

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ANTRASİKLİN BAZLI KEMOTERAPİ ALAN MEME KANSERİ  
HASTALARINDA KARDİYOTOKSİSİTE BELİRTECİ OLARAK  
PLAZMA MİKRORNA34A DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Eda Çalışkan Yıldırım**  
**UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA**  
**2018**

**T.C.**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ANTRASİKLİN BAZLI KEMOTERAPİ ALAN MEME KANSERİ  
HASTALARINDA KARDİYOTOKSİSİTE BELİRTECİ OLARAK  
PLAZMA MİKRORNA34A DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Eda Çalışkan Yıldırım**

**UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA**

**2018**

**Tez danışmanı: Prof. Dr. Alev Türker**

## TEŞEKKÜR

*Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, bu tezin oluşma aşamasından başlayarak her basamağında yardımına başvurduğum, desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Alev Türker'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.*

*Tezin deneysel sürecini yürüten, sonsuz sabır ve hoşgörülerini ile umutsuzluğa kapılmama izin vermeyen, bilimsel anlamda ufkumu açan Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Yrd. Doç.Dr. Gürcan Günaydın ve doktora öğrencisi Uzman biyolog Emre Gedik'e teşekkürü bir borç bilirim.*

*Multidisipliner çalışmanın zorluğunu dostluğu ile aşmamı sağlayan, yoğun temposunda bana zaman ayıran Kardiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr.Cem Çöteli'ye teşekkürlerimi sunarım.*

*Bir bireyi olmaktan gurur duyduğum Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda asistanlık sürecim boyunca temasta bulunduğum tüm hocalarıma, asistan arkadaşlarıma ve sağlık personeline teşekkür ederim.*

*Ve bu zorlu süreçte bana her zaman destek olan eşim Dr. Tuğrul Yıldırım'a, varlığı ile beni güçlü kılan canım oğluma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.*

Destekleyen kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi( BAP Proje No:THD-2017-14885)

## ÖZET

**Çalışkan Yıldırım E. Antrasiklin bazlı kemoterapi alan meme kanseri hastalarında kardiyotoksisite belirteci olarak plazma mikroRNA-34a düzeylerinin değerlendirilmesi.**

**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018.**

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık görülen kanserdir. Erken teşhis ve etkili tedavi alanındaki gelişmeler meme kanseri tanısı konan hastaların yaşam sürelerinde belirgin bir uzama sağlamıştır. Meme kanseri kür oranların artması ile birlikte bu popülasyonda kardiyovasküler hastalıklarda artış saptanmıştır. Kardiyovasküler morbidite ve mortalitenin meme kanserinden kurtulanlarda yüksek olması, onkologların kemoterapilerin uzun dönem yan etkilerine olan ilgisini arttırmıştır. Meme kanseri tedavisinin pek çok aşamasında oldukça sık kullanılan antrasiklinlerin kardiyotoksik etkileri iyi bilinmektedir. Antrasiklin ilişkili kardiyotoksisite sıklıkla tedaviden 10-15 yıl sonra geç dönemde görülmektedir. Antrasiklinlerin kardiyak hasar yapıcı etkileri iyi bilinmesine rağmen erken dönemde bunu tespit edebilecek bir biyobelirteç mevcut değildir. Bu alanda yapılan hayvan modellerinde bazı mikroRNA'ların kardiyotoksisite belirteci olabileceği yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın amacı da, antrasiklin bazlı kemoterapi alan meme kanseri hastalarında erken kardiyak hasar ile mikroRNA34a(miR34a) düzeyleri arasında ilişkiyi değerlendirmektir. Çalışmaya ilk kez antrasiklin bazlı kemoterapi alan 41 meme kanseri hastası dahil edilmiştir. Kemoterapi almadan önce ve aldıktan sonra hastaların kardiyak troponin-I, miR34a ve prekürsörü pre-miR34a düzeylerine bakıldı ,strain analizini de içeren ekokardiyografik değerlendirmeleri yapıldı. Hastaların antrasiklin tedavisi sonrası, tedavi öncesine göre troponin-I, miR34a ve pre-miR34a düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olmuştur. Ortalama miR34a ve pre-miR34a artışı sırasıyla 2.5 ve 2.3 kattır. Hastaların ekokardiyografik analizlerinde antrasiklin tedavisi sonrası global longitudinal strain (GLS) ölçümlerinde bazale göre anlamlı derecede azalma kaydedilmiştir. GLS değişimine göre kardiyak hasar olduğu tahmin edilen hastalarda miR34a/ pre-mir34a düzeylerinde artış saptanmış fakat bu artış istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Mir34a düzeylerinden ziyade miR34a/

pre-miR34a düzeylerinin artması doksorubisin tedavisi ile miR34a biyogenezi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmüştür. Bu çalışma miR34a ve prekürsörü pre-miR34a'nın antrasikline bağlı kardiyotoksisite belirteci olarak birlikte değerlendirildiği ilk çalışmadır. Mir34a'nın kardiyotoksisite gelişimindeki rolünün anlaşılabilmesi ve bir biyobelirteç olabilmesi için uzun dönem takipli, daha geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** meme kanseri, antrasiklin, kardiyotoksisite, biyomarker, mikroRNA

## ABSTRACT

**Caliskan Yildirim E. Assessment of plasma microRNA-34a levels as a cardiotoxicity biomarker in breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy .Hacettepe University Faculty Of Medicine Department Of Internal Medicine, Thesis Of Specialization in Medicine, Ankara, 2018.** Breast cancer is the most common cancer in women all over the world. Advances in early diagnosis and effective treatment have resulted in a significant prolongation of the life expectancy of patients with breast cancer. An increase in cardiovascular disease was detected in this population with an increase in breast cancer survivors. The high rate of cardiovascular morbidity and mortality in breast cancer survivors has increased the interest of oncologists to long-term side effects of chemotherapies. Anthracyclines, which are frequently used in many stages of breast cancer treatment, have well known side effects. Anthracycline-induced cardiotoxicity is often seen lately, 10 to 15 years after treatment. Although anthracyclines are well known for their cardiac damaging effects, there is no biomarker currently available to detect it early on. Some microRNAs have been found to be cardiotoxicity markers in animal studies. The purpose of this study is to assess whether plasma levels of microRNA34a(miR34a) can predict cardiotoxicity in breast cancer patients who will receive anthracycline-based chemotherapy. Forty-one breast cancer patients who will receive anthracycline-based chemotherapy for the first time are included in the study. Before and after taking chemotherapy, patients were examined for cardiac troponin-I, miR34a, and precursor miR34a levels, and echocardiographic strain analyzes were performed. There was a statistically significant increase in troponin-I, miR34a and pre-miR34a levels after treatment with anthracyclines. The mean increase in miR34a and pre-miR34a was 2.5 and 2.3 fold, respectively. Echocardiographic analysis of patients showed a significant decrease in global longitudinal strain (GLS) measurements compared to baseline after anthracycline treatment. An increase in the levels of miR34a / pre-miR34a was detected in patients who were estimated to have cardiac damage according to GLS replacement, but this increase was not statistically significant. The increased levels of miR34a / premiR34a levels, not miR34a, suggests a relationship between doxorubicin treatment and miR34a biogenesis. This is the first study in which miR34a and precursor pre-miR34a were evaluated together as anthracyclin-induced cardiotoxicity markers. Longer-term and larger-scale studies are needed to understand the role of miR34a in the development of cardiotoxicity and to be a biomarker.

**Key words:** breast cancer, anthracycline, cardiotoxicity, biomarker, microRNA

Supported by Hacettepe University Scientific Research Committee(SRC Project  
No:THD-2017-14885)

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.2.Meme Kanseri Tedavisinde Antrasiklinlerin Yeri	3
2.3.Antrasiklinler	5
2.4.Antrasiklin ile indüklenen kardiyotoksisite	6
2.5.Antrasikline bağlı kardiyotoksisite gelişiminin risk faktörler	7
2.6.Antrasiklin alan hastanın kardiyotoksisite açısından takibi	9
2.6.1.Ekokardiyografi	9
2.6.2.Kardiyak biyobelirteçler	11
2.7.Antrasikline bağlı kardiyotoksisitenin önlenmesi ve tedavisi	12
2.7.1.Antrasiklin türevleri ve infüzyon protokolü	12
2.7.2.Deksrazoksan	13
2.6.3.Beta bloker veya ACEi / ARB ile primer koruma	13
2.6.4.Kalp yetmezliği gelişen veya asemptomatik SVEF’unda azalma olanlarda tedavi	14
2.7.MikroRNA	14
2.7.1.MiRNA34a	18
2.7.2.MiRNA34a ve kalp üzerine etkileri	19
2.7.3.MiRNA34a ve meme kanseri	19



3.GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Çalışmanın tasarımı	20
3.2.Katılımcılar	20
3.3.Verilerin toplanması	21
3.4.Ekokardiyografi verilerinin analizi	22
3.4.1. Nokta Takip (“Speckle Tracking”) Yöntemi ile Strain Analizi	23
3.5.Troponin –I düzeylerinin ölçümü	23
3.6.MiR-34a ve pre-miR-34a düzeylerinin çalışılması	24
3.6.1. RNA izolasyonu	24
3.6.2. cDNA sentezi	24
3.6.3.qPCR Analizi	25
3.7.İstatiksel analiz	25
4.BULGULAR	
4.1.Meme kanseri hastalarının demografik ve tümöre ait özellikleri	27
4.2. Meme kanseri hastalarının bazal klinik, patolojik ve tedavi özellikleri	28
4.3. Tedavi sonrası değişim gösteren ekokardiyografi parametreleri	30
4.4. Tedavi sonrası matür ve immatür miR34a ekspresyon değişimi	32
4.5. Miyokardiyal deformite açısından grupların karşılaştırılması	33
4.6. Adriamisin dozu ile EKO parametreleri ve miR34 arasındaki ilişki	34
4.7.Tümör özellikleri ile miR34a arasındaki ilişki	34
5.TARTIŞMA	36
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	41
7.KAYNAKLAR	42
8.EKLER	
8.1.Araştırma için alınan Etik Kurul onayı	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devleti
AC	Adriamisin( doksorubisin)-siklofosfamid
ACEi	Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü
ARB	Angiotensin reseptörü blokörü
CAF	Siklofosfamid-adriamisin-flourourasil
CMF	Siklofosfamid- metotreksat- florourasil
cTnI	Kardiyak troponin I
DRZ	Deksrazoksan
EBCTCG	Erken meme kanseri çalışma grubu
EF	Ejeksiyon fraksiyonu
EKG	Elektrokardiyogram
EKO	Ekokardiyografi
ER	Östrojen reseptörü
ESC	Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti
ESMO	Avrupa Medikal Onkoloji Cemiyeti
GLS	Global longitudinal strain
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
KT	Kemoterapi
miRNA	MikroRNA
NAKT	Neoadjuvan kemoterapi
NSABP	Ulusal cerrahi adjuvan meme projesi
pCR	Patolojik tam yanıt
PR	Progesteron reseptörü
SOR	Serbest oksijen radikalleri

SVEF	Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu
TAC	Taxol-adriamisin-siklofosfamid
TAPSE hareketi	Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion - Triküspit anüler düzlemin sistolik hareketi
TC	Taxol-siklofosfamid
TOP2	Topoizomeraz II

## ŞEKİLLER

2.1.Antrasiklinle indüklenen kardiyomiyosit hasarının mekanizması	7
2.2.MikroRNA Biyogenezi	15
3.1.Livak modeline göre $\Delta\Delta Ct$ formülü	23
3.2.PCR sonuç grafisi örneği ( 2-4-5 nolu hastalara ait)	24
4.1.MiR34a ve pre-miR34a değişimi	28
4.2.Doksorubisin tedavisi sonrası GLS değişimi	29
4.3. Kümülatif adriamisin dozu( mg/ m <sup>2</sup> )-TAPSE korelasyon eğrisi	31

**TABLÖLAR**

4.1 Demografik özellikler	25
4.2 Tümör özellikleri	26
4.3 Tedavi ile değişim gösteren kardiyak parametreler	27
4.4 GLS'de % 10 değişim	30
4.5 GLS'de % 13 değişim	30
4.6 GLS'de % 15 değişim	30
4.7 Ki67 indeksi ve lenf nodu durumu ile miR34a arasındaki ilişki	32
4.8 Tedavi modalitesi ile miR34a düzeyleri arasındaki ilişki	32

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri insidansı kadınlar arasında birinci, genel sıralamada ise ikinci sırada yer almaktadır. Tüm yeni kanser vakalarının %25'ini oluşturmaktadır[1]. Son yıllarda etkili tedavi yöntemleri ile sağ kalım oranlarının artması, tedavilere bağlı oluşabilecek yan etkilerin erken tanınması ve mümkünse tedavi edilmesi gerekliliğini doğurmuştur[2]. Meme kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılan antrasiklin bazlı kemoterapi (KT) rejimlerinin en önemli yan etkisi kardiyotoksisitedir. Bu sebeple, gelişebilecek ventriküler komplikasyonları önlemek için, doksorubisine sekonder gelişen toksisitenin erken tanınması önem arz etmektedir[3].

Antrasiklinle ilişkili kardiyotoksisite sıklıkla tedaviden 10-15 yıl sonra geç dönemde ortaya çıkmakta ve semptomatik hale geldikten sonra genellikle geri dönüşümsüz olmaktadır. Aşık kalp yetmezliğinin yanı sıra, asemptomatik kardiyak disfonksiyonunda %18'e varan oranda bulunması antrasiklin ile ilişkili kardiyotoksisitenin erken tanınması oldukça önemlidir[4]. Fakat henüz elimizde erken kardiyotoksisiteyi saptayabilecek bir biyobelirteç mevcut değildir.

22-26 nukleotidden oluşan, kodlanmayan RNA'lar olarak bilinen mikroRNA'lar, pek çok gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı için 2000'li yılların başından beri bilim dünyasının popüler konularından biri olmuştur[5]. Binlerce insan mikroRNA'sından biri olan mikroRNA34a da akut miyokard infarktüsü sonrası kalp dokusunda upregüle olduğunun keşfedilmesi üzerine bir çok temel bilim araştırmasına konu olmuştur[6]. Hayvan modellerinde, miR34a'nın doksorubisin maruziyeti sonrası doku ve plazma düzeylerinin artması, hem bir biyobelirteç hem de bir tedavi hedefi olabileceği yönündeki düşünceleri güçlendirdi[7, 8].

Bu proje, plazma miR-34a düzeyinin erken kardiyotoksisite belirteci olarak prekürsörü olan pre-miR34a ve strain analizleri ile birlikte değerlendirileceği ilk insan çalışması olma özelliği taşımaktadır. Çalışma kapsamına, meme kanseri tanısı almış ilk kez antrasiklin bazlı KT alacak olan hastalar dahil edilecektir. Bu hastaların KT öncesinde ve sonrasında plazma miR-34a, pre-miR34a, troponin-I düzeyleri ve myokardiyal strain analizleri içeren ekokardiyografi bulguları kaydedilecektir.

Bu çalışmada, antrasiklin içeren KT öncesi ve sonrası miR-34a ve pre-miR34a düzeyleri ile troponin-I ve myokardiyal strain ekokardiyografi bulguları arasında korelasyon olup olmadığının gösterilmesi hedeflenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, kolon ve akciğer kanseri ile birlikte tüm dünyada en yaygın görülen üç kanserden biridir ve kadınlarda en sık görülen malignitedir. Her 8 kadından birinin hayatı süresince meme kanseri olacağı öngörülmektedir. 2012’de yaklaşık 1,7 milyon kadının meme kanseri tanısı aldığı ve 500.000 kadının bu sebeple öldüğü kaydedilmiştir. Meme kanserine bağlı mortalite, erken teşhis ve etkili sistemik tedaviler sayesinde giderek azalmaktadır. [1, 9] Özellikle erken evre meme kanseri hastalarının sağ kalım oranları oldukça yüksektir; beş yıllık sağ kalım %89, 10 yıllık sağ kalım %83 ve 15 yıllık sağ kalım %78'dir. [10]

Ülkemizde kanser tanısı konulan her 4 kadından 1’i meme kanseridir. Meme kanseri tanısı alan kadınların %44,5’inin 50-69 yaş arasında olduğu, %40,4’ünün ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun veritabanına göre, meme kanseri vakalarının %11,1’i evre 4’tür. [11]

### 2.2. Meme Kanseri Tedavisinde Antrasiklinlerin Yeri

Meme kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılan kemoterapi rejimlerinin başında antrasiklin bazlı kemoterapiler gelmektedir[3]. Günümüzde antrasiklin bazlı kemoterapiler, hem adjuvan ve neoadjuvan tedavi protokollerinde, hem de metastatik meme kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Erken Meme Kanseri Çalışma Grubunun(EBCTCG) 1998 yılında yayınladığı sistemik analiz sonucu antrasiklin içeren kemoterapi rejimlerinin, antrasiklin içermeyen protokollere üstün olduğu gösterilmiştir. Antrasiklin içeren rejimlerin, nüks riskini ve mortaliteyi anlamlı olarak azalttığını ortaya koyan bu sistemik analizden sonra antrasiklinler , meme kanserinin adjuvan tedavisinin bel kemiğini oluşturmaya başlamıştır[12, 13]. EBCTCG’nin adjuvan tedaviler ile ilişkili bu ilk raporunda, ilaç dozları dikkate alınmadığı ve taksan grubu ilaçların gözden geçirilmediği bilinmektedir. Bunun üzerine aynı grup 2012’de, 100.000’den fazla hastayı içeren erken meme kanserinde farklı kemoterapi rejimlerinin uzun dönem sonuçlarını



mukayese eden bir meta-analiz daha yayınlamış ve antrasiklinlerin etkinliğini bir kez daha kanıtlamıştır. Ortalama 10 yıllık takipten sonra; antrasiklin bazlı kemoterapi(KT) alanlar ile KT-almayanlar karşılaştırıldığında, hastalık rekürrens riski açısından %8, meme kanseri spesifik mortalitede % 6.5 ve genel mortalitede % 5 oranında mutlak bir azalma olduğu bildirilmiştir. 4 siklus standart doz doksorubisin–siklofosamid (AC) ile siklofosamid-metotreksat–florourasil (CMF) şemalarının benzer etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bazı bireysel çalışmalar kümülatif antrasiklin doz artışı ile tedavi aktivitesinde iyileşme arasında korelasyon olmadığını iddia etse de, bu meta-analizde yüksek antrasiklin dozu ile olan AC şemasının belirgin olarak daha iyi sonuçları olduğu ortaya koyulmuştur[14-16]. Taksanların, meme kanseri adjuvan tedavisindeki etkinliğine dair artan kanıtlar ile birlikte kullanımı da artmıştır. Bu durum, antrasikline bağlı toksik etkilerle ilgili endişeleri su yüzüne çıkarmış ve taksanların - en azından bazı hasta gruplarında - antrasiklin kullanımının önüne geçip geçmeyeceği tartışmasını gündeme getirmiştir[17]. ABD Onkoloji Araştırması 9735 faz 3 çalışması, evre I-III HER2 negatif meme kanseri olan 1016 hasta üzerinde gerçekleştirilmiş olup, katılımcılar AC ve TC (dosetaksel- siklofosamid) kollarına ayrılmıştır. Ortalama 8 yıllık takipten sonra, TC tedavisi alan grubun hastalısız sağ kalım ve genel sağ kalımının anlamlı olarak daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada az sayıda yüksek risk taşıyan hastanın olması ve çalışmanın antrasiklin içermeyen tedavinin üstünlüğünü göstermek üzere tasarlanmamış olması nedeniyle, çalışmanın sonucu sadece düşük riskli hastalarda antrasiklin kullanımını sınırlandırmayı desteklemektedir[18]. Elimizdeki veriler ışığında, antrasiklin içermeyen rejimler sadece düşük nüks riski olan hastalar ve antrasiklin kullanımının kontraendike olduğu hastalar için düşünülmelidir. Özellikle HER2 negatif hastalar için antrasiklin içermeyen rejimlerle ilgili daha fazla kanıt ihtiyaç bulunmaktadır. Yüksek nüks riskine sahip hastalar için günümüzdeki en iyi tedavi yaklaşımı antrasikline taksan eklenmesi ile oluşan rejimlerdir[17].

Lokal ileri ve inoperable meme kanseri tedavisinde neoadjuvan kemoterapi(NAKT) rejimleri, 30 yıldan uzun süredir uygulanmaktadır. 1978'de doksorubisin ve vinkristin ile neoadjuvan olarak tedavi edilen 110 inoperable meme kanseri hastasının değerlendirildiği bir çalışmada, hastaların %16'sında tam yanıt, % 55'inde kısmi yanıt elde edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın olumlu sonuçları, neoadjuvan KT uygulamaları ile ilgili bir çok çalışmaya ışık tutmuştur[19]. Genel olarak, antrasiklin ya da taksan içeren rejimlerle olan neoadjuvan tedavi, birden fazla çalışmada, meme koruyucu cerrahiye gidebilen kadın sayısının artmasına neden

olmuştur. Çalışmalar aynı zamanda neoadjuvan tedavinin, özellikle taksanlarla birlikte, kullanılmasının klinik yanıt ile birlikte patolojik tam yanıt (pCR) da oluşturabileceğini göstermiştir[13, 20]. Ulusal Cerrahi Adjuvan Meme Projesi(NSABP B-27 )çalışmasında, neoadjuvan 4 siklus AC KT'si sonrası dozetaksel ile tedaviye devam eden grupta patolojik tam yanıt (pCR) oranları%26.1 iken yalnız AC için bu oran % 13.7 tespit edilmiş ve meme koruyucu operasyon oranlarının arttığı gösterilmiştir[21].

1970'lerde antrasiklinlerin kullanılmaya başlanması ile ilerlemiş meme kanseri tedavisinde önemli bir gelişme kaydedilmiştir. Metastatik meme kanseri hastalarında, tek ajan doksorubisin ile (her 3 haftada 25-75 mg / m<sup>2</sup>) %25 ile %60 arasında değişen yanıt oranları elde edilmiştir[22]. Doksorubisin içeren rejimler, daha önce antrasiklin içermeyen kemoterapi ile tedavi edilen metastatik meme kanseri hastaları için başlangıçta ilk tercih olmuştur. Doksorubisin içeren kombinasyonlar ile yanıt oranları %50 ile %80 , yanıt süreleri 8 ile 15 ay arasında değişmektedir. Doksorubisin-alkile edici ajan kombinasyonları ile ortalama sağ kalım 17 ile 25 ay arasındadır. Doksorubisin içeren rejimler, metastatik hastalarda doksorubisin içermeyen kombinasyonlardan daha etkili olmakla birlikte, yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlanmaktadır[13].

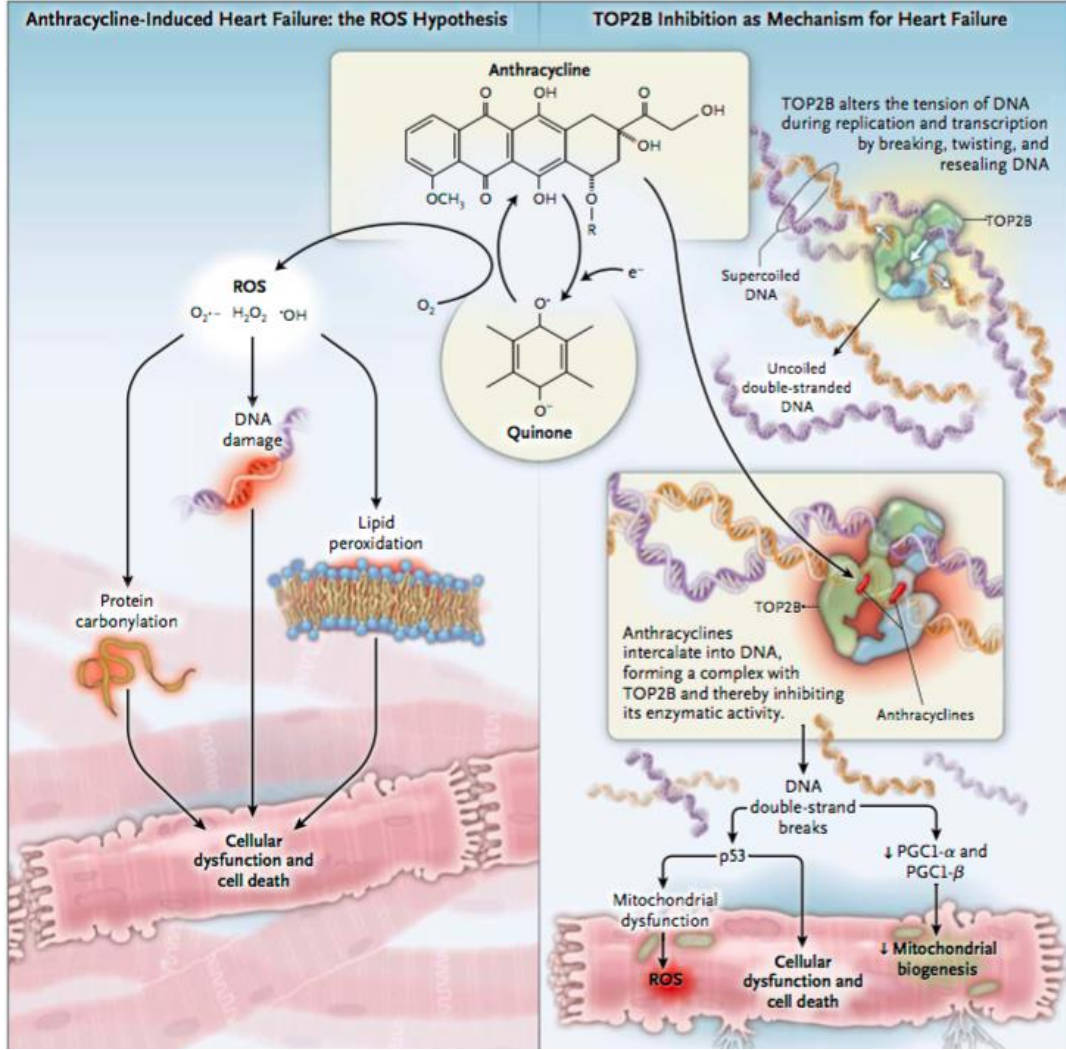
### 2.3 Antrasiklinler

Antrasiklinler , *Streptomyces peucetius* var. *caesius* adlı mantardan elde edilmektedir. İdarubisin ve epirubisin, doğal olarak üretilen antrasiklinler olan doksorubisin ve daunorubisinin sentetik analoglarıdır. Kimyasal olarak çok az farklılık içermelerine karşın klinik aktivite farklılıkları bulunmaktadır. Daunorubisin ve idarubisin öncelikle akut lösemilerde kullanılırken, doksorubisin ve epirubisin solid tümörlere karşı daha geniş aktivite göstermektedirler. Bu ajanlar, DNA interkalasyonu ile DNA, RNA ya da her ikisinin de sentezini bloke ederler ve DNA iplikçiklerinin parçalanmasına neden olarak hücre replikasyonuna engel olurlar. Diğer önemli sitotoksik mekanizmaları ise; serbest oksijen radikalleri oluşturarak topoizomerez-II (TOP2) inhibisyonu yapmak ve hücre membranına bağlanarak akışkanlığı ve iyon transportunu değiştirmektir[23, 24].

## 2.4. Antrasiklin ile indüklenen kardiyotoksisite

Antrasiklinle indüklenen kardiyotoksisitenin moleküler ve genetik mekanizmaları hala tam olarak anlaşılammıştır. Antrasiklinlerin kimyasal yapısında var olan kuinon gruplarının, hem normal hem de malign hücrelerde serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşturarak kardiyotoksisiteye neden olduğuna inanılmaktadır [25]. Fakat SOR'ni tutucu tedavilerin kardiyotoksisite oluşumunu engelleyememesi, SOR hipotezinin geçerliliğini tartışmalı hale getirmiş ve araştırmalar farklı mekanizmalara yönelmiştir [26]. 2012 yılında antrasiklin ile oluşan kardiak myosit hasarının ilk basamağının, SOR'dan bağımsız olarak topoizomerez enzim inhibisyonu ile geliştiği ortaya konulmuştur[27].

Antrasiklinler DNA'ya interkale olur ve TOP2 ile kompleksler oluşturur. Bu kompleksler; enzimin etkinliğini bozarak, DNA hasar tepkisini aktive eder ve hücre ölümüne yol açar. Topoizomerezın çeşitli biçimleri vardır. Hızlı bölünen tümör hücreleri, yüksek topoizomerez II alfa (TOP2A) düzeyleri ifade ederken, TOP2 beta (TOP2B) tüm hücrelerde ifade edilir; kardiyomiyositlerde sadece TOP2B görülür, TOP2A görülmez. Antrasiklinler hem TOP2A hem de TOP2B'yi hedef alırlar[28]. TOP2B geninden yoksun mutant fareler ile yapılan bir çalışmada, doksorubisin maruziyeti sonrası akut veya kronik kalp hasarı görülmemiştir. Bu mutant farelerde, doksorubisin kardiyotoksisitesinin önemli bir göstergesi olan sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda azalma olmamıştır. Yine bu çalışmada, wild tip farelerde doksorubisin maruziyeti sonucu SOR oluşumu gözlenmiş olup; bunun doksorubisinin kuinon grubunun redüksiyon-oksidasyon dönüşümünün sonucu olarak değil, mitokondriyal fonksiyonun bozulması sonucu ortaya çıktığı gözlenmiştir. Doksorubisine maruz kalan wild tip farelerin kardiak doku analizinde; mitokondriyal biyogenez düzenlenmesinde kritik rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin baskılanması ile DNA hasar yolağının aktive olduğu ortaya konulmuştur[27, 29].



Şekil 2.1: Antrasiklinle indüklenen kardiyomiyosit hasarının mekanizması  
(Douglas B. Sawyer, 2013'den (Ref.29) alınmıştır)

Doz bağımlı olan ve antrasiklinle indüklenen kardiyomiyopati, en dikkat çekici ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılmış olan bir kardiyovasküler toksisitedir. İlk kez 1971'de çeşitli tümörler nedeniyle doksorubisin tedavisi alan 67 hastada tanımlanmıştır[30]. En etkili antrasiklinlerden biri olan doksorubisine ikincil gelişen kardiyotoksisite; sublinik ventriküler disfonksiyondan mortalite ile sonuçlanabilecek ciddi kalp yetmezliğine kadar değişen bir spektrumda görülebilmektedir. 2013'de yayınlanan bir metaanalizde, doksorubisin alan hastaların %6'sında klinik olarak aşikar, %18'nde sublinik kardiyotoksisite olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple, gelişebilecek ventriküler komplikasyonları önlemek için doksorubisine sekonder gelişen toksisitesinin erken tanınması önem arz etmektedir [3, 4]

Antrasiklin ile indüklenen kardiyotoksisite erken ve geç dönem komplikasyonları olarak karşımıza çıkabilmektedir. Erken kardiyotoksisite, genellikle son antrasiklin

uygulanması sonrasındaki 3 ay içerisinde pik yapmaktadır. Akut kardiyotoksisite; aritmi, EKG değişiklikleri veya akut perikardit bulguları ile “sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda azalma saptanabilmektedir. Geç kardiyotoksisite ise, antrasiklin tedavisi tamamlandıktan 10-15 yıl sonra ortaya çıkmaktadır. Tipik kalp yetmezliği bulguları ile kendini gösterebileceği gibi myokard fonksiyonlarında subklinik bir azalma da görülebilmektedir.[31]

## **2.5.Antrasikline bağlı kardiyotoksisite gelişiminin risk faktörler**

*-Kümülatif antrasiklin dozu:* Doksorubisinle ile indüklenen kardiyotoksisite, standart dozu aşan kümülatif doksorubisin dozuyla önemli ölçüde artmaktadır. 400 mg/m<sup>2</sup> kümülatif doksorubisin dozu için tahmini kümülatif risk % 5-6 , 500 mg / m<sup>2</sup> kümülatif dozu için risk % 10'un üzerine çıkmaktadır. 550 mg / m<sup>2</sup>'den daha yüksek dozlarda hastaların dörtte birinin semptomatik konjestif kalp yetmezliği geliştirmesi beklenebilmektedir.[32-34].

*-Tedavi sonrası geçen süre:* Zaman geçtikçe klinik olarak anlamlı kardiyotoksisite insidansı artmaktadır [32, 35].

*-Radyoterapi:* Kümülatif radyasyon dozu >30 Gy ise veya 5 Gy kadar düşük dozda da eşlik eden antrasiklin kullanımı var ise risk artmaktadır [35, 36].

*-Eşlik eden diğer kemoterapiler:* Trastuzumab, siklofosfamid, bleomisin, vinkristin ve mitoksantron duyarlılığı veya toksisiteyi artırabilir [35].

*-Yaş:*60 yaş üzerinde ve 18 yaş altında risk artmaktadır [32].

*-Cinsiyet:* Kadınlarda risk daha yüksektir [32].

*-Diğer kardiyak risk faktörleri:* Hastaların hipertansiyon, iskemik, valvular veya myokardiyal kalp hastalığı gibi komorbid durumlarının olması, daha önce veya eş zamanlı kardiyotoksik tedavi almış olması riski artırmaktadır [37].

*-Komorbiditeler:* Diabet, obezite, kaşeksi [37].

## **2.6.Antrasiklin alan hastanın kardiyotoksisite açısından takibi**

ESMO (European Society for Medical Oncology) kemoterapi ile indüklenen kardiyotoksisite-klinik pratik rehberine göre antrasiklin alacak tüm hastalar antrasiklin almadan önce ekokardiyografik (EKO) olarak değerlendirilmeli, her antrasiklin siklusu

sonrası troponin-I düzeyi ile takip edilmelidir. Eğer KT boyunca troponin-I düzeyi bakılmadıysa tedavi sonunda EKO tekrarlanmalıdır. KT devam ederken troponin-I düzeyinde artış olan hastalar, ilk bir yıl 3 ayda bir, sonraki 5 yıl boyunca 6 ayda bir EKO ile değerlendirilmelidir. Troponin düzeyinde artış saptanmayan kişilerin yıllık EKO ile takibi yeterlidir [38].

Yine Avrupa Kardiyoloji Derneği'nin (ESC) 2016 yılında yayınlanmış olan "Kanser Tedavileri ve Tedavi Sırasında Gelişen Kardiyotoksisite" kılavuzunda, kardiyotoksik kemoterapötikler ile devam edilen tedavi sırasında, kardiyotoksisite açısından dikkatli olunması gerektiği ve düzenli aralıklarla kardiyotoksisite taraması yapılması gerektiği belirtilmektedir. Yine bu kılavuza göre kardiyotoksisite taramasının EKO, nükleer kardiyak görüntüleme, kardiyak manyetik rezonans görüntüleme ve troponin-I, yüksek sensitif troponin-I, b-tipi natriüretik peptid (BNP), N-terminal-pro b tipi natriüretik peptid (NT-proBNP) olmak üzere biyobelirteçler ile yapılabileceği ifade edilmektedir [39].

### **2.6.1.Ekokardiyografi**

Ekokardiyografi kanser tedavisi alan hasta popülasyonunda, kalpteki yapısal ve fonksiyonel değişmelerin takibi için ideal bir modalitedir. Rutin bir ekokardiyografide bakılan sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyonları, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonundaki (SVEF) değişimler ve kardiyotoksisite konusunda önemli bilgiler vermektedir [40]. Ekokardiyografinin; kolay ulaşılabilir olması, radyasyon maruziyetine sebep olmaması, tekrarlanabilir olması önemli avantajlarıdır. Buna karşın değerlendirmeyi yapan operatörler arasında sonuç farklılığının olabilmesi ve görüntü kalitesi nedeniyle elde edilen yanlış sonuçlar sorun yaratabilmektedir [39]. Yeni görüntüleme modalitelerinden olan miyokardiyal strain görüntüleme, ekokardiyografi operatörleri arasındaki farkı azaltmakta ve daha ayrıntılı bir sonuç ortaya koyabilmektedir [40].

ESC 2016 "Kanser Tedavileri ve Tedavi Sırasında Gelişen Kardiyotoksisite" kılavuzunda ekokardiyografik kardiyotoksisite değerlendirmesinde temel olarak 3 boyutlu ekokardiyografi ile LVEF ölçümü, 2 boyutlu ekokardiyografi ile Simpson yönteminin temel alındığı LVEF ölçümü ve global longitudinal strain ölçümü önerilmektedir [39].

Rutin bir ekokardiyografide sol ventrikül diyastolik fonksiyonlarının belirlenebilmesi için mitral akım E ve A dalgaları, izovolümetrik relaksasyon zamanı (IVRT), mitral anulus doku Doppler ölçümleri yapılabilmektedir [40]. Birçok çalışmada global sol ventrikül diyastolik disfonksiyonun, global sol ventrikül sistolik disfonksiyondan önce geliştiği gösterilmiştir [41, 42]. Buna karşın diyastolik disfonksiyon gelişmesi halinde tedavinin kesilmesi gerektiği yönünde bir kanıt halen mevcut değildir [39].

İlaçla ilişkili kardiyotoksisite aşağıdaki kriterlerin en az birinin bulunması olarak tanımlanmaktadır [43]:

- a) SVEF’nda düşüklük ile karakterize kardiyomiyopati (global veya septumdan daha belirgin olmak üzere segmenter duvar hareket bozukluğu içeren)
- b) Konjestif kalp yetmezliği semptomlarının bulunması
- c) Konjestif kalp yetmezliği ile ilişkili bulguların tespiti (S3 galo ve taşikardi dahil – ancak bu bulgular ile sınırlı değil)
- d) SVEF’nda son ejeksiyon fraksiyonunda (EF) %55’in altında olacak şekilde %5 düşüş ve konjestif kalp yetmezliği semptom ve bulgularının olması
- e) SVEF’nda son EF %55’in altında olacak şekilde %10 düşüş (herhangi bir semptom ve bulgu bulunmaksızın)

ESC 2016 “Kanser Tedavileri ve Tedavi Sırasında Gelişen Kardiyotoksisite” kılavuzunda normal LVEF değeri %50 ve üzeri olarak belirtilmiştir. Ölçülen LVEF değerinden bağımsız olarak tedavi sırasında LVEF’de bazale göre %10 ve üzerinde bir düşüş olması halinde bu hastalarda daha kısa aralıklı ekokardiyografi değerlendirmesinin yapılması gerektiği belirtilmiştir. LVEF’deki düşüş %10’dan daha fazla ve son ölçülen LVEF değeri normal sınırın altında ise hastalar asemptomatik dahi olsa kalp yetmezliği tedavisinin (anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü ve beta blokörü içerecek şekilde) başlanması önerilmektedir [39].

İlaçla ilişkili kardiyotoksisite tanımlarında daha çok SVEF değişimleri ön planda tutulmakta iken miyokardiyal strain görüntüleme günümüzde ekokardiyografinin önemli bir parçası haline gelmiş ve miyokardiyal disfonksiyonun erken evrelerindeki değerlendirmeye olanak sağlamaktadır [40].

Kanser tedavisi sırasında, sol ventrikül sistolik global longitudinal strain (GLS) ölçümünün kardiyotoksisite açısından en önemli prognostik değerlerden birisi olduğu görülmüştür. GLS'deki bazal değerlere göre %10-15'lik rölatif bir azalmanın ilaçla ilişkili kardiyotoksisite gelişiminin değerlendirilmesinde önemli ve faydalı bir prediktör olduğu gösterilmiştir [44].

## 2.6.2.Kardiyak biyobelirteçler

### Troponin –I

Cardinale ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yüksek doz kemoterapi alan 204 adet hastada troponin I değerleri ölçülmüş olup kardiyak troponin-I değeri yükselen ve yükselmeyen hasta grupları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda kardiyak troponin-I yükselmiş olan grupta yüksek doz kemoterapi sonrası progresif olarak LVEF'nun anlamlı oranda düştüğü izlenmiştir[45]. Yine Cardinale ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada yüksek doz kemoterapi alan 703 hastada erken (hemen kemoterapi sonrası) ve geç dönem (kemoterapiden 1 ay sonra) kardiyak troponin I değerleri ölçülmüş, hastalar her iki değer de normal (cTnI-/-), erken değer yüksek – geç değer normal (cTnI +/-) ve her iki değer de yüksek (cTnI +/+) olduğu hastalar değerlendirilmiştir. Bu 3 grubun 1 yıllık izlemlerinde cTnI-/- grubunda anlamlı bir SVEF düşüşü izlenmezken cTnI +/- grubunda ve cTnI +/- gruplarında anlamlı bir SVEF düşüşü olduğu gözlenmiş, bu düşüş cTnI +/- grubunda cTnI +/- grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olmuştur [46].

Troponin-I düzeyleri en az 3 ay önceden klinik olarak önemli sol ventrikül disfonksiyonunu tahmin edebilmektedir [47, 48]. Troponin-I'nın erken dönemdeki artışları da gelecekteki sol ventrikül disfonksiyonunun şiddetini ve ciddiyetini öngörebilmektedir. [46, 47]. Kemoterapi tamamlandıktan bir ay sonra troponin yüksekliğinin devam etmesi, izlemin ilk yılında % 85 olasılıkla büyük kardiyak olay gerçekleşmesi ile ilişkili bulunmuştur[46, 49]. Troponin-I düzeyinin yükselmemesi ve bu durumun kalıcı olması % 99'luk negatif prediktif değerle, en düşük kardiyotoksisite riskine sahip hastaları tanımlayabilir. Bununla birlikte, troponin değerlendirmesinin bazı olumsuz yanları mevcuttur. Yüksek doz kemoterapiden sonra zirve değerleri farklı zaman aralıklarında oluşur, bu nedenle onu tespit etmek için birden fazla örnekleme gerekebilir.



## **2.7.Antrasikline bağı kardiyotoksisitenin önlenmesi ve tedavisi**

### **2.7.1.Antrasiklin türevleri ve infüzyon protokolü**

Cochrane sistematik analizinde, eşdeğer anti-tümör dozlarda antrasiklin türevleri arasında kardiyotoksisite açısından klinik olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır[50]. Yaklaşık 16 000 çocukluk çağı kanseri sonrası hayatta kalan hastalar arasında yapılan bir analizde daunorubisinin, doksorubisinden daha az kardiyotoksisite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[51]. Bolus antrasiklin uygulamasından ziyade sürekli infüzyonun farelerde, daha düşük kardiyak konsantrasyonlar ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup erişkin sarkom ve lenfoma hastalarında da daha az kardiyotoksisite ile ilişkilendirilmiştir[52]. Ancak Akut lenfoblastik lösemi tanısıyla antrasiklin alan pediatrik olgularda infüzyonel uygulama ile kardiyotoksisite arasında ilişki gösterilememiştir. Lipozomal doksorubisin, düşük oranda kardiyovasküler risk, kalp yetmezliği ve SV fonksiyonunda subklinik değişiklikler ile ilişkilidir fakat pahalı olması sebebiyle kullanım alanı oldukça kısıtlıdır[50].

### **2.7.2.Deksrazoksan**

Deksrazoksan (DRZ), antrasikline bağı kardiyotoksisiteyi azaltan veya tamamen önleyen bir ajandır[53]. DRZ, infüzyon sonrasında miyokard tarafından hızla alınır ve Top 2 $\beta$  üzerindeki ATP bağlanma yerleri için rekabet eder. DRZ'nın Top 2 $\beta$ 'ya yapışması, antrasiklin ile kompleks oluşumunu önleyen ve bu sayede kardiyotoksisiteyi azaltan bir konfigürasyon değişikliğine neden olmaktadır. Koruyucu etkinin ana mekanizmasının bu konfigürasyon değişikliği olduğu düşünülmektedir[54]. DRZ kullanımını takiben, antrasiklinlerin anti-tümöral aktivitesinin azalmasına ilişkin endişeler ve çocukluk çağı lenfoma ve lösemi tedavisi sonrası ikincil malignitelerde artışa neden olduğuna dair veriler, DRZ kullanımını sınırlandırmıştır [55]. Sadece daha yüksek kümülatif antrasiklin dozu alan metastatik meme kanseri olgularında deksrazoksan kullanımını önerilmektedir.

### **2.7.3.Beta bloker veya ACEi / ARB ile primer koruma**

Antrasikline bağı kardiyotoksisitenin önlenmesinde  $\beta$ -Bloker, ACE inhibitörü ve anjiyotensin reseptör blokörü (ARB) kullanımının araştırıldığı çok sayıda randomize kontrollü çalışma yapılmıştır. Birincil önleme çalışmalarının çoğunda tedavi yaklaşımı, tüm antrasiklin ile tedavi edilen hastalara kardiyoprotektif medikasyon uygulamasını içermektedir[56].

Kemoterapiden 72 saat sonra erken dönemde cTn-I düzeyinde artış görülen 114 hasta enalapril veya plasebo kollarına randomize edilmiştir. Enalapril ile tedavi edilen hastalarda SVEF'de bazal ve 12. ayda bir değişiklik görülmezken; plasebo grubunda SVEF anlamlı bir düşüş saptanmıştır[49]. Karvedilol ve nebivolol ile yapılan daha küçük ölçekli randomize klinik çalışmalarda da, benzer koruma sağladığı gösterilmiştir[57, 58]. Bu alanda devam eden çalışmalar primer koruma tedavisinin etkilerini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır.

#### **2.7.4.Kalp yetmezliği gelişen veya asemptomatik SVEF’unda azalma olanlarda tedavi**

Antrasiklin tedavisi sırasında veya sonrasında kalp yetmezliği gelişen hastalar, Avrupa Kardiyoloji Derneği kılavuzlarına göre tedavi edilmelidir. Kardiyotoksik kanser tedavisine daha fazla maruz kalma konusunda dikkatli karar verilmesi gerektiği için, kalp yetmezliği veya SVEF’unda belirgin düşüş saptandığında, tedavi planının bir kardiyoloğun katılımıyla planlanması önerilmektedir. Mevcut kanser tedavisinden elde edilen kazanıma bağlı olarak bazen ACE inhibisyonu ve  $\beta$ -bloker desteğiyle tedaviye devam etmek mümkündür. Eğer uygun ise bu durumda lipozomal antrasiklin veya DRZ kullanımı da düşünülebilir. SVEF’unda asemptomatik azalma olan hastalar, kardiyotoksisite kriterlerini taşıyor ise rehber önerileri doğrultusunda, kemoterapinin yalnız ACEi/ ARB tedavisi altında veya ACEi/ARB+  $\beta$ -bloker kombinasyonu ile birlikte verilmesi değerlendirilmelidir[39].

Antrasiklinle kardiyotoksisite gelişen 226 hastanın değerlendirildiği çalışmada, hastaların % 88’ine enalapril+ karvedilol/ bisoprolol kombinasyon tedavisi verilmiş. Yaklaşık 1 yıl içinde tedavi alan hastaların % 11’nde SVEF’nda tam düzelme,% 71’nde parsiyel düzelme gözlemlendiği bildirilmiştir[59].

#### **2.8.MikroRNA**

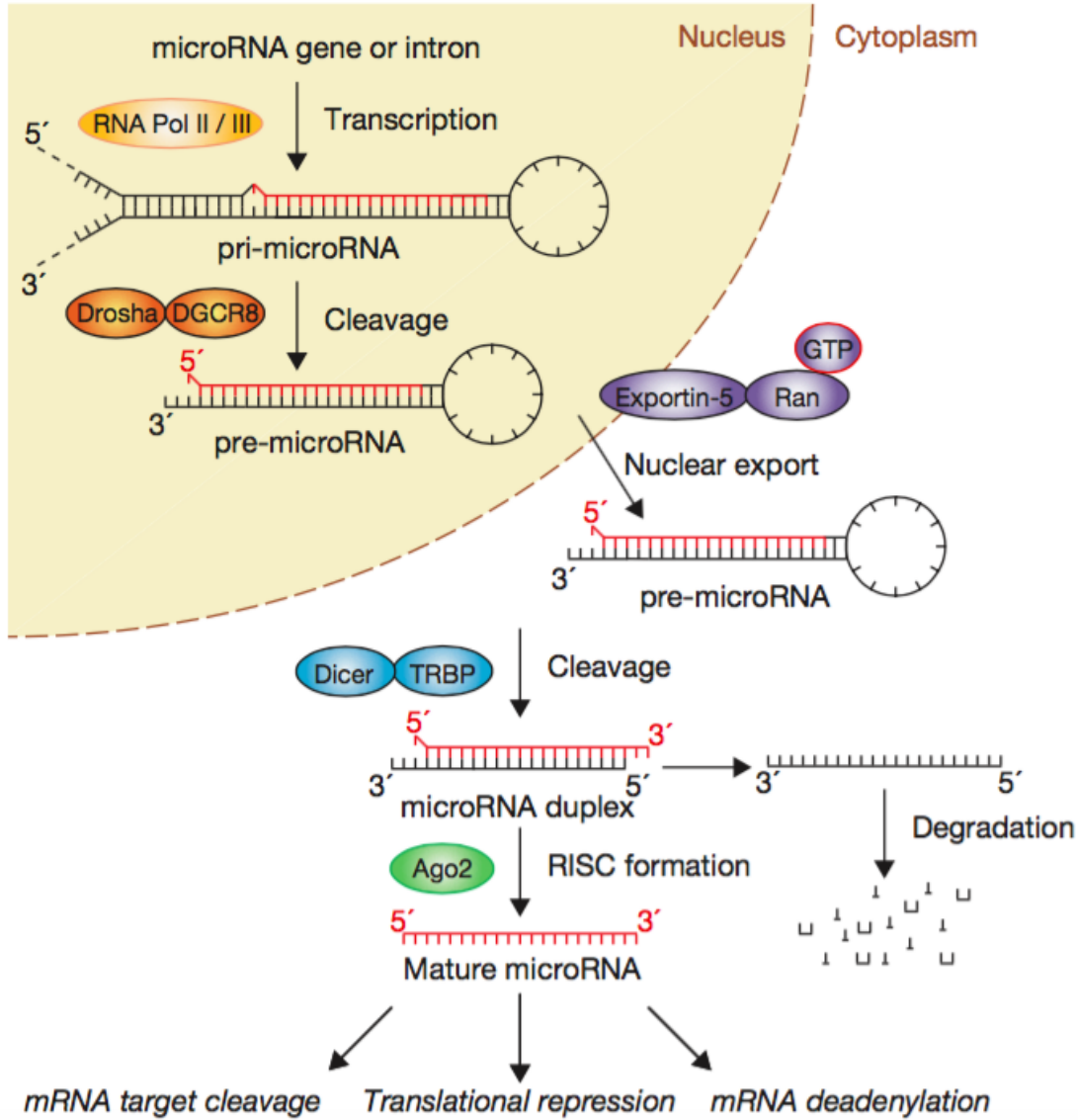
MikroRNAlar (miRNA); 22-26 nükleotidden oluşan, kodlanmayan RNA’lar olarak tanımlanır. MiRNA’ların primer hedefi fonksiyonel proteinler olup, spesifik mRNA translasyonunu inhibe ederek ve/veya mRNA degradasyonunu desteleyerek gen ekspresyonunu düzenleyen yapılardır [5, 60, 61].

İlk kez 1993'de Lee ve arkadaşları tarafından, *Caenorhabditis elegans*'da protein kodlayan mRNA fonksiyonunu ve ekspresyonunu düzenleyen küçük kodlanmayan mikroRNA tanımlandı[62]. MikroRNA'ların keşfinin birçok gen düzenleme sürecini anlama üzerine büyük etkisi oldu. İlk keşfinden beri, miRNA'ların bitki ve hayvan gen ekspresyonlarını düzenleme ile olan fizyolojik ilgisi saptandı. Çeşitli çalışmalarda, miRNA'ların hücre proliferasyonu, farklılaşma ve gelişimsel zamanlamanın kontrolü gibi pek çok biyolojik süreçte yer aldığı gösterildi[63, 64].

2002 de ilk kez miRNA'ların kanser ile ilişkisi gösterildi ve miRNA15a ve miRNA 16-1'in B hücreli KLL'de azaldığı tespit edildi[65]. Bu bulgunun, miRNA'ların kanser tanısı ve tedavisinde potansiyel rolleri olduğunun işareti olabileceği bildirildi. Takip eden 10 yıl boyunca çok sayıda miRNA'nın anormal ekspresyonları ortaya konuldu ve miRNA'lar tümör baskılayıcı veya indükleyici olarak kabul edildi[66, 67]. Bugüne kadar binlerce insan miRNA'sı tanımlandı [68]. Biyoinformatik analizler miRNA'ların, insan protein kodlayan genlerin %60 gibi büyük bir çoğunluğunu düzenlediğini öngörmektedir[69].

MikroRNA biyogenezinde , miRNA'nın primer transkripti olan pri-miRNA tip III ribonükleaz enzimi olan Drosha tarafından kesime uğrayarak öncül miRNA (pre-miRNA) oluşturulmaktadır. Pre-miRNA'nın nükleustan sitoplazmaya eksportin aracılığıyla translokasyonundan sonra sitoplazmik tip III RNA enzimi olan Dicer tarafından pre-miRNA'nın tekrar kesime uğraması ile matür miRNA yapısı oluşur [70].

MiRNA'nın kanonikal ve mirtron isimli iki yolağı vardır. Doku tipi, düzeyi, yolağı ve zamanı miRNA analizleri için önemli unsurlardır. Çünkü farklı dokularda, farklı düzeylerde, farklı yollar içerisinde aynı miRNA'lar farklı özellikler gösterebilirler. Zaman içerisinde aynı miRNA farklı regülasyonlar yapabilir[71].



Şekil.2.2 MikroRNA Biyogenezi

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, miRNA biyogenezi aşamasında farklı moleküllerin matür miRNA biyogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Örnek olarak, östrojen reseptör- $\alpha$  pri-miRNA'nın pre-miRNA dönüşümünü baskılamaktadır [70, 72]. Benzer şekilde meme kanserinde kalıtsal yatkınlık geni olan ve aynı zamanda bir tümör supresör gen olan BRCA1'in miRNA biyogenezinde rol oynayan Drosha enzim kompleksini direkt olarak regüle ettiği ve çeşitli pre-miRNA ve matür miRNA transkripsiyonunu etkilediği gösterilmiştir [70]. Ayrıca, c-Myc'in doğrudan miRNA transkriptini regüle ettiği, Drosha mRNA ekspresyonunu transaktive ederek miRNA biyogenezini kontrol ettiği gösterilmiştir. c-Myc upregülasyonu ile Drosha enzim aktivasyonu sayesinde pri-miRNA artışı

tetiklenmektedir. Bu nedenle c-Myc sadece posttranskripsiyonel düzeyde değil, transkripsiyonel düzeyde de miRNA'yı modüle etmektedir [73].

Genetik defektler haricinde, enzimatik aktivitenin değişimi ile de miRNA biyogenezi deregüle olmaktadır. Birçok kanser türünde RNA'ya bağlanan protein olan AUF1 ifadesinin upregüle olduğu, bunun sonucunda matür miRNA sentezinde rol oynayan Dicer1 mRNA düzeyini ve Dicer protein düzeyini azalttığı belirtilmektedir. Bu durumda, pre-miRNA düzeyinde bir değişim olmazken matür miRNA düzeyi değişmektedir [74]. Pre-miRNA/matür-miRNA dönüşümünde önemli role sahip Dicer proteini enzimatik aktivitesinin regülasyonunda siklin D1'in önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Meme kanseri hücrelerinde, siklin D1'in Dicer regülatör gen bölgesine bağlanması ile miRNA biyogenezinin regülasyonu sağlanmaktadır. Luminal A ve bazal benzeri meme kanserinde, siklin D1 ve Dicer ekspresyonunun artışı önemli prognostik belirteçler olarak görülmektedir [75].

Pre-miRNA ve matür miRNA düzeyleri arasındaki farklılık miRNA biyogenezi aşamasındaki posttranskripsiyonel modifikasyonu ifade etmektedir. Bu farklılık, çeşitli genetik mutasyonlardan veya sinyal yolağı defektlerinden dolayı oluşabilir. Bu bağlamda, pre-miRNA ve matür miRNA düzeylerinin karşılaştırılması ve iki transkript arasındaki farklılığın belirlenmesi hedef miRNA fonksiyonel etkisini anlamak açısından önem arz etmektedir.

Geçtiğimiz 10 yılda miRNA'ların periferik kan dolaşımında bulunduğu gösterilmiştir. Dolaşımdaki miRNA'lar; eksozom denilen lipoprotein vesikülleri sayesinde degradasyondan korunmakta ve diğer RNA molekülleri ile kıyaslandığı zaman dolaşımda oldukça stabil kalabilmektedir [76, 77]. MiRNA'ların plazmada değişmeden bulunmaları onları biyobelirteç çalışmalarının gözdesi haline getirmiştir. Son zamanlarda mikroRNA'lar, kardiyovasküler fonksiyonlar ve hastalıklarda temel düzenleyiciler olarak tanımlanmakta ve kardiyovasküler patolojiler için biyobelirteç/tedavi edici olabilme potansiyelleri nedeniyle de giderek artan bir ilgi görmektedir [3].

### **2.8.1.MiR34a**

MiR-34 ailesi üç üyeden oluşur: miR-34a, miR-34b ve miR-34c. MiR-34a, kromozom

1p36 üzerinde bulunurken, miR-34b ve miR-34c, kromozom 11q23 üzerinde bulunan ortak bir geni paylaşırlar [78]. MiR-34a, miR-34b ve miR-34c'nin baskın olduğu akciğerler hariç, çoğu dokuda miR-34b/c'den daha yüksek seviyelerde eksprese edilir [79]. MiR-34a kendi transkriptine sahiptir ve genellikle ektopik olarak başta kanser olmak üzere pek çok hastalıkta eksprese edilir. Ektopik miR-34a ekspresyonu, apoptozisi, hücre döngüsünü ve farklılaşmayı düzenler [80, 81] ve böylece karsinogenezde temel işlevsel bir düzenleyici rol üstlenir [82, 83]. Ayrıca, miR-34a'nın karsinogenez baskılayıcı olarak kök hücrelerin çoğalması ve apoptozuna dahil olduğu bildirilmiştir. MiR-34a'nın; hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, apoptoz, DNA tamiri ve anjiyogenezi düzenleyen hedef genleri düzenlediği de bilinmektedir [84, 85]. Tüm bu özellikleri nedeniyle miR-34a, kanser araştırmalarına yeni bir yön vermiştir [86].

### **2.8.2.MiR34a ve Kalp üzerine etkileri**

MiR34 aile üyeleri, (miR34a, -34b ve -34c), stress (ör: myokardiyal infarktüs) yanıtı olarak kalpte upregüle olmakta ve yaşa bağlı kardiyak fonksiyonel azalmaya katkıda bulunmaktadır [6, 87]. Özellikle miR34a, baskın olarak kalpte eksprese olmakta hücre siklusu, apoptozis, hücre yaşlanma, farklılaşma ve hücre gelişimi etkileyen pek çok hedef proteini modüle etmektedir [88]. Deneysel myokard infarktüsü ve basınç yüküne ikincil olarak geliştirilen ventriküler hipertrofi modellerinde, miR34a'nın farmakolojik inhibisyonunun kardiyak fonksiyonları ve rejenerasyonu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu gelişme, miR34a'nın susturulmasının kardiyak koruma için gelecekte bir terapötik seçenek olabileceğini akla getirmektedir [6, 87, 89]. Yeni bir çalışmada, doksorubisin tedavisi boyunca oluşan kardiyak doku hasarının erken moleküler kanıtı olarak fare kalbinde miR34a ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. İlginç olarak miR34a, akut miyokard infarktüsü sonrası hastalarda gelişebilecek kalp yetmezliğini predikte edebilecek bir plazma belirteci olarak da tanımlanmıştır [90, 91]. Piegari ve arkadaşlarının fare modeli üzerinde yaptığı çalışmada; in vitro ve in vivo olarak doksorubisine maruz kaldıktan sonra, kardiyak progenitör hücreler (KPH) de dahil olmak üzere kalp hücrelerinde miR34a düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bunun üzerine miR34a'nın farmakolojik olarak engellenmesinin, doksorubisinin kardiyak toksisitesinde bir değişikliğe yol açıp açmadığı değerlendirilmiş ve anti-miR34a'nın doksorubisine maruz bırakılan fare KPH'nin canlılığı, proliferasyonu, apoptozisi ve yaşlanması üzerine yararlı etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu

etkilere miR34a'nın hedefleri olan Bcl-2 ve SIRT1'in artışı, asetillenmiş p53 ve p16INK4a'nın azalması aracılık etmektedir. Bir diğer önemli nokta da miR-34a sessizleştirilmesiyle miRNA'nın doksorubisine maruz kalmış fare KPH'lerinden salınması azalmakta ve diğer progenitor hücrelerde negatif parakrin etkilerini azalmaktadır. Bu çalışmada ayrıca, kardiyomyopati gelişen farelerde plazmada da miR34a düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak miR-34a'nın , doksorubisin kardiyotoksitesini engellemek için bir tedavi hedefi olabileceği ve aynı zamanda antrasikline bağlı kardiyak hasar için dolaşımda bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülebilir [92]. Bir başka çalışmada da neoadjuvan olarak antrasiklin bazlı KT alan meme kanseri hastalarında bir kardiyotoksite belirteci olan troponin T ile miR34a arasından pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır [7].

### **2.8.3.MiR34a ve meme kanseri**

MiR-34a ve meme kanseri arasındaki ilişkiye odaklanan klinik araştırmalar yapılmış ve dolaşımdaki miR-34a'nın potansiyel bir tanı belirteci olabileceği tanımlanmıştır. Metastatik meme kanseri olan kadınlarda sağlıklı kadınlara göre artmış miR-34a düzeyleri saptanmıştır. Yine düşük miR-34a düzeylerine sahip hastaların daha kötü bir prognoza sahip olduğu gösterilmiş ve miR-34a'nın prognoz hakkında önemli bir bilgi sağlayıcı olabileceği öngörülmüştür [93, 94].

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmanın tasarımı

Prospektif kohort çalışması olarak tasarlanan bu çalışmanın protokolü Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunularak 04.04.2017 tarihli toplantı ve GO 17/319-18 sayılı karar ile araştırma onayı alındı.(ek-1)

Çalışmaya Mayıs 2017- Aralık 2017 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Medikal Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran, araştırmaya katılmak için onam veren ilk kez antrasiklin bazlı kemoterapi alacak olan 50 meme kanseri hastası dahil edildi.

#### 3.2.Katılımcılar

Hastaların çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıda tanımlandığı şekildedir.

##### Araştırmaya dahil olma kriterleri:

-Medikal Onkoloji Polikliniği'ne başvuran, meme kanseri tanısı ile ilk kez antrasiklin bazlı kemoterapi alacak olma

##### Araştırmadan dışlanma kriterleri :

-İleri kalp yetmezliği (New York Kalp Cemiyeti (NYHA) Evre II ve daha ileri kalp yetmezliği)

- i. -Geçirilmiş myokard infarktüsü
- ii. -Renal replasman tedavisi gerektiren böbrek yetmezliği olan hastalar
- iii.

#### 3.3.Verilerin toplanması

Çalışmaya dahil edilen hastaların tedavi öncesi aşağıdaki bilgileri sorgulanarak ve hastane kayıtları incelenerek kaydedildi.



- Demografik bilgileri (yaş, cinsiyet, medeni hal, çocuk varlığı)
- Komorbid hastalıkları (DM, HT gibi)
- Alışkanlıkları (sigara, alkol)
- İlaçlar
- Ailede meme kanseri öyküsü
- Ailede kalp yetmezliği öyküsü
- Antropometrik ölçümleri (boy, kilo, VKİ)
- Menopoz durumu (premenapozal/postmenapozal)
- Tümör histolojisi
- TNM sınıflaması
- Hormon reseptör durumu (ER, PR)
- HER2 durumu ( +/-)
- Tümör derecesi
- Ki67 indeksi

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar doksorubisin-siklofosfamid(AC ), siklofosfamid-doksorubisin-florourasil(CAF) veya paklitaksel-doksorubisin-siklofosfamid(TAC) KT protokollerinden birini aldılar. KT protokolleri hastaların kendi hekimleri tarafından belirlendi, protokol seçimine müdahale edilmedi. Tüm hastalar , ilk KT'den önce(TÖ) ve son KT'den sonra (TS) 3-6 hafta içinde olmak üzere 2 kez değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sırasında; kardiyak disfonksiyon açısından semptom sorgulaması, strain analizleri içeren ekokardiyografi, serum troponin-I düzeyleri, plazma matür ve immatür miR34a ölçümleri yapıldı. TS değerlendirmesi, hastanın tedavi planı içinde yer alan radyoterapi veya ardışık farklı KT uygulamasından önce tedavi planını aksatmayacak şekilde yapıldı.

### **3.4.Ekokardiyografi verilerinin analizi**

Ekokardiyografik inceleme, sol lateral pozisyonda " Vivid S6, GE Medical Systems, Horton, Norway" ekokardiyografi cihazının M4S-RS probu kullanılarak, parasternal uzun eksen, parasternal kısa eksen ve apikal uzun eksen, apikal iki boşluk, apikal dört boşluk, apikal beş boşluk görüntülerden yapıldı. Ekokardiyografik ölçümler Amerikan Ekokardiyografi Derneği'nin önerdiği kriterler baz alınarak yapıldı. Hastalara sırasıyla M-mod ekokardiyografik, iki boyutlu ekokardiyografik, PW, CW Doppler, renkli Doppler, PW

ve renkli doku Doppler ekokardiyografik değerlendirilmeler yapıldı.

İki boyutlu EKO ile yapılan ölçümler;

- Sol ventrikül için; sol ventrikül diyastol sonu çapı, sol ventrikül sistol sonu çapı, interventriküler septum kalınlığı, arka duvar kalınlığı , aortik çap, sol atriyum ön ve arka çapı
- Sağ ventrikül için ; sağ ventrikül bazal çapı, sağ ventrikül mid çapı, sağ ventrikül uzun eksen çapı, sağ ventrikül diyastol sonu alanı
- Sağ atrium diyastol sonu alanını içermektedir.

Konvansiyonel doppler EKO ile ; sistolik pulmoner arter basıncı, aortik ve pulmoner pik velositeleri, kapak yetmezlikleri, transmitral diyastolik akımlar ve izovolumetrik relaksasyon zamanı ölçümleri yapıldı ve kaydedildi.

Doku doppler görüntüleme ile pik sistolik (s'), pik erken diyastolik (e'), pik geç diyastolik (a') velositeler değerlendirildi.

### **3.4.1. Nokta Takip (“Speckle Tracking”) Yöntemi ile Strain Analizi**

Nokta takip (“speckle tracking”) yöntemi ile strain analizi için apikal dört boşluk, apikal iki boşluk, apikal uzun eksen, parasternal kısa eksen ekokardiyografik pencerelerinden sol ventrikülün; apikal dört boşluktan sağ ventrikülün saniyede 60 ile 80 frame aralığında olan iki boyutlu ekokardiyografik görüntüleri en az üç kardiyak siklusu kapsayacak şekilde kaydedildi. Kaydedilen görüntüler, bilgisayar ortamına aktarılarak “Echopac PC versiyon BT13” bilgisayar yazılım programı ile strain analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda, sol ventrikül septum ve lateral duvarının bazal, mid ve apikal kısmında; sol ventrikül anterior ve inferior duvarının bazal, mid ve apikal kısmında pik longitudinal sistolik strain hesaplandı. Ayrıca kaydedilen görüntülerden sol ventrikülün global pik longitudinal sistolik strain değeri ölçüldü.

### **3.5. Troponin –I düzeylerinin ölçümü**

Troponin-I düzeyi ölçümleri KT öncesi ve sonrasında separatör jel içeren sarı kapaklı biyokimya tüpüne alınarak Hacettepe Üniversitesi Acil Biyokimya Laboratuvarında 2 saat içinde çalışıldı. Bu çalışma, plazmadaki kardiyak TnI için spesifik monoklonal antikor kiti

kullanılarak immunassay yöntemiyle yapıldı.

### **3.6.MiR-34a ve pre-miR-34a düzeylerinin çalışılması**

#### **3.6.1. RNA izolasyonu**

44 hastadan alınmış olan tedavi öncesi ( TÖ) ve tedavi sonrası(TS) olmak üzere toplam 88 örnekten miRNeasy Serum/Plasma Kit ( Cat.No 217184, QIAGEN, gMBh, D-40724 Hilden, Germany) ile RNA izolasyonu üreticinin yönergeleri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen RNA'ların miktarları, 260/230 (inorganik kontaminant) ve 260/280 (organik solvent) değerleri Nano-drop cihazında 1,5 µl örnek kullanılarak ölçüldü. Nano-drop ölçümü sonucu RNA miktarı 10 ng/µl altında olan 3 hasta örneği çalışma dışı bırakıldı. Ölçüm ile DNA kontaminasyonuna rastlanmayan 41 hastanın 82 örneği ile complementer DNA(cDNA) sentezi aşamasına geçildi.

#### **3.6.2. cDNA sentezi**

Eş zamanlı PCR (qPCR) yapılabilmesi için öncelikle elde etmiş olduğumuz saf RNA'lardan cDNA sentezlenmesi gerekmektedir. cDNA sentezi miScript II RT Kit (Cat No./ID: 218161, QIAGEN, gMBh, D-40724 Hilden, Germany) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Yapılan ters transkriptaz PCR sonucu 20 ng/µl cDNA örnekleri elde edildi.

#### **3.6.3.qPCR Analizi**

Elde edilen cDNA örnekleri, miScript SYBR® Green PCR Kit(Cat No./ID: 218075, QIAGEN) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Her hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrası olmak üzere 2 örneği için biri miR34a-5p diğeri pre-miR34a iki hedef gen primeri ve 1 referans gen primeri( RNU6) kullanıldı. RT-PCR için gerekli bileşenler hazırlandıktan sonra reaksiyon önceden optimize edilen reaksiyon koşullarına göre ayarlandı.( Tablo 3.1)

Tablo 3.1 Optimize RT-PCR koşulu

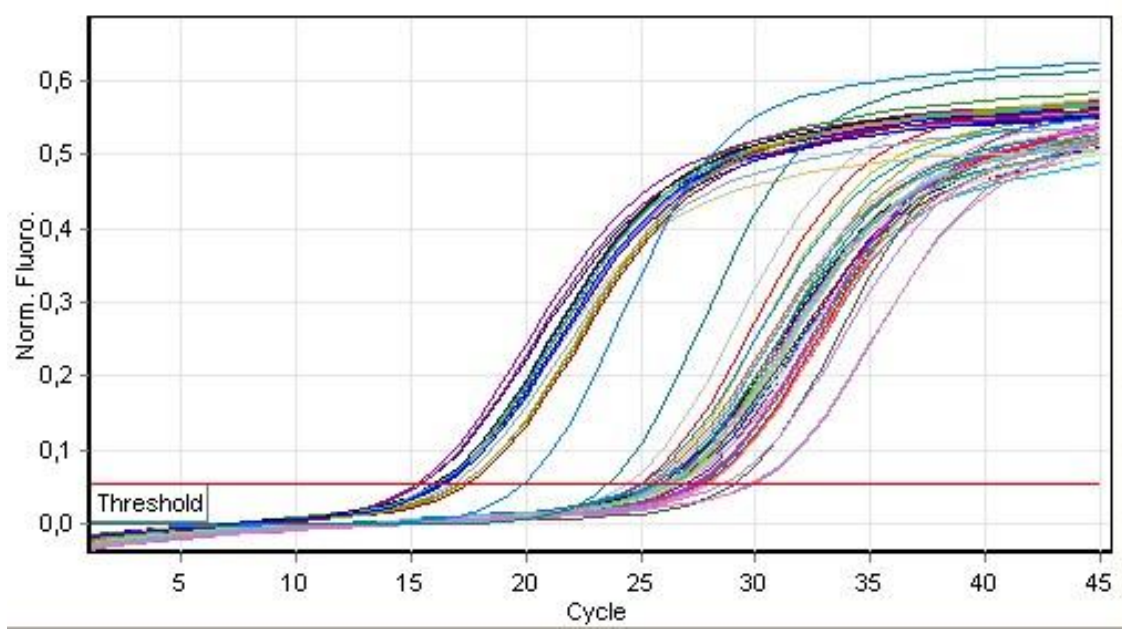
Denatürasyon	95 °C	15 dakika
40-Döngü	94 °C	15 saniye
amplifikasyon	55 °C	30 saniye
	70 °C	30 saniye

qPCR sonucu *Rotor-Gene 1.7.94* programı ile veriler elde edildi. Prensip olarak threshold değeri, background ışımadan sonra amplifikasyonun başladığı noktayı belirlemek amacıyla kullanılan bir doğrudur. Deney etkinliğinin uygun sınırlar içerisinde tutmayı primer hedef olarak kabul ederek, tüm örnekler için ayrı threshold alındı. Tüm deney sonuçları ( toplam 14 run ) için  $r^2$  değeri  $> 99$ , etkinliği %90-110'dur. Tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere tüm örnekler triplike çalışıldı, hedef olarak belirlenen miR34a-5p ve pre-miR34a ifadeleri analiz edildi. Referans gen olarak RNU6 kullanıldı. Threshold değerine göre belirlenen Ct (*Cycle Threshold*) değerleri analiz edildi. Eş zamanlı PCR yöntemi ile elde edilen veriler doğrultusunda antrasiklin tedavisi sonrası hedef miR34a ve pre-miR34a ekspresyonlarındaki değişim karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma referans genin ( RNU6) ekspresyonu ile hedef miRNAların normalize edilmesi ile belirlendi. Livak modeli ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) kullanılarak Eş Zamanlı PCR datası hesaplandı (Şekil 3.1)[95]. Verilerin değerlendirilmesi için istatistiksel analizi yapıldı.

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T,Target} - C_{,Actin})_{Time x} - (C_{T,Target} - C_{,Actin})_{Time 0}$$

Şekil 3.1. Livak modeline göre  $\Delta\Delta Ct$  formülü

(Kenneth J. Livak, Thomas D. Schmittgen 2001 (Ref. 93)'den alınmıştır.)



Şekil 3.2.PCR sonuç grafisi örneği ( 2-4-5 nolu hastalara ait)

### 3.7.İstatiksel analiz

Tanımlayıcı istatistikler; sürekli değişkenler için normal dağılıma uyan değişkenlerde ortalama ve standart sapma, normal dağılıma uymayan ya da ordinal değişkenlerde ortanca ve aralık olarak; kategorik değişkenlerde ise sayı ve yüzde olarak verildi. İkili karşılaştırmalarda sürekli değişkenler normal dağılımda ise bağımsız gruplar için Student T-testi, normal dağılımda değilse Mann-Whitney U testi; kategorik değişkenler için Ki-kare testi kullanıldı. Ekokardiyografi parametreleri ile troponin- I, miR34a düzeyleri arasındaki korelasyona bakmak için Spearman Korelasyon testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen bağımlı değişkenleri için Wilcoxon testi kullanıldı.

İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 20 paket programı kullanıldı ve  $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1.Meme kanseri hastalarının demografik ve tümöre ait özellikleri

Çalışma kriterlerine uygun toplam 50 hasta kaydedildi. Bu hastalardan 2'si kendi isteği ile çalışmadan ayrıldı, 1'i çalışmayı tamamlayamadan exitus oldu, 2'si tedavi merkezini değiştirdiği için 1'inin de kendi hekimi tarafından tedavi protokolü değiştiği için çalışmaya devam edemediler. Toplamda 44 hasta çalışmayı sonlandırabildi. 3 hasta örneğinden yeterli miktarda RNA izole edilemediği için çalışma dışı bırakıldı ve 41 hasta sonuç değerlendirmesine dahil edildi.

Hastaların yaş ve vücut kitle indeksi ortalamaları, sigara kullanımı, menapoz durumları, komorbiditeleri ile ailede meme kanseri ve kalp hastalığı mevcudiyetini içeren demografik özellikleri tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Demografik özellikler

Özellikler	Primer meme kanseri hastaları(n=41)
Yaş ortalaması( aralık)	52±10
VKI(ortalama(SD))	26,5±4,1
Sigara[n(%)]	
Var	9 (22)
Yok	33(78)
Menapoz [n(%)]	
Premenapoz	18(44)
Postmenapoz	23(56)
Komorbidite[n(%)]	
DM	3(7)
HT	9(21)
KAH	0(0)
Diğer	8(19)
Ailede meme ca öyküsü[n(%)]	
Var	11(69)
Yok	25(31)
Ailede kalp hastalığı öyküsü[n(%)]	
Var	8(23)
Yok	27(77)

#### 4.2. Meme kanseri hastalarının bazal klinik, patolojik ve tedavi özellikleri

Çalışmaya dahil edilen meme kanseri hastalarının patolojik özellikleri ve evresi heterojen yapıda olup tablo 4.2’de verilmiştir. Hastaların % 63’ü adjuvan tedavi alırken %20’si lokal ileri hastalık nedeniyle neoadjuvan KT , %17’si de metastatik hastalık nedeniyle tedavi almıştır. Tüm hastaların KT protokülünde antrasiklin olarak doksorubisin yer almıştır. Kümülatif doksorubisin dozu (ort+SD) 242±26mg/m<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır. Hastaların % 81’i AC KT protokökülü, %17’si CAF KT protokolünü almıştır. Sadece bir hasta TAC KT’si almıştır. Lokal ileri ve metastatik hastaların 11’i patolojik olarak parsiyel yanıt veya tam yanıt vermiştir. Lokal ileri hastalardan biri KT altında progrese olması nedeniyle cerrahiye yönlendirilmiş, 2 metastatik hastada klinik olarak stabil izlenmiştir.

Tablo 4.2 Tümör özellikleri

Özellikler	Primer meme kanseri hastaları(n=41)
<b>Histolojik alt tipi[n(%)]</b>	
<b>IDC</b>	28(72)
<b>ILC</b>	1(3)
<b>Miks( IDC +ILC)</b>	8(21)
<b>Diğer</b>	2(4)
<b>Tümör grade[n(%)]</b>	
<b>1</b>	0
<b>2</b>	16(42)
<b>3</b>	22(58)
<b>Moleküler alt tipi[n(%)]</b>	
<b>Luminal A</b>	25
<b>Luminal B</b>	3
<b>HER2+</b>	7
<b>Bazal</b>	5
<b>Ki67%( ortalama±SD)</b>	34±25
<b>T çapı[n(%)]</b>	
<b>&lt;2cm</b>	4(15)
<b>2-5cm</b>	19(73)
<b>&gt;5cm</b>	3(12)
<b>Lenf nodu tutulumu[n(%)]</b>	
<b>N0</b>	9(30)
<b>N1</b>	10(33)
<b>N2</b>	8(27)
<b>N3</b>	3(10)
<b>Metastaz varlığı[n(%)]</b>	
<b>M0</b>	34(82)
<b>M1-kemik</b>	4(10)
<b>M1-visseral organ</b>	3(8)

<b>Lenfovasküler invazyon varlığı[n(%)]</b>	8(29)
<b>Evre[n(%)]</b>	
<b>1</b>	0
<b>2</b>	17(44)
<b>3</b>	15(38)
<b>4</b>	7(18)

#### 4.3. Tedavi sonrası değişim gösteren ekokardiyografi parametreleri

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar tedavi öncesi ve sonrasında ekokardiyografik olarak değerlendirilmiş, doku doppler ve strain analizleri yapılmıştır. Myokard deformitesini işaret eden sol ventrikül global longitudinal strain (GLS) , sağ ventrikül fonksiyonlarını gösteren triküspit anular plan yer değiştirmesi (TAPSE) ve diyastolik fonksiyonları değerlendiren mitral pik erken diyastolik velositenin ( E ) pik erken miyokardiyal diyastolik velositeye(é) oranı ile elde edilen lateral ve septal E/e parametrelerinin tedavi ile değişimi tablo 4.3’de gösterilmiştir. Ayrıca kardiyak troponin-I düzeyinin tedavi ile değişimi de tabloda yer almaktadır.

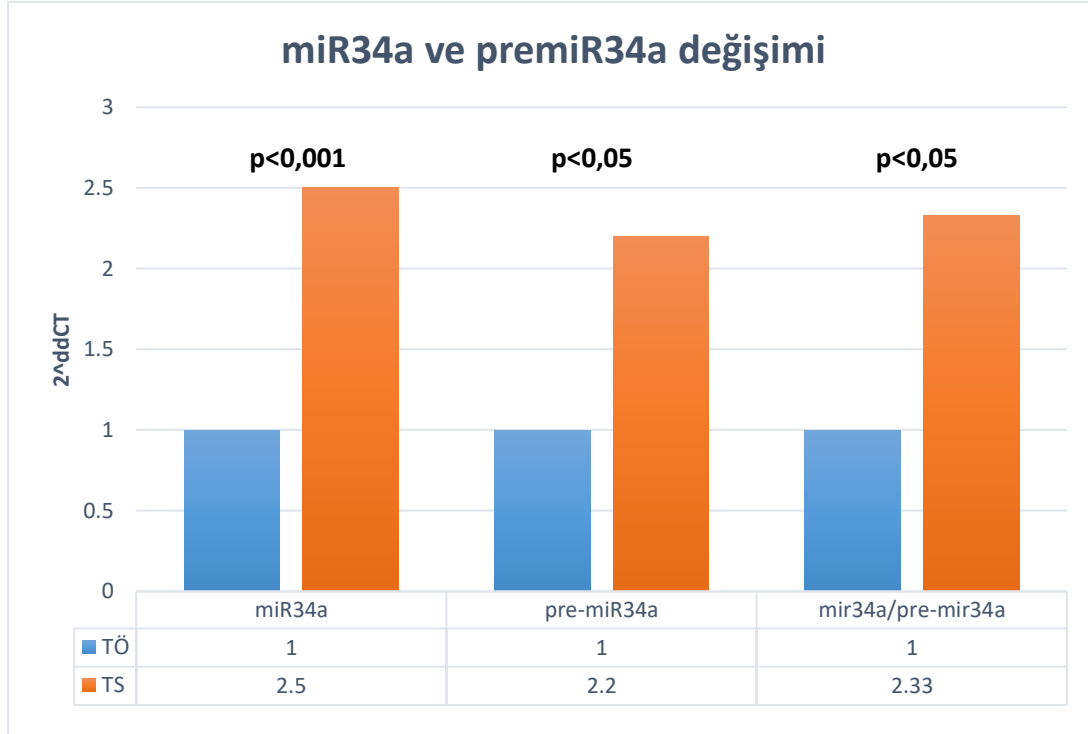
Tablo 4.3 Tedavi ile değişim gösteren kardiyak parametreler

	<b>Tedavi öncesi</b>	<b>Tedavi sonrası</b>	<b>p</b>
<b>Troponin-I</b>	0,007±0,011	0,061±0,049	<b>&lt;0,001</b>
<b>GLS</b>	19,84±3,15	17,92±3,72	<b>0.001</b>
<b>TAPSE(mm)</b>	24±3	22±3	<b>0.002</b>
<b>Septal E/e</b>	6±3	7±3	<b>0.005</b>
<b>Lateral E/e</b>	5±2	6±3	<b>0.015</b>

#### 4.4. Tedavi sonrası matür ve immatür miR34a ekspresyon değişimi

Tedavi öncesi ve sonrası miR34a ekspresyonları fold değişimi olarak daha önce method bölümünde belirtildiği gibi livak modeline uygun olarak hesaplandı. Şekil 4.1’de gösterilmiş olduğu üzere tedavi ile hem matür miR34a hem de immatür miR34a ekspresyonlarında istatistik olarak anlamlı bir artış olmuştur. Matür/immatür miR34a oranına bakıldığında da matür komponentin immatüre göre anlamlı derecede daha fazla arttığı görülmüştür.



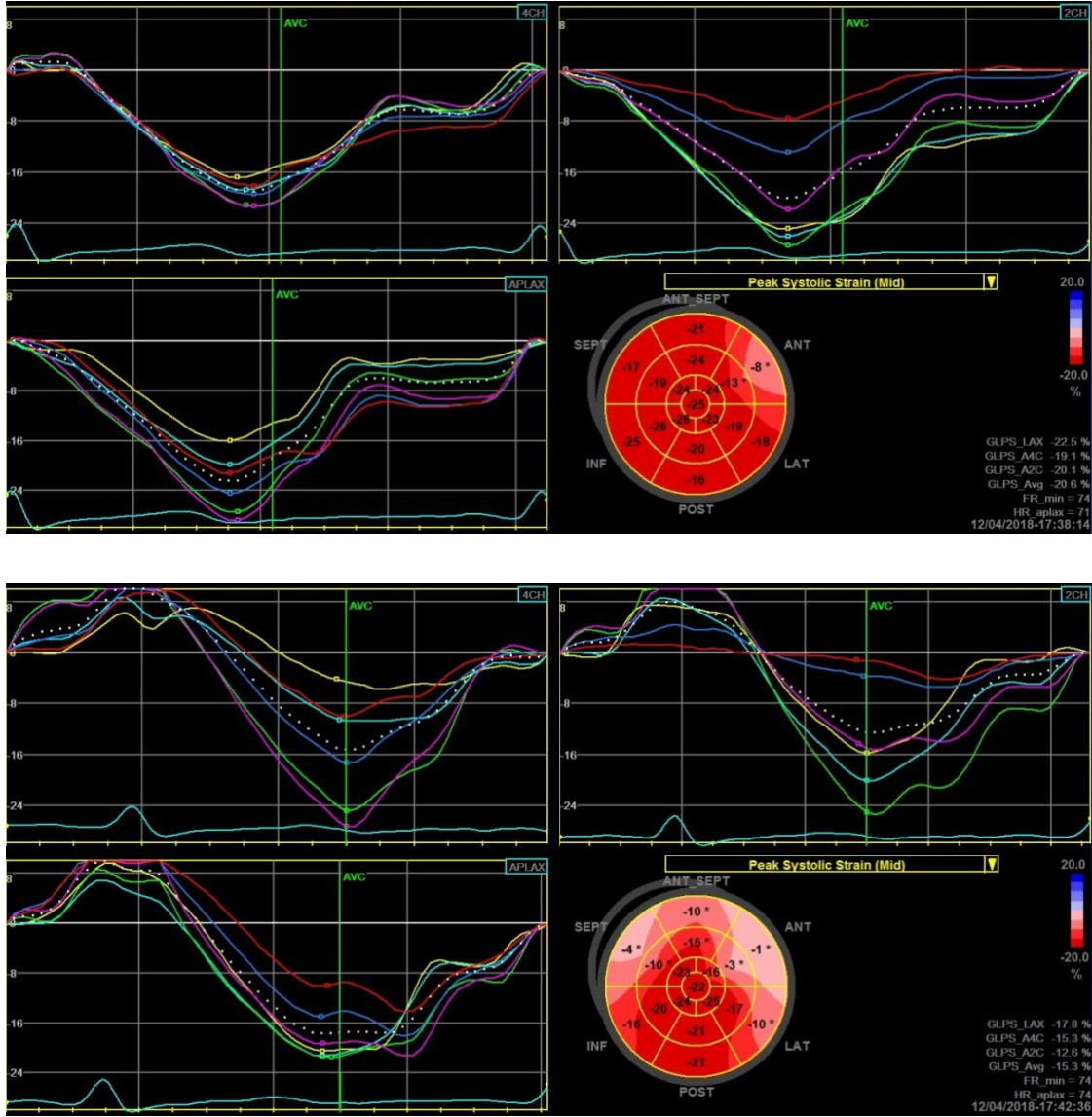


şekil 4.1 miR34a ve pre-miR34a değişimi

#### 4.5. Miyokardiyal deformite açısından grupların karşılaştırılması

Literatürde antrasiklin ilişkili kardiyotoksisitenin erken tanınmasında sol ventrikül global longitudinal strain(GLS) analizlerinde bazal değerlerine göre % 10-15'lik bir azalmanın önemli bir yol gösterici olduğu belirtilmiştir. Fakat bununla ilgili kesin bir cutoff değer bulunmamaktadır. Bu sebeple 3 farklı cutoff'a göre ayrı ayrı analizler yapılarak sırasıyla tablo 4.4, tablo 4.5 ve tablo 4.6 'da verilmiştir.

Sağ ventrikül disfonksiyonunu gösteren TAPSE değerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir değişim her üç cutoff değerinde de gözlenmektedir. Troponin-I düzeyindeki anlamlı değişim GLS % 15 cutoff'unda saptanmaktadır. MiR34a ve premiR34a düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Mir34a/ premiR34a oranındaki artış istatistiksel olarak her üç cutoff için de anlamlı bulunmasa da dikkati çekmiştir.



Şekil 4.2 Antrasiklin Sonrası GLS değişimi

Tablo 4.4 GLS'de % 10 değişim

Tedavi ile oluşan fark	GLS<10 N=33	GLS>10 N=18	p
Troponin-I	0,05±0,05	0,06±0,05	0,421
TAPSE	,72±3,91	2,74±2,79	<b>0,109</b>
Septal E/e	1,0±1,75	,89±2,69	0,759
Lateral E/e	0,67±1,68	0,95±2,39	0,935
MiR34a	1,56±2,21	1,64±1,91	0,649
Pre-34a	1,00±2,30	0,99±2,53	0,635
Mir34a/Pre34a	,77±1,51	2,1±3,12	0,429

Tablo 4.5 GLS'de % 13 değişim

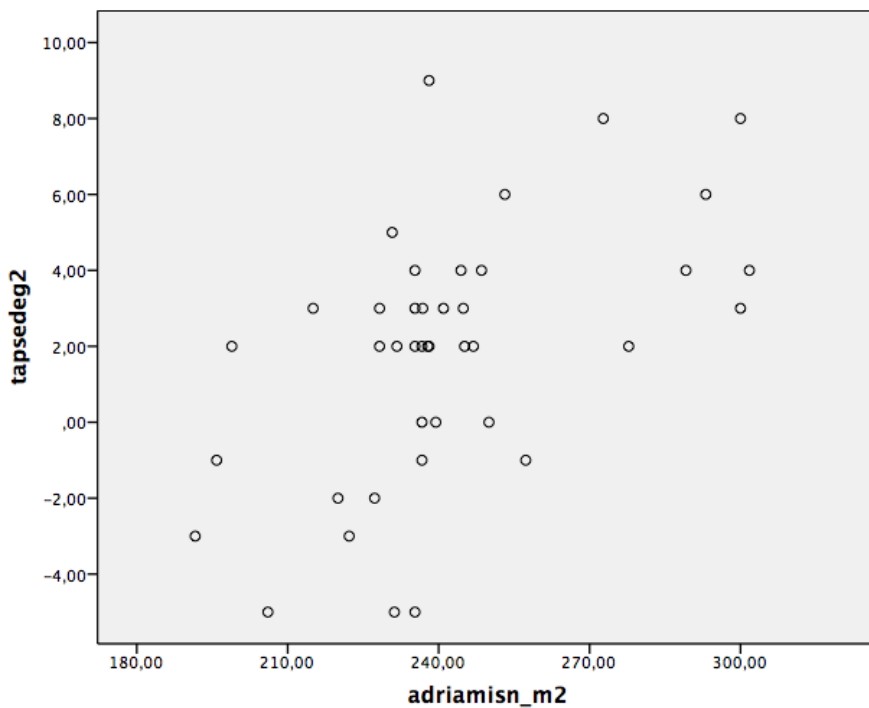
Tedavi ile oluşan fark	GLS<13 N=24	GLS>13 N=17	p
Troponin-I	0,05±0,04	0,07±0,06	0,199
TAPSE	,92±3,63	3,12±2,55	<b>0,077</b>
Septal E/e	,96±1,71	,94±2,54	0,649
Lateral E/e	0,79±1,67	,94±2,54	0,914
MiR34a	1,34±1,99	1,72±1,97	0,44
Pre-34a	1,32±2,56	1,03±2,61	0,40
Mir34a/Pre34a	,62±1,48	2,43±3,14	<b>0,073</b>

Tablo 4.6 GLS'de % 15 değişim

Tedavi ile oluşan fark	GLS<15 N=28	GLS>15 N=13	p
Troponin-I	0,04±0,04	0,08±0,06	<b>0,01</b>
TAPSE	1,14±3,41	3,31±2,90	<b>0,095</b>
Septal E/e	1,07±1,76	,69±2,98	0,989
Lateral E/e	0,79±1,95	1,0±2,31	0,989
MiR34a	1,66±2,16	1,16±1,49	0,88
Pre-34a	1,23±2,42	1,14±2,90	0,54
Mir34a/Pre34a	,94±1,89	2,31±3,28	<b>0,376</b>

#### 4.6. Adriamisin dozu ile EKO parametreleri ve miR34a arasındaki ilişki

GLS değişimine göre yapılan kardiyak deformite varlığı değerlendirmesinde deformite olanlar ile olmayan arasında kümülatif adriamisin dozu açısından anlamlı fark bulunmamaktadır. Fakat kümülatif adriamisin dozu ile TAPSE arasında orta derecede korelasyon saptanmıştır(  $r^2=,545$   $p<0,001$ ). Yani kümülatif adriamisin dozu arttıkça TAPSE değişimi artmaktadır. Kümülatif adriamisin dozunu  $240\text{mg}/\text{m}^2$  ve üzerinde alanlar ile  $240\text{mg}/\text{m}^2$ 'nin altında olanlar karşılaştırıldığında miR34a düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.3 Kümülatif adriamisin dozu(  $\text{mg}/\text{m}^2$ )-TAPSE korelasyon eğrisi

#### 4.7. Tümör özellikleri ile miR34a arasındaki ilişki

Tümör çapı ve grade'i göz önüne alınarak yapılan değerlendirmelerde miR34a düzeyleri ile farklı gradeler veya çaplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Yine tümörün moleküler özelliklerinden olan HER2 , ER ve PR durumları ile miR34a düzeyleri ilişkilendirilememiştir. Yüksek proliferasyon indeksine sahip grupta miR34a/ pre-mir34a oranında, düşük proliferasyon indeksine sahip gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Lenf nodu tutulumu var ise mir34a düzeyinde ve mir34a/ pre- miR34 oranında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bir artış tespit edilmiştir

Tablo 4.7 . Ki67 indeksi ve lenf nodu durumu ile miR34a arasındaki ilişki

	<b>Ki67&lt;30</b> n=19	<b>Ki67≥30</b> n=18	<b>p</b>
<b>MiR34a</b>	0,91±1,5	2,04±2,22	,153
<b>Pre-miR34a</b>	1,3±2,5	,86±2,59	,159
<b>miR34a/pre-miR34a</b>	,29±1,13	2,56±3,02	<b>,007</b>
	<b>Lenf nodu yok</b> n=11	<b>Lenf nodu var</b> n=30	
<b>MiR34a</b>	,76±1,5	1,77±2,05	<b>,055</b>
<b>Pre-miR34a</b>	,95±2,3	1,29±2,65	,859
<b>miR34a/pre-miR34a</b>	,54±1,5	1,71±2,7	<b>,063</b>

Tablo 4.8 Tedavi modalitesi ile mir34a düzeyleri arasındaki ilişki

	<b>Adjuvan</b> N=26	<b>Neoadjuvan</b> N=8	<b>Metastatik</b> N=7	<b>p</b>
<b>MiR34a</b>	1,3±1,8	2,59±1,96	1,0±2,3	<b>,072</b>
<b>Pre-miR34a</b>	1,56±2,67	1,32±3	-,29±,37	<b>,049</b>
<b>miR34a/pre-miR34a</b>	1,10±2,55	2,11±2,80	1,72±1,91	,261

## 5. TARTIŞMA

Erken teşhis ve tedavi alanındaki gelişmeler meme kanseri tanısı konan hastaların yaşam sürelerinde belirgin bir uzama sağlamıştır. Son 10 yıl içinde; yılda ~% 2'lik mortalite azalması ile birlikte, meme kanseri teşhisinden 5 yıl sonra hayatta kalan kadınların oranı % 90'ın üzerine çıkmıştır[2]. Meme kanserinden kurtulan kadınların artması ile birlikte bu popülasyonda kardiyovasküler hastalıklarda artış olmuştur[96]. 50 yaş ve üzerinde meme kanserinden kurtulanlar için kardiyovasküler hastalıklar, kanser dışı ölümlerin % 35'ini oluşturarak kansere bağlı olmayan ölümlerin en büyük nedenidir[97]. Kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin meme kanserinden kurtulanlarda yüksek olmasının 2 önemli nedeni vardır. Bunlardan biri; obezite, sigara, yetersiz fiziksel aktivite, kötü beslenme gibi ortak risk faktörleridir. Diğeri ise meme kanseri tedavisinde kullanılan kardiyotoksik ajanlardır[98]. Meme kanseri tedavisinin omurgasını oluşturan ajanlardan biri olan antrasiklinlerin kardiyotoksik etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Antrasiklin bazlı kemoterapi alan ve kür sağlanan hastalarda kardiyak disfonksiyon bozukluğu çoğunlukla tedavi sonrası 10-15.yıllarda görülmektedir[99]. Antrasikline bağlı gelişebilecek kardiyotoksisiteyi erken tanımak ve önlem almak burada ön plana çıkmaktadır. Kardiyak troponinler, kardiyomyosit hasarı sonucu saptanması nedeniyle bu alandaki ihtiyacı karşılayamamaktadır. Bu amaçla kullanılabilir biyobelirteç arayışı araştırmacıları mikroRNA'lar etrafında toplamıştır.

MiR-34 aile üyelerinin (miR-34a, -34b ve -34c), strese (örnek :miyokardiyal infarktüs) yanıt olarak kalpte upregüle olduğu ve kardiyak fonksiyonda yaşa bağlı azalmaya katkı sağladığı gösterilmiştir. Özellikle miR34a, kalpte ağırlıklı olarak ifade edilen, hücre döngüsü, apoptoz, yaşlanma, farklılaşma ve hücre gelişim ile ilgili çeşitli hedef proteinleri modüle etmektedir[6, 88]. Desai ve arkadaşları; doksorubisine maruz bırakılan fare miyokard dokusundaki miR34a düzeylerini değerlendirmiş ve miR34a'nın troponinlerden farklı olarak henüz daha kardiyomyosit nekrozu oluşmadan erken dönemde kalp dokusunda upregüle olduğunu göstermişler[90]. Piegari ve arkadaşları, doksorubisine maruz kalan ratların kardiyak progenitör hücreleri de dahil olmak üzere kalp hücrelerinde miR34a ekspresyonunun arttığını bildirmişler. Bu çalışmada miR34a'nın rat plazma düzeylerinin de arttığının gösterilmesi, doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite belirteci olabileceği yönündeki düşünceleri gündeme getirmiştir. Mir34a'nın apoptoz ve hücre döngüsü üzerine olan etkilerinin ortaya konmasından sonra Anti-miR34a ile farmakolojik inhibisyonu rat KPHlerinin canlılığı,

apoptozu ve yaşlanması üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir[7]. Mir34a'nın kardiyotoksisite göstergesi olabileceği yönündeki ilk insan çalışması Fréres ve arkadaşlarına aittir. Bu çalışma lokal ileri meme kanseri hastalarında neoadjuvan tedavi sonrası dolaşımdaki mikroRNA değişimlerinin ortaya konulması amacıyla tasarlanmış fakat ikincil sonuç olarak epirubisin tedavisi sonrası artan mir34a'nın kardiyak troponin-T ile orta derecede korele olduğu bulunmuştur[92]. Bu tez çalışması devam ederken Fréres ve arkadaşları, lokal ileri meme kanseri hastalarında antrasiklin tedavisi ile değişen dolaşımdaki kardiyak biyobelirteçleri incelenmiştir. Antrasiklin olarak epirubisinin kullanıldığı bu çalışmada miR34a düzeyleri tedavi öncesinde, ortasında, bitiminde ve KT tamamlandıktan 3 ay sonra olmak üzere toplamda 4 kez değerlendirilmiş olup en fazla tedavi ortasında olmak üzere tüm ölçümlerde miR34a düzeylerinde belirgin bir artış saptanmıştır. Fakat miR34a düzeyleri ile SVEF ve kardiyak troponin T arasında korelasyon bulunamamıştır[100].

Bizim çalışmamızda da doksorubisin bazlı KT alan meme kanseri hastalarında miR34a düzeylerinin tedavi sonrası bazaline göre literatür ile uyumlu olarak arttığı gösterilmiştir. Fakat Fréres ve arkadaşlarının yaptığı iki çalışmada da miR34a artışı bizim çalışmamızdan daha yüksektir. Bunun sebebi, bu çalışmalardaki hastalar lokal ileri neoadjuvan tedavi alan meme kanseri hastası iken bizim popülasyonumuzun yaklaşık 2/3'si cerrahi sonrası adjuvan tedavi alan hastalardan oluşması olabilir. Bizim örneklememizde de neoadjuvan tedavi alan hastaların miR34a düzeyleri ve miR34a/pre34a oranları adjuvan tedavi alanlara göre yüksek bulunmuştur. Adjuvan tedavi alanlarda tümör yükünün düşük olması nedeniyle tedavi ile olan tümör supresör miR34a değişiminin, neoadjuvan olarak tedavi alan lokal ileri meme kanseri hastalarından daha az olabileceği düşünülmektedir. Tümör baskılayıcı p53'ün DNA hasarı üzerinde hem büyümeyi durdurduğu hem de apoptozisi desteklediği bilinmektedir. MiR-34a ise doğrudan p53 tarafından anti tümör fonksiyonlarını uygulamak için indüklenmektedir. Antrasiklinlerin neden olduğu DNA kırıkları ve p53 aktivasyonu, antrasiklin tedavisi sonrası oluşan miR-34a upregülasyonunu açıklayabilir[101].

Bu çalışma, miR34a düzeyleri ile birlikte prekürsörü olan pre-miR34a düzeylerinin de ölçüldüğü, immatür mikroRNAların klinik olarak değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışmadır. Tedavi ile miR34a/premiR34a oranının artması doksorubisinin mikroRNA34a biyogenezinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Bu çıkarımın desteklenmesi için için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hastalarda oluşması öngörülen asemptomatik miyokardiyal deformasyonu değerlendirmek için troponin-I düzeylerine bakıldı ve nokta takip metodu ile ekokardiyografik olarak strain analizi yapıldı. Antrasiklinle ilişkili kardiyotoksisitenin taranmasında ve saptanmasında pratikte yaygın olarak ekokardiyografi ile tespit edilen sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (SVEF) kullanılmaktadır. Fakat SVEF'nun tekniğe bağlı olarak çok değişkenlik göstermesi ve çoğunlukla geç dönemde etkilenmesi önemli kısıtlılıklarıdır[102]. SVEF etkilenmeden önce gerçekleşen miyokardiyal deformasyonu göstermede ekokardiyografi strain analizleri giderek artan oranda kullanılmaktadır[103]. Biz de bu amaçla hastaların olası kardiyak deformasyon analizlerini tedavi öncesi ve sonrası değerlendirerek GLS değişim oranlarını hesapladık. Doksorubisin tedavisi sonrası yapılan değerlendirmede bazala göre GLS'de anlamlı bir azalma ve kardiyak troponin-I'da artma tespit edildi. Fakat korelasyon analizlerine bakıldığında troponin -I, miR34a, pre-miR34 ve GLS değişimi arasında anlamlı bir korelasyon saptanamadı. Literatür de miR34a- kardiyak troponin T arasındaki korelasyonu içeren iki çalışma mevcuttur. İkisini de Ferrer ve arkadaşlarının çalışması olup birinde 25 hastalık lokal ileri meme kanseri hastasında korelasyon saptanır iken , diğerinde 45 lokal ileri meme kanserinde korelasyon saptanmamıştır[92, 100].

Literatürde çalışmalar arasında kümülatif antrasiklin dozları arasında fark olsa da ( $<300 \text{ mg / m}^2 > 350 \text{ mg / m}^2$ ), düşük ve yüksek dozların her ikisinde de strain analizlerinde gerileme olduğu gösterilmiştir. Bu da miyokardiyal hasarın düşük antrasiklin dozlarında da olabileceğini vurgulamaktadır[99]. Bizim çalışmamızda antrasiklin olarak doksorubisin kullanılmış olup, kümülatif doksorubisin dozu  $240 \text{ mg/m}^2$  nin üzerinde tedavi alanlar ile altında alanlar karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda, sağ ventrikül disfonksiyonunu gösteren TAPSE parametresi dışında anlamlı farklılık saptanmadı.  $>240 \text{ mg/m}^2$  nin üzerinde doksorubisin alanlarda sağ ventrikül disfonksiyonunun işaretçisi olan TAPSE parametresindeki değişim daha fazla görülmektedir. Antrasiklinlerin sağ ventrikül disfonksiyonuna neden olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur. Sağ ventrikül fonksiyonlarının ihmal edilmemesi, özellikle antrasiklin alan hastalarda mutlaka değerlendirilmesi gerektiği yönünde görüşler literatürde yer almaktadır[104, 105].

GLS'deki değişime göre olası miyokardiyal deformasyonu tespit edilen hastalar ile deformasyonu olmadığı kabul edilen hastalar miR34a, troponin değişimi, septal ve lateral e/é ve TAPSE değişimi açısından karşılaştırıldı. GLS'deki değişim yüzdesi ile ilgili kesin bir cut



off değeri olmamakla birlikte, bu alanda yapılan çalışmaların meta analizleri sonucu GLS'nin % 10-15 aralığında değişimi erken kardiyotoksisite prediktörü olarak kabul edilmektedir[44]. Biz de bu verilerden yola çıkarak %10-%15 aralığının ortası %13 değişimi cutoff kabul ederek yaptığımız analizde miR34a/ premiR34a oranının belirgin arttığını tespit ettik(p=,073). GLS'nin % 15 değişimi cutoff kabul edildiği zaman myokardiyal deformasyon grubunda troponin değişiminin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür(p=0,01). Miyokardiyal deformasyon göstergesi olarak GLS değişimi cutoff kaç alınır ise alınsın miR34a /premir34a oranında artış olduğu görülmüştür. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamıştır. Bu durum çalışmanın gücünün yeterli olmadığını düşündürmektedir ve daha geniş popülasyonlarda değerlendirilmeyi hak etmektedir.

Ki 67 proliferasyon indeksi >% 30 olanlarda ve lenf nodu pozitifliği olan hastalarda matür / immatür oranının arttığı saptanmıştır. İnsan meme kanseri dokusunda yapılan klinikopatolojik inceleme miR34a'nın az ekspresyonunun ilerlemiş tümör klinik evresi ile ilişkili olduğunu göstermiştir[106].Geniş bir meme kanseri kohortunda, patoloji preparatlarında azalmış miR34a ekspresyonunun yaşam süresi üzerine olumsuz etkilediği bildirilmiştir[107]. MiR34a ile ilişkili en çok çalışılan konulardan biri de meme kanseri hastalarında prognostik bir belirteç olabileceği yönündedir.

Farklı moleküler subtipleri ve farklı evrelerdeki hastaları içeren heterojen bir meme kanseri popülasyonunda doksorubisin sonrası miR34a, prekürsörü pre-miR34a ve matur/ immatür oranlarını doksorubisin ilişkili erken kardiyotoksisite belirteci olarak inceledik. Klinik olarak daha önce benzerine rastlanmamış bu yenilikçi çalışmanın hasta sayısı ve kısa takip süresi en önemli kısıtlılıklarıdır. Özellikle matur/ immatür miR34a oranlarında belirgin farklılık saptanmasına rağmen istatistiksel anlamlılık elde edilememesi çalışmanın gücünün yetersiz kalması ile ilişkilendirildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların hiç birinde EF % 55'in altına düşmemiş ve kalp yetmezliği semptomları gelişmemiştir. Bakmış olduğumuz erken kardiyotoksisite parametrelerinin tam olarak neyi işaret ettiğini öğrenebilmemiz için bu hastaların uzun dönem takiplerinin yapılması gerekmektedir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1.Dokсорubisin tedavisi sonrası sol ventrikül sistolik fonksiyonlarını gösteren global longitudinal strain ( GLS) ölçümünde ve sağ ventrikül fonksiyonları gösteren TAPSE ölçümlerinde anlamlı bir düşüş olmuştur.

2.Dokсорubisin tedavisi sonrası diyastolik fonksiyonları değerlendiren lateral ve septal e/é parametrelerinde artma olmuştur.

3.Tedavi sonrası miR34a, pre-miR34a ve matur/ immatür oranında artış saptanmıştır.

4.GLS değişimi, troponin değişimi ve miR34a arasında korelasyon saptanamamıştır.

5.GLS değişimine göre miyokardiyal deformasyonu saptanan hastalarda , saptanamayanlara göre miR34a/ pre-miR34a oranında belirgin artış saptanmıştır.

6.Bulgular dokсорubisin tedavisinin miR34a biyogenezinde etkili olduğunu düşündürmüştür.

7.Kümülatif dokсорubisin dozu ile GLS, troponin-I ve miR34a düzeyleri arasında korelasyon saptanmaz iken , TAPSE değişimi ile arasında korelasyon izlenmiştir.

8. Dokсорubisin dozu arttıkça sağ ventrikül disfonksiyon parametresi olan TAPSE değişimi de artmıştır.

9. Proliferasyon indeksi olan Ki67>%30 olanlarda ve lenf nodu pozitif olan hastalarda miR34a/ premiR34a düzeyi artmıştır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 2015, 136(5):E359-86.
2. Siegel R, Miller K, Jemal A: Cancer Statistics, 2017 *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 7-30.
3. Raj S, Franco VI, Lipshultz SE: Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Current treatment options in cardiovascular medicine* 2014, 16(6):315.
4. Lotrionte M, Biondi-Zoccai G, Abbate A, Lanzetta G, D'Ascenzo F, Malavasi V, Peruzzi M, Frati G, Palazzoni G: Review and meta-analysis of incidence and clinical predictors of anthracycline cardiotoxicity. *The American journal of cardiology* 2013, 112(12):1980-1984.
5. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM: Circulating microRNAs. *Circulation research* 2012, 110(3):483-495.
6. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A: MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 2013, 495(7439):107-110.
7. Piegari E, Russo R, Cappetta D, Esposito G, Urbanek K, Dell'Aversana C, Altucci L, Berrino L, Rossi F, De Angelis A: MicroRNA-34a regulates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Oncotarget* 2016, 7(38):62312.
8. Zhu J-N, Fu Y-H, Hu Z-q, Li W-Y, Tang C-M, Fei H-W, Yang H, Lin Q-x, Gou D-M, Wu S-L: Activation of miR-34a-5p/Sirt1/p66shc pathway contributes to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Scientific reports* 2017, 7(1):11879.
9. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015, 65(2):87-108.
10. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A: Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 2016, 66(4):271-289.
11. TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Kanser İstatistikleri. Ankara. 2017,44-45

12. Group EBCTC: Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 1998, 352(9132):930-942.
13. Hortobagyi G. Breast Cancer. Kantarjian H, Wolff A, editors. The MD Anderson Manual of Medical Oncology, 3rd edition. USA 2016.
14. Group EBCTC: Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet* 2012, 379(9814):432-444.
15. Shulman LN, Berry DA, Cirincione CT, Becker HP, Perez EA, O'Regan R, Martino S, Shapiro CL, Schneider CJ, Kimmick G: Comparison of doxorubicin and cyclophosphamide versus single-agent paclitaxel as adjuvant therapy for breast cancer in women with 0 to 3 positive axillary nodes: CALGB 40101 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology* 2014, 32(22):2311-2317.
16. Buzdar AU, Singletary SE, Valero V, Booser DJ, Ibrahim NK, Rahman Z, Theriault RL, Walters R, Rivera E, Smith TL: Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of a prospective randomized trial. *Clinical Cancer Research* 2002, 8(5):1073-1079.
17. Turner N, Biganzoli L, Di Leo A: Continued value of adjuvant anthracyclines as treatment for early breast cancer. *The Lancet Oncology* 2015, 16(7):e362-e369.
18. Jones SE, Savin MA, Holmes FA, O'shaughnessy JA, Blum JL, Vukelja S, McIntyre KJ, Pippin JE, Bordelon JH, Kirby R: Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006, 24(34):5381-5387.
19. De Lena M, Zucali R, Viganotti G, Valagussa P, Bonadonna G: Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced (T 3b-T 4) breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1978, 1(1):53-59.
20. Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, Cristofanilli M, Booser DJ, Pusztai L, Rivera E: Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23(25):5983-5992.
21. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, Margolese RG, Hoehn JL, Vogel VG, Dakhil SR: Preoperative chemotherapy: updates of national surgical adjuvant breast and bowel project protocols B-18 and B-27. *Journal of Clinical Oncology* 2008, 26(5):778-785.

22. Hoogstraten B, George S, Samal B, Rivkin S, Costanzi J, Bonnet J, Thigpen T, Braine H: Combination chemotherapy and adriamycin in patients with advanced breast cancer. A Southwest Oncology Group study. *Cancer* 1976, 38(1):13-20.
23. Serrano J, Palmeira C, Kuehl D, Wallace K: Cardioselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1999, 1411(1):201-205.
24. Chabner BA BJ, Cleary J, et al: Chemotherapy of neoplastic diseases., 13th edn; 2017.
25. Levitt G, Anazodo A, Burch M, Bunch K: Cardiac or cardiopulmonary transplantation in childhood cancer survivors: an increasing need? *European journal of cancer* 2009, 45(17):3027-3034.
26. Srikanthan K, Klug R, Tirona M, Thompson E, Visweshwar H, Puri N, Shapiro J, Sodhi K: Creating a biomarker panel for early detection of chemotherapy related cardiac dysfunction in breast cancer patients. *Journal of clinical & experimental cardiology* 2017, 8(3).
27. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu L-S, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET: Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine* 2012, 18(11):1639-1642.
28. Lyu YL, Kerrigan JE, Lin C-P, Azarova AM, Tsai Y-C, Ban Y, Liu LF: Topoisomerase II $\beta$ -mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer research* 2007, 67(18):8839-8846.
29. Sawyer DB: Anthracyclines and heart failure. *New England Journal of Medicine* 2013, 368(12):1154-1156.
30. Middleman E, Luce J, Frei E: Clinical trials with adriamycin. *Cancer* 1971, 28(4):844-850.
31. Mackey JR, Martin M, Pienkowski T, Rolski J, Guastalla J-P, Sami A, Glaspy J, Juhasz E, Wardley A, Fornander T: Adjuvant docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: 10-year follow-up of the phase 3 randomised BCIRG 001 trial. *The Lancet Oncology* 2013, 14(1):72-80.
32. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS: Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. *Cancer* 2003, 97(11):2869-2879.

33. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP: Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *New England Journal of Medicine* 1991, 324(12):808-815.
34. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Dalton VM, Mone SM, Gelber RD, Colan SD: Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology* 2005, 23(12):2629-2636.
35. Lipshultz SE: Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1998, 1(27):53-68.
36. Adams MJ, Lipshultz SE: Pathophysiology of anthracycline-and radiation-associated cardiomyopathies: Implications for screening and prevention. *Pediatric blood & cancer* 2005, 44(7):600-606.
37. Barry E, Alvarez JA, Scully RE, Miller TL, Lipshultz SE: Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2007, 8(8):1039-1058.
38. Curigliano G, Cardinale D, Suter T, Plataniotis G, De Azambuja E, Sandri MT, Criscitiello C, Goldhirsch A, Cipolla C, Roila F: Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* 2012, 23(suppl\_7):vii155-vii166.
39. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, Habib G, Lenihan DJ, Lip GY, Lyon AR: 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2016, 37(36):2768-2801.
40. Bottinor WJ, Migliore CK, Lenneman CA, Stoddard MF: Echocardiographic assessment of Cardiotoxic effects of cancer therapy. *Current cardiology reports* 2016, 18(10):99.
41. Pudil R, Horacek J, Strasova A, Jebavy L, Vojacek J: Monitoring of the very early changes of left ventricular diastolic function in patients with acute leukemia treated with anthracyclines. *Exp Oncol* 2008, 30(2):160-162.
42. Stoddard MF, Seeger J, Liddell NE, Hadley TJ, Sullivan DM, Kupersmith J: Prolongation of isovolumetric relaxation time as assessed by Doppler

- echocardiography predicts doxorubicin-induced systolic dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 1992, 20(1):62-69.
43. Pizzino F, Vizzari G, Qamar R, Bomzer C, Carerj S, Zito C, Khandheria BK: Multimodality imaging in cardiooncology. *Journal of oncology* 2015, 2015.
  44. Thavendiranathan P, Poulin F, Lim K-D, Plana JC, Woo A, Marwick TH: Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: a systematic review. *Journal of the American College of Cardiology* 2014, 63(25):2751-2768.
  45. Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, LabTech AT, Civelli M, Lamantia G, Cinieri S, Martinelli G, Cipolla CM, Fiorentini C: Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology* 2000, 36(2):517-522.
  46. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G, Civelli M, Peccatori F, Martinelli G, Fiorentini C: Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004, 109(22):2749-2754.
  47. Cardinale D, Sandri M, Martinoni A, Borghini E, Civelli M, Lamantia G, Cinieri S, Martinelli G, Fiorentini C, Cipolla C: Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Annals of Oncology* 2002, 13(5):710-715.
  48. Kilickap S, Barista I, Akgul E, Aytemir K, Aksoyek S, Aksoy S, Celik I, Kes S, Tekuzman G: cTnT can be a useful marker for early detection of anthracycline cardiotoxicity. *Annals of oncology* 2005, 16(5):798-804.
  49. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, Martinelli G, Veglia F, Fiorentini C, Cipolla CM: Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 2006, 114(23):2474-2481.
  50. van Dalen EC, Michiels E, Caron HN, Kremer L: Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2010, 5.
  51. Feijen EA, Leisenring WM, Stratton KL, Ness KK, Van Der Pal HJ, Caron HN, Armstrong GT, Green DM, Hudson MM, Oeffinger KC: Equivalence ratio for daunorubicin to doxorubicin in relation to late heart failure in survivors of childhood cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2015, 33(32):3774-3780.

52. Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, Rasmussen SL, Blumenschein GR, Freireich EJ: Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med* 1982, 96(2):133-139.
53. Chow EJ, Asselin BL, Schwartz CL, Doody DR, Leisenring WM, Aggarwal S, Baker KS, Bhatia S, Constine LS, Freyer DR: Late mortality after dexrazoxane treatment: a report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology* 2015, 33(24):2639-2645.
54. Bures J, Jirkovska A, Sestak V, Jansova H, Karabanovich G, Roh J, Sterba M, Simunek T, Kovarikova P: Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite. *Toxicology* 2017, 392:1-10.
55. Vrooman LM, Neuberg DS, Stevenson KE, Asselin BL, Athale UH, Clavell L, Cole PD, Kelly KM, Larsen EC, Laverdière C: The low incidence of secondary acute myelogenous leukaemia in children and adolescents treated with dexrazoxane for acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. *European Journal of Cancer* 2011, 47(9):1373-1379.
56. Henriksen PA: Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart* 2017:heartjnl-2017-312103.
57. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, Oguzhan A, Eryol NK, Topsakal R, Ergin A: Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 2006, 48(11):2258-2262.
58. Kaya MG, Ozkan M, Gunebakmaz O, Akkaya H, Kaya EG, Akpek M, Kalay N, Dikilitas M, Yarlioglues M, Karaca H: Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *International journal of cardiology* 2013, 167(5):2306-2310.
59. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, Civelli M, Lamantia G, Colombo N, Curigliano G: Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 2015:CIRCULATIONAHA.114.013777.
60. Wang F, Chen C, Wang D: Circulating microRNAs in cardiovascular diseases: from biomarkers to therapeutic targets. *Frontiers of medicine* 2014, 8(4):404-418.



61. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R: Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development* 2006, 20(5):515-524.
62. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75(5):843-854.
63. Garzon R, Calin GA, Croce CM: MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine* 2009, 60:167-179.
64. Hermeking H: The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 2010, 17(2):193-199.
65. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP: Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010, 466(7308):835-840.
66. Esteller M: Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* 2011, 12(12):861-874.
67. Calin GA, Croce CM: MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer* 2006, 6(11):857-866.
68. Kozomara A, Griffiths S: JONES, 2011 miRBase: integrating microRNA annotation and deep--sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 39.
69. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 2009, 19(1):92-105.
70. Kawai S, Amano A: BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *The Journal of cell biology* 2012, 197(2):201-208.
71. Babiarz JE, Blelloch R: Small RNAs - their biogenesis, regulation and function in embryonic stem cells. In: *StemBook*. edn. Cambridge (MA); 2008.
72. Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, Takeyama K, Minami Y, O'Malley BW, Kato S: Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Molecular cell* 2009, 36(2):340-347.
73. Wang X, Zhao X, Gao P, Wu M: c-Myc modulates microRNA processing via the transcriptional regulation of Droscha. *Sci Rep* 2013, 3:1942.
74. Abdelmohsen K, Tominaga-Yamanaka K, Srikantan S, Yoon JH, Kang MJ, Gorospe M: RNA-binding protein AUF1 represses Dicer expression. *Nucleic acids research* 2012, 40(22):11531-11544.
75. Yu Z, Wang L, Wang C, Ju X, Wang M, Chen K, Loro E, Li Z, Zhang Y, Wu K *et al*: Cyclin D1 induction of Dicer governs microRNA processing and expression in breast cancer. *Nature communications* 2013, 4:2812.

76. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* 2008, 18(10):997-1006.
77. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ: Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics* 2010, 73(10):1907-1920.
78. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB: p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current Biology* 2007, 17(15):1298-1307.
79. Bouhallier F, Allioli N, Laval F, Chalmel F, Perrard M-H, Durand P, Samarut J, Pain B, Rouault J-P: Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *Rna* 2010, 16(4):720-731.
80. Sun F, Wan M, Xu X, Gao B, Zhou Y, Sun J, Cheng L, Klein O, Zhou X, Zheng L: Crosstalk between miR-34a and notch signaling promotes differentiation in apical papilla stem cells (SCAPs). *Journal of dental research* 2014, 93(6):589-595.
81. Rathod SS, Rani SB, Khan M, Muzumdar D, Shiras A: Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways. *FEBS Open Bio* 2014, 4(1):485-495.
82. Sun T, Kong X, Du Y, Li Z: Aberrant microRNAs in pancreatic cancer: researches and clinical implications. *Gastroenterology research and practice* 2014, 2014.
83. Shi Y, Liu C, Liu X, Tang DG, Wang J: The microRNA miR-34a inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) growth and the CD44hi stem-like NSCLC cells. *PloS one* 2014, 9(3):e90022.
84. Bu P, Chen K-Y, Chen JH, Wang L, Walters J, Shin YJ, Goerger JP, Sun J, Witherspoon M, Rakhilin N: A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets Notch in colon cancer stem cells. *Cell stem cell* 2013, 12(5):602-615.
85. Dotto GP, Lefort K: miR-34a/SIRT6 in squamous differentiation and cancer. *Cell cycle* 2014, 13(7):1055-1056.
86. Li L: Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miR-34a in cancer. *Journal of cancer research and therapeutics* 2014, 10(4):805.
87. Bernardo BC, Gao X-M, Winbanks CE, Boey EJ, Tham YK, Kiriazis H, Gregorevic P, Obad S, Kauppinen S, Du X-J: Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109(43):17615-17620.

88. Chen F, Hu SJ: Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: A review. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 2012, 26(2):79-86.
89. Yang Y, Cheng H-W, Qiu Y, Dupee D, Noonan M, Lin Y-D, Fisch S, Unno K, Sereti K-I, Liao R: MicroRNA-34a Plays a Key Role in Cardiac Repair and Regeneration Following Myocardial Infarction Novelty and Significance. *Circulation research* 2015, 117(5):450-459.
90. Desai VG, Kwekel JC, Vijay V, Moland CL, Herman EH, Lee T, Han T, Lewis SM, Davis KJ, Muskhelishvili L: Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicology and applied pharmacology* 2014, 281(2):221-229.
91. Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Usami M, Hara M, Kitamura T, Hamasaki T, Nanto S, Kawahara Y: Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circulation research* 2013:CIRCRESAHA. 113.301209.
92. Frères P, Josse C, Bovy N, Boukerroucha M, Struman I, Bours V, Jerusalem G: Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression. *Journal of cellular physiology* 2015, 230(2):473-481.
93. Roth C, Rack B, Müller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H: Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research* 2010, 12(6):R90.
94. Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H: Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clinical chemistry* 2013, 59(10):1489-1496.
95. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.
96. Park N-J, Chang Y, Bender C, Conley Y, Chlebowski RT, van Londen G, Foraker R, Wassertheil-Smoller S, Stefanick ML, Kuller LH: Cardiovascular disease and mortality after breast cancer in postmenopausal women: Results from the Women's Health Initiative. *PloS one* 2017, 12(9):e0184174.
97. Patnaik JL, Byers T, DiGuseppi C, Dabelea D, Denberg TD: Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Research* 2011, 13(3):R64.

98. Weaver KE, Foraker RE, Alfano CM, Rowland JH, Arora NK, Bellizzi KM, Hamilton AS, Oakley-Girvan I, Keel G, Aziz NM: Cardiovascular risk factors among long-term survivors of breast, prostate, colorectal, and gynecologic cancers: a gap in survivorship care? *Journal of Cancer Survivorship* 2013, 7(2):253-261.
99. Schmitz KH, Prosnitz RG, Schwartz AL, Carver JR: Prospective surveillance and management of cardiac toxicity and health in breast cancer survivors. *Cancer* 2012, 118(S8):2270-2276.
100. Frères P, Bouznad N, Servais L, Josse C, Wenric S, Poncin A, Thiry J, Moonen M, Oury C, Lancellotti P: Variations of circulating cardiac biomarkers during and after anthracycline-containing chemotherapy in breast cancer patients. *BMC cancer* 2018, 18(1):102.
101. He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D: A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007, 447(7148):1130.
102. Thavendiranathan P, Grant AD, Negishi T, Plana JC, Popović ZB, Marwick TH: Reproducibility of echocardiographic techniques for sequential assessment of left ventricular ejection fraction and volumes: application to patients undergoing cancer chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology* 2013, 61(1):77-84.
103. Geyer H, Caracciolo G, Abe H, Wilansky S, Carerj S, Gentile F, Nesser H-J, Khandheria B, Narula J, Sengupta PP: Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamentals and clinical applications. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2010, 23(4):351-369.
104. Tanindi A, Demirci U, Tacoy G, Buyukberber S, Alsancak Y, Coskun U, Yalcin R, Benekli M: Assessment of right ventricular functions during cancer chemotherapy. *European Journal of Echocardiography* 2011, 12(11):834-840.
105. Tadic M, Cuspidi C, Hering D, Venneri L, Danylenko O: The influence of chemotherapy on the right ventricle: did we forget something? *Clinical cardiology* 2017.
106. Li G, Yao L, Zhang J, Li X, Dang S, Zeng K, Zhou Y, Gao F: Tumor-suppressive microRNA-34a inhibits breast cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52. *Tumor Biology* 2016, 37(6):7481-7491.

107. Agarwal S, Hanna J, Sherman M, Figueroa J, Rimm D: Quantitative assessment of miR34a as an independent prognostic marker in breast cancer. *British journal of cancer* 2015, 112(1):61.