

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİ İLE  
İLİŞKİLİ GENLERİN DELESYON VE / VEYA  
AMPLİFİKASYONLARININ MULTİPLEX LİGATION-DEPENDENT  
PROBE AMPLİFİKATION (MLPA) YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

EMRE TEPELİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

EYLÜL, 2007

KABUL VE ONAY SAYFASI

Emre TEPELİ'nin Doktora Tezi olarak hazırladığı "Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri İle İlişkili Genlerin Delesyon ve/veya Amplifikasyonlarının Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemiyle İncelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

11.09.2007

Üye: Prof.Dr. Gülseren BAĞCI

Üye: Prof.Dr. Muzaffer METİNTAŞ

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN

Üye: Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14./09/2007. tarih ve 712./2318.. sayılı kararı ile onaylanmıştır

Prof.Dr.Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİ İLE  
İLİŞKİLİ GENLERİN DELESYON VE / VEYA  
AMPLİFİKASYONLARININ MULTİPLEX LİGATION-DEPENDENT  
PROBE AMPLİFİKATION (MLPA) YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

EMRE TEPELİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

EYLÜL, 2007

## ÖZET

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır.

Çalışmanın amacı Türkiye’de yeni bir yöntem olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ile Akciğer kanserlerine spesifik dizayn edilmiş olan Salsa MLPA Probemix 126/127 kitleri kullanılarak, akciğer kanserleri ile ilişkilendirilmiş 64 farklı gen bölgesindeki delesyon ve / veya amplifikasyonların incelenerek ortaya konmasıydı.

Çalışmaya İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “ akciğer kanseri” tanısı almış 100 olgu dahil edildi. Her hastaya ait parafine gömülü doku örneklerinden, kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır.

Çalışmada, akciğer kanserli tümöral dokularda en sık 2p, 3p, 13q, 17p ve 16p delesyonları, yine tümöral dokulardan yapılan çalışmalarda 17q, 8p ve 5q amplifikasyonları görülmüştür. Tümöral alana komşu akciğer dokularından lde edilen DNA’ larda yapılan çalışmalarda ise daha az sıklıkta olmak üzere tümöral alanlardakine benzer bölgelerde delesyonlar görülmüştür. Ayrıca özellikle tümöral dokularda 5q, 8p, 9q, 10p, 11p, 11q, 12p, 14q, 17q ve 21q prob bölgelerinde de delesyon saptanmıştır.

Sonuç olarak MLPA yönteminin akciğer kanserlerinin genomik değişimlerinin taramasında kullanılabilir ucuz, hızlı ve güvenilir sonuçlar verebilecek bir teknik olduğu görülmüştür. Elde edilen bulguların literatürle uyumlu olduğu görülmüştür. MLPA tekniği son zamanlarda geliştirilen en önemli moleküler tekniklerden birisidir ve kanser araştırmalarında da rahatlıkla kullanılabilir bir yöntemdir.

Anahtar Sözcükler: Akciğer Kanserleri, Tümör Süpresör Gen, Onkogen, MLPA

## SUMMARY

Lung cancer has the leading mortality rate among all cancers and it is the second most common cause of death following deaths from cardiovascular diseases.

This study was aimed to determine deleted and/or amplified regions of 64 different genes regions previously associated with lung cancer by using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique and SALSA MLPA ProbeMix 126/127 kits which are designed specifically for lung cancer.

This study was performed by analyzing 100 archival samples which had been previously examined histopathologically and diagnosed as “lung cancer” in İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi. DNA extracts from 5 micron paraffin-embedded tissue sections which contain cancerous tissues were used as sample group and 5 micron paraffin-embedded tissue sections which contain well- differentiated normal tissues from the same patients were used as control group in the study.

In the study, most frequently seen deletions in lung cancerous tissue were 2p, 3p, 13q, 17p, 16p and most frequently seen amplifications were 17q, 8p ve 5q. In studies performed in well-differentiated normal lung tissues, deletions in the same region as in cancerous tissue were observed but they were in a lower frequencies. Deletions in 5q, 8p, 9q, 10p, 11p, 11q, 12p, 14q, 17q ve 21q probe regions were seen especially in cancerous tissues.

As a conclusion, it was determined that MLPA is a technique which can give cheap, fast and reliable results in screening lung cancers. The findings obtained in the study is compatible with the literature. MLPA is one of the most important molecular techniques which have been developed recently and it can be used in cancer screening easily and reliably.

**Key Words:** Lung cancer, Tumor Suppressor Gene, Oncogene, MLPA

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b>	iv
<b>SUMMARY</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b>	ix
<b>TABLO DİZİNİ</b>	x
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	5
2.1. Kanser	5
2.1.1. Kanser Nedir?	5
2.1.2. Kanser Türleri	7
2.1.3. Benign ve Malign Neoplazmların Özellikleri	7
2.1.4. Kanserin Gelişimi	8
2.1.5. Tümör Büyümesinin Biyolojisi	10
2.1.6. Kanserin Nedenleri	13
2.1.7. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	14
2.2. Kanser ve Genetik	16
2.2.1. Hücre Döngüsü	18

2.2.2. Hücre Döngüsünün Basamakları	19
2.2.3. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları	20
2.2.4. Hücre Siklusunun Düzenlenmesi	22
2.2.5. Kanserin Genetik Yapısı	26
2.2.6. Onkogenler	27
2.2.7. Tümör Süpresör Genler	29
2.2.8. DNA Tamir Genleri	30
2.3. Akciğer Kanseri	31
2.3.1. Akciğer Kanseri İçin Risk Faktörleri	32
2.3.2. Akciğer Kanserinin Belirtileri	34
2.3.3. Akciğer Kanserinin Tipleri	35
2.3.4. Akciğer Kanserinde Tanı ve Evrelendirme	37
2.4. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi	42
2.4.1 Onkogenlerin Aktivasyonu	43
2.4.2. Tümör Süpresör Genler(TSG)	46
2.4.3. Akciğer Kanserinde Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri	49
2.5. Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi	50
2.5.1. Akciğer Kanserinde MLPA Tekniğinin Kullanımı	52
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>55</b>
3.1. Gereçler	55
3.1.1. Kullanılan Gereçler	55
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	56
3.2. Yöntemler	57
3.2.1. Materyal Seçimi	57

3.2.2. Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu İle Parafine Gömülü Dokudan DNA Elde Etme Protokolü	57
3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	59
3.2.3.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P126 ve 127 Probe Miks İle Hibridizasyonu	59
3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu	59
3.2.3.3. PCR	60
3.2.3.4. ABI 310 Cihazına Yükleme	61
3.2.4.5. Değerlendirme	61
<b>4. BULGULAR</b>	64
4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri	64
4.2. Araştırma Grubu Bireyleri MLPA Bulguları	67
<b>5. TARTIŞMA</b>	87
5.1. Parafine Gömülü Dokulardan DNA Elde Etme Protokollerinin Karşılaştırılması	88
5.2. Çalışma Grubunda Elde Edilen Verilerinin Literatür Bilgileri İle Karşılaştırılması	90
5.2.1. Kromozom 2p, 3p ve 13q Değişimleri	91
5.2.2. Kromozom 17p Değişimleri	93
5.2.3. Kromozom 16p, 10p, 11q, 12p, 9q ve 21q Değişimleri	94
5.2.4. Kromozom 5q, 8p, 9p, 11p, 14q ve 17q Değişimleri	96
5.3. MLPA' nın Kullanılabilirliği	97
5.4. MLPA' nın Avantajları Ve Dezavantajları	101
5.5. MLPA' nın Akciğer Kanseri Araştırmalarında Kullanımı	103
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	105
<b>7. KAYNAKLAR</b>	107
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	114



## ŞEKİL DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 3.2.2.1:</b> Örnek DNA' lara ait %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü	58
<b>Şekil 4.2.1:</b> Değerlendirmeye alınamayan MLPA pik görüntüleri	68
<b>Şekil 4.2.2:</b> Kontrollere ait MLPA Salsa P126 pik görüntüleri ve prob bölgeleri	69
<b>Şekil 4.2.3:</b> Kontrollere ait MLPA Salsa P127 pik görüntüleri ve prob bölgeleri	69
<b>Şekil 4.2.4:</b> 2p, 3p ve 13q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri	70
<b>Şekil 4.2.5:</b> 5q ve 16p kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri	72
<b>Şekil 4.2.6:</b> 11p ve 11q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri	74
<b>Şekil 4.2.7:</b> 17p ve 17q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri	76
<b>Şekil 4.2.8:</b> 3p, 10p ve 14q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri	78
<b>Şekil 4.2.9:</b> 8p kromozom bölgesinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri	80
<b>Şekil 4.2.10:</b> 17q kromozom bölgesinde amplifikasyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüsü ve amplifikasyon görülen prob bölgeleri	82

**TABLO DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.3.4.1:</b> Akciğer Kanserlerinde Yeni Uluslararası TNM Sistemi	39
<b>Tablo 2.3.4.2:</b> Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinde Evre Grupları	40
<b>Tablo 2.5.1.1:</b> MLPA Salsa-P126 akciğer kanseri kiti prob bölgeleri	53
<b>Tablo 2.5.1.2:</b> MLPA Salsa-P127 akciğer kanseri kiti prob bölgeleri	54
<b>Tablo 4.1.1:</b> Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları	65
<b>Tablo 4.1.2:</b> Hastaların ailelerinde kanser öyküsü varlığı dağılımı	65
<b>Tablo 4.1.3:</b> Vakaların histopatolojik tanılarına göre dağılımları	65
<b>Tablo 4.1.4:</b> Vakaların Grade'lerine göre dağılımları	65
<b>Tablo 4.1.5:</b> Vakaların TNM sınıflamasına göre dağılımları	65
<b>Tablo 4.2.1:</b> 2p, 9p ve 13q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları	71
<b>Tablo 4.2.2:</b> 5q ve 16p kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları	73
<b>Tablo 4.2.3:</b> 11p ve 11q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları	75
<b>Tablo 4.2.4:</b> 17p ve 17q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları	77
<b>Tablo 4.2.5:</b> 3p, 10p ve 14q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları	79
<b>Tablo 4.2.6:</b> 8p kromozom bölgesine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları	81
<b>Tablo 4.2.7:</b> 17q kromozom bölgesine ait saptanan amplifikasyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları	83
<b>Tablo 4.2.8:</b> Akciğer kanserli tümöral ve çevre dokulardan elde edilen MLPA sonuçları	84

**TABLO DİZİNİ (Devam Ediyor)**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 4.2.9:</b> Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının Grade' lere göre dağılımları	85
<b>Tablo 4.2.10:</b> Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının T1, T2 ve T3' lü olgulara göre dağılımları	85
<b>Tablo 4.2.11:</b> Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının olguların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları	86
<b>Tablo 4.2.12:</b> Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının olguların metastaz sıklıklarına göre dağılımları	86

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>BAC:</b>	Bronkoalveoler Kanser
<b>CAK:</b>	Cdk Aktive Edici Kinaz
<b>CDK:</b>	Siklin Bağımlı Kinaz
<b>cm:</b>	Santimetre
<b>CSF:</b>	Koloni Stimüle Edici Faktör
<b>DNA:</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DQ:</b>	DNA Miktarı
<b>EGF:</b>	Epidermal Growth Faktör
<b>FGF:</b>	Fibroblast Growth Faktör
<b>FISH:</b>	Fluorescence In Situ Hybridization
<b>GDP:</b>	Guanozin Difosfat
<b>GTP:</b>	Guanozin Trifosfat
<b>HGF:</b>	Hepatosit Growth Faktör
<b>KGH:</b>	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
<b>KHAK:</b>	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
<b>KHOAK:</b>	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
<b>MLPA:</b>	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
<b>mm:</b>	Milimetre
<b>MPF:</b>	Maturasyon İlerletici Faktör
<b>MR:</b>	Magnetik Rezonans
<b>ng:</b>	Nanogram
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>TGF:</b>	Tümör Growth Faktör
<b>TSG:</b>	Tümör Süpressör Gen
<b>TNM:</b>	Tümör Node Metastaz
<b>WHO:</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>µg:</b>	Mikrogram

## 1.GİRİŞ VE AMAC

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün 2003 yılına ait kanser raporunda, global kanser oranının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak 15 milyon kişiyi etkileyebileceği bildirilmiştir. Akciğer kanserinin yıllık 1.2 milyon yeni vaka ile birlikte dünyada en yaygın kanser tiplerinden olduğu bu raporla açıklanmıştır(77).

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. 1996 yılında ABD'de 64 bin kadın akciğer kanserinden, 44 bin kadın meme kanserinden ölmüştür. Tüm dünya ortalamasına baktığımızda Akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikinci sıradadır(24).

Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl yirmi bin- yirmibeş bin yeni akciğer kanseri ortaya çıkmakta ve bu rakamın otuz bin- kırk bin' e kadar ulaşabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde akciğer kanserlerinin çoğu erkeklerde görülmektedir. Ancak 1980'lerden sonra ülkemizde kadınlarda artan sigara tiryakiliği bu oranı hızla artırmaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1983-1989 yılları arasında ülkemizde kanser sıklığı 32/100.000'dir. Bunun %26 lık bölümünü ilk sıradaki akciğer kanseri oluşturmaktadır.1991-1992 verilerine göre solunum sistemi kanserlerinin oranı, tüm kanserler içinde %43'tür. Yine aynı verilere göre yapılan tahminlerde, gerçek kanser sıklığı 120-130 / 100.000 olmalıdır(80).

Akciğer kanserlerinin başlıca nedeni sigaradır. Risk sigara içme süresi, toplam içilen sigara, başlama yaşı ve içilen sigaranın türüne göre değişir. Aktif sigara içiminden sonra ikinci risk faktörü pasif sigara maruziyetidir. Pasif sigara maruziyetinin tek başına kanser oluşma riskini ortalama 1.2-1.3 kat arttırdığı bildirilmektedir.

Ailede akciğer kanseri olması, akciğer kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. Ailede akciğer kanseri olan ve hiç sigara içmemiş bir kadının akciğer kanserine yakalanma riskinin 2.8 kat arttığı bildirilmektedir. Yine asbestos denen tozlarla uğraşan kişilerde, çeşitli kimyasal maddelerle çalışılan iş kollarındaki işçilerde, daha önceden akciğerden hastalık geçiren ve akciğerde nedbe dokusu gelişen kişilerde akciğer kanseri riski artmaktadır.

Kanser gelişimi çok aşamalı bir olaydır. Meme, kolon gibi kanserlerde birçok kalıtsal mekanizma belirlenmiş olup son yıllarda akciğer kanserinde de genetik yatkınlıklar tanımlanmaya başlamıştır. Sigara içimi önemli bir faktör olmakla beraber, sigara içenlerin %20'sinde akciğer kanseri görülmesi, başka etkenlerin de, özellikle genetik yatkınlığın önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Karsinogenezis çok aşamalı bir süreçtir. Bu güne kadar elde edilen veriler, karsinogenezis sürecinde farklı türlerde genlerin etkili olduğunu göstermiştir. Kanserde etkili olduğu düşünülen tüm genler birlikte değerlendirildiğinde 3 ana grup altında toplanırlar:

- 1- Onkogenler
- 2- Tümör süpresör genler
- 3- DNA tamir genleri

Hücre siklusunda, hücrenin bölünmeye girebilmesini belirleyen kontrol noktaları vardır ve hücrenin bu kontrol noktalarından geçip geçmemesine göre hücre bölünmesine girip giremeyeceği belirlenir. Her iki kontrolde de normal regülatör gen ürünleri, hücre sayısının artırılması yada hücre sayısı artışının inhibe edilmesine göre gruplandırılır. Dolayısıyla kanserin tipik özellikleri olan kontrolsüz hücre poliferasyonu ve invaze olabilme yeteneğini belirleyen iki başkalaşıma açık nokta vardır(3).

Birincisi, uyarılan geni aşırı aktif hale getirir. Bu başkalaşım dominant özelliktedir, yani genin her iki allelinden sadece birinde oluşan bir başkalaşım bile o genin aşırı aktif hale gelmesi için yeterlidir. Bu başkalaşıma uğrayan gen *onkogen* olarak isimlendirilir. Onkogenlerin normal formları *protoonkogen* adını alır ve her normal hücrede bulunan genlerdir(3).

İkincisi ise hücre çoğalmasını inhibe edici geni inaktif hale getiren başkalaşımdır. Bu başkalaşım resesif özelliktedir, yani genin her iki allelinde başkalaşıma uğraması gerekir. Bu genler *tümör süpresör* genler olarak ifade edilir(3). Bu güne kadar 80 dolayında protoonkogen saptanmış olup her birinin onkogenik potansiyel göstererek farklı kanserlerin oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Gen, bir nokta başkalaşım, delesyon, kromozom translokasyonu yada retroviral DNA gibi bir hareketli genetik elementin eklenmesi ile değişebilir ve farklı bir yapı kazanabilir(3,45). Değişim genin protein kodlayan bölgesinde olabilir ve aşırı aktif bir ürün oluşumuna neden olur yada başkalaşım genin komşu kontrol bölgelerinde olabilir ki bu durumda da gen aşırı ürün oluşturur(3).

Tümör süpresör genlerin tümör gelişimindeki mekanizmalarına ilişkin bilgiler 1971'de Knudson tarafından ortaya atılmıştır. Bugün “Knudson hipotezi” veya “iki vuruş” hipotezi olarak ifade edilen bu görüşte tümör süpresör genin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yetenek ancak ilgili genin her iki allelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur. Tümör süpresör gen kontrol etme fonksiyonunu kaybeder(20).

Tümör süpresör genlerin ürünleri, normal koşullarda hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olarak iş gören proteinlerdir. Kanser oluşumunda aktive olması gereken onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler inaktif durumdadır. Protoonkogen ürünleri büyümeyi sağlarken, tümör süpresör gen ürünleri anormal büyümeyi ve malign transformasyonu durdururlar. Ancak her iki allelin de fonksiyonu kaybolduğu zaman malignansiye eşlik ederek tümör hücrelerinin anormal proliferasyonuna katkıda bulunurlar(32).

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada Akciğer kanseri ile ilişkili birçok tümör süpressör gen ve onkogen tanımlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda farklı teknikler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre değişik oranlarda farklı bölgelerde heterozigosite kaybı olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda Türkiye’de yeni bir yöntem olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ile şimdiye kadar akciğer kanserleri ile ilişkilendirilmiş 64 farklı gen araştırılmaktadır. Yöntem ilk olarak Schouten JP ve ark. tarafından tanımlanmıştır(58). MLPA’yı Multiplex gen dosaj analizi yapabilen kolay bir yöntem olarak kısaca tanımlayabiliriz. Bu yöntem sayesinde PCR temelli, tek reaksiyonda 50’ye yakın gen bölgesi incelenebilmektedir. İncelenecek gen bölgelerine spesifik dizayn edilmiş probmix’ler kullanılarak bu genlerde oluşmuş delesyon veya amplifikasyonlar saptanabilir.

Çalışmamızda MLPA yönteminin Akciğer kanserlerine spesifik dizayn etmiş olduğu Salsa MLPA Probemix 126/127 kitleri kullanılarak, akciğer kanserleri ile ilişkilendirilmiş 64 farklı gen bölgesindeki delesyon veya amplifikasyonların incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek verilere göre Türk popülasyonunda küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin türlerine göre etyolojisinde yer alan genleri ve bu genlerdeki değişimler ile klinik prognozları arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Yöntemin diğer tarama tekniklerine göre avantajları arasında, daha ucuz maliyette olması, PCR tabanlı, uygulaması kolay, tek reaksiyonda ~ 40 genomik DNA sekansının kopya sayısının belirlenmesi, 20 ng insan DNA sının yeterli olması ve yalnız tek nükleotid farklılığını bile ayırabilir olmasını sayabiliriz.



## 2.GENEL BİLGİLER

### **2.1. KANSER:**

Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Tanı olanaklarının gelişmesi ve sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilmektedir.

Ülkemizde 1970’li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ilk sıralara kadar yükselmiştir. Kanser, Türkiye’de 1982 yılında 1593 sayılı Umumi Hıfzısıhha Kanunu’nun 57. Maddesi gereğince “ bildirimi zorunlu hastalıklar listesi” ne alınmıştır. Yapılan istatistiksel çalışmalar kanserin, popülasyonun 1/3 ünden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin %20 kadarından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerdeki toplam tıbbi bakım harcamalarının %10 kadarını kanser tedavi harcamalarının oluşturduğunu göstermiştir(45).

#### **2.1.1. Kanser Nedir?**

Birçok farklı bilim dalı kanser için değişik tanımlar yapmışlardır. Bu çeşitliliğin nedeni, kanserin birçok mekanizmayı etkileyen bir durum olmasından kaynaklanmaktadır. Kanser çoğu kez tek bir hastalık gibi görünse de, gerçekte hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur (78).

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu oluşmaktadır. Kanser hücredeki bu temel düzenleyici mekanizmalardaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır (23).

## PDF Eraser Free

Kanser konusu içerisinde tanımının yapılması gereken önemli bir kelimedede neoplazidir. Neoplazinin sözcük anlamı yeni büyümedir. Willis, neoplaziyi “ Normal dokuları aşan, onlarla koordine olmayan ve değişime yol açan uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal bir doku kütleşi” şeklinde tanımlamıştır. Tüm neoplazilerin kökeninde normal büyüme kontrollerine verilen yanıtın kaybolması bulunur. Tıp dilinde neoplazmlar genel olarak “tümör” adıyla, tümörlerle ilgilenen dal ise “onkoloji” adıyla anılır (38).

Kanser gelişimine neden olan temel değişiklik, kanserin tanımında da sıklıkla kullanılan sürekli ve kontrolsüz hücre çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine, kontrolsüz bir biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila ederek tüm vücuda yayılırlar (23).

Kanser hücreleri genelde iki özelliğe sahiptir:

- i. Kontrolsüz çoğalma
- ii. Bulunduğu yerden vücudun bir başka yerine yayılma yada metastaz yapabilme yeteneği

Hücre bölünmesi hücre döngüsüne bağlı olarak ilerler. Oysa kanser hücrelerinde hücre döngüsünün kontrolü kaybolmuş ve hücre çoğalması hızlanmıştır (78). Kanser hücrelerinin ortak özelliği olan çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, çok hücreli sistemlerde biriken anomalilerin sonucudur.

## 2.1.2. Kanser Türleri:

Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabildiğinden, gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü mevcuttur. Onkolojide neoplazmların benign ve malign kategorilere ayrılması en önemli konuyu oluşturur. Bu sınıflandırma neoplazmın potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesine dayanır.

Bir tümörün sitolojik ve gros özellikleri nisbeten masum kabul edildiğinde, yani lokalize şekilde kalacağı, diğer bölgelere yayılmayacağı ve lokal cerrahi rezeksiyonla alınıp, hastanın sağkalımını etkilemeyeceği düşünüldüğünde, “benign” olduğu söylenir.

Malign tümörlerin hepsi kanser olarak adlandırılır. Malign kelimesi, komşu yapılara invaze olup, onları harap edebileceğini ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz yaparak) ölüme yol açabileceğini anlatır.

## 2.1.3. Benign ve Malign Neoplazmların Özellikleri:

Bir tümörün benign veya malign özellikte olduğunun ayrımı, uzun sürede doğrulanmış klinik ve anatomik kriterlere dayanarak belirgin bir doğruluk payı ile yapılır. Benign ve malign tümörlerin ayırt edilebileceği güvenilir kriterler bulunur (38). Bu farklar dört ana başlık altında toplanabilir:

i. **Diferansiasyon ve Anaplazi:** Benign tümörler, iyi diferansiye ve yapıları orjin aldıkları doku için tipik iken, malign tümörlerde anaplazi ile diferansiasyonda kayıp vardır ve yapıları sıklıkla orjin aldıkları dokuya göre atipiktir.

ii. **Büyüme Hızı:** Benign tümörler genellikle ilerleyici ve yavaş büyürler. Hatta bazı dönemlerde durabilir veya gerileyebilirler. Mitoz seyrek veya normaldir. Malign tümörlerde ise büyüme hızı kararsızdır. Yavaştan hızlıya doğru değişebilir. Mitoz çok sayıda ve anormal olabilir.

iii. **Lokal İnvazyon:** Benign tümörler, genellikle yapışık ve iticidir. İyi sınırlı kitle, çevre dokulara invaze ve infiltre etmez. Malign tümörler ise, lokal olarak invazivdirler. Çevre normal dokuları infiltre eder, bazen yapışık ve itici görülebilirler.

iv. **Metastaz:** Benign tümörlerde yoktur, fakat malign tümörlerde sıklıkla görülür. Daha büyük ve daha az diferansiye primer tümör daha sık metastaz yapar.

Gerek malign, gerekse benign tümörler tuedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Kanselerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: Karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar, epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir.

Toplam kanser olgularının %80'ini vücudun 11 bölgesinde ortaya çıkan kanserler oluşturur. Kanselerin yarısından fazlasını oluşturan dört kanser türü prostat, meme, akciğer ve barsak/rektum kanserleridir (23).

#### 2.1.4. Kanserin Gelişimi:

Tümör oluşumu çok aşamalı bir süreçtir. Kansere yol açan ajana (karsinojen) maruz kalınması hemen tümör gelişimine neden olmaz. Karsinojen tarafından başlatılan ilk başlangıç aşamasını takip eden olaylar zinciri sonucunda bir tümör gelişimi olur. Başlangıç aşamasını takip eden olaylar zinciri; bir karsinojen tarafından yada karsinojen olmayan ancak sadece transforme olan hücreyi etkileyerek o hücrenin çoğalmasını uyaran ajanlar tarafından oluşturulabilir (3, 9, 10, 20, 78). Bütün bu olaylar dizisi "karsinojenezis sürecini" oluşturur.

Kanser tek bir hücreden başlar. Bu klonite kanserin temel özelliklerinden birini oluşturur. Oluşan tümör dokusu, anormal çoğalmaya başlayan tek bir hücreden gelişir. Fakat tümörlerin klonal olması, tümör gelişmesine neden olan hücrenin başlangıçta, kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmez. Tam tersine, kanserin gelişmesi birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir.

Hücresele düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonucunda çoğalma, sağkalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar (23).

Karsinojenenezin merkezinde ölümcül olmayan genetik hasar yatar. Kanser gelişim aşamalarından ilki olan tümör başlangıcı, bir tek hücrenin anormal çoğalmasına neden olan genetik bir değişikliğin sonucudur. Bu tip genetik hasar (mutasyon) kimyasal maddeler, radyasyon ya da virüsler gibi çevresel ajanların etkisiyle oluşabilir veya kalıtsal olarak germ hücre dizilerinde bulunabilirler (38).

Karsinojen, dokunun stem hücre popülasyonundaki spesifik gen yada genleri harap edebilir. Fakat başkalaşıma uğramış hücre bölünmeden latent halde kalabilir veya çok yavaş bölünür. Bu hücrenin hızlı bir şekilde çoğalabilmesi, normal hücrelere göre baskın hale gelmesi için uyarıcı ajanların hücreyi etkilemesi gerekir. Pekçok ajan hücrenin bölünmeye girmesinde etkili olur. Ancak sadece uyarıcı ajanlar tümör gelişiminde etkindir. Dolayısıyla tümör gelişimi için hücre büyümesi gerekli olmakla birlikte yeterli değildir. Diğer faktörlerin de hücreyi etkilemesi gerekir (20).

Hücre çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür. Tümör ilerlemesi bu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonların gerçekleşmesiyle devam eder. Bu mutasyonların bir kısmı hücreye daha hızlı çoğalma gibi belirli avantajlar kazandırır. Bu özellik sonucunda bu hücrelerden türeyen hücrelerde tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın nitelikler kazanırlar.

Böylece, gerek çoğalma hızı, gerekse (sağkalım, invazyon ve metastaz yeteneği gibi) daha başka özellikler açısından avantajlı yeni bir tümör hücre klonu ortaya çıktığından bu işleme klonal seçim adı verilir. Klonal seçim tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak daha malign özellik kazanırlar (23).

Tümör hücreleri tüm özellikleriyle birlikte gelişmez. Statik bir hücre popülasyonu iken uyarıcılar ve yeni başkalaşımalar ile daha dinamik hale gelirler ve gelişim devam ettikçe yeni özellikler kazanırlar (3, 20, 78).

### **2.1.5. Tümör Büyümesinin Biyolojisi:**

Tipik bir malign tümörün doğal öyküsü çeşitli basamaklarda çözülebilir: Hücrenin neoplastik transformasyonu, transforme olmuş hücrenin klonal genişlemesi, lokal invazyon ve sonunda uzak yayılım.

Transformasyona uğramış bir hücrenin klonal yeni nesilleriyle tümör kütlesi oluşması birçok faktörün etkilediği karmaşık bir işlemdir. Tümör büyümesini etkileyen çok sayıda faktör üç başlık altında ele alınır:

- i. Tümör hücre çoğalmasının kinetiği
- ii. Tümör angiogenezi
- iii. Tümör ilerleyişi ve heterojenliği

Transformasyona uğramış tek bir hücrenin klinik olarak belirgin bir kitle oluşturma süresi üç değişkene bağlıdır. Bu değişkenler, tümörün iki katına çıkma süresi, büyüme fraksiyonu, hücre üretimi ve kaybıdır.

İlk başta tümör hücrelerinin normal hücrelerden daha hızlı bölündüğünün düşünülmesine karşın aslında birçok tümörün toplam hücre siklusu süresi kendisine denk olan normal hücrelerinkine eşit ya da daha uzundur.

Büyüme fraksiyonu replikatif havuzda yer alan tümör hücre popülasyonundaki hücrelerin oranı şeklinde tanımlayabiliriz. Klinik ve deneysel çalışmalar tümör büyümesinin erken, submikroskopik fazında transformasyona uğramış hücrelerin çoğunun proliferatif havuzda yer aldığını düşündürmektedir (38). Tümörler büyüdükçe hücreler dağılma, gıda maddelerinin yetersiz olması, farklılaşma ve mitozun G0 evresine dönme nedeniyle replikatif havuzu giderek artan sayılarla terk ederler. Gerçekten de kanserlerdeki hücrelerin çoğu G0 fazında kalır. Sonuç olarak bir tümörün klinik olarak saptanabildiği zamanda hücrelerinin çoğu replikatif havuzda yer almaz. Bazı hızlı büyüyen tümörlerde bile büyüme fraksiyonu yaklaşık %20'dir.

Günümüzde kullanılan antineoplastik ajanların neredeyse tamamı en büyük etkilerini siklusta bulunan hücreler üzerinde gösterirler. Yüksek büyüme fraksiyonlarına sahip tümörler antikanser ajanlara çok duyarlıdırlar.

Orijinal olarak transformasyona uğramış bir hücreden sonra gelen tüm nesiller replikatif havuzda kalsalardı tümörlerin çoğu ilk hücre bölünmesinden sonraki bir iki ay içinde klinik olarak saptanabilir hale gelirdi. Ancak hücrelerin çoğu replikatif havuzu terk ettiği için hücre birikimi nispeten yavaş bir işlemdir. Bu da bir tümörün klinik olarak saptanabilir bir hale gelmesinden önce aylar yada yıllar süren bir latent periyod oluşmasına neden olur.

Tümörlerin büyümesini hücre kinetiğinin dışındaki faktörler de etkiler. Bunlardan en önemlisi kan kaynağıdır. Tümörlerin damarlanmadıkları takdirde 1-2 mm'lik çapı yada kalınlığı aşacak şekilde büyüemediklerine ilişkin çok sayıda deneysel ve klinik kanıt bulunmaktadır. Birçok çalışma tümörlerin yeni kapiller oluşumunda görev alan tüm olaylar dizisini etkileme yeteneğine sahip faktörler salgıladıklarını işaret

etmektedir. Tümörlerle ilişkili anjiogenik faktörler genel olarak iki grupta sınıflandırılabilir: tümör hücreleri tarafından oluşturulanlar ve tümörleri infiltre eden inflamatuvar hücrelerden türeyenler, şeklinde ayırabiliriz. Birinci grubu en iyi karakterize eden örnekler heparin-bağlayıcı fibroblast büyüme faktörleridir (FGF). Diğer tümör kökenli anjiogenik faktörler arasında TGF- $\alpha$  (tümör büyüme faktörü) ve EGF (epidermal büyüme faktör) bulunur. Birçok anjiogenik molekülün protoonkogenlerin ürünü olduğu ve mutasyonlarla aktive oldukları bilinmektedir. Tümör anjiogenezi olası bir kanser baskılayıcı gen tarafından kodlanan bir anjiogenez-inhibe edici faktörün kaybıyla da ilişkili olabilir.

Tümörlerin çoğunun bir süre içinde daha agresif hale geldikleri ve daha malign bir potansiyel kazandıkları bilinmektedir. Bu olay “tümör progresyonu” olarak bilinmektedir. Klinik ve deneysel çalışmalar malignite artışının, sıklıkla kademeli bir şekilde oluştuğunu açığa çıkarmıştır. Bu biyolojik olay invazivlik, büyüme hızı, metastaz yeteneği, karyotip, hormonal yanıtılık ve antineoplastik ilaçlara duyarlılık gibi çeşitli fenotipik özellikleri farklı olan hücre alt populasyonlarının ardışık olarak belirmesiyle ilişkilidir. Malign tümörlerin çoğunun kökeni monoklonal olmasına karşın klinik olarak belirgin hale geldikleri zaman hücreleri son derece heterojen durumdadırlar.

Moleküler düzeyde tümör ilerleyişi ve bununla ilişkili heterojenliğin farklı hücrelerde birbirinden bağımsız olarak toplanan çok sayıda mutasyona bağlı olma ve böylece farklı özelliklere sahip alt klonlar oluşturma olasılıkları yüksektir. Transformasyona uğramış orijinal hücrenin ek genetik hasara uğramasına neyin predispozisyon oluşturduğu tamamen açıklığa kavuşmamıştır. Birçok araştırmacı transformasyona uğramış hücrelerin genetik olarak stabil olmadığına inanmaktadır. Bu olay hücreleri klonal genişleme sırasında yüksek hıza sahip randomize ve spontan mutasyonlara duyarlı kılmaktadır (38). Bu mutasyonlardan bazıları ölümcül olabilir; diğerleri protoonkogenleri ve kanser baskılayıcı genleri etkileyerek hücre çoğalmasını destekleyebilirler.



## 2.1.6. Kanserin Nedenleri:

Kansere yol açan maddelere karsinojen denir. Karsinojenler yapılan ayrıntılı epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Bir tümör gelişimi çok aşamalı bir süreçtir. Bu nedenle birçok farklı faktör kanserin oluşmasında etkili olabilir. Kansere neden olan ajanları 3 geniş gruba ayırabiliriz: Radyasyon, kimyasal bileşikler ve virüsler. Ultraviyole ışınları, X ışınları ve  $\gamma$  ışınları mutajenik ve karsinojeniktir. Bu ışınlar DNA'yı muhtelif yönlerde zedelerler. Ultraviyole radyasyonu pirimidin dimerlerinin oluşmasına neden olabilir. Karşıt bazların eliminasyonu ile pürinsiz veya pirimidinsiz konumlar oluşabilir. Tek ve çift dal kırılmaları veya dallarda çapraz bağlantılar meydana gelebilir. Işınlama enerjisinin neden olduğu karsinojenezde temel mekanizmanın DNA hasarı olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca DNA'daki direkt etkilerinden ayrı olarak, X ışınları ve  $\gamma$  ışınları dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar (53).

Kimyasal bileşiklerin pek çok çeşidi karsinojeniktir. İnsanlarda kanserin gelişimi ile pekçok madde ilişkilendirilmiştir. İnsan kanserlerinin %80 kadarının başta kimyasallar olmak üzere çevresel faktörler nedeni ile meydana geldikleri belirlenmiştir. Kişin böyle bileşiklere maruz kalması, mesleğinden ( benzen, asbest), beslenme alışkanlıklarından (aflatoksin), yaşam tarzından ( sigara, alkol kullanımı) veya diğer nedenlerden ( ilaç kullanımı) dolayı olabilir (53).

Kimyasal maddeler ve radyasyona ek olarak bazı virüsler de, gerek deney hayvanlarında, gerekse insanda kansere neden olabilir. Hayvan virüs ailelerinde yer alan bu virüslere "tümör virüsü" adı verilir (23). İnsanda kanser oluşturan virüsler Hepatit B ve C virüsleri ( karaciğer kanseri), papilloma virüsleri ( serviks kanseri ve diğer anogenital kanserler), Epstein-Barr virüsü ( Burkitt lenfoması ve nazofarenks karsinomu), Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüs ve insan T-hücre lenfotropik virüsüdür ( erişkin T hücreli lösemi). Ayrıca HIV virüsü de AIDS'li hastalarda immün yetmezlik sonucunda gelişen kanserlerden dolayı olarak sorumludur.

## 2.1.7. Kanser Hücrelerinin Özellikleri:

Kanser hücrelerinin en belirgin özelliği kontrolsüz çoğalmasdır. Bu özellik, hücrenin çoğalmasını düzenleyen mekanizmaları etkileyen değişikliklerin birikmesinin sonucudur. Genel olarak kanser hücresinde, hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda bir takım anormallikler görülür. Bu farklılaşmalar, kanser hücrelerinin bu karakteristik özellikleri ile malignitenin hücrese düzeyde tanımlanmasını sağlar.

Kanser hücreleri, hücre kültüründe de, kontrolsüz in vivo çoğalma sırasında sergiledikleri davranış özelliklerini gösterirler. Kanser hücresi ile normal hücrenin kültür ortamındaki ilk farkı, normal hücrelerin çoğalmasının, yoğunluğa bağlı inhibisyondan etkilenmesidir. Kanser hücrelerinin çoğalması ise bu yoğunluktan etkilenmez. Normal hücrelerin çoğalmasını durduran sinyallere uyarak G0' da durmak yerine, kontrolsüz in vivo çoğalma davranışlarını sürdürerek, yoğunluğun artmasına rağmen çoğalmaya devam ederler (23).

Kanser hücreleri, normal hücrelere göre hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Bu özellik, tümör hücrelerinin hem in vivo hem de in vitro koşullarda kontrolsüz çoğalmasını sağlamaktadır. Ayrıca bazı durumlarda kanser hücreleri büyüme faktörlerini kendileri de salgılayabilmektedir. Hücrenin gerek duyduğu büyüme faktörlerinin kendisi tarafından salgılanması hücreyi sürekli olarak çoğalmaya uyarır. Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağımlı olmaması, bazı durumlarda hücre içi sinyal sistemlerinde gerçekleşen anormalliklerden, örneğin, hücre çoğalmasını sağlayan sinyal yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerinin (Ras proteinleri veya protein kinazlar gibi) yada başka proteinlerin kontrolsüz aktivitesinden kaynaklanır (23).

Kanser hücreleri ile normal hücreler arasında görülen bir başka fark da, kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminin daha düzensiz olmasıdır. Yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür. Ayrıca hücre-hücre etkileşimi açısından en önemli fark kontakt inhibisyonda görülmektedir. Tümör hücreleri normal hücrelerde farklı olarak, komşu hücrelerle temas ettikten sonrada hareket etmeyi sürdürür, yanlarındaki hücrenin üzerine çıkar ve düzensiz, çok katlı kümeler oluştururlar.

Kanser hücrelerinin iki önemli özelliği daha vardır. Bu özellikler, kanser hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren ve bu nedenle invazyon ve metastaz açısından önem taşımaktadır. Bu özelliklerin ilki, malign hücrelerin hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücrelerinin normal komşu dokunun içine girmesine olanak veren proteazlar salgılamasıdır. İkinci özellik ise, kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) hızlandıran büyüme faktörleri salgılamasıdır.

Kanser hücrelerinin bir başka genel özelliği de normal biçimde farklılaşmamalarıdır. Bu farklılaşma kusuru anormal çoğalma ile yakından ilişkilidir. Kanser hücreleri normal farklılaşma programını izlemek yerine, sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar. Apoptoz yada programlı hücre ölümü birçok hücre türünde farklılaşmanın temel öğelerindedir. Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden etkilenmemesi tümör gelişimini önemli ölçüde hızlandırır. Kanser hücreleri apoptozdan kaçışlarına ek olarak, ökaryotik kromozomların uçlarını kısaltmaktan koruyan telomeraz enziminin ekspresyonu sayesinde, sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptir.

## 2.2. KANSER VE GENETİK

Kanser klinikte görülen en yaygın ve ciddi hastalıklardan biridir. Bugüne kadar yapılan birçok istatistiksel çalışmalarda, kanserin toplumların yaklaşık üçte birinden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin yüzden yirmiden fazlasından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık %10' undan fazlasının kanser tedavileri harcamalarını oluşturduğunu göstermiştir.

Bütün bu veriler sonucunda kanser bütün dünya üzerinde yapılan çalışmaların odak noktası haline gelmiştir. Kanser, tedavi edilmediği zaman ölümlerle sonuçlanmaktadır. Kanserle mücadelede en önemli noktayı erken tanı oluşturmaktadır. Kansere yakalanma riski yüksek olan bireylerin kanser gelişmeden önce saptanabilmesi büyük önem taşımaktadır.

Önceki bölümlerde normal hücre ile tümör hücresi özellikleri verilerek karşılaştırılmıştır. Bu bölümde ise “ Kanser esas olarak genetik bir hastalıktır.” olgusu vurgulanacaktır. Kanser başlangıcında yer alan çeşitli genler ve hastalığa neden olan bu genlerin fonksiyon kayıplarındaki mekanizmalar incelenecektir. Bütün bu konulara geçmeden önce kanserin başlangıcı ve tümör hücrelerinin özellikleriyle ilgili bazı önemli noktaları özetlemek gerekir:

- i. Kanser, moleküler hücre biyolojisinin pek çok yönüne temas eden hücresel davranışdaki temel bozukluktur. Vücuttaki pek çok hücre tipi, malign tümör (kanseri) hücrelerinin gelişmesini sağlayabilir.
- ii. Kanser hücreleri, kök hücreleri ve diğer çoğalan hücrelerden köken alır ve olgun farklılaşmış hücrelerden ziyade bu hücrelere benzerlik gösterir.
- iii. Kanser hücreleri, normal hücre proliferasyonu için gerekli olan büyüme faktörlerinin en azından bazılarının yokluğunda çoğalabilirler ve normal programlı hücre ölümü sinyallerine karşı dirençlidirler.

iv. Kanser hücreleri bazı zamanlarda çevre dokuya yayılım gösterirler. Bu metastatik yayılım, tümör hücrelerinden salgılanan değişik proteazlar ile komşu dokuların ekstraselüler matriksini etkilemek suretiyle olmaktadır.

v. Hem primer hem de sekonder tümörlerin anjiyogeneze ihtiyaçları vardır. Yeni kan damarlarının oluşması, tümöral dokunun büyümesi için gereklidir ve anjiyogenez sonucunda tümör dokusu daha da büyüyecektir.

vi. Kanser oluşumunun açıklanması için önerilen modellerden biri olan çoklu vuruş hipotezinde, kanser oluşumu için farklı mutasyonların gerekliliği ileri sürülmektedir. Bu mutasyonların özellikle hücre döngüsü ve proliferasyonundaki görevli genlerde olduğu düşünülmektedir.

vii. Onkojenik mutasyonların çoğunluğu, somatik hücrelerde meydana gelmektedir. Ve bu mutasyonlar, germ-line DNA' yı etkilemediği için diğer kuşaklara aktarım olmamaktadır.

viii. Birçok dokudan gelişen kanser türünde, spesifik tümör süpresör genler ve proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar etkili olmaktadır (4, 7, 30).

Tümör oluşumunda en önemli basamağı karsinogenez süreci oluşturmaktadır. Bugüne kadar elde edilen veriler, karsinogenez sürecinde farklı türlerde genlerin etkili olduğunu göstermiştir. Bu genler:

- Hücre proliferasyonunda ve hücreler arası sinyal iletiminde görevli proteinleri kodlayan genler
- Mitotik siklus düzenleyicilerini kodlayan genler
- Programlanmış hücre ölümü elemanlarını kodlayan genler
- Kontakt inhibisyon oluşumunda etkili olan elemanları kodlayan genler
- Hasarlı DNA'nın tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genler (45)

Günümüze kadar kanser oluşum mekanizmalarını inceleyen birçok çalışma yapılmış ve yayınlanmıştır. Literatürde farklı kanser tiplerinin oluşumunda etkili olduğu düşünülen moleküler mekanizmalar değerlendirildiğinde genel olarak yukarıda maddeler halinde verilen mekanizmalarda etkili gen gruplarında meydana gelen anomaliler rapor edilmiştir. Bu veriler, "Bir kanserin sporadik olarak bireylerde

izlenmesine yada herediter bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar edilmesine bakılmaksızın kanser genetik orijini olan bir hastalıktır” varsayımını doğrular niteliktedir(45). Birçok kanser türünde mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşur ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açar. Daha nadir olanı ise herediter kanser sendromunda görülür. Bu durumda kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar, germ hücrelerine aktarılmakta ve böylece vücudun tüm hücrelerinde yer almaktadır.

Oluşum mekanizması ne olursa olsun, kanser oluşumu bir kez başladığında, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA’ da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücresel mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar kümülatif olarak bir artış göstererek kanseri yaygınlaştırırlar (45).

Hücre döngüsünün düzenlenmesi kanser genetiği ile yakından ilişkilidir. Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü, mitoz bölünme safhaları arasında bir dizi olay ortaya koyar. Döngü, kanser genetiği ile çok yakından ilişkilidir (78).

### **2.2.1. Hücre Döngüsü:**

Hücrelerin çoğunda birbiri ile ilişkili süreçten oluşmaktadır. Bu süreçte yer alan basamaklar: hücre büyümesi, DNA replikasyonu, iki katına çıkan kromozomların yavru hücrelere aktarımı ve hücre bölünmesidir. Hücre büyümesi, her ne kadar genellikle kesintisiz bir süreç ise de, DNA hücre döngüsünün sadece bir evresinde sentezlenir ve daha sonra kopyalanmış kromozomlar hücre bölünmesi öncesi bir dizi karmaşık olayla yavru çekirdeklerine dağıtılır. Hücre döngüsünün bu basamakları, korunmuş bir denetleyici sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistem sadece hücre döngüsünün farklı olaylarını düzenlemekle kalmaz, hücre döngüsünün, hücre çoğalmasını kontrol eden hücre dışı sinyallerle bağlantısını da sağlar. Bu hücre dışı sinyal bağlantılarında meydana gelecek problemler, hücre döngüsünü etkileyerek, kanser oluşumunda önemli bir noktayı oluştururlar. Bu sinyal yollarının bilinmesi kanser oluşumunun anlaşılmasında önemli noktalardan birini oluşturmaktadır (23).

## 2.2.2. Hücre Döngüsünün Basamakları:

İnsan hücreleri kültür ortamında yaklaşık her 24 saatte bir bölünen bir seyir gösterirler. Hücre döngüsünü, mitoz ve interfaz olmak üzere iki temel gruba ayırabiliriz. Sitokinez ( hücre bölünmesi ) ile sonlanan mitoz evresi sadece bir saat sürerken, hücre döngüsünün %95' ini interfaz safhası oluşturur. İnterfaz sırasında kromozomlar yoğunluğunu kaybeder ve nükleus içine yayılırlar. Bu aşamada nükleus morfolojik olarak homojen görünümündedir. Moleküler düzeyde ise interfaz, hücre büyümesi ve DNA replikasyonunun gerçekleştiği, bölünmeye hazırlık aralığıdır.

Yapılan çalışmalar, DNA sentezinin, ökaryotik hücrelerde hücre siklusunun sentez evresi olarak adlandırılan S fazında meydana geldiğini göstermiştir. S fazından önce ve sonra birer zaman aralığı (Gap) oluşur. Bu yüzden hücre siklusu G1 (ilk aralık), S (sentez), G2 (ikinci aralık) ve M (mitoz) olmak üzere dört evrede meydana gelir. G1, S ve G2 evrelerinin hepsine birden “interfaz” adı verilir. İnterfazı mitozla hazırlı evresi olarak tanımlamak mümkündür. İnterfazı oluşturan evrelerdeki gelişen olayları kısaca özetleyecek olursak, G1 evresi mitozdan hemen sonra başlar; ribozomlar, enzimler, membran türevi organeller gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılır. Ayrıca hücre için gerekli RNA ve proteinler sentezlenir, DNA için sentez hazırlığı yapılır. S evresinde; RNA sentezi devam ederken protein sentezi en yüksek düzeye ulaşır. DNA sentezi yapılarak DNA miktarı iki katına çıkar. G2 evresi; büyümenin ve sentezin ikinci dönemi olarak mitozun başlamasına öncülük eder. Bu evrede DNA sentezi tamamlanmıştır fakat RNA ve protein sentezi G1 evresindeki kadar olmamakla birlikte devam eder. Dokulardaki birçok bölünmeyen hücre ( dinlenme durumundaki fibroblastlar gibi), S evresinden hemen önce yeterli DNA sentezlememiş ise, yeteri kadar büyümemiş ise, hücre siklusunu durdururlar. Böyle dinlenme durumundaki hücelere G0 durumunda denir. G0 evresi birkaç gün, birkaç hafta sürebilir hatta hücre bölünmekten tamamen vazgeçebilir (23, 27, 78). Tüm veriler ele alındığında, gözlemler, hücre döngüsünün sıkı bir şekilde düzenlendiğini ve belirli bir hücrenin yaşam öyküsüne ve farklılaşma basamağına bağlı olduğunu göstermektedir.

## 2.2.3. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları:

Hücrelerin bölünme sikluslarını tamamlayarak, faaliyetlerini devam ettirmeleri hücre içi sinyaller kadar çevrede yer alan dış uyarılar tarafından da düzenlenir. Hücre büyümesi, DNA replikasyonu, mitoz gibi farklı hücresel olaylar, hücre siklusu olayları esnasında koordine edilir. Bütün bu olaylar hücre siklusu esnasında belirli noktalarda düzenlenir. Bu noktalar “kontrol noktaları” olarak tanımlanır. Hücrelerin birçoğunda tanımlanmış en önemli kontrol noktalarından biri G1 evresinde görülür. Bu kontrol noktası G1’den S evresine geçişi kontrol eder. Bu kontrol noktası ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*’de belirlenmiş ve START olarak adlandırılmıştır. Bütün hücreler normalde START noktasın geçerek S evresine girer ve bölünme sikluslarına devam ederler. Bu nokta dış uyarılar tarafından kontrol edilir. START, karar verme noktası olmanın yanında, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi tarafından koordine edilen, hücre büyümesi noktasıdır.

Hücre siklusu kontrol noktalarının görevi, tamamlanmamış veya hasarlı kromozomların replikasyonunu engellemek ve bunların yavru hücrelere geçişini önlemektir. Bu kontrol noktaları, hücre döngüsü sırasında bir önceki evredeki olaylar tamamlanmadan sonraki evreye geçişi engeller. Bu kontrol noktaları, replike olmamış yada hasarlı DNA’lara duyarlıdır ve DNA replikasyonunun tamamlanması yada onarımı ile hücre döngüsünü ayarlarlar. Hücre siklusu boyunca belirlenmiş 4 ana kontrol noktası vardır:

**G1 kontrol noktası:** Eğer DNA’da bir hasar varsa, siklusun G1’de durmasını sağlar.

**G2 kontrol noktası:** DNA replikasyonunda bir hata olur ve ortamda replike olmamış DNA bulunursa, siklusun G2’de durmasını sağlar. Böylece, G2 kontrol noktası ile S tamamlanmadan M evresine geçiş engellenir ve hücreler, genom tamamen replike oluncaya kadar G2’de kalırlar. Ancak bundan sonra G2’deki inhibisyon ortadan kalkar ve hücre mitozu geçerek, tümüyle replike olmuş kromozomları yavru hücrelere dağıtır.



Replike olmamış DNA'ları algılamanın yanısıra, G2'deki kontrol noktaları, hasarlı DNA'lara da duyarlıdır. Eğer DNA hasarı saptanırsa, kontrol noktasındaki duraklama, hasarın onarılması için gerekli zamanı sağlar.

**S kontrol noktası:** DNA hasarı, hücre döngüsünü sadece G2'de değil, G1 ve S evresi kontrol noktalarında da duraklatır. S'deki kontrol noktası, hasarlı DNA'nın replike olmadan onarılması için, DNA'nın bütünlüğünü sürekli olarak izler. Ayrıca, S evresi kontrol noktası, DNA replikasyonu sırasında yanlış baz eşleşmesi yada DNA bölümlerinin eksik replikasyonu gibi, oluşabilecek hataları bulma ve onarma şeklinde kalite kontrol görevi yapar.

**M kontrol noktası:** Mitoz esnasında yavru kromozomlar mitotik içcik üzerinde uygun şekilde dizilmezlerse, siklusu M evresinde durdurur. Bu sayede bölünen kromozomlar yavru hücrelere tam bir kromozom seti halinde geçerler. Mitotik içcik üzerinde yer alan kromozomlardan biri veya birkaçı eksilirse bu kontrol noktası mitozun metafaz evresinde kalmasını sağlar ve böylece kromozomların eksik olarak yavru hücrelere geçmesini önler.

Bu kontrol noktalarında hücre döngüsünün durması, hasar görmüş yada replike olmamış DNA'ya bağlanan protein kompleksler ile tetiklenir. Tam olarak tanımlanmamış bu proteinler, DNA hasarını algırlar ve sadece hücre döngüsünü duraklatan sinyal yollarını uyarmakla kalmaz, DNA onarımını ve programlı durumlarda hücre ölümünü aktive ederler. Bu algılayıcı proteinlerin doğrudan hedefi ATM ve ATR olarak simgelenen, birbiriyle ilişkili iki protein kinazdır ve bunlar DNA hasarına cevaben aktifleşir. Bu proteinler ilk olarak ataxia telangiectasia hastalığından sorumlu olan ATM kodlayan gendeki mutasyonlarla tanımlanmıştır. ATR ise daha sonra ATM'nin yakın akrabası olarak tanımlanmıştır. Bir kez aktifleşen, ATM ve ATR sırasıyla Chk2 ve Chk1 kinazları fosfatlayarak aktive ederler. Bu kez de Chk1 ve Chk2, hücre döngüsünü düzenleyen sistemin bileşenlerini fosfatlayarak, hücre döngüsünü duraksatırlar (23).

Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasındaki duraksama, Chk2 ve ATM tarafından fosforillenen, p53 olarak bilinen diğer bir proteinin etkisi ile gelişir. Fosforillenme, aksi halde süratle yıkılacak olan p53'ü, kararlı hale getirir ve DNA hasarı p53 miktarında hızla artışa neden olur. p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve ekspresyon artışı, hücre döngüsünü duraksatacak hedef genlerin uyarılmasına yol açar. Birçok kanser türünde p53'ü kodlayan gen incelenmiş ve sıklıkla mutasyona uğradığı görülmüştür. Görülen bu mutasyonlarla, p53 proteinin işlev kaybı, hasarlı DNA'ya yanıt olarak G1 evresinde durmayı engeller. Hasarlı DNA böylelikle replike olarak onarılmadan yavru hücrelere geçer. *p53* genindeki mutasyonlar insan kanserlerindeki en yaygın genetik değişikliktir.

#### **2.2.4. Hücre Siklusunun Düzenlenmesi:**

Ökaryot hücrelerin bölünme döngüsünde ilerlemesini kontrol eden moleküler mekanizmalar günümüzde yapılan çalışmalarla anlaşılmaya başlanmıştır. Bütün bu çalışmalar, tüm ökaryotların hücre döngülerinin, korunmuş bir takım protein kinaz tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Bu protein kinazlar, temel hücre döngüsü geçişlerinden sorumludur.

**MPF: Cdc2 ve Siklin Dimeri:** Hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumlu anahtar moleküllerin belirlenmesinde yapılan farklı deneysel çalışmalardan faydalanılmıştır. Bu çalışmalarda kurbağa oositleri incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda, hormon uygulanmış oositlerde var olan bir sitoplazmik faktörün, hormon uygulanmış oositlerde G2'den M'ye geçişi uyardığı görülmüştür. Oositlerin mayoz geçişi genellikle yumurta olgunlaşması olarak kabul edildiğinden, bu sitoplazmik faktör "olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF)" olarak adlandırılır. Fakat daha sonra yapılan çalışmalar, MPF aktivitesinin, oositlerin mayoz girişiyile sınırlı olmadığını gösterdi. Aksine, MPF somatik hücrelerde de bulunur ve hücrelerin, mitotik döngüsünün M evresine girişini uyarır. Oositlere özgü olmak yerine, MPF'nin G2'den M'ye geçişte genel düzenleyici olarak davrandığı görülmektedir.

Siklin B sentezi, memeli hücrelerinin hücre siklusunun S evresinde başlar. Sentezlenen siklin B ile Cdc 2 bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hücre siklusunun S ve G2 evresi boyunca görev yapar. Bu kompleks oluşurken Cdc 2, düzenleyici 2 noktadan fosforlanır. İlk fosforilasyona, Cdc 2'nin kinaz aktivitesini yapabilmesi için gereksinim duyulur. İkinci fosforilasyonda Cdc 2'nin aktivitesi inhibe edilir ve Cdc 2 / siklin B kompleksinin hücre siklusunun S ve G2 evreleri boyunca inaktif olarak bir arada kalmalarını sağlar. Daha sonra Cdc 25 olarak adlandırılan bir protein fosfataz tarafından threonin-14 ve tirozin-15'in defosforile edilmesi ile Cdc 2 / siklin B kompleksi aktifleşir. Bu sayede G2 evresinden M evresine geçiş gerçekleşir. Cdc 2 protein kinazın aktifleşmesi, hedef proteinlerin fosforlanmasını sağlar, böylece M evresi olayları başlar. Aynı zamanda Cdc 2'nin aktivitesi siklin B' nin dağılmasını sağlar. Siklin B' nin bu proteolitik dağılımı Cdc 2'yi inaktive eder ve böylece mitozun sonlanıp sitokinez tamamlanarak hücrenin interfaza dönmesini sağlar (27).

**Siklin ve Siklin Bağımlı Kinaz Aileleri:** MPF'nin (Cdc 2/siklin B) yapı ve fonksiyonu, sadece M evresine giriş ve çıkışın anlaşılması için moleküler temel sağlamakla kalmamış, aynı zamanda diğer hücre döngüsü geçişlerinin düzenlenmesinin anlaşılmasına temel oluşturmuştur. Cdc 2 ve siklin B, benzer proteinlerin oluşturduğu büyük ailelerin üyeleridir. Bu ailelerin farklı üyeleri, hücre döngüsünün farklı evrelerinin gelişimini kontrol etmektedir.

Cdk ailesinin bu üyeleri, hücre döngüsünün farklı basamakları boyunca ilerlemeyi yönlendirmek için spesifik siklinlerle bağlanırlar. Örneğin, G1'den S'ye geçiş, temel olarak, siklin D ve E ile bağlanan Cdk 2, 4 ve 6 tarafından düzenlenir. Cdk 4 ve 6'nın D-tipi siklinlerle ( siklin D1, D2 ve D3) oluşturduğu kompleksler, G1' de restriksiyon noktasından geçişte kritik bir role sahiptir. Siklin E, G1'in ilerleyen evresinde eksprese edilir ve Cdk2/siklin E kompleksi G1' den S' ye geçiş ve DNA sentezinin başlaması için gereklidir. Cdk2' nin siklin A ile yaptığı kompleksler, hücrelerin S evresi sürecinde ilerlemesi için fonksiyon görür. G2' den M' ye geçiş ise, Cdc 2'nin daha sonra siklin B ile oluşturduğu kompleks tarafından sağlanır (23).

Hücre siklusu sırasında Cdk aktivitesi en az 4 mekanizma tarafından gerçekleştirilir:

- Cdk ile siklin birleşmesi; bu şekilde oluşan Cdk/ siklin kompleksi, siklin sentezi ve yıkımı tarafından kontrol edilir.
- 161. pozisyondaki threonin rezüdünün aktive edici fosforilasyonu; böylece Cdk / siklin kompleksi aktive edilir. Cdk' nın bu aktive edici fosforilasyonu CAK ( Cdk Aktive edici Kinaz) olarak adlandırılan bir enzim tarafından katalizlenir.
- CAK tarafından oluşturulan fosforilasyona zıt olarak, Cdk' nın amino ucu yakınında yer alan threonin ve tirozin rezüdülerin inhibitör fosforilasyonu.
- Cdk / siklin kompleksine inhibitör proteinlerin bağlanması; Cdk inhibitörlerinin bir familyası tanımlanmıştır. Bu familyanın farklı üyeleri farklı Cdk'ları inhibe etmektedir. Örneğin: Cdk inhibitör proteinlerinden birisi olan p16, Cdk 4 ve 6 ile siklin D komplekslerine bağlanarak hücreyi özel olarak G1 evresinde durdurur.

**Büyüme Faktörleri ve D-Tipi Siklinler:** Büyüme faktörlerinin yokluğunda, hücreler, restriksiyon noktasını geçemezler ve durağan hale gelirler. Çoğunlukla, G0 olarak bilinen dinlenme durumuna geçerler. Bu durumdan çıkmaları ve tekrar hücre döngüsüne girmeleri ancak büyüme faktörü uyarılarına cevaben gerçekleşir. Hücre döngüsü ilerlemesinin hücre dışı büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmesi, büyüme faktörü reseptörlerinin uyardığı hücre içi sinyal yollarının, sonunda, hücre döngüsü mekanizmasının bileşenlerini denetlediği anlamına gelir.

Büyüme faktörü uyarısı ile hücre siklusunun ilerlemesi arasındaki ilişki D-tip siklinler ile yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Büyüme faktörü uyarısına bağlı olarak siklin D sentezi artmakta ve büyüme faktörü ortamda olduğu sürece siklin D sentezi de devam etmektedir. Büyüme faktörü ortamdaki uzaklaştırılırsa D- tip siklinler yıkılmakta ve hücre içi konsantrasyonları hızla düşmektedir. Siklin D, büyüme faktörü uyarısının hedefi olduğundan siklin D düzenlenmesindeki bir defekt, kanser hücrelerinin bir karakteristiği olan büyüme faktörü düzenlenmesinin bozulmasına neden olur. Hücre siklusundaki bu defekt sonucu bazı insan kanserlerinin arttığı bulunmuştur.

**Hücre Döngüsü İnhibitörleri:** Hücre çoğalması sadece büyüme faktörleri tarafından değil, aynı zamanda, hücre döngüsü ilerlemesini baskılayan bir grup farklı sinyal tarafından da kontrol edilir. Örneğin, eğer bir DNA hasarı oluşursa, bu hasar tamir edilmedikçe hücre siklusu kesilir. Yine bir takım hücre dışı faktörler, hedef hücrelerin çoğalmasını uyarmaktansa inhibe eder. Bu tür inhibitör uyarıcıların etkisi özellikle Cdk inhibitörleri tarafından artırılır.

G1 kontrol noktasında DNA hasarına cevaben p53 proteini aracılığı ile hücre döngüsünün duraklatılması, Cdk inhibitörlerinin etkisine uygun bir örnektir. Transkripsiyonel düzenleyici olarak fonksiyon gösteren p53 proteini, en azından kısmen, Cdk inhibitörü p21'in ekspresyonunu uyarır. p21 proteini birçok Cdk/ siklin kompleksini inhibe eder ve p53 tarafından uyarılması, DNA hasarını takiben p53'e bağlı hücre döngüsü duraklatılmasının mekanizmalarından sadece biridir.

Hücre döngüsünü S ve G2 denetim noktalarında kontrol etmek için, replike olmamış yada hasara uğramış DNA'lara yanıt olarak hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyen, farklı bir moleküler mekanizma kullanılır. Bu kontrol noktalarında hücre döngüsünün duraklatılması Chk1 ve Chk2 protein kinazlar tarafından sağlanır. Chk1 ve Chk2, Cdc2/ siklin B komplekslerinin defosforillenmesi ve dolayısıyla aktivasyonundan sorumlu olan protein fosfotaz Cdc25C'yi fosfatlayarak inhibe eder. Cdc2 aktive olmazsa, mitozaya geçiş bloke olur ve hücre G2'de durdurulur. Benzer şekilde, Chk1 ve Chk2, Cdc25 ailesinin diğer bir üyesi olan Cdc25A'yı fosfatlar. Cdc25A, S evresinin başlatılması ve devamından sorumlu olan Cdk2 ve siklin A veya E komplekslerini defosforile ve aktive eder. Fosforilasyon Cdc25A'nın hızla parçalanmasına neden olur, bu da DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün duraklatılması ile sonuçlanır (23, 27).

## 2.2.5. Kanserin Genetik Yapısı:

Hücre bölünmesi ve hücre ölümünü kontrol eden çok çeşitli genler bulunmaktadır. Önceki bölümlerde özellikle hücre döngüsü sırasında etkili olan genlerden bahsedilmişti. Yapılan son çalışmalarda, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerin mutasyonlarının kanser oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. Kanser gelişimi, birçok kanser türünde, mutasyonların tek bir somatik hücrede oluşması ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açması şeklinde görülürken, daha nadir olarak ise kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar germ hücrelerine aktarılmakta ve böylece vücudun bütün hücrelerinde yer almaktadır. Bu mekanizma herediter kanser sendromlarında görülmektedir. Kanserde etkili olduğu düşünülen tüm genler birlikte değerlendirildiğinde 3 ana grup altında toplanırlar (3,78).

- 1- Onkogenler
- 2- Tümör süpresör genler
- 3- DNA tamir genleri

Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogenler adını verdiğimiz normal hücresel genlerin mutant (aktif olan) allelleri olmakla birlikte telomerazları kodlayan veya apoptozisi bloke eden genler de olabilirler.

Tümör süpressör genler ise hücre büyümesini düzenleyerek tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör süpressör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve defektif apoptozise neden olmaktadır.

Kanserdeki mutasyonları diğer mutasyonlardan farklı yapan, mutasyonların güçlü bir şekilde hücresel proliferasyon ve uzun hücresel yaşam için pozitif seleksiyona yol açmasıdır. Kanser hücresi fenotipik olarak kontrolsüz ve aşırı proliferasyon özelliğine sahip olup, tek bir mutant hücre yaşamı tehdit eden bir hastalık gelişimine yol açmaktadır (45).

## 2.2.6. Onkogenler:

Onkogen, fonksiyon veya ekspresyon değişimiyle hücre bölünmesi ve proliferasyonun anormal stimölasyonuna yol açan mutant bir gen dir. Aktive edici mutasyon, onkogenin kendisinde, onun regölaturar elementlerinde yada onkogen ü rününün regöl e edilemeyen fonksiyonuna veya artmış ekspresyonuna neden olan onkogenin genomik kopya sayısında dır.

Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncölük eden hücre sel genlere “protoonkogen” adı verilir. Bunlar ( *srs*, *ras* ve *raf* gibi), hücrede önemli rol oynayan, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yolların da görev yapan genlerdir. Onkogenler ise, bu protoonkogenlerin anormal eksprese olan veya mutant şekilleridir. Bu genlerde oluşabilecek değişiklik sonrasında, onkogenler anormal hücre proliferasyonuna ve tümör gelişimine yol açarlar.

Bir retroviral genoma yerleşen onkogen, birçok yönüyle hücre sel protoonkogen den farklıdır. Öncelikle, viral onkogenin transkripsiyonu protoonkogenin transkripsiyonunu düzenleyen normal diziler yerine, viral promotör ve güçlendirici dizilerin etkisiyle gerçekleşir. Bu nedenle onkogenler protoonkogenlerden çok daha fazla miktarda ve bazı durumlarda da olmaması gereken hücrelerde eksprese olurlar.

Onkogenler, normal hücre sel proteinlere kıyasla yapısal ve işlevsel açıdan farklılıklar gösteren proteinler kodlarlar. Onkogenlerin çoğu ( ö rn., *raf* ) amino ucunda viral diziler taşıyan bir birleşik proteinin sentezine neden olur. Bu tür birleşik proteinlerinin oluşmasına neden olan rekombinasyon olayları çoğunlukla, protoonkogenlerin virüslara geçişi sırasında gerçekleşir. Bu işlem sırasında protoonkogenin hem amino hem de karboksil ucu sıklıkla delesyona uğrar. Bu delesyonlar, protoonkogenin aktivitesini düzenleyen düzenleyici bölgelerin kaybına, dolayısıyla aktivitesi kontrol edilemeyen onkogen proteinlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir.

Bugüne kadar 80 dolayında protoonkogen saptanmış olup her birinin onkogenik potansiyel göstererek farklı kanserlerin oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Protoonkogenlerin büyük bölümü, vücutta hücrelerin sosyal davranışlarını düzenleyen mekanizmalarda görev alan elemanları kodlarlar. Bir hücrenin komşusundan gelen sinyaller hücreyi bölünmeye, farklılaşmaya yada ölmeye yönlendirir. İşte protoonkogenler, ekstrasellüler ortamdan gelen sinyalleri alarak hücre içerisinde bu sinyalin nükleusta DNA'ya kadar ulaşmasını sağlayan olaylar zincirinde rol alan proteinleri kodlarlar. Protoonkogen ürün listesine bakıldığı zaman hücre sinyal ileti sisteminde görev alan her tip molekülü içermektedir (salgılanan proteinler, transmembran reseptörler, GTP- bağlayan proteinler, proteinkinazlar, gen düzenleyici proteinler vb). Bu moleküllerin hepsi normal şartlarda kompleks zincirler halinde, daha fazla hücre gereksinimi olduğu durumlarda yeni hücre üretimi için sinyalleri alırlar. Ancak başkalaşım bu genlerin fonksiyonlarını değiştirir, hücre gereksinimi olmasa dahi hücrenin bu sinyalleri almasını ve hücre bölünmesinin devam etmesine neden olur (3, 37).

Nokta mutasyonları, protoonkogenlerin onkogene dönüşme şekillerinden sadece biridir. Birçok kanser türünde kromozom yapısında translokasyon, duplikasyon ve delesyon gibi anormallikler de görülür. Kromozom translokasyonlarından kaynaklanan gen düzenlenmeleri, sıklıkla onkogenlerin ortaya çıkmasına yol açar. Özellikle lösemi ve lenfomalarda çok sık gözlenen başta kromozom translokasyonları olmak üzere diğer kromozom yeniden düzenlenmeleri solid tümörlerde de rapor edilmektedir (3, 45, 55). Kromozom translokasyonu sonucu oluşan onkogen aktivasyonuna ilişkin tanımlanmış ilk örnek *c-myc* geninin, antikor üreten B lenfositlerin tümörü olan insan Burkitt lenfoması ve fare plazmasitomlarındaki rolüdür. Burkitt's lenfomada kromozom 8q da lokalize *c-myc* protoonkogeni ile kromozom 14q'da lokalize IgH genleri arasındaki karşılıklı parça değişimi sonucunda *c-myc* immüoglobulin lokusuna dahil olmakta ve burada kontrolsüz şekilde ürün oluşturmaktadır (9, 20, 45). *c-myc* geni, büyüme faktör uyarısı durumunda aktif hale gelen bir transkripsiyon faktörüdür ve kontrolsüz ürün oluşturması hücre proliferasyonunu yönlendirmesi için yeterli olmakta ve tümör gelişimi ile sonuçlanmaktadır (45).



Bazı protoonkogenlerin translokasyonu da, genlerin protein kodlayan bölgesinde değişikliklere neden olarak, anormal gen ürünlerinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Bu tür translokasyonların en tipik örneği, kronik myeloid lösemide, kromozom 9q2'da lokalize olan *abl* protoonkogenin kromozom 22q da lokalize *bcr* geni ile translokasyonudur (3, 9, 45). Kronik myeloid lösemi gelişiminin %90 kadarından sorumlu olan (21, 32) bu anomali sonucunda oluşan *bcr/abl* füzyon proteininde, *abl* protoonkogen proteininin normal amino terminalinin *bcr* aminoasit sekansları ile değişimi söz konusudur ve bunun sonucunda *bcr/abl* füzyon proteini sentezlenir. *Abl* protoonkogeni Onkogenik aktivite kazanmıştır(3, 9, 45, 78).

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktive olmasında etkili diğer bir mekanizma da, genlerin hızlı ve yüksek düzeyde ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. Gen amplifikasyonu, normal hücrelere göre tümör hücrelerinde daha sık gözlenir. Pek çok tümörün progresyonunda, tümörün daha hızlı gelişmesi ve malign yapısının artmasında onkogen amplifikasyonu önemli rol oynar. Bu gruba en iyi örnek nöroblastomda *N-myc*; meme ve over karsinomlarında ise *erbB-2* onkogen amplifikasyonlarıdır. Amplifiye *N-myc* kopyaları hızla gelişen agresif tümörlerde sıklıkla gözlenir ki bu da *N-myc*'nin nöroblastomanın malign özelliğinin artmasında önemli bir rolü olduğunu ifade eder (3, 45).

### 2.2.7. Tümör Süpresör Genler:

Bir diğer mekanizma ise tümör süpresör genlerin inaktivasyonudur (9). Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran yada kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise, hücre çoğalmasının kontrolünde bu mekanizmanın tam tersi bir yolu simgeler, normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskırlar. Oluşan birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki ortadan kalkar ve tümör hücrelerinde anormal çoğalma başlar.

Tümör süpresör genlerin aktivitesine ilişkin ilk bilgiler Henry Haris ve arkadaşları tarafında 1969'da başlatılan somatik hücre hibridizasyon deneylerinde elde edilmiştir. Normal hücrelerin tümör hücreleri ile birleşmesi sonucu oluşan hibrid hücrelerde her iki ebeveyne ait kromozomlar vardır. Ancak çoğu hücre deney hayvanlarında herhangi bir tümör oluşturmamıştır ki bunun nedeni, normal hücreden köken alan genlerin tümör gelişimini baskılamalarıdır (9). Tümör süpresör genlerin tümör gelişimindeki mekanizmalarına ilişkin bilgiler 1971'de Knudson tarafından ortaya atılmıştır. Bugün "Knudson hipotezi" veya "iki vuruş" hipotezi olarak ifade edilen bu görüşte tümör süpresör genin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yetenek ancak ilgili genin her iki allelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur. Tümör süpresör gen kontrol etme fonksiyonunu kaybeder (3).

### 2. 2. 8. DNA Tamir genleri:

DNA birçok kimyasal reaksiyonla ilişki içindedir. DNA hücre genomunun kalıcı kopyası olduğu için yapısındaki değişiklikler, diğer hücre komponentleri olan RNA yada proteinlere göre çok daha önemli sonuçlara neden olur. Başkalaşım, DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA'ya katılması nedeniyle oluşur. Ayrıca DNA'da spontan veya kimyasal ajanlara, radyasyona maruz kalma durumunda da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar (9, 20). Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA'yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadır. Bu DNA tamir mekanizmaları iki ana gruba ayrılır (9) :

1- DNA harabiyetinden sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi

2- Harap olan bazların DNA'dan çıkarılması

Ancak bu gruba dahil olan genlerde oluşacak başkalaşım, fonksiyonel ürün sentezlenmesini engellediği için DNA tamir edilemeyecek ve genom dengesi bozulacaktır ki bu da karsinogenezde önemli bir etkidir. Örneğin Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser gelişiminin %50 kadarındaki moleküler patoloji, yanlış eşleşme tamirinden sorumlu genlerdeki başkalaşım, nedeniyle tamirinin gerçekleşmemesidir (9).

## 2. 3. AKCİĞER KANSERİ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2003 yılına ait kanser raporunda, global kanser oranının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak 15 milyon kişiyi etkileyebileceği bildirilmiştir. Akciğer kanserinin yıllık 1.2 milyon yeni vaka ile birlikte dünyada en yaygın kanser tiplerinden biri olduğu bu raporla açıklanmıştır (77).

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür. 1996 yılında ABD'de 64 bin kadın akciğer kanserinden, 44 bin kadın meme kanserinden ölmüştür. Tüm dünya ortalamasına baktığımızda Akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikinci sıradadır (24).

Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl yirmi bin- yirmibeş bin yeni akciğer kanseri ortaya çıkmakta ve bu rakamın otuz bin- kırk bin' e kadar ulaşabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde akciğer kanserlerinin çoğu erkeklerde görülmektedir. Ancak 1980'lerden sonra ülkemizde kadınlarda artan sigara tiryakiliği bu oranı hızla artırmaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1983-1989 yılları arasında ülkemizde kanser sıklığı 32/100.000'dir. Bunun %26'lık bölümünü ilk sıradaki akciğer kanseri oluşturmaktadır.1991-1992 verilerine göre solunum sistemi kanserlerinin oranı, tüm kanserler içinde %43'tür. Yine aynı verilere göre yapılan tahminlerde, gerçek kanser sıklığı 120-130/ 100.000 olmalıdır (80).

## 2.3.1. Akciğer Kanseri İçin Risk Faktörleri:

En sık görülme, en çok ölümcül ve en fazla sosyal ekonomik kayıplar nedeni olma gibi bir hastalığın halk sağlığı için önemli üç özelliğinin tümünü akciğer kanseri içerir ve bu nedenle akciğer kanseri tıp düzeyi dışında halk sağlığı açısından da bir sorundur. Bu sorunun çözülmesinde önde gelenler koruyucu önlemlerin alınması ve erken tanının yapılmasıdır. Koruyucu önlemleri çeşitli kişisel ve genel nedenlerle çok defa sağlayabilmek mümkün olmayabilir. Ancak, erken tanı için taramalar çok önemlidir.

Yaş bütün kanserlerde olduğu gibi burada da önce gelen yüksek risk faktörlerinden bir tanesidir. Kansere, 65 yaş ve üzerindeki kişilerde önemli bir olgudur ve tüm kanserlerin %58 kadarı bu yaş üzerinde oluşmaktadır. Yaşı 65 üzerinde olan kişilerde kanser gelişme riski on kat daha fazladır. Akciğer kanserlerinin ancak %5-10 kadarı genç erişkinlerde görülür ve genellikle ailesel öyküye bağlanmaktadır. Son yirmi yılda 65-yaş ve üzeri erkeklerde görülme oranı %15 düşerken, kadınlarda %60 oranında yükseliş görülmektedir.

Akciğer kanserinin başlıca nedeni sigaradır. Tüm akciğer kanserlerinin %80-90'ı tek başına sigaraya bağlıdır. Akciğer kanseri oluşumu ile günlük içilen sigara sayısı arasında bir bağlantı olduğu gibi, bu kanserden ölüm riski sigaraya başlama yaşı, kullanım süresi, her gün içilen sigara sayısı ve sigaradaki katran yoğunluğu ile bağlantılıdır. Katran oranı az veya filtreli sigaralar ile hastalığın bağlantıları açısından farklılıklar olup-olmadığı konusunda yeterli bilgilerimiz olmamakla beraber, her ikisinin ölüm riskini azalttığı konusunda açıklamalar vardır. Sigara bırakıldıktan sonra risk azalmaya başlar ve bu azalma 5 yıl sonra belirgin duruma gelir. Ayrıntılarına girildiğinde, yaşamlarının erken dönemlerinde sigarayı bırakan kişiler daha düşük ölüm riskine sahiptir. Sigarayı 30-40 yaş arasında bırakanlarda, yaşa bağlı akciğer kanserinden ölüm riski hiç sigara içmeyenlerden hafifçe daha yüksektir. Sigarayı 50-60 yaş arasında bırakanlarda ölüm riski yükselmiyor fakat düşmediği de görülüyor. Akciğer kanseri riski pipo içenlerde, hiç içmeyenlere oranla yüksek, sigara içenlere

## PDF Eraser Free

oranla düşüktür. Akciğer kanseri nedeni olarak sigaranın rolü bu kadar belirgin olduğuna göre korunmanın en önemli iki yolu yaşam biçimini değiştirmek ve tütün kullanımını ortadan kaldıracak yasaları getirmektir.

Çevresel veya “gönülsüz, edinsel” sigara içimi de önemlidir. Örneğin, eşlerden bir tanesinin sigara kullandığı ailelerde sigara kullanmayan eşin akciğer kanseri riski artar. Eşlerden ikisinin sigara içmediği birinci aile ile eşlerden bir tanesinin sigara içtiği ikinci aile ile yapılan karşılaştırmada ikinci ailenin sigara içmeyen eşinde akciğer kanseri riski birinci aile fertlerinden %25 oranlarına kadar yüksektir. Çünkü, sigara dumanında bulunan bazı kanser yapıcı maddeler çevre dağılımı ile ortamdaki kişi tarafından alınmaktadır. Aynı durum iş ortamları için de bahis konusudur ancak bunu saptayabilmek de çok güçtür. Ancak, istatistikleri güvenli ülkelerde, örneğin ABD’ de her yıl akciğer kanserine yakalananların %5 kadarında çevresel sigara içiminin sorumlu olduğu düşünülüyor.

Temel de bazı meslek ortamları akciğer kanseri için tek başlarına bir neden konusudur. Meslekle ilgili akciğer kanseri yapıcı maddelerin önde gelenleri arasında arsenik, asbest, eter, krom, nikel ve vinil klorit vardır. Bazı ön görümlere göre, akciğer kanserlerinin mesleki nedenlerle oluşma oranı %20’lere kadar yükselmektedir. Sigara kullanılmasının bu kişilerde riski 90 kat kadar arttırabileceği ileri sürülmüştür. Meslek bağlantılı akciğer kanserleri için, asbest ve kömür ocaklarındaki ilişki, deneysel ve yaygınlık aşamalı yapılmış çalışmalar sonunda ortaya konulmuştur. Sosyal ve ekonomik düzeyi alt sıralarda olan kişilerde, Afrika kökenli insanlarda Akciğer kanseri görülme sıklığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Fakat bu ortamlarda ve ırklarda sigara kullanımının da daha fazla olduğu bir gerçektir. Beslenmenin rolü zaman zaman tartışılmakla beraber kesin bulgu ve bilgiler ortaya konamamıştır. Koruyucu rolü olanlar içinde taze sebze ve meyvelerdeki anti-oksidan maddeler ve karoten ihtiva eden yiyecekler gündemdedir. Risk nedeni olarak kolesterol ve yağ oranı yüksek yiyeceklere işaret edilmektedir

Çevresel radon maruziyetinin de akciğer kanseri gelişimi ile ilişkili olabileceği, coğrafi olarak akciğer kanseri yüksekliğine yol açabileceği bilinmektedir.

Ailede akciğer kanseri olması akciğer kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Ailede akciğer kanseri olan ve hiç sigara içmemiş bir kadının akciğer kanseri riski 2.8 kat artmış iken; ailede akciğer kanseri olmayan ve sigara içen bir kadında bu risk 11.3 kat artmıştır; ailede akciğer kanseri olan ve sigara içen bir kadında ise bu riskin 30 kat arttığı gösterilmiştir.

### **2. 3. 2. Akciğer Kanserinin Belirtileri:**

Akciğer kanseri başlangıçta pek özel olmayan bir grup genel şikayetlerle başlamaktadır. En basit bir soğuk algınlığı ve yorgunlukta da görülebilen bu şikayetlere çok defa önem verilmemektedir. Halbuki, erken tanı konulan, uygun ve gerekli cerrahi tedavi yapılan hastalarda beş yıllık yaşama oranları %70-80 düzeylerine çıkabilmektedir. Hastalığın semptomlarının iyi bilinmesi erken tanı açısından yarar sağlamaktadır. En sık görülen akciğer kanseri belirtileri:

- Bitmek bilmeyen ve zamanla daha kötüye giden bir öksürük
- Kalıcı göğüs ağrısı
- Kan tükürmek
- Nefes darlığı
- Hırıltılı nefes alıp-vermek.
- Sık sık zatürre veya bronşit olması ve geçmemesi
- Boyun ve yüzde şişkinlik
- İştahsızlık ve kilo kaybı
- Yorgunluk

Akciğer kanserinin akciğer dışı belirtileri, tümörün diğer organlara metastazlarına bağlı olabildiği gibi tümörden salınan bazı immünolojik ve hormonal maddelere bağlı da olabilir. Metastaz belirtileri organa özgü olup örneğin kemik metastazlarında ağrı, beyin metastazında bilinç bozukluğu, kasılmalarla seyreden nöbet, görme bozuklukları olabilir. Metastaz belirtilerinin dışında iştahsızlık, kilo kaybı, kuvvet kaybı, halsizlik, ateş gibi şikayetler olguların birçoğunda görülebilir. Ayrıca özellikle küçük hücreli akciğer kanserinde tümörden salınan bazı hormonal maddelere bağlı olarak parmaklarda çomaklaşma, deri lezyonları, nörolojik tablolar, kan tablosunda bozulma gibi bulgular olabilir.

### **2. 3. 3. Akciğer Kanserinin Tipleri:**

Akciğer sıklıkla ekstratorasik organların kanserlerinin metastaz yeri olmasına rağmen primer akciğer kanserleri de oldukça sık görülür. Primer akciğer tümörlerinin %95'i bronşial epitelden kaynaklanır (bronkojenik karsinomlar). Kalan %5'i içinde bronşial karsinoidler, mezoteliomalar, bronşial gland neoplazmları, mezenkimal malignensiler (fibrosarkomlar, leiomyomalar), lenfomalar ve birkaç benign lezyon bulunur. En sık görülen benign lezyon küçük (3-4 cm), küresel hamartomlardır.

Bronkojenik karsinomlar, endüstrileşmiş ülkelerdeki kansere bağlı ölümlerin büyük kısmını oluştururlar. Başlıca dört histolojik tipe bronkojenik karsinoma vardır. Bunlar, Squamöz hücreli, adenokarsinoma, Büyük hücreli indifferansiye ve küçük hücreli karsinoma'dır. Günümüzde tedavi açısından değerlendirme yapılırken ilk 3 tip bir kategoriye sokulup " Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu" (KHOAK) diye adlandırılır. Bu şekilde " Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu" (KHAK) bu gruptan ayrılmış olur (38).

## ***Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomları:***

*Squamöz hücreli karsinoma*, erkeklerde daha sık görülmektedir. Özellikle sigara içenlerde görülmektedir. Büyük bronşların santralinden çıkmaya meyillidir, lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır fakat toraks dışına diğer akciğer tümörlerinde olduğundan daha geç yayılır. Squamöz karsinoma, bronş epitelinde yıllar önce başlayan bir metaplazi ve displazi izleyen in-situ karsinomdan sonra ortaya çıkar. Mukozada 1-2 cm çapında, kalınlaşma ve irregüler nodül tarzında kabarıklık yavaş yavaş gelişir. Bu durumda henüz klinik ve radyolojik bir bulgu olmadığı halde, balgamda bronş yıkama ve fırça ile alınan materyalde atipik epitel hücreleri görülür. Histolojik olarak bu tümörler, keratin inciler ve intersellüler köprüler oluşturan iyi diferansiye tipten, minimal bir squamöz özelliği olan indiferansiye tipe kadar değişen çeşitlerdedir. Squamöz hücreli karsinomlar, metastaz yapmadan önce büyük ve bronşları tıkayan semptomatik kitle yaptıklarından diğer tiplere göre hafifçe daha iyi bir prognoza sahiptir. Tanı konulduğunda genellikle cerrahi olarak çıkarılabilir durumdadırlar.

*Adenokarsinomlar*, tüm KHOAK içinde %30-35 oranında görülmektedir. Santral yerleşimli olabileceği gibi, çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Periferik akciğer skarları ile ilgili olarak ortaya çıkar. Adenokarsinomlar, yavaş büyürler ve daha küçük kitle yaparlar. Ayrıca diğer subtiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Bronchioloalveolar karsinoma (BAC), özel bir adenokarsinoma tipidir. İki çeşidi vardır. BAC'ın yarısından azı multifokal müsinöz tümörlerdir. Bazen tek başlarına kitle yaparlar, bazen de birbirleri ile birleşen kitleler oluştururlar. Histolojik görünüm aldatıcı olarak benign olup mitoz nadirdir. Diğer çeşidi 10 cm çapa kadar ulaşabilen, gri-beyaz tek bir nodül şeklinde olup bir üst lob içinde ve perifere yakın yerleşimlidir. BAC'ın prognozu diğer bronkojenik karsinomlara göre daha iyidir.



*Büyük hücreli karsinomalar*, sitolojik diferansiyasyon göstermeyen belki de squamöz veya glandüler neoplazmların, herhangi bir kategoriye giremeyecek kadar, indifferensiye şeklindedir. Tümör bazen vahşi bir anaplazi gösteren dev hücrelerden oluşmuştur. Erken fazda uzak yerlere yayılma eğiliminden dolayı kötü prognozlu dururlar. Yarısından fazlasında tanı konduğu zaman beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşama oranı %2-3 dür.

### ***Küçük Hücreli Akciğer Karsinomları:***

Erkeklerde kadınlara oranla daha sık olup, sigara içimi ile çok yakın ilgileri vardır. Soluk gri renkte, santral lokalizasyonda kitleler olup, hiler ve mediastinal lenf nodlarını erken fazda tutarlar. Bu kanserler, küçük, oval-yuvarlak, lenfosit benzeri ve çok mitoz gösteren hücrelerden meydana gelmiştir. Bu klasik yulaf hücreli (oat cell) kanserdir. KHAK'lar hızlı büyüyen, geniş infiltrasyon yapan ve erken yayılan lezyonlardır ve nadiren rezeke edilebilir durumda yakalanırlar. Bu nedenle hemen her zaman kombine radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilirler. İki yıllık sağ kalım oranı %5-8 dolayındadır (38).

### **2.3.4. Akciğer Kanseri Tanı ve Evrelendirme:**

Daha önceki bölümlerde anlatılan belirti ve bulgularla hekime başvuran hastalarda ayrıntılı bir öykü ve fizik muayenenin ardından tanı için atılacak ilk adım standart akciğer grafisinin (2 yönlü) çekilmesidir. Birçok olguda bu görüntüleme yöntemi ile tümör yada tümörün oluşturduğu enfeksiyon, plörezi, atelektazi (akciğerin çökmesi) gibi tablolar saptanabilir. Akciğer grafisinde tümör yada tümör ile ilişkili olabilecek diğer görünümünün saptanması halinde atılacak 2. adım genellikle akciğerin bilgisayarlı tomografisinin çekilmesidir. Bilgisayarlı tomografi görülen lezyon hakkında detaylı bilgi verdiği gibi standart akciğer grafisinde görülemeyecek kadar küçük olan diğer

lezyonların görülmesine de olanak sağlar. Standart akciğer grafisi ve bilgisayarlı tomografilerin incelenmesinden sonra hastalığın bölgesel yayılımı ve lokalizasyonu ortaya çıkar. Hekim bu noktada artık kesin tanı için gerekli olacak biyopsi yönteminin ne olacağına karar verebilir. Örneğin cerrahi müdahale düşünülen olgularda ve santral bölgede yer alan tümörlerde bronkoskopi yapılması hem evreleme hem de tanı için gerekli iken, bronkoskopi ile ulaşılamayacak periferik bölgelerde yer alan tümörlerde bilgisayarlı tomografi rehberliğinde iğne biyopsisi tercih edilebilir. Yine bu ilk incelemelerin sonucunda tümöre cerrahi bir girişim düşünülüyorsa tanı için ilk aşamada balgam muayenesi istenebilir. Bu tür hastalarda balgamın sitolojik incelemesi sonucunda tanıya ulaşamaz ise diğer yöntemlere başvurulur. Akciğer grafisi ve bilgisayarlı tomografi ile görüntülenen tümörde balgam, plevra sıvısı sitolojisi, bronkoskopi veya iğne biyopsisi gibi yöntemlerle hücre tipi tanısı da konulduktan sonra elde edilen sonuca göre evreleme çalışmalarına başlanmalıdır. Kanserde evreleme hastalığın seyri ve uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesi açısından son derece önemlidir ve mutlaka yapılması gerekir (38).

Küçük hücreli akciğer kanseri sınırlı ve yaygın evre olmak üzere 2 evrede incelenir. Sınırlı evrede hastalık göğsün tek bir tarafı ile sınırlıdır, karşı akciğere veya diğer organlara yayılım yoktur. Yaygın evre küçük hücreli akciğer kanserinde hastalık, akciğer dışı diğer organlara yada karşı akciğere metastaz yapmıştır. Sınırlı ve yaygın evrelerde tedavi farklılık gösterdiğinden küçük hücreli akciğer kanseri tanısı konulan olgularda en azından beyin tomografisi yada MR'ı, kemik sintigrafisi ve üst batin tomografisi veya ultrasonografisi ile uzak organ metastazları araştırılmalıdır.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin erken evrelerinde cerrahi tedavi sağkalım üzerine en etkili tedavi modalitesi olduğundan bu hastalıkta evreleme çalışmaları küçük hücreli akciğer kanserine göre daha detaylı incelemeleri gerektirir. Küçük hücre dışı akciğer kanserinde evreleme TNM sistemine göre yapılır. Bu sistemde T ile tümör boyutu, tümörün komşu doku ve organlarla ilişkisi, tümörün bronkoskopik görünümü gibi birçok özelliği tanımlanırken, N tümöre ait bölgesel veya uzak lenf bezlerindeki metastaz varlığını yada yokluğunu tanımlar. M uzak organ metastazları ile ilişkili olup, M1 olarak tanımlanan olgular yani uzak organ metastazı saptanan olgular

doğrudan başka bir incelemeye gerek olmaksızın evre IV olarak sınıflandırılır. TNM sistemine göre akciğer kanseri olguları evre I, evre II, evre III ve evre IV olarak dört grupta ele alınır. Evre I ve II, erken evre akciğer kanseri olarak tanımlanır ve bu tür olgularda mutlaka cerrahi tedavi olanakları araştırılmalıdır.

Akciğer kanserinin anatomik yaygınlığının saptanması yani evrelendirmesi, hastalığın prognozunun belirlenmesi, tedavi şeklinin seçimi ve farklı klinik tedavi serilerinin sonuçlarının karşılaştırılması için gerekli bilgiyi sağlar. Özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olgularında, küratif cerrahi veya radyoterapi arasındaki seçimde evrelendirme esas rolü oynamaktadır. Bu nedenle Amerikan Kanser Birliği ve Uluslararası Kanser Mücadele Birliği, akciğer kanseri için primer tümörün büyüklüğü ve yaygınlığına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N), uzak metastazın varlığına (M) dayanan TNM evrelendirme klasifikasyonunu, 1997 yılında modifiye etmişler ve bugün kullanılan tanımı yapmışlardır (Tablo 2.3.4.1).

Tablo 2.3.4.1: Akciğer Kanselerinde Yeni Uluslararası TNM Sistemi

<p><b><u>PRİMER TÜMÖR (T)</u></b> T0: Primer Tümör saptanmaması. Tx: Radyolojik ve bronkoskopik olarak saptanamayan fakat bronkopulmoner sekresyonlarda malign hücre bulunması. Tıs: İn situ karsinom T1: En büyük çapı 3 cm veya daha az olan, akciğer parankimi veya visceral plevra ile çevrilmiş tümör. Bronkoskopik olarak lob bronşunun proximaline invazyon olmaması. T2: 3 cm den büyük tümör veya herhangi büyüklükteki bir tümörün visseral plevraya yayılması veya hiler bölgeye kadar genişleyen atelektazi ve obstrüktif pnömoniye neden olması. Bronkoskopik tetkikte, karinadan en az 2 cm daha uzakta olan tümör. T3: Herhangi büyüklükteki tümörün, göğüs duvarı (Superiör sulcus tümörü dahil), diyafragma,mediastinal plevra,parietal perikarda yayılması veya tüm akciğeri kapsayan atelektazi ve obstrüktif pnömoniye neden olması veya bronkoskopik tetkikte karinaya 2 cm'den daha az mesafede fakat karinaya yayılmamış olması. T4: Herhangi büyüklükteki tümörün mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özofagus, vertebra ve karinaya yayılması veya malign plevra ve perikard sıvısı saptanması veya akciğerin aynı lobunda birden fazla neoplastik nodül bulunması.</p> <p><b><u>NODAL TUTULUM (N)</u></b> N0: Rejyonel lenf nodlarında metastaz olmaması. N1: Aynı taraf peribronşial ve/veya hiler lenf bezlerinde metastaz veya direkt yayılım mevcut. N2: Aynı taraf mediastinal ve/veya subcarinal lenf bezlerinde metastaz olması. N3: Karşı taraf hiler veya mediastinal lenf bezlerinde metastaz saptanması, aynı taraf veya karşı taraf skalen veya subraklavikuler lenf bezlerinde metastaz mevcut.</p> <p><b><u>UZAK METASTAZ (M)</u></b> M0: Uzak metastazın olmaması M1: Uzak metastaz mevcut.</p>
---

## Evre Grupları

"Occult" karsinom (TxN0M0), bronkopulmoner sekresyonlarda malign hücreler belirlenmiş, fakat tümör radyolojik ve bronkoskopik olarak gösterilememiştir (Tablo 2.3.4.2).

1997'de evre I tümörler IA ve IB olarak ikiye ayrılmıştır. Evre I'de lezyonlar tamamen akciğer içerisindedir. Uzak metastaz veya lenf bezi tutulumu yoktur. Evre IA'da (T1 N0 M0) hastaların 5 yıllık yaşam süreleri, evre IB hastalardan daha iyidir. Bu hastalarda cerrahi tedavi tercih edilir. Evre IA'da 5 yıllık yaşam süresi %67, IB'de ise %57'dir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (KHOAK) hastaların %13'ü IA, %23'ü ise evre IB'dir.

Tablo 2.3.4.2: . Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Evre Grupları.

Evre	Tx	Nx	Mx
Occult carcinoma	x	?	?
Stage 0 (Karsinoma İn situ)	IS	0	0
Stage IA	1	0	0
Stage IB	2	0	0
Stage IIA	1	1	0
Stage IIB	2 3	1 0	0 0
Stage IIIA	3 1-3	1 2	0 0
Stage IIIB	herhangi N 4	3 herhangi T	0 0
Stage IV	herhangi T	herhangi N	1

Evre II, 1997'de bu gruptaki hastalar yaşam sürelerine göre, IIA ve IIB olarak ikiye ayrılmıştır. Evre IIA (T1N1M0) hastaların 5 yıllık yaşam süreleri %55'tir. KHOAK'li hastaların %1 den daha azı bu evrededir. Evre IIB hastalar ise, T2N1M0 ve T3N0M0 gruplarını kapsar. Göğüs duvarına invaze, ancak lenf nodu tutulumu olmayan (T3N0M0) tümörlerin prognozu, lenf nodu tutulumu olan küçük tümörlere göre daha iyidir. Bu nedenle T3N0M0 tümör, evre III yerine, evre IIB olarak evrenmektedir. Evre II B hastaların 5 yıllık yaşam süreleri %38'dir.

Evre III hastalar, cerrahi rezektabiliteye göre, IIIA ve IIIB olarak ikiye ayrılırlar. Evre IIIA tümörler, cerrahi olarak çıkarılabilmesine rağmen, evre IIIB tümörlere cerrahi tedavi yapılamaz. Evre IIIA hastalarda tümörün akciğer dışı yayılımı olmasına rağmen, sınırlı bir lenf bezi yayılımı vardır.. Bu hastalar T3N1M0 veya T1-3N2M0 gruplarını kapsar. KHOAK'lerin %10'u bu evrededir. Bu hastalarda tedavi değişkendir. Son yapılan çalışmalarda, evre IIIA hastalarda cerrahi öncesi kemoterapinin, yaşam süresini düzelttiği ve cerrahi sonrası hastalısız süreyi uzattığı gösterilmiştir. Evre IIIA hastalarda 5 yıllık yaşam süresi %23'tür.

Evre IIIB hastalarda, tümörün akciğer dışı yayılımı ile beraber, karşı taraf hiler ve mediastinal lenf bezlerine, aynı veya karşı taraf skalen ve supraklaviküler lenf bezlerine, uzak metastaz olmaksızın yaygın mediastinal lenf bezlerine yayılım ve sitoloji pozitif malign plevral efüzyon mevcuttur. Bu hastalar T1-3N3M0 veya T4N0-3M0 gruplarını kapsar ve KHOAK'nin %20'sini oluşturur. Bu hastalara palyatif tedavi uygulanır. Kesin tedavileri yoktur. Beş yıllık yaşam süresi çok yönlü tedavi ile %5'tir.

Evre IV, herhangi bir metastatik yayılımı olan hastaları kapsar. Bu hastalar herhangi T ve herhangi N'i olan M1 hastalar olarak gruplandırılır. KHOAK'li hastaların %27'si evre IV'dür. Bu hastalara cerrahi tedavi uygulanamaz. Palyatif olarak tedavi edilirler. Beş yıllık yaşam süreleri %1'dir. Bu hastaların ortalama yaşam süreleri 1 yıldan daha azdır (35).

## 2.4. AKCİĞER KANSERİ MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ:

Akciğer kanserlerinin çoğu, sigara içme alışkanlığına bağlanmasına karşın, ağır sigara içicilerin yaklaşık %20'sinde akciğer kanseri oluşur. Konak faktörleri bu değişik kişisel duyarlılıkta önemli rol oynarlar. Ailesel soy ağacının analizi, akciğer kanserinin diğer kanserlerle birlikte belli ailelerde daha çok görüldüğünü göstermiştir. Birçok çalışmada akciğer kanserli hastaların ailelerinde, kontrollere nazaran 2–5 kez daha fazla akciğer kanserine rastlandığı gösterilmiştir (61, 76). Ailelerinde kanser hikayesi olan sigara tiryakilerinde akciğer kanseri riski, sigara içmeyen ve aile hikayesi olmayanlardan 30–47 kat daha fazladır. Akciğer kanserli hastaların hem sigara içen hem de içmeyen akrabalarında akciğer kanseri riski 2.4 kat artmıştır. Artmış ailesel riskin; yaş, cinsiyet, mesleksi maruziyet ve sigara içiciliğinden bağımsız olduğu ve akciğer kanserine predispozisyon yaratan nadir bir otozomal genin Mendelyen kodominant kalıtım ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (14, 76).

Son yıllarda moleküler biyolojiye dayanan uzun süreli sağkalımı belirleyebilecek yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yapılan moleküler biyolojik çalışmalar bu nedenle önem kazanmıştır. Ayrıca bu sayede belirlenecek belirli hasta gruplarında adjuvan tedavi, konvansiyonel sitotoksik kemoterapi veya yeni gelişmekte olan özel hedeflenmiş ajanların kullanımı mümkün olacaktır (11, 25).

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada Akciğer kanseri ile ilişkili birçok tümör süpresör gen ve onkogen tanımlanmıştır. Bu çalışmalar sırasında görülmüştür ki, bazı genlerin, özellikle de karsinogen metabolizması ile ilişkili genlerdeki kalıtsal polimorfizmin çeşitli çevresel maruziyetler ile uyarılması sonucu bireyde akciğer kanseri gelişme olasılığını arttırmaktadır. Bunun dışında, DNA tamiri, hücre büyümesi, sinyal iletimi ve hücre siklus kontrolü ile ilişkili genler de akciğer karsinogenezisinin

değişik aşamalarında hasar görebilir. Akciğer kanserlerinde görülen genomik dengesizlik; pek çok sayısal (anöploidi) ve yapısal sitogenetik anormallikleri (delesyon, amplifikasyon, translokasyonlar) içerir (1, 18).

Akciğer kanserlerinde görülen anöploidik değişimler, özellikle mitotik kontrol noktalarındaki (mitotik checkpoint) fonksiyonel kayıp ile ilişkilidir (1,18). Artan genetik teknikler sayesinde bu preneoplastik hücresel değişimler daha ayrıntılı incelenmektedir.

Akciğer karsinogenezisinde oluşan majör genetik olaylar şöyle sıralanabilir(16, 33, 40):

- I. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu
- II. Tümör süpresör genlerin inaktivasyonu
- III. Hücre siklus regulasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- IV. DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- V. Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler

## **2. 4. 1. Onkogenlerin Aktivasyonu:**

Onkogenlerin normal hücresel işleyişte ve kanser oluşumundaki etkileri daha önceki bölümlerde anlatılmıştır. Tekrar özetlemek gerekirse onkogenler, protoonkogen denen normal hücresel genlerden gelişir. Protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin regulasyonunda önemli rol oynar. Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel disregulasyon ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Genin yapısal bir bölgesindeki değişiklik sonucu farklı fonksiyon gösteren bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ve en sık *ras* onkogen ailesinde görülür. Bir diğer mekanizma da, genin ekspresyonunu regüle eden bölgede oluşan bir değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün

aşırı miktarda üretilmesidir. Kromozomal traslokasyonlarda ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatuar bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu ile de hücre içindeki DNA miktarı artar. *Myc* ailesi buna bir örnek oluşturur (54).

### ***Ras Ailesi***

Ras ailesi, *H-ras*, *K-ras* ve *N-Ras*'tan oluşur. Kanser gelişimde özellikle gendeki nokta mutasyonu ile rol oynar. Ras proteinleri, membranda bulunan Guanozin trifosfataz (GTPase) aktivitesine sahiptir ve hücre membranından nükleusa sinyal transdüksiyonunda ve hücre büyümesinde rol oynar (17, 40, 65).

Ras proteinin normal hücredeki görevi, uyarıcı sinyallerin olduğu durumlarda Guanozin trifosfat (GTP)' a bağlanıp aktif hale geçerek, uyarıcı sinyalleri nükleusa iletmek; bu sınırlı sinyal iletimi sona erdiğinde de GTP molekülünün GTPase enzimi aracılığıyla hidrolize olması sonucu Guanozin difosfat (GDP) proteinine bağlı inaktif formunu oluşturup, istirahat fazına dönmesini sağlamak ve bir sonraki uyarıyı beklemektir. Mutant Ras proteini GTPase aktivitesini inhibe ettiğinden, gen ürünleri kontrolsüz olarak üretilir (18, 33, 43).

*H-ras*, *K-ras* ve *N-ras* genleri 11p15.5'te lokalizedir ve 12, 13, ve 61. kodonlarda kodlanır. En sık *K-ras* mutasyonu görülür ve bu mutasyon sıklıkla 12. kodonda oluşur. *H-ras* mutasyonu daha seyrek olup, *N-ras* mutasyonu ise çok nadirdir (43). *K-ras* aktivasyonu, KHDAK' lerinin %15-50'sinde görülür. Adeno ve büyük hücreli kanserlerde %30-60 oranında, yassı hücreli kanserlerde ise daha az oranda görülür. KHDAK' lerinde ise çok daha nadir görülür. *K-ras* mutasyonu görülenlerde sağkalımda azalma, erken relaps ve kötü prognoz görülür (17, 25, 33, 40, 43).



*K-ras* mutasyonu sigara içimi ile ilişkilidir. Sigara içen akciğer kanserli olgularda hiç içmemiş olanlara göre daha sık görülür (17, 33, 65).

## ***Myc Ailesi***

*Myc* genleri, DNA'ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar. Bu proteinler hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunda etkilidirler ve DNA sentezinin başlamasında rol alırlar. Klonlandıkları kültüre ve elde edilme şartlarına göre bu genler, *C-myc*, *N-myc* ve *L-myc*'ten oluşur (37). KHAK'lerinin %18-31, KHDAK'lerinin ise %8-20 sinde *myc* aktivasyonu izlenir. *c-myc* amplifikasyonu olan hücrelerde büyüme faktörü gereksinimi azalır hücre siklusunda G1 fazı kısalmış ve bunun sonucunda proliferasyon oluşur. *c-myc* tümör büyüme hızında artış ve sağkalımda kısımla ilişkilidir (17, 25, 43).

## ***Hücre İçi Sinyal İleticileri Ve Nükleer Transkripsiyon Faktörleri***

Bu grupta *c-erb B-1*, *c-erb B-2*, *c-fms*, *c-met*, *c-srs*, *c-raf-1*, *c-fos* ve *c-jun* yer alır. Bunlar çeşitli büyüme faktörü ve reseptörlerini kodlarlar ve bazı akciğer kanseri türlerinde ekspresyonları artmıştır.

a) *c-erb B-1*: Epidermal growth faktör (EGF) reseptörünü kodlar. Membran glikoproteini olup, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Özellikle yassı hücreli kanserlerde aşırı ekspresyonu görülür.

b) *c-erb B-2*: Transmembran büyüme faktör reseptörü olarak görev yapan bir proteini kodlar. P185 neu, kodlanan protein olup, hem yassı hücreli hem de adeno kanserlerde aşırı ekspresyonu görülür. P185 aşırı ekspresyonu adeno kanserlerde kötü prognostik bir göstergedir. Kemorezistans ve yüksek metastatik potansiyel ile ilişkilidir (43). Akciğer kanserlerinin %30-64 ünde görülür (65).

c) *c-fms*: Koloni Stimüle Edici Faktör (CSF) 1 için bir protein kodlar. KHAK de ekspresyonu görülür (43).

d) *c-met*: Hepatosit Growth Faktör (HGF) reseptörünü kodlar. KHAK'lerinin çoğunda, KHDAK'lerinin ise yarısında *c-met* ekspresyonu görülür. KHDAK'lerinde özellikle adeno ve yassı hücreli kanserlerde görülür(43).

e) *c-src*: pp60c-src N tirozin kinazları kodlayan protoonkogenlerdir. KHAK' de, adeno kanserlerinin %60' ında ve kötü diferansiye yassı hücreli akciğer kanserlerinin bir kısmında *c-src* tespit edilmiştir (43),

f) *c-raf-1*: Hücre dışındaki reseptörlerden nükleusa sinyal transdüksiyonunu sağlayan serin treonin kinaz aktivitesine sahip bir protoonkogendir. KHAK'lerinin %80' inde delesyonu görülür (43).

g) *c-fos* ve *c-jun*: Erken transkripsiyon faktörleridir. Protein sentezi olmaksızın mutajenik uyarılarla aktive olurlar.

### 2.4.2. Tümör Süpressör Genler (TSG):

#### *p53 Tümör Süpressör Geni*

İnsan kanserlerinde en sık görülen mutant gen olup, 17p13 lokusunda yerleşmiştir. Tüm kanserlerin % 50' sinde görülürken KHAK' lerinin % 90' ında, yassı hücreli kanserlerin % 65'inde, büyük hücreli kanserlerin % 60'ında ve adeno kanserlerin % 33'ünde gösterilmiştir (17, 25, 31, 42, 65, 73).

p53 proteininin hücre fonksiyonlarındaki rolü; gen transkripsiyonu, DNA sentez ve tamiri, genetik stabilitenin korunması, hücre siklusunun arresti, büyümeyi sonlandırma ve programlı hücre ölümüdür (31, 40). DNA hasarı yada hipoksemi p53 üretimini uyarır. *p53* gen fonkiyon kaybı sonucunda hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri yapılmaksızın hücre siklusu kontrolsüz olarak çoğalır. 157, 248 ve 278. kodonlarda meydana gelen mutasyonlar akciğer kanseri açısından önem taşır. Akciğer kanserlerinde bu bölgelerde en sık görülen mutasyon tipi GC→TA transversiyonudur.

*p53* fonksiyon kayıpları genellikle allelik kayıplar ve somatik missense mutasyonlar şeklindedir. Bu mutasyonlar KHAK'lerinin % 90' ında, KHDAK'lerinde % 50' sinden fazlasında görülür. Bu mutasyonlar sonucunda, hem tümör süpressör fonksiyonlarında kayıp hem de onkojenik fonksiyon kazanma şeklinde dual bir etki ortaya çıkabilir (18, 31, 42).

*p53* gen mutasyonları karsinogenezin erken basamaklarında görülür. *K-ras* geninde belli bir noktada mutasyon olurken, *p53* mutasyonları 17. kromozom üzerinde tüm gen boyunca oluşabilir (65, 31). Akciğer kanserlerindeki *p53* mutasyonu sigara içimi ile ilişkilidir.

### ***Retinoblastom Geni (RB)***

*RB* ilk bulunan TSG'dir. 13q14 de lokalizedir. *RB* protein yokluğu KHAK'lerinin hemen hepsinde görülürken, KHDAK' lerinin sadece % 10-30' unda görülür (11, 17, 73). Bu gen hücrel diferansiyasyonda çok önemli bir role sahiptir.

*p16-siklinD1/CDK 4-6-RB* yolu hücre siklusunun G1'den S transisyonunda önemli görevlere sahiptirler. Bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktiviteyle sonlanır (18, 25, 42, 59). Bu yoldaki proteinlerden biri olan *p16*, kromozom 9p21'de lokalize olup, genellikle akciğer kanserinde allelik kayba yada mutasyona uğrar. KHDAK' lerinin % 10-40'ında homozigot delesyonlar ve nokta mutasyonları saptanır.

Bu yolda adı geçen bir diğer proteinde *p19*'dur. *p19*, *p53/MDM2* kompleksi ile bağlanır ve *p53* degradasyonunu önler. Bir diğer CDK inhibitörü de *p27* olup, *p27* ekspresyonunda azalma KHDAK' lerinde kötü prognoz ile ilişkilidir (18).

## ***Kromozom 3p Kaybı***

Kromozom 1p, 1q, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 11p, 11q, 14q, 17q, 18q ve 22q tümör süpressör genlerinin lokalize olduğu bölgelerdir. Bu bölgelerdeki hemizigot delesyonlar ile tümör süpressör genler azalmış olur. Akciğer kanserinde sık görülen kırılma noktaları 1p, 3p, 9p ve 17p'dir.

Frajl histidin triad geni (*FHIT*) 3p14.2 lokalizasyonunda bulunur. Akciğer kanserinde bu bölgenin hemizigot yada bazen homozigot olarak delesyona uğradığı gösterilmiştir. *FHIT* gen anomalileri KHAK'lerinin % 80'inde, KHDAK'lerinin ise %42'sinde gösterilmiştir (22, 64) *FHIT* allel kaybının sigara içimi ve olasılıkla kötü prognozla ilişkili olduğu da gösterilmiştir (18).

3p delesyonunun karsinogenezin erken basamaklarında gerçekleştiği düşünülür, çünkü sigara içen kişilerde gelişen displazik lezyonlarda da görülür. Bu değişiklik KHAK'lerinin %100'ünde, KHDAK'lerinin ise % 50'sinde görülür (25). 3p delesyonunda hücre siklus regülasyonu bozulur. 3p bölgesinde bulunan bir gen, ubiquitin aktive edici enzim ile homologdur. Ubiquitin, aktive edici enzim ile fosforile olduktan sonra, *CCND1* degradasyonu ile hücre siklus regülasyonunda görev alır. Tütüne bağlı gelişen kanserlerde hücre siklus kontrolünün kaybı *CCND1* gen amplifikasyonu ve/veya ubiquitin aktive edici enzim delesyon mekanizmaları ile açıklanabilir (14).

3p21.3 bölgesinde yer alan bir başka TSG ise *RASSF1* olup, KHDAK'lerinin %30'unda ve KHAK'lerinin ise % 90'ından fazlasında promotor bölge hipermetilasyonuna uğrar. Bu hipermetilasyon kötü prognoz ile ilişkilidir (18).

### 2.4.3. Akciğer Kanserinde Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri:

Pek çok büyüme faktörü ve reseptörü akciğerde kanser hücreleri ve normal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler (61). Bu büyüme faktörleri otokrin, parakrin jukstakrin yollarla kanser büyümesinde rol oynarlar (61, 67). Eğer bir tümör hücresi, hem bir büyüme faktörü hem de reseptörünü taşıyorsa kendisini uyararak büyüme halkasına sahip demektir. Buna “ Otokrin Büyüme Halkası” denir. Normal hücrelerde bu düzenleyici sistemler bir denge içerisinde işlemektedir. Kanser hücrelerinde ise bu dengeler bozulmuştur (29).

Epidermal Growth Faktör (EGF) ve Transforming Growth Faktör-a (TGF-a), hücre proliferasyon ve differansiyasyonunu uyararak mitojenik etkileri gösterilmiş olan peptidlerdir. EGF, yüzey reseptörü aracılığı ile etkilerini gösterir (25,33,72). EGF Reseptörü (EGFR), tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteindir. Tirozin kinazlar hem normal hücre büyümesi ile hem de malign transformasyon ile ilişkili proteinlerdir (15,41,51). Pek çok çalışmada aberran EGFR sinyalizasyonu ve EGFR regülasyon bozukluğunun tümör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (15,41,51). KHKDAK' lerinin % 13-80'inde *EGFR* aşırı ekspresyonu saptanmıştır. Özellikle yassı hücreli akciğer kanserlerinde normal dokunun 2-3 katı *EGFR* ekspresyonu söz konusudur (47).

Transforming Growth Faktör- $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1), hücre fonksiyonlarının regülasyonunda rol oynayan bir polipeptit olup, normal epitelyal hücrelerin büyümesini inhibe eder (28, 67). TGF - $\beta$  peptidleri, hücre büyümesi, diferansiyasyonu, adezyon, migrasyon, angiogenez, ekstrasellüler matriks formasyonu ve immün fonksiyonları etkileyen multifonksiyonel polipeptidlerdir (68).

TGF - $\beta$ , in vitro olarak kanser hücre proliferasyonunu baskılar (28, 67). TGF - $\beta$ 1, angiogenezi stimüle eder, immün fonksiyonları baskılar, adezyon molekül ekspresyonunu ve ekstrasellüler matriks komponentini arttırarak metastatik potansiyeli

arttırır (28). *TGF- $\beta$ 1* ekspresyonu olan hastalarda sağkalımın daha kötü olduğu gösterilmiştir (65, 69). Özellikle adeno kanserli olgularda *TGF- $\beta$ 1* ekspresyonunun sağkalımda azalma ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (8).

Hepatosit Growth Faktör (HGF), plazmada bulunur ve trombositlerden sentezlenir. Esas olarak karaciğer rejenerasyonunda rol oynar. HGF, endotel hücreleri ve melanositler için mitojenik etki gösterir ve endotel hücrelerinde tübül oluşumunu uyarır (2). *HGF*, normal akciğerde çok düşük düzeyde eksprese edilir. KHAK ve KHDAK'lerinde *HGF* ekspresyonu artmıştır. Opere edilebilir KHDAK'lerinde yüksek *HGF* düzeyi kötü prognozu gösterir (17, 29).

### 2. 5. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tanımlamışlar ve son haliyle relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflemişlerdir (58). MLPA; 45 taneye kadar spesifik dizinin, bir multiplex PCR'dan sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği yeni bir metottur. Amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130 - 490 bp arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin delesyon / insersiyon taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterli olmakta ve tek nükleotid değişimleri (bağlanma bölgesindeki) görülebilmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir (79). Tekniğe; kolay uygulanabilir, üretken, sensitif olması ve doğru multipleks analiz sonucu verebilmesi için birçok modifikasyon yapılmıştır. Her bir MLPA probu hedef diziyeye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış problemler

5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probon diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerinin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA sı kullanılmıştır. M13 DNA sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziye mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' ucundan kesmektedir. 35-42 prob içeren kitler genellikle problemler arasında 6 yada 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün problemler farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı problemlerin birbirleri ile heterodubleks formasyonunu önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziye spesifik sentetik oligonükleotidler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 baz çifti uzunluğundaki problemler amplifikasyonda başarılı şekilde kullanılmıştır. M13 kaynaklı oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları bize amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri sayesinde avantaj sağlamıştır. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziye yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (58).

Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün problemler için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N-(3-fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (63). Genomik DNA' da olduğu gibi mRNA araştırmalarında da kullanılabilir. (79).

### **2.5.1 Akciğer Kanserinde MLPA Tekniğinin Kullanımı:**

Çalışmamızda Türkiye'de yeni bir yöntem olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ile şimdiye kadar akciğer kanserleri ile ilişkilendirilmiş 64 farklı gende dizayn edilmiş prob bölgelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bugüne kadar yapılmış, literatürde yayınlanmış MLPA tekniği ile ilgili birçok yayın olmasına karşın, akciğer kanserine yönelik bu tekniğin kullanıldığı bir çalışma yayınlanmamıştır. Yaptığımız akciğer kanserine yönelik MLPA tekniğinin kullanıldığı çalışmamız bu bakımdan bir ilk olma özelliğindedir.

Çalışmamızda akciğer kanserine yönelik dizayn edilmiş mevcut kitler kullanıldığı için belli kromozom ve gen bölgeleri incelenebilmiştir. Bu prob bölgelerinin dizaynında üretici firma, bugüne kadar yapılan ve literatürde yayınlanarak akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş bölgeleri dikkate almışlardır. Kullanılan problemlerin lokalizasyonları ve gen isimleri Tablo 2.5.1.1 ve Tablo 2.5.1.2.'de belirtilmiştir. Çalışmamız sırasında sadece bu bölgelerin incelenebilir olması bir dezavantaj olarak kabul edilebilir. Fakat yine de yöntem birçok farklı geni bir arada inceleyebilmesi nedeniyle birçok tekniğe göre avantaj sağlamaktadır.

Akciğer kanserinde birçok genomik değişim tanımlanmıştır. Bunlar büyük kromozom değişimlerinden, spesifik genlerdeki nokta mutasyonlarına kadar değişmektedir. MLPA tekniği bu geniş dağılım içerisinde özellikle, tanımlanmış kromozomal değişimlere yönelik bir kit dizaynı yapmıştır. İleriki süreçte belirli genlerdeki spesifik değişimlere yönelik dizayn edilecek yeni problemler ile daha ayrıntılı bir inceleme şansı doğacaktır.



Tablo 2.5.1.1: MLPA Salsa-P126 akciğer kanseri kiti prob bölgeleri

Uzunluk(bp)	Salsa Prob #	Kromozomal pozisyon
64-70-76-82	DQ-control bands*	
94	Synthetic Control probe	2q14
130	IL4 probe 0797-L0463	05q31.1
136	HMBS probe 1662-L1237	11q23.3
142	CREBBP probe 3088-L3991	16p13.3
148	CDH6 probe 1254-L0815	05q11
154	MEN probe 13404-L2795	11q13
160	PRKCE probe 0822-L0130	02p21
166	ENG probe 3005-L2445	09q34.1
172	CREBBP probe 3087-L2487	16p13.3
178	JAK2 probe 3179-L2518	09p24
184	MASS1 probe 3994-L3261	05q14.3
193	PDGFRB probe 2438-L3596	05q32
202	APC probe 1537-L0980	05q22
211	ATM probe 1632-L1170	11q23
220	RB1 probe 0582-L0147	13q14.3
226	PRSS7 probe 2117-L1603	21q21.1
238	MSH3 probe 2108-L0795	05q14.1
247	DNAJD1 probe 3297-L2661	13q14.1
256	MASS1 probe 3993-L3260	05q14.3
265	ZNF198 probe 0803-L0635	13q11
274	CDKN2A probe 1291-L0835	09p21
283	DECR2 probe 1078-L0648	16p13.3
292	TSC1 probe 1849-L1414	09q34
301	CREBBP probe 3086-L2486	16p13.3
310	IL18 probe 0471-L0054	11q23.1
319	ATM probe 2662-L2129	11q23
328	CREBBP probe 3085-L3993	16p13.3
337	DLEU1 probe 1590-L1162	13q14.3
346	THRSP probe 0621-L0178	11q13.5
355	FANCL probe 2743-L2170	02p16.1
364	NRXN1 probe 3986-L3253	02p16.3
373	FGFR4 probe 2243-L3902	05q35.3
382	BRCA2 probe 1614-L1196	13q12.3
391	APC probe 1701-L1469	05q22
400	DLEU1 probe 0801-L0639	13q14.3
409	RB1 probe 1796-L1359	13q14.2
418	LOX probe 3995-L3262	05q23.2
427	TRAF2 probe 1141-L0698	09q34
436	TEKT3 probe 2728-L2155	17p12
445	KIAA1030 probe 1143-L0700	11q25
454	BDNF probe 3090-L3996	11p14
463	DLEU7 probe 3042-L2417	13q14.3
472	NRXN1 probe 3987-L3254	02p16.3

Tablo 2.5.1.2: MLPA Salsa-P127 akciğer kanseri kiti prob bölgeleri

Uzunluk (bp)	Salsa Probe #	Kromozomal pozisyon
64-70-76-82	DQ-control bands*	
94	Synthetic Control probe.	2q14
130	CTSB probe 1212-L0766	08p22
136	CREM probe 0981-L0566	10p12.1
142	ERBB2 probe 0675-L0146	17q21.1
148	CDKN2A probe 1523-L0957	09p21
157	BRCA1 probe 2808-L2168	17q21
166	TP53 probe 2374-L1496	17p13.1
172	TGFBR 2 probe 2797-L2182	03p22
178	MSR1 probe 2534-L3442	08p22
184	DLC1 probe 2754-L2203	08p22
193	TP53 probe 1996-L1536	17p13.1
202	CDKN2A probe 0602-L0166	09p21
211	CTNNB1 probe 3985-L3252	03p22
220	FANCD2 probe 2133-L1626	03p25.3
226	HEI10 probe 1732-L1318	14q11.1
238	TINF2 probe 0974-L0561	14q12
247	RUNX1 probe 2836-L2267	21q22.3
256	TP53 probe 2377-L1499	17p13.1
265	FHIT probe 2288-L2213	03p14.2
274	BRCA1 probe 0437-L0002	17q21
283	NKX3A probe 2542-L2014	08p21
292	SOD1 probe 2116-L1604	21q22.11
301	TP53 probe 1991-L1501	17p13.1
310	LRMP probe 0495-L0070	12p12.3
319	BCLG probe 3194-L2547	12p13.2
328	RASSF1 probe 2248-L1734	03p21.3
337	PPM1D probe 3195-L2652	17q23.3
346	APP probe 0987-L0330	21q21.3
355	CCND2 probe 0498-L0084	12p13
364	MSRA probe 1202-L0787	08p23.1
373	FGFR1 probe 1046-L0624	08p11.2
382	CUGBP2 probe 1522-L0952	10p14
391	NFKBIA probe 0478-L0061	14q13
400	RASSF1 probe 3991-L3258	03p21.3
409	ERBB2 probe 0446-L0390	17q21.1
409	ROBO1 probe 4603-L3256	03p12.2
418	LASP1 probe 1058-L0631	17q12
427	TIAM1 probe 0817-L0335	21q22.11
436	KIAA0909 probe 1241-L0783	17p13
445	ROBO1 probe 3988-L3255	03p12.2
454	TEAD4 probe 4227-L3563	12p13.3
463	RENT2 probe 0979-L0568	10p14
472	CTNNB1 probe 3984-L3251	03p22

## 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3. 1. GEREÇLER:

#### 3. 1. 1. Kullanılan Gereçler:

Spektrofotometre (Eppendorf)

Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI Prizm 310)

Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Spektrofotometre Küvetleri (Eppendorf)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Elektroforez aleti (Consort E844)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Su banyosu (Nüve)

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Vorteks (Heidolph)

Deep-freeze (Meraeus)

Buzdolabı (Arçelik)

Santrifüj tüpleri

Eppendorf Tüpü (1,5 ml lik)

PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)

ABI 310 yükleme tüpleri (ABI)

ABI 310 47 cm Kapiller (ABI)

## 3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:

DNA Ekstraksiyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)  
Salsa MLPA Lung Probe Mix 1-2 ( Salsa P126/127- MRC Holland)  
Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)  
10X EDTA lı Buffer (ABI)  
Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)  
Hi-Di Formamide (ABI)  
Mineral Yağ (Roche)  
Ksilol ( Merk-1.08685.2500)  
Doku Parçalayıcı Tampon (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer) (Roche-Lot:  
13562000)  
Etanol (95%) (Tekel)  
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)  
Agoroz ( Sigma-Lot: 072K0059)  
Etidyum Bromid (Sigma)  
Proteinaz K (QIAGEN)  
Distile Su

## 3. 2. YÖNTEMLER:

### 3. 2. 1. Materyal Seçimi:

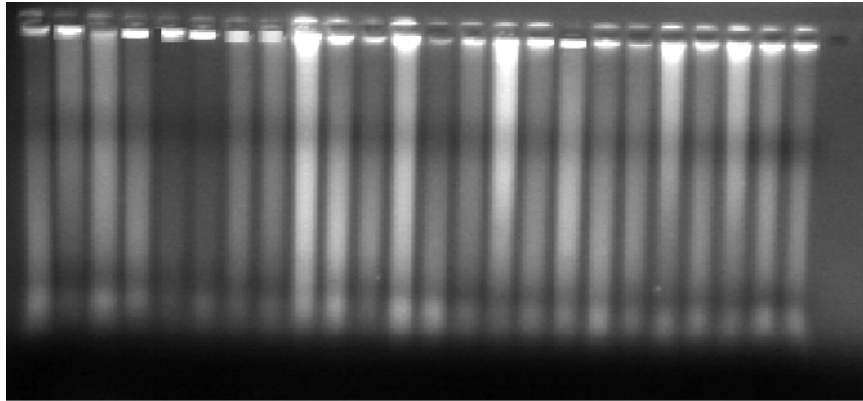
İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olgu çalışmaya alınmıştır. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış ve Hematoksilen- Eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre gradelendirilmiş ve TNM sınıflamasına göre evrelendirilmiştir. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, biyopsi şekli, takip aralıkları, rekürrens ve/veya progresyon durumları hastalara ait patoloji raporları, hasta dosyalarından temin edilmiştir.

### 3. 2. 2. Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu İle Parafine Gömülü Dokudan DNA Elde Etme Protokolü

1. Parafinli dokudan 10 µm ‘lik kesitler alınır ve ependorf tüpü içerisine konulur.
2. İçinde kesit bulunan ependorf tüpüne 1200 µl ksilol eklenir. 15 saniye vorteks yapılır. Örnekler 70<sup>0</sup> C’ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilir. Hızlı devirde (14000 rpm) 3 dakika santrifüj edilir. Süpernatantı atılıp aynı işlem iki defa daha tekrarlanır.
3. Pelet üzerine süzölmüş %100’lük etanoldan 1200 µl konularak 70<sup>0</sup> C’ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilir. Daha sonra hafifçe vorteks yapılır.
4. 3 dakika tam devirde santrifüj yapılarak süpernatantı atılır.

5. Alınabildiği kadar alkol uzaklaştırılıp etüvde 20 dakika kurutulur.
6. 180 µl buffer ATL + 20 µl Proteinaz K konularak vorteks yapılır, 56<sup>0</sup> C 'de çalkalamalı su banyosunda bir gece bekletilir.
7. İnkübasyon sonunda örnekler vortekslenerek 8000 rpm' ye ayarlanmış santrifüjde 2 dakika santrifüj edilir.
8. Süpernatantlar alınarak ayrı bir tüpe aktarılır.
9. İlk tüpteki peletin üzerine tekrar 180 µl buffer ATL + 20 µl Proteinaz K konularak vorteks yapılır, 56<sup>0</sup> C 'de çalkalamalı su banyosunda bir saat bekletilir.
10. Su banyosundan alınan örnekler örnekler vortekslenerek 8000 rpm' ye ayarlanmış santrifüjde 2 dakika santrifüj edilir.
11. Süpernatantlar daha önce aktarılan süpernatantlarla birleştirilir.
12. Elde edilen örnekler Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu'na uygun ekstraksiyon protokolü ayarlanarak yüklenir.

Elde edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Elde edilen DNA'lara ait örnek jel görüntüsü Şekil 3.2.2.1'de verilmiştir.



Şekil 3.2.2.1: Örnek DNA' lara ait %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

### **3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi:**

#### **3.2.3.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P126 ve 127 Probe Miks İle Hibridizasyonu:**

- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan 5 µl (20-250 ng DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 °C de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında örnekler 25 °C'ye soğutuldu.
- 25 °C'deki DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (P126/ P127) ve 1.5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Sonraki aşamada buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklendi.
- Daha sonra 95 °C de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60 °C de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.

#### **3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu:**

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54 °C ye indirildi.
- Örnekler 54 °C ye geldikten sonra strip tüplerden mineral yağ dikkatli şekilde pipet ile alındı.
- Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks ilave edildi.
- 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

# PDF Eraser Free

## 3.2.3.3. PCR:

- Ligasyon reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra ligasyon ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:
  - 4 µl 10XSALSA PCR Buffer
  - 26 µl distile su
  - 10 µl Polimeraz miks,konularak PCR başlatıldı.

-PCR şartları:

Denatürasyon	30 sn	95 °C	}	38 döngü
Annealing	30 sn	60 °C		
Ekstansiyon	60 sn	72 °C		
Final Ekstansiyon	20 dk	72 °C		



### 3.2.3.4. ABI 310 Cihazına Yükleme:

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 3 µl alınarak ABI 310 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.

- Daha sonra üzerlerine:

- 0.5 µl internal size standart (Rox 500)

- 12 µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edildi.

- Örnekler 94 °C de 4 dk Thermal Cyler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.

- Devamında örnekler buz üzerine alındı.

- ABI 310 cihazında; 15 kV de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV de 25 dakika yürütme zamanı, filitre C şartları sağlandı.

- Daha sonrasında ABI cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.

- Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edildi.

### 3.2.4.5. Değerlendirme:

Okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları excel dosyası formatında kaydedildi.

Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları Diagenanalyser programına aktarıldı. Normal örnekler eksternal kontroller olarak kaydedildi. Diagenanalyser programı tarafından test örneğinin bütün pik alanları, her bir pik alanının (internal kontrol pikleri) o çizgideki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesiyle birbirlerine göre oranları tayin edildi. Bu oranlar, pik alanları normal karyotipe sahip olduğu bilinen ve test örneklerle aynı testte çalışılmış 3 örneğin kanlarından elde edilen pik alanlarının (eksternal kontrol pikleri) ortalama sonuçları ile kıyaslandı ve doz tayinine gidildi.

Kontrol olarak kromozomal açıdan normal olduğu bilinen vakaların pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı. Her testte 3 eksternal kontrol test örnekleri ile birlikte çalışıldı. Relatif kantitatif PCR yöntemi olan MLPA ile değerlendirme yapılırken Diagenanalyser programı otomatik olarak internal kontrol ve ekstrenal kontrol pik değerleri ile aşağıdaki formülü kullanarak her bir prob spesifik bölge için doz tayini yapmaktadır:

$$\text{Doz Oranı} = \frac{\text{Hasta T. P. A. D.}}{\text{Hasta P. A. T. D. (İ.P.A.)}} = \frac{\frac{1. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{1. \text{ Kontrol P. A. T. D.}} + \frac{2. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{2. \text{ Kontrol P. A. T. D.}} + \frac{3. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{3. \text{ Kontrol P. A. T. D. (E.P.A.)}}}{3}$$

T. P. A.D.: Test Piki Alan Değeri  
P. A. T.D.: Pik Alanları Toplam Değeri  
İ. P. A.: İnternal Pik Alanları  
E. P. A.: Eksternal Pik Alanları

-Yöntem gereği olarak, program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0.7 ve 1.3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, 0.5 ile 0.7 değerleri arası gri alan, 0.5'den küçük değerlerde delesyon yani doz eksikliği olduğu, 1.3 ile 1.8 arası değerler gri alan, 1.8'den büyük değerler ise amplifikasyon yani doz fazlası olduğu belirlenmektedir.

Gri alan olarak belirlenmiş değer aralıklarındaki bölgeler, Diagenanalyser programında yer alan doğrulama bölümünde gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı yönünde tekrar incelenmişlerdir. Burada elde edilen pik değerlerinin gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı, bu pik değerinin elde edildiği hastanın sentetik prob büyüklüğü ile kantrollerin sentetik prob büyüklükleri karşılaştırılarak doğrulanmaktadır. Gri alan formülü şu şekilde tanımlanabilir:

Hasta Spesifik Prob Alanı

-----

Hasta Mutasyonlu Prob Alanı

Gri Alan Formülü: -----

Kontrollerin Ortalama Spesifik Prob Alanı

-----

Kontrollerin Ortalama Hasta Mutasyonlu Alana  
Karşılık Gelen Bölge Alanı

Gri alan formülü uygulanmış bölgenin sonuçları, doz oranı 0.7 ve 1.3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu,  $\leq 0.7$  değerlerinde bölgede kesin delesyon yani doz eksikliği olduğu,  $\geq 1,3$  değerlerinde ise kesin amplifikasyon 1,3 ile yani doz fazlası olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

## **4. BULGULAR**

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olgu çalışmaya alındı. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış (FFPT) ve Hematoksilen- Eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre ve TNM sınıflamasına göre evrelendirildi. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Olguların yaşları, cinsiyetleri, biyopsi şekli, takip aralıkları, rekürrens ve/veya progresyon durumları hastalara ait patoloji raporları, hasta dosyalarından temin edildi.

### **4. 1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri:**

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 32’si kadın, 68’i erkek olup, yaş ortalaması  $58,98 \pm$  olarak saptandı.(Tablo 4.1.1) Hastaların %90’ında sigara kullanımı öyküsü mevcuttu. Hastalar ayrıca ailelerindeki kanser öyküsü açısından da değerlendirildi.(Tablo 4.1.2)

Tablo 4.1.1.: Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları

Yaş	n	%
<39	4	4
40-49	18	18
50-59-	28	28
60-69	22	22
70+	28	28
Toplam	100	100

Tablo 4.1.2 : Hastaların ailelerinde kanser öyküsü varlığı dağılımı

Ailede Kanser Öyküsü	n	%
var	26	26
yok	74	74
Toplam	100	100

Çalışmamızda yer alan küçük hücre dışı akciğer kanseri tanısı almış vakalar histopatolojik olarak, 46'sı squamöz hücreli, 54'ü de adenokarsinom şeklinde değerlendirilmiştir(Tablo 4.1.3). Bu vakaların grade ve TNM sınıflarına göre dağılımları Tablo 4.1.4, Tablo 4.1.5'de belirtilmiştir. Bu dağılımlara göre vakaların %86'sı Grade III, TNM sınıflaması kriterlerine göre sınıflandırıldığında ise %32 oranında T3N1M0 sınıfı ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Tablo 4.1.3: Vakaların histopatolojik tanılarına göre dağılımları

<b>Histopatolojik Tanı</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Squamöz	46	46
Adenokarsinom	54	54
Toplam	100	100

Tablo 4.1.4: Vakaların Grade'lerine göre dağılımları

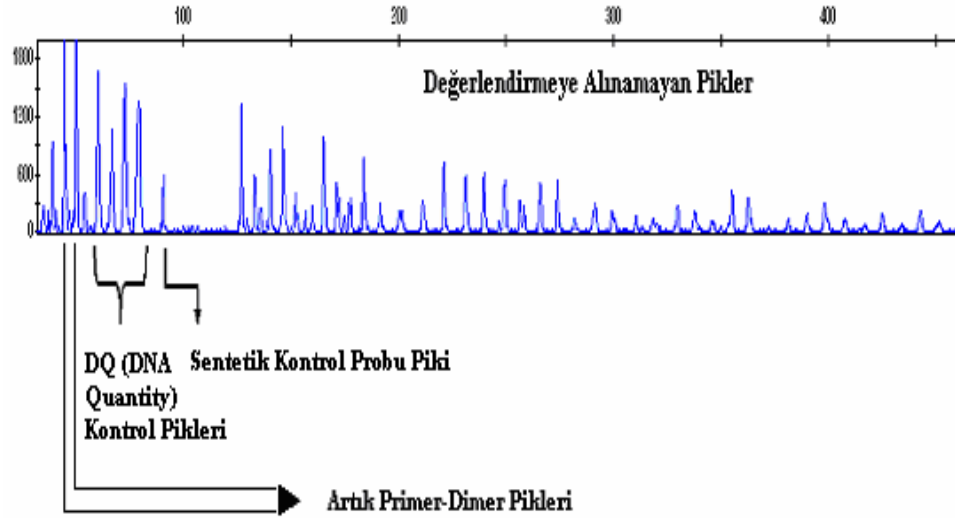
<b>Evre</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Grade I	2	2
Grade II	12	12
Grade III	86	86
Toplam	100	100

Tablo 4.1.5: Vakaların TNM sınıflamasına göre dağılımları

<b>TNM Sınıflaması</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
T3N1M0	32	32
T2N1M0	26	26
T2N0M0	10	10
T3N0M0	10	10
T4N1M0	6	6
T2N2M0	4	4
T4N0M0	4	4
T3N2M0	2	2
T2N0M1	2	2
T3N2M1	2	2
T4N2M0	2	2
Toplam	100	100

## 4.2. Araştırma Grubu Bireyleri MLPA Bulguları:

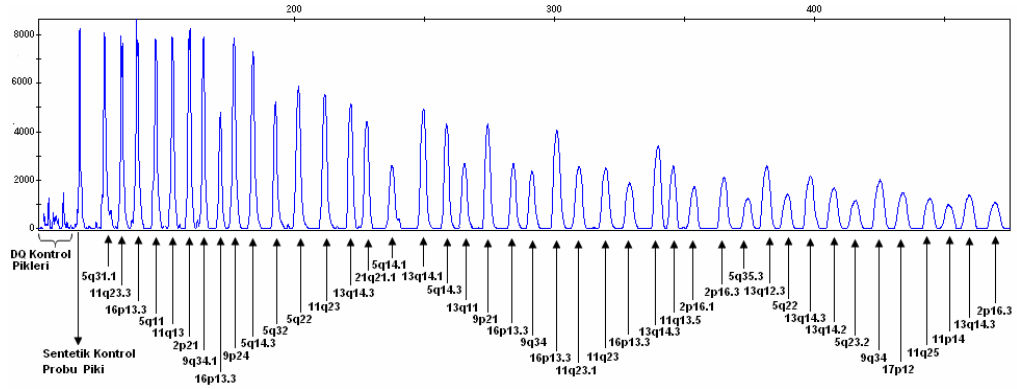
Çalışma grubuna alınan hastaların parafin dokulara gömülü doku örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde P126 ve P127 Akciğer kanseri kiti kullanılarak MLPA yöntemi çalışılmıştır. Çalışmada ABI 310 cihazına yüklenen örnekler, Genemapper V.3.7 programı kullanılarak incelenmiştir. Bu programda elde edilen piklerin büyüklükleri kontrol hastaları ile karşılaştırılmak üzere Excel tabanlı Diagenanalyser programına aktarılmıştır. Genemapper programında elde edilen piklerin boyutu öncelikli olarak DNA miktarıyla orantılıdır. Kaliteli ve yeterli miktarda (50- 500 ng) DNA elde edilemeyen örneklerde pikler düşük ve non-spesifik olabilmektedir. Çalışmaya alınan 100 tümöral doku ve 100 sağlam çevre doku örneklerinde, ilk değerlendirmelerinde, örneklerin %84'ünde yeterli DNA miktarına bağlı olarak kaliteli pikler elde edildi, kalan örneklerden ise değerlendirilebilecek düzeyde pikler elde edilemedi. Bu örneklerden tekrar DNA elde edilerek yapılan ikinci çalışmada, istenen pikler elde edildi. MLPA yönteminde kullanılan DNA miktarının düzeyini, prob piklerinin başlangıcında yer alan DQ ( DNA Quantity) fragmentlerine göre yapıldı. Bu pikler 64, 70, 76, 82 bp uzunluğunda, ligasyon olmasa bile görülen piklerdir. Elde edilen prob piklerine göre bu kontrol piklerini karşılaştırarak DNA miktarı belirlenebilmektedir. Buna göre bu kontrol pikleri elde edilen prob piklerine göre büyükse DNA miktarının yeterli olmadığını göstermekte, eğer bu kontrol pikleri prob piklerinden küçük veya görünmüyor ise DNA miktarının yeterli olduğunu göstermektedir. Çalıştığımız hastaların % 16'sında bu kontrol pikleri, prob piklerine göre oldukça büyüktü. (Şekil 4.2.1) Bu hastalarda kaliteli pik elde edilememesinin nedeni de yeterli DNA elde edilememesinden ötürü olduğunun sonucuna varıldı.



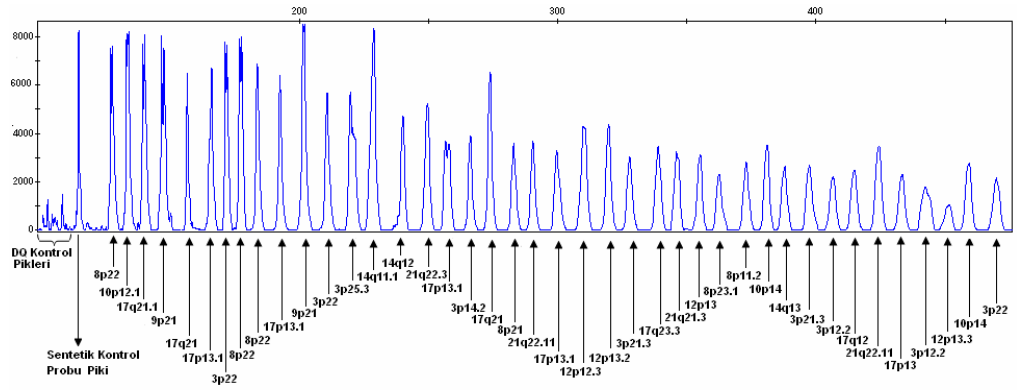
Şekil 4.2.1 : Değerlendirmeye alınamayan MLPA pik görüntüleri

Her çalışmada sağlıklı olduğu bilinen sigara içmeyen, ailesinde kanser öyküsü olmayan, bilinen bir kanserojen maruziyeti bulunmayan 4 bireyin periferik kanından elde edilen DNA örnekleri internal kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. Bu kontrol sayısı MLPA yönteminin önerdiği sayıdır. Çalışmada kullandığımız kontrollere ait pik görüntüleri ve piklerin karşılığı olan prob bölgeleri Şekil 4.2.2 ve Şekil 4.2.3’de gösterilmiştir.



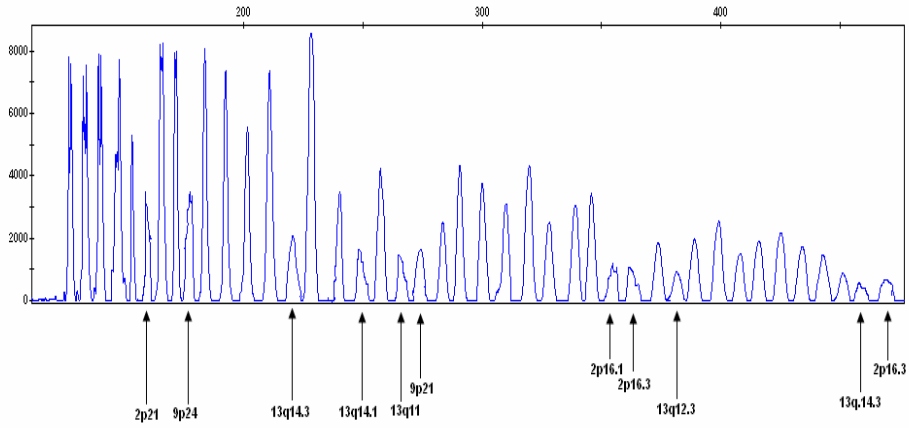


Şekil 4.2.2: Kontrollere ait MLPA Salsa P126 pik görüntüleri ve prob bölgeleri



Şekil 4.2.3: Kontrollere ait MLPA Salsa P127 pik görüntüleri ve prob bölgeleri

Elde edilen bu piklerin bp uzunlukları Genemapper programında görülebilir. Bu pik alanları daha sonra Excel programına aktarılarak, varsa non-spesifik pikler silinerek kaydedilir. Daha sonra Excel formatına alınan pik alanları, yine Excel tabanlı çalışan Diagenanalyser programında değerlendirmeye alınır. Bu programda kontrol pikleri ile hasta pikleri karşılaştırılarak bir ortalama değer elde edilir. Bu değer 0.7'nin altında ise delesyon yönünde, 1.3'ün üstünde ise amplifikasyon yönünde değerlendirilir.



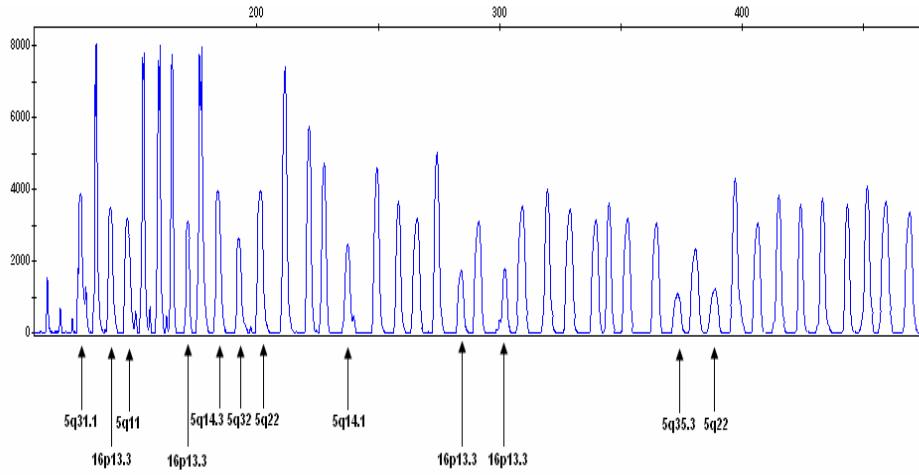
Şekil 4.2.4: 2p, 3p ve 13q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri

Çalışılan hasta gruplarından 2p, 9p ve 13q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların pik görüntüleri Şekil.4.2.4'de verilmiştir. Bu görüntülerde prob bölgelerinin karşılık geldiği pikler belirtilmiştir. Bu piklere göre delesyonlu bölgelerdeki düşmeler rahatlıkla görülebilmektedir. Yine hastalardan elde edilen piklerin area'ları kontrollerin area'ları ile karşılaştırılmak üzere Diagenanalyser programına aktarılmış ve değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler Tablo 4.2.1'de verilmiştir.

Tablo 4.2.1: 2p, 9p ve 13q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	ORTALAMA	HASTA	SONUC
92	Synthetic control probe	2q14	2,355287	2,673684	1,135184
130	IL4 probe 0797-L0463	5q31.1	3,267637	2,592828	0,793487
136	HMBS probe 1662-L1237	11q23.3	3,694688	2,58981	0,900955
142	CREBBP probe 3088-L3991	16p13.3	2,46977	2,722603	1,102371
148	CDH6 probe 1254-L0815	5q11	3,716354	2,631532	0,908095
154	MEN Probe 13404-L2795	11q13	1,743273	1,950657	1,118963
160	PRKCE probe 0822-L0130	2p21	2,818708	2,791187	0,457899
166	ENG Probe 3005-L2445	9q34.1	3,7322	2,856788	0,965443
172	CREBBP probe 3087-L2487	16p13.3	2,992826	2,364787	0,890152
178	JAK2 probe 3179-L2518	9p24	2,483251	2,617835	0,454196
184	MASS1 probe 3994-L3261	5q14.3	3,028064	4,540567	1,099495
193	PDGFRB probe 2438-L3596	5q32	3,656615	4,160664	1,137846
202	APC probe 1537-L0980	5q22	3,305494	3,938227	1,191418
211	ATM Probe 1632-L1170	11q23	3,388199	3,798437	1,121079
220	RB1 probe 0582-L0147	13q14.3	3,574199	4,709078	0,31752
226	PRSS7 probe 2117-L1603	21q21.1	4,492838	6,034677	1,043177
238	MSH3 probe 2108-L0795	5q14.1	1,827952	1,831562	1,001975
247	DNAJD1 probe 3297-L2661	13q14.1	4,17368	4,520403	0,483074
256	MASS1 probe 3993-L3260	5q14.3	3,36006	2,765087	0,822928
265	ZNF198 probe 0803-L0635	13q11	2,241109	2,243967	0,501276
274	CDKN2A probe 1291-L0835	9p21	4,344249	4,836829	0,513387
283	DECR2 probe 1078-L0648	16p13.3	2,231923	1,465455	0,956589
292	TSC1 probe 1849-L1414	9q34	2,303406	2,519003	1,0936
301	CREBBP probe 3086-L2486	16p13.3	1,737	2,316598	1,233678
310	IL18 probe 0471-L0054	11q23.1	1,995098	2,048261	1,026647
319	ATM Probe 2662-L2129	11q23	2,366771	2,356529	0,995673
328	CREBBP probe 3085-L3993	16p13.3	1,681649	1,624547	0,966044
337	DLEU1 probe 1590-L1162	13q14.3	2,015173	1,964719	0,974963
346	THRSP probe 0621-L0178	11q13.5	1,925315	1,823603	0,947171
355	FANCL probe 2743-L2170	2p16.1	1,118466	1,166839	0,432498
364	NRXN1 probe 3986-L3253	2p16.3	1,389331	1,193172	0,55881
373	FGFR4 probe 2243-L3902	5q35.3	1,127411	0,879996	0,880546
382	BRCA2 probe 1614-L1196	13q12.3	2,012189	1,866949	0,42782
391	APC probe 1701-L1469	5q22	1,083424	1,340159	1,23696
400	DLEU1 probe 0801-L0639	13q14.3	1,794539	1,46718	0,817581
409	RB1 probe 1796-L1359	13q14.2	1,045959	0,700906	0,970109
418	LOX probe 3995-L3262	5q23.2	1,20119	1,222656	1,01787
427	TRAF2 probe 1141-L0698	9q34	1,804182	1,102665	0,911172
436	TEKT3 probe 2728-L2155	17p12	1,22393	0,839104	0,885581
445	KIAA1030 probe 1143-L0700	11q25	0,721936	0,698452	0,96747
454	BDNF probe 3090-L3996	11p14	0,292644	0,567185	1,038139
463	DLEU7 probe 3042-L2417	13q14.3	1,157747	0,9121	0,487823
472	NRXN1 probe 3987-L3254	2p16.3	1,104264	0,75271	0,381639

Diagenalyzer programından elde edilen bu Tablo 4.2.1’de, örnek bir hastaya ait pik alanlarının değerlendirme sonuçları yer almaktadır. Bu tabloya göre son sütunda yer alan değerler, hasta ile kontrollerin karşılaştırılması sonucu elde edilen oranları göstermektedir. Bu oranlar değerlendirilirken 0.5’in altı kesin delesyon ( sarı bölgeler) ve 1.8’in üstünde yer alan değerlerde kesin amplifikasyon yönünde değerlendirilir. Yine Diagenalyzer programında yer alan bir özelliğe göre de 0.5- 0.7, 1.3- 1.8 arasındaki değerler gri zon olarak tanımlanmakta ve doğrulama işlemiyle yeniden incelenmektedir. Bu tabloda 2p, 9p ve 13q kromozomal bölgelerine karşılık gelen problardaki delesyonlar gösterilmiştir. Tabloda gösterilen bu hastada herhangi bir amplifikasyon görülmemiştir. Mavi renk ile gösterilen bölgeler normal olarak değerlendirilmiş bölgelerdir.



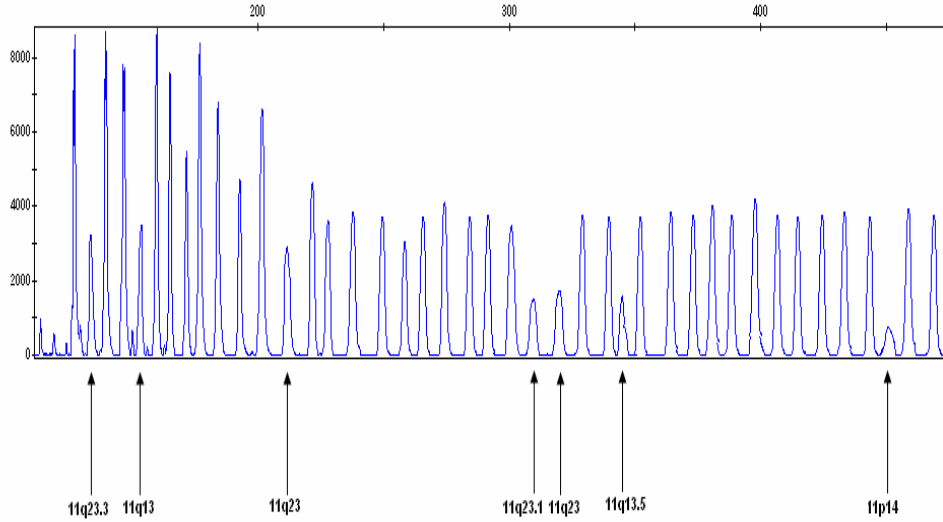
Şekil 4.2.5: 5q ve 16p kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri

Hasta gruplarından 5q ve 16p kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların pik görüntüleri Şekil 4.2.5’de verilmiştir. Şekilde 5q ve 16p bölgelerine ait prob bölgelerine karşılık gelen pikler belirtilmiştir. Delesyonlu piklerin diğer piklere göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu hastadan elde edilen piklerin area’ları kontrollerin area’ları ile karşılaştırılmak üzere Diagenalyzer programına aktarılmış ve değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler Tablo 4.2.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2.2: 5q ve 16p kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	ORTALAMA	HASTA	SONUC
92	Synthetic control probe	2q14	2,355287	2,197314	0,932928
130	IL4 probe 0797-L0463	5q31.1	3,267637	3,51179	0,574718
136	HMBS probe 1662-L1237	11q23.3	3,694688	2,548731	0,989837
142	CREBBP probe 3088-L3991	16p13.3	2,46977	2,372835	0,460751
148	CDH6 probe 1254-L0815	5q11	3,716354	2,454874	0,46056
154	MEN Probe 13404-L2795	11q13	1,743273	1,874048	1,075017
160	PRKCE probe 0822-L0130	2p21	2,818708	2,772936	0,983762
166	ENG Probe 3005-L2445	9q34.1	3,7322	4,629429	1,240402
172	CREBBP probe 3087-L2487	16p13.3	2,992826	3,418654	0,442283
178	JAK2 probe 3179-L2518	9p24	2,483251	2,590707	1,043272
184	MASS1 probe 3994-L3261	5q14.3	3,028064	3,761011	0,542051
193	PDGFRB probe 2438-L3596	5q32	3,656615	3,711104	0,514902
202	APC probe 1537-L0980	5q22	3,305494	2,813689	0,451216
211	ATM Probe 1632-L1170	11q23	3,388199	3,362571	0,992436
220	RB1 probe 0582-L0147	13q14.3	3,574199	3,241252	0,906847
226	PRSS7 probe 2117-L1603	21q21.1	4,492838	5,873214	1,007239
238	MSH3 probe 2108-L0795	5q14.1	1,827952	1,938845	0,406665
247	DNAJD1 probe 3297-L2661	13q14.1	4,17368	4,521214	1,083268
256	MASS1 probe 3993-L3260	5q14.3	3,36006	2,906763	0,865093
265	ZNF198 probe 0803-L0635	13q11	2,241109	2,005618	0,894922
274	CDKN2A probe 1291-L0835	9p21	4,344249	4,205063	0,967961
283	DECR2 probe 1078-L0648	16p13.3	2,231923	1,31968	0,491275
292	TSC1 probe 1849-L1414	9q34	2,303406	2,291109	0,994661
301	CREBBP probe 3086-L2486	16p13.3	1,737	2,263303	0,302995
310	IL18 probe 0471-L0054	11q23.1	1,995098	0,757036	0,879448
319	ATM Probe 2662-L2129	11q23	2,366771	2,412052	1,019132
328	CREBBP probe 3085-L3993	16p13.3	1,681649	1,49868	0,891197
337	DLEU1 probe 1590-L1162	13q14.3	2,015173	1,882857	0,93434
346	THRSP probe 0621-L0178	11q13.5	1,925315	2,17305	1,128672
355	FANCL probe 2743-L2170	2p16.1	1,118466	1,62746	1,155083
364	NRXN1 probe 3986-L3253	2p16.3	1,389331	1,27993	0,921256
373	FGFR4 probe 2243-L3902	5q35.3	1,127411	1,29689	0,450325
382	BRCA2 probe 1614-L1196	13q12.3	2,012189	2,471739	1,228383
391	APC probe 1701-L1469	5q22	1,083424	1,525671	0,408194
400	DLEU1 probe 0801-L0639	13q14.3	1,794539	1,556142	0,86714
409	RB1 probe 1796-L1359	13q14.2	1,045959	0,955441	0,913459
418	LOX probe 3995-L3262	5q23.2	1,20119	1,356859	1,129596
427	TRAF2 probe 1141-L0698	9q34	1,804182	1,468209	0,813781
436	TEKT3 probe 2728-L2155	17p12	1,22393	1,495953	1,222253
445	KIAA1030 probe 1143-L0700	11q25	0,721936	0,93961	1,201514
454	BDNF probe 3090-L3996	11p14	0,292644	0,684025	1,137395
463	DLEU7 probe 3042-L2417	13q14.3	1,157747	1,120209	0,967577
472	NRXN1 probe 3987-L3254	2p16.3	1,104264	0,912431	0,82628

Şekil 4.2.5’de pik görüntüleri verilen bu hastadaki düşük pikler, Diagenalyzer programı ile de incelenmiş ve sarı renk ile gösterilen bölgelerdeki delesyonlar gösterilmiştir. Kullandığımız prob mixlerde belli bölgeler için birden fazla prob dizayn edilmiş ve saptanan bu delesyonların benzer bölgelerde de görülmesi sonucun güvenilirliğini arttırmıştır. Gri zon ile uyumlu değerlerde doğrulama formülü kullanılarak saptanan delesyonun gerçek bir delesyon olup olmadığı kontrol edilmiştir. Şekillerde ve tablolarda verilen değerler seçilmiş bazı hastalara aittir. Çalışmada bu kriterler kullanılarak her hasta benzer şekilde değerlendirildi.

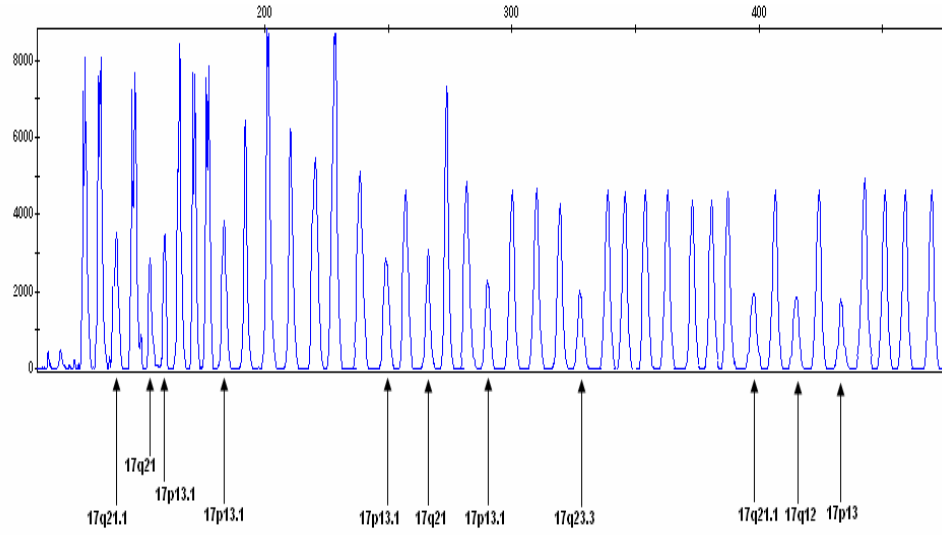


Şekil 4. 2. 6: 11p ve 11q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri

Şekil 4.2.6’da verilen pik görüntülerinde 11. kromozomun p ve q bölgelerindeki delesyonlar gösterilmiştir. 11 kromozomun özellikle q kolundaki delesyonlar akciğer kanserleriyle yakından ilişkilidir. Aynı hastada p kolundada delesyon görülmesi monozomi 11’i düşündürmüştür. Hastaya ait Diagenalyzer değerlendirme sonuçları Tablo 4.2.3’de verilmiştir.

Tablo 4.2.3: 11p ve 11q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	ORTALAMA	HASTA	SONUC
92	Synthetic control probe	2q14	2,35528701	2,715995	1,153148
130	IL4 probe 0797-L0463	5q31.1	3,26763727	3,907661	1,195867
136	HMBS probe 1662-L1237	11q23.3	3,69468762	2,83513	0,567353
142	CREBBP probe 3088-L3991	16p13.3	2,4697699	2,559679	1,036404
148	CDH6 probe 1254-L0815	5q11	3,71635442	2,97514	0,800553
154	MEN Probe 13404-L2795	11q13	1,74327254	1,421571	0,515461
160	PRKCE probe 0822-L0130	2p21	2,81870752	2,952438	1,047444
166	ENG Probe 3005-L2445	9q34.1	3,73219988	5,02289	1,145826
172	CREBBP probe 3087-L2487	16p13.3	2,99282612	3,877719	1,195671
178	JAK2 probe 3179-L2518	9p24	2,48325129	2,923937	1,177463
184	MASS1 probe 3994-L3261	5q14.3	3,02806393	3,58691	1,184556
193	PDGFRB probe 2438-L3596	5q32	3,65661479	3,591198	0,98211
202	APC probe 1537-L0980	5q22	3,30549446	2,961716	0,895998
211	ATM Probe 1632-L1170	11q23	3,38819863	3,588351	0,459073
220	RB1 probe 0582-L0147	13q14.3	3,57419874	2,1594	0,904163
226	PRSS7 probe 2117-L1603	21q21.1	4,49283811	5,486111	1,121079
238	MSH3 probe 2108-L0795	5q14.1	1,82795191	1,424734	0,979416
247	DNAJD1 probe 3297-L2661	13q14.1	4,17367987	4,382233	1,049969
256	MASS1 probe 3993-L3260	5q14.3	3,36005977	2,770291	0,924477
265	ZNF198 probe 0803-L0635	13q11	2,2411086	2,814642	1,155915
274	CDKN2A probe 1291-L0835	9p21	4,34424946	4,083025	0,939869
283	DECR2 probe 1078-L0648	16p13.3	2,23192311	1,845748	0,826977
292	TSC1 probe 1849-L1414	9q34	2,30340576	2,538699	1,10215
301	CREBBP probe 3086-L2486	16p13.3	1,73700032	1,933676	1,113227
310	IL18 probe 0471-L0054	11q23.1	1,99509801	0,634437	0,317998
319	ATM Probe 2662-L2129	11q23	2,36677065	2,757218	0,364971
328	CREBBP probe 3085-L3993	16p13.3	1,68164896	1,262338	0,950655
337	DLEU1 probe 1590-L1162	13q14.3	2,01517334	2,05383	1,019183
346	THRSP probe 0621-L0178	11q13.5	1,92531549	2,036715	0,457861
355	FANCL probe 2743-L2170	2p16.1	1,11846568	1,283986	1,147989
364	NRXN1 probe 3986-L3253	2p16.3	1,38933109	1,245856	0,896731
373	FGFR4 probe 2243-L3902	5q35.3	1,12741132	1,144679	1,015317
382	BRCA2 probe 1614-L1196	13q12.3	2,01218868	1,868626	0,928654
391	APC probe 1701-L1469	5q22	1,08342413	1,217285	1,123553
400	DLEU1 probe 0801-L0639	13q14.3	1,79453867	1,686726	0,939922
409	RB1 probe 1796-L1359	13q14.2	1,045959	1,095374	1,047243
418	LOX probe 3995-L3262	5q23.2	1,20118976	1,204528	1,002779
427	TRAF2 probe 1141-L0698	9q34	1,8041823	1,391489	0,971257
436	TEKT3 probe 2728-L2155	17p12	1,22393043	1,076642	0,87966
445	KIAA1030 probe 1143-L0700	11q25	0,72193644	0,91263	1,164142
454	BDNF probe 3090-L3996	11p14	0,29264431	0,617815	0,511146
463	DLEU7 probe 3042-L2417	13q14.3	1,1577466	1,239179	1,070337
472	NRXN1 probe 3987-L3254	2p16.3	1,10426413	0,911751	0,825664



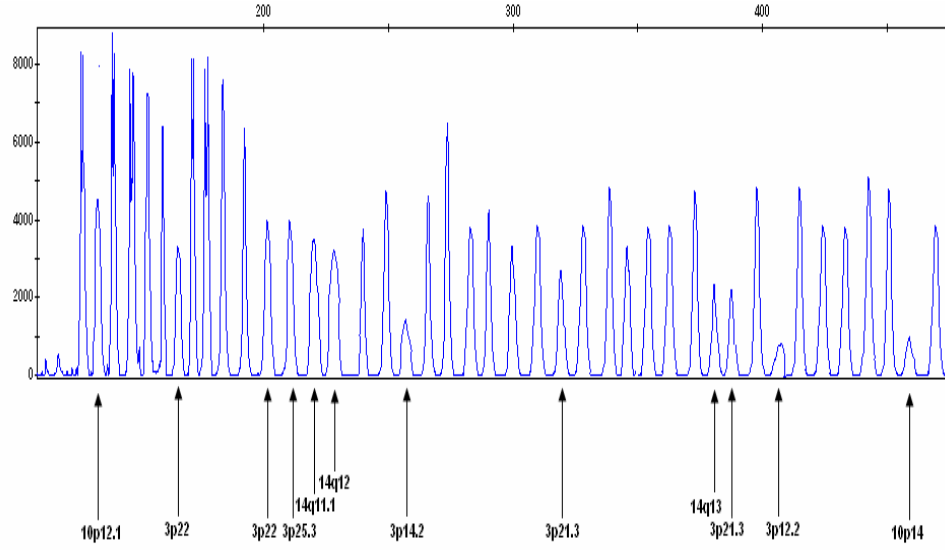
Şekil 4.2.7: 17p ve 17q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri

Çalışmada akciğer kanserine yönelik P126 ve P127 MLPA probmiksleri kullanılmıştır. Şekil.4.2.7’de P127 pobmiksl’inde yer alan 17p ve 17q bölgelerindeki delesyonlar görülmektedir. Bu bölgeler içerisinde özellikle 17p13.1 bölgesinde yer alan p53 genine ait delesyonlar dikkat çekicidir. Bu gene ait probmiksl içerisinde 3 ayrı prob dizayn edilmiştir. Pik görüntüleri verilen hastada bu üç bölgede de delesyon saptanmıştır. Bu piklere ait Diagenalyzer programı değerlendirme sonuçları Tablo 4.2.4’de verilmiştir.



Tablo 4.2.4: 17p ve 17q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	ORTALAMA	HASTA	SONUC
130	CTSB probe 1212-L0766	8p22	2,869437936	2,807107	0,978278
136	CREM probe 0981-L0566	10p12.1	3,824317337	3,174686	0,830131
142	ERBB2 probe 0675-L0146	17q21.1	4,088966964	3,86539	0,545322
148	CDKN2A probe 1523-L0957	9p21	4,025569358	3,768403	0,936117
157	BRCA1 probe 2808-L2168	17q21	3,466797439	3,713963	0,471295
166	TP53 probe 2374-L1496	17p13.1	2,945667583	3,396586	0,453079
172	TGFBR 2 probe 2797-L2182	3p22	3,508657076	2,504055	0,913679
178	MSR1 probe 2534-L3442	8p22	3,788842464	2,630053	0,994157
184	DLC1 probe 2754-L2203	8p22	2,949602461	3,07001	1,040822
193	TP53 probe 1996-L1536	17p13.1	2,834078882	3,362385	0,386412
202	CDKN2A probe 0602-L0166	9p21	3,699430439	2,10579	0,96922
211	CTNNB1 probe 3985-L3252	3p22	3,394531789	4,114889	1,212211
220	FANCD2 probe 2133-L1626	3p25.3	2,551964082	4,026608	1,177847
226	HEI10 probe 1732-L1318	14q11.1	5,384862951	3,509245	0,951687
238	TINF2 probe 0974-L0561	14q12	2,872796678	3,104179	1,080543
247	RUNX1 probe 2836-L2267	21q22.3	3,373969222	3,407823	1,010034
256	TP53 probe 2377-L1499	17p13.1	1,934367682	2,352365	0,51609
265	FHIT probe 2288-L2213	3p14.2	2,337052142	2,744256	1,174238
274	BRCA1 probe 0437-L0002	17q21	2,789674088	3,408053	0,521667
283	NKX3A probe 2542-L2014	8p21	2,382467909	1,623253	0,881333
292	SOD1 probe 2116-L1604	21q22.11	2,025578899	2,302196	1,136562
301	TP53 probe 1991-L1501	17p13.1	2,440793082	2,47672	0,414719
310	LRMP probe 0495-L0070	12p12.3	2,694142217	2,795772	1,037723
319	BCLG probe 3194-L2547	12p13.2	1,744019011	2,334459	1,138551
328	RASSF1 probe 2248-L1734	3p21.3	1,637990093	1,491473	0,910551
337	PPM1D probe 3195-L2652	17q23.3	1,943810266	1,924268	0,489946
346	APP probe 0987-L0330	21q21.3	1,023982831	1,375988	1,143761
355	CCND2 probe 0498-L0084	12p13	2,09382622	2,497254	1,192675
364	MSRA probe 1202-L0787	8p23.1	1,427181518	1,758943	1,032459
373	FGFR1 probe 1046-L0624	8p11.2	1,340354322	1,337975	0,998225
382	CUGBP2 probe 1522-L0952	10p14	1,464269873	1,568123	1,070925
391	NFKBIA probe 0478-L0061	14q13	1,838198561	1,897491	1,032256
400	RASSF1 probe 3991-L3258	3p21.3	1,143052157	1,189965	1,041042
409**	ROBO1 probe 4603-L3256	3p12.2	0,980924396	1,044484	1,064796
418	LASP1 probe 1058-L0631	17q12	1,335174625	1,31915	0,487998
427	TIAM1 probe 0817-L0335	21q22.11	1,372956	1,512171	1,101398
436	KIAA0909 probe 1241-L0783	17p13	1,084154748	1,134703	0,446625
445	ROBO1 probe 3988-L3255	3p12.2	1,160281885	1,263855	1,089266
454	TEAD4 probe 4227-L3563	12p13.3	0,919757927	0,959029	1,042697
463	RENT2 probe 0979-L0568	10p14	1,04839349	1,238459	1,181292
472	CTNNB1 probe 3984-L3251	3p22	1,013578217	1,190425	1,174478



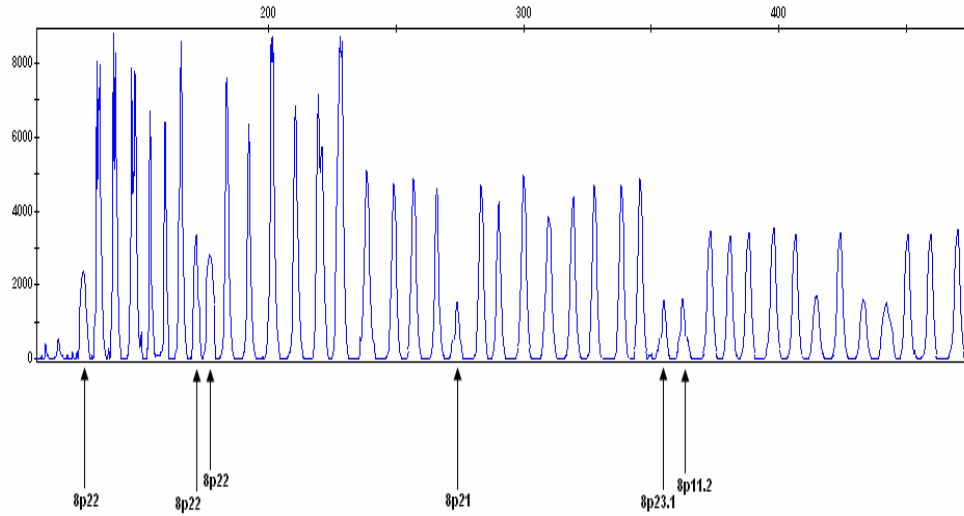
Şekil 4.2.8: 3p, 10p ve 14q kromozom bölgelerinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri

Akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş önemli bölgelerde biride kromozom 3p bölgesidir. 3. kromozomun p kolunda tanımlanmış birçok tümör baskılayıcı gen mevcuttur. Yapılan çalışmada incelenen hastaların büyük çoğunluğunda bu bölgede delesyon saptanmıştır. Şekil.4.2.8'de 3. kromozomun p kolunda ve 14. kromozomun q kolunda delesyonları olan bir hasta görülmektedir. Bu hastadan elde edilen pik alan değerleri ve kontroller ile karşılaştırma sonuçları Tablo 4.2.5'de verilmiştir.

Tablo 4.2.5: 3p, 10p ve 14q kromozomal bölgelerine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	ORTALAMA	HASTA	SONUC
92	Synthetic control probe	2q14	3,244525183	2,760069	0,850685
130	CTSB probe 1212-L0766	8p22	2,869437936	2,966453	1,03381
136	CREM probe 0981-L0566	10p12.1	3,824317337	3,491508	0,412976
142	ERBB2 probe 0675-L0146	17q21.1	4,088966964	3,806948	0,931029
148	CDKN2A probe 1523-L0957	9p21	4,025569358	3,651424	0,907058
157	BRCA1 probe 2808-L2168	17q21	3,466797439	4,053847	1,169335
166	TP53 probe 2374-L1496	17p13.1	2,945667583	3,73278	1,26721
172	TGFBR 2 probe 2797-L2182	3p22	3,508657076	2,408725	0,486509
178	MSR1 probe 2534-L3442	8p22	3,788842464	4,192198	1,106459
184	DLC1 probe 2754-L2203	8p22	2,949602461	3,032162	1,02799
193	TP53 probe 1996-L1536	17p13.1	2,834078882	3,307741	1,167131
202	CDKN2A probe 0602-L0166	9p21	3,699430439	2,239806	0,905446
211	CTNNB1 probe 3985-L3252	3p22	3,394531789	4,062087	0,496656
220	FANCD2 probe 2133-L1626	3p25.3	2,551964082	3,793915	0,486665
226	HEI10 probe 1732-L1318	14q11.1	5,384862951	5,509428	0,423132
238	TINF2 probe 0974-L0561	14q12	2,872796678	3,298701	0,548254
247	RUNX1 probe 2836-L2267	21q22.3	3,373969222	3,459924	1,025476
256	TP53 probe 2377-L1499	17p13.1	1,934367682	2,112708	1,092196
265	FHIT probe 2288-L2213	3p14.2	2,337052142	2,462382	0,553627
274	BRCA1 probe 0437-L0002	17q21	2,789674088	3,110069	1,11485
283	NKX3A probe 2542-L2014	8p21	2,382467909	1,271415	0,933655
292	SOD1 probe 2116-L1604	21q22.11	2,025578899	2,049504	1,011811
301	TP53 probe 1991-L1501	17p13.1	2,440793082	2,262096	0,926787
310	LRMP probe 0495-L0070	12p12.3	2,694142217	2,341709	0,869186
319	BCLG probe 3194-L2547	12p13.2	1,744019011	2,228842	1,277992
328	RASSF1 probe 2248-L1734	3p21.3	1,637990093	1,408024	0,459605
337	PPM1D probe 3195-L2652	17q23.3	1,943810266	1,829143	0,941009
346	APP probe 0987-L0330	21q21.3	1,023982831	1,330154	1,099
355	CCND2 probe 0498-L0084	12p13	2,09382622	2,391046	1,14195
364	MSRA probe 1202-L0787	8p23.1	1,427181518	1,502994	1,05312
373	FGFR1 probe 1046-L0624	8p11.2	1,340354322	1,235692	0,921915
382	CUGBP2 probe 1522-L0952	10p14	1,464269873	1,450427	0,990546
391	NFKBIA probe 0478-L0061	14q13	1,838198561	1,767173	0,461361
400	RASSF1 probe 3991-L3258	3p21.3	1,143052157	1,05178	0,52015
409**	ROBO1 probe 4603-L3256	3p12.2	0,980924396	0,821544	0,43752
418	LASP1 probe 1058-L0631	17q12	1,335174625	1,335527	1,000264
427	TIAM1 probe 0817-L0335	21q22.11	1,372956	1,307537	0,952351
436	KIAA0909 probe 1241-L0783	17p13	1,084154748	1,109611	1,02348
445	ROBO1 probe 3988-L3255	3p12.2	1,160281885	1,023536	0,882144
454	TEAD4 probe 4227-L3563	12p13.3	0,919757927	0,97518	1,060257
463	RENT2 probe 0979-L0568	10p14	1,04839349	0,943378	0,499832
472	CTNNB1 probe 3984-L3251	3p22	1,013578217	0,910814	0,898612

Tablo 4.2.5’de özellikle 3p21.3 bölgesinde yer alan RASSF1 genine ait prob bölgelerindeki delesyonlar sıklıkla diğer hastalarda da saptanmıştır. Bununla birlikte yine 3p22 ve 3p12.2 bölgelerinde de delesyonlar sık görülen delesyon bölgelerini oluşturmaktadır.

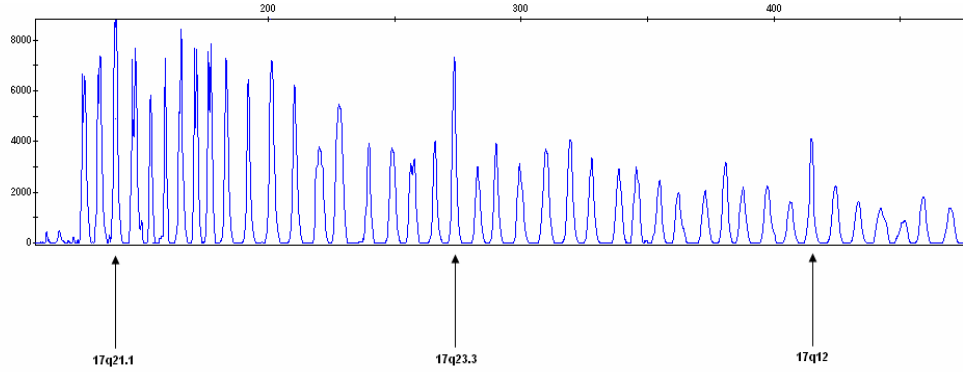


Şekil 4.2.9: 8p kromozom bölgesinde delesyon saptanan hastalara ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri

Şekil 4.2.9’da pik görüntüleri verilen hastada, 8. kromozoma ait dizayn edilen prob bölgelerindeki kayıplar görülmektedir. Bu kromozoma ait birden fazla bölge incelenmiş ve pik görüntüleri verilen hastada bu bölgelerin hepsinde delesyon olduğu gözlenmiştir. Bu durum bize 8. kromozomun p kolunda büyük bir kayıp olduğunu düşündürmektedir. Bu hastaya ait Diagenalyzer verileri Tablo 4.2.6’da gösterilmiştir.

Tablo 4.2.6: 8p kromozom bölgesine ait saptanan delesyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	ORTALAMA	HASTA	SONUC
92	Synthetic control probe	2q14	3,244525183	2,926482	0,901975
130	CTSB probe 1212-L0766	8p22	2,869437936	2,759917	0,461832
136	CREM probe 0981-L0566	10p12.1	3,824317337	3,622718	0,947285
142	ERBB2 probe 0675-L0146	17q21.1	4,088966964	3,61503	0,884094
148	CDKN2A probe 1523-L0957	9p21	4,025569358	3,544719	0,880551
157	BRCA1 probe 2808-L2168	17q21	3,466797439	2,812747	0,811339
166	TP53 probe 2374-L1496	17p13.1	2,945667583	3,091642	1,049556
172	TGFBR 2 probe 2797-L2182	3p22	3,508657076	3,334205	0,95028
178	MSR1 probe 2534-L3442	8p22	3,788842464	2,129815	0,562128
184	DLC1 probe 2754-L2203	8p22	2,949602461	2,367569	0,502674
193	TP53 probe 1996-L1536	17p13.1	2,834078882	3,128571	1,103911
202	CDKN2A probe 0602-L0166	9p21	3,699430439	3,2984	0,891597
211	CTNNB1 probe 3985-L3252	3p22	3,394531789	3,837795	1,130582
220	FANCD2 probe 2133-L1626	3p25.3	2,551964082	3,622753	1,119594
226	HEI10 probe 1732-L1318	14q11.1	5,384862951	6,019458	1,117848
238	TINF2 probe 0974-L0561	14q12	2,872796678	2,75065	0,957482
247	RUNX1 probe 2836-L2267	21q22.3	3,373969222	3,122006	0,925322
256	TP53 probe 2377-L1499	17p13.1	1,934367682	2,108683	1,090115
265	FHIT probe 2288-L2213	3p14.2	2,337052142	2,592791	1,109428
274	BRCA1 probe 0437-L0002	17q21	2,789674088	2,887587	1,035098
283	NKX3A probe 2542-L2014	8p21	2,382467909	1,59895	0,571132
292	SOD1 probe 2116-L1604	21q22.11	2,025578899	2,189245	1,0808
301	TP53 probe 1991-L1501	17p13.1	2,440793082	2,468701	1,011434
310	LRMP probe 0495-L0070	12p12.3	2,694142217	2,713265	1,007098
319	BCLG probe 3194-L2547	12p13.2	1,744019011	2,354089	1,349807
328	RASSF1 probe 2248-L1734	3p21.3	1,637990093	1,249884	0,863059
337	PPM1D probe 3195-L2652	17q23.3	1,943810266	2,176678	1,1198
346	APP probe 0987-L0330	21q21.3	1,023982831	1,162056	1,134839
355	CCND2 probe 0498-L0084	12p13	2,09382622	2,785648	1,13041
364	MSRA probe 1202-L0787	8p23.1	1,427181518	1,795457	0,580441
373	FGFR1 probe 1046-L0624	8p11.2	1,340354322	1,312613	0,479303
382	CUGBP2 probe 1522-L0952	10p14	1,464269873	1,598072	1,091378
391	NFKBIA probe 0478-L0061	14q13	1,838198561	1,753509	0,953928
400	RASSF1 probe 3991-L3258	3p21.3	1,143052157	1,022064	0,894154
409**	ROBO1 probe 4603-L3256	3p12.2	0,980924396	1,052604	1,073073
418	LASP1 probe 1058-L0631	17q12	1,335174625	1,423574	1,066208
427	TIAM1 probe 0817-L0335	21q22.11	1,372956	1,616115	1,177106
436	KIAA0909 probe 1241-L0783	17p13	1,084154748	1,23149	1,135898
445	ROBO1 probe 3988-L3255	3p12.2	1,160281885	1,296922	1,117765
454	TEAD4 probe 4227-L3563	12p13.3	0,919757927	1,084688	1,179319
463	RENT2 probe 0979-L0568	10p14	1,04839349	1,239212	1,182011
472	CTNNB1 probe 3984-L3251	3p22	1,013578217	1,301626	1,184189



Şekil 4.2.10: 17q kromozom bölgesinde amplifikasyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüsü ve amplifikasyon görülen prob bölgeleri

İncelenen hasta grubu içerisinde 9 hastada 17q bölgesinde amplifikasyon saptanmıştır. Bu bölgeye yönelik incelenen prob bölgeleri ve alınan pik görüntüleri Şekil 4.2.10'da verilmiştir. Şekli incelediğimizde 17q bölgesine karşılık gelen piklerdeki artış dikkat çekmektedir. Bu hastaya ait Diagenalyzer sonuçları Tablo.4.2.7'de verilmiştir. Bu tabloda amplifikasyon görülen bölgeler kırmızı renk ile gösterilmiştir. Bu alanların diğer kontrollerin pik alanlarına göre karşılaştırıldığında oranın 1.8'in üstünde olması, amplifikasyon yönünde değerlendirilmektedir.

Tablo 4.2.7: 17q kromozom bölgesine ait saptanan amplifikasyonların Diagenalyzer programında örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	ORTALAMA	HASTA	SONUC
92	Synthetic control probe	2q14	3,244525183	3,689654	1,137194
130	CTSB probe 1212-L0766	8p22	2,869437936	2,863555	0,99795
136	CREM probe 0981-L0566	10p12.1	3,824317337	4,235362	1,107482
142	ERBB2 probe 0675-L0146	17q21.1	4,088966964	4,069876	1,995331
148	CDKN2A probe 1523-L0957	9p21	4,025569358	3,902184	0,96935
157	BRCA1 probe 2808-L2168	17q21	3,466797439	3,263303	0,941302
166	TP53 probe 2374-L1496	17p13.1	2,945667583	2,928293	0,994102
172	TGFBR 2 probe 2797-L2182	3p22	3,508657076	2,769759	0,789407
178	MSR1 probe 2534-L3442	8p22	3,788842464	3,257766	0,859832
184	DLC1 probe 2754-L2203	8p22	2,949602461	2,788077	0,945238
193	TP53 probe 1996-L1536	17p13.1	2,834078882	2,697153	0,951686
202	CDKN2A probe 0602-L0166	9p21	3,699430439	4,660922	1,259903
211	CTNNB1 probe 3985-L3252	3p22	3,394531789	3,180789	0,937033
220	FANCD2 probe 2133-L1626	3p25.3	2,551964082	1,599574	0,926801
226	HEI10 probe 1732-L1318	14q11.1	5,384862951	5,729234	1,063952
238	TINF2 probe 0974-L0561	14q12	2,872796678	2,630293	0,915586
247	RUNX1 probe 2836-L2267	21q22.3	3,373969222	3,265218	0,967768
256	TP53 probe 2377-L1499	17p13.1	1,934367682	1,872012	0,967765
265	FHIT probe 2288-L2213	3p14.2	2,337052142	2,231169	0,954694
274	BRCA1 probe 0437-L0002	17q21	2,789674088	2,670634	0,957328
283	NKX3A probe 2542-L2014	8p21	2,382467909	2,62359	1,101207
292	SOD1 probe 2116-L1604	21q22.11	2,025578899	1,996949	0,985866
301	TP53 probe 1991-L1501	17p13.1	2,440793082	2,505814	1,026639
310	LRMP probe 0495-L0070	12p12.3	2,694142217	2,8999	1,076372
319	BCLG probe 3194-L2547	12p13.2	1,744019011	1,720723	0,986642
328	RASSF1 probe 2248-L1734	3p21.3	1,637990093	1,742912	1,064056
337	PPM1D probe 3195-L2652	17q23.3	1,943810266	2,223343	1,843806
346	APP probe 0987-L0330	21q21.3	1,023982831	0,832468	0,812971
355	CCND2 probe 0498-L0084	12p13	2,09382622	2,233542	1,066728
364	MSRA probe 1202-L0787	8p23.1	1,427181518	1,529841	1,071932
373	FGFR1 probe 1046-L0624	8p11.2	1,340354322	1,433672	1,069622
382	CUGBP2 probe 1522-L0952	10p14	1,464269873	1,57905	1,078387
391	NFKBIA probe 0478-L0061	14q13	1,838198561	1,905526	1,036627
400	RASSF1 probe 3991-L3258	3p21.3	1,143052157	1,254198	1,097236
409**	ROBO1 probe 4603-L3256	3p12.2	0,980924396	1,04708	1,067442
418	LASP1 probe 1058-L0631	17q12	1,335174625	1,448035	1,984528
427	TIAM1 probe 0817-L0335	21q22.11	1,372956	1,45328	1,058505
436	KIAA0909 probe 1241-L0783	17p13	1,084154748	1,172683	1,081656
445	ROBO1 probe 3988-L3255	3p12.2	1,160281885	1,251242	1,078395
454	TEAD4 probe 4227-L3563	12p13.3	0,919757927	1,036713	1,127159
463	RENT2 probe 0979-L0568	10p14	1,04839349	1,146496	1,093574
472	CTNNB1 probe 3984-L3251	3p22	1,013578217	0,658114	0,949298

Çevre akciğer dokusu ve tümöral dokudan elde edilen DNA'lar ayrı ayrı MLPA yöntemi ile incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2.8'de gösterildi.

Tablo 4.2.8: Akciğer kanserli tümöral ve çevre dokulardan elde edilen MLPA sonuçları

Kromozomal Bölge	Tümöral Doku		Çevre Doku	
	Delesyon (%)	Amplifikasyon(%)	Delesyon (%)	Amplifikasyon(%)
2p	72	---	12	---
3p	64	---	12	---
5q	12	3	2	---
8p	8	4	2	---
9p	---	---	2	---
9q	16	---	--	---
10p	22	---	6	---
11p	2	---	2	---
11q	20	---	2	---
12p	20	---	6	---
13q	76	---	14	---
14q	4	---	--	---
16p	30	---	2	---
17p	38	---	4	---
17q	6	9	2	1
21q	16	---	4	---

Bu sonuçlar incelendiğinde, akciğer kanserli tümöral dokularda en sık 2p, 3p, 13q, 17p ve 16p delesyonları, yine tümöral dokulardan yapılan çalışmalarda 17q, 8p ve 5q amplifikasyonları görülmüştür. 9. kromozomun p bölgesine yönelik prob bölgelerinde herhangi bir delesyon veya amplifikasyon saptanmamıştır. Tümör çevresi akciğer dokularından yapılan çalışmalarda ise daha az sıklıkta olmak üzere tümöral alanlardakine benzer bölgelerde delesyonlar görülmüştür. Bu bölgelerde sadece 17q bölgesinde bir hastada amplifikasyon görülmüştür.



Tablo 4.2.9: Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının Grade'lere göre dağılımları (-: Delesyon Yok, +: Delesyon Var)

	2p		3p		5q		8p		9p		9q		10p		11q		11p	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Grade 0</b>	0	14	6	8	12	2	14	0	14	0	14	0	8	6	12	2	14	0
<b>Grade 1-2</b>	28	58	28	58	76	10	78	8	86	0	70	16	70	16	68	18	84	2

	12p		13q		14q		16p		17q		17p		21q	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Grade 0</b>	12	2	2	12	14	0	12	2	14	0	8	6	14	0
<b>Grade 1-2</b>	68	18	22	64	82	4	58	28	80	6	54	32	70	16

Tablo 4.2.10: Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının T1, T2 ve T3' lü olgulara göre dağılımları (-: Delesyon Yok, +: Delesyon Var)

	2p		3p		5q		8p		9p		9q		10p		11q		11p	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>T1</b>	11	30	17	24	35	6	41	0	41	0	38	3	33	8	35	6	41	0
<b>T2</b>	17	30	13	34	45	2	39	8	47	0	38	9	35	12	37	10	45	2
<b>T3</b>	0	12	4	8	8	4	12	0	12	0	8	4	10	2	8	14	12	0

	12p		13q		14q		16p		17q		17p		21q	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>T1</b>	37	4	7	34	41	0	29	12	41	0	31	10	37	4
<b>T2</b>	35	12	15	32	43	4	37	10	41	6	25	22	37	10
<b>T3</b>	8	4	2	10	12	0	4	8	12	0	6	6	10	2

Tablo 4.2.11: Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının olguların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları ( -: Delesyon Yok, +: Delesyon Var)

	2p		3p		5q		8p		9p		9q		10p		11q		11p	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>N0</b>	6	20	12	14	18	8	24	2	26	0	22	4	18	8	20	6	26	0
<b>N1</b>	20	44	20	44	62	2	60	4	64	0	56	8	52	12	52	12	64	0
<b>N2</b>	2	8	2	8	88	2	8	2	10	0	6	4	8	2	8	2	8	2

	12p		13q		14q		16p		17q		17p		21q	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>N0</b>	24	2	6	20	26	0	20	6	26	0	16	10	24	2
<b>N1</b>	48	16	16	48	62	2	44	20	58	6	40	24	52	12
<b>N2</b>	8	2	2	8	8	2	6	4	10	0	6	4	8	2

Tablo 4.2.12: Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen MLPA sonuçlarının olguların metastaz sıklıklarına göre dağılımları ( -: Delesyon Yok, +: Delesyon Var)

	2p		3p		5q		8p		9p		9q		10p		11q		11p	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>M0</b>	28	68	34	62	84	12	88	8	96	0	80	16	78	18	76	20	96	0
<b>M1</b>	0	4	0	4	4	0	4	0	4	0	4	0	4	4	4	0	2	2

	12p		13q		14q		16p		17q		17p		21q	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>M0</b>	78	18	24	72	92	4	70	26	90	6	58	38	80	16
<b>M1</b>	2	2	0	4	4	0	0	4	4	0	4	0	4	0

Tablo 4.2.9-12' de tümör dokularından MLPA ile elde edilen sonuçların olguların grade ve TNM sınıflamalarına göre dağılımları incelendi. Bu sonuçlara göre ileri grade' li olgularda delesyon sıklığının arttığı görülmektedir. Fakat bu sonuçlar değişken sayısının çokluğundan ve örnek sayısının azlığından dolayı istatistiki açıdan değerlendirilemedi. Bununla birlikte T2 ve N2' li olgularda delesyon sıklığındaki artış dikkat çekiciydi.

## 5.TARTIŞMA

Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Sıklılığının ve mortalitesinin yüksek olması kanser üzerindeki çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. Özellikle kanser etyolojisinin aydınlatılması, tedavi ve erken tanı bu çalışmaların başını oluşturmaktadır. Kanser genetik bir hastalık olarak da kabulünden sonra bu çalışmalar özellikle genetik alt yapının araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan alışmalar akciğer kanserinin sigara içimi ile ilişkisini belirgin bir şekilde ortaya koymuştur. Fakat ağır sigara içicilerinin sadece %20' sinde akciğer kanserinin görölmesi ve ailelerinde akciğer kanseri olan bireylerde, toplumun diğer kesimlerine göre daha yüksek oranda akciğer kanserine yakalanmaları akciğer kanserinin genetik alt yapısının olduğunu göstermiştir. Akciğer kanserinin genetik etyolojisinin aydınlatılmasına yönelik bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda farklı teknikler ve doku şekilleri kullanılmış, akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş birçok gen tanımlanmış ve halende tanımlanmaktadır.

Çalışmamıza İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek "küçük hücreli olmayan akciğer kanseri" tanısı almış 100 olgu dahil edilmiştir. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömölü dokulardan hazırlanmış ve Hematoksilen- Eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre gradelendirilmiş ve TNM sınıflamasına göre evrelendirilmiştir. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, biyopsi şekli, takip aralıkları, hastalara ait patoloji raporları, hasta dosyalarından temin edilmiştir.

Elde edilen DNA örnekleri MLPA yöntemiyle, akciğer kanserine yönelik hazırlanmış P126 ve P127 probmikserleriyle çalışılmış, incelen prob bölgelerindeki amplifikasyon ve/veya delesyonlar araştırılmıştır.

## 5.1. PARAFİNE GÖMÜLÜ DOKULARDAN DNA ELDE ETME PROTOKOLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI:

Yaptığımız MLPA çalışmasında en çok zorlanılan ve zaman alan basamak parafine gömülü dokulardan DNA ekstraksiyonu oldu. DNA eldesinde kullandığımız ilk protokol DNA ekstraksiyon kitinde tavsiye edilen protokoldü. Bu protokolün ilk denemelerinde istenilen kalitede ve miktarda DNA elde edilemedi. Bunun sebebi, dokuların gömülü olduğu parafini yeterince uzaklaştırılmaması olarak düşünüldü. Yapılan literatür taramalarında, parafine gömülü dokulardan DNA eldesinde benzer problemlerle karşılaşıldığı görüldü. Yapılan çalışmalarda parafine gömülü dokulardan DNA eldesi protokolleri çok kısa anlatılmış ve birçok yayında kullanılan protokol ve kimyasallar belirtilmemiştir. Foster ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınlanan çalışmalarında parafine gömülü akciğer dokularından DNA elde etmişlerdir (19). DNA eldesinin deparafinizasyon basamağında uyguladıkları protokolde, parafin kesitlerini 50µl proteinaz K digestion tamponunda 55°C' de 24 saat inkübasyona bırakmışlardır. Bu protokolde zor olan kısım kullanılan proteinaz K digeston tamponunun içeriğinin hazırlanması ve süresinin uzun olmasıydı. Çalışmamızda bu protokol denendi ve yine istenen miktarda DNA elde edilemedi. Dacic S ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada dokuları sadece proteinaz K solüsyonunda bekleterek DNA elde etmişlerdir (12). Tanımlanan protokol oldukça basit ve kısadır. Bu protokolü takip ettiğimizde ise hiç DNA bandı görülmemiştir. Tanaka ve ekibinin yayınlanan çalışmalarında deparafinizasyonda ksilol kullanmışlar ve daha sonrasında proteinaz K solüsyonunda bekletmişlerdir (71). Bu protokol bizim en iyi DNA elde ettiğimiz yöntem oldu. Çalışmamızda en önemli modifikasyonlar bu yayında izlenen protokoller üzerinde yapılmıştır. Burada ana problemin parafinin dokulardan uzaklaştırılmasında olduğu düşünüldü. Başlangıçta takip ettiğimiz kit protokolünde, doku kesitleri ksilol içerisinde bekletilmeden sadece ksilol ile vortekslenip uzaklaştırılıyordu. Bu işlemlerin sonucunda parafini yeterince uzaklaştırılmayan dokularda yeterince homojenizasyon sağlanamaması ve dokuların parçalanamamasından yeterli miktarda DNA elde edilemedi.

Elde edilen DNA miktarının kullanılan doku tipine göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Akciğer dokusu diğer dokulara oranla DNA' nın daha az elde edildiği dokulardandır. Bunun sebebi diğer organlara göre farklılık gösteren hücresel kuruluşudur. Akciğerin geniş hava boşluklarından oluşan histolojisi hücre sayısında azlığa, bu boşluklara parafinin dolması nedeniyle parafinin diğer doku kesitlerine oranla daha zor uzaklaştırılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle kit protokollerinde tavsiye edilen kesit sayısından fazla kesit kullanarak bu açık kapatıldı. Literatürde tavsiye edilen yöntemlerden bazılarında dokuları 65°C'de etüvde 1 saat bekletilmesi önerilmiştir. Çalışmamızda bu protokolleri biraz genişleterek, etüvde değil ama 65°C'deki su banyosunda dokular, ksilol içinde 15 dakika bekletildi. Burada düşüncemiz su banyosu içinde ısı iletkenliğinin biraz daha iyi olmasıydı. Bu basamak en az 3 kere tekrar edildi. Daha sonra ksilol, alkol yardımıyla dokulardan uzaklaştırıldı. Verilen protokollerden farklı olarak yaptığımız bir işlem de dokuların homojenizasyonunu sağlamak için proteinaz K (QIAGEN) ve doku parçalayıcı tampon (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer-Roche-Lot: 13562000) ile 56°C' deki su banyosunda gecelik bırakılmasıydı. Bu işlem süreyi uzatsa da sonucunda dokuların oldukça iyi parçalanarak homojenize olduklarını görüldü. Bu işlemler sonucunda MLPA yöntemi için yeterli miktarda ve kalitede DNA elde edilebildi. DNA' nın kalitesini ve miktarını, agaroz jeldeki görüntüler ve MLPA'nın kendi içinde dizayn ettiği sentetik problemlerle karşılaştırarak karar verildi. Agaroz jel elektroforezindeki DNA görüntülerinde bazı örneklerde smear görüntüsü alındı. İncelenen literatürlerde, bu görüntünün formalin fikse dokularda görülebildiğini, sebebinin de formalinin DNA'da kırıklar oluşturabilmesinden kaynaklandığı öne sürülmüştür.

## **5.2. ÇALIŞMA GRUBUNDA ELDE EDİLEN VERİLERİNİN LİTERATÜR BİLGİLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI:**

Yapılan çalışmada kromozom 2p, 3p, 5q, 8p, 9p, 9q, 10p, 11p, 11q, 12p, 13q, 14q, 16p, 17p, 17q ve 21q bölgelerindeki değişimler MLPA yöntemiyle incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda özellikle tümöral dokulardaki 2p, 3p ve 13q bölgelerindeki delesyonlar dikkat çekicidir.

Şimdiye kadar akciğer kanserlerindeki genomik değişikliklerle ilgili birçok çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda farklı teknikler ile farklı gen ve kromozom bölgeleri incelenmiştir.

Yan ve ark.'larının 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH) yöntemiyle akciğer tümör dokularındaki genomik değişimleri araştırmışlar ve özellikle 1p, 2q, 3p, 4p, 4q, 6p, 6q, 8p, 13q, 13p ve 16p kromozomal bölgelerinde delesyon saptamışlardır. Bu bölgeler içerisindeki en sık değişimleri %56.4 oranıyla 3p, %53.8 ile 5q ve %51.3 ile 13q bölgelerinde göstermişlerdir (81).

Dacic S ve ark. 2005 yılında yayınladıkları başka bir çalışmada, akciğer adenokarsinomlu 20 hastanın parafin dokularından elde ettikleri DNA örneklerinde mikrosatellit markerlar kullanarak 1p, 3p, 5q, 9p, 9q, 10q, 17p ve 22q bölgelerindeki değişimleri incelemişler ve özellikle 3p bölgesinde heterozigozite kaybı bulmuşlardır (13).

Yoshino I ve arkadaşlarının 49 adenokarsinomlu, 22 skuamoz hücreli karsinomlu akciğer kanseri hastalarında heterozigozite kaybını mikrosatellit markerlar kullanarak, *FHIT*, *p53*, *CDKN2*, *hMLH1*, *hMSH3* genlerini araştırmışlardır. Adenokarsinomlu vakaların %67'sinde, skuamoz hücreli karsinomlu vakalarında %90'ında heterozigozite kaybı saptanmıştır (82).

Sato M ve arkadaşları 2002'de yaptıkları bir çalışmada küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserli olgularda *FHIT*, *CDKN2A*, *P14ARF*, *CDKN2B*, *PTEN*, *TP53* genlerinin homozigot delesyonlarını araştırmışlar ve olguların %59'unda bu genlerin 1 ila 6'sında homozigot delesyon bulmuşlardır (56).

MLPA yöntemiyle yapılan birçok farklı çalışma bulunmasına karşın, akciğer kanserine yönelik yapılmış herhangi bir çalışma literatürde yayınlanmamıştır. Çalışmamız bu bakımdan bir ilk olma özelliğini taşımaktadır. Elde ettiğimiz veriler, literatürde yayınlanmış diğer tekniklerle yapılan çalışmalardan elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır.

### 5.2.1. Kromozom 2p, 3p ve 13q Değişimleri:

Kromozom 2p ve 3p, akciğer kanserlerinde genomik instabilite açısından en duyarlı bölgelerdir (49). Akciğer kanserli vakalarda yapılan birçok çalışmada diğer kromozomal bölgelere göre bu alanlarda daha fazla oranda delesyon saptanmıştır. Bu çalışmalarda 2p ve/veya 3p'de %25-75 oranları arasında değişen sıklıklarda delesyon görülmüştür. Saptanan bu delesyonlar, hastanın klinik ve demografik özellikleri ile karşılaştırıldığında, özellikle erken dönem tümörlerde ve uzun süreli sigara içicilerinde daha yüksek sıklıkta görüldüğü saptanmıştır. Bu veriler karsinogenezisi tetikleyen genetik değişimlerin 2p ve 3p'deki delesyonların olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan epigenetik çalışmalarda, karsinogenezisin başlangıç sürecinde artmış CpG bölgeleri metilasyonunun yanında tüm genomda genel bir metilasyon azalması olduğu gösterilmiştir. Artan DNA hipometilasyonu, kromatin yapısını duyarlılaştırarak genomik değişimlere zemin hazırlar. Genomik instabiliteye en duyarlı bölgeler olan 2p ve 3p kromozomal bölgelerinde yüksek oranda delesyon bulunması karsinogenezis sürecinde epigenetik değişikliklerin önemli bir rol oynadığının göstergesidir. Yine 2p ve 3p bölgelerinde bulunan tümör baskılayıcı genler, bu değişimlerin ana sebeplerinden birini oluşturmaktadır. Özellikle *FHIT* geni akciğer kanserindeki önemli aday tümör baskılayıcı genlerden birisidir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatür ile uyumlu bulunmuştur. 100 tümör dokusu içerisinde 72 hastada (%72) 2p delesyonu, 64 hastada da (%64) 3p delesyonu saptanmıştır. Yine çalıştığımız tümör dokusu içermeyen komşu akciğer dokularında 12 olguda (%12) 2p, yine 12 olguda (%12) 3p delesyonu saptanmıştır. Tümör dokusu içermeyen sağlam dokularda bu delesyonların görülmesi, bu dokularda genomik değişimlerin olduğunu ancak hücresel düzeyde neoplastik değişimlerin henüz oluşmadığını düşündürmüştür. Çünkü delesyon saptadığımız sağlam doku örneklerinin yine çalışılan tümöral sahalarında bu değişimler görülmüştür.

2p ve 3p delesyonu ile hastaların histopatolojik ve demografik özellikleri karşılaştırıldığında, squamöz hücreli karsinomlarda 3p delesyonu, adenokarsinomlara göre istatistiksel açıdan anlamlı bir oranda yüksek bulunmuştur ( $p=0.01$ ). Bu verimizin de literatürle uyumlu olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda 13q delesyonu en yüksek oranda saptanan delesyondur.(%76) Literatürde akciğer kanserli vakalarda 13q değişimlerini inceleyen çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Özellikle yapılan çalışmalar prostat ve meme kanserleriyle kromozom 13'deki değişimlerin ilişkili olduğunu göstermektedir (39). Akciğer kanserine yönelik yapılan çalışmalarda ise 13q bölgesinde heterozigote kaybı araştırılmış ve %40-80 oranlarında kayıp saptanmıştır. 13q12.2, 13q14.1 ve 13q22 kromozomal bölgelerinin kayıpları KHDAK'lerinde sıklık gösterir. Bununla birlikte *BRCA2* gibi bazı tümör baskılayıcı genler 13q12.1 bölgesinde yerleşiktir. Ancak bu genlerin KHDAK' lerindeki rolü henüz net değildir.

Kwong F ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış oldukları bir çalışmada içinde *RBI* genininde olduğu 13q14.3 bölgesine ait allelik kayıp %16.7 gibi beklenenden az bir oranda bulunmuştur. Bu çalışmanın aksine Reissmann, *RBI* geninin KHDAK' lerinde inaktive olduğunu göstermiştir (52). Bununla birlikte *RBI* genine çok yakın D13S284 mikrosatellit bölgesine lokalize *DICE1* geni de araştırılması planlanan aday tümör baskılayıcı genler arasında gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda da bu bölgeler incelenmiş ve %76 gibi yüksek oranda bir delesyon saptanmıştır. Bu bölgeler ile ilgili



akciğer kanserinde yapılmış çok fazla çalışma olmamasından dolayı verilerimiz istenen düzeyde karşılaştırılamamıştır. Elde ettiğimiz veriler bundan sonra yapılacak benzer çalışmalar için önemli bir kaynak oluşturacağını düşünmekteyiz. Yine çalışmamızda 13q bölgesi delesyonları, sağlam çevre akciğer dokularından yapılan analizlerde de en yüksek oranda (%14) saptanmıştır.

### 5.2.2. Kromozom 17p Değişimleri:

Çalışmamızda özellikle tümörlü dokularda yüksek sıklıkta (%36) gözlenen diğer bir anomali kromozom 17p delesyonudur. Kromozom 17p'de lokalize *p53* tümör baskılayıcı geninin akciğer kanseri ve yine birçok kanser türünde önemli bir rolü olduğu pek çok literatürde rapor edilmiştir. *p53* geni insan kanserlerinde en sık görülen mutant gen olup, 17p13 lokusunda yerleşmiştir. Tüm kanserlerin %50'sinde görülürken KHAK'lerinin %90'ında, yassı hücreleri kanserlerin %65'inde, büyük hücreli kanserlerin %60'ında ve adenokanserlerin %33'ünde bu genin mutasyonu gösterilmiştir (17,25,31,42,65,73).

*p53* proteininin hücre fonksiyonlarındaki rolü; gen transkripsiyonu, DNA sentez ve tamiri, genetik stabilitenin korunması, hücre siklusunun arresti, büyümeyi sonlandırma ve programlı hücre ölümüdür (31, 40).

Çalışmamızda yer alan 55 adenokarsinomlu olgunun %40.7'sinde 17p delesyonu görülürken, squamöz hücreli karsinomlu olgularımızda bu oran %34.7'dir. Bu iki grup arasında 17p delesyonu görülme sıklığı açısından istatistiki açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Ayrıca tümör dokusu içermeyen çevre akciğer dokularından yapılan çalışmalarda 17p delesyon oranı %4'tür. Elde ettiğimiz veriler literatür ile uyumlu verilerdir. Bu verilerle 17p delesyonlarının akciğer kanseri gelişiminde önemli bir rolü olduğu tekrar gösterilmiştir.

## 5.2.3. Kromozom 16p, 10p, 11q, 12p, 9q ve 21q Değişimleri:

Yaptığımız çalışmada diğer sık rastlanan delesyonlar 16p (%30), 10p (%22), 11q (%20), 12p (%20), 9q (%16) ve 21q kromozomal bölgelerindedir. Takamochi K ve ark.'nın 2001 yılında yayınlanan bir çalışmasında, KHDAK'lı vakalarda 9q ve 16p bölgelerindeki heterozigozite kayıplarını mikrosatellit belirleyiciler kullanarak incelemişler ve %35 oranında 16p delesyonu, %78 oranında ise 9q delesyonu saptamışlardır (66). Elde ettikleri 9q delesyon oranı hem bizim çalışmamıza göre hem de literatürdeki diğer çalışmalara göre yüksek bir orandır. 9q kromozomal bölgesine lokalize *TSC* geni, Tüberous sclerosis (TSC) hastalığından sorumludur. Bu hastalık mental retardasyon, konvülsiyon ve birçok organdaki multiple hamartomlarla seyreder. Özellikle akciğerdeki bu lezyonların adenokarsinomlara dönüşme riski yüksektir. Takamochi ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışmada ayrıca akciğer kanserinin progresyonu ile birlikte 9q bölgesinin kaybında da progresyon gösterdiği vurgulanmıştır. Bu bilgi, 9q bölgesinde akciğer adenokarsinomları ile ilgili birden fazla tümör baskılayıcı genin varlığını düşündürmektedir. Yan WS ve ark.'nın yapmış oldukları başka bir çalışmada 9q ve 16p delesyon oranları %35.9 olarak verilmiştir (81).

16p kromozomal bölgesinde lokalize *CBP* geni, büyümeyi de içeren temel hücre fonksiyonlarında, farklılaşmada, DNA tamirinde ve apoptoziste görev alır. *CBP* geninin onkogenik rolü, akut myeloid lösemide *MOZ* geni ve daha başka genlerle füzyon proteini oluşturmasıyla ortaya çıkmıştır. Akciğer kanserinde özellikle squamöz hücrelilerde *CBP* delesyonları gösterilmiştir (34,36,46). Bizim çalışmamızda squamöz hücreli karsinomlar ile adenokarsinomlu vakalar 16p delesyonu açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır.

Akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş bir diğer kromozomal bölge 11q bölgesidir. 11q13 kromozom anomalileri Multiple Endokrin Neoplazi Tip 1 (MEN1)'li hastalardaki tümör artışı ile ilişkilidir. Bazı hastalarda MEN1'in sendromunun bir parçası olarak

akciğer kanseri de görülebilir. *MEN1* gen anomalileri özellikle heterozigozite kaybı sporadik akciğer kanserlerinde gösterilmiştir. Akciğer adenokarsinomlarında, 11q22-24 bölgesinde heterozigozite kaybı frekansında artış göstermiştir (48). Bu durum 3 muhtemel tümör baskılayıcı gen varlığını göstermektedir. Akciğer kanseri gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili diğer bir tümör baskılayıcı genin 11q23 bölgesinde lokalize olduğu düşünülmektedir. Petzmann S. ve ark.'nın 2001 yılında yayınlanan akciğer karsinoidli vakalarda yapılan çalışmalarında, 11q bölgesine yönelik mikrosatellit markerlar kullanmışlar, incelenen hastaların %65'inde bu bölgelerde heterozigozite kaybı bulmuşlardır (48). Bizim çalışmamızda 11q bölgesi delesyonları incelenen tümürlü dokular içerisinde %20 oranında saptanmıştır. Bu oran literatürdeki çalışmalara göre daha düşüktür. Çünkü incelenen literatürlerde 11q değişimleri çok daha spesifik bir grupta özellikle akciğerin nöroendokrin tümörlerinde araştırılmıştır. Bu yüzden oranların biraz daha yüksek saptandığını düşünmekteyiz.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kromozom 12'nin p kolundaki polimorfizmlerin akciğer kanserinin gelişimi ve prognozuyla ilişkili olduğu saptanmıştır (44). 12p'de lokalize tümör gelişimi ile ilgili en önemli gen *KRAS*'dir. J Lei ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınlanan yayınlarında, akciğer adenokarsinomlu vakalar üzerinde kromozom 12p bölgesini incelemişler ve inceledikleri dokuların yaklaşık olarak %50'sinde 12p bölgesinde heterozigozite kaybı saptamışlardır. Ayrıca bu yayında *KRAS2* mutasyonunu %40 oranında bulmalarının yanında, bu mutasyonun mevcut olduğu hastaların hepsinde 12p heterozigozite kaybı olduğunu saptamışlardır. Yine bu yayında *KRAS2*'nin akciğer kanseri için güçlü bir tümör baskılayıcı gen olduğu iddia edilmiştir (44). Biz de çalışmamızda 12p bölgesine ait dizayn edilmiş farklı prob bölgelerinde yaptığımız incelemelerde, tümör dokularının %20'sinde delesyon olduğunu saptadık. Kullandığımız probmikslere içerisinde *KRAS* genine spesifik dizayn edilmiş bir prob olmamasına karşın, farklı bölgelerdeki birden çok saptanan kayıplar nedeniyle, bu gende de delesyon olabileceğini düşündük. Uchiyama M. ve ekibinin yapmış olduğu bir başka çalışmada, KHDAK'lu vakalarda 12p bölgesini incelemişler ve %18 oranında kayıp saptamışlardır (75).

Yapılan sitogenetik ve heterozigozite kaybı analizlerinde KHDAK'larında 21q delesyonları sıkça rastlanmıştır (57,74). Bu durumda 21q bölgesinde tümör baskılayıcı genler olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte bu bölgeyle ilgili bilgilerin çok net olmaması nedeniyle bu bölgede olduğu düşünülür tümör baskılayıcı gen açıkça tanımlanamamıştır. Lee EB ve arkadaşlarının KHDAK'lu vakalarda 21. kromozomdaki heterozigozite kaybı üzerine yaptıkları çalışmada, hastaların %56.4 oranında 21q21.2, 21.3 ve 22.1 bölgelerinden en az birinde heterozigozite kaybı saptamışlardır. Buna benzer olarak Takashi K. ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışmada %51.1 oranında 21q bölgesinde heterozigozite kaybı saptamışlardır (70). Çalışmamızda elde ettiğimiz %16'lık 21q delesyon oranı literatürdeki bazı çalışmalara göre düşük oranda saptanmıştır.

#### **5. 2. 4. Kromozom 5q, 8p, 9p, 11p, 14q ve 17q Değişimleri:**

Yapmış olduğumuz çalışmada ayrıca 5q, 8p, 9p, 11p, 14q ve 17q bölgeleri de incelenmiştir. Bu bölgeler içerisinde 5q bölgesinde %12, 8p bölgesinde %8, 11p bölgesinde %2, 14q bölgesinde %4, 17q bölgesinde %6 oranında delesyon görülmüştür. 9p bölgesinde ise herhangi bir delesyon saptanmamıştır. Bu oranlar literatürde yayınlanmış çalışmalarla karşılaştırıldığında, elde ettiğimiz oranların daha düşük olduğu, fakat bu bölgelerin incelendiği yayın ve incelenen hasta sayılarının düşük olmasından ötürü kesin bir sonuca varılamamaktadır. Ayrıca bu çalışmalarda verilen oranlar birbirleriyle karşılaştırıldığında farklılık göstermektedir. Shin J.H. ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada akciğer kanserli 13 vakada %100 oranında 5q'nun değişik bölgelerinde heterozigozite kaybı gösterirken, başka bir çalışmada Yan WS. ve arkadaşları bu oranı %53.8 olarak saptamışlardır (60,81). Bu farklılıkların temelinde kullanılan yöntemin farklı olması, hasta sayısındaki değişkenlik, çalışılan hastaların klinik, histopatolojik, demografik özelliklerinin farklı olması gösterilebilir.

### 5.3. MLPA'NIN KULLANILABİLİRLİĞİ:

MLPA yöntemi ülkemiz ve dünya için oldukça yeni bir yöntemdir. MLPA ile yapılmış çalışmalar henüz son 2-3 yıl içerisinde literatürde yayınlanmaktadır. Bu nedenle MLPA ile yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin, karşılaşılan sorunların, yöntemin güvenilirliğinin daha net anlaşılabilmesi için benzer çalışma sayılarının artması gerekmektedir.

MLPA'yı multiplex gen dosaj analizi yapabilen, PCR temelli, tek reaksiyonda 50'ye yakın gen bölgesi inceleyebilen kolay bir yöntem olarak tanımlayabiliriz. Yöntem 4 ana basamaktan oluşmaktadır.

İlk 2 basamak denetürasyon ve hibridizasyon basamaklarından oluşmaktadır. Denetürasyonda DNA ilk olarak 94°C'de 5 dakika denetürasyona bırakılmıştır. Kit protokolüne göre; problemlerin hedeflerine hibridizasyonunun hemen hemen 12 saatten sonra tamamlandığı ve hibridizasyon periyodunun 12 ile 24 saat arasında herhangi bir sürede olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda, 16 saat hibridizasyon süresi uygulanmıştır ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu basamaklarda karşılaştığımız en önemli problem buharlaşmadır. Final hacim 8 µl gibi düşük hacimde olduğundan buharlaşma durumunda yanlış sonuçlar, kalitesiz pik görüntüleri elde edilebilir. Bu nedenle çalışmamızda buharlaşmayı önlemek amacıyla mineral yağ kullanılmıştır. Hibridizasyona bırakılacak örneklerin üzerine 5 µl yağ konularak bu problem çözülmüştür. Bu çözüm daha sonra MLPA'nın üretici firması tarafından da protokollere eklenmiştir.

Kit protokolüne göre; ilk kullanımdan önce kit ile sağlanan tüplerin (DNA polimeraz ve ligaz hariç) bir kaç saniye süre ile vortekslenmesi tavsiye edilmektedir. MLPA tamponunun tuz ve diğer bileşenlerden oluşan yüksek bir konsantrasyona sahip olduğuna dikkat edilmelidir. MLPA tamponu genellikle -20 °C de donacaktır, bazen sıvı

olarak da kalabilmektedir. Çalışmamızda bu tavsiyeye uyulmuş ve başarılı sonuç alınmıştır.

MLPA tekniğinde diğer bir önemli basamak ligasyon basamağıdır. Bu basamakta hibridizasyonu gerçekleşen problemler hedef dizilerinde birleşirler. Hedef dizilerde delesyon mevcut ise tam anlamıyla hibridizasyon olmayacağından ligasyon işlemi gerçekleşmez. Protokole göre, 98°C ligaz inaktivasyon işleminden sonra, örnekler 4°C de bir haftaya kadar saklanabilir. Daha uzun süreler için -20°C de saklanması tavsiye edilmektedir. Çalışmamızda ligasyon ürünleri ile ilgili bu tavsiyelere uyulmuş ve sonuç elde edemediğimiz örneklere ait ürünler PCR aşaması için tekrar kullanılmıştır. Bu tekrar kullandığımız örneklerden başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Yöntemi temelini oluşturan basamak PCR basamağıdır. Bu yöntemin diğer yöntemlere göre öne çıkaran nokta, tek bir primer çiftinin kullanılmasıyla birçok gen bölgesinin aynı anda incelenebilmesidir. Kit protokolüne göre, MLPA PCR ürünlerinde kullanılmış mikropipetlerin MLPA reaksiyonlarının diğer basamaklarında hiç bir zaman kullanılmamalıdır. PCR'dan sonra, tüpler termal cyclerin yakınında açılmamalıdır. Çalışmamızda kontaminasyonu önlemek amacı ile bu tavsiyelere uyulmuş ve örneklerimizin hiçbirinde kontaminasyon görülmemiştir.

Protokolde; ligasyon ürününe polimeraz miksinin ilave edilmesinden sonra mümkün olan en kısa zamanda PCR'ın başlatılması önerilmiştir. Bu tavsiyeye uymak üzere çalışmamızda; uygulama kolaylığı ve zaman kazanma açısından avantaj sağlaması amacı ile örnek sayısına yeterli gelecek şekilde su, PCR tamponu ve polimeraz miksinden oluşan solüsyon hazırlanarak, tüm tüplere dağıtılmış ve sonra ligasyon ürünlerini ilave edilerek PCR reaksiyonu kısa sürede başlatılabilmüş ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

MLPA yönteminde, PCR döngülerinin protokolde tavsiye edilen sayısı 35'tir. Ancak yine protokole göre çoğu kullanıcı için 33 döngü yeterli olabilmektedir ve birçok kullanıcı döngü sayısını 30'a düşürebilmektedir. Sadece 10-20 ng insan DNA sı içeren DNA örnekleri, PCR döngü sayısının 37'ye çıkarılmasını gerektirebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz DNA miktarları bu oranlar arasında olduğundan, PCR için örneklerimizde 38 döngü uygulanmıştır.

Kit protokolüne göre; PCR ürünleri 4°C de en az bir hafta süresince saklanabilir. Kullanılan floresan etiketleri ışığa duyarlı oldukları için PCR ürünleri karanlık bir kutuda saklanmalı veya alüminyum folyoya sarılmalıdır.

Kit protokolüne göre; bütün kitler için tek çift primer kullanıldığından MLPA tekniği, PCR bulaşma problemlerine sıradan PCR reaksiyonlarına göre daha fazla hassastır. Çalışmamızda DNA ekstraksiyonu, prob hibridizasyon işlemi ve PCR farklı odalarda yapılmıştır ve pipet sterilizasyonuna azami dikkat gösterilmiştir. Çalışmamızda kontaminasyon problemine rastlanmamıştır.

Çalışmamızda karşılaştığımız veya MLPA tekniği çalışılırken karşılaşılabilecek bazı problemler ve çözümleri şunlardır:

1. PCR ürünleri kapiller elektroforez cihazında yürütülürken hiç bir pik alınamıyorsa; molekül ağırlığı işaretleyicisinin (size standart) reaksiyona eklendiğinden emin olunması, kapiller ve elektroforez şartlarının kontrol edilmesi tavsiye edilmiştir. Cihaz ile ilgili bazı problemler, örneğin kapillerin tıkanması da bu duruma yol açabilmektedir. Çalışmamızda bazı deneylerde bu problemle karşı karşıya kaldık. Problem yeni kapillerin kullanılması ve cihazın tekrar temizlenmesiyle çözüldü.

2. Kit prosedüründe belirtildiği gibi; dört kontrol fragmanının görünür halde olduğunu kontrol edilmelidir. Her SALSA araştırma (prob) miksi, ligasyon yapılmaya bile 64, 70, 76 ve 82 nt fragmanlarını amplifiye edeceği bildirilmiştir. Bu bantlar, MLPA için 50 ng dan fazla insan DNA sı kullanıldığı zaman küçük olacaktır. Protokolde, bu bantlar beklenen MLPA amplifikasyon ürünlerinden daha güçlü ise, ya ligasyon reaksiyonunun başarısız olduğu ya da örnek DNA miktarının tavsiye edilen

minimum miktar olan 20 ng'den çok daha az olabileceği bildirilmiştir. Her iki durumda da elde edilen sonuçlar güvenilir olmayabilecektir. Protokolde bildirildiği üzere ligasyona bağlı olan kontrol miksi tarafından 94 nt lik bir beşinci bant (sentetik kontrol probu piki) üretilmektedir. Bu, insan IL1B genine özel bir sentetik MLPA probunun amplifikasyon ürünüdür. Bu bant, beklenen MLPA amplifikasyon ürünlerinin çoğuyla benzer pik alanlarına sahip olmalıdır. Çalışmamızda bu internal kontrol sistemi büyük kolaylık sağlamıştır. Bu kontrol pikleri ile kullandığımız DNA' nın miktarının yeterli olup olmadığı tayin edilebilmiştir. Düşük pik alınan örneklerde çalışma tekrar edilmiştir.

3. Protokole göre primer pikleri mevcut, fakat kontrol fragmanı ve prob amplifikasyon ürünleri yok ise; PCR reaksiyonunun başarısız olarak yorumlanması gerektiği bildirilmiştir. Bu durumda aynı ligasyon reaksiyon ürünü kullanarak, örneğin farklı bir thermal cycler kullanımıyla, PCR reaksiyonunun tekrarlanması tavsiye edilir. Böyle bir problemle karşılaşıldığından çalışmayı tekrar hibridizasyon basamağından başlatmak, kit kaybına yol açacaktır. Yöntemde hibridizasyon güçlü bir şekilde olduğundan bu basamakta çok hata görülmemektedir. Bu nedenle çözüm çalışmayı tersten takip ederek olmalıdır. Ve PCR ürünleri tekrar okutulmalı, yine pikler düşük veya yok ise PCR ligasyon ürünleriyle tekrar yapılmalıdır.

DQ bantları görünüyor, fakat sinyaller zayıf ise (pik alanları düşük ise); protokole göre, PCR reaksiyonunun tüpleri bir başka 4 döngü için termal cycler'a yerleştirilebilir veya aynı ligasyon reaksiyonlarını kullanan (fakat 36-40 döngü ile) yeni bir PCR yapılabilir.

Protokolde bildirildiğine göre; farklı örnekler arasında göreceli pik alanlarında büyük farklar varsa; bu DNA hazırlıklarındaki bozukluklardan kaynaklanabilir. Daha az miktarda örnek kullanılması problemi sıklıkla çözmektedir. Bu duruma başka bir sebep ise, kapiller elektroforezde floresan tespit aygıtının doyması ile sonuçlanan kapillerin fazla yüklenmesidir. Elektroforez sırasında tamamlanmamış denatürasyon, geniş piklere (özellikle daha uzun fragmanların pikleri) neden olabilir. Çalışmamızda böyle bir problemle karşılaşılmamıştır.



Protokolde bildirildiğine göre; daha uzun problarda kısa olanlara göre daha düşük pik alanlarının görülmesinin birçok nedeni olabilir. DNA örneğinin hacmi + prob miksi + MLPA tamponu (buffer) 8 µl dır. 16 saat hibridizasyon reaksiyonu süresince buharlaşma, ısıtılmış kapak (lid) nedeniyle düşüktür. Genel olarak, bu 16 saat inkübasyondan sonra tüpün dibinde 6-6.5 µl den daha fazla sıvı kalır. Eğer hacim, örneğin tüplerin kötü kapatılmasından, yanlış ısıtılmış kapak sıcaklığı vb. nedenlerden dolayı, 5 µl den düşük ise, amplifikasyon ürününün arttırılmış uzunluğu ile birlikte pik yüksekliklerinin kaybolması meydana gelebilir. Çalışmamızda, bazı tüplerdeki sıvının tamamının buharlaştığı görüldüğünden, hibridizasyon aşamasında buharlaşma nedeni ile meydana gelebilecek kayıpları önlemek için tüplere mineral yağ eklenmiştir ve bu sebeple doğabilecek problemler önlenmiştir.

#### **5.4. MLPA’NIN AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI:**

Yöntem PCR tabanlı, uygulaması kolay, bir tek reaksiyonda en az 40 genomik DNA sekansının kopya sayısını belirleyebilmektedir. Çalışmada 20 ng insan DNA’sı yeterli olmaktadır. Bu nedenle kısıtlı DNA ile yapılacak çalışmalarda büyük avantaj sağlayacaktır. Piyasada kullanılan bazı hazır kitlerde çok yüksek DNA miktarları gerekmektedir. MLPA bu bakımdan özellikle kısıtlı doku veya başka bir örnekle çalışacaklar için büyük kolaylık sağlayacaktır.

Yöntemin hassasiyeti üretici firma tarafından tek nükleotid farklılığını bile ayırabilir düzeyde olduğunu söylese bile probun bağlanma bölgesine göre bu 2-3 baz oynayabilmektedir.

Yalnızca bir termal cycler ve sekans tip elektroforez cihazı MLPA tekniğinin yapılabilmesi için yeterlidir. Bu cihazlar bugün için birçok laboratuarda bulunan cihazlardır.

## PDF Eraser Free

Birçok uygulama için aynı protokolün uygulanması yöntemin kullanılabilirliğinde büyük kolaylık sağlamaktadır. Verilen protokoller oldukça net ve kolay uygulanan protokollerdir. Örnek sayısı ile değişmekle birlikte ortalama olarak sonuçlara 24 saatte ulaşılabilmektedir. Bu süre incelenen bölgelerin çokluğu düşünüldüğünde, aynı işlemi yapabilecek farklı tekniklere göre oldukça kısa bir süredir.

Tüm kimyasallar sıvıdır ve birçok uygulama için sabittirler. Bu sayede hem kullanımları kolay hem de kalite kontrolü daha rahat yapılabilmektedir.

Yöntemin en önemli avantajlarından biriside yaptığı iş düşünüldüğünde toplam maliyetin oldukça düşük olmasıdır.

Yöntemin dezavantajlarını inceleyecek olursak öncelikle sonuçlar örnek kalitesi ile direkt ilişkilidir. Kullanılan DNA kaynağına göre sonuçlar arasında farklılıklar görülebilir. Kandan elde edilen DNA ile çalışıldığında elde edilen pik kalitesi ile dokudan elde edilmiş pik kalitesi arasında farklılıklar oluşmaktadır. Bizim çalışmamızda tümör dokusundan elde edilmiş DNA'lara ait pik görüntüsü ile aynı hastaya ait tümör dokusu içermeyen komşu akciğer dokularından elde edilen pik görüntüleri arasında bile farklılıklar oluşmuştur. Bu nokta da karşılaştığımız en önemli problem, DNA miktarı düşük örneklerde genel pik düşüklüğü ve örneklerdeki sonlara doğru meydana gelen pik düşmeleridir. Bu problemin çözümünde dokudan tekrar daha yoğun DNA elde edilerek çalışmanın tekrar edilmesi olmuştur.

Yöntemin bir diğer dezavantajı tüm triploidileri ve dengeli translokasyonları tarayamamasıdır. Ayrıca bu teknikle mozaik durumlar ayırt edilememektedir. Özellikle kanser çalışmalarında, prenatal tanılarda bu önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Kullanılan kitler tanısal amaçlı değil araştırma amaçlı üretilmiştir. Bunun nedeni henüz ISO sertifikasının ve CE belgesinin olmamasıdır.

### **5.5. MLPA’NIN AKCİĞER KANSERİ ARAŞTIRMALARINDA KULLANIMI:**

MLPA tekniği uygulaması kolay ve diğer tekniklere göre daha ucuz bir yöntemdir. Üretici firma tarafından sürekli geliştirilen bir ürün yelpazesi vardır. Bu yeni ürünlerin gelişimde en önemli kriter, talebin olmasıdır. Piyasadaki kitlerin çeşitliliğinin genişlemesi ve güvenirliliğinin artması yapılan çalışma sayısındaki artışa bağlı olacaktır.

Literatürde akciğer kanserine yönelik MLPA tekniğinin kullanıldığı bir çalışma yayınlanmamıştır. Bizim çalışmamız bu nedenle bir ilk olma özelliğindedir. Bu nedenle elde ettiğimiz verileri, literatürde yayınlanmış farklı yöntemlerle yapılan çalışmalarla karşılaştırabildik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bazı verilerin, literatürdeki verilerle uyuşmamasının en önemli nedenlerinden birinin bu olduğunu düşünmekteyiz.

Akciğer kanserinde görülen genomik değişiklikler oldukça geniş bir skalada yer almaktadır. Bu değişimler tek nükleotid değişimlerinden, kromozomal artma veya azalmaya kadar değişmektedir. Bu nedenle akciğer kanserinin genetik etyolojisini araştırmak oldukça zor olmaktadır. Kanser araştırmalarında bugün için kullanılan, rutin sitogenetik analizler, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (KGH) ve bu yöntemlerde daha hassas olan moleküler yöntemler çalışmaların büyük çoğunluğunu oluştırmaktadır. Moleküler yöntemler içerisinde mikrosatellit analizleri, dizi analizleri, restriksiyon enzim kesimleri akciğer kanserlerinin araştırılmasında ön plana çıkmaktadır. Ayrıca akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş birçok gen ve yine birçok aday gen bulunmaktadır. Tüm bunlar akciğer kanserine yönelik çalışmaları zorlaştırmaktadır.

MLPA’nın akciğer kanserine yönelik dizayn ettiği ve bizim çalışmamızda kullandığımız P126 ve P127 kitleri, akciğer kanserindeki daha büyük genomik değişimlerin saptanması amacıyla dizayn edilmiştir. Probların hazırlanmasında

literatürde ön plana çıkmış kromozomal bölge değişiklikleri dikkate alınmıştır. MLPA yönteminin hassasiyeti tek bazlık değişimleri bile saptayabildiği halde bu kitlerin dizaynı genelde gene yönelik değil, kromozomal değişimlere yöneliktir. Bunun en önemli nedeni, tek çalışmada daha fazla bölgenin taranmasının istenmesidir. Yine tekniğin farklı tümör baskılayıcı genlere yönelik, gendeki değişimleri daha geniş inceleyebilecek kitleri mevcuttur. Bu nedenle elde edilen veriler daha yüzeysel verilerdir. Ayrıca akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş daha birçok kromozomal bölge olmasına karşın, bu bölgeler kitte yer almamaktadır. Bu bölgeler içinde 1p, 1q, 4p, 4q, 6p, 6q, 8q, 16p ve 18p bölgeleri sayılabilir. Ama yinede mevcut kitlerle akciğer kanserine yönelik önemli değişimler incelenebilmektedir.

Sonuç olarak akciğer kanserindeki genomik değişimlerin büyük çoğunluğu MLPA yöntemiyle incelenebilmektedir. Ve bu çalışma düşük bir maliyette ve zamanda yapılabilir. Elde edilen veriler ile daha sonra farklı kitler kullanılarak gene spesifik değişimler araştırılabilir ve detaylı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca mevcut kitte bulunan bölgelere ilave proplar hazırlanarak incelenen bölgeler genişletilebilir. MLPA tekniği son dönemlerde geliştirilen en önemli moleküler tekniklerden birisidir ve kanser taramalarında da rahatlıkla kullanılacak bir yöntemdir.

## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

KHDAK'lerinde, parafine gömülü tümör dokularında ve çevre akciğer dokularındaki genomik değişimlerin MLPA yöntemiyle incelenmesi amaçlanan bu çalışmada, parafine gömülü 100 tümör ve 100 çevre dokusu MLPA yöntemiyle incelenerek, elde edilen bulgular hastaların klinik ve demografik özellikleri ile karşılaştırıldı. Yine çalışmamızda saptanan sonuçların literatür ile uyumları karşılaştırıldı.

Başarılı bir MLPA çalışması için kullanılacak DNA miktarının ve kalitesinin önemli olduğu çalışmamızda da gösterilmiştir. Parafine gömülü dokulardan DNA elde ederken karşılaşılan problemler değerlendirmiş ve mevcut protokoller üzerinde modifikasyonlar uygulanarak bu problemler çözülmüştür. Düzenlenen bu son parafine gömülü dokulardan DNA elde etme protokolü ile çalışmamızda kullanılacak bütün dokulardan MLPA yöntemi için uygun kalitede ve miktarda DNA elde edilmiştir.

Çalışmamızda uyguladığımız MLPA yöntemi, ülkemiz ve dünya için yeni bir teknik olup, kısaca MLPA'yı multiplex gen dosaj analizi yapabilen, PCR temelli, tek reaksiyonda 50'ye yakın gen bölgesi inceleyebilen kolay bir yöntem olarak tanımlayabiliriz. Yöntemin kısa sürede bu kadar çok gen bölgesini inceleyebilmesi çalışmamızda da süre ve incelenen bölgeler açısından büyük kolaylık sağlamıştır.

Yaptığımız incelemelerde akciğer kanserli tümöral dokularda en sık 2p, 3p, 13q, 17p ve 16p delesyonları, yine tümöral dokulardan yapılan çalışmalarda 17q, 8p ve 5q amplifikasyonları görülmüştür. 9. kromozomun p bölgesine yönelik prob bölgelerinde herhangi bir delesyon veya amplifikasyon saptanmamıştır. Tümör çevresi akciğer dokularından yapılan çalışmalarda ise daha az sıklıkta olmak üzere tümöral alanlardakine benzer bölgelerde delesyonlar görülmüştür. Bu bölgelerde sadece 17q bölgesinde bir hastada amplifikasyon görülmüştür.

Ayrıca çalışmamızda bu bulgulara ilaveten özellikle tümöral dokularda 5q, 8p, 9q, 10p, 11p, 11q, 12p, 14q, 17q ve 21q prob bölgelerinde de delesyon saptanmıştır. Elde edilen veriler, genellikle literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Bazı prob bölgelerinde saptanan delesyon oranlarının literatürde verilen oranlarda farklılık göstermesinin sebebi olarak kullanılan yöntemin farklı olması, hasta sayısındaki değişkenlik, çalışılan hastaların klinik, histopatolojik, demografik özelliklerinin farklı olması gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada squamöz hücreli karsinomlarda 3p delesyonu, adenokarsinoma göre istatistiksel açıdan anlamlı bir oranda yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu veri literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Yine yapılan literatür çalışmaları sonucu çalışmamızda kullandığımız P126 ve P127 MLPA akciğer kanseri kitinin, incelenen bölgeler açısından daha da genişletilebileceği sonucuna vardık. Kullanılan bu kitlerin dizaynının genellikle akciğer kanserinde tanımlanmış daha büyük genomik değişimlere yönelik olduğu görülmüş, daha hassas veriler içinse yine MLPA yönteminin dizayn ettiği spesifik genlere yönelik diğer kitlerle veya yonteme alternatif microarray KGH gibi teknikler ile çalışmaların yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak MLPA yönteminin akciğer kanserlerinin genomik taramasında kullanılacak ucuz, hızlı ve güvenilir sonuçlar verebilecek bir teknik olduğu görülmüştür. MLPA tekniği son dönemlerde geliştirilen en önemli moleküler tekniklerden birisidir ve kanser genomik taramalarında da rahatlıkla kullanılacak bir yöntemdir. Literatürde akciğer kanserine yönelik MLPA tekniğinin kullanıldığı bir çalışma yayınlanmamıştır. Bizim çalışmamız bu nedenle bir ilk olma özelliğindedir. Elde ettiğimiz sonuçlar benzer çalışma yapacak pek çok araştırmacıya da kaynak oluşturacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Akbulut H., Akbulut, K.G., Karsinogenez, 1997, ANTIPAŞ. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, Ankara, 23-38 s.
2. Akbulut H., Akbulut, K.G., Büyüme Faktörleri, 1997, ANTIPAŞ. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, Ankara, 39-48 s.
3. Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Watson,J.D., The molecular biology of the cell, 1994, Third Edition, Garland Publishing Inc.,New York&London
4. Bienz, M., Clevers, H., Linking colorectal cancer to Wnt signaling.,2000, Cell, 103, 311–320 p
5. Boldrini, L., Calcinai, A., Samaritani, E., 2000, Tumour necrosis factor-a and transforming growth factor-a are significantly associated with better prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: putative relation with BCL-2 mediated neovascularization, Br J Cancer, 83, 480-486 p.
6. Bolon, I., Robert, C., Matrix proteases and transcription factors in the process of dissemination. In: Brambilla C, Brambilla E, eds. Lung tumors Fundamental biology and clinical management, 1999, Marcel Dekker Inc., New York, 399-422 p
7. .Classon, M., Harlow, E., 2002., The retinoblastoma tumour suppressor in devolpment and cancer, Nature Rev. Cancer, 2, 910-917 p.
8. Colasante, A., Mascetra, N., Brunetti M., 1997, Transforming growth factor- $\beta$ 1, interleukin-8 and , interleukin-1 in nonsmall cell lung tumors, Am J Crit Care Med, 156, 968-973 p.
9. Cooper, M., The cell,A molecular approach, 1997, ASM Press Washington, D.C.
10. Cox, T.M., Sinclair, J., Molecular Biology in Medicine, 1997, Blackwell Science
11. Cox, G., Jones, J.L., Andi A., 2001, A biological staging model for operabl non-small cell lung cancer, Thorax; 56, 561-566 p.
12. Dacic, S., Finkelstein, S.D., Yousem, A., 2005, Clonal selection of adenocarcinoma of the lung as determined by loss of heterozygosity, Experimental and Molecular Pathology, 78, 135-139 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

13. Dacic, S., Ionescu, D.N., Finkelstein, S., Yousem A.S., 2005, Patterns of allelic loss of synchronous adenocarcinomas of the lung, *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 7, 897-902 p.
14. Davidson, B.J., Hsu, T.C., Schantz, S.P., 1993, The genetics of tobacco induced malignancy, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119, 1198-1205 p.
15. Fernandes, A.M., Hamburger, A.W., Gerwin, B.I., 1999, Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells, *Cancer Letters*, 142, 55-63 p.
16. Field, J.K., Selection and validation of new lung cancer markers for the molecular-pathological assessment of individuals with a high risk of developing lung cancer. In: Brambilla C Brambilla E, eds. *Lung tumors fundamental biology and clinical management*, 1999, Marcel Dekker Inc., New York, 287-302 p.
17. Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D., 1999, Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118, 1136-1152 p.
18. Fong, K.M., Minna, J.D., 2002, Molecular biology of lung cancer: clinical implication. *Clinics In Chest Medicine*, 23, 83-101 p
19. Foster, N.A., Banerjee, A.K., Xian, J., Roberts, I., Pezzella, F., Coleman, N., Nicholson, A.G., Goldstraw, P., George, J.P., Rabbitts, P.H., 2005, Somatic genetic changes accompanying lung tumor development., *Genes Chromosomes Cancer.*, 44, 1, 65-75 p.
20. Franks, L.M., Teich, N.M., *Cellular and molecular biology of cancer*, 1998, Thied edition, Oxford Uni. Press
21. Gelehrler, T.D., Collins, F.S., Ginsburg, D., *Principles of Medical Genetic*, Second Edition, 1998
22. Gemill, R.M., Drabkin, H.A., Chromosome 3p loss in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA, eds., *Biology of lung cancer.*, Marcel Dekker Inc., 1998 New York, 465-501 p.
23. Geoffey, M.C., Hausman, E.R., *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, 2006, (Çev.: Sakızlı M., Atabey N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 592-640 s.
24. Grenle, R.T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A., 2000, Cancer statistics 2000.CA, *Cancer J.Clin.*, 50, 7-33 p.



## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

25. Groeger, A.M., Odocha, O., Mueller, M.R., 1997, Racial variation in lung cancer. *Anticancer Research*, 17, 2843-2848 p
26. Groeger, A.M., Esposito, V., Mueller, M.R., 1997; Advances in the understanding of lung cancer, *Anticancer Research*, 17, 2519-2522 p.
27. Güneş, H.V., *Moleküler Hücre Biyolojisi*, 2003, Kaan Kitabevi, Eskişehir, 350-353 s.
28. Hasegawa, Y., Takanashi, S., Kanehira, Y., 2000, Transforming growth factor- $\beta$ 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma, *Cancer*, 91, 964-971 p.
29. Hastürk, S., Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi. In: Hastürk S, Yüksel M eds, *Akciğer Kanseri*, 2000, İstanbul, 1-27 s.
30. Hesketh, R.E., *The Onkogene and Tumor Suppressor Gene Facts Book*, 2d ed. 1997, Academic Pres.
31. Hussain, S.P., Haris, C.C., 2000, Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens, *Mutation Research*, 311-322 p.
32. <http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/kansergenetikaekmekci.htm>
33. Jacobson, D.R., Ras mutations in lung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E, eds. *Lung tumors fundamental biology and clinical management*. 1999, Marcel Dekker Inc., New York, 139-156 p.
34. Janknecht, R., 2002, The versatile function of the transcriptional coactivators p300 and CBP and their roles in disease, *Histol. Histopathol.*, 17, 657-668 p.
35. Karlıkaya, C., *Akciğer Kanseri Ders Notları*, 2005
36. Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hiramata, C., Kitabayashi, I., Minna, J.D., Takenoshita, S., Yokota, J., 2005, Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer, *Clinical Cancer Research*, 11, 512-519 p.
37. Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C., 2003, Akciğer kanseri moleküler biyolojisi, *Solunum*, 5, 127-138 s.
38. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., *Robbins Temel Patoloji*, 2003, (Çev: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-195 s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Kwong, F.M., Wong, S.P., Lung, M.L., 2003, Genetic alterations detected on chromosomes 13 and 14 in Chinese non small cell lung carcinomas, *Cancer Letters*, 192, 189-198 p.
40. Lecture, G.F.F., 1996, Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors, *Chest*, 109, 14-19 p.
41. Lei, W., Mayotte, J.E., Levitt, M.L., 1998, Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in nonsmall cell lung cancer cells, *Anticancer Research*, 19, 221-228 p.
42. Levin, W.J., Casey, G., Ramos, J.C., 1994, Tumor suppressor and immediate early transcription factor genes in nonsmall cell lung cancer, *Chest*, 106, 372-376 p.
43. Mabry, M., Activating oncogenes in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA, eds. *Biology of lung cancer*, 1998, Marcel Dekker Inc., New York, 391-412 p
44. Manenti, G., Gregorio, D.D., Pilotti, S., Falvella, F.S., Incarbone, M., Ravagnani, F., Pierotti, M.A., Dragani, T.A., 1997, Association of chromosome 12p genetic polymorphism with lung adenocarcinoma risk and prognosis, *Carcinogenesis*, 18, 10, 1917-1920 p.
45. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Thompson&Thompson *Tıbbi Genetik*, 2005, Güneş Kitabevi, 312-313 s.
46. Panagopoulos, I., Fioretos, T., Isaksson, M., 2001, Fusions of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13), *Hum Mol Genet*, 10, 395-404 p.
47. Perez-Soler, R., Mendelson, J., Growth factor receptors as a target for therapy. In: Roth JA, Cox JD, Hong WK eds. *Lung cancer*. 2nd ed, 1998, Blackwell Science Inc., 309-341 p.
48. Petzmann, S., Ullmann, R., Klemen, H., Renner, H., Popper, H.H., 2001, Loss of heterozygosity on chromosome arm 11q in lung carcinoids, *Human Pathology*, 32, 3, 333-338 p.
49. Pifarre, A., Rosell, R., Monzo, M., De Anta J.M., Moreno, I., Sanchez, J.J., Ariza, A., Mate, J.L., Martinez, E., Sanchez, M., 1997, Prognostic Value of replication errors on chromosomes 2p and 3p in non small lung cancer, *Br J Cancer*, 75, 2, 184-189 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

50. Rabiasz, G.J, Langdon, S.P, Bartlett, J.M.S, 1992, Growth control by epidermal growth factor and transforming growth factor in human lung squamous carcinoma cells, Br. J. Cancer, 66, 254-259 p.
51. Raymond, E., Faivre, S., Armand, J.P., 2000, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy, Drugs, 60, 15-23 p.
52. Reissmann, P.T., Koga, H., Takahashi, R., Figlin, R.A., Holmes, E.C., Piantadosi, S., Cordon-Cardo, C., Slamon, D.J, 1993, Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non small cell lung cancer, Oncogen, 8, 1913-1919 p.
53. Robert, K.M, Peter, A.M., Granner, D.K, Rodwell, V.W., Harper' s Biochemistry, 1990, Appleton and Lange, 819-820 p.
54. Roth, J.A., 1994, Molecular events in lung cancer, Lung Cancer;10, 3-15 s.
55. Sasaki, K., Kawauchi, S., 2003, Molecular cytogenetic analysis of solid tumors, J. Orthop. Sci., 8, 457-459 p.
56. Sato, M., Takahashi, K., Nagayama, K., Arai, Y., Ito, N., Okada, M., Minna, D.J., Yokota, J., Kohno, T., 2005, Identification of Chromosome Arm 9p as the Most Frequent Target of Homozygous Deletions in Lung Cancer, Genes Chromosomes&Cancer, 44, 405-414 p.
57. Sato, S., Nakamura, Y., Tsuchiya, E, 1994, Difference of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung, Cancer Res., 54, 5652-5655 p.
58. Schouten, J.P., McElgunn, C.J, Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G., 2002, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, Nucleic Acids Research, 30-57 p.
59. Scalfani, R.A, Schaurer, I.E, Langan, T.A., Alterations in cell cycle control in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA , eds. Biology of lung cancer, 1998, Marcel Dekker Inc., New York, 295-315 p.
60. Shin, J.H., Kang, S.M., Kim, Y.S., Shin, D.H., Chang, J., Kim, S.K., Kim, S.K., 2005, Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 5 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma, Chest, 128, 4, 2999-3003 p.
61. Siegfried, S.M., 1999, Biology and chemoprevention of lung cancer, Chest, 113, 1, 40-45 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

62. Siegfried, J.M, Demichele, M.A.A, Davis, A.G, Growth factors and receptors in non small cell lung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E, ed. Lung tumors fundamental biology and clinical management, 1999. Marcel Dekker Inc., New York, 317- 336 p.
63. Slater, H.R, Bruno, D.L, Ren, H., Pertile, M., Schouten, J.P, Choo, K.H.A, 2003 Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA), J. Med. Genet., 40, 907–912 p.
64. Sozzi, G., Deletions of the short arm of chromosome 3 and the FHIT gene in ung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E, eds.Lung tumors fundamental biology and clinical management
65. Spivack, S.D., Fasco, M.J., Walker, V.E., Kaminsky, L.S., 1997, The molecular epidemiology of lung cancer, Crit. Rev. Toxicology, 27, 319-365 p.
66. Takamochi, K., Ogura, T., Suzuki, K., Kawasaki, H., Kurashima, Y., Yokose, T., Ochiai, A., Nagai, K., Nishiwaki, Y., Esumi, H., 2001, Loss of heterozygosity on chromosomes 9q and 16p in atypical adenomatous hyperplasia concomitant with adenocarcinoma of the lung, Am.J.Patho., 159, 5, 1941-1948 p.
67. Takanami, I., Imamura, T., Hashizume, T., 1996, Expression od PDGF, IGF-II, bFGF and TGF- $\beta$ 1 in pulmonary denocarcinoma.Path Res Pract, 192, 1113-1120 p.
68. Takanami, I., Tanaka, F., Hashizume, T., 1997, Roles of transforming growth factor- $\beta$ 1 and its type I and II receptors in the development of a pulmonary adenocarcinoma: results of an immunohistochemical study, J. Surg. Oncol., 64, 262-267 p.
69. Takanami, I., Tanaka, F., Hashizume, T.,. 1997, Transforming growth factor- $\beta$  isoforms expressions in pulmonatry adenocarcinomas as prognostic markers. Oncology, 54, 122-128 p.
70. Takashi, K., Kawanishi, M., Matsuda, S., Ichikawa, H., Takada, M., Ohki, M., Yamamoto, T., Yokota, J., 1998, Homozygous deletion and frequent allelic loss of the 21q11.1-q21.1 region including the ANA gene in human lung carcinoma, Genes Chromosomes Cancer, 21, 236-243 p.
71. Tanaka, R., Wang, D., Morishita, Y., Inadome, Y., Minami, Y., Lijima, T., Fukai, S., Goya, T., Noguchi, M., 2005, Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma, American Cancer Society, 103 ,3 , 608-615 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

72. Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., 1990, Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung, *Cancer Research*, 50, 7077-7080 p.
73. Tchia, M.M., Holmes, M.D., McLennan, G., 1991, The molecular biology of lung cancer, *Med. J. Australia*, 154, 501-503 p.
74. Testa, J.R., Siegfried, J.M., Lin, Z., Hunt, J.D., Feder, M.M., Litwin, S., Zhou J.Y., Taguchi, T., Keller, S.M., 1994, Cytogenetic analysis of 63 nonsmall cell lung carcinomas: Recurrent Chromosomes alterations amid frequent and widespread genomic upheaval, *Genes Chromosomes Cancer*, 11, 178-194 p.
75. Uchiyama, M., Usami, N., Kondo, M., Mori, S., Iro, M., Iro, G., Yoshioka, H., Imaizumi, M., Ueda, Y., Takahashi, M., Minna, J.D., Shimokata, K., Sekido, Y., 2003, Loss of heterozygosity of chromosome 12p does not correlate with KRAS mutation in non small cell lung cancer, *Int.J.Cancer*, 107, 962-969 p.
76. Wei, Q., Spitz, M.R., 1997, The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer A review, *Cancer and Metastasis, Reviews*, 16, 295-307 p.
77. WHO “ World Cancer Report”, 2003, Genova (<http://www.who.int/cancer/en/>)
78. William, S.K., Cummings, M.R., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636 s.
79. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)
80. [www.saglik.gov.tr](http://www.saglik.gov.tr)
81. Yan, W.S., Song, L.Y., Wei, W.D., Li, A., Liang, Q.W., Liu, J.H., Fang, Y., 2005, Chromosomal imbalance in primary lung squamous cell carcinoma and their relationship with smoking, *Ai Zheng*, 24, 1, 47-52 p.
82. Yoshino, I., Osoegawa, A., Yohena, T., Kameyama, T., Oki, E., Maehara, Y., 2005, Loss of Heterozygosity (LOH) in non small cell lung cancer: difference between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, *Respiratory Medicine*, 99, 308-312 p.

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Emre TEPELİ  
Doğum Tarihi ve Yeri : 10. 01. 1978 Denizli  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Durumu : Evli  
İletişim Adresleri  
:Mehmetçik Mah. 1299 sok. No: 9 DENİZLİ  
:[emre\\_tepeli@yahoo.com](mailto:emre_tepeli@yahoo.com)  
:0.532.547 35 98

### Eğitim Durumu:

İlkokul : Denizli Hürriyet İlkokulu-1988  
Ortaokul : Denizli Atatürk Ortaokulu-1991  
Lise : Özel İzmir Fen Lisesi-1994  
Üniversite : Pamukale Üniversitesi Tıp Fakültesi-2001

### Üye Olunan Bilisel Kuruluşlar:

:Tıbbi Genetik Derneği  
:Türkiye Hemofili Derneği