

# Tıbbi Biyolojide **Yeni** Yaklaşımlar

Editor  
**Ferit KARGIN**

## **BİDGE Yayınları**

Tıbbi Biyolojide Yeni Yaklaşımlar

**Editör:** Prof. Dr. Ferit KARGIN

ISBN: 978-625-372-479-5

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.12.2024

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

[www.bidgeyayinlari.com.tr](http://www.bidgeyayinlari.com.tr) - [bidgeyayinlari@gmail.com](mailto:bidgeyayinlari@gmail.com)

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /  
Ankara



## İçindekiler

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| Epilepsi.....                                                 | 4   |
| Hava YILDIRIM .....                                           | 4   |
| Ender COŞKUNPINAR .....                                       | 4   |
| Mehmet YILDIRIM .....                                         | 4   |
| Oral Kanserler ve Kodlamayan RNA ’lar.....                    | 43  |
| Aleyna KAŞALTI .....                                          | 43  |
| Emine YAĞCI.....                                              | 43  |
| Cansu ÖZBAYER .....                                           | 43  |
| NETosis: Moleküler Mekanizması ve Kanserle İlişkisi .....     | 84  |
| Emine YAĞCI.....                                              | 84  |
| Kadmiyum ve Epigenetik Etkileri.....                          | 108 |
| Emrah TÜMER .....                                             | 108 |
| Epilepsi Genetiği ve miRNA’ların Önemi.....                   | 125 |
| Ender COŞKUNPINAR .....                                       | 125 |
| Hava YILDIRIM .....                                           | 125 |
| Mehmet YILDIRIM .....                                         | 125 |
| Nükleik Asit İzolasyon Teknikleri.....                        | 165 |
| Ruşen AVŞAR .....                                             | 165 |
| İyonize Radyasyon ve Canlılar Üzerindeki Etki Mekanizması ... | 196 |
| Elif DEMİR .....                                              | 196 |

# BÖLÜM I

## Epilepsi

**Hava YILDIRIM<sup>1</sup>**  
**Ender COŞKUNPINAR<sup>2</sup>**  
**Mehmet YILDIRIM<sup>3</sup>**

### Giriş

Epilepsi, tüm dünyada, popülasyonun yaklaşık %1'ini yani 70 milyondan fazla insanı etkileyen, spontan epileptik nöbetler oluşturmaya yönelik kalıcı bir yatkınlık ile karakterize, yaygın, nörolojik bir hastalıktır (Thijs & ark., 2019). Epilepsinin en güncel tanımı 2014 yılında ILAE' tarafından yapılmıştır. ILAE'ya göre epilepsi; nörobiyolojik, bilişsel ve psikososyal sonuçlara sahip olan

---

<sup>1</sup> Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Üsküdar/İSTANBUL, Orcid: 0000-0002-4234-7155, havayildirim55@gmail.com

<sup>2</sup> Prof. Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Üsküdar/İSTANBUL, Orcid: 0000-0002-1003-5544, ecoskunpinar@gmail.com

<sup>3</sup> Prof. Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD, Üsküdar/İSTANBUL, Orcid: 0000-0003-1798-5478, mehmetyildirim58@gmail.com

ve aşağıdaki 3 koşuldan en az birisi ile tanımlanan bir hastalıktır (Fisher & ark., 2014):

1) 24 saatten fazla arayla meydana gelen en az iki provoke edilmemiş nöbet (veya refleks),

2) Provoke edilmemiş bir nöbet (veya refleks) ve sonraki on yıl içinde meydana gelen iki provoke edilmemiş nöbetten sonra genel tekrarlama riskine sahip başka nöbet olasılığı (en az %60),

3) Epilepsi sendromu tanısı.

Hipokrat'ın epilepsiyi diğer hastalıklar gibi fizyolojik ilkelere dayandırmasına rağmen, oldukça güçlü olan toplumsal kabuller nedeni ile epilepsi için 16. yüzyıla kadar bilimsel ve tıbbi yeni bir tanımlama yapılamamıştır. Bohemyalı Dr. Marcus Marci (1595-1667) klinik gözlemlere dayanarak epilepsiyi, kişinin zihninde bozukluğa neden olan ve vücut kısımlarının tamamı, bir kısmı ya da sadece bir tanesinde kendi istekleri dışında harekete yol açan bir hastalık olarak tanımlamıştır (Temkin,1971; Patel & Moshé, 2020). İskoçyalı Dr. Willam Cullen (1710-1790), aydınlanma döneminde epilepsinin tanımını yine klinik gözlemlere dayanarak daha da geliştirmiş ve epilepsiyi *"istemli harekete ilişkin kaslarının büyük bir bölümünün konvülsiyonlarından oluşan, duyu kaybıyla birlikte görülen ve bir duyarsızlık ve uyku hali ile biten"* ve aynı zamanda *"daha kısmi kasılmaları da içerebilen: yani, vücudun yalnızca belirli kısımlarını etkileyen ve bu kasılmalara duyu kaybının eşlik etmediği veya epilepsinin her zaman olduğu gibi bir koma ile sonlanmadığı"* durum olarak tanımlamıştır (Eadie & Bladin, 2001). İngiliz nörolog John Hughlings Jackson (1835-1911) tarafından yapılan çalışmalar, epilepsinin bir nöbetin patofizyolojik nedenleri ile tanımlanmasını sağlamıştır (Patel & Moshé, 2020).

## 1. Epilepsinin tarihçesi

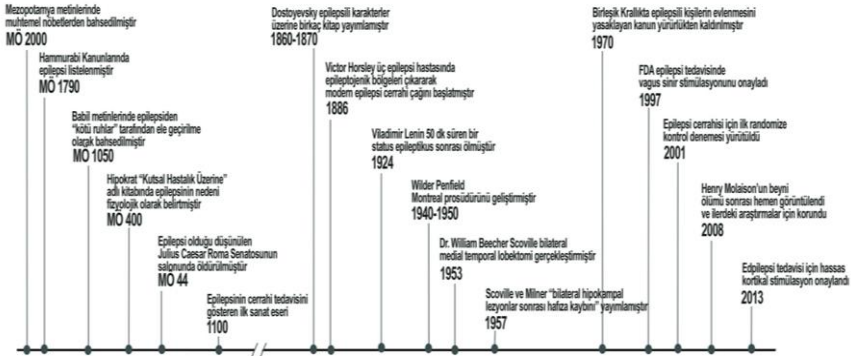
Epilepsi “*yakalanmak*” anlamına gelen Yunanca “*epilambanein*” kelimesinden türetilmiştir. Bu terim hem hastalığı hem de tek bir saldırıyı ifade etmek için kullanılmıştır (Temkin,1971). Geçmiş dönemlerde bazı toplumlarca epilepsili kişiler kirli veya kötü olarak kabul edilmekle kalmayıp damgalanmaya maruz kalmıştır (Patel & Moshé, 2020). Tarihsel yazıtlarda epilepsi hastalarına karşı bakışın ve bu hastalara ilişkin ilk tasvirlerin oldukça tatsız olduğu dikkate alındığında, insanlığın epilepsiye ilişkin görüşü zaman içerisinde önemli ölçüde gelişmiştir (Ali & ark., 2016). Bu duruma ilişkin ilk bilgilerden biri, Milattan Önce (M.Ö.) 2000 yılında Akad dilinde yazılmış bir Mezopotamya metninden gelmektedir. Metnin yazarı muhtemelen epileptik nöbet geçiren bir hastayı tanımlarken; “hastanın gözlerinin sonuna kadar açık, el ve ayaklarının gergin ve bilincinin kapalı olduğunu” belirttikten sonra yazar, bu durumu basit bir nedene bağlayarak “*günahın eli*” olarak tanımlamıştır (Magiorkinis, Sidiropoulou, & Diamantis, 2010). Epilepsinin etiyolojisinin günah veya kötülükle eşanlamlı olduğuna ilişkin tarihsel algı, uzun süre devam etmiştir. M.Ö. 1790 tarihli Hammurabi Kanunlarında satın alınan ve daha sonra epileptik nöbet geçirdiği tespit edilen köleler için bir “*iade maddesinin*” olduğu, yine M.Ö. 1090'lara ait bir Babil metninde “*kötü ruhlar*” tarafından ele geçirildiği söylenen epilepsi hastaları için manevi bir çözümün ana hatlarını çizdiği görülmektedir (Magiorkinis, Sidiropoulou, & Diamantis, 2010; Wilson & Reynolds, 1990). Epilepsinin etiyolojisinin ilahi bir nedenden dolayı değil, fizyolojik olduğuna dair şu andaki modern tıbbi görüşün kökeni büyük ölçüde batı tıbbının babası olarak kabul edilen Koslu Hipokrat'ın M.Ö. 400 yılında yazdığı “Kutsal Hastalık Üzerine” adlı

esere dayanmaktadır. Hipokrat, epilepsinin nedenini, o dönemde yaygın olarak kabul edilen ruhani olduğu yönündeki inanca karşı çıkarak diğerk hastalıklar gibi fizyolojik ilkelere dayandırmıştır (Ali & ark., 2016; Magiorkinis, Sidiropoulou, & Diamantis, 2010). Bununla birlikte epilepsinin nedeninin ruhani olduğuna ilişkin güçlü inanış, Avrupa'daki tıp camiasının kutsal müdahalenin epilepsiyle herhangi bir ilgisinin olmadığına yönelik fikir birliğı geliştirdiğı 18. yüzyılın aydınlanma dönemine kadar 2000 yıl daha devam etmiştir (Cawthorne, 1958, Cohen & Squire, 1980).

Epilepsi, bazı tarihi şahsiyetlerin hayatlarını da etkilemiştir. Tarihsel sürece bakıldığında epilepsi ile anılan belki de en ünlü siyasi lider Gaius Julius Caesar (Jül Sezar)'dır. Sezar, M.Ö. 15 Mart 44'te Gaius Cassius Longinus ve Marcus Junius Brutus tarafından planlanan ve Roma Senatosu'nda bir grup soylu tarafından desteklenen suikast sonucu öldürölmüştür. Sezar'ın ilerleyen yaşlarda açıklanamayan yere düşmelerden giderek daha fazla muzdarip olması, geç başlangıçlı bir epilepsiye sahip olduğunu düşündüren yorumlara neden olmuştur. Mevcut bilgilere göre, bu epileptik durumun olası nedenleri arasında iyi huylu bir tümör, serebral tüberküloz, sıtma veya nörosistiserkoz yer almaktadır. Genellikle depresyonun da epilepsi ile ilişkili olması nedeni ile Sezar'ın karar verme yeteneğinin suikasttan önce bozulmuş olabileceğı ifade edilmiştir (Şekil 1.) (Ali & ark., 2016; Kanner & Nieto, 1999; Bruschi 2011).

Epilepsinin damgalanmaya yol açan ve olumsuz algı oluşturan bir hastalık olarak değerkendirildiğı geçmiş dönemlerde, özellikle kamu görevlilerinin hastalığını saklanmasına neden oluyordu (Ali & ark., 2016). 1640 yılında, dönemin Danimarka-Norveç Kralının oğlu Han Ulrik Gyldenlove, İspanya'ya yapılan resmi bir devlet ziyareti

sırasında nöbet geçirdiği için babası tarafından, utanç duyulduğu için erkenden eve geri göndermiştir (Bredsdorff, 2009). İsveç Prensi Erik ve Birleşik Krallık Prensi John, 1900'lü yılların başlarında epileptik nöbetleri nedeniyle kamuoyundan uzaklaştırılmış ve hayatlarının büyük bir bölümünü özel konutlarda geçirmişlerdir (Reynolds 2003). Epilepsinin siyasi liderlerin karar verme yetisini doğrudan etkilediği durumlarda yol açtığı sonuçlar, tüm toplumu da etkileyecek tarzda çok daha büyük ve yıkıcı olmaktaydı. I. Napolyon olarak da bilinen ve 1804-1814 yılları arasında Fransa İmparatorluğu yapan Napoléon Bonaparte (Napolyon Bonapart)'ın bir gonore enfeksiyonu nedeniyle ileri düzeyde epileptik nöbetler geçirdiği tahmin edilmektedir (Hughes, 2003). Epilepsi hastası olan Sovyetler Birliği'nin ilk Başbakanı Vladimir Lenin'in 1924'te 50 dakika süren bir status epileptikus sonrasında ölmesi Sovyetler Birliği'ni siyasi bir kaosa sürüklemiştir (Şekil 2.) (Lerner, Finkelstein & Witztum, 2004).



**Şekil 1:** Epilepsi tarihindeki önemli olaylara ilişkin zaman çizelgesi

Kaynak: Ali vd., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır

## 2. Epilepsinin tanımlanması

Elektroensefalogram (EEG)'in kullanımıyla epilepsi, belirli bir nöbet tipinden veya çok sayıda farklı nöbet tipinden oluşan bir hastalık olarak tanımlanmaya başlandı. Fransız nörolog ve epileptolog Henri Gastaut (1915-1995), başlıca insan EEG modellerini tanımladı ve spesifik epilepsi sendromlarının tanımlanmasına odaklanmıştır. Çalışmaları, fotoparoksizmal epilepsi, irkilme epilepsisi, hemikonvülsif-hemiplejik epilepsi, epilepsili çocukların şiddetli ensefalopatisi (Lennox-Gastaut sendromu) ve çocukluk çağının iyi huylu oksipital epilepsisi dahil olmak üzere birçok önemli sendromun tanımlanmasını sağlamıştır (Patel & Moshé, 2020; Millett, 2010; Panteliadis & ark, 2017).

Epilepsiye ilişkin yeni keşifler, epilepsinin bir “hastalık” ve nöbetlerin ise “semptom” olarak kabul edilmesini, dolayısıyla nöbet ve epilepsi arasındaki ayrım ve sınırların daha da netleştirilmesini sağlamıştır. Bu ayrım ayrıca Gastaut'un hem nöbetleri hem de epilepsileri sınıflandırmasıyla daha da netleşmiştir (Gastaut, 1969). Epileptik sendrom kavramı 1981 yılında yayımlanan sınıflandırmada, tipik olarak birlikte ortaya çıkan, klinik veya yardımcı çalışmalarla saptanabilen, bir dizi belirti ve semptomla karakterize epileptik bir bozukluk olarak tanımlanmıştır (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1985). 2001 yılında “ILAE Sınıflandırma ve Terminoloji Görev Gücü” tarafından tanıtılan “İktal Semiyoloji için Tanımlayıcı Terminoloji Sözlüğü”nde “epilepsi” terimi için “tekrarlayan epileptik nöbetlerle karakterize kronik nörolojik bir bozukluk” tanımı yapılmıştır (Blume & ark, 2001). 2005 yılında ILAE ve Uluslararası Epilepsi Bürosu (IBE) epilepsiyi, “epileptik nöbetler oluşturmaya yönelik kalıcı bir yatkınlık ve bu durumun

nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize olan bir beyin bozukluğu” olarak tanımlanma noktasında fikir birliğine varmıştır. Bu tanım, en az bir epileptik nöbet oluşumunu ve nöbetin “provokasyonsuz” olmasını gerektirmemektedir (Fisher & ark, 2005). 2014 yılında önerilen en güncel tanım, “bozukluk” terimini “hastalık” ile değiştirmenin yanı sıra, provoke edilmiş ve provoke edilmemiş nöbetlerin kesin olmayan sınırlarını da kabul ederek, tedaviyi yapan hekime belirli bir durumda tekrarlama riskini belirleme konusunda herhangi bir yük getirmemiştir (Fisher & ark, 2014).

### **3. Epilepsi ve nöbetlerin sınıflandırılması**

20. yüzyılın başlarında henüz ILAE kurulmadan önce, epilepsi ve nöbetleri sınıflandırmak için tek tip bir sistem bulunmamaktaydı. 19. yüzyılın başlarında, Paris hastanelerinde çok veya daha az şiddetli atakları ayırt etmek için “grand mal” ve “petit mal” terimleri kullanılmış ve sonunda bu terimler standart hale gelmiştir (Temkin, 1994). Bununla birlikte bu terimler belirsizdi ve hangi nöbetlerin “grand mal” veya “petit mal” olarak değerlendirilmesi gerektiğine ilişkin herhangi bir kılavuz bulunmamaktaydı. Epilepsinin klinik araştırmaları genişledikçe ve yeni tedaviler ortaya çıkmaya başladıkça, tek tip terminoloji ve sınıflandırmanın bir zorunluluk olduğu anlaşılmıştır (Varnado & Price, 2020).

Nöbetlere ilişkin ilk sınıflandırma kılavuzu ILAE tarafından 1969 yılında oluşturulmuş ve nöbetler “parsiyel” ve “jeneralize” şeklinde iki ana gruba, parsiyel nöbetler de daha sonra “basit parsiyel” ve “kompleks parsiyel” şeklinde iki alt gruba ayrılmıştır. 1981 ve 2001 yıllarındaki revizyonlarda, bu olayların sadece bir nöbetin “parçası” olarak kabul edilmesinin yanlış

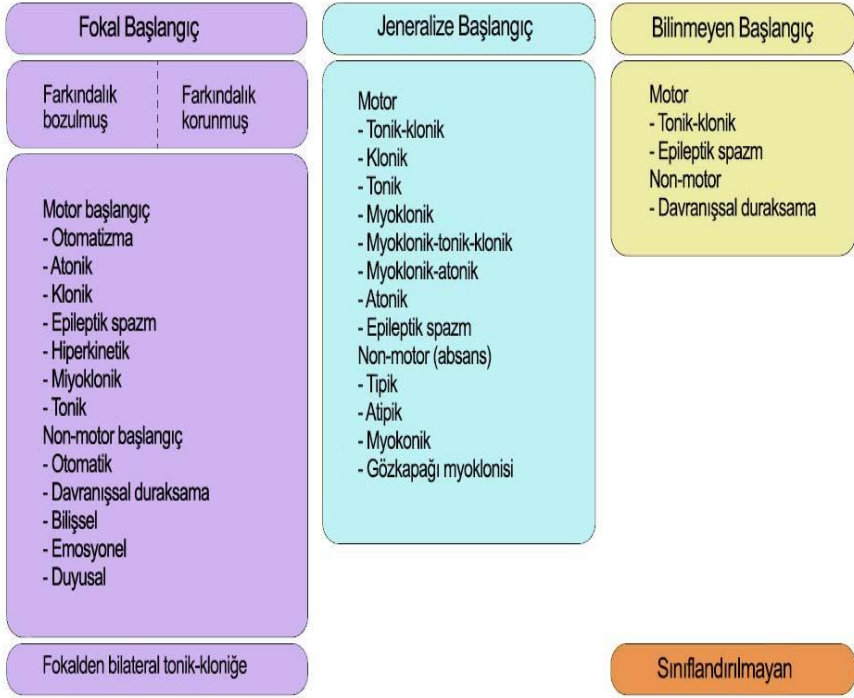
anlaşılabileceğinden dolayı “parsiyel” yerine “fokal” terimi tartışılmıştır (Engel, 2001). Terimler, “bilinç bozukluğu olmayan”, “bilişsel özellikleri olmayan” ve “bilateral hale gelen” şeklindeki alt kategorilerin, “basit parsiyel” ve “kompleks parsiyel” şeklindeki alt kategorilere dönüşümünü kapsayan “parsiyel nöbetler” şeklindeki adlandırmanın “fokal nöbetler” şeklinde yeniden adlandırıldığı 2010 yılındaki kurumsal revizyona kadar birbiri yerine kullanılmıştır (Berg & Millichap, 2013). Farklı epilepsi tipleri için ilk kılavuz 1985'te ILAE tarafından oluşturulmuştur. Bu sınıflandırmada “lokalizasyonla ilişkili” (fokal veya parsiyel ile benzer) ve “jeneralize” epilepsiler şeklindeki iki ana grup altında “idiyopatik”, “semptomatik” veya “kriptojenik” etiyojisine göre alt sınıflandırmalar yapılmıştır (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1985). Bu terimler, etioloji veya epileptik sendromlara dayalı bireysel tanı lehine 2010 yılında yapılan revizyona kadar kullanılmıştır (Varnado & Price, 2020; Berg & Millichap, 2013).

Nöbet geçiren bir hastaya tanı konma sürecinde birkaç kritik adım üzerinden ilerlenmektedir. Bir nöbeti sınıflandırmaya çalışmadan önce, paroksizmal olayın gerçekten bir epileptik nöbet olup-olmadığı ve ayırıcı tanının mümkün olup-olmadığının belirlenmesi gerekir. Bunlara konvülsif senkop, parasomniler, hareket bozuklukları ve diğer epileptik olmayan olaylar dahildir. Bu konuya ilişkin olarak, ILEA'nın epilepsilerin en yeni çevrimiçi tanı kılavuzunu içeren web sitesinin <https://www.epilepsydiagnosis.org/epilepsy-imitators.html> adresinden epilepsiyi taklit eden durumlara ulaşılabilir (Scheffer & ark, 2017).

“Nöbet tipinin” teşhisi, epilepsi sınıflandırma çerçevesinin başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Burada klinisyenin epileptik nöbet için kesin bir tanı koyduğu varsayıldığı için epileptik durumu epileptik olmayan olaylardan ayırt etmek için bir tanı algoritması öngörülmemiştir (Goodkin & ark, 2007). “Nöbet tipi sınıflandırmasında” nöbetler, fokal başlangıç, jeneralize başlangıç ve belirlenemeyen şeklinde 3 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.; Şekil 3.) (Fisher & ark, 2017).

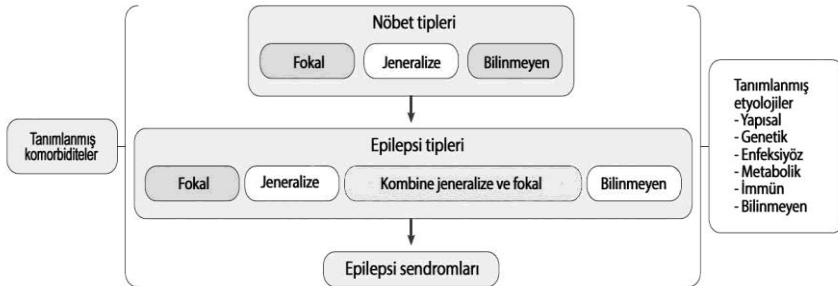
Epilepsilerin sınıflandırılmasına ilişkin olarak en son sınıflandırma yine ILEA tarafından 2017 yılında yapılmıştır. Bu yeni “epilepsi sınıflandırması”, epilepsiyi farklı klinik ortamlarda sınıflandırmak için tasarlanmış çok seviyeli bir sınıflandırma sistemidir. Bu yeni sistemde mümkünse, bireyin epilepsisinin etiyolojisi ile, her 3 düzeyde de bir tanı aranması gerekmektedir. Bahsedilen bu çok seviyeli sınıflandırma sistemini oluşturan 3 ayrı düzey şunlardır (Şekil 3.) (Scheffer & ark, 2017).:

- 1.Nöbet tipi
- 2.Epilepsi tipi
3. Epilepsi sendromu



**Şekil 2:** ILAE 2017'ye göre nöbet tiplerinin genişletilmiş sınıflandırması

Kaynak: Fisher vd., 2017'den değiştirilerek alınmıştır



**Şekil 3:** Epilepsilerin sınıflandırılması için çerçeve

Kaynak: Scheffer vd., 2017'den değiştirilerek alınmıştır

“Epilepsi tipinin” teşhisi epilepsi sınıflandırmasının ikinci düzeyini oluşturmaktadır. 2014 tanımına göre hastanın epilepsi tanısı aldığı varsayılmaktadır (Fisher & ark, 2014). “Epilepsi tipi” düzeyi, iyi bilinen “jeneralize epilepsi” ve “fokal epilepsiye” ilave olarak yeni bir “kombine fokal ve jeneralize epilepsi” kategorisini de içermektedir. Ayrıca “bilinmeyen” şeklinde bir kategori bulunmaktadır. Birçok epilepsi, birden fazla nöbet tipini kapsayabilmektedir. Jeneralize epilepsi teşhisi için, hasta EEG'de tipik olarak yavaş jeneralize spike-dalga aktivitesi gösterecektir. Jeneralize epilepsili bireyler, absans, miyoklonik, atonik, tonik ve tonik-klonik nöbetler dahil olmak üzere bir dizi nöbet tipine sahip olabilir. Jeneralize epilepsi tanısı, tipik interiktal EEG deşarj bulgusu ile desteklenen klinik gerekçelerle konulmaktadır. Fokal epilepsiler, tek odaklı ve çok odaklı bozuklukların yanı sıra bir hemisferi kapsayan nöbetlerle ilgilidir. Bilincin korunduğu fokal nöbetler, bilincin bozulduğu fokal nöbetler, fokal motor nöbetler ve fokal non-motor nöbetler gibi bir dizi nöbet tipi görülebilmektedir (Scheffer & ark, 2017). “Bilinmeyen” terimi, hastanın epilepsi olduğunun anlaşıldığı, ancak yeterli bilgi olmadığı için klinisyenin epilepsi tipinin fokal mi yoksa jeneralize mi olduğunu belirleyemediği durumları belirtmek için kullanılır. Bu durum EEG'ye erişimin olmaması gibi çeşitli nedenlere bağlı olabilir (Şekil 3.) (Scheffer & ark, 2017).

“Epilepsi sendromunun” teşhisi epilepsi sınıflandırmasının üçüncü düzeyini oluşturmaktadır. Genellikle başlangıç yaşı ve remisyon (varsa), nöbet tetikleyicileri, günlük değişkenlik ve bazen prognoz gibi yaşa bağlı özelliklere sahiptir (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1985; Commission on Classification and Terminology of

the International League Against Epilepsy, 1989). Çocukluk çağı absans epilepsisi, West sendromu ve Dravet sendromu gibi iyi bilinen birçok sendrom vardır, ancak ILAE tarafından hiçbir zaman resmi bir sendrom sınıflandırması yapılmadığına dikkat edilmelidir (Şekil 3.) (Berg & ark, 2010).

#### **4. Epilepsinin epidemiyolojisi**

Epilepsi, nörolojik bozukluklar arasında görülen en yaygın üçüncü hastalıktır (Devinsky & ark, 2018). Epilepsi dışında, insanların yaklaşık %10'u hayatları boyunca en az bir nöbet geçirmektedir (Hauser & Beghi, 2008). Düşük ve orta gelirli ülkelerde epilepsinin hem prevalans hem de insidansı yüksek gelirli ülkelere göre daha yüksek bir eğilim göstermekle birlikte, dünya genelinde ortalama epilepsi prevalansının 6.4/1000 ve yıllık insidansının ise 67.8/100000 olduğu tespit edilmiştir (Fiest & ark, 2017). Düşük ve orta gelirli ülkelerdeki epilepsi prevalans ve insidansındaki yüksekliğin trafik kazaları, doğum yaralanmaları ve nöroenfeksiyöz bozuklukların bu ülkelerde daha sık görülmesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (Singh & Trevick, 2016).

Epilepsiye ilişkin risk faktörleri yaş grubuna göre değişmektedir. Beyinin gelişimsel malformasyonları genellikle erişkinlik öncesi gelişen epilepsi ile ilişkili iken, kafa travması, enfeksiyonlar ve tümörlerle ilişkili epilepsi her yaşta ortaya çıkabilmektedir. Serebrovasküler hastalık yaşlılarda en sık görülen risk faktörüdür. Plasmodium falciparum nedenli sıtma, nörosistiserkoz ve onkoserkiazis gibi paraziter durumlar dünya genelinde epilepsi için en yaygın risk faktörleri arasında olduğu için coğrafi konumda risk faktörleri bakımından önemli görünmektedir (Thijs & ark, 2019; Chen & ark, 2018). Yüksek gelirli ülkelerde,

epilepsi hastalarının 2/3'ten fazlası genellikle antiepileptik ilaçlarının yaygın kullanımına bağlı iyi bir prognoz ile tanıdan hemen sonra uzun süreli remisyona ulaşmaktadır. Düşük gelirli ülkelerdeki birçok insanın ilaçsız uzun süreli remisyona girmesi bazı hastalardaki prognozun ilaçtan bağımsız olduğu fikrini desteklemektedir (Kwan & Sander, 2004; Bell & ark, 2016). Epilepsi hastalarının 1/3'ünde nöbetler ilaca dirençlidir. Antiepileptik ilaç sayısındaki artışın insanları nöbetlerden arındırma bakımından yalnızca küçük bir fayda sağladığı düşünülmektedir (Chen & ark, 2018). İlaça dirençli epilepsili hastaların gerçek sayısının öngörülenden daha fazla olduğu tahmin edilmektedir.

## **5. Epilepsinin patofizyolojisi**

Epileptogenez sürecine ilişkin mekanizmalar, nöronal devrelerde işlev bozukluğuna yol açan moleküler ve yapısal değişiklikleri kapsamaktadır (Devinsky & ark, 2018). Çoğu mekanizma spontan nöbetlerin başlamasından önce belirli bir zaman sürecinde meydana gelirken, bazı mekanizmalar hastalığın ilerlemesi sırasında devam etmektedir. Nörolojik fonksiyon bozukluğu çoğunlukla spontan nöbetlerin ortaya çıkmasından önce meydana gelmektedir ve epilepsi ile komorbidit bazı problemlerin altında ortak mekanizmalar yatabilmektedir (Ravizza & ark, 2017).

Epilepsi nedeniyle ameliyat edilen hastalar ile genetik ve travma kaynaklı epilepsi modellerinde beyin dokusundaki epileptojenik bölgede reaktif gliosis oluşmaktadır (Devinsky & ark, 2013). Glial hücre fenotipindeki değişiklikler nedensel olarak epileptogenez ile bağlantılı bulunmuştur (Robel & ark, 2015). Aktive olmuş astrositler, gap junction (geçit bağlantısı) konneksinlerinin, glutamat taşıyıcılarının, potasyum kanallarının

(örn., Kir4.1) ve aquaporin-4 kanallarının (Devinsky & ark, 2013) down regülasyonu dahil olmak üzere nöronal ağın hipereksitabilitesini artırabilmekte ve katyonun-klor birlikte taşıyıcılarının (kotransporter) nöronal ekspresyonunda değişime neden olabilmektedir (Robel & ark, 2015). Astrositlerde azalmış glutamin sentetaz (glutamatı glutamine dönüştüren enzim) aktivitesi ile beyindeki glutamaterjik ve GABAerjik nöronlarda glutamat ve GABA dengesinin bozulması ve astrositlerde artan adenosin kinaz aktivitesinin (pürin ribonükleosit adenosini 5'-AMP'ye dönüştürerek adenosin seviyelerini düzenleyen enzim) sinapsların çevresindeki inhibitör adenosini azaltması spontan nöbetlere neden olabilmektedir (Boison, 2016). Status epileptikusun başlangıcından birkaç dakika sonra tespit edilebilen mikroglia aktivasyonu, epileptogenez sırasında meydana gelen en erken hücresel olaylardan birisidir (Eyo, Murugan & Wu, 2017). Mikroglialar nöbet kaynaklı nörodejenerasyonla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte lezyon gelişmeyen nöbet modellerinde gösterildiği gibi mikroglial aktivasyon için nöronal hücre kaybının gerekli olmadığı ifade edilmiştir (Dubé & ark, 2010).

## **6. Satus epileptikus**

ILAE status epileptikusu, nöbetin kendi kendini sınırlamasından sorumlu mekanizmaların başarısızlığından veya atipik olarak uzun süreli nöbetlere yol açan mekanizmaların başlamasından kaynaklanan bir durum olarak tanımlamıştır. Status epileptikus, nöbet tipine ve süresine bağlı olarak nöronal hasara veya ölüme neden olabilen veya nöronal ağlarının değişmesine yol açabilecek uzun vadeli sonuçlar oluşturabilen bir durumdur (Trinka & ark, 2015; Ascoli & ark, 2021). Status epileptikusun tıbbi yönetimi kapsamında, hava yolu, solunum ve dolaşımın

değerlendirilmesi, periferik intravenöz erişimin sağlanması ve epileptik nöbetleri durdurmak için hızlı bir antiepileptik ilaç tedavisinin başlanmasını kapsayan acil nörolojik yaşam desteği yer almaktadır (Claassen, Riviello & Silbergleit, 2015).

Ortalama 10-30/100.000 düzeyinde bir insidansa sahip olan status epileptikus, yoğun bakım ünitelerine yapılan başvuruların en az %1'lik bölümünü oluşturmaktadır (Sanchez & Rincon, 2016). Tıbbi komorbiditeye, nonkonvulsif status epileptikusun varlığına ve nöbetlerin nedenine bağlı olarak yaklaşık %8-65 düzeyinde bir mortalite oranı sergileyebilmektedir (Brophy & ark, 2012). Status epileptikusa ilişkin yıllık doğrudan yatan hasta maliyetlerinin Almanya'da 83 milyon eurodan fazla, ABD'de ise 4 milyar dolarından fazla olduğu tahmin edilmektedir (Penberthy & ark, 2005; Strzelczyk & ark, 2013).

Status epileptikusun patofizyolojisinin büyük bir bölümü halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, status epileptikusun altında yatan temel mekanizmaların aydınlatılmasına önemli katkılar sunmuştur. Status epileptikus gelişiminde çok sayıda moleküler ve hücresel süreç yer almakla birlikte temel sorun endojen mekanizmaların bir nöbeti sonlandırmadaki yetersizliğidir. Bu yetersizlik bir nöbet sırasındaki aşırı düzeydeki anormal uyarılmadan veya endojen inhibitör mekanizmaların kaybından kaynaklanabilmektedir (Betjemann & Lowenstein, 2015). Nöbetin başlamasından sonraki ilk milisaniye veya saniyeler içerisinde nörotransmitter salınımı, iyon kanallarının açılıp-kapanması ve protein fosforilasyonu uzayan bir nöbet için zemin hazırlamaktadır (Chen, Naylor & Wasterlain, 2007). Bu moleküler olayları inhibitör GABA<sub>A</sub> reseptörünün  $\beta 2/\beta 3$  ve  $\gamma 2$  alt birimlerinde endositoz aracılı

azalma ve uyarıcı NMDA reseptörlerinde artış dahil olmak üzere reseptör düzeyinde değişiklikler izlemektedir (Naylor & ark, 2013; Goodkin & ark, 2007). GABA<sub>A</sub> reseptör modülasyonundaki bu değişimin status epileptikus devam ettikçe daha belirgin hale gelen benzodiazepin farmako-direncine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Jones & ark, 2002). Status epileptikustan sonraki günler ve haftalarda meydana gelen genetik ve epigenetik değişikliklere yönelik analizler, status epileptikus sonrası epileptogenez sürecine katkıda bulunabilecek çok sayıda genin ekspresyonunda hem artış hem de azalma olduğunu ortaya koymuştur (Roopra, Dingledine & Hsieh, 2012). Örneğin status epileptikusun fare modelinde hipokampal hücre DNA metilasyonunda, genomik boyuttaki değişimleri kapsayan epigenetik değişiklikler gösterilmiştir (Şekil 4.). (Miller-Delaney & ark, 2012). Bu bağlamda transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'nın değişen regülasyonunun da epileptogenezde ve status epileptikus kaynaklı nöronal hasarda rol oynadığı ifade edilmiştir (Jimenez-Mateos & Henshall, 2013).

|                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Milisaniyeler-saniyeler</b><br><b>1. Aşama</b><br> | <b>Protein fosforilasyonu</b><br><b>İyon kanalının açılması-kapanması</b><br><b>Nörotransmitter salınımı</b>                                                                                                                                                         |
| <b>Saniyeler-dakikalar</b><br><b>2. Aşama</b><br>     | <b>Reseptör trafiği</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• İnhibitör GABAA <math>\beta 2/ \beta 3</math> ve <math>\gamma 2</math> alt birimlerinde azalma</li> <li>• Eksitator NMDA reseptöründe artış</li> <li>• Eksitator AMPA reseptöründe artış</li> </ul> |
| <b>Dakikalar-saatler</b><br><b>3. Aşama</b><br>       | <b>Nöropeptid ekspresyonu</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eksitator P maddesinde artış</li> <li>• İnhibitör nöropeptid Y'nin yetersiz yer değiştirmesi</li> </ul>                                                                                       |
| <b>Günler-haftalar</b><br><b>4. Aşama</b><br>         | <b>Genetik ve epigenetik değişimler</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gen ekspresyonu</li> <li>• DNA metilasyonu</li> <li>• mikroRNA'nın düzenlenmesi</li> </ul>                                                                                          |

**Şekil 4:** Tek bir nöbetin, status epileptikusa geçişinde rol oynayan mekanizmalar dizisi

*Kaynak: Betjemann ve Lowenstein, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır (51)*

Status epileptikus konvülsif, nonkonvülsif ve elektrografik tiplerde ortaya çıkabilmektedir. Konvülsif status epileptikus ekstremitelerin tonik, klonik veya tonik-klonik hareketleri ile karakterizedir. Nonkonvülsif status epileptikus kesin olarak tanımlanmamakla birlikte EEG'de epileptiform deşarjlarla karakterize uzun süreli nöbet aktivitesidir. Hem fokal hem de jeneralize formları mevcut olan nonkonvülsif status epileptikus, bazı hastalarda bariz motor belirtiler olmaksızın davranış veya bilinç değişikliği ile ortaya çıkmaktadır (Meierkord & Holtkamp, 2007).

Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE)'nin 2015 yılı sınıflandırmasına göre konvülsif status epileptikus, 5 dakikadan daha uzun süren, bilateral tonik-klonik nöbet aktivitesiyle karakterize yaşamı tehdit eden nörolojik bir acil durum olarak tanımlanmıştır (Lu & ark, 2020). Amerika Birleşik

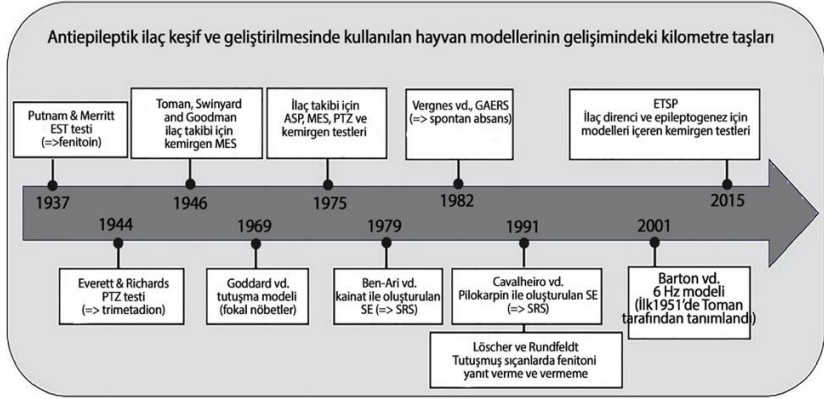
Devletleri (ABD)'nde her yıl acil servislere ortalama bir milyon nöbetle ilgili başvuru yapılmaktadır. Bu durum nörolojik sorunlara yönelik acil servis ziyaretlerinin yaklaşık %20'sini ve tüm acil servis başvurularının %1'ini oluşturmaktadır (Pallin & ark, 2008; Farhidvash & ark, 2009). Nöbetle ilgili gerçekleşen yıllık ortalama 1.000.000 başvurunun 200.000'i status epileptikusun tanımlayıcı özelliği olan 5 dakikadan daha uzun süren veya hızla tekrarlayan nöbet vakalarına ilişkindir (Claassen & Goldstein, 2017). Uzun süreli nöbetler daha yüksek mortalite ve daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (Scholtes, Renier & Meinardi, 1994). Bu kapsamda ABD'de sinir sistemini etkileyen zehirlenmelere bağlı olarak gelişen status epileptikustan yılda 22.000-42.000 aralığında değişebilen oranlarda insanın öldüğü ve status epileptikusun henüz çözülmemiş bir terapötik zorluk olmaya devam ettiği bildirilmiştir (DeLorenzo & ark, 1996; Chen & Wasterlain, 2006).

Konvülsif status epileptikusun nöronal hasara neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Babunlarda indüklenen konvülsif nöbetlerin hipertermi, hipotansiyon ve hipoksiye yol açtığı ve bu durumların da talamus, hipokampus ve neokortekste nöronal hasara neden olduğu bildirilmiştir (Meldrum & Horton, 1973). Status epileptikusa ilişkin farklı hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda eksitotoksisite, nekroz, apoptoz ve mitokondriyal disfonksiyon dahil olmak üzere nöronal hücre ölümü ve hasarına katkıda bulunabilecek çok sayıda potansiyel mekanizma tanımlanmıştır (Sankar & ark, 1998; Lopez-Meraz, Niquet & Wasterlain, 2010). Status epileptikus sonrası insanlarda da nöronal hasar ve hücre ölümünün gerçekleştiğini kanıtlayacak deliller artmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda nöronal hasarın bir

belirteci olan nörona özgü serum enolaz düzeyinin hem konvülsif hem de nonkonvülsif status epileptikustan sonra yükseldiği bildirilmiştir (DeGiorgio & ark, 1996; DeGiorgio & ark, 1996).

## **7. Antiepileptik ilaçların etki mekanizmaları**

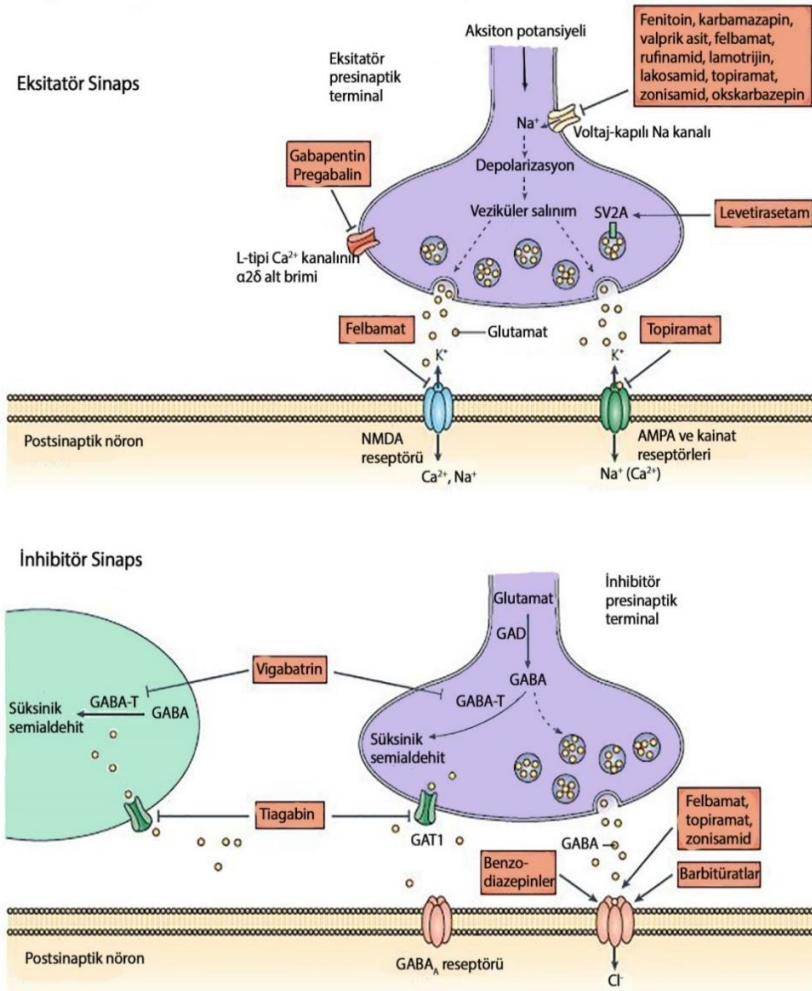
Epileptik nöbetlere ilişkin temel tedavi yaklaşımı antiepileptik ilaç kullanımına dayanmaktadır. Antiepileptik ilaçların geliştirilmesinde deneysel epilepsi modellerinden faydalanılmaktadır (Şekil 5.). Uygun şekilde seçilen antiepileptik ilaçların hastaların %60-70'inde yeterli nöbet kontrolü sağladığı bildirilmiştir (Kwan & Brodie, 2000). Epilepside terapötik bir yaklaşım tasarlanırken, daha az yan etki nedeniyle tek bir ilacın (monoterapi) kullanılması tercih edilmesine rağmen hastaların yaklaşık %30'u kontrolsüz nöbetler geçirmeye devam etmekte ve çoğu zaman birden fazla antiepileptik ilaç aynı anda kullanılmaktadır. İki veya daha fazla uygun tipte antiepileptik ilaç kullanımına rağmen nöbet kontrolü sağlanamayan kişilerin ilaca dirençli epilepsi hastası olduğu kabul edilmektedir (Kwan & Brodie, 2004; Hakami, 2021). Antiepileptik ilaçlar yaklaşık 40 yıldan fazla bir süre önce klinik uygulamaya girmiştir. Monoterapi olarak karbamazepin ve valproat gibi daha eski antiepileptik ilaçlar ile tedavi edilen kişilerin %30-40'ında tedavi başarısızlığına katkıda bulunabilecek yan etkilerin geliştiği bildirilmiştir (Mattson & ark, 1985). İlk kullanılan antiepileptik ilaçlardaki kısıtlı ve yan etkiler dikkate alınarak son 30 yılda farklı moleküler mekanizmalara ve farmakokinetiğe sahip ikinci ve üçüncü kuşak yaklaşık 20 yeni antiepileptik ilaç kullanıma girmiştir (Hakami, 2021; Stephen & Brodie, 2011).



**Şekil 5:** Antiepileptik ilaçların keşfi ve incelenmesinde kullanılan hayvan modellerinin geliştirilmesine ilişkin kilometre taşları

Kaynak: Löscher, 2017'den değiştirilerek alınmıştır

Antiepileptik ilaçlar, daha eski olan birinci kuşak, daha yeni olan ikinci ve üçüncü kuşak ilaçlar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Birinci kuşak antiepileptik ilaçlardan 40 yılı aşkın bir süre önce klinik uygulamaya girenler arasında fenobarbital, fenitoin, primidon, etosüksimit, valproat, karbamazepin, klonazepam ve klobazam yer almaktadır. İkinci kuşak antiepileptik ilaçlar 1980'lerin sonundan itibaren kronolojik sırayla vigabatrin, okskarbazepin, lamotrijin, gabapentin, felbamat, topiramet, tiagabin, levetirasetam ve zonisamid şeklinde kullanıma girmiştir. Üçüncü kuşak antiepileptik ilaçlar arasında pregabalın, fosfenitoin, lakozamid, rufinamid, eslikarbazepin, retigabin (veya ezogabin), perampanel, brivarasetam, kannabidiol, stiripentol, senobamat ve fenfluramin bulunmaktadır (Hakami, 2021; Marson & ark, 1997).



**Şekil 6:** Antiepileptik ilaçların eksitator ve inhibitör sinapslardaki etki mekanizmaları

Kaynak: Bialer ve White, 2010'dan değiştirilerek alınmıştır

Antiepileptik ilaçların temel etki mekanizması eksitasyonun azaltılması veya inhibisyonun güçlendirilmesine yöneliktir. Bazı antiepileptik ilaçlar ise bu iki etki yolağının her ikisini de aktive etmektedir. Eksitasyonun azaltılması veya baskılanması, sodyum ve

kalsiyum kanalları gibi intrinsek uyarılabilirlik mekanizmaları üzerinden veya glutamatın AMPA ve NMDA reseptörleri ile sinaptik vezikül proteini 2A (SV2A) gibi uyarıcı sinaptik iletim mekanizmaları üzerinden sağlanabilir. İnhibisyonun güçlendirilmesi ise GABA'nın kullanılabilirliği veya GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin aktivasyonundaki artış ile gerçekleştirilebilir. Bu bağlamda antiepileptik ilaçların hedefleri arasında voltaj-kapılı sodyum kanallarının blokajı, kalsiyum kanallarının blokajı, GABA ile ilgili hedeflerin güçlendirilmesi, glutamaterjik iletimin zayıflatılması ve diğer bazı spesifik mekanizmalar yer almaktadır (Şekil 6.) (Hakami, 2021).

Antiepileptik ilaçlardan karbamazepin, senobamat, lakozamid, lamotrijin, fenitoin ve zonisamid eksitator ve inhibitör sinaptik iletileri doğrudan etkilemek yerine nöronal membranlarda voltaj-kapılı sodyum kanallarını bloklayarak aksiyon potansiyeli oluşumunu azaltmaktadır. Topiramid de kısmen bu mekanizma ile etki ederken fenobarbital ve valproat ise yüksek dozlarda sodyum kanallarını etkilemektedir (Sills & Rogawski, 2020). Etosüksimid, talamokortikal nöronlarda düşük voltajla aktiflenen voltaj-kapılı T-tipi kalsiyum kanallarını inhibe etmektedir. Valproat da benzer etki gösterebilmektedir. Gabapentin ve pregabalin, voltaj-kapılı kalsiyum kanalının  $\alpha 2\delta$  alt birimine bağlanarak uyarıcı sinapslarda glutamat salınımını azaltmaktadır (Hakami, 2021). Benzodiazepinler GABA<sub>A</sub> reseptörlerini açarak GABA'nın yaptığı gibi hücre içeresine klorür iyon akımına neden olmaktadır. Fenobarbital ve diğer barbitüratlar GABA aracılı klorür iyon kanalının açık kalma süresini uzatırken, bir GABA analogu olan vigabatrin, GABA'nın etkisini sonlandıran GABA transaminaz enzimini geri dönüşümsüz olarak inaktive etmektedir. Ayrıca

valproat da yüksek dozlarda GABA transaminazı inhibe edebilmektedir. Tiagabin, GABA taşıyıcısı GAT-1'i seçici olarak inhibe ederek GABA aracılı inhibitör sinaptik iletinin uzamasına neden olmaktadır. Felbamat ve topiramat, GABA'nın inhibitör etkilerini kolaylaştıran antiepileptik ilaçlar arasında yer almaktadır. Gabapentin ve pregabalin, GABA'nın yapısal analogları olmakla birlikte GABA aracılı nöronal mekanizmaları etkilemek yerine daha önce ifade edildiği gibi voltaj-kapılı kalsiyum kanalının  $\alpha 2\delta$  alt birimine bağlanarak glutamat salınımını azaltırlar (Sills & Rogawski, 2020). Levetirasetam veziküller üzerindeki SV2A reseptörlerine bağlanarak glutamatın ekzositozunu engellemektedir. Retigabin ise presinaptik sinir terminallerinde KCNQ2-5 (Kv7.2-Kv7.5) voltaj-kapılı potasyum kanalını açarak böylece glutamat salınımını inhibe etmektedir. Daha önce sıralanan etkilerine ilaveten valproat, voltaj-kapılı potasyum kanal geçirgenliğini artırarak hiperpolarizasyona neden olmaktadır. Perampanel, AMPA reseptör antagonisti olarak işlev görmektedir (Şekil 6.) (Hakami, 2021; Sills & Rogawski, 2020).

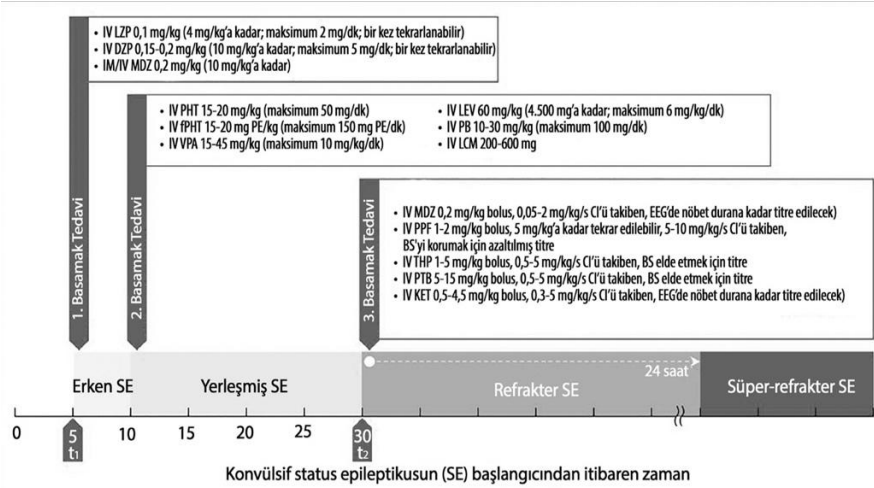
## **8. Status epileptikusta antiepileptik ilaç kullanımı**

Günümüzde epilepsi tedavisinde kullanılan 20'den fazla antiepileptik ilaç olmasına rağmen epileptik nöbetlerin yaklaşık %30'luk bölümü mevcut ilaçlarla kontrol altına alınamamaktadır. Epileptik nöbetler ile ilgili en ağır tablo status epileptikus tablosudur (Brophy, Bell & Claassen, 2012). Status epileptikusun tıbbi yönetimi; hava yolu, solunum ve dolaşımın değerlendirilmesi, periferik intravenöz erişimin sağlanması ve epileptik aktiviteyi durdurmak için hızlı bir tedavi gerektiren, kapsamlı ve acil nörolojik yaşam desteğinin bir parçasıdır (Claassen Riviello & Silbergleit, 2015). Status epileptikusun tedavisine yönelik farmakolojik

yaklaşımlar, gama aminobütirik asit (GABA) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin rollerinin daha iyi anlaşılmasıyla mümkün olabilecektir. Status epileptikusun patofizyolojisi bu nörotransmitter reseptörlerinin yeri ve alt birim kompozisyonundaki değişiklikleri kapsamaktadır. Bu değişiklikler spontan olarak devam eden nöbetleri desteklemekte ve status epileptikus devam ettikçe, status epileptikusun erken evrelerini tedavi etmek için kullanılan ilaçların etkinliğinin azalmasıyla sonuçlanmaktadır (Amengual-Gual, Sánchez Fernández & Wainwright, 2019). GABA'nın veziküler salınımına yanıt olarak fazik inhibitör akımlar üreten GABA<sub>A</sub> reseptörleri, benzodiazepinler ve diğer bazı antiepileptik ilaçların hedefidir (Goodkin, Yeh & Kapur, 2005; Naylor, Liu & Wasterlain, 2005). Diğer taraftan glutamat reseptörleri (özellikle NMDA) status epileptikus sırasında sinaptik zarda birikerek eksitasyonu artırmaktadır (Wasterlain & ark, 2009; Naylor & ark, 2013). Hem GABA hem de glutamat reseptörlerinin alt birim kompozisyonu bu reseptörlerin sinapstaki lokalizasyonlarını ve bağlanma özelliklerini düzenlemektedir (Naylor, 2010). Gelişmekte olan bir beyinin tekrarlayan nöbetlere maruziyeti GABA<sub>A</sub>, NMDA ve alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat (AMPA) reseptörlerinin bileşiminde değişime ve bu sayede uyarılabilirlikte artışa yol açmakta ve spontan olarak tekrarlayan nöbetleri teşvik etmektedir (Burnashev & ark, 1992; Wong, Chuang & Bianchi, 2002).

Klinik uygulamada, 5 dakikadan daha uzun süren jeneralize tonik-klonik nöbetlerin ve 10 dakikadan uzun süren bilinç bozukluğu olan veya olmayan fokal nöbetlerin status epileptikus olarak tedavi edilmesi gerektiği genel kabul görmektedir. 2016 yılında Amerikan Epilepsi Derneği tarafından çocuklar ve yetişkinlerde görülen konvülsif status epileptikusun tedavisine yönelik hazırlanan

kılavuza göre, status epileptikusun birinci basamak tedavisinde intravenöz lorazepam (LZP) veya diazepam (DZP) veya intramüsküler midazolam (MDZ) şeklinde bir benzodiazepin kullanımı öngörülmektedir. Bu seçenekler mevcut değilse, alternatif olarak rektal DZP, intranazal MDZ, bukkal MDZ veya intravenöz fenobarbital (PB) önerilmektedir (Glauser, Shinnar & Gloss, 2016). Nöbet devam ederse ikinci basamak tedavi için fenitoin (PHT), fosfenitoin (fPHT), valproat (VPA), levetirasetam (LEV) ve PB gibi uygun bir antiepileptik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu antiepileptik ilaçlardan PHT kardiyotoksisiteye neden olabileceği için intravenöz fPHT tercih edilmektedir. Kardiyotoksisitenin yansıra PHT'nin intravenöz uygulamasında, enjeksiyon bölgesinin distalinde ödem ve ağrının eşlik ettiği morumsu-siyah bir renk değişikliğinin meydana geldiği potansiyel olarak ciddi "mor eldiven sendromu" riski de bulunmaktadır. Oysa fPHT daha düşük bir mor eldiven sendromu insidansına sahiptir. İkinci basamak tedavide ayrıca intravenöz VPA veya intravenöz LEV veya alternatif olarak intravenöz PB (önceden verilmemişse) uygulanabilmektedir. Bununla birlikte PB uzun bir yarı ömre sahip olmasının yansıra şiddetli sedasyon, solunum depresyonu ve hipotansiyon gibi kalıcı yan etkilere neden olabilmektedir (Brigo & ark, 2019). İkinci basamak tedavi nöbetleri durduramazsa, genellikle diğer bir ikinci basamak ajan denenmektedir. Birinci ve ikinci basamak tedavilere rağmen en az 30 dakika daha nöbetler devam ederse veya nöbetler tekrarlanması durumunda tedaviye dirençli status epileptikustan söz edilebilmektedir ki bu durumda anestezi dozlarında PB, propofol (PPF), MDZ veya tiyopental (THP) kullanımı gerekmektedir (Şekil 7.) (Glauser, Shinnar & Gloss, 2016).



**Şekil 7: Konvülsif status epileptikus için farklı evrelerde tedavi seçenekleri**

*Kaynak: Kim vd., 2021'den değiştirilerek alınmıştır*

(t1: anormal derecede uzamış nöbetin başlangıcı, t2: uzun vadeli sonuçların başlangıcı. BS: bōrst-baskılama paterni, CI: sürekli infüzyon, DZP: diazepam, EEG: elektroensefalografi, fPHT: fosfenitoin, IM: intramüsküler, IV: intravenöz, KET: ketamin, LCM: lakozamid, LEV: levetirasetam, LZP: lorazepam, MD: midazolam, PB: fenobarbital, PE: fenitoin sodyum eşdeğeri, PHT: fenitoin, PPF: propofol, PTB: pentobarbital, SE: status epileptikus, THP: tiyopental, VPA: valproat)

## Sonuç

Dünya genelinde en yaygın olarak görülen nörolojik hastalıklardan biri olan epilepsi nöbetlerle karakterizedir. Nöbetler serabral korteksde ara sıra meydana gelen, ani olarak gelişen, hızlı ve düzensiz deşarjlar şeklinde ortaya çıkar. Epilepsinin etyolojisi, morbiditesi, doğal seyri ve prognozu toplumlar arasında farklılık gösterir. Gelişen teknoloji ve görüntüleme sistemleri aracılığıyla epilepsinin yapısal ve fonksiyonel neden ve sonuçlarına ilişkin sahip olduğumuz veriler günden güne artmaktadır. Ancak günümüzde bile vakaların yaklaşık yarısında nöbet etyolojisi hala bilinmemektedir.

Genomik teknolojideki gelişmelerden yararlanılarak yaygın epilepsi türlerinin karmaşık genetik yapısı açığa çıkarılmaya çalışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verileri epilepsi tanısı almış hastaların yaklaşık %70'inin uygun tedavi olanakları sağlandığında nöbetlerden kurtulabileceğini göstermektedir (WHO Epilepsy, 2019).

## KAYNAKÇA

Ali, R., Connolly, I. D., Feroze, A. H., et al., (2016). Epilepsy: A Disruptive Force in History. *World Neurosurgery*, 90, 685-690.

Amengual-Gual, M., Sánchez Fernández, I., & Wainwright, M. S. (2019). Novel drugs and early polypharmacotherapy in status epilepticus. *Seizure*, 68, 79–88.

Ascoli, M., Ferlazzo, E., Gasparini, S., Mastroianni, G., Citraro, R., Roberti, R., & Russo, E. (2021). Epidemiology and Outcomes of Status Epilepticus. *International journal of General Medicine*, 14, 2965–2973.

Bell, G. S., Neligan, A., Giavasi, C., et al. (2016). Outcome of seizures in the general population after 25 years: a prospective follow-up, observational cohort study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 87(8), 843–850.

Berg, A. T., & Millichap, J. J. (2013). The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 19(3 Epilepsy), 571–597.

Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., et al. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676–685.

Betjemann, J. P., & Lowenstein, D. H. (2015). Status epilepticus in adults. *The Lancet. Neurology*, 14(6), 615–624.

Bialer, M., & White, H. S. (2010). Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature reviews. Drug Discovery*, 9(1), 68–82.

Blume, W. T., Lüders, H. O., Mizrahi, et al. (2001). Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, 42(9), 1212–1218.

Boison D. (2016). Adenosinergic signaling in epilepsy. *Neuropharmacology*, 104, 131–139.

Bredsdorff, A. (2009). *The Trials and Travels of Willem Leyel: An Account of the Danish East India Company in Tranquebar, 1639–1648*. Museum Tusculanum Press: University of Copenhagen.

Brigo, F., Del Giovane, C., Nardone, R., et al. (2019). Intravenous antiepileptic drugs in adults with benzodiazepine-resistant convulsive status epilepticus: A systematic review and network meta-analysis. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 101(Pt B), 106466.

Brooks-Kayal, A. R., Jin, H., Price, M., & Dichter, M. A. (1998). Developmental expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry*, 70(3), 1017–1028.

Brophy, G. M., Bell, R., Claassen, J., et al. (2012). Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. *Neurocritical Care*, 17(1), 3–23.

Bruschi F. (2011). Was Julius Caesar's epilepsy due to neurocysticercosis? *Trends in Parasitology*, 27(9), 373–374.

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., & Sakmann, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, 8(1), 189–198.

Cawthorne, T. (1958). Julius Caesar and the falling sickness. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 51(1), 27–30.

Chen, J. W., Naylor, D. E., & Wasterlain, C. G. (2007). Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta Neurologica Scandinavica*, 115(4 Suppl), 7–15.

Chen, J.W., Wasterlain, C.G. (2006). Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurology*, 5:246–256.

Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D., et al. (2018). Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurology*, 75(3), 279–286.

Chuang, Y. C., Chang, A. Y., Lin, J. W., Hsu, S. P., & Chan, S. H. (2004). Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia*, 45(10), 1202–1209.

Claassen, J., & Goldstein, J. N. (2017). Emergency Neurological Life Support: Status Epilepticus. *Neurocritical care*, 27(Suppl 1), 152–158.

Claassen, J., Riviello, J. J., Jr, & Silbergleit, R. (2015). Emergency Neurological Life Support: Status Epilepticus. *Neurocritical Care*, 23 Suppl 2, S136–S142.

Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4466), 207–210.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1985). Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 26(3), 268–278.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. (1989). *Epilepsia*, 30(4), 389–399.

DeGiorgio, C. M., Correale, J. D., Gott, P. S., Ginsburg, D. L., Bracht, K. A., Smith, T., Boutros, R., Loskota, W. J., & Rabinowicz, A. L. (1995). Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology*, 45(6), 1134–1137.

DeGiorgio, C. M., Gott, P. S., Rabinowicz, A. L., Heck, C. N., Smith, T. D., & Correale, J. D. (1996). Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia*, 37(7), 606–609.

DeLorenzo, R. J., Hauser, W. A., Towne, A. R., Boggs, J. G., Pellock, J. M., Penberthy, L., Garnett, L., Fortner, C. A., & Ko, D. (1996). A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology*, 46(4), 1029–1035.

Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N. C., & Rogawski, M. A. (2013). Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 36(3), 174–184.

Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., et al. (2018). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18024.

Dubé, C. M., Ravizza, T., Hamamura, M., et al. (2010). Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 30(22), 7484–7494.

Eadie, M.J., Bladin, P.F. (2001). *A disease once sacred: a history of the medical understanding of epilepsy*. Eastleigh: John Libbey.

Engel, J., Jr, & International League Against Epilepsy (ILAE) (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6), 796–803.

Eyo, U. B., Murugan, M., & Wu, L. J. (2017). Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia*, 65(1), 5–18.

Farhidvash, F., Singh, P., Abou-Khalil, B., Arain, A. (2009). Patients visiting the emergency room for seizures: insurance status and clinic follow-up. *Seizure*, 18:644–7.

Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., et al. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 88(3), 296–303.

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., et al., (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.

Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., et al. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530.

Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., et al. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472.

Gastaut, H. (1969). Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia*, 10, 14–21.

Glauser, T., Shinnar, S., Gloss, D., et al. (2016). Evidence-Based Guideline: Treatment of Convulsive Status Epilepticus in Children and Adults: Report of the Guideline Committee of the American Epilepsy Society. *Epilepsy Currents*, 16(1), 48–61.

Goodkin, H. P., Sun, C., Yeh, J. L., Mangan, P. S., & Kapur, J. (2007). GABA(A) receptor internalization during seizures. *Epilepsia*, 48 Suppl 5, 109–113.

Goodkin, H. P., Yeh, J. L., & Kapur, J. (2005). Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(23), 5511–5520.

Hakami T. (2021). Neuropharmacology of Antiseizure Drugs. *Neuropsychopharmacology Reports*, 41(3), 336–351.

Hauser, W. A., & Beghi, E. (2008). First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia*, 49 Suppl 1, 8–12.

Hughes J. R. (2003). Emperor Napoleon Bonaparte: did he have seizures? Psychogenic or epileptic or both? *Epilepsy & Behavior: E&B*, 4(6), 793–796.

Jimenez-Mateos, E. M., & Henshall, D. C. (2013). Epilepsy and microRNA. *Neuroscience*, 238, 218–229.

Jones, D. M., Esmaeil, N., Maren, S., & Macdonald, R. L. (2002). Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Research*, 50(3), 301–312.

Kanner, A. M., & Nieto, J. C. (1999). Depressive disorders in epilepsy. *Neurology*, 53(5 Suppl 2), S26–S32.

Kim, D., Kim, J. M., Cho, Y. W., et al. (2021). Antiepileptic Drug Therapy for Status Epilepticus. *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)*, 17(1), 11–19.

Kwan, P., & Brodie, M. J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 342(5), 314–319.

Kwan, P., & Brodie, M. J. (2004). Drug treatment of epilepsy: when does it fail and how to optimize its use? *CNS Spectrums*, 9(2), 110–119.

Kwan, P., & Sander, J. W. (2004). The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75(10), 1376–1381.

Lerner, V., Finkelstein, Y., & Witztum, E. (2004). The enigma of Lenin's (1870-1924) malady. *European Journal of Neurology*, 11(6), 371–376.

Lopez-Meraz, M. L., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2010). Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus. *Epilepsia*, 51 Suppl 3(Suppl 3), 56–60.

Löschner W. (2017). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research*, 42(7), 1873–1888.

Lu, M., Faure, M., Bergamasco, A., Spalding, W., Benitez, A., Moride, Y., & Fournier, M. (2020). Epidemiology of status epilepticus in the United States: A systematic review. *Epilepsy & behavior: E&B*, 112, 107459.

Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K., & Diamantis, A. (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy & Behavior*, 17(1), 103-108.

Marson, A. G., Kadir, Z. A., Hutton, J. L., & Chadwick, D. W. (1997). The new antiepileptic drugs: a systematic review of their efficacy and tolerability. *Epilepsia*, 38(8), 859–880.

Mattson, R. H., Cramer, J. A., Collins, J. F., et al. (1985). Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. *The New England Journal of Medicine*, 313(3), 145–151.

Meierkord, H., & Holtkamp, M. (2007). Non-convulsive status epilepticus in adults: clinical forms and treatment. *The Lancet. Neurology*, 6(4), 329–339.

Meldrum, B. S., & Horton, R. W. (1973). Physiology of status epilepticus in primates. *Archives of Neurology*, 28(1), 1–9.

Miller-Delaney, S. F., Das, S., Sano, T., Jimenez-Mateos, E. M., Bryan, K., Buckley, P. G., Stallings, R. L., & Henshall, D. C. (2012). Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. *The Journal of Neuroscience*:

*The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 32(5), 1577–1588.

Millett, D. (2010). Chapter 26: a history of seizures and epilepsies: from the falling disease to dysrhythmias of the brain. *Handbook of Clinical Neurology*, 95, 387–400.

Naylor D. E. (2010). Glutamate and GABA in the balance: convergent pathways sustain seizures during status epilepticus. *Epilepsia*, 51 Suppl 3, 106–109.

Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2013). Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiology of Disease*, 54, 225–238.

Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2013). Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiology of Disease*, 54, 225–238.

Naylor, D.E., Liu H., Wasterlain, C.G. (2005). Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *Journal of Neuroscience*, 25:7724-33.

Pallin, D. J., Goldstein, J. N., Moussally, J. S., Pelletier, A. J., Green, A. R., & Camargo, C. A., Jr (2008). Seizure visits in US emergency departments: epidemiology and potential disparities in care. *International journal of emergency medicine*, 1(2), 97–105.

Panteliadis, C. P., Vassilyadi, P., Fehrlert, J., & Hagel, C. (2017). Historical documents on epilepsy: From antiquity through the 20th century. *Brain & Development*, 39(6), 457–463.

Patel, P., & Moshé, S. L. (2020). The evolution of the concepts of seizures and epilepsy: What's in a name? *Epilepsia Open*, 5(1), 22–35.

Penberthy, L. T., Towne, A., Garnett, L. K., Perlin, J. B., & DeLorenzo, R. J. (2005). Estimating the economic burden of status epilepticus to the health care system. *Seizure*, 14(1), 46–51.

Ravizza, T., Onat, F. Y., Brooks-Kayal, A. R., et al. (2017). WONOEP appraisal: Biomarkers of epilepsy-associated comorbidities. *Epilepsia*, 58(3), 331–342.

Reynolds E. (2003). Sudden death in the shadows of epilepsy. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 326(7385), 349–350.

Robel, S., Buckingham, S. C., Boni, J. L., et al. (2015). Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 35(8), 3330–3345.

Roopra, A., Dingledine, R., & Hsieh, J. (2012). Epigenetics and epilepsy. *Epilepsia*, 53 Suppl 9(Suppl 9), 2–10.

Sanchez, S., & Rincon, F. (2016). Status Epilepticus: Epidemiology and Public Health Needs. *Journal of Clinical Medicine*, 5(8), 71.

Sankar, R., Shin, D. H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., & Wasterlain, C. G. (1998). Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 18(20), 8382–8393.

Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., et al. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521.

Scholtes, F. B., Renier, W. O., & Meinardi, H. (1994). Generalized convulsive status epilepticus: causes, therapy, and outcome in 346 patients. *Epilepsia*, 35(5), 1104–1112.

Sills, G. J., & Rogawski, M. A. (2020). Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*, 168, 107966.

Singh, A., & Trevick, S. (2016). The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurologic Clinics*, 34(4), 837–847.

Stephen, L. J., & Brodie, M. J. (2011). Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents. *CNS Drugs*, 25(2), 89–107.

Strzelczyk, A., Knake, S., Oertel, W. H., Rosenow, F., & Hamer, H. M. (2013). Inpatient treatment costs of status epilepticus in adults in Germany. *Seizure*, 22(10), 882–885.

Temkin, O. (1971). *The falling sickness*, (2nd ed) Baltimore: Johns Hopkins.

Temkin, O. (1994). *The falling sickness: A history of epilepsy from the Greeks to the beginnings of modern neurology* (2nd ed.). Baltimore: Johns Hopkins.

Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., et al. (2019). Epilepsy in adults. *Lancet (London, England)*, 393(10172), 689–701.

Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A. O., Scheffer, I. E., Shinnar, S., Shorvon, S., & Lowenstein, D. H. (2015). A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, 56(10), 1515–1523.

Varnado, S., & Price, D. (2020). Basics of modern epilepsy classification and terminology. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 50(11), 100891.

Wasterlain, C. G., Liu, H., Naylor, D. E., Thompson, K. W., Suchomelova, L., Niquet, J., Mazarati, A. M., & Baldwin, R. A. (2009). Molecular basis of self-sustaining seizures and pharmacoresistance during status epilepticus: The receptor trafficking hypothesis revisited. *Epilepsia*, 50 Suppl 12, 16–18.

WHO Epilepsy: A public Health Initiative. Geneva: World Health Organization; 2019.

Wilson, J. V., & Reynolds, E. H. (1990). Texts and documents. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. *Medical History*, 34(2), 185–198.

Wong, R. K., Chuang, S. C., & Bianchi, R. (2002). Metabotropic Glutamate Receptors and Epileptogenesis. *Epilepsy currents*, 2(3), 81–85.

## BÖLÜM II

### Oral Kanserler ve Kodlamayan RNA'lar

**Aleyna KAŞALTI<sup>1</sup>**  
**Emine YAĞCI<sup>2</sup>**  
**Cansu ÖZBAYER<sup>3</sup>**

#### Giriş

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) veya oral kanser (OK), dilde, dudaklarda ve ağız tabanında ortaya çıkan en yaygın baş ve boyun kanseri türüdür. OK ilerlemesinin sıklıkla bağlantılı olduğu en yaygın faktörler yüksek tütün ve alkol tüketimi ile insan papilloma virüsünün (HPV) neden olduğu bir enfeksiyondur. Geleneksel tedavi stratejileri ilerlemesine rağmen, OK'nin genel

---

<sup>1</sup> Öğrt. Görevlisi, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kütahya Meslek Yüksekokulu, Dişçilik Hizmetleri, Diş Protez Teknolojisi Pr., Kütahya/ Türkiye, Orcid: 0009-0005-0973-0055, aleyna.kasalti@ksbu.edu.tr

<sup>2</sup> Dr. Öğrt Üyesi, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya/ Türkiye, Orcid: 0000-0003-2179-1318 emine.yagci@ksbu.edu.tr,

<sup>3</sup> Prof. Dr., Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya/ Türkiye, Orcid: 0000-0002-1120-1874 cansu.ozbayer@ksbu.edu.tr

sağkalım oranı ancak %50'dir ve metastaz durumunda daha da kötüleşmektedir. 1991'den beri ABD'de genel ölüm oranında %33'lük sürekli bir düşüş görülmüştür. Hastalığın gecikmiş tanı, erken teşhis belirteçlerinin eksikliği, etkili kemoterapi ilaçlarının eksikliği, tedavi direnci ve yan etkilerle agresifliği ve heterojenliği sıklıkla hastalığın yönetimini karmaşık hale getirir. Bu nedenle, hastalık sürecini anlamak ve daha iyi teşhis ve tedavi stratejileri geliştirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Dey et al., 2023; Siegel, Miller, Wagle, & Jemal, 2023; Sung et al., 2021).

Yüksek verimli genom dizilemesindeki gelişmeler, insan genomunun %90'ından fazlasının herhangi bir protein kodlamayan, kodlamayan transkriptleri kodladığını ortaya koymuştur. Uzun bir süre boyunca, kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) hücreler için çöp materyaller olarak kabul edildi. Kapsamlı moleküler değerlendirmeler, kodlamayan genlerin günümüzde kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların ilerlemesinde önemli ilgi görmesine yol açmıştır. Yapısal ve işlevsel özelliklere dayanarak, bir hücrede bulunan ncRNA türleri tRNA, rRNA, uzun kodlamayan RNA (lncRNA), dairesel RNA (circRNA), mikroRNA (miRNA), PIWI ile etkileşen RNA (piRNA) ve küçük nükleolar RNA'dır (snoRNA). ncRNA'ların konformasyonlarını, aktivitelerini ve kararlılıklarını değiştirmek için nükleik asitler veya proteinlerle etkileşime girdiği bulunmuştur. ncRNA'ların farklı ifadeleri farklı kanserlerde bildirilmiştir. Birincil dokuların dışında, kan ve tükürük dahil olmak üzere vücut sıvılarındaki ncRNA'ların farklı ifadeleri, bunların tanı ve tedavi biyobelirteçleri olarak önemini göstermektedir. RNAseq çalışmaları 200'den fazla ncRNA'nın (miRNA, lncRNA, circRNA, snoRNA ve piRNA dahil) OK ilerlemesiyle ilişkili olduğunu ortaya

koymuştur (Dey et al., 2023; Le, Romano, Nana-Sinkam, & Acunzo, 2021).

### **Oral Kanserin Tanımı**

Oral kanser (OK) terimi, tüm ağız boşluğunu, yumuşak damağı ve uvuladan sonra devam eden farinks bölgesinin skuamöz hücreli karsinomlarını kapsar (Coşan & Yılmaz, 2022). Baş-boyun bölgesinde görölen kanserler, tüm kanser türleri içinde altıncı en sık görölen kanser türüdür ve oral kanserler baş-boyun bölgesindeki kanserlerin %48'ini oluşturur. Hastalığın görölme insidansı erkeklerde kadınlara oranla daha fazladır (Karaca, 2018).

OK'lerin %90'ından fazlası histolojik olarak 'Oral Skuamoz Hücreli Kanseri' (OSHK) olarak teşhis edilir (Irani, 2011, 2016; Nakashima et al., 2017). Oral kanserler ağız tabanı, dudak vermillion hattı ve orofarenks kanserleri olmak üzere 3 ana gruba ayrılır. En sık görölen oral kanserler epidermoid karsinomlardır. Bu karsinomlar veya varyasyonları tüm ağız kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. %5-10'unu ise minör tükürük bezi karsinomları (adenokarsinoma, adenokistik karsinoma, mukoepidermoid karsinoma) ve diğeri kalan kısmını ise yumuşak doku sarkomları, malign melonoma, Hodgkin dışı lenfomalar ve diğeri habis tümörler oluşturur (Mollaoğlu, Peker, Çankal, Gültekin, & Kılınç, 2021).

OK'lerin epidemiyolojisiyle ilgili olarak, yaş ve cinsiyet dağılımı coğrafi bölgelere göre önemli farklılıklar gösterir. OK'lerin etiyolojisinde bir çok farklı faktör etkilidir. Tütün, alkol, ultraviyole ışığı (dudak kanserleri için), immunsupresyon, çeşitli virüsler, kronik travma, kötü ağız hijyeni, genetik ve beslenme gibi etkenlerin yanı sıra, son yıllarda oral bakteriyel mikroflora, oksidatif stres ve epigenetik değışiklikler gibi birçok faktörün OK'lerin

meydana gelmesinde etkili olduğu düşünölmektedir (Alqahtani et al., 2020; Irani, 2020; Kumar, Nanavati, Modi, & Dobariya, 2016; Sarode et al., 2020).

Batı ölkelerinin çoğunda görölme insidansı nispeten düşük olmakla birlikte, Hindistan'da ve Asya'nın diğör bölgelerinde en yaygın kanser türlerinden biri olmaya devam etmektedir (Moore, Johnson, Pierce, & Wilson, 2000). Ağız kanserinin tanı ve tedavisindeki kayda değör gelişmelere rağmen hastaların yarısı yaşamlarını ilk beş yılda kaybetmektedirler. Ağız kanseri, 5 yıllık sağ kalım oranı en düşük 5 kanserden biridir. Erken tanı ve etkili tedavi ile sağ kalım oranı %70-90'lara çıkabilmektedir. Bu nedenle ağız kanserlerinin erken evrede teşhis edilmesi ve tedavilerinin yapılması hastaların sağ kalım sürelerini uzatacak ve yaşam standartlarını yükseltecektir (Jafari, Najafi, Moradi, Kharazifard, & Khami, 2013).

Ağız kanserlerinin tedavisi tümörün bulunduğu bölgeye, yayılma durumuna ve tümörün çeşidine bağılı olarak değışmektedir. Tedavide ana seçenekler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Bir tedavi planı belirlenirken hastanın genel sağlığı, kanserin tipi ve safhası, hastalığı tedavi etme olasılığı ve tedavinin konuşma, çiğneme ve yutma gibi önemli fonksiyonlar üzerindeki muhtemel etkileri değörlendirilmelidir. Radikal kanser cerrahisi tümörün ve boyun bölgesi metastazlarının tedavisine dayanır. Bu hastaların cerrahi yaklaşımlarında sıklıkla tümörle birlikte boyun lenf bezlerinin ve bunun yanında kas ve damar gibi yapıların çıkarılması gerekebilmektedir. Baş-boyun bölgesine yapılan radyoterapi ve kemoterapi ağız ve diş sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir (Deveci & Çankal).

En sık görülen oral kanserler epidermoid karsinomlardır. Oral kanserler köken aldıkları dokuya göre Epidermoid Karsinom, Tükürük Bezi Karsinomları, Lenfomalar, Sarkomlar, Metastatik Tümörler, Melanomlar ve Multipl Miyelomlar olarak sınıflandırılır (Kayhan & Ünür, 2011).

### **Epidermoid Karsinomlar**

Bu grupta verrüköz karsinom, asinik hücreli karsinom, bazaloid karsinom, adenoskuamöz hücreli karsinom ve bazoskuamöz hücreli karsinom bulunur. Verrüköz karsinom lezyonları tipik olarak ekzofitik, karnabahar şekilli kitleler olarak görülür ve genellikle lökoplaki lezyonları ile ilişkilidirler (Cawson, Binnie, Barrett, & Wright, 2001). Bu kanserin önemi yavaş büyüyen ve genellikle yüzeysel büyüme gösteren bir tümör olmasıdır. Sıklıkla bukkal mukoza ve gingivada görülür (K. Engin & Erişen, 2003). Her ne kadar prognozu skuamöz hücreli karsinomdan çok daha iyi olsa da kafa kaidesi gibi lokal yapılara ulaştığında sonuç fetaldir (Ord & Blanchaert Jr, 2000). Epidermoid karsinomlar arasında en yaygın olan kanser tipi Oral Skuamöz Hücreli Karsinomlardır. Oral skuamöz hücreli karsinom, çok katlı skuamöz epitelin malign neoplazmi olup bölgesel destrüktif büyüme ve metastaz yapma yeteneğindedir. Oral mukozada görülen malignitelerin %90'ından fazlasının skuamöz hücreli karsinom olduğu belirtilmiştir (B. Engin, Bairamov, Kutlubay, & Tüzün, 2012; Kayhan & Ünür, 2011).

Oral SHK çoğunlukla yetişkinlerde görülmekte olup, erkekler kadınlardan iki kat daha fazla etkilenmektedirler. İnsidansı yaşla birlikte artmaktadır. Erken evredeki oral SHK'lerin tedavisinde cerrahi ve radyoterapi eşdeğer başarı göstermektedir. İleri evrelerde ise cerrahi ve radyoterapi birlikte uygulanmalıdır. Son yıllarda

kemoterapi, organların korunması ve cerrahi tedaviden kaçınmak için radyoterapiye ek olarak uygulanmaya başlanmıştır (JP, 2007; Ord & Blanchaert Jr, 2000).

### **Tükürük Bezi Karsinomları**

Tüm tükürük bezi tümörlerinin %10-15'ini intraoral minör tükürük bezi tümörleri oluşturur ve bu tümörlerin yaklaşık olarak %50'si malign tümörlerdir. Tümörler çoğunlukla palatinal mukozada sert yumuşak damak sınırına yakın bir bölgede orta hattın tek yanında olacak şekilde konumlanırlar. Sublingual tükürük bezi tümörleri ise tüm tümörlerin sadece %0.5-1'ini oluştururlar fakat bu tümörlerin %90'ından fazlası maligndir (Kayhan & Ünür, 2011).

### **Lenfomalar**

Intraoral lenfomaların en sık görüldüğü alan Waldeyer halkasını oluşturan lenfatik dokudur. Bu alanda lingual tonsil, farengeal tonsil, adenoidler ve sert-yumuşak damak birleşme hattı bulunur. Lezyonlar submukozal yumuşak kitleler olabileceği gibi karsinomu çağrıştıran şekilde hızlı büyüyen, ekzofitik yapılı, ülsere lezyonlar da olabilir (Ord & Blanchaert Jr, 2000).

### **Sarkomlar**

Bu mezenkimal tümörler fibröz, yağ, kas, sinovyal, vasküler ya da nöral dokulardan kaynaklanıp hematojen yolla yayılma eğilimindedirler. Oral kavitede ve çenelerde tanımlanmış tipleri; en çok rhabdomyosarkomlar olmak üzere fibrosarkomlar, osteosarkomlar, kondrosarkomlar, liposarkomlar, fibröz histiyosarkomlar, nörofibrosarkomlar ve anjiyosarkomlardır (Gorsky & Epstein, 1998).

## **Metastatik tümörler**

Her ne kadar teorik olarak vücudun herhangi bir organında yer alan primer odak çenelerde metastaz yaratabilse de akciğer, göğüs, prostat, böbrek ve tiroid çenelerdeki metastazları iyi tanımlanmış kanserlerdir. Mandibula posterioru ve kondil en sık tutulan alanlardır bunun nedeni de büyük olasılıkla bu alanlarda kırmızı iliğin bulunmasına bağlıdır. Bu lezyonların tedavisi semptomatiktir ve cerrahi, radyoterapi veya kemoterapi uygulanabilir (Sapp, Eversole, & Wysocki, 1997).

## **Melanomlar**

Mukozal melanom nadirdir. Oral mukoza melanomları tüm melanomların %22'sinden azını oluştururlar. Sert damak ve maksiler gingiva oral kavite melanomlarının en sık kaynaklandığı bölgelerdir. Oral malign melanomlar ise tüm oral malignitelerin %0,5'ini oluşturur. Lezyonlar genellikle asemptomatiktir. Fizyolojik pigmentasyondan ve iyatrojenik amalgam pigmentasyonundan ayırt edilmelidir. Uzak metastazları sık ve prognozları oldukça kötüdür (K. Engin & Erişen, 2003; Sapp et al., 1997; N. Tanaka, Mimura, Ogi, & Amagasa, 2004).

## **Multipl Miyelom**

Sistemik bir hastalık olup kemiğin en sık görülen malign tümörüdür. Hastalık genellikle çenelerde bulgu vermeden önce teşhis edilmiş olur. Çenelerde görülen multipl myelomlar genellikle manbibulada gözlenir. Tedavisinde kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu kullanılmaktadır (Lambertenghi-Deliliers, Bruno, Cortelezzi, Fumagalli, & Morosini, 1988; Witt, Borges, Klein, & Neumann, 1997).

## **Oral Kanser Etiyolojisi**

Oral kanser vakalarının çoğunda tümörün dil lateralinde veya ağız tabanında yerleşimli olması ve bu bölgelerin tükürüğün en fazla göllendiği bölgeler olması nedeniyle tükürükle birlikte etkisini güçlendiren kimyasal ajanların etiyolojide rol oynayabileceği düşünülmektedir (T. Tanaka & Ishigamori, 2011).

Ağız veya baş-boyun skuamöz hücreli karsinomu ve minör tükürük bezi karsinomlarının gelişimi; tütün, alkol, diyet ve beslenme, virüsler, radyasyon, etnik köken, ailevi ve genetik yatkınlık, ağız pamukçuk, bağışıklık baskılanması, gargara kullanımı, frengi, diş faktörleri ve mesleki riskler gibi faktörden etkilenir (Kumar, Nanavati, Modi, Dobariya, & therapeutics, 2016).

Bununla birlikte oral karsinogenezisin oluşum mekanizması hücre çoğalmasını kontrol eden birçok genin mutasyona uğraması esasına dayanır. En çok p16, APC ve p53 tümör süpressör genlerinin yer aldığı kromozom kısımlarında kayıplar izlenmiştir (T. Tanaka & Ishigamori, 2011).

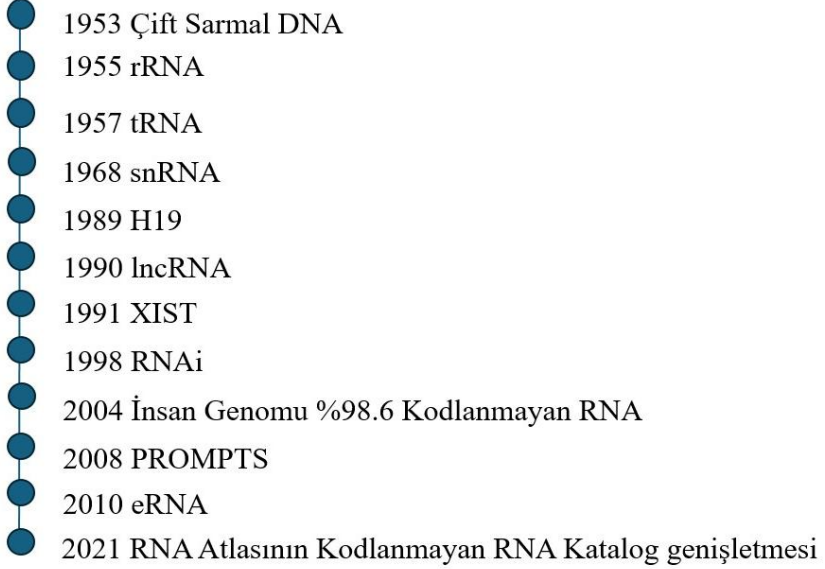
Son yıllarda, Genetik faktörlerin yanında epigenetik mekanizmaların, özellikle de kodlamayan RNA'ların da kanser gelişiminde önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır (Zhou, Hu, & Lai, 2010). Kodlamayan RNA'lar, çeşitli kanserlerin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde anahtar unsurlardır, oral kanser gelişimi ve ilerlemesinde de yer aldığı belirlenmiştir (Irimie et al., 2017).

## **RNA Dünyası ve Kodlamayan RNA'lar**

Dünyamızın yaklaşık 4,54 milyar yaşında olduğu düşünülmektedir. Kanıtlar, ribonükleik asitin (RNA) veya kimyasal olarak RNA'ya benzeyen başka bir molekülün evrim sırasında ilk yaşayan molekül olarak kabul edildiğini göstermekte ve RNA

dünyası kavramını desteklenmektedir (Higgs & Lehman, 2015). RNA dünyası hipotezi, günümüz hücrelerinde RNA'nın, özellikle (ribozomda protein üretimini katalize eden) rRNA'nın, RNA dünyasının evriminin bir izi olduğunu savunmaktadır. 1968'de Crick ve Orgel, RNA'nın hem genotipte hem de fenotipte yer aldığını ve muhtemelen karmaşık DNA-RNA-protein sisteminin öncüsü olduğunu fark etmişlerdir (Orgel, 1968). On dokuzuncu yüzyılın sonunda DNA'nın keşfedilmesinden bu yana, RNA üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Housekeeping RNA'lar (rRNA, tRNA, vb.) 1950'lerin sonlarında tasarlanan moleküler biyolojideki santral dogmanın temel direği olan mRNA modelini desteklemiştir (Jarroux, Morillon, & Pinskaya, 2017).

Şekil 1'de, kodlamayan RNA ile ilgili moleküler süreçler göstermiştir. Şu anda, işlevsel ncRNA'lar ile önceleri önemsiz olarak tanımlanan RNA (junk RNA) arasındaki çelişki oldukça belirsiz görünmektedir. Çünkü, prokaryotlarda genomun %80-95'inin protein kodladığı ve sadece bir kısım ncRNA'ya sahip olduğu (yakından ilişkili suşlar arasında bile farklılık gösterir) ve ökaryotlarda nispeten daha küçük bir kısım protein kodlayan genlere sahip olduğu bilinen bir gerçektir. Bu organizmaların fizyolojisinde, özelliklerinde ve alt kordat olmayanlardan insanlara kadar gelişiminde artan karmaşıklıkla, bu proteomun miktarı, transkripsiyona uğrayan ancak çoğunlukla alternatif splicing mekanizmaları yoluyla fark gözetmeksizin translase edilen intronlar ve genler arası dizilerdeki artışlar nedeniyle daha da azalmaktadır (Bhatti et al., 2021)



*Şekil 1. Kodlamayan RNA ile ilgili moleküler keşiflerin zaman çizelgesi*

RNA, bir nitrojen bazına bağlı bir riboz şekeri ve bir fosfat grubu içeren dört farklı nükleotitten (adenozin, guanin, sitozin ve urasil) oluşan doğrusal bir polimerdir. Protein sentezi sırasında ribozomlar, RNA'da bulunan genetik bilgiyi proteine dönüştürür. RNA'ların temel işlevi, proteinleri çeviri yoluyla sentezlemektir. Bu, ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) ve haberci RNA (mRNA) tarafından gerçekleştirilir. Bunlara ek olarak, son yıllarda moleküler araştırmaların temel hedeflerinden biri olan ve kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) olarak bilinen RNA'ların da RNA editing (düzenlenmesi) ve gen ifadesinin düzenlenmesi gibi birçok göreve sahip olduğu bildirilmiştir.

Yeni teknolojilerin ve güçlü yeni nesil dizilemenin ortaya çıkışıyla, DNA elemanlarının Ansiklopedisi (ENCODE) ve Memeli Genomunun İşlevsel Açıklaması (FANTOM) adlı iki büyük ölçekli konsorsiyum, genomun çoğunluğunun transkripsiyona uğradığını ve geniş bir kodlamayan RNA türü (ncRNA) yelpazesi ürettiğini göstermiştir (Lekka & Hall, 2018).

Hücrenel dünyada RNA aslında iki farklı forma ayrılmıştır; birincisi bir zamanlar evrimsel olarak çöp olarak kabul edilen ve protein kodlama potansiyeli olmayan kodlamayan RNA (ncRNA), diğeri ise çok daha küçük bir parça olan ve protein kodlayan RNA grubudur. RNA'ların yalnızca %1,2'sinin proteinleri kodladığını, geri kalanının ise "kodlayıcı olmayan" olarak kabul edildiği gösterilmiştir. Evrimsel olarak, protein kodlayan genler nispeten statik kalırken, kodlamayan dizilerin miktarının organizmanın karmaşıklığıyla birlikte belirgin biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemin biyolojik temeli, bu transkriptlerin işlevselliğine dair artan kanıtlarla da desteklenmiştir (Carninci et al., 2005; Hangauer, Vaughn, & McManus, 2013; Jarroux et al., 2017; Kaikkonen, Lam, & Glass, 2011; Katayama et al., 2005).

Kodlamayan RNA'lar 1990'lı yıllarda ilk olarak bakterilerde ve daha sonra çoğu ökaryotik organizmada tanımlanmıştır. H19 ve Xist gibi birkaç uzun ncRNA (lncRNA), genom öncesi dönemde karakterize edilmiştir, ancak 2000'li yılların başına kadar istisna olarak kalmaya devam etmiştir (Jarroux et al., 2017).

Çalışmalar, ncRNA'ların proteinleri kodlama konusundaki yetersizliklerine rağmen DNA ve proteinlerle etkileşime girebildiklerini ve dolayısıyla epigenetik, transkripsiyonel ve translasyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonunu düzenleyen

entegre etkileşim ağlarına katılabildiklerini göstermiştir (Tang et al., 2019). Sonuç olarak, ncRNA'ların fizyolojik ve gelişimsel süreçlerde önemli rol oynadığı ve karmaşık biyolojik süreçleri düzenlediği rapor edilmiştir (Zhang, Wu, Chen, & Chen, 2019)

ncRNA'ların hücresel süreçlerdeki bu önemli rolleri nedeniyle, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve daha da önemlisi kanser gibi hastalıklarda ekspresyonlarının sıklıkla değiştiği ve hastalık patogenezinde doğrudan rol oynadığı gözlemlenmiştir (Esteller, 2011)

Kanser, ncRNA ekspresyon seviyelerinde aktif veya pasif değişikliklerin sürekli olarak rapor edildiği bu hastalıklar arasındadır. Farklı kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, hücrelerin onkojenik dönüşümünü teşvik edebilen veya baskılayabilen birçok ncRNA tanımlanmıştır (Feng, Zhang, Yao, Chen, & Wang, 2019; Sun, Yang, Xu, & Guo, 2017). Üstelik birkaç ncRNA'nın agresiflik, metastaz yapma yeteneği ve tedaviye yanıt gibi tümör özelliklerine etki ettiği de deneysel olarak doğrulanmıştır (He, Li, Xie, & Tian, 2019; Jia et al., 2019; Sheng, Wang, Xu, Shan, & Chen, 2019). Bu bulgular sayesinde ncRNA'lar, çeşitli kanser türleri için tanısal, prognostik ve terapötik hedefler olarak kabul edilmektedir (Balakittnen et al., 2023).

Yakın zamana kadar bilinen kodlamayan RNA'ların (ncRNA'lar) çoğu, mRNA translasyonunda yer alan rRNA'lar ve tRNA'lar, eklemede yer alan küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) ve rRNA'ların modifikasyonunda yer alan küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) gibi hücrelerde nispeten genel işlevleri yerine getirdi (Mattick, 2004).

Prokaryotlarda esas olarak mRNA translasyonunu veya stabilitesini düzenlediği görünen sınırlı sayıda trans-etkili küçük ncRNA tanımlanmıştır. Son birkaç yılda E. coli'de bu tür 60'tan fazla RNA tanımlanmış olup, diğer 200 kadar RNA da biyoinformatik olarak tahmin edilmiştir. Bu RNA'lardan bazıları mRNA'larla birlikte eksprese edilir ve transkripsiyondan sonra bölünme yoluyla salınır (Gottesman, 2004; Kawano, Reynolds, Miranda-Rios, & Storz, 2005; Storz, Opdyke, & Zhang, 2004; Vogel et al., 2003).

Küçük ncRNA'lar aynı zamanda diğer bakteri ve arkelerde de tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde ökaryotlarda mikroRNA'ların (miRNA'lar) ve küçük müdahaleci RNA'ların (siRNA'lar) faaliyetinde merkezi olan RNA bağlayıcı endonükleaz ailesi olan Argonaute'un homologlarına sahiptir (Dennis & Omer, 2005).

Bununla birlikte, ncRNA'lar prokaryotlardaki genomik çıktıya hakim değildir; bilindiği kadarıyla genomlarının yalnızca küçük bir kısmını temsil eder ve genellikle repertuarları değişebilen protein kodlayan diziler tarafından hakimiyet altına alınır (Mattick, 2004).

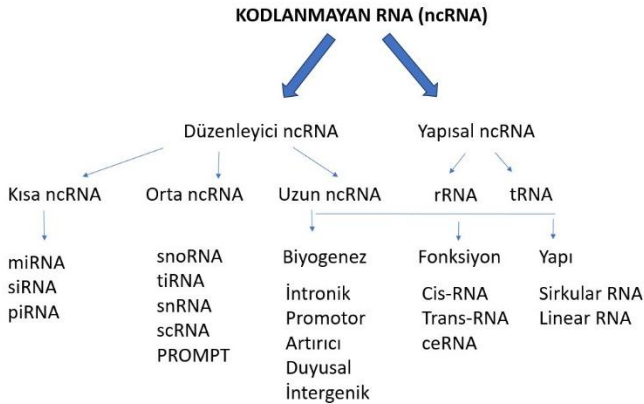
## **Sınıflandırma**

Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA'lar), çeşitli biyolojik fonksiyonlarda düzenleyici olarak görev almakla birlikte, onkogeneze ve tümör progresyonunun ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Brosnan & Voinnet, 2009; Mattick, 2001).

İnsan genom analizi, tRNA ve rRNA gibi uzun ncRNA dizilerinin ilk keşfine katkıda bulunmuştur. Buna ek olarak, protein çevrimi olmayan ama işlevi olan diğer lncRNA dizileri de tanımlanmıştır. Kodlamayan RNA'nın bu uzun dizileri ENCODE konsorsiyum verileriyle karşılaştırıldığında, birkaç ncRNA molekül sınıfının protein kodlayan genlerinkine benzer yollarla üretildiği

bulunmuştur. Kodlamayan RNA'nın çeşitliliğini inceleyen önceki veriler doğrultusunda, ncRNA'lar iki ana kategoriye ayrılır: yapısal kodlamayan RNA'lar ve düzenleyici kodlamayan RNA'lar (Şekil 2).

Yapısal kodlamayan RNA'lar rRNA'lar ve tRNA'lardan oluşur. Düzenleyici kodlamayan RNA'lar ayrıca küçük, orta ve uzun kodlamayan RNA'lar olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Ayrıca, miRNA, siRNA, piRNA, cisRNA, telsRNA 20-50 nükleotid arasında bir boyuta sahip kısa kodlamayan RNA olarak kabul edilmiş ve snoRNA, prompts, tiRNA, snRNA ve daha birçoğu 50-200 nükleotid arasında bir boyuta sahip orta kodlamayan RNA olarak sınıflandırılmıştır. Buna ek olarak 200'den fazla nükleotid içeren maksimum düzenleyici potansiyele sahip büyük bir RNA sınıfı uzun kodlamayan RNA olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2) (Dahariya et al., 2019).



Şekil 2. Uzun kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması. Şema, uzun kodlamayan RNA'ların eylemlerine, biyogenezlerine ve yapılarına göre sınıflara ve alt sınıflara yerleştirilmesini ve sınıflandırılmasını göstermektedir (Dahariya et al., 2019).

## **NcRNA Fonksiyonu**

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), lokusa özgü bir şekilde transkripsiyon, genom damgalama, kromatin yeniden modellemesi ve epigenetik dahil olmak üzere biyolojideki temel süreçlerde çeşitli roller oynarlar. Bu nedenle, ncRNA'ların yapay lokusa özgü bağlanması, ncRNA bağlanmasından sonra biyolojik hedeflerin veya bağlı ncRNA'lar tarafından kontrol edilen moleküler mekanizmaların incelenmesi gibi çok çeşitli biyolojik araştırmalarda bilim insanları için faydalı olacaktır (Fujita & Fujii, 2023).

İnsan genomu boyunca, ncRNA'ların oluşumundan çok sayıda gen sorumludur ve ayrıca ncRNA'nın üretimi için ayrı transkripsiyonel birimler (otonom olarak çalışan) bulunabilir. Bu biyogenez süreci, transkripsiyonu, çekirdekte olgunlaşmayı, işlenmek üzere sitoplazmaya aktarılmasını ve fonksiyonel RNA'nın üretilmesini içerir (Feng et al., 2019).

## **NcRNA ve Kanser**

Genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi, kanser oluşumuna neden olabilen somatik mozaisizm biçimiyle sonuçlanır (Fernandez, Torres, & Real, 2016). Kanser ile ilgili gelişmeler sürekli olarak güncellenmekle birlikte, kanser karmaşık süreçlerden oluşan kompleks bir hastalıktır. Şimdiye kadar kanserin ortaya çıkması ve ilerlemesine ilişkin kanıtların çoğunluğu protein kodlayan bölgelerle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, aşırı korunan kodlamayan dizilerin genellikle kanserde serbest bırakıldığı bulunmuştur (George A Calin et al., 2007). Örneğin, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), kanser oluşumuyla ilişkili yüksek riskli değişiklikler arasındadır; ilginç bir şekilde, SNP'lerin %85'i kodlamayan bölgelerde yer almaktadır ve hastalık gelişimiyle

bağlantılıdır (Freedman et al., 2011). Bu anormalliklerin, değişen ifade ve bozulan fonksiyonlarla birlikte hedeflerinde kararsızlık sergileyen lncRNA üzerinde etkisi vardır (Anastasiadou, Jacob, & Slack, 2018b).

NcRNA'ların kanserdeki işlevini anlamadaki en büyük zorluklardan biri, ncRNA'ların tümör oluşumu sürecinde her zaman tek bir role sahip olmamasıdır. Bir ncRNA, bir kanser türünde tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir ancak başka bir kanser türünde hastalığın ilerlemesini teşvik eden onkogen olarak çalışabilir (Svoronos, Engelman, & Slack, 2016).

ncRNA'lar çeşitli sınıflar içerir, çeşitli kanser türlerinin ilerlemesinde ve düzenlenmesinde rol oynar. Bazı ncRNA'lar, kanser hastalarında serum ve idrarında yüksek oranda bulunur ve tanısal belirteçler veya prognostik göstergeler olarak değerlendirilebilirler. NcRNA'ları hedef alarak birçok klinik çalışma da gerçekleştirilmiş ve umut verici terapötik etkiler gözlemlenmiştir (Yan & Bu, 2021).

İnsan tümör örneklerinde ncRNA'ların prognostik ve tanısal biyobelirteçler olarak tanımlanması, ncRNA'ların yeni nesil dizilenmesi yoluyla yapılır. Ek olarak, fotoaktif edilebilir ribonükleosit ile güçlendirilmiş çapraz bağlanma ve immünopresipitasyon (PAR-CLIP) tekniği de kullanılabilir (Anastasiadou, Jacob, & Slack, 2018a). ncRNA alanındaki bir diğer araç ise CRISPR-Cas9 sistemi adı verilen genomik düzenleme aracıdır. Bu sistem, örneğin genomun mutasyon taşıyan kısmını parçalamak ve bunları başarılı bir şekilde onarmak için genomun hedeflenen şekilde düzenlenmesine olanak tanır. CRISPR-Cas9 sistemi aynı zamanda ncRNA'nın kanserdeki fonksiyonel rollerini

incelemek amacıyla ncRNA genomik olarak silmeleri için de kullanılabilen bir sistemdir (Adams, Parsons, Walker, Zhang, & Slack, 2017; Anastasiadou et al., 2018a).

Kanser, kontrol dışı büyüyen (çoğalan), diğer dokulara yayılabilen (metastaz yapabilen) ve kontrollü hücre ölümü (apoptoz) süreci yoluyla ölme yeteneğini kaybeden hücrelerle karakterizedir. NcRNA'nın keşfi, genomun geri kalanının etkisine dair bakış açısı sağlayarak kanserin nasıl geliştiğinin ve nasıl tedavi edilebileceğinin anlaşılmasına yeni bir boyut eklemiştir (Anastasiadou et al., 2018b).

Düzensiz ncRNA ekspresyonu kanser gelişimi ve ilerlemesinde doğrudan rol oynamaktadır. ncRNA'ları kodlayan genlerdeki genetik değişikliklerin kanserle ilişkili olduğu bulunmuştur; ancak protein kodlayan genlerle karşılaştırıldığında şu ana kadar yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin sayısı oldukça sınırlıdır. En dikkate değer örneklerden biri, kronik lenfositik lösemide (CLL) tümör baskılayıcı olan miR-15/16'nın lokalize olduğu 13q14.3'ün silinmesidir. NcRNA sadece büyüme, gelişme gibi temel biyolojik süreçleri düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda başta kanser olmak üzere hastalıklarda kritik bir rol oynar (Adams et al., 2017).

Güncel araştırmalar, ncRNA moleküllerinin genlerin kodlanmasında, kodunun çözülmesinde, düzenlenmesinde ve ifadesinde üstlendiği önemli rollerin yanı sıra birbirleriyle nasıl iletişim kurduklarını da anlamamızı sağlamıştır (Anastasiadou et al., 2018a; Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Gregory & Shiekhattar, 2005; Huarte & Rinn, 2010; Kasinski & Slack, 2011; Krichevsky, King, Donahue, Khrapko, & Kosik, 2003; Tay, Rinn, & Pandolfi, 2014).

## **Oral Kanserlerde Onkogenik NcRNA'lar**

Araştırmalar, miRNA'ların onkogenler olarak işlev görebildiğini, anormal hücre büyümesini teşvik ettiğini ve tümör oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu miRNA'lar, tümör baskılayıcıların aktivitesini doğrudan inhibe edebilir veya onkogen aktivitesi üzerindeki genetik frenleri kaldırarak dolaylı olarak çalışabilir. Örneğin miR-155, anormal B hücresi proliferasyonunu teşvik edebilir ve sonunda lösemi ve lenfoma gelişimine yol açacak bir dizi değişikliği süreç içine sokabilir (Babar et al., 2012; O'Connell, Chaudhuri, Rao, & Baltimore, 2009).

Bu onkogenik miRNA'lar, onkogen bağımlılığı (oncomiR bağımlılığı) fenomenini sergiler çünkü tümörler hayatta kalmak için miRNA'ların sürekli ekspresyonuna bağımlıdır ve bu nedenle anti-kanser terapisinde önemli potansiyel hedeflerdir (Cheng & Slack, 2012).

## **Oral Kanserlerde Tümör Süpresör NcRNA'lar**

Araştırmalar, miRNA'ların aynı zamanda tümör baskılayıcı olarak da hareket edebildiğini ve işlevleri kaybolduğunda koruyucu güçlerinin de kaybolduğunu göstermektedir. Örneğin, let-7, tüm insan kanserlerinin yaklaşık üçte birinde rol oynayan bir onkogen ailesi olan RAS'ı baskılar (C. D. Johnson et al., 2007; S. M. Johnson et al., 2005).

Sonuç olarak, let-7 ekspresyonu RAS düzeylerini azaltabilir, bu da bunun bir tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını ve umut verici bir terapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Trang et al., 2010; Trang et al., 2011). Başka bir örnek olarak, miR-15a ve miR-16-1 tipik olarak tümör baskılayıcı olarak görev yapar ancak mutasyona uğradığında veya silindiğinde, en yaygın lösemi

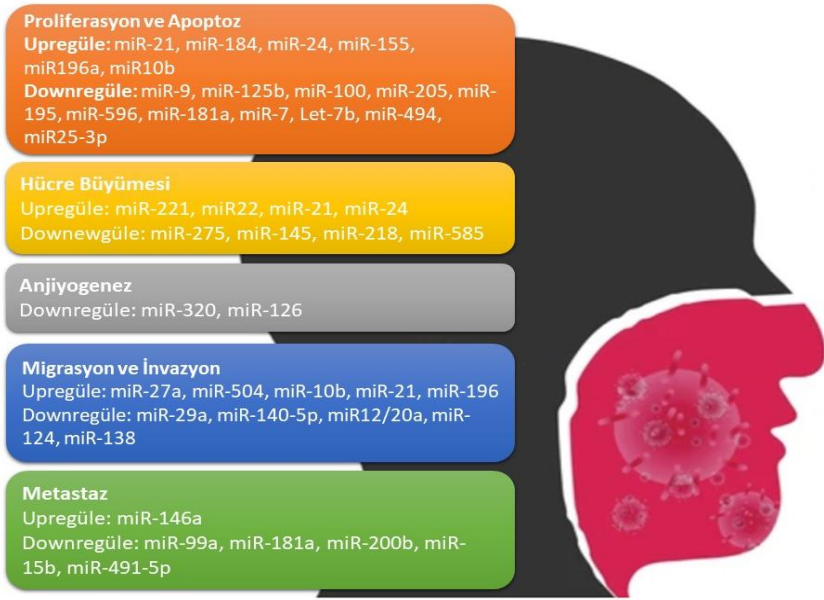
türü olan kronik lenfositik lösemnin (CLL) gelişimi ile ilişkilidir (George Adrian Calin et al., 2002; George Adrian Calin et al., 2005; Klein et al., 2010).

### **Oral Kanserlerde Bir Biyobelirteç Olarak MiRNA'lar**

NcRNA'lar yararlı moleküler biyobelirteçlerdir çünkü çeşitli kanserlerde düzensiz ncRNA ekspresyonu gözlemlenmiştir. Klinik öncesi ortamda yapılan çok sayıda büyük ölçekli keşif çalışması, ncRNA'ların tanısı ve prognostik biyobelirteçler olabileceğini göstermiştir. Her ne kadar işlevsel olarak henüz yeni tanımlanmaya başlansa da, circRNA'lar eksoribonükleazlara dirençli kovalent olarak kapalı uçlardan kaynaklanan gelişmiş stabiliteyi nedeniyle özellikle ilgi çekici bir biyobelirteç sınıfıdır (Schwanhäusser et al., 2011; Vo et al., 2019). Daha da önemlisi, kanda veya idrarda çeşitli biyobelirteçler bulunabilir bu da tümör biyopsisi elde etmek için gerekli olandan daha az invazivdir. Belirli bir biyobelirtecin ifadesi, normal örneklerle karşılaştırıldığında kanserin varlığını tespit edebilir veya kanser hastalarında ki sağkalımı, metastazı veya tedaviye yanıt için biyobelirteç olabilir (Slack & Chinnaiyan, 2019).

MiRNA'lar malign dönüşümde önemli role sahiptir. MiRNA ekspresyon profili tümör dokularında normal dokuya kıyasla farklıdır ve ayrıca belirli tümör tiplerinde belirli özelliklere sahiptir. MiRNA'lar onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görerek tümör oluşumuna katılabilir. Her bir miRNA ortalama 100-200 hedef geni düzenleyebilir. Temel olarak tüm biyolojik süreçlerde yer aldıklarından, anormal miRNA ekspresyonu kanser de dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın başlamasını tetikleyebilir. MiRNA'lar kendileri transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemeye uğrar ve önemli hücresel süreçleri etkiler. Çeşitli

biyolojik süreçlerdeki temel rolleri nedeniyle, genom bütünlüğünün ve uygun hücre kaderinin korunmasında aktif olarak yer alırlar ve sinyal dönüştürücü düzenleyiciler olarak hareket ederler. Tümör hücreleri hayatta kalmaları ve çoğalmaları için gerekli bir dizi strateji geliştirmiştir. Oral kanserler ve diğer kanser tiplerinde miRNA'lar kanser belirtilerine katılır. Oral karsinogenez ile ilgili bilgiler **Şekil 3'de** özetlenmiştir (Irimie et al., 2017).



*Şekil 3: Oral kanserlerde proliferasyon, apoptoz, hücre büyümesi, anjiyogenez, migrasyon, invazyon ve metastazda rol oynayan miRNA'lar. Oral kanserlerde mikroRNA'ların karmaşık işlevlerini anlamak için, dahil oldukları kanser süreçlerinin özelliklerine göre kategorize edilmiştir. Kanser hücreleri apoptozdan kaçınır ve sürekli olarak çoğalır. Hücreler, allojenik sinyallerden kaçmalarını sağlayan endojen büyüme faktörleri salgılar. Tümör hücrelerinin yeterli besinle sağlanması için anjiyogenez lokal olarak uyarılır.*

*Belirli bir süre sonra, kanser hücreleri fenotiplerini değiştirir, kan dolaşımına girer ve yakındaki dokuyu istila eder veya uzak organlara metastaz yapar. Oral kanserlerde upregüle olan mikroRNA'lar ile downregüle olan mikroRNA'lar, kanserdeki ayırt edici süreçler ile ilişkilendirilerek şekilde sunulmuştur (Irimie et al., 2017).*

Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSCC) ve Dil Skuamöz Hücreli Karsinom (TSCC)'da miRNA'ların düzensizliği önemli sayıda bilimsel araştırma çalışmasının konusu olmuştur. Oral kanserde miR-21, miR-24, miR-31, miR-184, miR-211, miR-221, miR-222'nin yukarı düzenlendiği, miR-203, miR-100, miR-200, miR-133a, miR-133b, miR-138 ve miR-375'in aşağı düzenlendiği ve böylece oral karsinogenezden sorumlu temel moleküler mekanizmaları etkilediği bildirilmiştir (Osan et al., 2021).

Giderek artan sayıda deneysel kanıt, miRNA'ların hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenlemede önemli roller oynadığını ve OSCC gelişimini desteklediğini göstermektedir. Oral karsinogenez ile ilişkili miRNA'lar arasında miR-21, hücre proliferasyonu ve apoptozuna katılarak bir onkomiR olarak önemli bir role sahiptir ve çeşitli tümör tiplerinde düzensiz olduğu bulunmuştur. Ayrıca, miR-21'in oral kanser hücrelerinde posttranskripsiyonel düzeyde tümör baskılayıcı P12CDK2AP1'i aşağı düzenlediğini ve hücre çoğalmasını ve in vitro invazyonunu desteklediği gösterilmiştir (Irimie et al., 2017; Zheng et al., 2011).

TSCC'de seviyesi yükselen miR-184, aynı zamanda anti-apoptotik ve pro-proliferasyon faktörü olarak da etki eder. miR-184'ün inhibisyonun, hücre çoğalmasını azalttığı, apoptozu indüklediği ve c-Myc'yi aşağı düzenlediği bildirilmiştir. OSCC'de

belirgin şekilde yukarı düzenlenen miR-24, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B'nin (CDKN1B) aşağı düzenlenmesi yoluyla apoptoz direncine ve çoğalmaya katkıda bulunan RNA bağlayıcı protein çıkmazı 1'i (DND1) doğrudan hedef alıyor gibi görünmektedir (Wu, Xiong, Jia, & Zhang, 2011).

miR-133a, -133b, -137, -193a, -125b ve -100, OSCC'de sıklıkla aşağı düzenlenir. Pre-miR-133a ve pre-miR-133b'nin TSCC hücre hatlarına transfeksiyonu, hücre çoğalmasını belirgin şekilde azaltmış ve apoptozu indüklemiştir. TSCC'de miR-133a ve -133b'nin anormal şekilde azalmasının, miR-133a ve -133b'nin olası hedefi olan aşırı ifade edilmiş onkogen pirüvat kinaz tip M2 (PKM2) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Wu et al., 2011).

Benzer şekilde, miR-137 ve -193a'nın sırasıyla siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) ve E2F transkripsiyon faktörü 6 (E2F6) ekspresyonunu aşağı düzenlediği ve sonuç olarak OSCC hücre büyümesini azalttığı ortaya konmuştur. miR-125b ve -100, OSCC'de hücre çoğalmasını inhibe eden tümör baskılayıcılar olarak tanımlanmıştır (Wu et al., 2011).

### **Oral Kanserde Uzun Kodlamayan RNA'lar**

Uzun kodlamayan RNA'lar (LncRNA'lar) 200'den fazla nükleotid uzunluğundadır ve mRNA'lar'a benzer biyogeneze sahiptirler. RNA-Polimeraz II (Pol II) tarafından transkripsiyona uğrarlar ve poliadenilasyon, splicing ve 5'-cap ekleme işlemleriyle olgunlaşırlar. LncRNA'lar çekirdekte, sitoplazmada veya her ikisinde de lokalizedir. Lokalizasyona bağlı olarak, epigenetik modifikasyon, transkripsiyonel düzenleme, RNA ekleme, mRNA stabilizasyonu, translasyonel düzenleme, protein stabilizasyonu ve DNA'lar, RNA'lar ve proteinlerle etkileşime girerek çeşitli hücresel

süreçleri gerçekleştirirler. Bu düzenleyici işlevleri nedeniyle lncRNA'lar diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, çeşitli kan hastalıkları ve kanserler gibi çok sayıda bozuklukla ilişkilidir (Dey et al., 2023; Sur & Ray, 2022).

LncRNA'lar OK'de anormal ifade kalıpları sergiler ve hastalığın ilerlemesinde önemli bir rol oynar. OK'de, lncRNA'lar onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak hareket edebilir. MALAT1, NEAT1, PVT1, ELDR, DLEU1, HOTAIR, HIFCAR, PCAT1, DANCR gibi onkojenik lncRNA'lar tümör proliferasyonu, invazyonu, metastazı, anjiyogenezi ve ilaç direnci ile ilişkilidir. Örneğin, yüksek MALAT1 ekspresyonu OK tekrarlama ve metastaz ile ilişkilidir. Ayrıca MALAT1'in Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalleme ve PI3K/AKT/mTOR sinyalleme yolları dahil olmak üzere birden fazla sinyalleme olayını kontrol ederek hücresel proliferasyonu ve metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir. MALAT1, sisplatin, 5-florourasil ve paklitaksel gibi birden fazla ilaca karşı dirençle ilişkilidir. lncRNA MALAT1 OK klinik denemesindedir. MALAT1 promotörü, transkripsiyon faktörleri SP1 ve SP3 bağlanma bölgelerini içerir. SP1 ve SP3'ün birlikte işlev göstermesi MALAT1 ekspresyonunu aktive eder (Dey et al., 2023; Ye, Deng, Shen, & therapy, 2021).

Başka bir lncRNA ELDR'nin OK hücre hatlarında ve hasta örneklerinde up regüle olduğu belirlenmiştir. ELDR, miRNA-7'yi inhibe ederek EGFR'nin stabilizasyonu ile sonuçlanır. Normal oral keratinositlerde (NOK'lar) ELDR'nin aşırı ekspresyonu, CTCF/FOXM1/AURKA ekseninin aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasını ve G2/M hücre döngüsü ilerlemesini indükler ve bu da lncRNA'nın OK sürücü genlerinden biri olarak önemini gösterir (Dey et al., 2023; Sur et al., 2020).

Öte yandan, MEG3, GAS5, FENDRR ve PTCSC3 lncRNA'lar OK'de down regüle olmaktadır. Örneğin, lncRNA GAS5'in down regülasyonu miR-21 ekspresyonunu artırır ve çoğalma, invazyon, EMT ve migrasyonu kolaylaştırır. Başka bir tümör baskılayıcı lncRNA olan MEG3, miR-421 ve Wnt/ $\beta$ -katenin yolunu baskılar. LncRNA'nın down regülasyonu hücre döngüsünün, hücre çoğalmasının, metastazın ve hücre apoptozunun baskılanmasının indüklenmesine yardımcı olur (Chen et al., 2021; Dey et al., 2023).

### **Oral Kanserde Sirküler RNA'lar (circRNA)**

CircRNA'lar, 3' veya 5' uçları olmayan ve bir poli (A) kuyruğu olan, kapalı loop (closed-loop) son derece kararlı ncRNA molekülleridir ve doğrusal RNA'lara kıyasla daha yüksek bir yarı ömre sahiptir. Pre-mRNA'ların geri eklenmesi ve ekzon atlanması, circRNA'ların üretildiği iki işlemdir. Transkripsiyon işlemi RNA pol II aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu RNA yapıları, RNase R tarafından ekzonükleolitik parçalanmaya dayanma yeteneğine sahiptir. CircRNA'ların %80'inin sitoplazmada bulunduğu görülmüştür. Ancak, circRNA'ların çekirdekte bulunması gen ifadesinin kontrolünü mümkün kılar (Dey et al., 2023; Geng et al., 2020).

Kapalı-loop şeklinde düzenlenmiş olmaları, doku özgüllükleri, yüksek stabiliteleri ve korunumları nedeniyle, çeşitli hastalıklar için önemli biyobelirteçler olarak hizmet ederler. Bu RNA molekülleri, doğrudan protein bağlanması ve belirli circRNA'ların proteinlere çevrilmesi gibi çeşitli düzenleyici işlevler gerçekleştirir. Çok sayıda çalışma, anormal şekilde ifade edilen circRNA'ların çoğunun, bir dizi kanser belirtisini etkileyerek kanserin ilerlemesini kontrol etmede önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Proliferatif sinyalleme, tümör ve antitümör bağışıklığını teşvik etme,

anjyogenezi tetikleme, invazyonu ve metastazı teşvik etme anormal bir circRNA profiliyle ilişkili bazı işlevlerdir (Dey et al., 2023; Yu et al., 2019).

Son yıllarda OK'deki circRNA üzerine yapılan araştırmalar artmıştır ve bu RNA moleküllerinin OC'nin gelişimi, yönetimi ve prognozu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir. miRNA ve lncRNA gibi, bu RNA molekülleri de OC'de hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak rol oynar. Örneğin, circ\_0002185, circ\_PVT1, circ\_100290, circ\_0001742, circ\_HIPK3, circ\_0001971, circ\_DOCK1, circ\_FLNA, circ\_GOLPH3, circ\_CLK3, circ\_CDR1, circ\_0014359, circ\_LPAR3, circ\_SEPT9 gibi circRNA'lar up regüle olurken, circ\_0000140, circ-PKD2, circ\_0005379, circ\_0004491, circ\_SPATA6, circ\_0086414, circ\_0008309, circGDI2, circ\_0007059 gibi circRNA'lar da OK'de down regüle olmaktadır. Onkolojik dairesel RNA circ\_100290, rekabet eden endojen RNA (ceRNA) olarak hareket eder ve glikoz taşıyıcısı GLUT1'in miR-378a aracılı baskılanmasını inhibe ederek glikoliz ve hücre büyümesinin indüklenmesine neden olur. Circ\_CDR1 adı verilen başka bir dairesel RNA'nın, AKT/ERK-1/2/mTOR sinyal yolunun kontrolü yoluyla OK'de hücre sağ kalımını artırmak için hipoksik koşullar altında otofajiyi teşvik ettiği belirtilmiştir. Aksine, bir çalışma, AKT/mTOR yolağının düzenlenmesi yoluyla circ\_0007059 ve OK'in baskılanmış ifadesi arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Tüm bu çalışmalar, bu RNA moleküllerinin OK'deki MAPK, WNT/ $\beta$ -catenin, Notch, VEGF ve PI3K/AKT gibi başlıca sinyal yolları üzerindeki kontrol yoluyla OK'i düzenlediğini ileri sürmektedir. OK'in saldırgan özelliğinin circ\_PKD2 down regülasyonu bağlantılı olduğu bulunmuştur. circ PKD2'nin aşırı ekspresyonu hücre

döngüsü durmasını ve apoptozu indükler ve miR-204-3p'yi inhibe ederek OK'in çoğalmasını, göçünü ve istilasını inhibe eder. Tüm bu çalışmalar circRNA'nın OK'deki potansiyel rolünü göstermektedir (Dey et al., 2023).

### **Ağız Kanserinde Küçük Nükleolar RNA'lar (SnoRNA)**

İnsan genomunda tanımlanmış yaklaşık 300 snoRNA dizisi vardır. SnoRNA'lar küçük boyutlu olmalarına rağmen, hücre çekirdeğinde çok miktarlarda bulunurlar. Çoğu snoRNA, hem kodlayan hem de kodlamayan genlerin intronunda ifade edilirken, geri kalanı RNA pol II tarafından transkripsiyona uğrar. Endonükleolitik parçalanma ve transkripsiyon sonrası düzenleme yoluyla ribozomal, küçük nükleer ve diğer pre-mRNA moleküllerinin gelişiminde roller oynarlar. Ayrıca, mRNA'yı değiştirerek gen ekspresyonunu kontrol etme yeteneğine de sahiptirler. SnoRNA'lar protein moleküllerine bağlanarak küçük nükleolar ribonükleoprotein kompleksleri (snoRNP kompleksleri) oluştururlar ve bu da daha sonra rRNA bazlarının modifikasyonuna yol açar (Dey et al., 2023; Dragon, Lemay, & Trahan, 2006).

SnoRNA'lar çeşitli patolojik ve fizyolojik süreçlerde rol oynar. Çalışmalar, snoRNA'ların tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı ve ayrıca karsinogenez süreci sırasında hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermiştir. Daha da önemlisi, snoRNA'lar OK tümörlerinin gelişiminde önemli bir rol oynar. Günümüzde, OK'lerde snoRNA'ların farklı ekspresyonu, bunların tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak kullanılma olasılığını öne çıkarmıştır. Ancak, OK'de snoRNA'nın farklı ekspresyonunun mekanizması net olarak bilinmemektedir. En önemli ölçüde modüle edilmiş snoRNA'lar DNA şablonu düzenlemesi, RNA düzenlemesi,

hücre çoğalmasının düzenlenmesi, yapışma, invazyon, metastaz, PI3K-AKT sinyalizasyonu, EMT ve anjiyogenez yollarıyla ilişkilendirilmiştir. En iyi beş snoRNA (SNORD114-17: ENSG00000201569, SNORA36B: ENSG00000222370, SNORD78: ENSG00000212378, U3: ENSG00000212182 ve U3: ENSG00000212195) ile yapılan ileri analizler, hasta sağkalımı ile ilişki olduğunu göstermiştir ve bu da snoRNA'ların hastalık ilerlemesinde ve OK'de biyobelirteç olarak önemini göstermektedir (Dey et al., 2023; Xing, Zhang, Zhang, & Tong, 2020).

OK hastalarında up regüle olan bir snoRNA SNHG3, oral skuamöz hücrelerin göçünü ve hücre çoğalmasını başlatır. SNHG3/miR-2682-5p eksenini aracılığıyla nükleer transkripsiyon faktörü-Y alt birim gama'yı (NFYC) hedef alır ve bir biyobelirteç işlevi görür. SnoRNA SNHG15 ayrıca OK hücre hatlarında aşırı ifade edilir. Bu nedenle, snoRNA'lar OK'de tümör büyümesine yardımcı olur (Dey et al., 2023).

### **Ağız Kanserinde PIWI ile etkileşen RNA'lar (piRNA)**

piRNA'lar, üç ana kategoriye ayrılabilen bir ncRNA alt sınıfıdır: transpozon türevi piRNA'lar, mRNA türevi piRNA'lar ve lncRNA türevi piRNA'lar. 24-31 nükleotid uzunluğundadırlar, 5'-uç uridin veya 10. pozisyon adenozin eğilimine sahiptirler ve uygun ikincil yapısal özelliklerden yoksundurlar. Farklı nükleotid dizilerinden oluşan piRNA'lar, P-element kaynaklı wimpy testis (PIWI) proteinleriyle etkileşime giren tek zincirli ncRNA'lardır. Bunlar en büyük ncRNA grubudur ve çok işlevlidir. piRNA'lar, piRNA/PIWI kompleksi oluşturmak için PIWI proteinlerine bağlanarak genom yeniden düzenlenmesinde, spermiyogenezde,

protein düzenlemesinde, transpozon susturulmasında ve epigenetik düzenlemede etkilidir (Dey et al., 2023; Han et al., 2018).

piRNA'ların çoğunlukla germ hücrelerinde ifade edildiği bilinmektedir; ancak, bunların varlığı kanser hücrelerinde de gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu RNA moleküllerinin prognostik bir belirteç veya tedavi hedefi olarak kullanılması sorusu ortaya çıkmaktadır. Güncel araştırmalar, piRNA'lar/PIWI kompleksinin meme kanseri ve akciğer kanseri oluşumu, gelişimi, metastazı ve tekrarlaması için kullanıldığına dair kanıtlar sunmuştur. Bazı piRNA'ların OK gelişiminde rol oynadığı ve gelecekte OK için potansiyel bir biyobelirteç veya tedavi hedefi olabileceği belirlenmiştir. OK fare modelinde, piR354, piR415, piR832 ve piR1584'ün mRNA molekülleriyle etkileşime girdiği bulunmuştur. GALNT6, SPEDF ve MYBL2 gibi piRNA'larla eşleştirilmiş genlerin çeşitli OK tümörlerinin baskılanması veya ilerlemesinden sorumlu olduğu gözlemlenmiştir. piRNA'ların OC'deki ekspresyonlarının düzenlenmesini ve işlevsel mekanizmasını bilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Dey et al., 2023).

## **Sonuç**

Oral kanserler çok faktörlü patolojiler olup etkili tedavi ve doğru tanı araçları konusunda yetersizlikler bulunmaktadır. Bunun başlıca nedeni geç tanıdır; bu nedenle hastalığın erken tanısı ve hasta sınıflandırması için güvenilir biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Kodlamayan RNA'lar, çeşitli kanserlerin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde önemli yere sahiptir ve bu moleküller ağız kanseri gelişimi ve ilerlemesi için de anahtar bileşenlerdir. Rollerinin daha iyi anlaşılması, bu kanser türü için gelecekteki tedavi seçenekleri hakkında daha kapsamlı bir bakış açısı sağlayabilir.

## Kaynaklar

Adams, B. D., Parsons, C., Walker, L., Zhang, W. C., & Slack, F. J. (2017). Targeting noncoding RNAs in disease. *The Journal of clinical investigation*, 127(3), 761-771.

Alqahtani, W. S., Almufareh, N. A., Al-Johani, H. A., Alotaibi, R. K., Juliana, C. I., Aljarba, N. H., . . . Ahmed, H. G. (2020). Oral and oropharyngeal cancers and possible risk factors across Gulf Cooperation Council countries: a systematic review. *World Journal of Oncology*, 11(4), 173.

Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2018a). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 5-18.

Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2018b). Non-coding RNA networks in cancer. *J Nature Reviews Cancer*, 18(1), 5-18.

Babar, I. A., Cheng, C. J., Booth, C. J., Liang, X., Weidhaas, J. B., Saltzman, W. M., & Slack, F. J. (2012). Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1695-E1704.

Balakittnen, J., Weeramange, C. E., Wallace, D. F., Duijf, P. H., Cristino, A. S., Kenny, L., . . . Punyadeera, C. (2023). Noncoding RNAs in oral cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 14(3), e1754.

Bhatti, G. K., Khullar, N., Sidhu, I. S., Navik, U. S., Reddy, A. P., Reddy, P. H., & Bhatti, J. S. J. M. b. d. (2021). Emerging role of non-coding RNA in health and disease. 36, 1119-1134.

Brosnan, C. A., & Voinnet, O. (2009). The long and the short of noncoding RNAs. *Current opinion in cell biology*, 21(3), 416-425.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Rai, K. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524-15529.

Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., . . . Fabbri, M. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 353(17), 1793-1801.

Calin, G. A., Liu, C.-g., Ferracin, M., Hyslop, T., Spizzo, R., Sevignani, C., . . . Wojcik, S. E. (2007). Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer cell*, 12(3), 215-229.

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M., Maeda, N., . . . Wells, C. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *science*, 309(5740), 1559-1563.

Cawson, R. A., Binnie, W. H., Barrett, A. W., & Wright, J. M. (2001). *Oral disease-clinical and pathological correlations*.

Chen, P.-Y., Hsieh, P.-L., Peng, C.-Y., Liao, Y.-W., Yu, C.-H., & Yu, C.-C. J. J. o. t. F. M. A. (2021). LncRNA MEG3 inhibits self-renewal and invasion abilities of oral cancer stem cells by sponging miR-421. *120*(4), 1137-1142.

Cheng, C. J., & Slack, F. J. (2012). The duality of oncomiR addiction in the maintenance and treatment of cancer. *The cancer journal*, 18(3), 232-237.

Coşan, G., & Yılmaz, S. J. A. T. D. (2022). Oral Kanserlerin Tanısında Tükürük Biyobelirteçlerinin Rolü. 8(2), 218-224.

Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Palapati, A., & Gutti, R. K. J. M. i. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. 112, 82-92.

Dennis, P. P., & Omer, A. (2005). Small non-coding RNAs in Archaea. *Current opinion in microbiology*, 8(6), 685-694.

Deveci, H., & Çankal, D. A. U. Oral cancers and the role of dentists.

Dey, S., Biswas, B., Manoj Appadan, A., Shah, J., Pal, J. K., Basu, S., & Sur, S. J. C. (2023). Non-coding RNAs in oral cancer: emerging roles and clinical applications. 15(15), 3752.

Dragon, F., Lemay, V., & Trahan, C. J. E. o. l. s. (2006). snoRNAs: biogenesis, structure and function.

Engin, B., Bairamov, O., Kutlubay, Z., & Tüzün, Y. (2012). Oral Mukozanın Malign Hastalıkları. *Archives of the Turkish Dermatology & Venerology/Turkderm*, 46.

Engin, K., & Erişen, L. (2003). Baş-Boyun Kanserleri 1. baskı Nobel Matbaacılık. In: İstanbul.

Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259-269.

Esteller, M. J. N. r. g. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *12*(12), 861-874.

Feng, Q., Zhang, H., Yao, D., Chen, W.-D., & Wang, Y.-D. (2019). Emerging role of non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of molecular sciences*, *21*(1), 258.

Fernandez, L. C., Torres, M., & Real, F. X. (2016). Somatic mosaicism: on the road to cancer. *Nature Reviews Cancer*, *16*(1), 43-55.

Freedman, M. L., Monteiro, A. N., Gayther, S. A., Coetzee, G. A., Risch, A., Plass, C., . . . Duggan, D. (2011). Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. *Nature genetics*, *43*(6), 513-518.

Fujita, T., & Fujii, H. (2023). New Directions for Epigenetics: Application of Engineered DNA-binding Molecules to Locus-specific Epigenetic Research. In *Handbook of Epigenetics* (pp. 843-868): Elsevier.

Geng, X., Jia, Y., Zhang, Y., Shi, L., Li, Q., Zang, A., & Wang, H. J. E. (2020). Circular RNA: Biogenesis, degradation, functions and potential roles in mediating resistance to anticarcinogens. *12*(3), 267-283.

Gorsky, M., & Epstein, J. (1998). Head and neck and intra-oral soft tissue sarcomas. *Oral Oncology*, *34*(4), 292-296.

Gottesman, S. (2004). The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, *58*(1), 303-328.

Gregory, R. I., & Shiekhattar, R. (2005). MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer research*, 65(9), 3509-3512.

Han, Y.-N., Li, Y., Xia, S.-Q., Zhang, Y.-Y., Zheng, J.-H., Li, W. J. C. P., & Biochemistry. (2018). PIWI proteins and PIWI-interacting RNA: emerging roles in cancer. 44(1), 1-20.

Hangauer, M. J., Vaughn, I. W., & McManus, M. T. (2013). Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS genetics*, 9(6), e1003569.

He, T., Li, X., Xie, D., & Tian, L. (2019). Overexpressed circPVT1 in oral squamous cell carcinoma promotes proliferation by serving as a miRNA sponge. *Molecular medicine reports*, 20(4), 3509-3518.

Higgs, P. G., & Lehman, N. (2015). The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(1), 7-17.

Huarte, M., & Rinn, J. L. (2010). Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Human molecular genetics*, 19(R2), R152-R161.

Irani, S. (2011). Metastasis to head and neck area: a 16-year retrospective study. *American journal of otolaryngology*, 32(1), 24-27.

Irani, S. (2016). Herbal medicine and oral health: A review. *Journal of International Oral Health*, 8(10), 989-994.

Irani, S. (2020). New insights into oral cancer—Risk factors and prevention: A review of literature. *International Journal of Preventive Medicine*, 11.

Irimie, A. I., Braicu, C., Sonea, L., Zimta, A. A., Cojocneanu-Petric, R., Tonchev, K., . . . Berindan-Neagoe, I. J. I. j. o. m. s. (2017). A looking-glass of non-coding RNAs in oral cancer. 18(12), 2620.

Jafari, A., Najafi, S., Moradi, F., Kharazifard, M., & Khami, M. (2013). Delay in the diagnosis and treatment of oral cancer. *Journal of Dentistry*, 14(3), 146.

Jarroux, J., Morillon, A., & Pinskaya, M. (2017). History, discovery, and classification of lncRNAs. *Long non coding RNA biology*, 1-46.

Jia, B., Xie, T., Qiu, X., Sun, X., Chen, J., Huang, Z., . . . Zhao, J. (2019). Long noncoding RNA FALEC inhibits proliferation and metastasis of tongue squamous cell carcinoma by epigenetically silencing ECM1 through EZH2. *Aging (Albany NY)*, 11(14), 4990.

Johnson, C. D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., . . . Shingara, J. (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer research*, 67(16), 7713-7722.

Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., . . . Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635-647.

JP, P. (2007). Meta-analyses of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 69, 1544-1552.

Kaikkonen, M. U., Lam, M. T., & Glass, C. K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular research*, 90(3), 430-440.

Karaca, İ. R. J. O. M. J. O. T. D. (2018). Oral kavitede görülen invaziv kanserler: derleme. *10*(4).

Kasinski, A. L., & Slack, F. J. (2011). MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(12), 849-864.

Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., . . . Kawai, J. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *science*, 309(5740), 1564-1566.

Kawano, M., Reynolds, A. A., Miranda-Rios, J., & Storz, G. (2005). Detection of 5'-and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in Escherichia coli. *Nucleic acids research*, 33(3), 1040-1050.

Kayhan, K. B., & Ünür, M. (2011). AĞIZ BOŞLUĞUNDA GÖRÜLEN KANSERLER VE SINIFLANDIRILMASI. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 45(1), 55-63.

Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., . . . Bhagat, G. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*, 17(1), 28-40.

Krichevsky, A. M., King, K. S., Donahue, C. P., Khrapko, K., & Kosik, K. S. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna*, 9(10), 1274-1281.

Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., & Dobariya, C. (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of cancer research and therapeutics*, 12(2), 458-463.

Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., Dobariya, C. J. J. o. c. r., & therapeutics. (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. 12(2), 458-463.

Lambertenghi-Delilieri, G., Bruno, E., Cortelezzi, A., Fumagalli, L., & Morosini, A. (1988). Incidence of jaw lesions in 193 patients with multiple myeloma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 65(5), 533-537.

Le, P., Romano, G., Nana-Sinkam, P., & Acunzo, M. J. C. (2021). Non-coding RNAs in cancer diagnosis and therapy: focus on lung cancer. 13(6), 1372.

Lekka, E., & Hall, J. (2018). Noncoding RNA s in disease. *FEBS letters*, 592(17), 2884-2900.

Mattick, J. S. (2001). Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports*, 2(11), 986-991.

Mattick, J. S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nature Reviews Genetics*, 5(4), 316-323.

Mollaoğlu, N., Peker, İ., Çankal, D. A. U., Gültekin, S. E., & Kılınç, Y. J. A. K. B. D. (2021). Oral Prekanseröz Lezyonların Teşhis ve Tedavisi. In (Vol. 10, pp. 159-164): Ankara Dış Hekimleri Odası.

Moore, S., Johnson, N., Pierce, A., & Wilson, D. (2000). The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral diseases*, 6(2), 65-74.

Nakashima, T., Tomita, H., Hirata, A., Ishida, K., Hisamatsu, K., Hatano, Y., . . . Kato, K. (2017). Promotion of cell proliferation by the proto-oncogene DEK enhances oral squamous cell carcinogenesis through field cancerization. *Cancer medicine*, 6(10), 2424-2439.

O'Connell, R. M., Chaudhuri, A. A., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7113-7118.

Ord, R. A., & Blanchaert Jr, R. H. (2000). Oral cancer: the dentist's role in diagnosis, management, rehabilitation, and prevention. (*No Title*).

Orgel, L. E. (1968). Evolution of the genetic apparatus. *Journal of molecular biology*, 38(3), 381-393.

Osan, C., Chira, S., Nutu, A. M., Braicu, C., Baciut, M., Korban, S. S., & Berindan-Neagoe, I. J. G. (2021). The connection between MicroRNAs and oral cancer pathogenesis: emerging biomarkers in oral cancer management. 12(12), 1989.

Sapp, J. P., Eversole, L. R., & Wysocki, G. (1997). Contemporary oral and maxillofacial pathology. *Implant Dentistry*, 6(3), 238-239.

Sarode, G., Maniyar, N., Sarode, S. C., Jafer, M., Patil, S., & Awan, K. H. (2020). Epidemiologic aspects of oral cancer. *Disease-a-Month*, 66(12), 100988.

Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., . . . Selbach, M. (2011). Global

quantification of mammalian gene expression control. *nature*, 473(7347), 337-342.

Sheng, Z., Wang, X., Xu, G., Shan, G., & Chen, L. (2019). Analyses of a panel of transcripts identified from a small sample size and construction of RNA networks in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Genetics*, 10, 431.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. J. C. a. c. j. f. c. (2023). Cancer statistics, 2023. 73(1), 17-48.

Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The role of non-coding RNAs in oncology. *Cell*, 179(5), 1033-1055.

Storz, G., Opdyke, J. A., & Zhang, A. (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Current opinion in microbiology*, 7(2), 140-144.

Sun, W., Yang, Y., Xu, C., & Guo, J. (2017). Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs on gene expression in cancers. *Cancer genetics*, 216, 105-110.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. J. C. a. c. j. f. c. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 71(3), 209-249.

Sur, S., Nakanishi, H., Steele, R., Zhang, D., Varvares, M. A., & Ray, R. B. J. E. r. (2020). Long non-coding RNA ELDR enhances oral cancer growth by promoting ILF 3-cyclin E1 signaling. 21(12), e51042.

Sur, S., & Ray, R. B. J. T. F. J. (2022). Emerging role of lncRNA ELDR in development and cancer. 289(11), 3011-3023.

Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer research*, 76(13), 3666-3670.

Tanaka, N., Mimura, M., Ogi, K., & Amagasa, T. (2004). Primary malignant melanoma of the oral cavity: assessment of outcome from the clinical records of 35 patients. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 33(8), 761-765.

Tanaka, T., & Ishigamori, R. J. J. o. o. (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. 2011(1), 603740.

Tang, W., Zhou, W., Xiang, L., Wu, X., Zhang, P., Wang, J., . . . Huang, X. (2019). The p300/YY1/miR-500a-5p/HDAC2 signalling axis regulates cell proliferation in human colorectal cancer. *Nature communications*, 10(1), 663.

Tay, Y., Rinn, J., & Pandolfi, P. P. (2014). The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *nature*, 505(7483), 344-352.

Trang, P., Medina, P. P., Wiggins, J. F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., . . . Weidhaas, J. B. (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*, 29(11), 1580-1587.

Trang, P., Wiggins, J. F., Daige, C. L., Cho, C., Omotola, M., Brown, D., . . . Slack, F. J. (2011). Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Molecular Therapy*, 19(6), 1116-1122.

Vo, J. N., Cieslik, M., Zhang, Y., Shukla, S., Xiao, L., Zhang, Y., . . . Cao, X. (2019). The landscape of circular RNA in cancer. *Cell*, 176(4), 869-881. e813.

Vogel, J., Bartels, V., Tang, T. H., Churakov, G., Slagter-Jäger, J. G., Hüttenhofer, A., & Wagner, E. G. H. (2003). RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic acids research*, 31(22), 6435-6443.

Witt, C., Borges, A. C., Klein, K., & Neumann, H.-J. (1997). Radiographic manifestations of multiple myeloma in the mandible: a retrospective study of 77 patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 55(5), 450-453.

Wu, B.-h., Xiong, X.-p., Jia, J., & Zhang, W.-f. J. O. o. (2011). MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene. 47(5), 314-319.

Xing, L., Zhang, X., Zhang, X., & Tong, D. J. J. o. C. P. (2020). Expression scoring of a small-nucleolar-RNA signature identified by machine learning serves as a prognostic predictor for head and neck cancer. 235(11), 8071-8084.

Yan, H., & Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. *Essays in biochemistry*, 65(4), 625-639.

Ye, D., Deng, Y., Shen, Z. J. O., & therapy. (2021). The role and mechanism of MALAT1 long non-coding RNA in the diagnosis and treatment of head and neck squamous cell carcinoma. 4127-4136.

Yu, T., Wang, Y., Fan, Y., Fang, N., Wang, T., Xu, T., . . . oncology. (2019). CircRNAs in cancer metabolism: a review. 12, 1-10.

Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., & Chen, M. J. J. o. i. b. (2019). Non-coding RNAs and their integrated networks. *16*(3), 20190027.

Zheng, J., Xue, H., Wang, T., Jiang, Y., Liu, B., Li, J., . . . Sun, M. J. J. o. c. b. (2011). miR-21 downregulates the tumor suppressor P12CDK2AP1 and Stimulates Cell Proliferation and Invasion. *112*(3), 872-880.

Zhou, H., Hu, H., & Lai, M. (2010). Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biology of the Cell*, *102*(12), 645-655.

## BÖLÜM III

### NETosis: Moleküler Mekanizması ve Kanslerle İlişkisi

Emine YAĞCI<sup>1</sup>

#### Giriş

Nötrofiller konak savunması için çok önemli bağışıklık sistemi hücreleridir. Nötrofil sayısı düşük olan hastalarda tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyona ek olarak bu enfeksiyonların organizmadan temizlenmesinde de kusurlar vardır. Kemik iliğinde granülosit-monosit progenitör hücrelerinden farklılaşan olgun nötrofiller, sitozollerinde granüllerin olması ve çok loblu bir çekirdeğe sahip olmaları ile karakterizedir (Thiam, Wong, Wagner &Waterman, 2020).

Nötrofiller dolaşıma salınır ve burada aktif endotel hücreleri, yerleşik bağışıklık hücreleri ve yaralı epitel hücreleri tarafından hem steril hem de patojen kaynaklı yaralanma bölgelerine çekilebilir.

---

<sup>1</sup> Dr. Öğrt Üyesi, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya/Türkiye, Orcid: 0000-0003-2179-1318  
emine.yagci@ksbu.edu.tr

Yaralanma bölgesine ulaştıklarında, n6trofil y6zey resept6rlerinin bakteriyel bileşenler, fungal  $\beta$ -glukan veya sitokinler gibi proinflamatuvar sinyallerle etkileşimi, gelişmiş n6trofil efekt6r fonksiyonları (yani aktivasyon) ile sonuçlanan bir sinyal kaskadını başlatır. Aktif n6trofiller, gran6llerini degran6lasyon yoluyla serbest bırakarak, patojenleri fagositoz yoluyla alıp parçalayarak ve n6trofil h6cre dışı tuzaklarını (neutrophil extracellular traps-NET'ler) serbest bırakarak istilacıları etkisiz hale getirebilir (Thiam, Wong, Wagner &Waterman, 2020).

NETosis, gran6llerden ve sitoplazmadan bakterisidal proteinler içeren modifiye kromatinden oluşan n6trofil ekstrasel6ler tuzaklarının (NET'ler) oluşumu için bir programdır. Çeşitli patojenler, antikorlar ve bağışıklık kompleksleri, sitokinler, mikro kristaller ve diğ6r fizyolojik uyarıcılar NETosise neden olabilir (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

Kanserli farelerde n6trofillerin, ağı benzeri yapılar olan n6trofil ekstrasel6ler tuzakları (NET'ler) oluşturma eğıliminin arttığı bildirilmesinin ardından, bu s6recin yalnızca h6cre 6l6m6yle ilişkili bir s6re değıl aynı zamanda NET oluşumu (NETosis) ve benzer yapıların lizis ve n6trofil h6cre 6l6m6 olmadan da oluşabileceğı g6sterilmiştir (Olsson & Cedervall, 2016).

Buna ek olarak, yapılan çalışmalarda kanserli insanlarda NET'lerin varlığı olduğı doğrulandırmıştır ve bu da t6m6r kaynaklı NETosis'in klinik olarak 6nemli olduğunu g6stermektedir. Birkaç raporda ayrıca NET'lerin, tromboz, sistemik inflamasyon ve hastalığın n6ksetmesi gibi kanserle ilişkili 6l6mden sorumlu s6releri teşvik ederek kanserle ilişkili patolojiye katkıda bulunduğı açıklanmıştır (Olsson & Cedervall, 2016).

## **Nötrofil Apoptozu ve Homeostazdaki Rolü**

Nötrofiller homeostatik koşullar altında sıklıkla apoptoz tarafından yenilenen kısa ömürlü hücrelerdir. Apoptoz, genellikle inflamatuvar olmayan bir hücre ölümü süreci olarak kabul edilen, düzenlenmiş hücre ölümünün evrimsel olarak korunan bir şeklidir. Organizma homeostazının sürdürülmesinde merkezi bir rol oynar ve 'içsel' veya 'dışsal' apoptoz yollarının aktivasyonuna yanıt olarak meydana gelir. Bu apoptotik yollar, yüzlerce apoptotik substratın parçalanmasına yol açan bir apoptotik kaspaz kaskadı başlatır ve böylece hücre büzülmesi, plazma zarının kabarması, apoptotik gövde oluşumu, kromatin yoğunlaşması ve nükleer DNA'nın düzenli parçalanması gibi apoptotik özelliklere yol açar (Dejas, Santoni, Meunier, & Lamkanfi, 2023; Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019).

Hem içsel hem de dışsal apoptoz yolları, homeostaz sırasında dolaşımdaki nötrofillerin hayatta kalmasını düzenler. İçsel apoptozis yolu, DNA hasarı, hipoksi ve metabolik stres dahil olmak üzere çeşitli hücre içi stres faktörleri tarafından aktive edilir. Bu apoptozis yolu, B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin ekspresyonları ve aktivitesi tarafından düzenlenir (Dejas et al., 2023; Moulding, Akgul, Derouet, White, & Edwards, 2001; Noseykina, Schepetkin, Atochin, & Physiology, 2021; Villunger, Scott, Bouillet, & Strasser, 2003).

Uyarılmamış koşullar altında, nötrofiller yaşam sürelerini belirleyen yüksek düzeyde pro-apoptotik Bcl-2'yi eksprese eder. İçsel apoptozis yolunun aktivasyonu üzerine, pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri Bcl-2 ilişkili X proteini (Bax) ve/veya Bcl-2 antagonisti/katili (Bak), mitokondriyal dış zarın (MOMP) geçirgenleşmesini teşvik ederek sitokrom c ve diğer mitokondriyal

proteinlerin sitozole salınmasına neden olur. Nötrofillerde sitokrom c ekspresyonu düşük olsa da, sitozole salınması, kaspaz-9'u toplayan ve aktive eden apoptozomun birleşmesini sağlamak için yeterlidir. Bu da apoptozu indüklemek için apoptozis efektör kaspazlar 3 ve 7'yi aktive eder (Dejas et al., 2023; Moulding, Akgul, Derouet, White, & Edwards, 2001; Noseykina, Schepetkin, Atochin, & Physiology, 2021; Villunger, Scott, Bouillet, & Strasser, 2003).

Ölüm reseptörü aracılıklı apoptoz olarak da bilinen dışsal apoptozis yolu, CD95/Fas ve TNF reseptör süper ailesinin üyeleri gibi plazma membranına bağlı ölüm reseptörlerinin hücre dışı ligandları tarafından indüklenir. Diğer hücre tiplerinde olduğu gibi, nötrofillerde bu ölüm reseptörlerinin etkileşimi, kaspaz 8 ve 10'un, apoptozu indüklemek için kaspazlar 3 ve 7'nin aktivasyonunu teşvik eden bir ölüm indükleyen sinyal kompleksi'ne (DISC) dahil edilmesini sağlayabilir. İçsel apoptozis yolu, pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bid, Bak, Bax, Bcl-2 ve Mcl-1'in ifade seviyeleri aracılığıyla nötrofillerde CD95/Fas kaynaklı apoptozu da düzenleyebilir. Bu majör apoptoz yollarına ek olarak, nötrofillerin birincil (azurofilik) granüllerden katepsinler gibi proteazları serbest bıraktığı ve apoptozu indüklemek için kaspaz 8 ve 3'ü kesip aktive ettiği gösterilmiştir (Conus et al., 2008; Dejas et al., 2023).

### **NETosis Mekanizmaları**

NETosisteki önemli bir olay, granüllerden sitozole bazı proteinlerin salınmasıdır. Azurofil granüller, sekiz tip protein içeren "azurosom" protein kompleksini içerir, bunlardan üçü oldukça homolog serin proteazlardır: nötrofilik elastaz (NE), katepsin G ve azurosidin ve ayrıca substrat olarak klor ve hidrojen peroksit kullanarak hipoklorit anyonu üreten bir enzim olduğu ve bunun da

granüllerden sitozole serin proteazların ve MPO'nun salınmasına yol açtığı gösterilmiştir. Serin proteazlar (esas olarak NE), NETosis'in gerçekleşmesine katkıda bulunan hücre iskeleti elemanlarını parçalar. Daha sonra, kromatin dekonkonsansasyonuna ve nükleer zarfın yıkımına katkıda bulunan lamini ve histonları parçaladıkları çekirdeğe göç ederler (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

MPO, azurozomun ayrışmasında ve proteazların granüllerden salınmasında önemli rol oynar. İlginç bir şekilde, bu aşamada MPO'nun enzimatik aktivitesi gerekli değildir. Bu hem içeren proteinin hücre içi bir hidrojen peroksit reseptörü olarak hizmet etmesi muhtemeldir. Ancak, hipoklorit anyonu nötrofil elastaz aktivitesini uyardığından, NETosis için MPO aktivitesi gereklidir. NETosis sırasında granüllerden ROS'a bağlı protein salımı, birçok yönden lizozomların ROS'a bağlı geçirgenleşmesi ve bunlardan katepsinlerin salınmasına benzer ve bu birçok nekroz çeşidi için tipiktir (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

Peptidil-arginin deaminazlar (PAD),  $Ca^{2+}$  bağlayıcı proteinlerdir ve aktiviteleri  $Ca^{2+}$  tarafından uyarılır. Öte yandan, PAD4 aktive edilir ve hidrojen peroksit eklenmesine yanıt olarak histon sitrülinasyonuna neden olur. Ayrıca, LPS ile ilişkili histonların sitrülinasyonu ve NETosis, mikrotübüllerin sağlamlığına bağlıdır. Tüm bu faktörlerin kombinasyonu PAD4'ün aktivasyonu için gereklidir. Sitrülinasyonla birlikte, histonlar da NETosis sırasında asetilasyona uğrayabilir, ancak bu süreçteki rolü hala yeterince anlaşılmamıştır (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

Kromatin dekonkonsansasyonu ve nükleer laminanın proteolitik hasarı, nükleer zarfın yıkımına ve kromatinin sitoplazmaya salınmasına yol açar. Son zamanlarda, NETosis'in hücre döngüsüne

girişini kolaylaştıran siklin bağımlı kinazların (CDK'lar) aktivasyonu nedeniyle meydana gelebileceği gösterilmiştir. Lamina fosforilasyonu ve sentrozom ayrımı gibi mitoz aygıtının parçalarının NETosis sırasında nükleer zarfı yok etmek için kullanılması mümkündür (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

NETosis'in son aşamasında, plazma membranında gözenekler oluşur ve kromatin, NET'lerin oluşumuyla ortama salınır. Granüllerden salınan proteinler, elektrostatik etkileşim nedeniyle dekonpanse olmuş kromatine güçlü bir şekilde bağlanır. Bu dev kompleksin geçmesine izin veren gözenekler, piroptoz sırasında makrofaj membranında gözenekler oluşturan gasdermin D proteini (GSDMD) tarafından oluşturulur. GSDMD'nin kaspaz-1 ve -4/5 (farelerde kaspaz-11) tarafından parçalanma yoluyla aktive edildiği piroptozun aksine, NETosis sırasında esas olarak nötrofil elastaz tarafından parçalanır ve aktive edilir. GSDMD'nin aktivasyonu muhtemelen sadece plazmalemmada değil, aynı zamanda nükleer membranda da gözeneklerin oluşumuna yol açar (Chen et al., 2018; Rogers et al., 2019; Rogers et al., 2017; NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

Nötrofillerde GSDMD'nin kaspaz bağımlı aktivasyonu, inflamazomun kanonik olmayan aktivasyonunun bir sonucu olarak da meydana gelebilir, ancak bu mekanizmanın NETosis'teki rolünü anlamak için daha fazla araştırma gerekmektedir. GSDMD ile ilişkili olan Gasdermin E, kaspaz-3 tarafından aktive edilir ve mitokondrinin geçirgenleşmesine ve apoptozisin yanı sıra sekonder nekrozu teşvik eder. Başka bir gözenek oluşturan protein MLKL (gasderminlerle ilişkili değildir), nekroptoz sırasında RIP kinazlar tarafından aktive edilir. Nötrofillerde MLKL'nin aktivasyonu,

NET'lerin salınmasına da yol açabilir (Chen et al., 2018; Rogers et al., 2019; Rogers et al., 2017; NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

### **NETosis'in fizyolojik modülasyonu**

Fizyolojik koşullar altında,  $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$  konsantrasyonları, pH ve  $\text{O}_2$  içeriği oranı NETosisi modüle edebilir. Orta derecede alkali koşullar altında ve azaltılmış  $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$  oranında, PMA,  $\text{Ca}^{2+}$  iyonoforu, ürik asit mikro kristalleri veya LPS'nin neden olduğu NETosis seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Nötrofil sitoplazmasındaki pH'nın artması  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonunda bir artışa ve hem NADPH oksidaz hem de mitokondri tarafından ROS üretiminin artmasına neden olmuştur. Ortamdaki pH'nın azalması, muhtemelen glikolizin inhibisyonu nedeniyle NETosis'in inhibisyonuna neden olur. Ayrıca, düşük pH'ta, mPTP'nin açılma olasılığı keskin bir şekilde azalır, bu da mtROS üretimini düşürebilir (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020; Nina Vorobjeva et al., 2020).

NETosisin pH bağımlılığının, patojenlerden dokuyu koruyan inflamatuvar lezyonun çevresinde maksimum düzeyde aktive olmasına yol açtığı, düşük pH ile karakterize edilen lezyonun merkezinde ise NETosisin zayıfladığı ve doku hasarını artırmadığı varsayılmaktadır. Hipoksinin NETosis üzerindeki etkisine ilişkin bilgiler tartışmalıdır. Bir yandan Hif-1 $\alpha$ 'nın (hipoksiye adaptasyonu düzenleyen ana transkripsiyon faktörü) nakavt edilmesi NETosisi baskılamak, Hif-1 $\alpha$ 'nın farmakolojik stabilizasyonu ise NETosisi uyarmaktadır. Öte yandan PMA tarafından indüklenen NETosis hipoksi ile azalmaktadır ve bu etki Hif-1 $\alpha$ 'ya bağlı değildir. NETosis ortamın bileşimine ek olarak, ozmolaritesine de bağlıdır, hipertonic ortam ROS üretimini ve NETosisi baskılamaktadır (Branitzki-Heinemann et al., 2016; Lodge, Cowburn, Li, & Condcliffe, 2020;

Nadesalingam, Chen, Farahvash, & Khan, 2018; NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

Sitokinler ve inflamatuvar mediatörler NETosisin aktivasyonunda önemli bir rol oynarken, aynı zamanda bazı anti-inflamatuvar moleküller ters etkiye neden olabilir. İnflamasyonu çözmede önemli bir rol oynayan prostaglandin E2, siklik AMP'nin hücre içi içeriğindeki artışa bağlı olarak NETosisi inhibe eder. Aktifleştirilmiş C proteini (anti-trombotik ve anti-inflamatuvar etkilere sahip bir serin proteinaz) belirli bir reseptöre (EPCR) bağlanarak veya proteaz aktiviye reseptör 3 (PAR3) ve CD11b/CD18 integrinleri (Mac-1) ile etkileşime girerek NETosisi inhibe edebilir. İlginç bir şekilde, aynı aktifleştirilmiş C proteini NET'lerin bir parçası olan histonları kesebilir. NETosisin anti-inflamatuvar sitokin IL-10 tarafından baskılandığı gösterilmiştir (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

Patojenik mikroorganizmalar, NET'lerin mikrobisidal etkisine müdahale eden çok çeşitli araçlara sahiptir. Birçok mikroorganizma, NET'leri yok eden litik enzimler (başlıca endonükleazlar) üretir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* gibi bakteriler ve *Aspergillus* cinsinin mantarları koruyucu ve maskeleyici hücre dışı zarflar üretir. *P. aeruginosa*, NETosis'i baskılayan IL-10 üretimini başlatır. Aynı mekanizmanın insan immün yetmezlik virüsü (HIV-1) tarafından da kullanıldığı görülmektedir. HIV-1 virionları, dendritik hücreler tarafından IL-10 üretimini uyarır ve bu da virüsü NET enzimlerinin litik etkisinden korur. Hepatit B virüsü (HBV), HBE zarf proteini ve HBC çekirdek proteinini kullanarak nötrofillerde ROS üretimini baskılayarak NETosisi engeller (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

## NETosisde Nötrofil Aktivasyonu

Nötrofiller, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı konak savunmasında doğuştan gelen bağışıklık için kritik öneme sahiptir. NETosis süreci sırasında patojenleri fagosite ederek, sitotoksik enzimlerle dolu granüllerini salgılayarak veya nötrofil ekstraselüler tuzaklarını (NET'ler) dışarı atarak konak savunma rollerini gerçekleştirirler. NET'ler, aktive edilmiş nötrofiller tarafından salınan histonlar ve antimikrobiyal proteinlerle süslenmiş ağ benzeri DNA yapılarıdır. Başlangıçta nötrofillerin patojenleri nötralize etmesi için bir araç olarak tanımlanan NET salınımı, steril inflamasyonda da meydana gelir, trombozu teşvik eder ve doku hasarına aracılık edebilir (NV Vorobjeva & Chernyak, 2020).

NETosis nötrofil aktivasyonu gerektirir. Bu nedenle, inflamasyonsuz koşullardaki istirahat nötrofilleri NETosis'e uğramaz. Ayrıca, Toll benzeri reseptör 2 (TLR2) veya kompleman bileşeni 3'te eksik olan farelerin nötrofilleri ve daha genel olarak, interlökin-1 (IL-1) reseptörü/TLR sinyallemede [MyD88 nakavtı (KO)] eksik olan fareler, *Staphylococcus aureus* uyarımı üzerine NET'leri serbest bırakmaz. G-protein-eşli reseptörlerin (GPCR'ler), tümör nekroz faktörü (TNF) ve Fc reseptörlerinin ligandlarının NETosis'i indüklediği bildirilmiştir (Thiam et al., 2020).

Plazma membran yüzey reseptörlerine ek olarak, NETosis nükleotid oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptör proteini 3'ün aktivasyonu ile tetiklenebilir. İyonomisin ve nijerisin gibi bakteriyel toksinler ve reaktif oksijen türleri (ROS), muhtemelen yüzey reseptörlerini aktive etmeden NETosis'i indükleyebilir. Böylece, nötrofil aktivasyonu, bakteriyel toksinler veya yüzey reseptör etkileşimi yoluyla NETosisi başlatır (Thiam et al., 2020).

## NETosis'te Kalsiyum Artışı

Nötrofil aktivasyonu hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artışa yol açar. Örneğin, GPCR'ler, Fcγ reseptörleri, TLR4 ve kompleman reseptörleri ( $\beta_2$  integrin) üzerindeki ligand bağlanması, endoplazmik retikulumda (ER) depolanan kalsiyumun salınımını tetikler ve bunu plazma membran kalsiyum kanallarının açılması izler. NETosis sırasında, lipopolisakkaritler (LPS'ler), IL-8 ve PMA tarafından uyarılan nötrofillerde hücre içi kalsiyumda artış olur (Thiam et al., 2020).

Daha da önemlisi, hücre dışı kalsiyum şelasyonu IL-8, PMA, *Pseudomonas aeruginosa*, ionomisin ve nigerisin uyarılı NETosisi inhibe ederken, hücre içi kalsiyum şelasyonu IL-8, PMA ve nigerisin uyarılı NETosisi bozar, ancak *Candida albicans* veya Grup B *Streptococcus* uyarılı NETosisi bozmaz. Bu nedenle, hücre içi depoların salınması veya hücre dışı ortamdan içeri akış yoluyla hücre içi kalsiyumda artış NETosis için önemlidir. Bununla birlikte, NETosis sırasında kalsiyum gerektiren hücresel süreçler yeterince anlaşılmamıştır (Thiam et al., 2020).

Kalsiyumun aracılık ettiği bilinen bir yol, NETosis için kritik bir enzim olan peptidil arginin deiminaz 4 (PAD4) yoluyla gerçekleşir ve aktivasyonu için yüksek konsantrasyonda kalsiyuma ihtiyaç duyar. Bu nedenle, NETosis sırasında kalsiyum artış mekanizmalarının ve kalsiyumun hücresel hedeflerinin daha fazla tanımlanması, kalsiyumun NET salınımını nasıl düzenlediğini anlamak için kritik olacaktır (Thiam et al., 2020).

## NETosiste Kinazların Rolü

Kalsiyum girişı veya sitokin katılımının ardından aktive olan ve hücre döngüsünün düzenleyicileri olan kinazlar da NETosiste rol oynamaktadır. Fosfolipid bağımlı, forbol ester ve kalsiyumla aktive olan anahtar hücre döngüsü düzenleyici kinaz, protein kinaz C (PKC), özellikle PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ 1 ve PKC $\zeta$ , PMA-, iyonomisin-, IL-8-, trombosit aktive edici faktör-, *C. albicans*- ve Grup B *Streptococcus* kaynaklı NETosise aracılık eder. Hücre döngüsünün G<sub>1</sub>/S geçişini düzenleyen siklin bağımlı kinaz 6 ve Raf-MEK-ERK MAP kinaz yolu, PMA kaynaklı NETosis için kritik öneme sahiptir, SYK-PI3K-mTorc2 yolu ise monosodyum urat kristali ve *S. aureus* kaynaklı NETosise aracılık eder (Thiam et al., 2020).

Son olarak, sitokin aracılı sinyallemeyle ileten ve hücre çoğalmasını kontrol eden reseptör olmayan tirozin kinaz Janus kinaz 2 (JAK2), yakın zamanda NETosis ile ilişkilendirilmiştir. Gerçekten de, kansere neden olan JAK2'deki aktive edici bir mutasyon aynı zamanda NETosis eğilimini de artırır. Ancak kalsiyuma benzer şekilde, PKC gereksinimi, Raf-MEK-ERK ve SYK-PI3K-mTorc2 yolları NETosis uyarıcısına bağlıdır. Bu nedenle, reseptör aktivasyonunun ve/veya kalsiyum girişinin aşağı akışında, hücre döngüsü düzenlemesinde rol oynayan çeşitli kinazlar NETosise aracılık eder (Thiam et al., 2020).

## NETosis, İmmun Sistem, Karsinogenez ve Tümör İlerlemesi

Nötrofiller kanser biyolojisinde önemli bir rol oynar. Deneysel kanser modellerinde ve insan tümörlerinde inflamatuvar hücre infiltratının önemli bir bölümünü oluştururlar. Ancak, nötrofillere hem pro- hem de anti-tümöral özellikler gösterdiği için tümör

ilerlemesindeki rolleri hala önemli bir araştırma konusudur. Tümörle ilişkili nötrofillerin zıt rollerinin aktivasyon aşamalarıyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Melanie Demers & Wagner, 2014).

Benzer bir durum, özellikle tümör ilerlemesi için de söz konusudur; makrofajlar da tümör baskılayıcı klasik M1 benzeri bir alt tipten tümör destekleyici M2 benzeri bir makrofaja fenotipik bir geçiş sergileyebilir. Bu M2 makrofajları genellikle katı bir tümördeki bağışıklık hücrelerinin çoğunluğunda mevcuttur ve immünoşüpresif ve pro-anjiyojenik mekanizmalarla tümör ilerlemesine katkıda bulunur (Sica, Schioppa, Mantovani, & Allavena, 2006).

Son veriler, nötrofil fonksiyonunun malign hastalık sırasında benzer şekilde değiştiğini göstermektedir. Nötrofiller, fagositoz ve antimikrobiyal peptitlerin salgılanması yoluyla bulaşıcı hastalıklarla mücadelede birinci basamak savunma olarak vazgeçilmez bir role sahiptir. Ancak kanserli bireylerde, nötrofiller bunun yerine belirgin hastalık destekleyicileri haline gelebilir ve anjiyogenez ve metastaz gibi tümör ilerlemesinde önemli adımlara katkıda bulunabilir (Kumar & Sharma, 2010; Olsson & Cedervall, 2016).

Tümör hücrelerinin nötrofilleri NET üretmeye yatkın hale getirme yeteneği birçok tümör tipinde gösterilmiştir. Demers ve arkadaşları, hematolojik, meme ve akciğer neoplazmaları da dahil olmak üzere birden fazla tümör tipinin dolaşımdaki nötrofilleri NET üretmeye yatkın hale getirebildiğini göstermiştir (Cools-Lartigue, Spicer, Najmeh, Ferri, & sciences, 2014; Mélanie Demers et al., 2012).

Araştırmacılar ilk olarak, t(9;22) kırılma noktası küme bölgesi–Abelson (BCR–ABL-1) translokasyonunu eksprese eden

hücrelerin kemik iliğine tutunmasıyla gerçekleştirilen kronik miyeloid lösemi (KML) benzeri miyeloproliferatif neoplazmalı fareler üretmişlerdir. Bu süreç, Abelson fare lösemi viral onkogen homolog 1 (ABL1) kodlu tirozin kinazın yapısal aktivasyonu ile sonuçlanır ve insanlarda KMY ile ilişkili düzensiz hücresel çoğalmaya yol açar. Bu farelerin, kontrol farelerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek miktarda plazma hücresiz DNA (cfDNA) ifade ettiği bulunmuştur (Cools-Lartigue, Spicer, Najmeh, Ferri, & sciences, 2014; Mélanie Demers et al., 2012).

Trombosit aktive edici faktör (PAF) ile uyarılmasının ardından dolaşımdaki nötrofillerin izolasyonu, KMY benzeri farelerden türetilen nötrofillerin, vahşi tip farelerden türetilen nötrofillere kıyasla NET oluşumuna daha yatkın olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, birincil tümörlerin dolaşımdaki nötrofillerden NET üretimini kolaylaştırabileceği hipotezini desteklemektedir (Cools-Lartigue, Spicer, Najmeh, Ferri, & sciences, 2014; Mélanie Demers et al., 2012).

Kanser ilişkili trombozu araştıran çalışmalar, tümör taşıyan farelerden alınan nötrofillerin sağlıklı donörlerden alınan nötrofillere göre NET oluşturmaya daha yatkın olduğu ve tümör taşıyan farelerdeki NETosis'in akciğerlerde trombüs oluşumuyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Kanser NETosis'i destekleyen sistemik bir ortam yaratırken, NET'ler tümörlerin içinde de bulunur ve tümör destekleyici bir rol oynadığı tahmin edilmektedir (Cedervall, Zhang, & Olsson, 2016).

Kanser gelişimi ve ilerlemesi, neoplastik hücreler ve kötü huylu olmayan konak hücreleri arasındaki kompleks etkileşimler tarafından yönlendirilir. Konak hücrelerin tümör destekleyici etkileri

genellikle tümör mikroçevresi tarafından "ele geçirilen" normal veya hatta temel fizyolojik işlevleri ifade eder (Lip, Chin, & Blann, 2002; Olsson & Cedervall, 2016).

Örneğin, yara iyileşmesi ve yaralanmaya bağlı kanamayı önlemek için trombosit aktivasyonu gereklidir; aynı mekanizma aslında kanserli bireylerde hastalığın ilerlemesine ve ölüm oranına da katkıda bulunur. Benzer şekilde, normalde enfeksiyonlara karşı temel bir savunma görevi gören doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri, kötü huylu tümör sırasında hastalığı destekleyicileri haline gelmek üzere modüle olabilir (Lip, Chin, & Blann, 2002; Olsson & Cedervall, 2016).

Nötrofil kromatininin salınması, tümör büyümesi, anjiyogenez, metastaz ve bağışıklık baskılanması gibi tümör gelişiminin birçok farklı adımını etkileyebilir. NET'ler ile kanser arasındaki ilk ilişki, Ewing sarkomu olan birkaç hastada tanımlanmıştır. Bu hastalarda tümör içi NET'ler kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. O zamandan beri, NET'ler çeşitli deneysel ve insan kanser tiplerinde tanımlanmıştır. Hepsinde olmamakla birlikte çoğu durumda, NET'ler deneysel ve insan kanserlerinde protümörojenik bir rol ile ilişkilendirilmiştir. NET'lerin tümör oluşumunda önemli bir rol oynayan endotelden mezenkimala geçişi de (EMT) yönlendirdiği bildirilmiştir (Cristinziano et al., 2022).

Nötrofillerin klasik antimikrobiyal rollerine ek olarak, nötrofil ekstraselüler tuzaklarının yani NET'lerin oluşumu yaklaşık on yıl önce şiddetli bakteriyel enfeksiyonlar sırasında yeni bir savunma mekanizması olarak tanımlanmıştır. NET'ler, aktive edilmiş nötrofiller kromatinlerini ve granüler içeriklerini dışarı çıkardıklarında ve patojenler için bir tuzak görevi gören DNA

iplikçikleri ağı oluşturdıklarında oluşur (Cedervall et al., 2016; Mélanie Demers et al., 2012; Olsson & Cedervall, 2016).

NET oluşumunun (NETosis) bakteriyel enfeksiyonlara bir yanıt olarak tanımlanmasının ardından virüs ve mantarların neden olduğu enfeksiyonlarda ve ayrıca ateroskleroz, diyabet ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi durumlarda NET'lerin varlığı bildirilmiştir (Cedervall et al., 2016; Mélanie Demers et al., 2012; Olsson & Cedervall, 2016).

NET'lerin deneysel yumurtalık ve pankreas kanserini de kolaylaştırdığı belirlenmiştir. 4T1 kaynaklı meme kanseri ve Lewis akciğer karsinomu fare modellerinde, tümör taşıyan farelerde kontrol farelerine kıyasla artmış plazma NET seviyeleri bulunmuştur. Tümör taşıyan farelerde, nötrofiller trombüs oluşumu ve pro-koagülasyon durumu ile ilişkili olan NET'leri kendiliğinden üretmeye karşı artmış bir duyarlılık göstermiştir. Ortotopik meme kanserinin in vivo modelinde, neoplastik hücreler NET oluşumunu uyarmış, bu da meme kanseri hücrelerinin hareketliliğini artırmış ve akciğer metastazını teşvik etmiştir (Cristinziano et al., 2022).

NET'ler ayrıca metastatik yayılımı engellemeye büyük ölçüde katkıda bulunabilen dinamik tümör bağışıklık mikroçevresinin (TIME) önemli bir üyesi olarak kabul edilmiştir. Tümör mikroçevresinde kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler) en hayati pro-tümör faktörlerinden biri olarak kabul edilir. NET'lerin CAF'ler üzerindeki etkisiyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda, NET oluşumunun pankreas duktal adenokarsinomunda CAF'lerden kaynaklandığı ve böylece pro-tümör mikroçevresi ürettiği bildirilmiştir (Shao, Yao, Li, Chai, & Linghu, 2021).

## **NETosis, Kronik İnflamasyon ve Karsinogenez**

NETosis, karsinogenezde doğrudan ve dolaylı bir rol oynayabilir. Kronik inflamasyon, karsinogenez için iyi bilinen bir öncüdür. Patolojik inflamasyon, konak dokularına zarar verir, somatik mutasyonlar ve ardından kanser gelişimi riskini artıran hiperproliferatif bir durum başlatır. Nötrofiller, istilacı patojenleri ortadan kaldırmak için akut inflamasyon sürecini uygun şekilde aktive ederken, otoimmün durumlar, post viral pnömonit (COVID-19 gibi) ve tip 2 diabetes mellitus gibi hastalıklarda kronik, patolojik inflamasyonu da başlatabilirler ve NETosis önemli bir itici güçtür. ROS salınımı ve NETosis tarafından sürekli doku hasarı ile ardından bunu takip eden DNA hasarı, kanserlerin başlamasında rol oynar (Jaboury, Wang, O’Sullivan, Ooi, & Ho, 2023).

NET’ler, hücresel proliferasyonun indüklenmesi ve anjiyogenezin aracılık etmesi yoluyla doğrudan kanser büyümesini destekleyebilir. Pankreas ve akciğer kanserlerinde, NET’lerin, aktive edilmiş nötrofiller tarafından ekstraselüler matriksin parçalanması yoluyla bilinen bir anjiyogenez hızlandırıcısı olan matriks metalloproteinaz 9’u (MMP-9) içerdiği ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımını tetiklediği bulunmuştur (Deryugina et al., 2014; Jaboury et al., 2023).

NET’ler ayrıca kanser hücre metastazını da teşvik edebilir. NETosis’in bilinen bir indükleyicisi olan ve artan nötrofil seviyeleri tarafından tetiklenen artan interlökin-17/Granülosit koloni uyarıcı faktör (IL17/GCSF) eksenleri, akciğer ve meme kanserlerinin metastazıyla ilişkilendirilmiştir. NETosis’in aktivasyonunda anahtar bir hücre yüzey proteini olan B2-integrin (CD18), farelerde kolorektal kanserin karaciğere metastazıyla ilişkilendirilmiştir. Non-

alkolik yağlı karaciğer hastalığında NETosis, hepatosellüler kanser gelişimi ve metastazıyla ilişkilendirilmiştir (Jaboury et al., 2023; van der Windt et al., 2018; Zhang et al., 2020).

Hücre içi bileşenlerin lizozom bağımlı bir bozunma süreci olan otofaji, NETosis'te önemli bir rol oynar. NETosis'in tetikleyicilerinden biri olan ROS, hem otofajik sinyallemeyi indükleyebilir hem de inhibe edebilir. Forbol miristat asetat (PMA) ile uyarılan nötrofillerde, NET oluşumu için otofaji ve ROS üretimi gereklidir. Akut promyelositik lösemi hücrelerinde, otofajinin NETosis'i indüklediği bulunmuştur (Jaboury et al., 2023; Yun et al., 2020).

### **Kansere Terapotik Yaklaşımda NETosisin Hedeflenmesi**

Son zamanlarda tamamlanan araştırma verileri, bir dizi patolojik durumda NET oluşumunu baskılamının potansiyel bir fayda sağlayabileceğini göstermektedir. DNase I ile tedavi, NET'lerin ortadan kaldırılmasını sağlayabilir ve bir dizi klinik öncesi hastalık modelinde uygulanmış olup belirgin yan etki gözlenmemiştir. Ek olarak, DNase I, onlarca yıldır kistik fibrozun yönetimi için klinik kullanımda olup, ilaç güvenilirliği bulunmaktadır. Ancak DNase I bir proteindir ve tüm protein ilaçlarında olduğu gibi, uzun süreli uygulama, bağışıklık tepkilerini ve ardından ilacın temizlenmesini böylece de etkinin ortadan kalkmasını önlemek için türlere özgü versiyonlar gerektirir (Cedervall et al., 2016; Thomson, 1995).

NET'leri destabilize etmenin ve ortadan kaldırmanın bir başka yolu da heparin eklemektir. Negatif yükü nedeniyle heparin histonlara karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve histonları kromatinden çıkarabilir, bu da NET yapısının çökmesine neden olur.

Heparinin NET'i inhibe eden bir ilaç olarak avantajı, klinikte antikoagülan olarak kullanımında kapsamlı deneyim olmasıdır. Ayrıca, bir protein olmadığı için türlere özgü ilaç varyantlarına gerek yoktur (Cedervall et al., 2016; Fuchs et al., 2010).

Kanserli bir bireyde periferik organlarda NET kaynaklı oluşan inflamatuvar durumun metastaza katkıda bulunan bir faktör olduğu düşünülmektedir. Tümör taşıyan farelerin böbrek endotelinde yapışma moleküllerinin ekspresyonlarının up-regüle olduğu belirlenmiştir, bu muhtemelen tümör hücreleri tarafından ikincil bölgelere ekstrasvazyon için kullanılabilir. Bu adezyon moleküllerinin up-regülasyonunun, kanserli bireylerde metastazların geliştiği yerler de dahil olmak üzere vücudun her yerinde meydana gelen genel bir süreç olup olmadığı henüz anlaşılamamıştır. Eğer öyleyse, kanser hastalarının NET'i inhibe eden bir ilaçla erken tedavisi, tümör hücrelerinin yayılmasını önlemede faydalı olabilir (Cedervall & Olsson, 2015).

Protein-arginin deiminaz 4 (PAD4), NET'lerin oluşumunda ve daha spesifik olarak NETosis sırasında meydana gelen histon sitrülasyonunda güçlü bir şekilde rol oynamaktadır. Yeni, seçici PAD4 inhibitörleri yakın zamanda hem insan hem de fare NET'lerinin oluşumunu bozma kapasitesine sahip olarak tanımlanmıştır. Bu küçük molekül inhibitörleri istenmeyen NETosisi önlemek için klinik bir araç sağlayabilir. NET'lerin rol oynadığına inanılan hastalıkların sayısı düşünüldüğünde, bu ilaçların terapötik potansiyeli önemli olmalıdır (Cedervall & Olsson, 2015).

## **Sonuç**

Nötrofiller, kanser hücreleri ile doğrudan gelen bağışıklık sistemi arasında karmaşık ve önemli etkileşimlerde rol oynarlar.

Uyarılmış nötrofiller tarafından NET'lerin oluşumunun keşfi, nötrofillerin inflamatuvar hastalıklar, kanser ve trombozdaki beklenmedik işlevlerini ortaya çıkarmıştır.

NETosis, kromatinin dekontansasyonuna, ardından nükleer ve granüler membran parçalanmasına, bileşenlerin karışmasına ve son olarak sitoplazmik membran lizisine ve NET'lerin salınmasına yol açan yeni bir hücre ölüm programıdır.

Hem nötrofiller hem de NETosis, doğrudan tümör oluşumuna neden olan bir tümör mikroçevresine katkıda bulunarak dolaylı olarak ise inflamasyon yoluyla DNA hasarını tetikleyerek karsinogeneizde rol oynamaktadır.

Nötrofiller ile kanser hücreleri arasındaki etkileşimin detaylarını anlamak ve kanser immünoterapilerinin etkinliğini artırmak için NETosisin anahtar bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, kanser için alternatif tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır, sadece tümör hücrelerini ortadan kaldırmak amacıyla değil aynı zamanda kanserli bir bireyde tümör kaynaklı sistemik etkilerin geri döndürülemez hale gelmesini önleyen terapötik müdahale sağlamak için de NETosisi hedeflemek böyle bir fırsat sağlayabilir.

## Kaynaklar

Branitzki-Heinemann, K., Möllerherm, H., Völlger, L., Husein, D. M., De Buhr, N., Blodkamp, S., . . . von Köckritz-Blickwede, M. J. F. i. i. (2016). Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level. 7, 518.

Cedervall, J., & Olsson, A.-K. J. O. (2015). NETosis in cancer. 2(11), 900.

Cedervall, J., Zhang, Y., & Olsson, A.-K. J. C. r. (2016). Tumor-induced NETosis as a risk factor for metastasis and organ failure. 76(15), 4311-4315.

Chen, K. W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N. D., . . . Schroder, K. J. S. i. (2018). Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. 3(26), eaar6676.

Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., & Simon, H.-U. J. T. J. o. e. m. (2008). Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. 205(3), 685-698.

Cools-Lartigue, J., Spicer, J., Najmeh, S., Ferri, L. J. C., & sciences, m. l. (2014). Neutrophil extracellular traps in cancer progression. 71, 4179-4194.

Cristinziano, L., Modestino, L., Antonelli, A., Marone, G., Simon, H.-U., Varricchi, G., & Galdiero, M. R. (2022). *Neutrophil extracellular traps in cancer*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Dejas, L., Santoni, K., Meunier, E., & Lamkanfi, M. (2023). *Regulated cell death in neutrophils: From apoptosis to NETosis and pyroptosis*. Paper presented at the Seminars in Immunology.

Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, T. A., . . . Wagner, D. D. J. P. o. t. N. A. o. S. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *109*(32), 13076-13081.

Demers, M., & Wagner, D. D. (2014). *NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis*. Paper presented at the Seminars in thrombosis and hemostasis.

Deryugina, E. I., Zajac, E., Juncker-Jensen, A., Kupriyanova, T. A., Welter, L., & Quigley, J. P. J. N. (2014). Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment. *16*(10), 771-788.

Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers Jr, D. D., . . . Wagner, D. D. J. P. o. t. N. A. o. S. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *107*(36), 15880-15885.

Jaboury, S., Wang, K., O'Sullivan, K. M., Ooi, J. D., & Ho, G. Y. J. F. i. i. (2023). NETosis as an oncologic therapeutic target: a mini review. *14*, 1170603.

Kumar, V., & Sharma, A. J. I. i. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *10*(11), 1325-1334.

Lip, G. Y., Chin, B. S., & Blann, A. D. J. T. l. o. (2002). Cancer and the prothrombotic state. *3*(1), 27-34.

Lodge, K. M., Cowburn, A. S., Li, W., & Condliffe, A. M. J. I. j. o. m. s. (2020). The impact of hypoxia on neutrophil degranulation and consequences for the host. *21*(4), 1183.

Moulding, D. A., Akgul, C., Derouet, M., White, M. R., & Edwards, S. W. J. J. o. l. b. (2001). BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *70*(5), 783-792.

Nadesalingam, A., Chen, J. H., Farahvash, A., & Khan, M. A. J. F. i. i. (2018). Hypertonic saline suppresses NADPH oxidase-dependent neutrophil extracellular trap formation and promotes apoptosis. *9*, 359.

Noseykina, E., Schepetkin, I., Atochin, D. J. J. o. E. B., & Physiology. (2021). Molecular mechanisms for regulation of neutrophil apoptosis under normal and pathological conditions. *57*(3), 429-450.

Olsson, A.-K., & Cedervall, J. J. F. i. I. (2016). NETosis in cancer–platelet–neutrophil crosstalk promotes tumor-associated pathology. *7*, 373.

Rogers, C., Erkes, D. A., Nardone, A., Aplin, A. E., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. J. N. c. (2019). Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *10*(1), 1689.

Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., & Alnemri, E. S. J. N. c. (2017). Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *8*(1), 14128.

Shao, B.-Z., Yao, Y., Li, J.-P., Chai, N.-L., & Linghu, E.-Q. J. F. i. O. (2021). The role of neutrophil extracellular traps in cancer. *11*, 714357.

Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., & Allavena, P. J. E. j. o. c. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *42*(6), 717-727.

Thiam, H. R., Wong, S. L., Wagner, D. D., Waterman, C. M. J. A. r. o. c., & biology, d. (2020). Cellular mechanisms of NETosis. *36*(1), 191-218.

Thomson, A. H. J. J. o. t. R. S. o. M. (1995). Human recombinant DNase in cystic fibrosis. *88*(Suppl 25), 24.

van der Windt, D. J., Sud, V., Zhang, H., Varley, P. R., Goswami, J., Yazdani, H. O., . . . Minervini, M. I. J. H. (2018). Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis. *68*(4), 1347-1360.

Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. J. I. (2019). Caspases in cell death, inflammation, and disease. *50*(6), 1352-1364.

Villunger, A., Scott, C., Bouillet, P., & Strasser, A. J. B., The Journal of the American Society of Hematology. (2003). Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. *101*(6), 2393-2400.

Vorobjeva, N., & Chernyak, B. J. B. (2020). NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *85*, 1178-1190.

Vorobjeva, N., Galkin, I., Pletjushkina, O., Golyshev, S., Zinovkin, R., Prikhodko, A., . . . Chernyak, B. J. B. e. B. A.-M. B. o. D. (2020). Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *1866*(5), 165664.

Yun, H. R., Jo, Y. H., Kim, J., Shin, Y., Kim, S. S., & Choi, T. G. J. I. j. o. m. s. (2020). Roles of autophagy in oxidative stress. *21*(9), 3289.

Zhang, Y., Chandra, V., Riquelme Sanchez, E., Dutta, P., Quesada, P. R., Rakoski, A., . . . Horne, W. J. J. o. e. m. (2020). Interleukin-17–induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer. *217*(12).

## BÖLÜM IV

### Kadmiyum ve Epigenetik Etkileri

**Emrah TÜMER**

#### 1. Giriş

Ağır metaller, doğada bulunan ancak insan faaliyetleri sonucu çevreye yüksek miktarlarda yayılan elementlerdir. Bilinen elementlerin neredeyse %80'i metal grubuna dahildirler. Çoğu metalin oldukça reaktif doğası, oksijen, sülfür ve klorür gibi diğer bileşiklerle kompleksler oluşturmalarına neden olur. Bu reaktivite, toksik olmalarının birincil yolu olsa da, birçok metal, iz miktarlarda, normal fizyolojik süreçler için hayati öneme sahiptir; örneğin, demir oksijen taşınmasında, manganez ve selenyum antioksidan savunmasında ve çinko metabolizmada önemli rol oynar (van Dronkelaar et al., 2018). Bu esansiyel metallerde toksisite, konsantrasyonların çok düşük veya çok yüksek olduğu durumlarda ortaya çıkar. Bazı metaller için ise faydalı herhangi bir fizyolojik konsantrasyon yoktur; bu metaller, düşük konsantrasyona dahi, sadece toksisiteye neden olma potansiyeline sahiptir (Tchounwou, Yedjou, Patlolla, & Sutton, 2012).

Geçtiğimiz yüzyıl boyunca kadmiyuma (Cd) maruz kalmanın birçok farklı şekli gösterilmiştir Cd birçok insan faaliyeti

sonucunda çevrede bulunmaktadır. Cd kirliliğinin sürekli kaynakları, endüstride aşındırıcı bir reaktif olarak kullanılmasına ve PVC ürünlerinde stabilizatör, renk pigmentleri ve Ni-Kd pillerde kullanımıyla ilgilidir. Bunların yanı sıra, elektro kaplama, kaynak, elektrik ve nükleer fizyon uygulamalarında, plastik stabilizatörü, lehim, alaşım üretiminde kullanılan bir metaldir. Bu nedenle, endüstriyel süreçler antropojenik Cd emisyonlarının birincil kaynağıdır. Ayrıca, Cd içeren sentetik fosfat gübreler de önemli bir kirlilik kaynağıdır (Wuana & Okieimen, 2011).

Bu metallerin büyük bir kısmı toksik özelliklere sahiptir ve çevresel kirlilik ile sağlık sorunlarına yol açabilirler. Hızlı sanayileşme, madencilik, metal işleme, kirlenmiş sulama suları ve endüstriyel atıkların yanlış yönetimi, su kaynaklarında ve çevrede ağır metal birikimi nedeniyle kirlenmesine neden olmaktadır. İnsanlar, ağır metallerin biyobirikim eğilimleri ve bozunmaya dirençli yapıları nedeniyle, kirlenmiş kaynakları kullanarak gıda üretmekte, bu da nihayetinde gıda zincirinde birikmektedir. Kirlenmiş toprakların bulunduğu bölgelerde, ev tozu kadmiyuma maruz kalmanın potansiyel bir yoludur (Charkiewicz, Omeljaniuk, Nowak, Garley, & Nikliński, 2023).

## **2. Cd'un hücreye alınması**

İnsan vücudu genellikle dört yolla ağır metal iyonlarına maruz kalır: metal ile kirlenmiş yiyeceklerin yenmesi, kirlenmiş suyun içilmesi, cilt teması ve kirlenmiş havanın solunması (Jaishankar, Tseten, Anbalagan, Mathew, & Beeregowda, 2014). İnsanlarda Cd maruziyetinin ana nedeni, Cd ile kirlenmiş suyun içilmesi ve yiyeceklerin tüketilmesi veya yoluyla solunumdur, cilt yoluyla emilim nispeten nadirdir (Kesari et al., 2021). Cd vücuda girdiğinde, eritrositler ve albümin aracılığıyla kan dolaşımına taşınır ve ardından böbreklerde, karaciğerde ve bağırsakta birikir. Cd'un biyolojik yarı ömrü, diğer bir deyişle insanlarda vücuttan atılması için geçen süre yaklaşık 20-30 yıldır (Järup, Rogenfelt, Elinder, Nogawa, & Kjellström, 1983).

Cd, giderek daha fazla gıda ve içecek ürünlerini kirlüten bir ağır metaldir. Bir kez alındığında, Cd insan sağlığı için önemli bir

tehdit oluşturan toksik etkiler gösterir. Ağır metaller, metal benzeri bileşiklerin son derece toksik doğasından sorumlu olan kovalent bağlar oluşturma eğilimindedir. Bu metaller, organik gruplara kovalent olarak bağlanabilir ve lipofilik bileşikler veya iyonlar oluşturabilir. Bu metalik bileşiklerin lipofilik doğası nedeniyle hücre zarından geçerek hücreye girerler. Ağır metaller hücre içerisini pasif difüzyon, aktif taşıma ve endositoz olmak üzere 3 farklı yoldan girmektedir. Hücreye nüfuz ettiklerinde ise, hücre organelleriyle etkileşime girerek toksik etkilere neden olur (Briffa, Sinagra, & Blundell, 2020).

### **3. Cd'un insan fizyolojisi üzerine etkileri**

Cd canlıların biyolojik fonksiyonlarında herhangi bir işleve sahip olmayan ve neredeyse tüm canlılar için toksisiteye sahip bir ağır metaldir (Friberg, Elinder, Kjellstrom, & Nordberg, 2019). Zehirli Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı'na (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) göre, Cd en toksik 7. ağır metaldir (ATSDR, 2012).

İnsanlarda, Cd oral yolla alındığında tükürük salgılama, kusma, karın ağrısı, baş dönmesi, bilinç kaybı ve anal sifinkterde ağrılı spazma neden olur. Cd'un inhalasyonu kuru boğaz, öksürük, baş ağrısı, grip benzeri semptomlar, ateş, kusma, göğüs ağrıları, akut pulmoner ödem, astım benzeri bronkospazm, pnömoni, kas zayıflığı ve bacak ağrılarına yol açar (Johri, Jacquillet, & Unwin, 2010).

İnsanlarda Cd maruziyeti, böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğu, pulmoner ödem, testis hasarı, osteomalazi ve adrenal bezler ile hematopoietik sistemde hasar gibi çeşitli olumsuz etkilere neden olabilir (Tinkov et al., 2018). Sinir sistemi de aynı şekilde, uzun süreli ve düşük doz kadmiyum maruziyetine karşı özellikle savunmasızdır. Ağır metaller kronik maruziyet, beyin ve periferik sinirler de dahil olmak üzere çeşitli organları etkiler. Çoğu Cd toksisite araştırması böbrekler ve diğer organlar üzerindeki etkilerine odaklanmışken, Cd nörotoksik etkileri olabileceğini gösteren giderek artan kanıtlar bulunmaktadır. Merkezi sinir sistemi Cd dahil olmak üzere ağır metallerin zararlı etkilerine duyarlıdır. Çalışmalar, Cd'un kan-beyin bariyerini aşabildiğini ve beyinde

biriktiğini, bu durumun normal nöronal fonksiyonu bozabileceğini göstermiştir (Arruebarrena, Hawe, Lee, & Branco, 2023).

Cd birkaç farklı mekanizma ile hasara neden olmaktadır. Cd, solunum zinciri enzimlerini inhibe ederek, mitokondriyal zar potansiyelini çökerten ve mitokondrilerin şişmesine neden olarak solunumu engelleyen birçok mitokondriyal proteinin (enzimler ve dış ve iç zarlar arasındaki taşıyıcı sistemler) aktivitesini değiştirebilir (Lee & Thévenod, 2020). Mitokondriler, enerji üretimi ve hücre metabolizma için kritiktir. Cd, mitokondriyal fonksiyonu bozarak ATP üretiminin azalmasına ve ROT üretiminin artması neticesinde oksidatif strese yol açar. Beyin gibi organlar, yüksek oksijen tüketimi ve yağ açısından zengin ortamı nedeniyle oksidatif hasara özellikle duyarlıdır. Artan ROT seviyeleri, nöronal hücrelerde lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarına neden olabilir, bu da hücrelerin işlevini ve hatta nöronal hücre ölümüne netice verebilir (Branca et al., 2020).

#### **4. Cd ve Epigenetik**

Kadmiyumun toksik etkileri yalnızca hücre hasarla sınırlı kalmamakta, aynı zamanda epigenetik mekanizmalar üzerinden gen ekspresyonunu da etkileyerek uzun vadeli biyolojik sonuçlara yol açabilmektedir. Kromatin, DNA ve histon proteinlerini içeren dinamik bir yapıdır ve farklı iç ve dış uyaranlara yanıt vererek genlerin aktivasyonunda veya baskılanmasında önemli bir rol oynar. Epigenetik çalışmalar, DNA dizisini değiştirmeden kromatinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir araştırma alanıdır. Bu değişiklikler, başlıca DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar olmak üzere üç temel epigenetik mekanizmayı kapsar.

Epigenetik değişiklikler, DNA dizisini değiştirmeden gen aktivitesini etkileyen ve kalıtılabilen modifikasyonlardır. Bu değişiklikler, genlerin ne zaman ve ne kadar aktif olacağını belirler ve organizmaların çevreye uyum sağlamasına yardımcı olur. Başlıca epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA'lardır. Laboratuvar ve canlı organizma çalışmaları, özellikle kadmiyum gibi çevresel faktörlere

maruz kalındığında bu mekanizmaların gen ekspresyonunu önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Bu mekanizmalar, genlerin aktivitesini açıp kapatarak veya seviyesini değiştirerek organizmanın çevresel etkilere verdiği tepkiyi düzenler. Kısacası, epigenetik değişiklikler gen aktivitesini dinamik olarak ayarlayarak organizmaların adaptasyonunda kritik rol oynar ve çevresel toksinlere maruz kalmak bu mekanizmaları bozarak sağlık sorunlarına yol açabilir.

Kadmiyumun etkileri genellikle gen dizilimine özgü değildir; bu durum, epigenetik enzimlerin aktivitesinin dokuya ve gelişimsel zamana bağlı olarak değişmesinden kaynaklanabilir.

#### **4.1 Kadmiyum ve DNA metilasyonu**

Çevresel metallerin (örneğin, arsenik, krom, kadmiyum ve nikelle uzun süreli maruziyet) bireylerde kanser riskini artırdığına dair kanıtlar giderek çoğalmaktadır. Epigenetik işaretlerdeki değişimlerin, gen ekspresyonu ile hastalıkların oluşumu ve ilerlemesi arasında bağlantılar oluşturabileceği düşünülmektedir.

DNA metilasyonu önemli epigenetik düzenlemelerden birisidir. Tüm hücrelerdeki genetik yapı aynı olmasına rağmen zigot halindeki tek hücre değişik doku tiplerine farklılaşmaktadır. Bu farklılaşmanın kontrolünde en başta gelen düzenleyicilerden biri ise doku tiplerine özel olan transkripsiyon faktörleridir. Hangi doku tipinde hangi genlerin sentezleneceği, doku tipine spesifik olan transkripsiyon faktörlerinin ilişkili olduğu genin promoter bölgesine bağlanmasına göre şekillenmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin spesifik gene bağlanması ise genelde DNA metilasyonu ve Histon modifikasyonu ile düzenlenmektedir.

DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi tarafından CpG dinükleotidindeki (sitozin-fosfat bağının guanin ile oluşturduğu yapı) sitozin bazının 5. pozisyonuna bir metil grubunun eklenmesiyle oluşur. Genellikle DNA metilasyonu, gen ifadesini baskılayan bir mekanizmadır.

DNA metilasyonu, nesiller boyunca korunan bir epigenetik işarettir ve bu koruma özellikle DNA replikasyonu sırasında

gerçekleşir. Replikasyon sırasında, yeni sentezlenen DNA iplikçiğindeki sitozin molekülleri henüz metillenmemiştir. Bu durum, DNA iplikçiğini yarı-metillenmiş bir halde bırakır. Yarı-metillenmiş DNA, DNMT1 enzimini bölgeye çekerek yeni sentezlenen DNA zincirine metil gruplarının eklenmesini sağlar ve böylece DNA tamamen metillenmiş hale gelir.

DNMT1 enzimi, yarı-metillenmiş DNA'yı tanır ve eksik olan metilasyonu tamamlayarak bu epigenetik işaretin korunmasını sağlar. Öte yandan, DNMT3A ve DNMT3B enzimleri, daha önce metillenmemiş DNA üzerinde çalışarak yeni metilasyon işaretlerinin eklenmesinde rol oynar. Bu mekanizmalar, DNA metilasyonunun hem hücresel hem de nesiller arası devamlılığını sağlar.

Kadmiyum (Cd), DNA metiltransferaz (DNMT) enzimlerine bağlanarak bu enzimlerin fonksiyonlarını etkileyebilir ve global DNA metilasyon seviyelerinde değişikliklere yol açabilir. Kadmiyumun neden olduğu reaktif oksijen türleri (ROS), metil gruplarının azalmasına veya DNA metil bağlanma bölgelerinin oksidasyonuna neden olabilir. Araştırmalar, kadmiyum maruziyetinin global DNA metilasyon seviyelerinde belirgin değişikliklere yol açtığını ve 5-metilsitozin (5mC) içeriğini artırarak DNA hipermetilasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Bu etkilerin doza ve maruziyet süresine bağlı olarak değiştiği, özellikle hepatopankreas dokusunda global DNA hipermetilasyonunun gözlemlendiği tespit edilmiştir (Nica et al., 2017).

Kadmiyumun hipokampal nöronlardaki etkileri de dikkat çekicidir. Kadmiyum maruziyeti, DNA metilasyon seviyelerini artırarak DNA metiltransferaz (DNMT) enzimlerinin, özellikle DNMT1 ve DNMT3 $\alpha$ 'nın ekspresyonunu artırır. DNA metilasyon inhibitörü 5-Aza-CdR kullanıldığında, kadmiyumun neden olduğu global DNA metilasyon artışı engellenmiş, mitokondriyal morfolojideki bozukluklar düzelmiş ve hücre canlılığı artmıştır. Bu durum, kadmiyumun hipokampal nöronlarda DNA metilasyonu aracılığıyla mitokondri dinamiklerini değiştirerek nörotoksositeye yol açtığını ve öğrenme ile hafıza gibi bilişsel yeteneklerin azalmasıyla ilişkilendirildiğini göstermektedir (Geng et al., 2024).

Yine sinir sistemi üzerine yapılan araştırmalarda, kadmiyum maruziyeti otoimmün reaksiyonlar, ROS oluşumu ve bağışıklık sistemindeki disfonksiyon gibi mekanizmalar aracılığıyla epigenetik değişimler yaratabilir. Bu durum, myelin hasarına ve multiple skleroz (MS) hastalığına neden olabilmektedir. Kadmiyumun MS hastalarında inflamatuvar süreçleri şiddetlendirdiği, APOE geninin hipermetilasyonuna ve ACKR3 geninin hipometilasyonuna yol aarak miyelin onarımı ile inflamasyon kontrolünde olumsuz etkiler yarattığı rapor edilmiştir (Nourian et al., 2021).

Kadmiyum, hem akut hem de kronik maruziyetlerde DNMT aktivitesini etkiler. Akut kadmiyum maruziyeti, DNMT aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olur. Bu inhibisyon, kadmiyumun DNMT enziminin katalitik bölgesinden bağımsız olarak DNA bağlanma bölgesiyle etkileşime girmesiyle gerçekleşir. Akut kadmiyum maruziyeti, DNA hipometilasyonuna neden olur. Ancak, uzun süreli maruziyet sonrasında DNA hipermetilasyonu gözlemlenir. Kronik kadmiyum maruziyeti, DNMT aktivitesinde ve DNA hipermetilasyonunda artışa yol aar. Bu durum, malign transformasyonla ilişkilendirilmiştir. (Takiguchi, Achanzar, Qu, Li, & Waalkes, 2003).

TRL1215 fare karaciğer hücrelerinde yapılan bir çalışmada, kısa süreli kadmiyum maruziyeti DNMT aktivitesini inhibe ederek DNA hipometilasyonuna neden olmuş, uzun süreli maruziyet ise DNMT aktivitesini artırarak DNA hipermetilasyonuna yol açmıştır (Wang, Li, Shao, Tan, & Cai, 2012).

Yüksek doz kadmiyum maruziyeti, düşük dozlara göre daha belirgin metilasyon değişikliklerine neden olur. Örneğin, gen promotör bölgelerinde metilasyon azalmaları, belirli genlerin daha aktif hale gelmesini sağlar. Kadmiyuma maruz kalan hücrelerde F2rl3 geninde belirgin hipometilasyon gözlemlenmiş ve bu durumun metabolik hastalıklar ile oksidatif stresle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Ren et al., 2021)

Kadmiyum ayrıca TET proteinlerinin (TET1, TET2, TET3) aktivitesini azaltarak DNA metilasyon düzenini değiştirebilir. Bu proteinler, 5-metilsitozini (5mC) 5-hidroksimetilsitozin (5hmC) ve

diğer türevlerine dönüştürerek DNA demetilasyonunu sağlar. Kadmiyumun bu süreç üzerindeki baskılayıcı etkileri, epigenetik düzenlemelerin bozulmasına yol açabilir (Guo, Kumar, & Lombard, 2022).

Kısa süreli Cd maruziyeti K562 hücrelerinde hipometilasyona neden olurken (Huang, Zhang, Qi, Chen, & Ji, 2008), uzun süreli düşük doz maruziyet insan embriyo akciğer fibroblast hücrelerinde genomik DNA metilasyonunda artışa yol açmıştır. Kadmiyum maruziyetinin DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b genlerinin mRNA seviyelerini artırdığı gözlemlenmiştir (Jiang et al., 2008).

Kadmiyumun, özellikle baz çıkarma tamiri (BER), nükleotid çıkarma tamiri (NER) ve hata eşleşme tamiri (MMR) gibi DNA tamir sistemlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Giaginis, Gatzidou, & Theocharis, 2006). Yapılan çalışmalarda bu etkilerini epigenetik aracılığıyla gerçekleştirebilmektedir. Örneğin, MLH1, mismatch repair (MMR) olarak bilinen önemli bir DNA tamir yolunda görev alan bir proteindir. Cd maruziyetinin MLH1 geninin promotor bölgesinde hipermetilasyona neden olduğu ve bunun sonucunda MLH1 ekspresyonunun azaldığı. Kadmiyum maruziyeti, hMSH2, ERCC1, XRCC1, ve hOGG1 gibi DNA tamir genlerinin promotör bölgelerinde belirgin bir hipermetilasyona neden olmuştur ve bu etkiler DNA demetilasyon ajanı 5-Aza-2'-deoksisitidin, DNMT aktivitesini azaltarak kadmiyumun neden olduğu global DNA hipermetilasyonu ve DNA tamir genlerinin baskılanmasını kısmen tersine çevirmiştir (Z.-h. Zhou, Lei, & Wang, 2012).

## **4.2 Kadmiyum ve Histon Modifikasyonu**

Histon modifikasyonları, DNA'nın histon proteinleriyle olan etkileşimini düzenleyerek gen ekspresyonunun kontrolünde kritik bir rol oynar. Bu modifikasyonlar, histon proteinlerinin belirli amino asit bölgelerine eklenen kimyasal gruplar yoluyla gerçekleşir. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumoylasyon gibi farklı modifikasyon türleri, kromatin yapısını dinamik bir şekilde değiştirerek genlerin aktif veya baskılanmış durumda olmasını sağlar.

Histon modifikasyonlarının kalıtımı, özellikle hücre bölünmesi sırasında önem taşır. Replikasyon sırasında, yeni sentezlenen DNA'ya bağlanan histonlar henüz modifiye edilmemiş durumdadır. Ancak, ebeveynden gelen histon proteinleri üzerinde bulunan modifikasyonlar, kromatin düzenleyici enzimler için bir rehber işlevi görür.

Bu süreçte, histon asetilasyonunu sağlayan histon asetil transferaz (HAT) ve histon metilasyonunu gerçekleştiren histon metil transferaz (HMT) gibi enzimler, orijinal histonların modifikasyon desenini yeni histonlara aktarır. Aynı şekilde, histon deasetilaz (HDAC) ve histon demetilaz (HDM) gibi enzimler de eski modifikasyonları silerek yeni düzenlemeler yapar. Bu mekanizma, kromatinin gen düzenleyici özelliklerinin korunmasını ve genetik bilginin yanı sıra epigenetik işaretlerin de nesiller boyunca aktarılmasını sağlar.

Kadmiyumun hücre transformasyonuna neden olduğu durumlarda, çeşitli histon modifikasyon türleri keşfedilmiştir. Bu modifikasyonlar, farklı mekanizmalar aracılığıyla kadmiyumun istenmeyen etkilerine katkıda bulunabilir.

Kadmiyumun, HDAC2'nin artışı, gen ekspresyonunun baskılanmasına ve sinir hücrelerinde akson ve dendrit büyümesinin engellenmesine yol açtığı gösterilmiştir. Bu baskılanma sonucunda epigenetik düzenlemelerini değiştirerek gen ekspresyonunu baskılar ve nörotoksisiteye neden olur. Bu mekanizma, histon modifikasyonları üzerinden öğrenme ve hafıza gibi bilişsel süreçlerin bozulmasına neden olur. Trichostatin A (TSA) gibi HDAC inhibitörleri, kadmiyumun neden olduğu HDAC2 artışını baskılayarak dendrit büyümesindeki hasarı kısmen geri çevirmiştir (R. Zhou et al., 2020).

Kadmiyum, H3K4me2 ve H3K36me3 gibi histon modifikasyonlarını azaltırken, H3K9acS10ph, H4K5ac, H4K8ac ve H4K12ac seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu değişiklikler, hücre proliferasyonu, DNA tamiri ve aktif transkripsiyon süreçlerinde rol oynayan modifikasyonlardır (Liang et al., 2018).

Fare embriyosu üzerinde yapılan çalışmalarda histon deasetilaz 1 (HDAC1) seviyelerindeki artışla ilişkili olarak embriyolarda H4K8ac ve H4K12ac seviyelerini düşürmüştür. Bu durum, gen ekspresyonunun düzenlenmesini bozarak embriyo gelişimini engellemiştir (Zhu et al., 2021).

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada Cd maruziyeti, histon deasetilaz 2'nin (HDAC2) ekspresyonunu düzenleyerek nörotoksisiteyi daha da şiddetlendirir. HDAC2'nin artışı, gen ekspresyonunu artırarak epigenetik mekanizmaları tetikleyerek sinir hücrelerinde akson ve dendrit büyümesini engeller. Bu durum, öğrenme, hafıza ve diğer bilişsel işlevlerin bozulmasına yol açar (R. Zhou et al., 2020).

#### **4.3 Kadmiyum ve miRNA üzerinden etkileri**

MikroRNA'lar (miRNA), gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen küçük, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. Yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğundaki bu moleküller, hedef mRNA'ya bağlanarak ya mRNA'nın yıkımına neden olur ya da translasyonu engelleyerek gen ekspresyonunu baskılar. miRNA'lar, hücresel süreçlerde ve hastalık mekanizmalarında önemli rol oynar ve epigenetik düzenlemenin önemli bir bileşenidir.

MiRNA'lar, gen ekspresyonunu iki ana yolla düzenler. Birinci yol, translasyonun baskılanmasıdır. miRNA, hedef mRNA'nın 3'-uç bölgesindeki tamamlayıcı dizilere bağlanarak ribozomun mRNA'ya bağlanmasını engeller ve böylece protein sentezini durdurur. İkinci yol ise mRNA'nın degradasyonudur. miRNA, hedef mRNA ile tam veya kısmi uyum sağladığında, mRNA'nın yıkımını başlatır. Bu iki yol, miRNA'ların genetik bilgi akışını düzenlemesini sağlar.

Bunlara ilaveten, hücre döngüsü, apoptoz, hücresel farklılaşma, stres yanıtı ve bağışıklık sistemi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde kritik rol oynar. Bunun yanı sıra, miRNA düzensizlikleri birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Özellikle kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve

metabolik hastalıklarda miRNA ekspresyonunda anormallikler gözlemlenmiştir. miRNA'lar, teşhis ve tedavi alanlarında büyük bir potansiyele sahiptir. Stabil yapıları sayesinde, kan, plazma ve diğer biyolojik sıvılarda kolayca tespit edilebilirler, bu da onları biyobelirteç olarak değerli kılar.

MiRNA'lar, kadmiyumun neden olduğu hücresel toksisite ve genetik kararsızlık süreçlerinde kritik bir rol oynar. Kadmiyum maruziyeti, bağırsak epitel hücrelerinde (IEC-6) apoptozu tetikleyerek anti-apoptotik Bcl-2 genini baskılar ve apoptotik Bax ile Caspase-3 proteinlerini artırır. Bu süreçte, miR-124-3p ve miR-370-3p gibi mikroRNA'lar Bcl-2 genini hedef alarak apoptozu düzenleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir (Yang et al., 2021). Kadmiyum, sıçan PC12 hücrelerinde toksisite ve sinir hasarını apoptoz ve ferroptozis yoluyla indüklerken, bu süreçte miR-34a-5p/Sirt1 ilişkisinin önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. Kadmiyum maruziyeti, miR-34a-5p ekspresyonunu artırarak Sirt1 ekspresyonunu baskılar ve buna bağlı olarak oksidatif stres ve hücre ölümü mekanizmalarını tetikler. miR-34a-5p'nin inhibe edilmesi, kadmiyumun neden olduğu toksisiteyi ve sinir hasarını hafifleterek hücre hayatta kalımını destekler (Hao et al., 2022). Kadmiyum ve diğer ağır metallerin (As-Cd-Pb) karışımı, miR-222'nin ekspresyonunu artırarak DNA onarım mekanizmasında yer alan Rad51c proteinini baskılar ve homolog rekombinasyonu engeller. Bu süreç, DNA hasarlarının birikmesine ve genetik kararsızlığa yol açarak kanser başlangıcını tetikleyen hücresel dönüşümle sonuçlanır. Anti-miR-222 kullanımı, miR-222'nin neden olduğu bu dönüşüm sürecini bloke ederek hücresel hasarı azaltabilir (María, Rodríguez-Sastre, & Valverde, 2019). Sonuç olarak, mikroRNA'lar, kadmiyumun hücresel hasar mekanizmalarındaki düzenleyici rolleri sayesinde hem toksik etkilerin anlaşılmasında hem de potansiyel terapötik hedefler olarak önem taşımaktadır.

## 5.Sonuç

Sonuç olarak, kadmiyumun epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkileri, DNA metilasyonunun gen ekspresyonu ve biyolojik süreçlerdeki rolünü anlamada kritik bilgiler sunmaktadır.

Bu ilişkiyi daha iyi anlamak, çevresel toksikoloji ve insan sağlığı araştırmaları için önemli bir zemin oluşturacaktır. İnsan çalışmalarında, kadmiyuma bağlı DNA metilasyon değişiklikleri potansiyel olarak biyomarker olarak kullanılabilir. Ancak bu ilişkilerin nedensellik açısından daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir.

## 6.Referanslar

Arruebarrena, M. A., Hawe, C. T., Lee, Y. M., & Branco, R. C. (2023). Mechanisms of cadmium neurotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 24(23), 16558.

ATSDR. (2012). Public Health Statement Cadmium. Division of Toxicology and Human Health Sciences. 2012. Retrieved from <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp5.pdf>

Branca, J. J., Fiorillo, C., Carrino, D., Paternostro, F., Taddei, N., Gulisano, M., . . . Becatti, M. (2020). Cadmium-induced oxidative stress: focus on the central nervous system. *Antioxidants*, 9(6), 492.

Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9).

Charkiewicz, A. E., Omeljaniuk, W. J., Nowak, K., Garley, M., & Nikliński, J. (2023). Cadmium toxicity and health effects—a brief summary. *Molecules*, 28(18), 6620.

Friberg, L. T., Elinder, G.-G., Kjellstrom, T., & Nordberg, G. F. (2019). *Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal: Volume 2: Effects and response* (Vol. 1): CRC press.

Geng, H., An, Q., Song, J., He, D., Han, H., & Wang, L. (2024). Cadmium-induced global DNA hypermethylation promoting mitochondrial dynamics dysregulation in hippocampal neurons. *Environmental Toxicology*, 39(4), 2043-2051.

Giaginis, C., Gatzidou, E., & Theocharis, S. (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 213(3), 282-290.

Guo, A. H., Kumar, S., & Lombard, D. B. (2022). Epigenetic mechanisms of cadmium-induced nephrotoxicity. *Current opinion in toxicology*, 32, 100372.

Hao, R., Ge, J., Song, X., Li, F., Sun-Waterhouse, D., & Li, D. (2022). Cadmium induces ferroptosis and apoptosis by modulating miR-34a-5p/Sirt1axis in PC12 cells. *Environmental Toxicology*, 37(1), 41-51.

Huang, D., Zhang, Y., Qi, Y., Chen, C., & Ji, W. (2008). Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicology letters*, 179(1), 43-47.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7(2), 60-72.

Järup, L., Rogenfelt, A., Elinder, C.-G., Nogawa, K., & Kjellström, T. (1983). Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 327-331.

Jiang, G., Xu, L., Song, S., Zhu, C., Wu, Q., Zhang, L., & Wu, L. (2008). Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. *Toxicology*, 244(1), 49-55.

Johri, N., Jacquillet, G., & Unwin, R. (2010). Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*, 23, 783-792.

Kesari, K. K., Soni, R., Jamal, Q. M. S., Tripathi, P., Lal, J. A., Jha, N. K., . . . Ruokolainen, J. (2021). Wastewater treatment and reuse: a review of its applications and health implications. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232, 1-28.

Lee, W.-K., & Thévenod, F. (2020). Cell organelles as targets of mammalian cadmium toxicity. *Archives of toxicology*, 94(4), 1017-1049.

Liang, Z. L., Wu, D. D., Yao, Y., Yu, F. Y., Yang, L., Tan, H. W., . . . Lau, A. T. (2018). Epiproteome profiling of cadmium-transformed human bronchial epithelial cells by quantitative histone post-translational modification–enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Applied Toxicology*, 38(6), 888-895.

María, E. R. M. M.-P., Rodríguez-Sastre, A., & Valverde, M. (2019). As-Cd-Pb mixture induces cellular transformation via post-transcriptional regulation of Rad51c by miR-222. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 53, 910-920.

Nica, D. V., Popescu, C., Draghici, G. A., Andrica, F.-M., Privistirescu, I. A., Gergen, I. I., & Stöger, R. (2017). High-level dietary cadmium exposure is associated with global DNA hypermethylation in the gastropod hepatopancreas. *PLoS One*, 12(9), e0184221.

Nourian, Y. H., Beh-Pajooh, A., Aliomrani, M., Amini, M., Sahraian, M. A., Hosseini, R., . . . Ghahremani, M. H. (2021).

Changes in DNA methylation in APOE and ACKR3 genes in multiple sclerosis patients and the relationship with their heavy metal blood levels. *Neurotoxicology*, 87, 182-187.

Ren, C., Ren, L., Yan, J., Bai, Z., Zhang, L., Zhang, H., . . . Li, X. (2021). Cadmium causes hepatopathy by changing the status of DNA methylation in the metabolic pathway. *Toxicology letters*, 340, 101-113.

Takiguchi, M., Achanzar, W. E., Qu, W., Li, G., & Waalkes, M. P. (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental cell research*, 286(2), 355-365.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology: volume 3: environmental toxicology*, 133-164.

Tinkov, A. A., Filippini, T., Ajsuvakova, O. P., Skalnaya, M. G., Aaseth, J., Bjørklund, G., . . . Huang, P.-T. (2018). Cadmium and atherosclerosis: A review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies. *Environmental research*, 162, 240-260.

van Dronkelaar, C., van Velzen, A., Abdelrazek, M., van der Steen, A., Weijs, P. J., & Tieland, M. (2018). Minerals and sarcopenia; the role of calcium, iron, magnesium, phosphorus, potassium, selenium, sodium, and zinc on muscle mass, muscle strength, and physical performance in older adults: a systematic review. *Journal of the American Medical Directors Association*, 19(1), 6-11. e13.

Wang, B., Li, Y., Shao, C., Tan, Y., & Cai, L. (2012). Cadmium and its epigenetic effects. *Current medicinal chemistry*, 19(16), 2611-2620.

Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Notices*, 2011(1), 402647.

Yang, J., Chen, W., Sun, Y., Xia, P., Liu, J., & Zhang, W. (2021). The role of microRNAs in regulating cadmium-induced apoptosis by targeting Bcl-2 in IEC-6 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 432, 115737.

Zhou, R., Zhao, J., Li, D., Chen, Y., Xiao, Y., Fan, A., . . . Wang, H.-L. (2020). Combined exposure of lead and cadmium leads to the aggravated neurotoxicity through regulating the expression of histone deacetylase 2. *Chemosphere*, 252, 126589.

Zhou, Z.-h., Lei, Y.-x., & Wang, C.-x. (2012). Analysis of aberrant methylation in DNA repair genes during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium. *Toxicological Sciences*, 125(2), 412-417.

Zhu, J., Huang, Z., Yang, F., Zhu, M., Cao, J., Chen, J., . . . Liu, Z. (2021). Cadmium disturbs epigenetic modification and induces DNA damage in mouse preimplantation embryos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 219, 112306.

## BÖLÜM V

### Epilepsi Genetiği ve miRNA'ların Önemi

**Ender COŞKUNPINAR<sup>1</sup>**

**Hava YILDIRIM<sup>2</sup>**

**Mehmet YILDIRIM<sup>3</sup>**

#### Giriş

#### 1. Epilepsi genetiği

Epilepsi, ILAE tarafından "epileptik nöbetler oluşturmaya yönelik kalıcı bir yatkınlık ve bu durumun nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları" olarak tanımlanan ve provoke edilmemiş nöbetlere yol açan nörofizyolojik bir işlev bozukluğudur. Epilepsili kişilerde nöbetler sıklıkla diğer fonksiyonel bozukluklarla birlikte ortaya çıkar (Sands & Gelinas, 2024). Epilepsi ile beyin

---

<sup>1</sup> Prof. Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Üsküdar/İSTANBUL, Orcid: 0000-0002-1003-5544, ecoskunpinar@gmail.com

<sup>2</sup> Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Üsküdar/İSTANBUL, Orcid: 0000-0002-4234-7155, havayildirim55@gmail.com

<sup>3</sup> Prof. Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD, Üsküdar/İSTANBUL, Orcid: 0000-0003-1798-5478, mehmetyildirim58@gmail.com

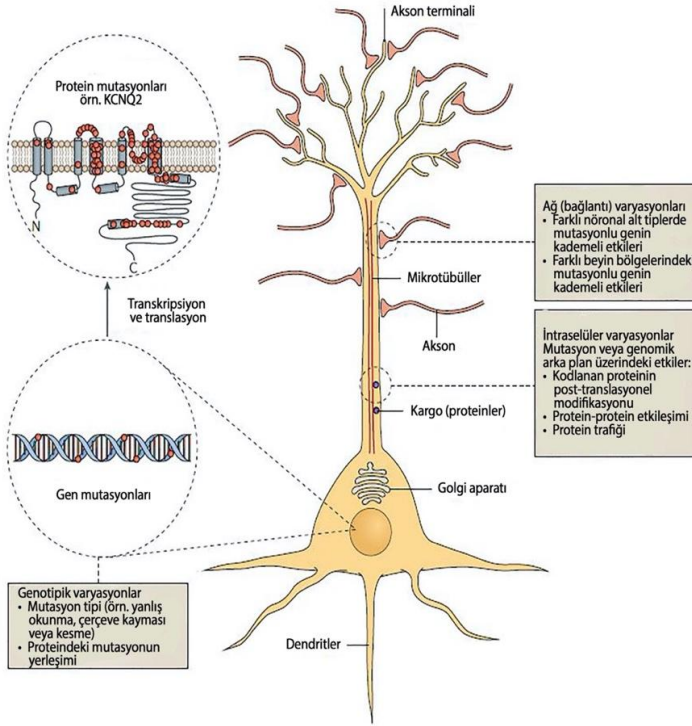
disfonksiyonu arasındaki ilişki oldukça karmaşıktır ve epilepsi ile ensefalopatinin ortak bir kökene sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bunun sebebi edinilmiş beyin hasarı, ya da bir genetik bozukluk olabilir. Öte yandan bu durum epileptik aktivitenin kendisinin ensefalopatiye neden olması şeklinde de yorumlanmaktadır. Epilepsi beyinde tekrarlayan anormal paroksizmal elektriksel aktiviteyi içerdiğinden, beyin fonksiyonunun altında yatan normal nörofizyolojik süreçler hem iktal hem de interiktal nöbetler sırasındaki epileptik aktivite ile tehlikeye girebilir. Bu sebeple özellikle yaşamın ilk yıllarında epilepsi görülme sıklığı sonraki dönemlere göre daha fazladır (Helmstaedter & ark, 2003; Aaberg & ark, 2017).

Klasik epidemiyolojik çalışmalar, epilepsi vakalarının yaklaşık 1/4'ünün altında yatan kazanılmış nedenlerin olduğunu göstermiştir. Yaygın nedenler arasında felç, beyin tümörleri, kafa travmaları, beyin enfeksiyonları ve dejeneratif bozukluklar bulunmaktadır. Vakaların geri kalan 3/4'ünün altında yatan etiyoloji bilinmemektedir (Perucca, Bahlo, & Berkovic, 2020). Son yıllarda, giderek daha fazla hassaslaşan manyetik rezonans görüntüleme (MRI), otoimmün nedenler ve Mendelian epilepsilerin vakaların bir kısmından sorumlu olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, çoğu epilepsi hastasında altta yatan etiyoloji açık değildir. Gen dizileme teknolojisindeki son gelişmelerin rehberliği ile elde edilen veriler, bu vakalarda genetiğin önemli bir rol oynadığı hipotezini oldukça güçlendirmiştir. Hedeflenmiş dizileme, tüm ekzom dizileme (WES) ve tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni dizileme yaklaşımları, epilepside oldukça başarılı olmuş ve yeni gen keşfini hızlandırmanın yanı sıra birçok hastada nedensel varyantların tespitini sağlamıştır (Perucca, Bahlo, & Berkovic, 2020; Ellis, Petrovski & Berkovic,

2020). Dizileme, en yaygın olarak patojenik germ hattı varyantlarını aramak için lenfosit türevli DNA'ya uygulanmaktadır (Perucca, Bahlo, & Berkovic, 2020). Beyin hastalığına neden olan somatik mutasyonlar bazen beyin dışında düşük miktarda bulunabilmekte ve bu mutasyonlar derin ekzom dizileme, derin hedefli dizileme veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanarak bukkal hücre veya lenfosit türevli DNA'da veya plazmadaki hücresiz DNA'da tespit edilebilmektedir (Hildebrand & ark 2018; Sim & ark, 2019).

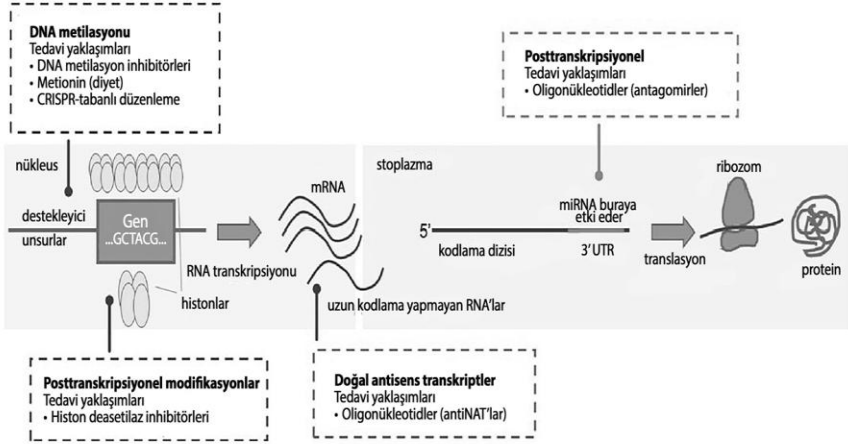
2018 yılında “ILAE Kompleks Epilepsi Konsorsiyumu” 15.212 vaka ile 29.677 kontrolünü kapsayan ve epilepsi alanında bugüne kadarki en büyük “genom çapında ilişkilendirme çalışmasını (GWAS)” yayımlamıştır. Bu çalışma epilepsi için 11'i yeni olmak üzere toplam 16 tane genom çapında anlamlı lokus ortaya çıkarmıştır (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2018). SCN1A, SCN2A ve PNPO gibi bu lokuslara karşılık gelen genlerin bazıları, geleneksel bağlantı ve dizileme analizleri ile tanımlanan yerleşik epilepsi genleriyle örtüşmüştür (Perucca, Bahlo, & Berkovic, 2020). Mevcut anlayışımız, epilepsilerin çok sayıda nadir Mendelian alt tipini içerdiği ve daha yaygın formların hem ortak hem de nadir varyant katkıları olan olası bir oligo veya poligenik mimariye sahip olduğu yönündedir (Petrovski & Berkovic, 2020). Şiddetli kafa travması veya felçden kaynaklanan durumlar gibi edinilmiş epilepsilerde bile, gerçek varyantlar tespit edilememiş olmasına rağmen, aile öyküsü verilerinin gösterdiği gibi genetik faktörler rol oynamaktadır (Eriksson & ark, 2019). Epilepsinin özel genetik mimarisi, epilepsi genetiğine ilişkin mevcut bilgilerin diğer nörolojik durumlara ve ayrıca yaygın nörolojik olmayan bozukluklara hem yaygın hem de nadir varyantların katkıları açısından karşılaştırılması veya

kıyaslanmasıyla gösterilebilecektir. Karmaşık hastalıkların araştırılması 1) uygun analitik yöntemlerin eksikliği, 2) örneklem boyutunun büyüklüğü ve 3) metilasyon, histon modifikasyonları, transkriptomlar vb. verileri oluşturulmasına yönelik multi-omik yaklaşımlar gibi faktörlere bağlıdır. (Şekil 1.; Şekil 2.) (Perucca, Bahlo, & Berkovic, 2020).



**Şekil 1: Genetik epilepsilerde fenotipik çeşitliliğin kaynakları**

Kaynak: Demarest ve Brooks-Kayal, 2018'den değiştirilerek alınmıştır



**Şekil 2:** Epigenetik mekanizmaların gen ekspresyon sürecine etkisi ve epilepside terapötik hedeflemeye yönelik potansiyel yaklaşımlar

Kaynak: Henshall, 2020'den değiştirilerek alınmıştır

## 2. Genetik temelli epilepsiler

Monogenik nedenli epilepsi etiyolojileri, yeni nesil dizileme yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla hızla keşfedilmiştir. Bununla birlikte, bu etiyolojilerin tutarlı bir genotip-fenotip korelasyonu büyük ölçüde belirsizliğini korumakta ve klinisyenlerin genetik etiyolojileri mevcut klinik epilepsi sendromlarıyla bütünleştirme çabalarını boşa çıkarmaktadır. Çoğu zaman, yeni genetik etiyolojiler, mevcut birkaç epilepsi sendromuyla örtüşebilen hastalık fenotiplerinin yaygın spektrumuna sahiptir. Epilepsinin genetik nedenlerine dayanan açık ve tutarlı bir genotip-fenotip korelasyonu nadirdir ve bu koşulların patofizyolojisine ilişkin bilgiler hala sınırlıdır. Bugün için monogenik etiyolojilerden poligenik etiyolojilere ve hastalığa katkıda bulunan çoklu risk faktörü genlerden kaynaklanan etiyolojilere kadar geniş bir spektrum mevcuttur. Bir genetik mutasyonun bir fenotip olarak ortaya çıkışına

aracılık eden süreçler inanılmaz derecede karmaşıktır ve çeşitli fenotipik varyasyon kaynağını içermektedir (Demarest & Brooks-Kayal, 2018).

Yeni nesil dizileme, özellikle epileptik ensefalopatilerdeki baskın kalıtım modellerine sahip de novo mutasyonlar için, epilepside Mendelian genetik etiyolojilerin keşfi için güçlü bir araç olmuştur. Bununla birlikte, biyoinformatik teknikler genellikle bir gen mutasyonunun hastalığa neden olmak için yeterli olduğunu belirleyebilse de bu teknikler hastalığın ciddiyetini doğru bir şekilde tahmine yetmemektedir (Demarest & Brooks-Kayal, 2018; Hutchison, 2007). Muhtemelen, epilepsilerin hiçbiri gerçekten monogenik değildir, ancak belirli genler “yüksek etkili”, yani tek gen değişikliklerinin tutarlı bir şekilde bir hastalık fenotipi ile sonuçlanması için yeterli görünmektedir. Bu genler normal popülasyonda birkaç patojenik olmayan varyantın birikmesiyle yüksek oranda korunmaktadır (Petrovski & ark, 2013; Gussow & ark, 2016).

Genetik epilepsilerdeki çalışmaların çoğu, kısmen fizyolojik özelliklerinin geleneksel elektrofizyolojik tekniklerle incelenebilmesi nedeniyle kanalopatiler üzerinde gerçekleştirilmiş ve bu nedenle bu kanallar sıklıkla kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir (Demarest & Brooks-Kayal, 2018). Örneğin, KCNQ2 (potasyumun voltaj-kapılı kanal alt ailesi KQT üye 2'yi kodlar) ile ilgili epilepsi en iyi karakterize edilmiş kanalopatilerden biridir. Bu kapsamda KCNQ2-bağılantılı epilepsili yaklaşık 200 hastadan sistematik bir şekilde fenotipik ve fonksiyonel verilerin bir kombinasyonunun toplanması sağlamıştır (Millichap & ark, 2016). KCNQ2 mutasyonları, kendi kendini sınırlayan yenidoğan nöbetlerinden ciddi gelişimsel ve epileptik ensefalopatiye

(karakteristik olarak Ohtahara sendromu olarak ortaya çıkan) kadar değişen çeşitli fenotiplere yol açabilmektedir. Hafif bir fenotipin genellikle gen boyunca ara sıra hatalı değişiklikler veya kesilmeler ya da çerçeve kayması mutasyonları ile ilişkili olduğu, ağır bir fenotipin ise genellikle fonksiyonel hassas noktalardaki patojenik varyantlar ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Demarest & Brooks-Kayal, 2018). Bu mutasyonların etkisinin, ortaya çıkan amino asit değişikliğinin özellikleriyle olduğu kadar lokasyonla da ilgili olduğu rapor edilmiştir (Miceli, Soldovieri & Ambrosino, 2013).

### **3. Epilepside genetik testler**

Epilepsilerin genetik ve fenotipik heterojenliği ve ayrıca dizilemenin günden güne azalan maliyeti, geniş bir test stratejisi için dikkate alınmaktadır. Çoğu hasta için bu durum, ya bilinen epilepsi genlerinin bir panelini ya da yeni genler keşfedildikçe potansiyel bir yeniden analiz avantajına sahip olan tüm ekzom dizilimini içerecektir. Kodlamayan bölgeleri ve bazı kodlama bölgelerinin daha iyi kapsanmasını içeren tüm genom dizileme, muhtemelen yakın gelecekte klinik uygulamaya girecektir fakat bu testler de epilepsinin tüm olası genetik nedenlerini tespit etmede yetersiz kalacak ve ilave testlere ihtiyaç duyulacak gibi görünmektedir (Petrovski & Berkovic, 2020).

Kromozomal mikrodiziler, özellikle zihinsel engelli veya konjenital anomalileri olan epilepsi hastalarında, kopya sayısı değişikliklerinin saptanması için önemini korumaktadır (Coppola & ark, 2019). Her ikisi de epilepsinin bilinen nedenleri olan duplikasyonlar ve halka kromozom (Ring kromozomu) oluşumu, şu ana kadar bahsedilen teknolojilerle hızlı ve tam olarak tespit edilemeyebilmekte ve bazı klinik özel testler gerektirmektedir

(Conlin & ark, 2011, Bahlo & ark, 2018). Buradaki klinik zorluk, sonuçların ve özellikle belirsiz anlamlı varyantların yorumlanmasına ilişkindir. Hastalar ve aileleri genellikle belirsiz öneme sahip varyantlar hakkında bilgilendirilmek istemekte ve klinisyenler varyantın daha kesin bir sınıflandırmasına yönelik ilave adımlara ihtiyaç duymaktadır. Hastanın fenotipi, genin rapor edilen fenotipik spektrumu ile karşılaştırılmalıdır. Varyant düzeyinde bilgi dikkate alınmalı ve bir genin işlev kaybı veya işlev kazanımı yoluyla veya belirli bir işlevsel alandaki varyantlar yoluyla epilepsiye neden olup-olmadığı hesaba katılmalıdır. Herhangi bir nörogelişimsel bozukluk da dahil olmak üzere dikkatli bir aile öyküsü rehberliğinde diğer aile üyelerinin de dahil edildiği bağlantı çalışmaları bu sürece yardımcı olabilmektedir.

#### **4. miRNA'lar ve epilepside biyobelirteç olarak kullanımları**

##### **4.1. miRNA'ların tanımı ve tarihçesi**

Mikro RNA'lar (miRNA), 18-25 nükleotid uzunluğunda, küçük, tek sarmallı, posttranskripsiyonel seviyede negatif gen düzenleyiciler olarak rol oynayan, DNA'dan kopyalanan ve proteine çevrilmek yerine diğer genlerin protein sentezine ilişkin işlevlerini düzenleyen bir RNA formudur. Transfer RNA (tRNA)'ları, ribozomal RNA (rRNA)'ları ve küçük nükleolar RNA (snoRNA)'ları kodlayan genlerin yanı sıra insan genom dizilemesinde tanımlanan binlerce yeni varsayılan gen düşünüldükten sonra bile, türden türe değişmekle birlikte insan genomun yaklaşık %97'si kodlamayan DNA bölümünü oluşturmaktadır. Önemli bir açık okuma çerçevesi olmayan ve RNA'yı nihai ürün olarak kodluyor gibi görünen RNA'lara karşılık gelen ve potansiyel olarak önemli bir gen sınıfı olan miRNA'lar gelişim, protein sekresyonu ve gen düzenlemesinde kritik roller

üstlenebilmektedir. miRNA'ların insanda protein kodlayan genomun yaklaşık %30'unu düzenlediği tahmin edilmektedir.

Yaklaşık 30 yıl öncesine kadar miRNA'ların hem varlığı hem de önemi yeterince bilinmiyordu. O zamana kadarki bilimsel çalışmalar tüm protein kodlamayan dizilerin incelenmesi yerine, DNA'nın RNA'ya kopyalandığı ve daha sonra proteine çevrildiği klasik dogmaya, yani protein kodlayan genlere odaklanmıştı (Almeida, Reis & Calin, 2011). 1993 yılında Ambros ve Ruvkun laboratuvarlarının iş birliği ile ilk miRNA keşfi Caenorhabditis elegans nematodunda yapılmıştır (Lee, Feinbaum & Ambros, 1993). Caenorhabditis elegans'ta tüm larva evrelerinin zamansal gelişim modelini kontrol eden heterokronik genlerden birisi olan lin-4, daha önceki yıllarda boş (null) bir mutasyonun izolasyonu ile keşfedilmiş ve nematodun zamansal gelişim sürecinde yetersizliğe neden olduğu bulunmuştur (Chalfie, Horvitz & Sulston, 1981). Lin-4 fonksiyon kaybı mutasyonlarına sahip hayvanlarda bazı yetişkin yapıları eksiktir ve yumurta bırakamazlar, ayrıca uygun olmayan geç larva evrelerinde erken gelişim programlarını yinelerler (Lee, Feinbaum & Ambros, 2004).

İlk miRNA'nın bulunmasından 7 yıl sonra, 2000 yılında keşfedilen ikinci miRNA olan let-7, lin-4 gibi Caenorhabditis elegans'ın heterokronik bir genidir. Let-7 aktivitesinin kaybı, gelişimin yetişkin aşamasında larvaya ilişkin hücresel sürecin yeniden ortaya çıkmasına neden olurken, artan let-7 aktivitesi ise yetişkin hücresel sürecin erken ifade edilmesine neden olmaktadır (Reinhart & ark, 2000). Let-7'nin türler arasında korunduğunun keşfi, miRNA'lar adı verilen yeni bir küçük ncRNA sınıfının araştırılmasında bir dönüm noktası olmuştur. Günümüzde insanda üçbinin üzerinde miRNA tanımlanmış ve miRNA veri tabanı

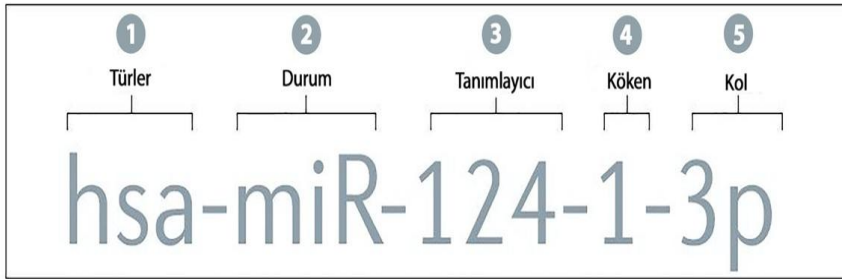
(miRBase) gibi çevrimiçi miRNA dizi depoları oluşturulmuştur. Bununla birlikte miRNA hedef tahminine yönelik geliştirilen mevcut araçlar ve yazılımlar, miRNA'ların işlevsel ağına ilişkin çalışmaları kolaylaştırmaktadır. Yapay zeka kullanımı da bu süreçte analizlerin anlamlandırılması için hızla yayılmaktadır.

#### **4.2. miRNA'ların adlandırılması**

miRNA'lar ilk keşfedildiklerinde fenotiplerine göre adlandırılırken (örn. lin-4, let-7 ve lsy-6), klonlama veya dizileme yoluyla bulunan miRNA'ların çoğuna rakamsal adlar (örn. diğer türlerdeki lin-4 homologları mir-125 olarak) verilmiştir. Kardeş miRNA'ları kodlayan genler harfli son eklerle (örn. mir-125a ve mir-125b) ifade edilmiştir. Aynı olgun miRNA birden fazla ayrı lokustan üretilmiş ise miRNA lokuslarının adlarının sonuna rakamsal ekler (örn. mir-125b-1 ve mir-125b-2) ilave edilmektedir. Her lokus biri prekürsörün 5' zincirinden ve diğeri ise 3' zincirinden (örn. miR-125a-5p ve miR-125a-3p) olmak üzere iki olgun miRNA üretmektedir. Bununla birlikte, “kılavuz” zincir olarak adlandırılan kol toplamın ortalama %96-99'unu oluşturduğu için çok daha yaygındır ve diğer koldan (miRNA\* olarak bilinen “yolcu” zinciri) biyolojik olarak daha aktiftir.

Her miRNA bir tür kodu ile tanımlanır (örn., insanlar için homo sapiens = hsa, fareler için mus musculus = mmu ve sıçanlar için rattus norvegicus = rno). Bir miRNA molekülünün gelişim durumu, öncü miRNA için “mir” ve olgun miRNA için 'miR' ile gösterilir. Birkaç istisna dışında (let-7 ailesi) miRNA'ların keşif sırasını gösteren bir tanımlayıcı numara vardır (örn., miR-100, miR-101'den önce keşfedilmiştir). İki miRNA'nın neredeyse aynı olgun dizileri varsa, onları ayırt etmek için “a” ve “b” harfleri kullanılır

(örn., miR-146a-5p ve miR-146b-5p). Aynı olgun miRNA dizileri farklı genomik konumlardan ortaya çıkıyorsa, bunları ayırt etmek için bir “1” ve “2” rakamları kullanılır (örn., miR-124-1-3p ve miR-124-2-3p). Orijinal saç tokası (hairpin) öncüsünden kaynaklanan bölge, miRNA'nın 3p veya 5p kolundan kaynaklanıp-kaynaklanmadığına bağlı olarak “3p” veya “5p” olarak belirtilir (Şekil 3.).

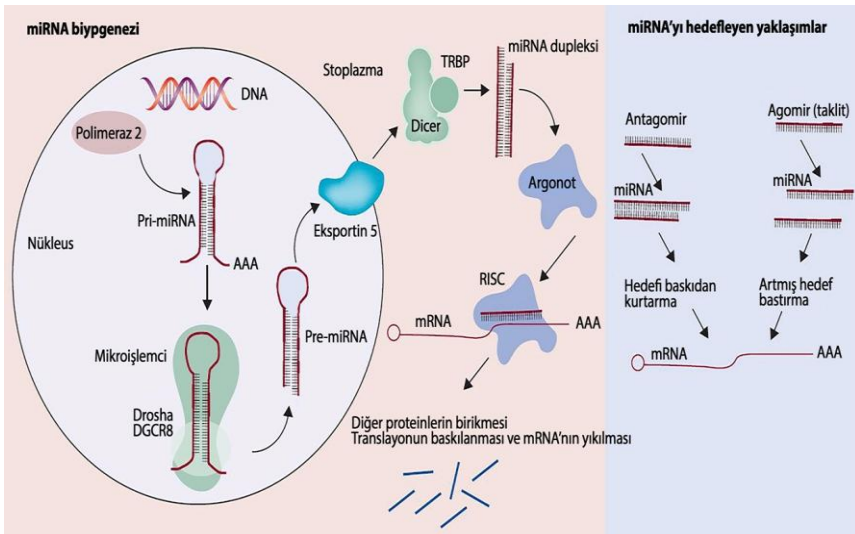


**Şekil 3:** miRNA'ların adlandırılması

### 4.3. miRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi, esas olarak RNA polimeraz II tarafından, protein kodlayan genlerin ve spesifik lokusların intronlarından bir primer miRNA (pri-miRNA)'nın transkripsiyonu ile başlar. Nukleustaki mikroişlemci kompleksi RNaz Drosha ve DGCR8 içerir ve bunlar pri-miRNA'yı yaklaşık 60-70 nükleotidlik bir saç tokası (hairpin) yapısını (pre-miRNA) üretmek üzere keser. Pre-miRNA daha sonra exportin-5 enzimi yardımıyla sitoplazmaya nakledilir ve ayrıca, TRBP ile yaklaşık 22 nükleotidlik dupleks miRNA'yı üretmek üzere başka bir RNaz olan Dicer tarafından işlenir. Sitoplazmada aktif RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC)'ne entegre olduktan sonra RISC yeterli tamamlayıcı bağlanma mevcut olana kadar hedef mRNA'lar boyunca hareket eder ve argonaute2

(Ago2) enzimi yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (Şekil 4.). Hedef seçimi, miRNA ve mRNA arasındaki tohum etkileşimi olarak adlandırılan 7-8 nükleotidlik tamamlayıcı dizi eşleşmesi ile belirlenir. miRNA'yı tamamlayıcı bir antisens oligonükleotit dizisinin eklenmesi, miRNA işlevini bloke edebilir. Bir miRNA agomirinin tanıtılması, hedeflerin miRNA'ya bağlı susturulmasını kolaylaştıracaktır.



**Şekil 4:** miRNA biyogenezi ve epilepsi hayvan modellerinde kullanılan miRNA manipülasyonu

Kaynak: Henshall vd., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır

miRNA biyogenez yolunun temelleri belirlenmiş olmasına rağmen, halen netleştirilmemiş alanlar bulunmaktadır. Örneğin miRNA olgunlaşmasına ilişkin anlayışımızı büyük ölçüde geliştirecek olan Drosha'nın yapısı henüz yeterince çözülmemiştir. İnsan Dicer-TRBP kompleksinin kristal yapısının aydınlatılması,

miRNA öncesi işleme ve yükleme adımları sırasında Dicer'ın substratları ve ürünleri ile nasıl etkileşime girdiğine ilişkin birçok soruyu yanıtlayacaktır. miRNA bozunması için korunmuş bir yolun var olup-olmadığının belirlenmesi ve bu sürece hangi nükleazların dahil olduğunu ortaya çıkarmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Diğer taraftan kanonik olmayan miRNA'ların keşfi nedeniyle miRNA'lar ve diğer küçük RNA'lar arasındaki sınırlar giderek belirsizleşmektedir. İleride alternatif biyogenez yolları tanımlanabilir ve bu alternatif yolların kullanımının çeşitli hücrel koşullar altında farklı şekilde düzenlenip-düzenlenmediğinin tespiti önemli bilgiler sağlayacaktır.

İnsanlarda, kanonik miRNA'ların çoğu, kodlamayan veya kodlayan transkriptlerin intronları tarafından kodlanırken, bazı miRNA'lar ekzonik bölgeler tarafından kodlanmaktadır. Çoğunlukla birkaç miRNA lokusu birbirine çok yakındır ve bir polisistronik transkripsiyon ünitesi oluşturmaktadır (Lee 2002). Aynı kümedeki miRNA'lar genellikle birlikte kopyalanmakta fakat bireysel miRNA'lar ayrıca post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenebilmektedir. Oldukça iyi düzeyde korunan kümelerden biri, bilaterian hayvanların (bilateral simetrik hayvanları kapsayan bir hayvanlar alt alemi) gelişiminde önemli bir role sahip olan mir-100~let-7~mir-125 kümesidir. Let-7 miRNA (diğer miRNA'lar hariç) embriyonik kök hücrelerde ve memelilerdeki bazı kanser hücrelerinde transkripsiyon sonrası baskılanmaktadır (Ha & Kim, 2014; Roush & Slack, 2008). miRNA promotörlerinin kesin konumları, çoğu miRNA geni için henüz haritalanmamıştır, ancak CpG adalarının toplu analizinden, RNA dizileme verilerinden ve ChIP-seq (kromatin immünopresipitasyon ve ardından dizileme) verilerinden çıkarılabilmektedir (Ozsolak & ark, 2008). Bazı

miRNA genleri, protein kodlayan genlerin intronlarında bulunmakta ve bu nedenle konakçı genin promotörünü paylaşmaktadır. Bununla birlikte, miRNA genlerinin sıklıkla çoklu transkripsiyon başlangıç bölgelerine sahip olduğu ve intronik miRNA'ların promotörlerinin bazen konakçı genlerinin promotörlerinden farklı olduğu ifade edilmiştir (Ha & Kim, 2014; Monteys & ark, 2010).

Kanonik biyogenez yolağında, miRNA genlerinin çoğu RNA Polimeraz II tarafından en az bir saç tokası (hairpin) yapısı içeren pri-miRNA'lar olarak adlandırılan büyük RNA olarak kopyalanır. Tüm kanonik pri-miRNA'lar 5'-başığa sahiptir ancak 3' ucunda poliadenilasyon sinyali olmayabilirler (Bartel, 2018). Drosha, bir tür çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz olan RNase III enzimlerinin bir üyesidir. DGCR8, mikroişlemci kompleksinin katalitik olmayan alt birimi olarak işlev gören çift sarmallı bir RNA bağlayıcı proteindir (Nguyen & ark, 2018). Pre-miRNA'lar daha sonra XPO5 ve küçük bir GTP bağlayıcı protein olan Ras ile ilişkili nükleer protein (RAN) tarafından sitoplazmaya çıkarılmaktadır (Lund, Güttinger & Calado, 2004). Sitoplazmada, pre-miRNA'lar halkanın yakınında, 3' ucunda 2-3 nükleotid çıkıntısı ile karakterize küçük dsRNA'lara (biri kılavuz, diğeri yolcu zinciridir) bölünür. Bu bölünmeye, bir çift sarmallı RNA bağlayıcı protein olan transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile ilişkili bir RNase III enzimi ve Dicer aracılık eder (Ha & Kim, 2014). RNA susturmadaki merkezi rolü argonaute (AGO) ailesi proteinleri üstlenmektedir. miRNA duplesi, ATP'ye bağımlı şaperon proteinlerinin yardımıyla AGO proteinine yüklenir. AGO orijinal konformasyonuna döndürüldükten sonra, tek zincirli olgun miRNA üretmek için miRNA duplesinin yolcu zinciri çıkarılmaktadır (Bartel, 2018). Yüklemeden sonra AGO, hedeflenen mRNA'nın

tanınmasına aracılık eden ve RISC olarak adlandırılan bir ribonükleoprotein kompleksinin montajını destekler. Olgun miRNA'lar, baz eşleştirme yoluyla spesifik mRNA hedeflerine yönlendirilir. İnsanlarda mRNA ile kesin eşleşme gerekli değildir (Saliminejad & ark, 2019; Zealy & ark, 2017).

Son zamanlarda, miRNA biyogenezi için kanonik olmayan birkaç alternatif yol ifade edilmiştir. Birkaç farklı RNA sınıfı, yapısal ve işlevsel olarak miRNA'lara benzemekle birlikte, kanonik biyogenez yolundaki bir veya daha fazla adımı atlamaktadırlar. Drosha ve DGCR8, kanonik miRNA'ları işlemek için gerekli iken, bunların yokluğunda kanonik olmayan miRNA'lar oluşturulabilmektedir (Abdelfattah, Park & Choi, 2014). Kanonik olmayan miRNA'ların biyogenezinde, Drosha'dan bağımsız ve Dicer'den bağımsız yollar dahil olmak üzere birkaç yol bulunmaktadır. İyi bilinen kanonik olmayan bir yolda (mirtron), bazı dalları ayrılmış intronlar pre-miRNA saç tokaları olarak işlev görebilir. Drosha/DGCR8'den bağımsız olan mirtron yolunda, intronlar spliceosome tarafından kement intronlarına işlenir ve daha sonra kement ayırma enzimi tarafından dalları ayrılır, ardından pre-miRNA saç tokalarına katlanırlar. Daha sonra bu pre-miRNA benzeri form, kanonik yollara devam etmek için XPO5 tarafından sitoplazmaya aktarılır (Saliminejad & ark, 2019; Westholm & Lai, 2011).

#### **4.4. miRNA'ların fonksiyonları**

miRNA'ların biyolojik işlevlerinin tespiti genellikle hayvan nakavt modelleri ve transgenik aşırı ekspresyon deneyleri ile gerçekleştirilmektedir (Hammond, 2015). Bir fenotipik etkiyi tespit etmek için bir miRNA ailesinin birkaç üyesinin inaktive edilmesi

gerektiği bilinmektedir (Vidigal & Ventura, 2015). Farelerde, miRNA aile üyelerinin bolluğu genellikle fenotiplerin belirgin hale gelmeden önce birden fazla aile üyesinin bozulmasını gerektirirken, *Drosophila*'da ise korunmuş bir miRNA ailesinin yalnızca bir üyesinin silinmesi anormal fenotiplerle sonuçlanmaktadır. En dikkate değer istisnalar, her birinin yalnızca bir kopyasının silinmesinin hem farelerde hem de insanlarda haploin yetersiz anormalliklere neden olan miR-96 ve miR-17~92 lokuslarıdır. miR-96'nın bir kopyasının kaybı sağırılığa neden olurken, miR-17~92 kümesinin bir kopyasının silinmesi ise iskelet anomalilerine, büyüme kusurlarına ve öğrenme problemlerine neden olmaktadır (Bartel, 2018; Saliminejad & ark, 2019).

Genel olarak, tek tek dokuların belirlenmesi ve gelişimi için miRNA'lar gerekli değildir. Örneğin farelerde kardiyak spesifik miR-208'in silinmesine rağmen, yine de bir kalp gelişmektedir. Bireysel miRNA'ların doku homeostazını koruduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte dokuya özgü miRNA'ların çoğunun hastalıklarda azalması nedeniyle, doku farklılaşma sürecini devam ettirmek için miRNA'ların gerekli olabileceği öne sürülmüştür (Saliminejad & ark, 2019; Hammond, 2015). Transgenik aşırı ekspresyon çalışmaları, bireysel miRNA'ların biyolojik rollerinin tanımlanması için kullanılsa da verilerin yanlış yorumlanmasına yol açabilecek aşırı ekspresyon artefaktı dezavantajına sahiptir (Hammond, 2015). Örneğin memelilerde, miR-34 ailesi üyelerinin aşırı ekspresyonunun p53'ün yolağında güçlü bir tümör baskılayıcı olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, farelerde tüm miR-34 üyelerinin silinmesine rağmen, çeşitli hücrel hasara karşı normal p53 yanıtları sergilenmiştir (Saliminejad & ark, 2019; Vidigal & Ventura, 2015).

#### 4.5. Epigenetikte miRNA'ların rolü

Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerin eşlik etmediği, gen ekspresyonunda mitotik ve/veya mayotik kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır (Moutinho & Esteller, 2017). Epigenetik kalıtım, farklılaşma, dişi memelilerin X kromozomu (Xi) gibi kromozomal alanların susturulması, kök hücre plastisitesi, yaşlanma ve genomik baskılanma gibi birçok fizyolojik süreçte önemlidir (Jones & Baylin, 2007). Patolojik epigenetik değişiklikler, gen fonksiyonunu bozan mutasyonlara ve kromozomal değişikliklere alternatif olarak kabul edilmektedir. Epigenetik düzenlenme, aralarında sıkı iş birliği olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları şeklinde iki kategoride gerçekleşmektedir (Moutinho & Esteller, 2017; Malumbres, 2013).

DNA metilasyonu ağırlıklı olarak CpG adalarının dinükleotid dizisinin sitozininde bulunur. miRNA genlerinin promotörü içindeki CpG adalarının hipermetilasyonu, gen susturma potansiyeli ve tümör baskılama özelliklerinden sorumludur (Yao, Chen & Zhou, 2019). Tipik olarak, miRNA promotörleri içindeki CpG adacıklarının metilasyonu, metilasyon bağlayıcı proteinin DNA'ya bağlanmasını sağlayarak ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimerazın DNA'ya bağlanmasını önleyerek miRNA gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olmaktadır. Tersine, CpG adacıklarının hipometilasyonu gen ekspresyonunu aktive etmekte ve kanser oluşumunu desteklemektedir (Jaenisch & Bird, 2003). Örneğin miR-424'ün promotör CpG adalarının gliomada hipermetilasyonu, hücre istilas ve göçü ile ilişkili miR-424 ekspresyonunu azaltmakta ve hücre apoptozunu arttırmaktadır (Jin & ark, 2017). miRNA genlerinin kapsamlı analizinde bu genlerin yaklaşık yarısının CpG adaları ile ilişkili olduğunu ve bu durumunda onların DNA

metilasyonunun düzenlenmesine tabi tutulabileceklerini düşündürmektedir (Yao, Chen & Zhou, 2019; Weber & ark, 2007).

#### **4.6. miRNA'ların hastalıklarla ilişkisi ve klinik önemi**

##### **4.6.1. miRNA'ların nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi**

Son yıllardaki epilepsi çalışmalarında, ekspresyonu değişen miRNA'ların önemli gen düzenleyicileri oldukları bilinmektedir. Epileptogenezi önlemeye yönelik olarak, epilepsi gelişiminde etkili olan proteinlere ilişkin genleri hedefleyen prelinik denemelerin başarısızlıkla sonuçlanması, miRNA'ların ön plana çıkmasında etkili olmuştur. Nöronal ölüm, gliosis, inflamasyon ve nöronal ağların yeniden düzenlenmesi gibi epileptogenezde anahtar rol oynayan süreçlerin miRNA'ların kontrolü altında olması, beyinde miRNA'ların gen ekspresyonunun meta-denetleyicileri olmasını sağlamaktadır.

Ekspresyonu değişen miRNA'ların epileptik nöbetlerin oluşumu ve nöbet kaynaklı nöronal ölümde önemli bir etken olduğu tespit edilmiştir (Jimenez-Mateos & ark, 2012)). Bu nedenle araştırmacılar epilepside rol oynayan miRNA'ların fonksiyonunu anlamak için *In vivo* koşullarda miRNA'ları manipüle ederek biyobelirteç olma potansiyelini belirlemeye çalışmaktadırlar.

Temporal lop epilepsi hastalarından rezeke edilen hipokampus miRNA profil tarama çalışmalarında ekspresyon seviyesi değişen yaklaşık 100 miRNA tespit edilmiştir (Kan & ark, 2012; McKiernan & ark, 2012).

Alzheimer hastalığı ile ilişkili olarak miR-29a, miR-29b ve miR-29c şeklindeki miR-29 aile üyelerinin farelerde ikinci haftadan itibaren ekspresyon seviyesinin zamanla arttığı, bu durumun da nöronal homeostaz ile yaşlanma sürecinde nöronların korunması

bakımından kritik olduğunu göstermiştir (Hébert & ark, 2009). miR-15'in deneysel Alzheimer modellerinde ve Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvısı (BOS)'nda down regüle olduğu ve bu durumun da ERK1 seviyelerini yükselterek NFT'lerin ana bileşeni olan Tau'nun hiperfosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Hébert & ark, 2010; Quinlan & ark, 2017). 48 Alzheimer hastası ve 22 kontrolden alınan kan örneklerinde miR-26b-3p, miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-148b-5p, miR-151a-3p ve miR-186-5p dahil olmak üzere 13 miRNA'nın up regüle olduğu, miR-15a-5p, miR-17-3p, miR-29b-3p ve miR-144-5p dahil olmak üzere 14 miRNA'nın ise down regüle olduğu tespit edilmiştir (Satoh, Kino & Niida, 2015). Diğer bir çalışmada 158 Alzheimer hastası ve 155 eşleştirilmiş kontrolde miR-483-3p, miR-342-3p, miR-98-5p, miR-191-5p, miR-855-5p ve miR-342-3p ile let-7d-5p'nin yüksek tanısal doğruluğu olduğu ifade edilmiştir (Kumar & ark, 2013). Yine eşleştirilmiş kontrolleri ile birlikte mikrodizi yapılan 6 Alzheimer hastasının BOS'unda miR-9, miR-125b, miR-146a ve miR-155 aşırı eksprese olduğu görülmüştür (Alexandrov & ark, 2012).

Parkinson hastalığı ile ilişkili olarak, embriyonik kök hücre kültürlerinde Dicer'in silinmesinin dopaminerjik nöron kaybına yol açtığı, Dicer içermeyen fare modelinde de benzer sonuçların elde edildiği ve mezensefalon dopaminerjik nöronları ve onların nigrostriatal aksonal projeksiyonlarında ilerleyici bir kayıp olduğu tespit edilmiştir. Bu süreç ile bağlantılı miR-133b'nin iki farklı Parkinson fare modelinde (Aphakia fareleri ve 6-OHDA modeli) kontrol grubuna göre azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, miR-133b'nin aşırı ekspresyonunun Parkinson hastalığının patogenezinde nedensel bir rol oynadığı belirtilmiştir (Kim & ark, 2007). İnsanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise miR-1, miR-22 ve miR-29a'nın

sağlıklı kontrollere kıyasla plazma düzeylerinin azaldığı, miR-16-2, miR-26a-2 ve miR-30a düzeylerinin ise arttığı tespit edilmiştir (Margis & Rieder, 2011).

Huntington hastalarına ilişkin olarak kortekste eksprese edilen 380 miRNA'dan miR-100, miR-106b, miR-148b, miR-151, miR-222, miR-382 ve miR-383'ün önemli ölçüde deregülasyonu ifade edilmiştir (Martí & ark, 2010). Hastalığın başlangıç yaşını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada 26 Huntington hastasında 8 sağlıklı gönüllüye göre miR-10b-5p ve miR-486-5p'nin upregüle olduğu ve plazma düzeylerinin arttığı ve ayrıca miR-10b-5p seviyesinin hastalık başlangıç yaşı ile korele olduğu bulunmuştur (Hoss & ark, 2015).

#### **4.6.2. miRNA'ların kanserle ilişkisi**

miRNA'lar hücrel differansiyasyon, proliferasyon, apoptozis, eritropoez, fibrozis, angiogenez, immunité gibi birçok hücrel ve biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Genomda yer alan tüm genlerin yaklaşık %60'ının bu düzenleyiciler tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Protein kodlayan genler gibi miRNA'lar da onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev görmekte ve çeşitli hedef genleri düzenleme kapasiteleri nedeniyle yeni terapötik hedefler ve fenotipik belirteçler olarak ortaya çıkmaktadırlar.

miRNA'ların kanserle ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışma, miR-15 ve miR-16'nın B-hücreli kronik lenfositik lösemilerin (B-CLL) %68'inde silindiği veya downregüle olduğuna yöneliktir (Calin, Dumitru & Shimizu, 2002). Akciğer kanserinde, hsa-mir-155'in yüksek ekspresyon düzeyi çok değişkenli analizin yanı sıra tek değişkenli analizde de düşük sağkalım ile ilişkili olduğu ve ayrıca belirli ekspresyon profillerinin tümörü normal dokulardan

ayırabildiği ifade edilmiştir (Yanaihara, Caplen & Bowman, 2006; Gargalionis & Basdra, 2013). İnsan prostat kanseri ksenograftlarında, tümör gelişiminden kaynaklanan miR-144'ün plazma seviyesinin arttığı saptanmıştır (Mitchell & ark, 2008). Diğer bir çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında miR-486, miR-30d, miR-1 ve miR-499'un sağ kalımla ilişkili biyobelirteç olarak potansiyellerinin olduğu ifade edilmiştir (Hu & ark, 2010).

#### **4.6.3. miRNA'ların kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi**

Kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği ile doğrudan bağlantılı benzersiz miRNA ifade kalıpları tanımlanmıştır. Her ikisi de şiddetli hipertrofi ile sonuçlanan torasik aort bağlamasına tabi tutulan veya aktive edilmiş kalsinörin eksprese eden farelerde up regüle veya down regüle olan oniki miRNA'lık bir panel saptanmıştır. Özellikle bu panelde bulunan miR-195'in aşırı ekspresyonunun transgenik farelerde kalp hipertrofisi ve kalp yetmezliğini başlatmada önemli olduğu bulunmuştur (Van Rooij & ark, 2006). Koroner arter hastalığı olan hastalarda ve miyokard enfarktüsü geçirmiş sıçan kalbinde miR-1 yüksek ekspresyon seviyeleri göstermektedir (Gargalionis & Basdra, 2013). miRNA'ların ayrıca iskemi sonrası anjiyogenik süreçlere de katkı sağladığı, gelişim sırasında anjiyogenez için çok önemli bir molekül olan miR-126'nın inhibisyonunun iskemiye maruz kaldıktan sonra İn vivo olarak sorunlu bir anjiyogenik tepkiye neden olduğu ifade edilmiştir (Van Solingen & ark, 2009). miR-208b ve miR-499'ün özellikle akut miyokard enfarktüsülü hastalarda troponin T seviyeleri ile korele olarak yüksek oranda up regüle olduğu bulunmuştur (Corsten & ark, 2010). Bu moleküllerin yanı sıra miR-1 ve miR-133a'nın insan miyokard enfarktüsünde down regüle olmaları nedeni ile potansiyel

biyobelirteçler olabilecekleri ifade edilmiştir (Gargalionis & Basdra, 2013; Bostjancic & ark, 2010).

#### **4.6.4. miRNA'ların metabolik bozukluklarla ilişkisi**

Glukoz metabolizması ile insülin sekresyon ve duyarlılığında düzenleyici olarak işlev gören miRNA'lar, dünya çapında en yaygın metabolik bozukluk olan diabetes mellitusta önemli görünmektedir (Fernández-Hernando & ark, 2013). Dicer1 enziminin koşullu delesyonu uygulanan hayvanların insülin üreten pankreas hücrelerinde ciddi bir azalma olduğu için, normal pankreas gelişiminde özgün bir miRNA ekspresyon profilinin gerekli olduğu düşünülmektedir (Lynn & ark, 2007). Diğer taraftan yetişkin  $\beta$ -hücrelerinde miR-24, miR-26, miR-182 ve miR-148'i içeren yeni bir miRNA ağının, Bhlhe22 ve Sox6 gibi insülin transkripsiyonel baskılayıcılarını hedefleyerek insülin içeriğini düzenlediği bildirilmiştir. Dicer1 silindiğinde, önceki transkripsiyonel baskılayıcılar up regüle olurken,  $\beta$ -hücreleri insülin protein içeriğinde ve mRNA seviyelerinde bir azalma gözlenmiştir (Melkman-Zehavi & ark, 2011). Diğer taraftan karaciğerde miR-122'nin lipid ve kolesterol homeostazına katkıda bulunduğu hem normal hem de diyetle bağlı obez farelerde miR-122 inhibisyonunun plazma kolesterol seviyesini düşürdüğü ifade edilmiştir (Gargalionis & Basdra, 2013; Rotllan & Fernández-Hernando, 2012).

### **5. Genetik epilepsiye ilişkin tedavi stratejileri**

Spesifik genetik mekanizmaları hedefleyen mevcut ilaçların yeniden kullanılması, genetik epilepsilere ilişkin umut verici bir tedavi stratejisidir (Petrovski & Berkovic, 2020). Bu yöndeki klinik çalışmalardan birisi rapamisinin memeli hedefi (mTOR) inhibitörü olan everolimus için etkinin büyüklüğü, geleneksel nöbet önleyici

ilaçlar için tipik olarak görülen etkilerle karşılaştırılabilir olmasına rağmen tüberosklerozlu hastalarda nöbetleri azaltmıştır (French & ark, 2016). PCDH19 epilepsili hastaların nörosteroid ekspresyonunun azaldığı yönündeki gözleme dayanılarak, bu hastaları tedavi etmek için bir klinik ganaksolon klinik denemesi (NCT03865732) sürdürülmektedir (Tan & ark, 2015). Dravet sendromunun tedavisine yönelik olumlu klinik denemeler arasında kannabidiol ve fenfluramin tedavisi yer almaktadır. Spesifik bir genetik mekanizmayı hedeflemekten ziyade ampirik olarak tanımlanan bu ilaçların Dravet sendromunun ötesinde diğer epilepsi türleri için faydalı olabileceği düşünülmektedir (Devinsky & ark, 2017; Lagae & ark, 2019). Genetik epilepsiye ilişkin olarak moleküler genetik tanıları hedefleyen yeni tedaviler de geliştirilmektedir. Örneğin, SCN1A mutasyonlarından etkilenen NaV1.1 kanalını, seçici olarak aktive eden örümcek zehirinden türetilen bir peptit, Dravet sendromunun bir fare modelinde etkili olmuştur (Richards & ark, 2018). Yeni genetik keşifleri etkili tedavilere dönüştürmek karmaşık ve zorlu bir süreçtir. Son yıllarda özellikle Antisens oligonükleotitler, miRNA'lar ve viral vektörlerce uygulanan gen terapisi gibi nükleotit bazlı tedaviler hız kazanmıştır.

### **5.1. miRNA'ların tedavide kullanımı**

miRNA'ların tedavide kullanımlarına yönelik olarak miRNA inhibitörleri veya miRNA'ları taklit eden ajanların geliştirilmesine odaklanılmıştır. miRNA'ları inhibe etmek için antisens oligonükleotitler geliştirilmiştir. Antisens oligonükleotitlerin kullanımı gen tedavisi metodlarına muadil olarak öne çıkmaktadır. Özellikle antimiR'ler olarak adlandırılan miRNA'ların bu rekabetçi inhibitörlerinin etkinlikleri ve biyoyararlanımlarını geliştirmek için çeşitli kimyasal modifikasyonlar uygulanmaktadır (Mendell &

Olson, 2012). Bunlardan bir tanesi, bisiklik RNA analogları sınıfını oluşturan kilitli nükleik asitin (LNA) modifikasyonuna ilişkin olup, bunlar sadece miRNA tanısında bir saptama aracı olarak değil, aynı zamanda umut verici bir LNA aracılı miRNA susturma yolu olarak da test edilmiştir (Stenvang & ark, 2008). Konjuge olmayan LNA ile modifiye edilmiş fosforotioat oligonükleotitlerin, tek veya tüm miRNA ailelerini inhibe ettiği, farelerin normal dokuları ve meme tümörleri tarafından artan bir alım sergilediği, doğrudan hedefleri upregüle ettiği ve çok az hedef dışı etkilerinin olduğu öne sürülmüştür (Obad & ark, 2011). Farklı bir antimiR türü ise karaciğerde miR-122'ye karşı etkili olan ve antagomir olarak adlandırılan antisens, kolesterole bağlı, 20-O-metil (20-OMe) oligonükleotittir. Bu antagomir ile tedavi edilen hayvanların miR-122 ile ilişkili kolesterol biyosentez genlerinin down regüle olduğu ve plazma kolesterol seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Krützfeldt & ark, 2005). Diğer taraftan down regüle olmuş/tümör baskılayıcı miRNA'ların eski haline getirilmesi için miRNA taklitlerinin sistemik uygulanmasına yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin hepatoselüler karsinomun bir fare modelinde, adeno-ilişkili virüs tümör büyümesinin inhibisyonuna yol açan miR-26a uygulamasının etkili bir yoludur (Kota & ark, 2009). Pankreas kanseri hücre hattı Mia-PaCa-2 ile enjekte edilen ksenograftlarda, miR-34a veya miR-143/145'ün tümör büyümesini oldukça etkili bir şekilde baskılandığını ifade eden çalışmada miRNA taklitlerinin uygulanması, belirgin bir toksisitesi olmayan lipid bazlı nanoparçacık (nanovektör) tarafından oluşturulan yeni sentezlenen mikroRNA ekspresyon vektörleri aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (Pramanik & ark, 2011).

## 5.2. Epilepside gen tedavisi

Genetik düzeyde protein ekspresyonlarını veya moleküler değişiklikleri düzenleyen herhangi bir terapötik strateji gen terapisi olarak tanımlanmaktadır (Zhang, & Wang, 2021). Geleneksel farmakoterapiye göre en önemli avantajlarından bir tanesi tedavi edilemeyen hedeflerin manipüle edilmesine imkân tanınmasıdır (Simonato, 2014). Gen terapisinde, ekzojen genetik materyalleri konakçılara taşımak ve protein ürünlerinin ekspresyonunu düzenlemek için uygun in vivo ve etkili gen manipülasyon yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Klasik gen terapi süreci, hedeflenen bölgeye vektör enjeksiyonları ile başlamakta ve ardından vektörün veya promotörün tropizmine bağlı olarak spesifik hücre tiplerinde transgen ekspresyonu ile devam etmektedir. Vektör aracılı gen terapisine yönelik deneysel uygulamalardan bazıları klinik deneylerde test edilirken, optogenetik ve kemogenetik gibi diğer yeni teknikler klinik uygulamalara nadiren çevrilebilmiştir (Zhang, & Wang, 2021). Diğer taraftan epilepsi dahil nörolojik hastalıklarda gen terapisine ilişkin preklinik araştırmalarda belirli bir mesafe kat edilmekle birlikte epilepsi ile ilgili olarak bunların hiçbiri henüz klinik uygulamaya dönüştürülmemiştir.

Genel olarak viral ve viral olmayanlar şeklinde sınıflandırılan gen taşıma araçları kullanılarak gerçekleştirilen vektör-aracılı gen transferi, terapötik hedefleri rasyonel olarak tamamlama veya değiştirme şansı sağlamaktadır. Beyinde en sık kullanılan virüs vektörler, adeno-ilişkili virüsler (AAV), lentivirüs ve herpes simpleks virüsleri (HSV)'dir. AAV'ler nöron ve astrosit gibi postmitotik hücrelerde uzun süreli gen ekspresyonunun desteklenmesi, viral serotiplere bağlı olarak geniş dağılımın elde edebilmesi ve spesifik hücre tiplerini hedeflenebilmesi nedeni ile

kişiselleştirilmiş tedavilerde vektör olarak en önemli araç olarak kabul edilmektedirler (Cearley & ark, 2008; Hocquemiller & ark, 2016). Örneğin spinal musküler atrofi (SMA) tip-1 hastalarını için “survival motor nöron-1” (SMN1) genini taşıyan kan-beyin bariyerini geçebilen ve nörotropik özellikte AAV9 vektörleri kullanılarak gerçekleştirilen gen tedavisinde umut verici bir ilerleme sağlanmıştır (Zhang, & Wang, 2021; Young & ark, 2014; Hocquemiller & ark, 2016; Mendell & ark, 2017). Lentivirüsler, çoğu viral araç gibi sistematik olarak hedefe ulaşamaması ve boyutundan dolayı hücre dışı boşluktan yeterince geçememesi nedeni ile AVV'lere göre viral vektör olarak daha az tercih edilmektedir. Diğer taraftan AAV'lerden daha büyük kapasiteye (DNA'nın yaklaşık 9 kb) sahip olmaları lentivirüsler için bir avantaj olarak görülmektedir. HSV'lere lentivirüslerden daha büyük transgen (150 kb'ye kadar) yüklenebilmekte fakat karakteristik nörotropizm özelliği transfekte olmuş nöronlarda nörotoksiste veya immünojenik reaksiyonlar başlatabilmesinden dolayı viral vektör olarak ciddi bir kısıtlama oluşturmaktadır (Zhang, & Wang, 2021; Ingusci & ark, 2019).

Gen tedavisinde yaygın kullanılmasına ve yoğun bir şekilde geliştirilmiş olmasına rağmen üretimden-uygulamaya kadar geçen süreçte saklama koşulları, uygulanma yolu ve konağın MSS (Merkezi Sinir Sistemi) ortamı gibi birçok faktörden etkilenebilmesi, ekzojen viral proteinlerin immünojeniteyi uyandırma potansiyeli, nötralize edici antikorları gen transdüksiyonunun güvenliğini ve etkinliğini azaltabilmesi gibi faktörlerden dolayı viral vektörlerin gen tedavisinde kullanımlarına ilişkin ciddi belirsizlikler bulunmaktadır. Daha kontrol edilebilir durumdaki viral olmayan vektörlerin gen transfer stratejilerinin bu tür komplikasyonları

önleyebileceği düşünülmektedir (Vandamme, Adjali & Mingozi, 2017). Viral olmayan vektörler, ilaç veya gen yükleme kapasitesine sahip sentetik partiküllerdir. Yaygın olarak kullanılan viral olmayan vektörler, lipidler ve polimer bazlı vektörler olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Periferik uygulamalarda özel ligandlar bağlanmış nanopartiküller ile Kan Beyin Bariyerinden rahat geçilebilmesi, daha büyük gen paketleme kapasitesi ve büyük ölçekli üretim kolaylığı nedeni ile viral olmayan vektörlerin çok daha fazla kullanım kolaylıkları olduğu bildirilmiştir (Jayant & ark, 2016). Diğer taraftan düşük dağılım verimliliği, biyolojik özellik olarak ekzojen genleri konakçı genomuna verimli bir şekilde entegre edebilen viral vektörlerin aksine periferik kandan hedeflenen nöronların çekirdeğine in vivo teslim işlemi sırasında çeşitli engellerin olması gibi, viral olmayan vektörler için iyileştirilmesi gereken belirli faktörler de bulunmaktadır (Zhang, & Wang, 2021).

Klinik tabloların doğru sınıflandırılması epilepsi tedavisinde önemli bir yol gösterici faktördür. ILAE Konsorsiyumu tarafından karmaşık epilepsiler üzerine yapılan son epilepsi GWAS meta-analizi çalışması farklı epilepsi formları arasında belirgin şekilde farklı genetik mimariler olduğunu ortaya koymuştur. Bu veriler sendromik fenotiplemenin ne kadar önemli olduğunu ve buna bağlı yeni tedavi protokollerinin ve biyobelirteçlerin keşfini sağlayabileceğini göstermektedir.

## **Sonuç**

Son yirmi yılda gerçekleşen genomik devrim, epilepsi ile ilişkili olduğu bilinen binden fazla genin tanımlanmasına yol açmıştır. Yeni nesil dizilemedeki hızlı teknolojik gelişmeler, gen ilişkilerinin şaşırtıcı bir hızla keşfedilmesini sağlamıştır. Bu

gelişmeler araştırmaları ve klinik paradigmaları çarpıcı biçimde değiştirmiş olsa da gen ilişkilerinin keşfedilme hızı, gen mutasyonlarının patofizyolojisini ve bunların hastalık fenotipleriyle ilişkisini değerlendirme yeteneğimizi geride bırakmıştır (Demarest & Brooks-Kayal, 2018). İnsan Genom Projesinin tamamlanmasının üzerinden yirmi yıldan fazla zaman geçmiştir. Bugün, tüm genom dizilimi laboratuvarlarda oldukça düşük maliyetler ile elde edilebilmesine rağmen insan genomunun ilk tekrarının bir araya getirilmesinden bu yana DNA dizileme sürecinin, yolculuğun sadece başlangıcı olduğu fark edilmiştir (Demarest & Brooks-Kayal, 2018; Hutchison, 2007).

## Kaynakça

Aaberg KM, Gunnes N, Bakken IJ, et al. Incidence and prevalence of childhood epilepsy: a nationwide cohort study. *Pediatrics*. 2017;139, e20163908.

Abdelfattah, A. M., Park, C., & Choi, M. Y. (2014). Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular concepts*, 5(4), 275–287.

Alexandrov, P. N., Dua, P., Hill, J. M., et al. (2012). microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(4), 365–373.

Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research*, 717(1-2), 1–8.

Bahlo, M., Bennett, M. F., Degorski, P., et al. (2018). Recent advances in the detection of repeat expansions with short-read next-generation sequencing. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-736.

Bartel D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20–51.

Bostjancic, E., Zidar, N., Stajer, D., & Glavac, D. (2010). MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology*, 115(3), 163–169.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(24), 15524–15529.

Cearley, C. N., Vandenberghe, L. H., Parente, M. K., et al. (2008). Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Molecular therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(10), 1710–1718.

Chalfie, M., Horvitz, H. R., & Sulston, J. E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*, 24(1), 59–69.

Conlin, L. K., Kramer, W., Hutchinson, A. L., et al. (2011). Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients. *Journal of Medical Genetics*, 48(1), 1–9.

Coppola, A., Cellini, E., Stamberger, H., et al. (2019). Diagnostic implications of genetic copy number variation in epilepsy plus. *Epilepsia*, 60(4), 689–706.

Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., et al. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 3(6), 499–506.

Demarest, S. T., & Brooks-Kayal, A. (2018). From molecules to medicines: the dawn of targeted therapies for genetic epilepsies. *Nature Reviews. Neurology*, 14(12), 735–745.

Devinsky, O., Cross, J. H., Laux, L., et al. (2017). Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 376(21), 2011–2020.

Ellis, C. A., Petrovski, S., & Berkovic, S. F. (2020). Epilepsy genetics: clinical impacts and biological insights. *The Lancet.Neurology*, 19(1), 93–100.

Eriksson, H., Wirdefeldt, K., Åsberg, S., & Zelano, J. (2019). Family history increases the risk of late seizures afterstroke.*Neurology*, 93(21), e1964–e1970.

Fernández-Hernando, C., Ramírez, C. M., Goedeke, L., & Suárez, Y. (2013). MicroRNAs in metabolic disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(2), 178–185

French, J. A., Lawson, J. A., Yapici, Z., et al. (2016). Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet (London, England)*, 388(10056), 2153–2163.

Gargalionis, A. N., & Basdra, E. K. (2013). Insights in microRNAs biology. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(13), 1493–1502.

Gussow, A. B., Petrovski, S., Wang, Q., Allen, A. S., & Goldstein, D. B. (2016). The intolerance to functional genetic variation of protein domains predicts the localization of pathogenic mutations within genes. *Genome Biology*, 17, 9.

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. Nature reviews. *Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524.

Hammond S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3–14.

Hébert, S. S., Horré, K., Nicolaï, L., et al. (2009). MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiology of Disease*, 33(3), 422–428.

Hébert, S. S., Papadopoulou, A. S., Smith, P., et al. (2010). Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 19(20), 3959–3969.

Helmstaedter C, Kurthen M, Lux S, Reuber M, Elger CE. (2003) Chronic epilepsy and cognition: alongitudinal study in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 54:425e432.

Henshall D. C. (2020). Epigenetics and noncoding RNA: Recent developments and future therapeutic opportunities. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 24, 30–34.

Henshall, D. C., Hamer, H. M., Pasterkamp, R. J., et al. (2016). MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *The Lancet. Neurology*, 15(13), 1368–1376.

Hildebrand, M. S., Harvey, A. S., Malone, S., et al. (2018). Somatic GNAQ mutation in the forme fruste of Sturge-Weber syndrome. *Neurology. Genetics*, 4(3), e236.

Hocquemiller, M., Giersch, L., Audrain, M., et al. (2016). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Human Gene Therapy*, 27(7), 478–496.

Hoss, A. G., Lagomarsino, V. N., Frank, S., et al. (2015). Study of plasma-derived miRNAs mimic differences in Huntington's disease brain. *Movement Disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 30(14), 1961–1964.

Hu, Z., Chen, X., Zhao, Y., et al. (2010). Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(10), 1721–1726.

Hutchison C. A., (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, 35(18), 6227–6237.

Ingusci, S., Verlengia, G., Soukupova, M., et al. (2019). Gene Therapy Tools for Brain Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 724.

International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies (2018). Genome-wide mega-analysis identifies 16 loci and highlights diverse biological mechanisms in the common epilepsies. *Nature Communications*, 9(1), 5269.

Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33 Suppl, 245–254.

Jayant, R. D., Sosa, D., Kaushik, A., Atluri, V., Vashist, A., Tomitaka, A., & Nair, M. (2016). Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(10), 1433–1445.

Jimenez-Mateos, E. M., Engel, T., Merino-Serrais, P., et al. (2012). Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nature Medicine*, 18(7), 1087–1094.

Jin, C., Li, M., Ouyang, Y., Tan, Z., & Jiang, Y. (2017). MiR-424 functions as a tumor suppressor in glioma cells and is down-

regulated by DNA methylation. *Journal of Neuro-oncology*, 133(2), 247–255.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683–692.

Kan, A. A., van Erp, S., Derijck, A. A., et al. (2012). Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 69(18), 3127–3145.

Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., et al. (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5842), 1220–1224.

Kota, J., Chivukula, R. R., O'Donnell, K. A., et al. (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, 137(6), 1005–1017.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., et al. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438(7068), 685–689.

Kumar, P., Dezso, Z., MacKenzie, C., et al. (2013). Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PloS One*, 8(7), e69807.

Lagae, L., Sullivan, J., Knupp, K., et al. (2019). Fenfluramine hydrochloride for the treatment of seizures in Dravet syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 394(10216), 2243–2254.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.

Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell*, 116(2 Suppl), S89–S96.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., et al. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663–4670.

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., et al. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654), 95–98.

Lynn, F. C., Skewes-Cox, P., Kosaka, Y., et al. (2007). MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes*, 56(12), 2938–2945.

Malumbres M. (2013). miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(4), 863–874.

Margis, R., & Rieder, C. R. (2011). Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *Journal of Biotechnology*, 152(3), 96–101.

Martí, E., Pantano, L., Bañez-Coronel, M., et al. (2010). A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 7219–7235.

McKiernan, R. C., Jimenez-Mateos, E. M., Sano, T., Bray, I., Stallings, R. L., Simon, R. P., & Henshall, D. C. (2012). Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning

identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Experimental neurology*, 237(2), 346–354.

Melkman-Zehavi, T., Oren, R., Kredo-Russo, S., et al. (2011). miRNAs control insulin content in pancreatic  $\beta$ -cells via downregulation of transcriptional repressors. *The EMBO Journal*, 30(5), 835–845.

Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *The New England Journal of Medicine*, 377(18), 1713–1722.

Mendell, J. T., & Olson, E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148(6), 1172–1187.

Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., et al. (2013). Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v)7.2 potassium channel subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11), 4386–4391.

Millichap, J. J., Park, K. L., Tsuchida, T., et al. (2016). KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots, and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurology. Genetics*, 2(5), e96.

Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513–10518.

Monteys, A. M., Spengler, R. M., Wan, J., et al. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* (New York, N.Y.), 16(3), 495–505.

Moutinho, C., & Esteller, M. (2017). MicroRNAs and Epigenetics. *Advances in Cancer Research*, 135, 189–220.

Nguyen, T. A., Park, J., Dang, T. L., et al. (2018). Microprocessor depends on hemin to recognize the apical loop of primary microRNA. *Nucleic Acids Research*, 46(11), 5726–5736.

Obad, S., dos Santos, C. O., Petri, A., et al. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics*, 43(4), 371–378.

Ozsolak, F., Poling, L. L., Wang, Z., et al. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & Development*, 22(22), 3172–3183.

Perucca, P., Bahlo, M., & Berkovic, S. F. (2020). The Genetics of Epilepsy. *Annual review of genomics and human genetics*, 21, 205–230.

Petrovski, S., Wang, Q., Heinzen, E. L., Allen, A. S., & Goldstein, D. B. (2013). Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genetics*, 9(8), e1003709.

Pramanik, D., Campbell, N. R., Karikari, C., et al. (2011). Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(8), 1470–1480.

Quinlan, S., Kenny, A., Medina, M., et al. (2017). MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 334, 309–343.

Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., et al. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906.

Richards, K. L., Milligan, C. J., Richardson, R. J., et al. (2018). Selective NaV1.1 activation rescues Dravet syndrome mice from seizures and premature death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(34), E8077–E8085.

Rotllan, N., & Fernández-Hernando, C. (2012). MicroRNA Regulation of Cholesterol Metabolism. *Cholesterol*, 2012, 847849.

Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, 18(10), 505–516.

Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451–5465.

Sands TT, Gelinas JN. (2024) Epilepsy and Encephalopathy. *Pediatr Neurol*. Jan;150:24-31. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2023.09.019. Epub 2023 Sep 29. PMID: 37948790.

Satoh, J., Kino, Y., & Niida, S. (2015). MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease from Public Data. *Biomarker Insights*, 10, 21–31.

Sim, N. S., Ko, A., Kim, W. K., et al. (2019). Precise detection of low-level somatic mutation in resected epilepsy brain tissue. *Acta Neuropathologica*, 138(6), 901–912.

Simonato M. (2014). Gene therapy for epilepsy. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 38, 125–130.

Stenvang, J., Silahdaroglu, A. N., Lindow, M., et al. (2008). The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*, 18(2), 89–102.

Tan, C., Shard, C., Ranieri, E., et al. (2015). Mutations of protocadherin 19 in female epilepsy (PCDH19-FE) lead to allopregnanolone deficiency. *Human Molecular Genetics*, 24(18), 5250–5259.

Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Liu, N., et al. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18255–18260.

Van Solingen, C., Seghers, L., Bijkerk, R., et al. (2009). Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8A), 1577–1585.

Vandamme, C., Adjali, O., & Mingozi, F. (2017). Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial. *Human Gene Therapy*, 28(11), 1061–1074.

Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends in cell biology*, 25(3), 137–147.

Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., & Lyko, F. (2007). Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(9), 1001–1005.

Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93(11), 1897–1904.

Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9(3), 189–198.

Yao, Q., Chen, Y., & Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 51, 11–17.

Young, D., Fong, D. M., Lawlor, P. A., et al. (2014). Adenosine kinase, glutamine synthetase and EAAT2 as gene therapy targets for temporal lobe epilepsy. *Gene Therapy*, 21(12), 1029–1040.

Zealy, R. W., Wrenn, S. P., Davila, S., Min, K. W., & Yoon, J. H. (2017). MicroRNA-binding proteins: Specificity and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 8, 5.

Zhang, L., & Wang, Y. (2021). Gene therapy in epilepsy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 143, 112075.

## BÖLÜM VI

### Nükleik Asit İzolasyon Teknikleri

**Ruşen AVŞAR<sup>1</sup>**

#### Giriş

Nükleik asit izolasyonu, genetik çalışmalar, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanı için temel bir işlemdir ve araştırmacıların genetik materyali elde etmesine olanak tanır. Modern süreçler, her biri özellikle temel materyalin tanımlanması sürecindeki kullanımlarını etkileyen özelliklere sahip kimyasal veya mekanik olarak kategorize edilir. Materyalin tanımlanması, karmaşık analitik makineleri, hasta yakınında, bakım noktasında veya ihtiyaç noktasında kullanılabilen mikro analitik sistemlerle değiştirmeyi amaçlayan yeni bir yaklaşımdır. Önemli çalışmalar için sarf edilmiş olsa da, basit ve etkili bir ekstraksiyon yöntemi nükleik asit izolasyonunda yaygın kullanımı için hala büyük bir zorluktur. Bu çalışmada, en yaygın nükleik asit izolasyon yöntemlerinin her

---

<sup>1</sup>Dr., Gaziantep Üniversitesi, Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı, Gaziantep/Türkiye, Orcid: 0000-0003-0420-7626, rusenavsar@gmail.com

birinin çalışma prensibini detaylı olarak ele alınmış olup avantajlarını ve dezavantajlarını nükleik asit izolasyon sistemlerine entegrasyon potansiyellerini genel hatlarıyla incelenmiştir.

Nükleik asit ekstraksiyonu, moleküler biyolojideki en önemli adımlardan biridir ve biyolojik ve tıbbi bilimlerin birçok alanında rutin olarak kullanılır, çünkü bu prosedür herhangi bir moleküler tanı kitinde bir başlangıç noktasıdır (Tan ve Yiap 2009). Bu kritik prosedür bir asırdan uzun süredir bilinmektedir ve son on yılda önemli ölçüde gelişmiştir. Ancak, nükleik asit izolasyon protokollerinin laboratuvar ortamlarından bakım noktası teşhisinin "gerçek dünyasına" geçmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Günümüzde, hücre içi nükleik asitlerin genomik veya kromozomal, plazmidler ve farklı RNA tipleri olarak geniş bir şekilde kategorize edilebileceği bilinmektedir (Doyle 1996). RNA'lar urasil içerirken DNA'lar timin içerse de, nükleik asitler benzer temel biyokimyasal özellikler gösterir ancak oldukça farklı üç boyutlu yapılara (genomik, plazmid, tRNA, mRNA, rRNA) sahip olabilir. Bununla birlikte, yapısal farklılıklara rağmen, mevcut metinde açıklanan en yaygın kullanılan yöntemler, küçük değişikliklerle DNA'nın birçok organizasyonel biçimine (kromozomal, plazmid, vb.) ve RNA ve çok boyutlu biçimlerine (mRNA, rRNA, tRNA, miRNA) uygulanabilir (Price & ark. 2009). Nükleik asit izolasyonu, numuneye ve alt akış uygulamalarına bağlı olarak modüle edilebilen kabaca dört adıma ayrılabilir: hücre parçalanması, membran lipidlerinin, proteinlerin ve diğer nükleik asitlerin uzaklaştırılması, nükleik asidin toplu halde saflaştırılması/bağlanması ve nükleik asit konsantrasyonu (Goldberg 2008).

Hücre parçalanması veya parçalanması, temel amacı hücre duvarını ve/veya hücre zarlarını parçalamak olan fiziksel veya kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Parçalama yöntemleri esas olarak numunenin özelliklerine dayanır ve bu amaçla doku/hücre parçalanmasını sağlamak için tek başlarına veya bir arada çok çeşitli araçlar ve yaklaşımlar kullanılır. Litik enzimler, kaotropik ajanlar ve farklı tipte deterjanlar kimyasal lizisin ana bileşenleridir, mekanik yöntem ise hücreleri öğütme, kesme, boncuk dövme ve şoklama yoluyla parçalar (Burden 2012). Bir tekniğin iyi sonuçlar vermemesi durumunda bir diğerinin başarılı olabileceğini belirtmek ilginçtir. Ozmotik şok yöntemleri, bazı durumlarda fenol-kloroform ekstraksiyonu ve boncuk dövme gibi yaygın nükleik asit saflaştırma protokollerinden daha iyi sonuçlar vermiştir (Kaya & ark. 2007). Hücre parçalanması sadece DNA ekstraksiyonu için önemli olmakla kalmaz, aynı zamanda biyofarmasötik endüstrisinde de önemli bir rol oynar, çünkü birçok rekombinant protein ve hücrenin diğer önemli bileşenleri bu işlemle geri kazanılabilir. Hücre parçalanması için bir diğer yaklaşım, farklı yöntemlerin bir arada kullanılmasıdır. Bunun iyi bir örneği, birçok protokolün nükleik asiti koruyucu protein iskeletinden kurtarmak için proteazları kullandığı enzimatik lizis durumudur. Ayrıca, yeni proteinsiz nükleik asiti korumak için çözeltiye serbest kalan hücresel nükleazların inaktivasyonu da çok önemlidir. Tek bir çözeltide deterjanlar ve kaotik tuzların kombinasyonu, hücre duvarını veya hücre zarını çözmek ve hücre içi nükleazları inaktive etmek için kullanılır. Öte yandan mekanik parçalama, hücrenin bileşenlerini çıkarmak için kuvvet kullanır. Biyolojik bilimlerde öğütmenin klasik bir örneği, günümüzde sıvı nitrojen kullanımıyla (numunenin izin verdiği durumlarda) optimize edilen havan ve tokmak kullanımıdır. Hücre duvarları ayrıca

sonikasyon veya kavitasyonla ortaya çıkan hızlı basınç değişiklikleriyle oluşan şok dalgalarıyla da parçalanabilir. Hücre parçalanması için kullanılabilen diğer mekanik araçlar, hücrede bir delik açmak için teğetsel bir kuvvet kullanan kesme ve Bunge ve diğerleri tarafından belirtildiği gibi sert hücre duvarını parçalamak için farklı cam veya çelik boncuklar kullanılmaktadır. Bu işlemler, konsolide örneklerle Tablo 1'de kısaca özetlenmiştir.

*Tablo 1: Nükleik asit elde etmek için kullanılan kimyasal ve mekanik yöntemlerin temel özellikleri*

|                 | <b>Teknik</b>                     | <b>İlke</b>                                           | <b>Lizis modu</b> | <b>Maliyet</b>                                             | <b>En yaygın uygulama</b>                                             |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>Kimyasal</b> | Ozmotik şok                       | Membranın ozmotik yırtılması                          | Nazik             | Ucuz                                                       | Sferoplastlar ve Protoplastlar                                        |
|                 | Enzimatik sindirim                | Hücre duvarının sindirimi                             | Nazik             | Küçük ölçekte ucuz; büyük ölçekte pahalı                   | Gram pozitif ve gram negatif bakteriler                               |
|                 | Deterjanlar                       | Membranların çözündürülmesi                           | Nazik             | Ilıman                                                     | Genel kullanım                                                        |
|                 | Alkali tedavisi                   | Membranın çözündürülmesi                              | Sert              | Ucuz                                                       | Plazmit DNA'sı                                                        |
| <b>Mekanik</b>  | Homojenizasyon (bıçak veya havan) | Hücrelerin parçalanması                               | Ilıman            | Orta (büyük ölçekli uygulamalar için tercih edilen yöntem) | Hayvansal dokular                                                     |
|                 | Ultrasonikasyon veya kavitasyon   | Hücrelerin basınçla parçalanması                      | Sert              | Orta ila pahalı                                            | Sferoplastlar için iyi ama birincil hücreler için değil               |
|                 | Basınç hücresi ("French press")   | Hücrelerin kayma kuvvetiyle parçalanması              | Sert              | Ilıman                                                     | Gram-negatif ve bazı Gram-pozitif bakteriler için kullanılır          |
|                 | Bilyalı değirmen                  | Hücreler cam/çelik bilyeler/boncuklar arasında ezilir | Sert              | Ucuz                                                       | Bakteri, maya, mikroalg, tek hücreli hayvan hücreleri için kullanılır |

*Kaynak: (Harrison, Todd & ark., 2015; (Ali, Rampazzo & ark., 2017*

## **1. Kimyasal Olarak Sürülen Yöntemler**

Bu yöntemler, istenen moleküler ayrımı elde etmek için hücresel bileşenlerin biyokimyasal özelliklerine dayanır ve içsel özelliklerine bağlı olarak DNA veya RNA'nın çıkarılmasında tercih veya ayrıcalık gösterebilir.

### **1.1. Etidyum Bromür (EtBr) ile Sezyum Klorür (CsCl) Gradyan Santrifüjü**

Bu teknik esas olarak kaldırma kuvveti ve özgül yoğunluk olgusuna dayanmaktadır. Etidyum bromür (EtBr) bir ara maddedir, bu nedenle UV ışığı altında çift sarmallı DNA'nın yerini bildirir ve süper sarmal ve süper sarmal olmayan DNA moleküllerinin kolayca görsel olarak ayrılmasını sağlar. EtBr'nin iki molekülü ayırdığı temel mekanizma, nispeten doğrusal moleküllerin kaldırma kuvveti yoğunluğunu azaltmaktır (Ali & ark. 2017). Ultra santrifüjlemeden sonra, toplanan DNA'nın CsCl ile diyalize edilmesi gerekir. Bu yöntem, büyük ölçekli bir kültüre ihtiyaç duyulmasına rağmen bakterilerden DNA çıkarmak için kullanılabilir (Moore 1996). Bu yöntem ile kromozomal, plazmit DNA, rDNA veya mitokondriyal DNA gibi çeşitli DNA formlarının saflaştırılması için kullanılabilir (Carr ve Griffith 1987). Hassas olması ve iyi miktarda saf DNA sağlaması nedeniyle, yöntem diğer saflaştırma protokollerine kıyasla zahmetli, zaman alıcı ve maliyetlidir. Ayrıca EtBR, PCR, klonlama ve DNA dizilimi gibi alt akış uygulamalarını etkileyebilir (Nath & ark. 2000).

### **1.2. Guanidinyum Tiyosiyanat-Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu**

Guanidinyum tiyosiyanat- (GuSCN-) fenol-kloroform karışımı, Chomczynski ve Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987) tarafından gösterildiği gibi, tek adımlı bir prosedürde RNA

ekstraksiyonuna izin verir. Guanidinyum yönteminin geliştirilmesinden önce, fenol ekstraksiyonu normalde iki adımlı, zahmetli bir işlemde ekstraksiyon için kullanılırdı. Yöntem, RNA izolasyonu için guanidinyum klorür yerine guanidinyum tiyosiyanat kullanan (Ullrich & ark. 1977) ile başlayarak, daha sonra 1979'da Chirgwin & ark. (1979) tarafından GuSCN'yi uzatılmış saatler süren ultra santrifüjleme ve bir CsCl yastığı ile birleştirerek zamanla art arda değiştirildi. Son nükleik asidin kalitesini artırmak için, teknik, daha kısa santrifüjleme süresiyle guanidinyum tiyosiyanat ve fenol-kloroform kullanılarak iyileştirildi (Chomczynski ve Sacchi 2006). Guanidin hidroklorürden (guanidinin bir diğer yaygın tuzu) suda daha az çözünmesine rağmen GuSCN, her iki iyonunun da kaotropik olması nedeniyle daha güçlü denatüre edici özelliklere sahiptir.

Yöntemin temel prensibi, esas olarak GuSCN, kloroform, sodyum asetat ve fenoldan oluşan oldukça asidik bir çözelti ile ekstraksiyon aşamasından sonra RNA'nın DNA ve proteinlerden ayrılması ve ardından santrifüjlenmesidir. Elde edilen toplam RNA'nın üst sulu fazda bulunurken, DNA ve proteinlerin büyük bir kısmı asidik koşullar altında ara fazda veya alt organik olarak görülür. Daha sonra ortamdaki toplam RNA organik bileşik olan izopropanol ile çöktürme yoluyla ortama tekrar getirilir ve sonraki işlemler için kullanılabilir. Orijinal yöntem memeli dokusunda gerçekleştirildi ancak daha sonra bazı değişikliklerle bitkiler, hayvanlar ve kültürlenmiş hücre dokuları için de kullanıldı (Chomczynski ve Sacchi 2006); (Meng and Feldman 2010). Optimum pH, ayırma sürecinde kritik bir rol oynar çünkü DNA asidik koşullar altında (pH 4–6) organik faza veya nötr pH'ta (pH 7–8) sulu faza ayrılır. Bu yöntemin temel dezavantajı, fenol ve kloroformun her ikisinin de tehlikeli kimyasallar olmasıdır

(Chomczynski ve Sacchi, 2006). Bu reaktif, farklı isimlerle ticari olarak mevcuttur. Çıkarılan NA'nın yüksek saflığı ve verimi bu prosedürün ayırt edici özelliğidir.

### **1.3. Setiltrimetilamonyum Bromür (CTAB) Ekstraksiyonu**

Setiltrimetilamonyum bromür ekstraksiyon yöntemi esas olarak bitki örnekleri ve yaprakları, tohumları ve tahılları gibi parçaları için kullanılır. Yöntem çeşitli gıda örnekleri için de kullanılır. CTAB ekstraksiyon tamponunun temel bileşimi alkali pH'ta %2 CTAB içerir, ancak diğer birçok ekstraksiyon protokolü gibi CTAB da her bir örneğin ihtiyacına göre değiştirilmiştir (Terry & ark. 2002). CTAB, düşük iyonik güçteki çözeltilerde nükleik asitleri ve asidik polisakkaritleri çökeltmek çalışırken, proteinler ve nötr polisakkaritler çözeltide kalır. Daha sonra, CTAB-nükleik asit çökeltmiş kompleks yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünür ve çözeltide asit polisakkaritleri bırakır (Tan ve Yip 2009). Çökeltme ve yıkama adımları sırasında CTAB yöntemi fenol, kloroform, izoamil alkol ve merkaptetanol gibi çeşitli organik çözücüler ve alkoller kullanır. Bu prosedürün temel dezavantajı zaman alıcı olması ve fenol ve kloroform gibi toksik kimyasallar kullanmasıdır. Ayrıca, CTAB ile çıkarılan DNA'nın PCR analizlerinin inhibisyonunu önlemek için daha fazla saflaştırılması gerekir (Demeke ve Jenkins 2010).

### **1.4. Chelex® Ekstraksiyonu**

Chelex; saç, kan lekesi kartları ve yanak sürüntüleri gibi çeşitli kaynaklardan DNA çıkarmak için adli tıp alanında sıklıkla kullanılan bir şelat oluşturuçudur (Walsh, Metzger & ark. 1991). Walsh'e göre , Chelex varlığında kaynatma, yüksek sıcaklık ve düşük iyonik koşullarda DNA parçalanmasına neden olan metal iyonlarını

şelatlayarak DNA parçalanmasını engelleyerek, nispeten az miktarda DNA'nın PCR amplifikasyonu sırasında sinyali artırabilir. Chelex, çok değerlikli metal iyonları için şelat oluşturunca olarak kullanılan eşleştirilmiş iminodiasetat iyonları içeren bir stiren divinilbenzen kopolimeridir (Phillips & ark. 2012). Bu teknik, hızlı olması, birkaç manipölasyon adımı içermesi ve fenol/kloroform gibi tehlikeli kimyasallar kullanmaması nedeniyle ilginçtir. Başlıca dezavantajı, saflaştırma adımlarının olmaması nedeniyle karmaşık numunelerden PCR inhibitörlerini etkili bir şekilde uzaklaştıramamasıdır (Schrader & ark. 2012). Bu yöntem restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizleri için de uygun değildir, çünkü DNA'nın bu protokolün yüksek sıcaklığına ve alkalinitesine maruz kalması DNA'nın denatürasyonuna ve kırılmasına neden olur.

### **1.5. Alkali Ekstraksiyon**

Alkali ekstraksiyon yöntemi, (Birnboim ve Doly 1979) tarafından tanımlanan plazmit DNA izolasyonuna adanmıştır. Bu yöntemin temel prensibi, yüksek moleküler ağırlıklı kromozomal DNA'nın seçici alkali denatürasyonudur, kovalent bağlı dairesel plazmit DNA'sı bozulmadan kalır. Nötralizasyondan sonra, kromozomal DNA renatüre olur ve çözünmeyen bir çökelti oluştururken, plazmit DNA'sı üstte kalan kısımda kalır. Bu yöntem hem küçük hem de büyük DNA plazmitleri için faydalıdır (Birnboim ve Doly 1979).

Yöntem, ilgi duyulan bakterilerin kültür ortamından toplanmasını ve alkali çözeltiye (temel olarak SDS ve NaOH'den oluşur) maruz bırakılmasını içerir. SDS, hücreleri lize etmek ve proteinleri denatüre etmek için deterjan görevi görürken, alkali

koşullar genomik DNA'yı, plazmit DNA'sını ve proteinleri denatüre eder. Potasyum asetat (pH 5.2) eklenmesi karışımı nötralize eder ve plazmitin ve genomik DNA'nın renatürasyonu ile sonuçlanır. Daha fazla etanol (veya izopropanol) eklenmesi genomik DNA'yı çöktürürken, plazmit DNA'sı kısa bir 2 dakikalık santrifüjlemeden sonra süpernatanttan toplanabilir. Bu teknik, hücrelerden plazmit DNA'sı elde etmenin en hızlı, en güvenilir ve nispeten kolay yollarından biri olarak kabul edilir. Lizis ve nötralizasyon aşamaları sırasında kuvvetli karıştırma, genomik DNA'nın parçalanmasına ve plazmit süpernatantıyla kontaminasyona neden olabilir. Saflaştırılmış DNA, daha az hassas uygulamalar için uygundur. Daha hassas uygulamalar için, genellikle spin kolonlarla bir saflaştırma adımı gerekir.

### **1.6. Oligo(dT)-Selüloz Kromatografisi ile Poli(A)+ RNA'nın Saflaştırılması**

Ökaryotik mRNA moleküllerinin çoğu, 3' ucunda yaklaşık 250 nükleotitlik bir poliadenile (poliA) kuyruğa sahiptir. Bu, kromatografik tekniklerle basit ve kolay bir RNA çıkarma yöntemi için temel sağlar. Bu yöntemin temel mekanizması, poli(A) RNA'nın yüksek tuz koşulları altında bir oligo(dT)-selüloz matrisiyle hibritleşmesidir. Ökaryotik mRNA'lar, boyut (0,5 kb'den 20 kb'nin üzerine) ve bolluk (hücre başına 15'ten az kopya ile 20.000'in üzerine kopya) açısından çeşitli bir aralığa sahiptir (Bryant ve Manning 2000). Minimum 20 kalıntıya sahip poliadenile RNA, genellikle 10-20 nükleotitten oluşan oligo(dT)-selüloz matrisine bağlanma yeteneğine sahiptir (Connolly 1983). Tüm poliadenile edilmemiş RNA'lar yıkandıktan sonra, oligo(dT)-poli(A) bağını bozmak için düşük tuzlu bir tampon kullanılır ve bu da poli(A) RNA'larının elüsyonu ile sonuçlanır (Sambrook ve Russel 2000). Poli(A) RNA

seçimi, hızlı olan ve iyi RNA geri kazanımı sağlayan kolon veya parti kromatografisinde yapılabilir (Tan ve Yiap 2009). Dezavantajı, yöntemin yalnızca mRNA'ları seçmesi ve miRNA'lar, rRNA'lar ve tRNA'lar gibi diğer RNA'larda bulunan önemli biyolojik bilgileri doğal olarak dışlamasıdır.

## **2. Katı Faz Nükleik Asit İzolasyonu**

Katı faz ekstraksiyonu (SPE), piyasada bulunan en verimli NAE tekniklerinden biridir (Tan ve Yiap 2009); (Price & ark. 2009). Hem çözünen hem de sorbentin belirli hidrofobik, polar ve/veya iyonik özelliklerine dayanarak hedef analiti çözeltiden seçici olarak ayıran sıvı ve sabit fazlara dayanır. İlgi duyulan sorbent ve analit arasındaki kimya bu tekniğin temelini oluştururken, van der Waals kuvvetleri (polar olmayan etkileşimler), dipol-dipol etkileşimleri (polar etkileşimler) ve hidrojen bağı gibi "zayıf" kimyasal etkileşimler SPE'deki tutma mekanizmasını belirler.

SPE yöntemleri normal/düzenli SPE, ters SPE ve iyon değişim SPE olarak ikiye ayrılabilir. SPE'de kullanılan her sorbent, ekstraksiyon yöntemlerinde yer alan belirli bir problem için bir çözüm ortaya çıkaran benzersiz özelliklere sahiptir. Bunun iyi bir örneği, çözeltinin polaritesini azaltan ve DNA moleküllerinin durağan fazla etkileşimini azaltan asetone'dir. Normalde, ters SPE polar/orta derecede hareketli faz, polar olmayan durağan faz ve yarı veya polar olmayan analitler kullanırken, normal SPE yarı ila polar olmayan hareketli faz, polar durağan faz ve polar analitlerden oluşur. Öte yandan, iyon değişim SPE hem sorbentin hem de ilgi duyulan analitin elektrostatik etkileşimine dayanır (Żwir-Ferenc ve Biziuk 2006).

Katı faz mikroekstraksiyonu (SPME), 1990'larda (Arthur ve Pawliszyn 1990) tarafından tanıtılan katı faz ekstraksiyon tekniğinde nispeten yeni bir gelişmedir ve sıvı, gaz ve katı matrisler dahil olmak üzere çeşitli analitler için yararlıdır (Merkle & ark. 2015). SPME'de iki önemli adım yer alır: (i) analitlerin elyaf kaplı ekstraksiyon fazında bölünmesi ve (ii) ekstraktın desorpsiyonun gerçekleştiği gaz kromatografisi gibi ayırma cihazına aktarılması. SPME hızlı ve kullanımı kolay bir tekniktir ve belirli bileşikler için iyi bir tespit sınırına (trilyonda parça) sahiptir (Nielsen ve Jonsson 2002). SPME'nin dezavantajları arasında yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin analiz edilmesindeki zorluk, numune taşınması ve ticari olarak temin edilebilen sabit fazların sonunda kıtlığı yer alır.

## **2.1. Silika Matrisler**

1979'da silikatların alkali koşullar ve artan tuz konsantrasyonu altında DNA için yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğu bulundu (Vogelstein ve Gillespie 1979). Silika matrisler, hem ticari hem de araştırma amaçları için NAE prosedürlerinde devrim yaratmıştır. NA'nın silika matrislere etkili ve seçici bağlanması, bu hızlı ve sağlam NA saflaştırma prosedürünün ayırt edici özelliğidir (Esser & ark. 2006). Silika matrisler, jel veya cam partikülü (yani, cam mikrofiberler) biçiminde silika malzemeden oluşur (Padhye & ark. 1997). Bu teknikte yer alan mekanizma, negatif yüklü NA ile pozitif yüklü silika malzeme arasındaki afinitedir ve bunun sonucunda nükleik asitler silika matrislere seçici olarak bağlanırken, hücre bileşenlerinin geri kalanı ve diğer kimyasallar yıkanır. Silika yüzeyi, negatif yüklü DNA'nın bağlanmasını artıran pozitif iyonlarla kaplıdır. Son adım olarak, NA, nükleaz içermeyen su veya alkali Tris-EDTA gibi tamponlar gibi herhangi bir hipozmotik çözelti ile silika matristen elüe edilebilir. RNA ekstraksiyonu için, kaotropik

ajanlar RNazları denatüre etmede ikinci ve çok önemli bir göreve sahiptir (Mutiu ve Brandl 2005). Orijinal prosedüre, hidratlı silika matrisinin ve mikroçip bazlı silika SPE'nin tanıtılması gibi birçok değişiklik yapılmıştır (Christel & ark. 1999). Bu teknikte, sodyum iyonlarının nükleik asidin fosfat grubunda bulunan negatif yüklü oksijeni çekmede ve yüksek tuz koşulları ve asidik pH varlığında "tuzlanma" olarak bilinen olgu nedeniyle NA'nın çözünmez hale gelmesine yardımcı olmada oynadığı rol de dikkate değerdir (Chacon-Cortes ve Griffiths 2014). Bu teknik yüksek saflıkta DNA sağlar, gerçekleştirilmesi kolaydır ve ayrıca niceliksel ve niteliksel olarak çoğalabilir. Bu tekniğin dezavantajı, küçük parçalar silika matrisine sıkıca bağlandığından küçük DNA parçalarını verimli bir şekilde kurtaramamasıdır (Green ve Sambrook 2012).

## **2.2. Cam Parçacıkları**

Toz halinde kromatografi sabit fazı veya mikroboncuk formunda olsun, cam parçacıkları da nükleik asitlerin çıkarılması için kullanılmıştır. Kaotropik tuzlar NA'yı serbest bırakmak ve yaygın silikat camına, çakmak taşı camına ve borosilikat camına (cam elyaf filtreler olarak düzenlenmiştir) bağlanmasını sağlamak için kullanılır. NA'nın cam parçacıklarına bağlanmasının temel ilkesi, karışımda bulunan bileşenlerin (DNA, proteinler, vb.) kromatografi kolonunun sabit fazına (cam parçacıkları) adsorpsiyon afinitesine dayanır. DNA gibi polar bileşikler, belirli iyonik kuvv& arktında polar sabit faza bağlanma konusunda yüksek bir eğilime sahiptir (Padhye & ark. 1997).

## **2.3. Diyatomlu Toprak**

Diyatomlu toprak (DE), alternatif olarak kizelgur veya diatomit olarak bilinir, ilk olarak Boom & arkadaşları tarafından

açıklanan bu prosedür, esas olarak kaotropik ajanların varlığında NA'nın katı bir faza (örneğin DE) bağlanmasına ve ardından su veya düşük tuzlu tamponda elüsyona dayanır (Boom, Sol & ark. 1990). NA, silika matrislerine bağlanma prensiplerini izleyerek DE'de bulunan silikaya bağlanır. Bu prosedür, hem plazmit hem de tek veya çift sarmallı nükleik asitler için kullanıldığından, azaltılmış pipetleme hatası, daha kısa protokol süresi ve numune hazırlama için daha az sayıda adım avantajına sahiptir (Koo & ark. 1998). Ancak, bu teknik nispeten yüksek maliyeti nedeniyle rutin olarak kullanılmaz.

#### **2.4. Manyetik Boncuk Tabanlı Nükleik Asit Saflaştırması**

Manyetik boncuk teknolojisi, RNA ve genomik, plazmit ve mitokondriyal DNA'yı çıkarmak için ortaya çıkan stratejilerden biridir. Teknik, tamamlayıcı hibridizasyon yoluyla nükleik asitlerin karmaşık karışımlardan ayrılmasını içerir (Archer & ark. 2006). Son yıllarda, işlevselleştirilmiş manyetik partikül veya boncuklar, hızlı ve etkili bir çıkarma prosedürü için uygun tampon sistemlerine bağlanmıştır (Azimi & ark. 2011). Kesme kuvvetleri üretebilen ve nükleik asitlerin kırılmasına neden olabilen santrifüjleme adımlarının olmamasının, genomik DNA'dan daha uzun parçaların sağlam kalmasını daha iyi sağladığı düşünülmektedir. Genellikle, işlevselleştirilmiş manyetik boncuklarla karıştırılmış numuneyi içeren bir kabın veya tüpün kenarına bir mıknatıs uygulamak ve hedef partikülleri yalnızca kap duvarının yakınında toplamak yeterlidir. Bu tekniğin olumlu yönü, santrifüjleme adımlarından kaçınmanın yanı sıra çok sayıda numuneden çıkarma prosedürlerinin otomasyonu için alternatif bir yol sağlamasıdır. Çıkarma tekniği, çok sayıda numune (kan, doku ve diğerleri) içeren toplu işlemlerde kullanılabilir ve otomasyon, yüksek verimli uygulamalar ve yüksek

numune işleme için en iyi seçeneklerden biri olarak yürütülmesi nispeten kolaydır (Berensmeier 2006; Franzreb & ark. 2006). Bu yöntem, neredeyse ekipman gerektirmediği için düşük teknolojik ortamlarda kullanılmaya da uygundur.

## **2.5. Anyon Değişim Malzemesi**

Silika matrisler gibi, anyon değişim reçineleri de DNA ve RNA ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılır. Silikatın negatif yükünün aksine, anyon değişim reçinesi, nükleik asidin negatif yüklü fosfatını çekmek için pozitif yüklü dietilaminoetil selülozu (DEAE) kullanır. Bu nedenle, pH ve tuz konsantrasyonu, NA'nın anyon değişim reçinesine bağlanmasını veya elüsyonunu belirleyen önemli yönlerdir (Handbook 2001). Anyon değişimi, silikaya kıyasla çok saf DNA çıkarma ve renatürasyon sırasında reçineyi yeniden kullanma avantajına sahiptir. Ancak, bu yöntem elüsyon adımıyla yüksek tuz konsantrasyonu kullandığından, akış aşağısı uygulamaları için tuzdan arındırma gerektirir.

## **2.6. Selüloz Matrisi**

Emici selüloz bazlı kağıt, nükleik asitlerin saflaştırılması ve depolanması için ilginç bir matristir. Selüloz, glikozun bir polimeridir ve bu nedenle yüksek oranda hidroksile edilmiştir ve belirli kimyasal koşullar altında nükleik asitleri bağlamak için yeterince güçlü bir polar çekim üretir. Ticari olarak temin edilebilen FTA kağıdı (Whatman Inc., ABD) veya analiz için hızlı teknoloji, selüloz kullanılarak DNA'nın nasıl saflaştırılıp depolanacağına dair ilginç bir örnektir. FTA kartları, her yerde bulunan Tris pH 8, SDS ve EDTA gibi özel bir tampon, deterjan ve şelatlama maddesi karışımı ile gömülü, basitçe kalın bir kağıt tabakasıdır. Hücreler kağıda tespit edildiğinde, deterjan zarları lize eder ve EDTA,

nükleazlara kofaktör olan metal iyonlarını şelatlar ve ayrıca kirletici organizmaların büyümesini önler (Smith ve Burgoyne 2004; Burgoyne 1996).

### **3. Çıkarma Yöntemlerinde Kullanılan Cihazlar**

#### **3.1. Spin Sütunları**

Spin-kolon sistemlerindeki bağlayıcı eleman genellikle cam parçacıkları veya tozu, silika matrisleri, diatomlu toprak ve iyon değişim taşıyıcılarından oluşur. Nükleik asit bağlanması bu nedenle belirli tampon çözeltileri ve son derece hassas pH ve tuz konsantrasyonları ile optimize edilir (Chacon-Cortes ve Griffiths 2014). Kolon bazlı NAE, mevcut seçenekler arasında en iyi tekniklerden biridir ve hızlı ve güvenilir bir tampon değişimi ve dolayısıyla NAE için sağlam bir sabit faz sağladığı için iyon değişim yöntemlerinde hayati bir rol oynar. Bu yöntem hızlı ve tekrarlanabilir ve ana dezavantajı ekipman gereksinimi olarak küçük bir santrifüje ihtiyaç duymasıdır.

#### **3.2. Boncuklar veya Manyetik Boncuklar**

Manyetik parçacık veya boncuklar, ekstraksiyon sürecinde santrifüje bağlı adımları ortadan kaldırmak için ilk seçenektir. Manyetik boncuklar, numunedeki hedefine özgül olarak bağlanan antikorlar, antijenler, oligonükleotidler veya aptamerler gibi farklı ligandları kullanır. Ekstraksiyon için kullanılan ilk manyetik parçacık, daha sonra DNA veya RNA'ya bağlanan fonksiyonel karboksilik grupla kaplı bir demir oksit çekirdekten oluşuyordu (Hawkins 1998). O zamandan beri, sülfat, amino ve hidroksil grupları gibi farklı yüzey fonksiyonel grupları kullanılarak birçok değişiklik yapıldı (Adams & ark. 2015). Bu fonksiyonel grupların yanı sıra, tosil veya epoksi grupları gibi farklı fonksiyonel gruplara

sahip önceden aktive edilmiş manyetik boncuklar mevcuttur (Centi & ark. 2009). Protein A, protein G veya streptavidin ile aktive edilen manyetik boncuklar ticari olarak mevcuttur. Manyetik boncuk ayırma, ekipmansız bir işleme izin vererek santrifüje bağlı ekstraksiyon sürecine göre birçok avantaj sunar. NA'nın ekipmansız ayrılması, boncukların plastik kabarcık pipetlerinin içinde tutulduğu manyetik olmayan boncuklarla da mümkündür (Pawlowski ve Karalus 2012).

### **3.3. Otomasyon (Sıvı Taşıma Robotları)**

Tanı testlerinin ve hasta sayılarının artışı, rutin çalışmalarda otomasyona olan ihtiyacı vurgulamaktadır. Bu talebi karşılamak için çeşitli otomatik cihazlar geliştirilmiş ve pazara sunulmuştur. En başarılı örnekler, birçok yaşam bilimi ve klinik analiz laboratuvarında rutin olarak numune, reaktif veya diğer sıvıları belirlenmiş kaplara hassas miktarda dağıtmak için kullanılan otomatik sıvı işleme robotlarıdır. Bu teknoloji sayesinde, artık birçok numuneyi aynı anda hassas ve hızlı bir şekilde işlemek mümkündür. Ek olarak, barkod okuyucular bu tür ekipmanların ayrılmaz bir parçasıdır ve numunelerin ve sonuçların kolayca izlenebilirliğini sağlar. Bu tür ekipmanlar için katı faz veya manyetik boncuk yöntemleri kullanılarak tam otomatik NAE protokolleri geliştirilmiştir (Rule & ark. 2001).

### **3.4. Mikroakışkanlar ve “Laboratuvar-Üzerinde-Çip” Kartuşları**

Nükleik asit tabanlı tespit (NAT), duyarlılık ve özgüllük nedeniyle immünoassay tabanlı tespite kıyasla tercih edilir, ancak NAT tabanlı tanı karmaşık altyapı, gelişmiş makineler ve eğitilmiş personel gerektirir. Bu engeli aşmak için, POC-Dx stratejisinin bir

parçası olarak moleküler tabanlı testler için gerekli tüm reaktifleri iç bölmelerde taşıyan mikroakışkan çipler tasarlanmış ve üretilmiştir. Genellikle, mikroakışkan çipler (veya "çip üzerinde laboratuvar" kartuşları) NA izolasyonu için zarlar veya boncuklar biçiminde katı faz ekstraksiyonuna güvenir (Vogelstein ve Gillespie 1979; Mauk & ark. 2015).

Otomasyonun POC cihazlarında minyatürleştirme ihtiyacıyla birleşmesi, kapalı bir kapta bir veya birkaç biyolojik reaksiyonu gerçekleştiren kartuşların geliştirilmesine yol açtı. Bu reaksiyonlar, NAE, amplifikasyon ve tanımlama gibi mevcut moleküler biyoloji yöntemlerinin çoğunu ve serolojik imza analizlerini içerir. POC olmasa da mikroakışkan kartuşun en büyük örneklerinden biri, GeneXpert MTB/RIF platformu tarafından elde edilen Mycobacterium tuberculosis tanısıyla ilgili dönüm noktasıdır (Boehme & ark. 2010). Belirli hücreler/sporlar, bir lizis adımı (sonifikasyon) ile takip edilen filtrasyon yoluyla seçilir. Mikrotüpler, pompalar ve döner tahrikler, sıvıları yıkama, saflaştırma ve nükleik asitlerin konsantrasyonunun gerçekleştiği belirli kartuş odalarına aktarır. Bir sonraki adım, çıkarılan NA'nın gerçek zamanlı PCR'nin gerçekleştiği bir reaksiyon odasına taşınmasıdır (Dineva & ark. 2007). FilmArray 2.0 sistemi numune işleme, NA amplifikasyonu ve özel bir kese içinde tespiti birleştiren bir multipleks PCR sistemidir. Belirli keseler, numunede bulunan farklı hedefleri çoğaltmak için kullanılır, Nested PCR ve ardından kimya tabanlı tespit ile gerçek zamanlı PCR kullanılır. Yazılım daha sonra belirli kontrol reaksiyonlarına veya bilinen dizilerin erime eğrisi veritabanına dayalı DNA erime analizi kullanarak otomatik olarak tanımlama raporları oluşturur.

*Tablo 2: Nükleik asit ekstraksiyon protokollerinde kullanılan mevcut cihazların özeti*

| <b>Malzeme</b>                                           | <b>Afinite molekülü</b> | <b>Avantaj</b>                                                                              | <b>Dezavantaj</b>                                              |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Döndürme sütunları                                       | DNA, RNA                | Hızlı; tekrarlanabilir                                                                      | Aerosollerin çapraz kontaminasyonu; gerekli altyapı ve ekipman |
| Boncuklar veya manyetik boncuklar                        | DNA, RNA                | Kullanımı kolay; yüksek otomasyon potansiyeli; ekipman gerektirmeyen süreç                  | Emek yoğun                                                     |
| Otomasyon (sıvı işleme robotları)                        | DNA, RNA                | Numune ve reaktiflerin hassas bir şekilde işlenmesi, kayıpların ve maliyetlerin azaltılması | Yüksek maliyet                                                 |
| Mikroakışkanlar ve "çip üzerinde laboratuvar" kartuşları | DNA, RNA                | Hassas ve spesifik                                                                          | Yaygın NAE kimyasallarının uyumsuzluğu                         |

Kaynak: (Ali & ark., 2017)

#### **4. Taşınabilir Cihazlarda Çıkarım Protokollerinin Uygulanmasına Yönelik Sınırlamalar**

POC-Dx için eksiksiz ve kullanımı kolay bir çözümün geliştirilmesinin önündeki en büyük engel, numune hazırlama protokollerinin taşınabilir cihazlara entegre edilmesidir. Girişimleri gidermek ve hedef molekülleri çıkarmak, özellikle numune matrisleri arasındaki büyük farklılıklar ve hedef analitlerin özellikleri nedeniyle önemsiz bir iş değildir. NAE protokolleri laboratuvarında iyi bir şekilde yerleşmiş olsa da ve mikroakışkan Dx cihazlarının başlangıcından bu yana birçok ilerleme kaydedilmiş olsa da, bu cihazların ticari olarak bulunabilirliği hala nadirdir (Cui,

Rhee & ark. 2015). Yeni teknolojilere dayalı yeni testlerin uygulanması ve kabulü için teknik zorlukların yanı sıra engelleri tartışan birçok bilimsel çalışma bulunmaktadır.

Moleküler biyolojide rutin olarak kullanılan çeşitli organik kimyasallar, POC kartuşlarında/cihazlarında yaygın olarak kullanılan plastik malzemelerle reaksiyona girebilir ve bu da bazı polimerlerin başlangıçtaki mekanik ve fizikokimyasal özelliklerini sürdürmesini zorlaştırır. Plastik malzemelerin performans özellikleri açısından en önemli özelliklerden biri kimyasal atalettir, yani ilgi duyulan aktif maddenin temas edeceği malzeme etkileşime girmeyecek ve genellikle çıkarılabilir veya süzülebilir olarak sınıflandırılan istenmeyen ürünler üretmeyecektir. Toksikolojik veya fonksiyonel çalışmalar genellikle belirli bir çevre koşulu altında çıkarılabilir veya süzülebilir ürün seviyelerini belirlemek için gerekli olan çıkarma ve etkileşim çalışmalarının yerini alır. Bu tür bir değiştirme kabul edilebilir, ancak ideal değildir, çünkü toksikolojik çalışmalar için gerçekleştirilen biyolojik değerlendirme temel çıkarma/etkileşim değerlendirmelerini içermelidir (Jenke 2007). Yaygın olarak kullanılan termoplastikler polikarbonat (PC) ve polimetilmetakrilat (PMMA) gibi camsı polimerlerin yapısal özelliklerine ilişkin çalışmalar, polimer çözünürlüğünü gerilim çatlağı derecesine kadar çeşitli çözücülere maruz bırakıldığında ilişkilendirir (Bernier ve Kambour 1968). PMMA'nın bir avantajı, ultraviyole aralığında yüksek optik şeffaflığıdır; PC ise daha geniş bir çözücü yelpazesıyla uyumluluk ve NA amplifikasyonu için polimeraz zincir reaksiyonu gibi uygulamalara çok uygun daha yüksek bir cam geçiş sıcaklığı sunar. Ancak, bunların hiçbirisi NAE için rutin olarak kullanılan kimyasallarla kullanılmak için yeterince iyi değildir. Örneğin, PMMA aseton veya metanol gibi güçlü

çözücülerle temizlenemez, çünkü bu kimyasallar yüzeyine önemli ölçüde zarar verir ve şeffaflığı azaltır (Yang ve DeVoe 2013).

Bazı kimyasallar polimerin rengini, yüzey görünümünü, esnekliğini ve kütlesini etkileme potansiyeline sahiptir ve değerlendirilmesi gereken çıkarılabilir/sızınabilir ürünler üretir. Bu değişiklikler, (i) yapılarını bozabilen ve depolimerizasyona yol açabilen polimer zinciriyle kimyasal etkileşim; (ii) kimyasalların plastiklere adsorpsiyonu olan fiziksel etkileşim, bunun sonucunda şişme ve yumuşama meydana gelmesi; veya (iii) plastikleştiriciler veya polimer parçaların üretimi sırasında kullanılan yapıştırıcılar veya hatta moleküler biyoloji süreçleri sırasında kullanılan deterjanlar veya yağlar gibi gerilim çatlatma ajanları nedeniyle gerilimle ilişkili çatlama meydana gelebilir (Robeson 2013). Herhangi bir kimyasalın neden olduğu değişiklikler, ne kadar küçük görünürse görünsün, iyice değerlendirilmelidir. Aşırı durumlarda, etanol/izopropanol gibi kimyasallar ikame edilmelidir. Kartuşlarda etanol/izopropanol depolaması, uçuculuğu, yanıcılığı ve sızıntı potansiyeli nedeniyle de sorunludur.

Son olarak, anlamlı sonuçlar elde etmek için gereken numune hacmi konusunda farklılık vardır. Hücre lizi için kullanılan tamponların ve dolayısıyla sert kimyasalların hacmi numunenin hacmiyle doğru orantılı olduğundan, POC-Dx testleri virüs ve çoğu bakteriyel enfeksiyon gibi patojenin daha yüksek sayılarda bulunduğu hastalıklarda en faydalıdır. Bununla birlikte, parazitik enfeksiyonlar POC-Dx için bir zorluk oluşturur çünkü parazit yükleri kullanılan tekniklerin tespit sınırlarına çok yaklaşabilir (Warkiani, Tay & ark. 2015), böylece numunedeki hedef NA'nın bulunabilirliğini büyük ölçüde etkiler. Reaktiflerin hacmi de, küçük hacimlerin homojenleştirilmesi daha kolay olduğundan, ortak

laboratuvar cihazları olmadan çözeltilerin uygun şekilde karıştırılmasını sağlamak için önemlidir.

## **Sonuç**

Friedrich Miescher tarafından DNA'nın ilk başarılı izolasyonundan yaklaşık 150 yıl sonra, nükleik asitler artık muhafaza amaçlı numunelerin tanımlanmasından kişiselleştirilmiş tıp ve farmakogenomik alanlarına kadar farklı alanlarda biyolojik bilgi elde etmenin merkezinde yer almaktadır. NAE için kullanılan protokoller ve cihazlar tiyosiyanat-fenol-kloroform manuel tekniklerinden kullanıcı dostu kolon teknolojisine ve otomatik platformlara doğru evrilmiştir, ancak henüz genel bir altın standart yöntem oluşturulmamıştır. Bu inceleme, mevcut her yöntemin çalışma prensibini ve avantajlarını ve dezavantajlarını analiz etmiştir. Ana fikir, her uygulamanın belirli özelliklere sahip olmasıdır ve bu özellikler daha sonra her araştırmacıyı en uygun yönteme yönlendirmelidir. Moleküler biyoloji teknikleri hassas ve doğru yöntemler olsa da, testleri çalıştırmak ve sonuçları analiz etmek için oldukça iyi kurulmuş bir laboratuvar ortamı ve pahalı cihazların yanı sıra yetenekli personel gerektirir ve bu da her zaman mevcut değildir. Son yıllarda, çip üzerinde laboratuvar teknolojisi, biyolojik bilginin yönetimini düşük kaynaklı ortamlar, bir doktor kliniği veya bir hastane hasta yatağı gibi ihtiyaç duyulan yerlere götürme vaadini getirdi. Ancak, ilerleme kaydedilmiş olsa da, POC-Dx testlerinde NAE protokollerinin kullanımını engelleyen birkaç engel hala var, bunu çip üzerinde laboratuvar teknolojisini kullanan ürün sayısının az olmasından da görebilirsiniz. NAE protokollerinin zorluklarının ve sınırlamalarının üstesinden gelmek, moleküler biyoloji tekniklerinin kullanımını büyük ölçüde artıracak ve böylece daha iyi tanı testlerine erişim sağlayarak genel nüfusun genel yaşam

kalitesini artıracaktır. Nükleik asit ekstraksiyonu moleküler biyolojinin önemli bir parçasıdır. 1869'da geliştirilen orijinal yöntemde birkaç değişiklik yapılmıştır. Hem mekanik hem de kimyasal süreçlerin, özellikle bakım noktasında teşhis olmak üzere, kullanımlarını etkileyen özellikleri vardır.

## Kaynakça

Adams, N. M., H. Bordelon, K.-K. A. Wang, L. E. Albert, D. W. Wright and F. R. Haselton (2015). "Comparison of three magnetic bead surface functionalities for RNA extraction and detection." *ACS applied materials & interfaces* **7**(11): 6062-6069.

Ali, N., R. d. C. P. Rampazzo, A. D. T. Costa and M. A. Krieger (2017). "Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics." *BioMed research international* **2017**(1): 9306564.

Archer, M. J., B. Lin, Z. Wang and D. A. Stenger (2006). "Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA." *Analytical biochemistry* **355**(2): 285-297.

Arthur, C. L. and J. Pawliszyn (1990). "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers." *Analytical chemistry* **62**(19): 2145-2148.

Azimi, S. M., G. Nixon, J. Ahern and W. Balachandran (2011). "A magnetic bead-based DNA extraction and purification microfluidic device." *Microfluidics and nanofluidics* **11**: 157-165.

Berensmeier, S. (2006). "Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids." *Applied microbiology and biotechnology* **73**: 495-504.

Bernier, G. and R. Kambour (1968). "The Role of Organic Agents in the Stress Cracking and Cracking of Poly (2, 6-dimethyl-1, 4-phenylene oxide)." *Macromolecules* **1**(5): 393-400.

Birnboim, H. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic acids research* **7**(6): 1513-1523.

Boehme, C. C., P. Nabeta, D. Hillemann, M. P. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore and R. Rustomjee (2010). "Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance." *New England Journal of Medicine* **363**(11): 1005-1015.

Boom, R., C. Sol, M. Salimans, C. Jansen, P. Wertheim-van Dillen and J. Van der Noordaa (1990). "Rapid and simple method for purification of nucleic acids." *Journal of clinical microbiology* **28**(3): 495-503.

Bryant, S. and D. L. Manning (2000). "Isolation of mRNA by affinity chromatography." *The Nucleic Acid Protocols Handbook*: 9-11.

Burden, D. W. (2012). "Guide to the disruption of biological samples-2012." *Random Primers* **12**(1): 1-25.

Burgoyne, L. (1996). "Solid Medium and method for DNA storage US Patent 5496562."

Carr, S. M. and O. M. Griffith (1987). "Rapid isolation of animal mitochondrial DNA in a small fixed-angle rotor at ultrahigh speed." *Biochemical Genetics* **25**: 385-390.

Centi, S., S. Laschi and M. Mascini (2009). "Strategies for electrochemical detection in immunochemistry." *Bioanalysis* **1**(7): 1271-1291.

Chacon-Cortes, D. and L. R. Griffiths (2014). "Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives." *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*: 1-9.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Analytical biochemistry* **162**(1): 156-159.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." *Nature protocols* **1**(2): 581-585.

Christel, L., K. Petersen, W. McMillan and M. Northrup (1999). "Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration."

Connolly, M. L. (1983). "Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids." *Science* **221**(4612): 709-713.

Cui, F., M. Rhee, A. Singh and A. Tripathi (2015). "Microfluidic sample preparation for medical diagnostics." *Annual review of biomedical engineering* **17**(1): 267-286.

Demeke, T. and G. R. Jenkins (2010). "Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits." *Analytical and bioanalytical chemistry* **396**: 1977-1990.

Dineva, M. A., L. Mahilum-Tapay and H. Lee (2007). "Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings." *Analyst* **132**(12): 1193-1199.

Doyle, K. (1996). "The source of discovery: protocols and applications guide." Madison: PROMEGA.

Esser, K.-H., W. H. Marx and T. Lisowsky (2006). maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices, Nature Publishing Group US New York.

Franzreb, M., M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobley and O. R. Thomas (2006). "Protein purification using magnetic adsorbent particles." Applied microbiology and biotechnology **70**: 505-516.

Goldberg, S. (2008). "Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization." 2D PAGE: Sample preparation and fractionation: 3-22.

Green, M. and J. Sambrook (2012). "Protocol 12. Isolation of high-molecular-weight DNA using organic solvents to purify DNA." Molecular cloning: a laboratory manual **1**: 44-46.

Handbook, Q. G. D. (2001). "Qiagen: Valencia." Calif, USA.

Harrison, R. G., P. Todd, S. R. Rudge and D. P. Petrides (2015). Bioseparations science and engineering, Oxford University Press, USA.

Hawkins, T. (1998). DNA purification and isolation using magnetic particles, Google Patents.

Jenke, D. (2007). "Evaluation of the chemical compatibility of plastic contact materials and pharmaceutical products; safety considerations related to extractables and leachables." Journal of pharmaceutical sciences **96**(10): 2566-2581.

Kaya, G., C. Dale, I. Maudlin and K. Morgan (2007). "A novel procedure for total nucleic acid extraction from small numbers of *Eimeria* species oocysts." *Turkiye Parazitoloj Derg* **31**(3): 180-183.

Koo, K., P. M. Foegeding and H. E. Swaisgood (1998). "Isolation of RNA and DNA fragments using diatomaceous earth." *Biotechnology techniques* **12**(7): 549-552.

Mauk, M. G., C. Liu, M. Sadik and H. H. Bau (2015). "Microfluidic devices for nucleic acid (NA) isolation, isothermal NA amplification, and real-time detection." *Mobile Health Technologies: Methods and Protocols*: 15-40.

Meng, L. and L. Feldman (2010). A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds, Wiley Online Library.

Merkle, S., K. K. Kleeberg and J. Fritsche (2015). "Recent developments and applications of solid phase microextraction (SPME) in food and environmental analysis—a review." *Chromatography* **2**(3): 293-381.

Moore, R. (1996). of molecular and cellular methods in biology and medicine by PB Kaufman, W Wu, D Kim and LJ Cseke. pp 484. CRC Press, Boca Raton, 1995.£ 65ISBN 0-8493-2511-0, Wiley Online Library.

Mutiu, A. I. and C. J. Brandl (2005). "RNA isolation from yeast using silica matrices." *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* **16**(4): 316.

Nath, K., J. W. Sarosy, J. Hahn and C. J. Di Como (2000). "Effects of ethidium bromide and SYBR® Green I on different

polymerase chain reaction systems." *Journal of biochemical and biophysical methods* **42**(1-2): 15-29.

Nielsen, A. T. and S. Jonsson (2002). "Trace determination of volatile sulfur compounds by solid-phase microextraction and GC-MS." *Analyst* **127**(8): 1045-1049.

Padhye, V., C. York and B. Adam (1997). "United States patent US 5658548." Promega Corporation.

Pawlowski, D. R. and R. J. Karalus (2012). "Electricity-free, sequential nucleic acid and protein isolation." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*(63): 4202.

Phillips, K., N. McCallum and L. Welch (2012). "A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated)." *Forensic Science International: Genetics* **6**(2): 282-285.

Price, C. W., D. C. Leslie and J. P. Landers (2009). "Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip." *Lab on a Chip* **9**(17): 2484-2494.

Robeson, L. M. (2013). "Environmental stress cracking: A review." *Polymer Engineering & Science* **53**(3): 453-467.

Rule, G., M. Chapple and J. Henion (2001). "A 384-well solid-phase extraction for LC/MS/MS determination of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in human urine and plasma." *Analytical chemistry* **73**(3): 439-443.

Sambrook, J. and D. Russel (2000). "Molecular cloning, 3-volume set: a laboratory manual." Cold Spring Harboc Lab Press, New York.

Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johnne (2012). "PCR inhibitors—occurrence, properties and removal." *Journal of applied microbiology* **113**(5): 1014-1026.

Smith, L. and L. A. Burgoyne (2004). "Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper." *BMC ecology* **4**: 1-11.

Tan, S. C. and B. C. Yiap (2009). "DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present." *BioMed Research International* **2009**(1): 574398.

Terry, C. F., N. Harris and H. C. Parkes (2002). "Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction." *Journal of AOAC International* **85**(3): 768-774.

Ullrich, A., J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W. J. Rutter and H. M. Goodman (1977). "Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences." *Science* **196**(4296): 1313-1319.

Vogelstein, B. and D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**(2): 615-619.

Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi (1991). "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material." *Biotechniques* **10**(4): 506-513.

Warkiani, M. E., A. K. P. Tay, B. L. Khoo, X. Xiaofeng, J. Han and C. T. Lim (2015). "Malaria detection using inertial microfluidics." *Lab on a Chip* **15**(4): 1101-1109.

Yang, S. and D. L. DeVoe (2013). "Microfluidic device fabrication by thermoplastic hot-embossing." *Microfluidic Diagnostics: Methods and Protocols*: 115-123.

Żwir-Ferenc, A. and M. Biziuk (2006). "Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications." *Polish Journal of Environmental Studies* **15**(5).

## BÖLÜM VII

### İyonize Radyasyon ve Canlılar Üzerindeki Etki Mekanizması

**Elif DEMİR<sup>1</sup>**

#### İyonize Radyasyon

Radyasyon, doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjiye denir. Radyasyonu en temel anlamda, yol alan enerji olarak da tanımlamak mümkündür (Tubiana & Dutreix, 1990; Kaya, 2002; Khan, 2003). Radyasyon doğal veya yapay kaynaklı olabilir. Doğal radyasyon, doğada kendiliğinden var olan radyasyondur ve tüm canlılar bu radyasyona maruz kalır. Kozmik ışınlar, radon gazı, gama radyasyonu ve radyoizotopların solunum ve sindirim gibi yollarla vücuda alınmasıyla oluşan iç ışınlama, doğal kaynaklara örnektir (Gökharman & ark. 2016). Baş doğal radyasyon kaynağı radon gazıdır. Radon gazı kayalarda ve toprakta bol miktarda bulunur, evlerin temellerindeki açıklık ve çatlaklardan içeri girerek insan vücuduna zarar verir (Hacıosmanoğlu, 2017). Radon gazının sigaradan sonraki en önemli akciğer kanseri etkeni olduğu tespit

---

<sup>1</sup> Doç. Dr., Harran Üniversitesi, Vanşehir Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, Şanlıurfa/Türkiye, Orcid: 0000-0003-4545-5175, elifdemir@harran.edu.tr

edilmiştir (Akkoçlu & Öztürk, 1999). Bir diğer doğal radyasyon kaynağı olan kozmik ışınlar ise yüksek enerjiye sahiptir. Bunların büyük kısmı atmosfer tarafından tutulur ve böylece yeryüzüne yönelik zararı önlenir. Deniz seviyesinden yüksekliğe göre, maruz kalınan kozmik ışınlarla bağlı radyasyon miktarı değişiklik gösterir. Deniz seviyesinden yükseğe çıkıldıkça radyasyona maruziyet artar. Bu durumdan en çok meslekleri nedeniyle pilotlar etkilenmektedir (Hacıosmanoğlu, 2017). Yapay radyasyon kaynakları: Doğada kendiliğinden var olmayan, teknolojik gelişmelerin de etkisiyle insan faaliyetleri sonucunda oluşan radyasyondur (Coşkun, 2011). Tıbbi uygulamalar, nükleer santraller, nükleer silah denemeleri ve televizyon, bilgisayar, radyo, duman dedektörleri gibi birçok ürün, yapay radyasyon kaynağıdır (Bozbıyık & ark. 2011). Bunlar arasında en büyük pay tıbbi uygulamalara aittir.

Radyasyon, iyonize ve iyonize olmayan olarak iki gruba ayrılır. İyonize olmayan radyasyon, kütsüz elektromanyetik dalga şeklinde olan radyasyondur. Radyo dalgaları, mikrodalga, radar, görünür ışık, mor ötesi ışık, infrared, ultraviyole ışınlarından oluşur (Uzal & Çaloğlu, 2002; Mazon & Lacoche, 1995). Atom veya moleküllerden elektron koparabilecek kadar güçlü enerji seviyesine sahip radyasyona iyonize radyasyon denir (Smith & Stather, 2006; Mercantepe, 2008). İyonize radyasyon bir ortama veya biyolojik sisteme girdiğinde ortamdaki atomlara çarparak elektron koparırlar veya çarptıkları atomların elektronlarını koparmasalar bile daha yüksek enerji seviyesine atlatırlar (Kaya, 2002; Mercantepe, 2002). Bu iki olay, radyasyon enerjisinin ortam tarafından absorblendiğini gösterir.

## **İyonize Radyasyon Tipleri**

### **2.1. Elektromanyetik radyasyon**

Elektromanyetik radyasyon uzayda dalga hareketi ile yayılmakta ve foton adı verilen enerji paketçiklerinden oluşurlar. X ışınları ve gama ( $\gamma$ ) ışınlarından oluşur (Tubiana & Dutreix, 1990; Mercantepe, 2008).

### **2.1.1. X ışınları**

Atom çekirdeğinden yayılmayan elektromanyetik dalgalardır. X ışınları maddeye giren elektron maddenin atom nükleusları tarafından frenlenerek bir enerji açığa çıkmasıyla oluşur.

### **2.1.2. Gama ışınları ( $\gamma$ )**

$\gamma$  ışınları elektromagnetik dalgalardır. Radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçerken açığa çıkan enerji fazlasının nükleustan dışarı atılmasıyla oluşur ve atom çekirdeğindeki fotonlar tarafından yayılmaktadır.  $\gamma$  radyasyon oldukça enerjik olup etkileşim olmaksızın insan vücudundan belirli bir kısmı geçebilecek kadar penetrandır. Fotonların yaklaşık %75'i hedef dokunun atomlarıyla etkileşime geçerek enerji kaybederler.

### **Parçacık tip radyasyon**

Alfa ( $\alpha$ ) parçacığı, beta ( $\beta$ ) parçacığı, nötron, proton, ağır iyonlardan oluşur (Tubiana & Dutreix, 1990; Mazeron & Lacoche, 1995).

## **İyonize Radyasyonun Canlılar Üzerindeki Etkileri**

### **3.1. Moleküler/Hücresel düzeyde etki**

Direkt olarak DNA zincirinde kırılmalar oluşturur ya da hücre içindeki moleküllerle etkileşerek oksijen radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu oksijen radikalleri DNA bileşenleri ile etkileşerek bozulmalara yol açar. Her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır. Sık bölünen ve andiferensiye olan hücrelerin duyarlılığı fazla iken, bölünmeyen ve üst diferansiyasyon gösteren hücrelerin duyarlılığı daha azdır (Kaya, 2002; Ayala & ark., 2007; Fu & ark., 1998).

### **3.2. Doku/Sistem düzeyinde etki**

Somatik ve genetik olmak üzere iki şekilde incelenebilir.

#### **3.2.1. Somatik etkiler**

İyonize radyasyonların somatik etkileri radyasyona maruz kalan kişinin ömür süresi içinde ortaya çıkan etkilerdir. Somatik

etkilerin cinsi ve önemi birçok faktörlere bağlı olup bunlar içinde en önemlileri:

- Maruz kalınan toplam radyasyon dozu.
- Radyasyon dozunun alındığı zaman süresi
- Radyasyonlara maruz kalan vücut kısmı ve alanıdır.

### **3.2.2. Genetik etkiler**

Bu tip etki, organizmanın üreme hücrelerinde bulunan kromozomların radyasyon maruziyeti sonucu hasarlanması ile oluşur. Böylece hasar bireyde değil çocuklarında ortaya çıkar ve sonraki kuşaklara da aktarılabilir. Bu etkiler sitokastik tipte etkilerdir (Güenalp, 2003; Kelle, 2008; Yaren, 2005). Radyasyonlar kromozom mutasyonları da meydana getirir. Kromozomlar genlerden meydana gelen zincirler olup, radyasyon etkisiyle bu zincir bir veya daha fazla yerinden kırılabilir. Kırılan kromozom parçaları, büyük gen gruplarının yer değiştirmesine sebep olacak bir şekilde yeniden birleşebilirler (Halliwell, 1994; Vallyathan & Shi, 1997; Mercantepe, 2008).

### **4. İyonize Radyasyonun Hücredeki Etki Mekanizması**

İyonize radyasyonlardan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve nötron iyonize radyasyonları biyolojik sistemlerle etkileşime girer (Kaya, 2002; Fu & ark., 1998; Güenalp, 2003; Yaren, 2005). İyonize radyasyonların canlı maddede oluşturduğu iyonlaşma ve uyarılma olaylarının yol açtığı fizikokimyasal değişiklikler, bir saniyeden daha kısa sürede olup biter. Oysa bu fizikokimyasal değişikliklerin doğurduğu biyolojik sonuçların ortaya çıkabilmesi zaman alır (Özgen, 2010; Mercantepe, 2008).

İyonize radyasyonun biyolojik bir sistemde yol açtığı olumsuz etki direkt ve indirekt etki olarak ikiye ayrılır. Eğer radyasyon enerjisi DNA veya bir enzim molekülü tarafından absorblanıyorsa bu moleküllerde oluşturduğu olumsuz etkilere radyasyonun direkt etkisi denir. Moleküldeki elektronu uzaklaştırmak için yeterli miktarda enerji absorbe edilmişse bağ kırıkları oluşur. Tek veya çift bağ kırığı olmak üzere iki tür bağ kırığı

oluşabilir. Tek bağ kırıkları genellikle hücre tarafından tamir edilebilir, ancak çift bağ kırıkları çoğunlukla hücrenin ölümüne neden olur. Eğer radyasyon enerjisi biyolojik sistemdeki ortam molekülleri tarafından direkt olarak absorblanmayıp, içinde bulunduğu ortamın molekülleri tarafından absorblanarak değişikliğe uğratılıyorsa bu etkiye radyasyonun indirekt etkisi denir. İndirek etkide radyasyona bağlı enerji transferi sonucu serbest radikallerin oluşması ve bu serbest radikallerin DNA yı etkilemesi sonucu molekülün hasarı meydana gelir. Bu etki büyük ihtimalle su molekülleri üzerinden olmaktadır (Dynlacht & ark., 2008; Halperin & ark., 2008; Beyzadeoğlu, 2010.).

Radyasyon başlıca üç kademedede etki gösterir (Mercantepe, 2008).

- Fiziksel Kademe
- Kimyasal Kademe
- Biyolojik Kademe

#### **4.1. Fiziksel kademe**

İyonize radyasyon ile canlı dokularını oluşturan atom ve moleküller arasındaki ilk etkileşimdir. Radyasyon enerjisinin maddeye aktarılması sonucunda maddenin moleküllerinde iyonlaşma ya da uyarılma meydana gelir. İyonlaşma sonucunda oluşan serbest elektronlar diğer komşu atomlarda da iyonlaşmaya yol açar ve bu şekilde zincirleme bir reaksiyon meydana gelir. Ancak bu ilk reaksiyonlar ile ortaya çıkan ürünler son derece kararsızdırlar. Kısa sürede sekonder reaksiyonların oluşmasına yol açarlar.

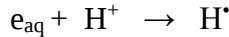
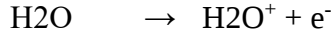
#### **4.2. Kimyasal kademe**

Sekonder reaksiyonların meydana geldiği kademedir. Hasar gören atom ve moleküller reaksiyona girmesi sonucu serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikaller çok reaktif olup, hem kendileri hem de ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyona girerler (Mazeron & Lacoche, 1995; Tubiana & Dutreix, 1990).

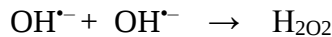
### 4.3. Biyolojik kademe

Bu kademedede meydana gelen olaylar, radyasyonun biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına yol açar. Bu kademe birtakım hasarlara yol açan enzim reaksiyonlarıyla başlar. DNA molekülünde hasarlar oluşur. Oluşan bu hasarların bir kısmı onarılabılır hasarlar olup, bir kısımda onarılamayan hasarları oluşur. Bu durum hücrenin ölümüne yol açar. Işınlanmış hücrelerde esas hedef DNA'dır. Hücre, özellikle bölünme sırasında radyasyona en duyarlı evrededir (Bulus, 2008; Kaya, 2002; Günalp, 2003; Yaren, 2005). Aynı zamanda radyasyon genetik bozukluklar ve kanser gibi etkiler de oluşturmaktadır (Mazeron & Lacoche, 1995; Mercantepe, 2008).

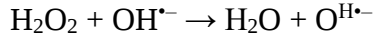
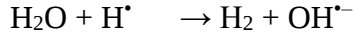
Canlıların vücutlarının %70-90'ını su oluşturduğundan, en çok su molekülleri iyonize radyasyonda etkilenir. Radyasyon etkisi ile su molekülleri uyarılırlar, pozitif yüklü bir iyon ve bir serbest elektron oluşur (Güenalp, 2003; Kelle, 2008). Kısa süre içinde serbest elektron birçok sekonder iyonlaşma olayına yol açarak enerjisini kaybeder ve ortamda su molekülleri tarafından sarılarak hidrat elektron haline geçer. Pozitif yüklü iyondan ise, hidroksil ( $\text{OH}^{\bullet-}$ ) ve hidrojen radikali ( $\text{H}^{\bullet}$ ) ortaya çıkar.



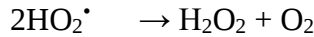
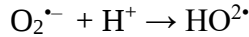
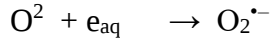
$\text{OH}^{\bullet-}$  ve  $\text{H}^{\bullet}$  radikalleri sadece suyun iyonlaşması ile gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda oluşmazlar. Su moleküllerinin uyarılması ve uyarılmış molekülün ayrılması ile de meydana gelebilirler.  $\text{OH}^{\bullet-}$  ve  $\text{H}^{\bullet}$  radikalleri çok reaktiftirler. Aralarında radikal-radikal reaksiyonları meydana gelir ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) molekülleri oluşur.



Serbest radikaller bu reaksiyonların dışında diğer su molekülleri ile de reaksiyona girebilecekleri gibi, kendi aralarındaki reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan ürünlerle de tekrar reaksiyona girebilirler.



Radyasyonun canlıdaki etkinlik derecesi, ışınlama sırasında oksijenin varlığı ile artmaktadır. Serbest radikaller oksijen molekülleri ile reaksiyona girerek aşağıda gösterildiği gibi  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşur (Serhatlıoğlu & ark., 2004; Mazeron & Lacoche, 1995).



## KAYNAKÇA

Tubiana M, Dutreix J. Introduction to radiobiology. Taylor&Francis, 1990.

Kaya A. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. Dicle Tıp Dergisi (Journal Of Medical School) 2002;29:3.

Khan, Faiz M. Physics of Radiation Therapy, The 3<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2003;3-4. 16.

Uzal C, Çaloğlu M. Kanser etyolojisinde iyonizan radyasyonun yeri. Trak Üniv Tıp Fak Derg 2002;19:177-82. 32.

Mazeron J, Locoche T, Maugis A. Kanserde ışınlama teknikleri. Uzal C. Öncü Limited, Ankara, 1995;7-60.

Mercantepe T. Gamma radyasyonun neden olduğu mide mukozası hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi. 2008, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 66 sayfa, Edirne.

Smith H and Stather J, 2 Biological effects of ionising radiation. In: Kaul A, Becker D (eds) Landolt-Börnstein- Group VIII Advanced Materials and Technologies, Radiological Protection. Springer, Berlin 2006

Ayala M, Strid H, Jacobsson U, Söderberg G. p53 expression and apoptosis in the lens after ultraviolet radiation exposure. Invest Ophthalmol Vis. Sci. 2007;48:4187–419.

Günalp B. İyonize Radyasyonun biyolojik etkileri. Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, 2003.

Kelle İ. Radyoprotektif etkili ajanlar. Dicle Tıp Derg 2008;35(1):69-76.

Yaren H, Karayılanoglu T. Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 2005;4(4):199-205.

Fu S, Dean R, Southan M, and Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. The Journal Of Biological Chemistry 1998;273: 28603-28609.

Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. Nutrition Reviews 1994;52(8):253-265

Vallyathan V, Shi X. The Role of Oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. Environ Health Perspect 1997;105: 65-177

Özgen Çimen S. İyonizan radyasyonla oluşturulan deneysel katarakt modelinde curcuminin rolü. 2010, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 77 sayfa, Edirne, (Prof. Dr. Dikmen Dökmeci).

Dynlacht JR, Valluri S, Lopez J, Greer F, Desrosiers C, Caperell-Grant A, Mendonca MS and Bigsby RM. Estrogen protects against radiation-induced cataractogenesis. Radiat Res 2008;170(6):758-64.

Edward C. Halperin, Carlos A. Perez, Luther W. Brady. Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008;13.

Beyzadeoğlu M. Basic Radiation Oncology, Springer-Verlag Berlin Heidenberg. 2010.

Bolus NE. Review of common occupational hazards and safety concerns for nuclear medicine technologists. J Nucl Med Technol 2008;36:11-17.

Serhatlıoğlu S, Oğur E, Ozan AT, Gürsu F, Gödekmerdan A and Ayar A. İyonizan radyasyonun radyoloji çalışanlarının bağışıklık düzeyleri ve kan biyokimyası üzerine etkileri. Tanısal ve girişimsel radyoloji. 2004;10(2):97-102.

Gökharman FD, Aydın S, Koşar PN. Radyasyon güvenliğinde mesleki olarak bilmemiz gerekenler. SDÜ Sağlık Bilimleri Derg. 2016;7(2):35–40.

Hacıosmanoğlu T. Doğal ve yapay radyasyon kaynakları, kişisel doza katkıları. Nucl Med Semin. 2017;3:166–71.

Akkoçlu A, Öztürk C. Akciğer Kanseri, Multidisipliner Yaklaşım. Toraks Kitapları, no I. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1999:238

Coşkun Ö. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. Int J Tech Sci. 2011;1(2):13–7.

Bozbıyık A, Özdemir Ç, Hancı H. Radyasyon yaralanmaları ve korunma yöntemleri. Sürekli Tıp Eğitimi Derg. 2002;11(7):272–4.

