



**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİNDE
“EXCISION REPAIR CROSS-COMPLEMENTING GROUP-1”
(*ERCC1*) GENİ T19007C VE C8092A TEK NÜKLEOTİD
POLİMORFİZMLERİNİN KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELERLE İLİŞKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Esin KOÇ

**Ağustos 2010
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Esin KOÇ tarafından, Yrd. Doç. Dr. Vildan CANER yönetiminde hazırlanan “**Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanselerinde “Excision Repair Cross-Complementing Group 1” (ERCC1) Geni T19007C ve C8092A Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilerinin Belirlenmesi.**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hasan ACAR
Jüri Başkanı

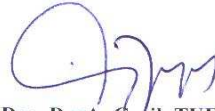


Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Vildan CANER
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.12.10 tarih ve 2010/16-2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. A. Cevik TUFAN
Müdür

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİNDE
‘EXCISION REPAIR CROSS-COMPLEMENTING GROUP 1’
(*ERCC1*) GENİ T19007C VE C8092A TEK NÜKLEOTİD
POLİMORFİZMLERİNİN KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELERLE İLİŞKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Esin KOÇ

Danışman: Doç. Dr. Vildan CANER

**Ağustos 2010
DENİZLİ**

Yüksek Lisans Tezi Onay Formu

Esin KOÇ tarafından Doç. Dr. Vildan CANER yönetiminde hazırlanan “**Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde “Excision Repair Cross-Complementing Group 1” (ERCC1) Geni T19007C ve C8092A Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilerinin Belirlenmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Hasan ACAR
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Vildan CANER
Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... tarihsayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Tezim süresince bana yardım eden başta danışman hocam Doç. Dr. Vildan CANER olmak üzere, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya ve diğer öğretim üyelerine, birlikte çalıştığımız arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim. Ayrıca tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne de teşekkür ederim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe, ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı: Esin KOÇ

ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİNDE “EXCISION REPAIR CROSS-COMPLEMENTING GROUP 1” (*ERCC1*) GENİ T19007C VE C8092A TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Koç, Esin

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Vildan CANER

Ağustos 2010, 69 sayfa

Kanser gelişimi çok aşamalı bir olaydır ve bugüne kadar elde edilen verilerle, akciğer karsinogenez sürecinde başlıca tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve “Excision Repair Cross-Complementing Group 1” (*ERCC1*)’in de içinde yer aldığı DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler olmak üzere farklı türdeki genlerin etkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC)’nde *ERCC1* mRNA stabilitesini etkiledikleri bilinen T19007C (rs11615) ve C8092A (rs3212986) tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) belirlenmesi ve bu polimorfizmlerin yaş, cinsiyet, sigara içimi, TNM evre ve histolojik tip olmak üzere klinikopatolojik parametrelerle olası korelasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, histopatolojik olarak incelenen ve NSCLC tanısı alan 80 olguya ait formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş arşiv doku örnekleri kullanılmış ve T19007C ve C8092A SNP’leri gerçek-zamanlı PCR ile analiz edilmiştir. *ERCC1* geni T19007C SNP ile ilişkili TT, TC ve CC genotiplerinin dağılımı sırasıyla %40, %44, %16 olarak belirlenirken, C8092A SNP ile ilişkili CC, CA, AA genotiplerinin dağılımı sırasıyla %38, %51, %11 olarak belirlenmiştir. C8092A SNP’nin klinikopatolojik parametrelerle ilişkili olmadığı, ancak T19007C SNP’inin TNM evre ile anlamlı olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (p=0.046). Bu bulgular, T19007C SNP’ne özgü genotip dağılımının Avrupa popülasyonunda gözlenen dağılımla büyük bir benzerlik gösterdiğini ve aynı zamanda bu polimorfizmin NSCLC’nde progresyonla ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: *ERCC1*, C8092A ve T19007C SNP, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) , gerçek-zamanlı PCR

ABSTRACT**THE DETERMINATION OF RELATIONSHIP BETWEEN “EXCISION REPAIR CROSS-COMPLEMENTING GROUP 1”(ERCCI) GENE T19007C AND C8092A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS AND CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

Koç, Esin

M. Sc. Thesis in Department of Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Vildan CANER

August 2010, 69 Pages

The development of cancer is a multistep process and it has been reported that the different types of genes such as tumor suppressor genes, oncogenes and DNA repair genes including "Excision Repair Cross-Complementing Group 1" (*ERCCI*) are involved in human lung carcinogenesis. In this study, the determination of T19007C (rs11615) and C8092A (rs3212986) single nucleotide polymorphisms (SNP) thought to affect mRNA stability of *ERCCI* and the determination of any correlation between the profiles and clinicopathological parameters including age, sex, the history of smoking, TNM stage and histological subtypes were aimed.

In this study, the archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of 80 cases which were histopathologically diagnosed as non-small cell lung cancer were used and T19007C and C8092A SNPs were analyzed using real-time PCR. Regarding T19007A SNP, the distribution of TT, TC, and CC genotypes was 40%, 44% and 16%, respectively. As for C8092A SNP, the distribution of CC, CA, and AA genotypes was 38%, 51% and 11%, respectively. No relationship was observed between C8092A SNP and clinicopathological parameters, but T19007A SNP was significantly associated with TNM stage ($p=0.046$). This study indicated that T19007A SNP genotypes in this study was similar to those in Europe. It was also supported that the SNP may associated with tumor progression in NSCLC.

Key words: *ERCCI*, C8092A and T19007C SNP, non-small cell lung cancer (NSCLC), real-time PCR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İçindekiler	vi
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Akciğer Kanseri Tanımı	3
2.2. Akciğer Tümör Hücrelerinin Özellikleri	6
2.3. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji	9
2.4. Akciğer Kanseri Etiyoloji	11
2.5. Akciğer Kanseri Tipleri	15
2.5.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC)	16
2.5.2. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC)	16
2.6. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Histolojik Alt Tiplerin Dağılımı	19
2.7. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri TNM Sınıflaması	20
2.7.1. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde klinik evreler	22
2.8. Akciğer Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları	22
2.8.1. Protoonkogenler ve onkogenler	24
2.8.2. Tümör baskılayıcı genler	30
2.8.3. DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler	30
2.8.3.1. Kesip-çıkarma (Eksizyon) onarımı	31
2.8.4. Genetik varyasyonlar: mutasyonlar ve polimorfizmler	35
2.8.4.1. Excision repair-cross complementing group 1 (<i>ERCC1</i>) geni ve polimorfizmleri	37
3. MATERYAL VE METOD	40
3.1. Materyal	40
3.2. FFPE Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	40
3.2.1. Genomik DNA örneklerinin konsantrasyonlarının ve saflık değerlerinin belirlenmesi	41
3.3. Gerçek-zamanlı PCR (Real-time PCR)	42
3.4. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. NSCLC'li Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler	46
4.2. Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyonları ve Saflık Değerleri	50
4.3. Gerçek-zamanlı PCR ile T19007C SNP Analizi	51
4.4. Gerçek-zamanlı PCR ile C8092A SNP Analizi	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR	61
8. ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Solunum sisteminin anatomisi	4
Şekil 2.2 Akciğer kanseri patogeneziine özgü anatomik bölümler	5
Şekil 2.3 Dünya genelinde kanser insidans oranları	10
Şekil 2.4 Dünya genelinde kanser mortalite oranları	11
Şekil 2.5 Karsinogenez basamakları	23
Şekil 2.6 Akciğerin skuamöz hücreli karsinom patogenezi süresince birbirini izleyen histopatolojik ve moleküler değişimleri	24
Şekil 2.7 Hücre döngüsü yolağı	29
Şekil 2.8 DNA hasarına neden olan etmenler ve hücreyel yanıt	31
Şekil 2.9 Kanserin önlenmesinde genomun korunma mekanizmaları	32
Şekil 2.10 Nükleotid eksizyon onarımının evreleri	34
Şekil 2.11 ERCC1/XPF heterodimeri ve XPG'nin hasarlı DNA'yı sırasıyla 5' ve 3' bölgelerinden kesimi	35
Şekil 2.12 ERCC1 geninin lokalizasyonu	37
Şekil 4.1 NSCLC'li olguların cinsiyete göre dağılımları	48
Şekil 4.2 NSCLC'li olgulara ait sigara içen ve sigara içmeyen grupların dağılımı	48
Şekil 4.3 NSCLC'li olguların klinik evrelere göre dağılımı	49
Şekil 4.4 NSCLC'li olgulara ait histolojik alt tip dağılımı	49
Şekil 4.5 ERCC1 geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP analizine özgün amplifikasyon eğrisi	52
Şekil 4.6 ERCC1 geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP analizine özgün erime eğrisi	52
Şekil 4.7 ERCC1 geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP'ne özgü genotip dağılımı.....	53
Şekil 4.8 ERCC1 geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP'ne özgü genotipleri oluşturan allellerin dağılımı	53
Şekil 4.9 ERCC1 geni 3'UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan C8092A SNP analizine özgün amplifikasyon eğrisi	54
Şekil 4.10 ERCC1 geni 3'UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan C8092A SNP analizine özgün erime eğrisi	54
Şekil 4.11 ERCC1 geni 3'UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan C8092A SNP'ne özgü genotip dağılımı	55
Şekil 4.12 ERCC1 geni 3'UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan C8092A SNP'ne özgü genotipleri oluştururan allellerin dağılımı	55

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Sigaradan çıkan dumandaki toksinler	12
Tablo 2.2 2004 Dünya Sağlık Örgütü akciğer kanserleri sınıflandırılması- Malign epitelyal tümörler	18
Tablo 2.3 Akciğer kanserinin TNM sınıflaması için önerilen değişimler	21
Tablo 3.1 <i>ERCC1</i> T19007C SNP analizinde kullanılan primerlerin ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')	42
Tablo 3.2 <i>ERCC1</i> C8092A SNP analizinde kullanılan primerlerin ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')	43
Tablo 3.3 T19007C ve C8092A SNP analizi için hazırlanan reaksiyon karışımları...	43
Tablo 3.4 T19007C SNP için gerçek-zamanlı PCR protokolü	44
Tablo 3.5 C8092A SNP için gerçek-zamanlı PCR protokolü	45
Tablo 4.1 TNM evreleme sistemine göre klinik evrelerin belirlenmesi	46
Tablo 4.2 NSCLC hastalarına ait klinikopatolojik parametreler	47
Tablo 4.3 DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDK	Siklin bağımlı kinaz (CDK)
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERCC1	“Excision Repair Cross-Complementing Group 1”
FBF	Fibroblast büyüme faktörü
FFPE	Formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş
MYC	Avian myelositomatozis viral onkogen homoloğu
NER	Nükleotid kesip-çıkarma onarımı
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PI3K	Fosfoinositol 3 kinaz
Rb	Retinoblastom
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
TNF-α	Tümör nekroze edici faktör-alfa
UTR	“Untranslated Region” (Çeviri yapılmayan bölge)
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XPF	Xeroderma Pigmentozum Komplemantasyon Grup F

1. GİRİŞ:

Kanser gelişimi çok aşamalı bir olaydır. Meme ve kolon kanserleri gibi solid kanserlerde etyoloji, patogenez ve progresyonu aydınlatan birçok genetik mekanizma belirlenmiş olup, son yıllarda akciğer kanserinde de ilgili genetik mekanizmalar aydınlatılmaya başlanmıştır. Sigara içimi önemli bir faktör olmakla birlikte, sigara içenlerin sadece %20'sinde akciğer kanserinin görülmesi, genetik faktörlerin de akciğer kanserinin etyolojisinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Bugüne kadar elde edilen veriler akciğer karsinogenez sürecinde, başlıca tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve *ERCC1* gibi DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler olmak üzere farklı türdeki genlerin etkili olduğunu göstermiştir.

Nükleotid kesip-çıkarma onarımı (NER), oldukça sıkı korunmuş, çok yönlü ve güçlü DNA onarım yoludur. Memeli NER'in moleküler mekanizması oldukça komplekstir ve bu mekanizmada farklı fonksiyonlara sahip birçok gen ve protein rol oynamaktadır. Yapı-spesifik endonükleazlardan Kseroderma Pigmentozum Komplementasyon Grup F (XPF) kendi katalitik partneri olan ERCC1 ile XPF-ERCC1 heterodimeri oluşturulmasında etkindir. XPF-ERCC1 heterodimeri ve XPG, hasarlı DNA'yı sırasıyla 5' ve 3' uçlarından kesen bir endonükleazdır.

ERCC1 geni kromozom 19q13.2-13.3'e lokalizedir. *ERCC1* geni gibi DNA onarım mekanizmasında yer alan genlerdeki polimorfizmlerin DNA onarım kapasitesinde farklılıklara neden olabildikleri ve normal olmayan düzeylerde ERCC1 proteinini ekprese ederek, yüksek onarım kapasitesine sahip olan akciğer hücrelerinde karsinogenez sürecini etkileyebildikleri rapor edilmiştir. *ERCC1* geni T19007C (rs11615) ve C8092A (rs3212986) polimorfizmleri çalışmalarda yer alan en yaygın polimorfizmlerdir.

ERCC1 T19007C SNP kodon 118'de lokalizedir ve asparajin aminoasidi kodlar. *ERCC1* geni kodon 118'de C/T değişimi ile karakterize bu tek nükleotid polimorfizmi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların büyük bir bölümünde ortak hedeflerden biridir ve bu polimorfizmin ERCC1 ekspresyon değişiminin bir belirteci olarak fonksiyonel öneme sahip olabileceği rapor edilmiştir.

ERCC1 C8092A SNP, genin 3' "untranslated" bölgesinde (UTR) gözlenen sessiz bir varyanttır ve NSCLC'lerinde hem kanser riski hem de kemosenitivite açısından birçok çalışmada değerlendirilen bir parametredir.

Takenaka ve ark., tümör evresini baz aldıklarında T19007C SNP için en az bir T alleleline sahip (TT ve TC genotipli) NSCLC hastalarının CC genotipli hastalardan daha ileri evrede olduklarını, C8092A SNP ile ilgili CA genotipinin lenfatik invazyonlu hastalarda daha sık, ancak 65 yaş altı hasta gruplarında daha nadir gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada, NSCLC tanısı alan formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş arşiv doku örneklerinde NSCLC progresyonunda etkili olduğu düşünülen T19007C ve C8092A polimorfizmlerine ait genotiplerin belirlenmesi ve yaş, cinsiyet, sigara içimi, TNM evre ve histolojik tip olmak üzere klinikopatolojik parametrelerle olası korelasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2. 1. Akciğer Kanseri Tanımı

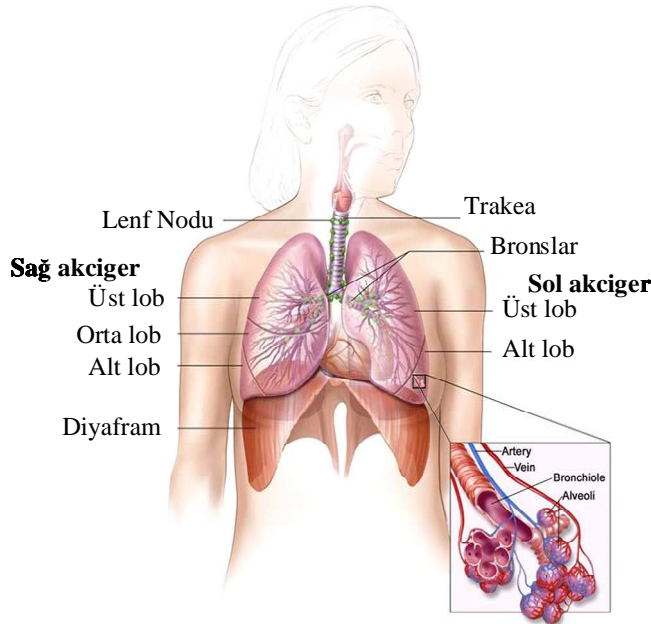
Kanser, organizmanın gereksinme referansı olmaksızın hücre sayısında artışa olanak sağlayan ve hemostazi yöneten temel düzenleyici mekanizmaları olumsuz etkileyen bir gen ekspresyon hastalığıdır. Ondokuzuncu yüzyılda Boveri'nin kanserin nedeni olarak anormal kromozomların rolünü öne sürmesi ile kanserin genetik modeli tanımlanmaya başlanmıştır. Kanserle ilgili temel araştırmalarda ve tümör hücre biyolojisinin altında yatan genetik değişimlerin tanımlanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Benzer şekilde, 1990'lı yılların ortalarından bu yana artan bilgi birikimi, kanserde epigenetik değişimlerle düzenlenen kalıtsal değişikliklerin de karsinogenez sürecinde etkin olduklarını göstermiştir. Genetik ve epigenetik değişimler, farklı mekanizmalarla hemostatik yollarda yer alarak onkogenlerde aktivasyona ya da tümör baskılayıcı genlerde inaktivasyona neden olabilirler (Feinberg 2006, Allis vd 2007).

İnsanlarda en ölümcül kanser türlerinin başında gelen akciğer kanseri, başta bronş mukoza hücreleri olmak üzere diğer akciğer ve akciğeri çevreleyen dokulardan kaynaklanan tümöral yapılanmadır. Mikroskopik görünümüne dayanılarak küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Akciğer kanser hücreleri orijinal tümör dokusundan ayrılabilirler ve kan veya lenf damarları yolu ile vücudun diğer dokularına yayılabilirler.

Akciğer kanseri de diğer kanser türlerinde olduğu gibi biyolojik davranışlarına göre benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere temelde 2 gruba ayrılır. Alveolar adenomlar, farklı mikroskopik ve makroskopik bulgulara sahip, nadir benign akciğer tümörleridir. Alveolar adenomların histolojik özellikleri tam olarak aydınlatılmış olmamakla birlikte, epitelyal ve mezenkimal elementleri içerdikleri bilinmektedir.

Akciğer Benign Tümörlerin Klinik Özellikleri:

- 1) Sınırları bellidir.
- 2) Yavaş gelişirler.
- 3) Genelde ağrıya neden olmazlar.



Şekil 2.1 Solunum sistemi anatomisi: Trakea, her iki akciğer lobu, bronşlar ve alveoller. Resimde aynı zamanda lokal lenf nodları ve diyafram da yer almaktadır. Solunum sırasında oksijen akciğerlere alınır, oradan alveollerdeki ince membranlara ve sonrasında da kan damarlarına aktarılır (<http://www.cancer.gov> adresinden alınmış ve Türkçe'ye çevrilmiştir).

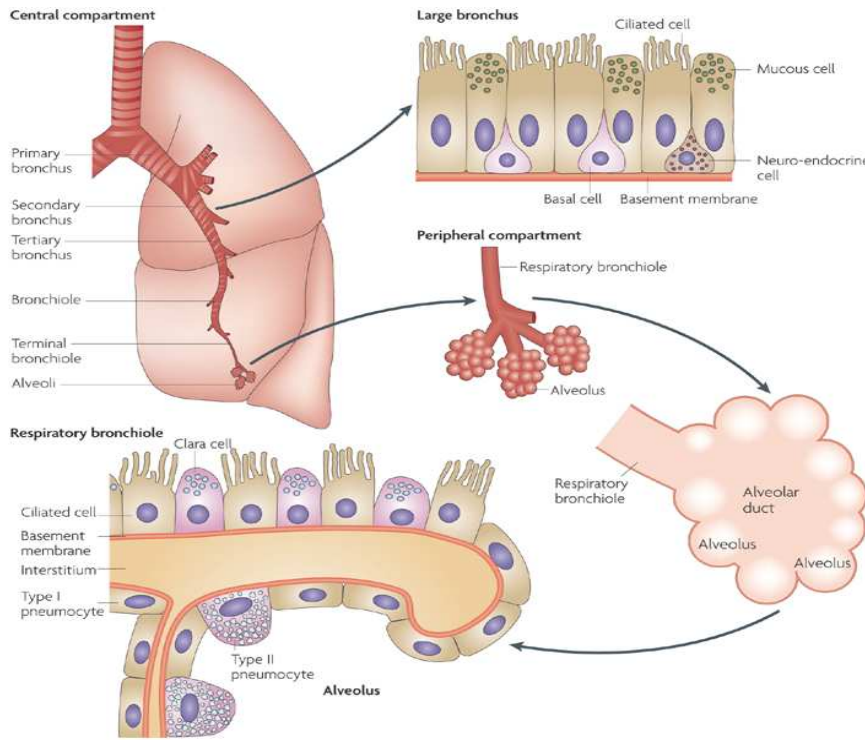
Akciğer Benign Tümörlerin Histopatolojik Özellikleri:

- 1) Çevre dokudan fibröz kapsül ile ayrılırlar.
- 2) Tümör hücreleri iyi diferansiyedir.
- 3) Mitotik indeks belirgin olarak artmamıştır veya normal mitotik durum gözlenir.
- 4) Çevre dokulara invazyon ve infiltrasyon yoktur.
- 5) Metastatik özellikleri yoktur (Ersöz 2007).

Ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere 3 germ yaprağının birinden köken alan herhangi bir epitelten veya parankimal hücrelerden kaynaklanan malign tümörler, karsinomlar olarak adlandırılırlar. Akciğer kanserlerinin büyük çoğunluğu maligndir.

Akciğer Malign Tümörlerin Klinik ve Histopatolojik Özellikleri:

- 1) Belirli sınırları yoktur.
- 2) Mukozada ülserasyon yapabilirler.
- 3) Hızlı büyüme gösterirler ve kısa zamanda büyük boyutlara ulaşabilirler.
- 4) Ağrıya neden olabilirler (Ersöz 2007).



Şekil 2.2 Akciğer kanseri patogenezine özgü anatomik bölümler: Akciğer kanseri, organın farklı anatomik bölümlerinden köken alan farklı histolojik alt tiplere sahiptir. Akciğerin temel fonksiyonu ile solunan hava, bronş ve bronşiyoller aracılığı ile alveollere ulaştırılır. Kıkırdakla güçlendirilmiş ve kas duvarına sahip büyük tüpler bronşlardır. Kıkırdak desteği olmayan ve tam bir kas duvarına sahip olmayan daha küçük tüpler (<1 mm çap) ise bronşiyollerdir ve alveollerle temas halindedirler. Bronşların kabul edilen kök hücreleri, bazal hücredir ve bu hücrenin silialı, müköz ve nöroendokrin hücrelere farklılaştığı düşünülmektedir. Terminal bronşiyoller ve alveollerin ise ortak bir kök hücreyi paylaştıkları genel bir görüştür. Ancak, periferel havayolu kök hücrelerini morfolojik olarak tanımlamak oldukça zordur ve bu lokalizasyonda bölünme yeteneğine sahip olan hücreler, Klara hücreleri (bronşiyollerde) ve sürfaktan sekrete eden tip II pnömositlerdir (alveollerde). Akciğer kanseri ya merkezi havayolu bölümünden (özellikle SCLC ve skuamöz hücre karsinomu) ya da periferel hava yolu bölümünden (özellikle adenokarsinom) köken alır. Sigara tüketimine bağlı karsinojenler, her iki havayolunu da etkileyebilir ancak sigara içmeyen hastalarda akciğer kanserine neden olan ve henüz tam olarak tanımlanmamış faktörlerin özgün olarak periferel bölümü hedefledikleri gözlenmektedir (Sun vd 2007).

2.2. Akciğer Tümör Hücrelerinin Özellikleri

Tüm tümör hücrelerinde olduğu gibi, akciğer tümör hücreleri de, orijinalinden farklı davranış modeli sergileyen hücrelerdir. Bu davranış modelleri:

Farklılaşma (Diferansiasyon) ve anaplazi:

Farklılaşma, parankimal hücrelerin normal karşıtlarına hem morfoloji hem de fonksiyon yönünden ne kadar benzerlik gösterdiğini belirtir. İyi farklılaşmış (diferansiye) tümör hücreleri, o dokunun olgun normal hücrelerine benzerlik gösterirler. Kötü farklılaşmış veya farklılaşmasını tamamlayamamış tümörler, primitif görünümlü normal hücrelerin özgün özelliklerine sahip değildirler. Genelde benign tümörler iyi diferansiye hücrelerden oluşurken, malign tümörleri oluşturan hücreler farklılaşma süreçlerini tamamlayamamış hücrelerdir.

Anaplazi ise farklılaşma yokluğudur ve malignitenin temel özelliklerinden biridir. Anaplazinin morfolojik bulgusu, hücre ve nükleustaki boyut ve şekil farklılığıdır yani pleomorfizmdir. Nükleus, DNA içeriğinin fazla olması nedeniyle oldukça koyu boyanır (hiperkromazi). Tümör hücrelerinin nükleusları sitoplazmaya göre daha büyük, nükleolus iri ve belirgindir. Bir başka morfolojik bulgu, tümör dev hücrelerinin varlığıdır. Anaplastik hücreler görünümünde anormallikleri yanı sıra organizasyonlarında da farklılıklar içerirler. Örneğin tümör hücreleri düzensiz bir biçimde bir araya gelerek adalar veya geniş plaklar oluşturabilirler (Ersöz 2007).

Büyüme hızı:

Benign ve malign tümörlerde büyüme hızı, bilinen veya bilinmeyen birçok faktörün etkisi altındadır. Tümör hücrelerinin büyüme faktörlerine ve hormonlara bağımlılığı, tümör anjiyogenezi, çevre dokuların özellikleri gibi etkenlerin büyüme hızı ile ilişkisi detaylı bir biçimde tanımlanmıştır. Özellikle tümör hücreleri büyüme faktörlerine çok az gereksinim duyarlar. Hatta bazı tümör hücreleri kendi büyüme faktörlerini salgılayabilirler ve bu faktörlerin otokrin etkisi ile çoğalırlar.

Genel olarak benign tümörler yavaş gelişirken, malign tümörler hızla büyüyerek yayılırlar. Bazen bu durumun tersi de gözlemlenebilir. Tümörlerin gelişmesinde siklusun proliferatif fazındaki hücrelerin sayısı önemlidir. Neoplastik bir dokuda proliferatif fazdaki hücre sayısı normal dokuya göre daha fazladır. Mitoz bölünmeye uğrayan hücrelerin yüzdesi olarak tanımlanan mitotik indeks, bazı tümörlerde benign veya malign ayrımı için önemli bir kriterdir ve malign tümör hücrelerinin en tipik özelliklerinden biri limitsiz replikatif potansiyele sahip olmalarıdır. Malignite tayininde ayrıca tripolar, kuadripolar gibi anormal mitotik yapıların görülmesi de önemlidir (Ersöz 2007).

Lokal invazyon :

İnvazyon, tümör hücrelerinin mekanik olarak veya immun doku bariyerlerini geçerek dokuların içine ulaşmasıdır. Doku bariyerlerinin proteanolizi ile invazyon oluşmaktadır. İnvazyonun gerçekleşmesi için ilk olarak tümör hücrelerinin bazal membrana adezyonu ve sonra da bazal membranın enzimler aracılığıyla hasara uğratılıp, tümör hücrelerinin doku içine girmesi gerekmektedir (Taşdemiroğlu 2003).

Metastaz:

Metastaz, tümör hücrelerinin orijin aldığı bölgeden çok daha uzak bir bölgeye gidip yerleşmesi ve burada yeni hücre kolonilerini meydana getirmesi olarak tanımlanabilir. Metastaz malign tümörlerin en önemli özelliği iken, benign tümörlerde metastaz gözlenmez.

Metastazın oluşması için anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu) ve tümör hücrelerinin çoğalması gereklidir. Anjiyogenez, tümör büyümesinde ve yayılmasında önemli rol oynar. Anjiyogenezisi uyaran Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) normal dokularda bulunur veya tümör hücrelerinden salgılanır (Taşdemiroğlu 2003, Ersöz 2007).

Tümör anjiyogenezi:

Tümörlerin büyümesinde tümör anjiyogenezi önemli rol oynamaktadır. Tümörler damarlanmadıkça 1-2 mm çapı geçemez, tümörün metastaz yapabilmesi damarlanmaya bağlı olduğundan, anjiyogenez malignite için gerekli ve önemli bir koşuldur. Tümör anjiyogenezinde çeşitli faktörler rol oynarlar. En önemli anjiyogenik faktörler; temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve makrofaj kökenli tümör nekroze edici faktör alfa (TNF- α)'dır. Ayrıca tümör hücrelerinden salınan trombospondin 1, anjiyostatin, endostatin gibi antianjiyogenik faktörlerin de tümör anjiyogenez mekanizmasına katılırlar. Bu yeni damarlanma, tümör büyümesi üzerine iki yönlü etki gösterir: Besin maddeleri ile birlikte oksijenin perfüzyonla ilgili bölgeye ulaşması ve yeni oluşan endotel hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri ile tümör büyümesinin uyarılmasıdır.

Son yıllardaki çalışmalar, tümör anjiyogenezinin anjiyogenik faktörler ve anjiyogenez inhibitörleri (trombospondin, anjiostatin gibi) arasındaki dengeyle kontrol edildiğini bildirmektedir (Patıroğlu 2000). Genelde tümör malignitesinde gözleendiği gibi, anjiyogenez ve özellikle VEGF'nün akciğer kanserinde tümör büyümesi ve metastazında kritik rol oynadığı rapor edilmiştir (Herbst vd 2005). VEGF'nin akciğer kanserinde artmış küçük damar yoğunluğu ile ilişkili olduğu (Yuan vd 2000), NSCLC'nde aşırı ifade edildiği (Stefanou vd 2004, Eriksson vd 2006) ve karsinojenlerle ilişkili olabildiği (Jarzynka vd 2006) gösterilmiştir. Ayrıca VEGF'nün aşırı ifadesi, sağkalımda azalma ile ilişkilendirilmiştir (Bremnes vd 2006).

Anjiyogenez yoğunluğunun melanom ve meme kanserinde olduğu gibi NSCLC'de de rekürrensler ve metastaz oluşumu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Shrivasta vd 1988, Horak vd 1992, Macchiarini vd 1992). Aynı zamanda yüksek anjiyogenez yoğunluğunun, tümör hücrelerinin dolaşıma sızmasını kolaylaştırdığı ve tümör hücrelerinde endotelial hücreler tarafından gösterilen parakrin etkileri arttırdığı bildirilmiştir (Gasparini 1996). NSCLC'nin farklı histolojik tipleri sistemik metastazlar açısından farklı potansiyellere sahiptirler (Morton 1988). Hematolojik yayılım nedeniyle adenokarsinom epidermoid karsinomdan daha yüksek metastaz potansiyeline sahiptir. Macchiarini ve arkadaşları, T1N0M0 evreli NSCLC hastalarında rezeksiyondan sonra metastazların tümör dokusunun yeniden damarlanması ile ilişkili

olduğunu rapor etmiştir (Macchiarini vd 1992). Yukarıda da bahsedildiği gibi, anjiyogenez metastazın başlamasında önemli rol oynamaktadır ve metastaz sürecinde primer tümör anormal damarlanmaya sahip olmalı, kanser hücresi dolaşıma geçmeli, hedef organa ulaşmalı ve daha fazla büyüme için anjiyogenezi başlatmalıdır (Yuan vd 1995). Teicher ve arkadaşları, hayvan çalışmalarında kemoterapi ve/veya radyoterapi ile birlikte antianjiyogenik terapinin hastalarda tedavi etkinliğini arttırdığını ileri sürmüşlerdir (Teicher vd 1996).

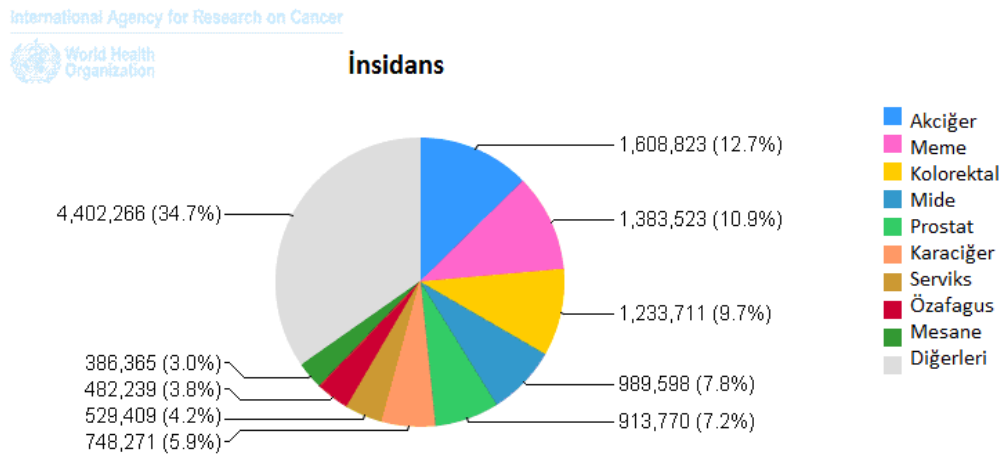
Malign akciğer tümörlerinin başlıca yayılım yolları lenfatik yol ve hematojen yolla yayılımdır. *Lenfatik yol ile yayılım*, malign epitelyal tümörlerin ilk tercih ettikleri yayılım yoludur. Sarkomlar da bu yolu kullanıp yayılırlar. Tümörün yayılımını bir süre önlemek için lenf nodülleri etkili bariyerler oluştururlar. Akciğerin büyük bronşlarına yerleşen karsinomlar, primer olarak perihiler ve mediastinal lenf nodüllerinde tutulum yaparlar. *Hematojen yol ile yayılım* ise, mezenkimal tümörlerin ilk tercih ettiği yayılma yoludur, fakat karsinomlarda da bu yolla yayılım görülür. Venlerin duvarları arterlerden daha ince olduğundan tümör hücreleri tarafından daha kolay penetre edilirler. Arteriyel yayılım, tümör hücrelerinin pulmoner kapiller yatağı geçmesi veya akciğerdeki metastatik odaklardan tümör embolilerinin meydana gelmesi ile oluşur. Tüm portal drenajın karaciğere, tüm kaval drenajın akciğerlere olmasından dolayı, hematojen metastazlar en fazla akciğer kanserinde görülür. Metastazların oluşmasında organa ulaşan tümör hücreleri ile bu organın mikrovasküler altyapısı arasındaki etkileşim önemlidir. Proteazlarla birlikte büyüme faktörleri, tümör hücrelerinin yeni dokuya ulaşmasını ve girişini kolaylaştırmaktadır (Ersöz 2007).

2.3. Akciğer Kanserinde Epidemiyoloji

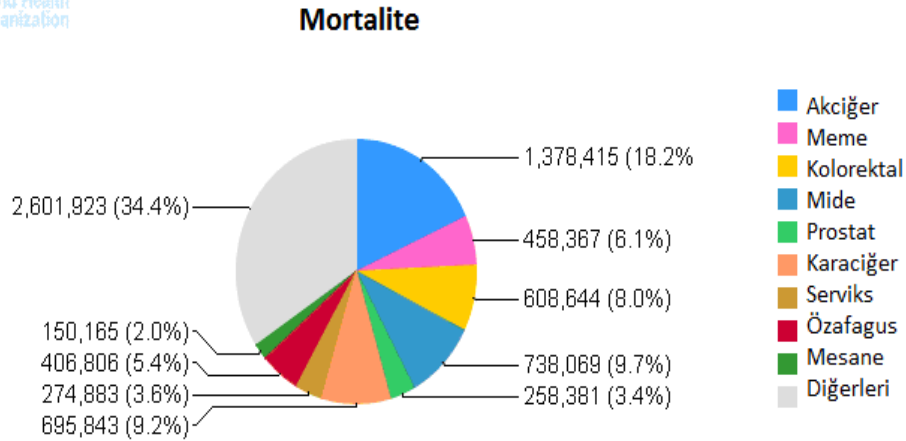
Kanser, her yıl dünyada yaklaşık 7,6 milyon ölüme neden olmaktadır. Bunların %72'den fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Kanser ölümlerinin 2030'da tahminen 17 milyona kadar artacağı düşünülmektedir (www.who.int). Tüm dünyada akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında nadir bir hastalık olarak tanımlanmasına karşın, günümüzde ciddi bir halk sağlığı problemidir. Kalp hastalıklarından sonra genel ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almakta ve kanser ölümlerinin de %25'ini oluşturmaktadır (Conrad 2007). Akciğer kanserinde 5

yıllık sağkalım oranının %5-10 olduğu bildirilmiştir. Erkekler arasında her yıl tahminen 960.000 yeni olgu ve 850.000 ölüm, kadınlar arasında 390.000 yeni olgu ve 330.000 ölüm vakalarının gözlenebileceği hesaplanmıştır (www.who.int)

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Daire Başkanlığı tarafından rapor edilen bilgilere göre 2006’da toplam kanser insidansı erkeklerde 256,4/100.000 iken, kadınlarda 158,1/100.000’dir. Genel kanser insidansının 2005 yılında erkeklerde 246,5/100.000, kadınlarda 149,7/100.000 oranda olduğu ve 1 yıllık kısa bir süreç içinde bile insidansın artmış olduğu dikkat çekicidir. Ülkemizde 2006 yılı akciğer kanser insidansı kadınlarda 7,7/100.000 ve erkeklerde 68,9 /100.000 iken, erkeklerde en sık görülme yaş aralığının 70-74 yaş, kadınlarda ise 65-69 yaş olduğu belirtilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2008).



Şekil 2.3 Dünya genelinde kanser insidans oranları (WHO Kansere Savaş Daire Raporu, 2008)



Şekil 2.4 Dünya genelinde kanser mortalite oranları (WHO Kanser Raporu, 2008)

Ülkemizde kanserle ilgili istatistiksel veriler, özel kanser kayıt elemanları tarafından tek tek hasta dosyaları ve elektronik veri tabanları araştırılarak oluşturulmaktadır. Buna göre elde edilen veriler, kanser kayıt formlarına aktarılır ve bu formlar İl Sağlık Müdürlüğü Kanser Kayıt Merkezleri'ne ulaştırılır. Bu merkezlerde dublikasyon kontrolü ve diğer kalite kontrol çalışmaları yapıldıktan sonra elde edilen veriler elektronik ortamda Sağlık Bakanlığı'na gönderilir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de profesyonel kanser kaydı yapabilecek iller seçilmiştir ve bu sistemde veri toplayan 14 Aktif Kanser Kayıt Merkezi bulunmaktadır. Bu merkezlerin yer aldığı iller Ankara, İzmir, Antalya, Samsun, Adana, Eskişehir, Erzurum, Edirne, Trabzon, Bursa, Şanlıurfa, Kayseri, Van ve Kocaeli'dir.

2.4. Akciğer Kanserinde Etyoloji

Sigara içimi:

Akciğer kanserinin en sık görülen nedenidir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından gelişmiş ülkelerde erkeklerde sigara içme oranı 1980'den sonra %50'den %30-40'a düştüğü, kadınlarda bu oranın %20-40'a yükseldiği belirtilmiştir (Sağlık Bakanlığı, 1988). Türk Toraks Derneği Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu'nun

raporunda erkeklerdeki aktif sigara içiciliği oranı %78 olarak belirtilmiştir (Türk Toraks Derneği, 2002).

Akciğer kanseri etyolojisi ile ilgili en net veriler, sigaranın karsinogenezisi başlattığı ve ilerlettiğidir. Sigara içiminin akciğer kanseri başta olmak üzere larinks, özofagus, farinks, dudak, mesane, kolon ve serviks kanserlerini içine alan birçok farklı kansere de neden olduğu gösterilmiştir. Sigara içiminin 4000 farklı kimyasalı içerdiği ve bunlardan en az 43 tanesinin kanser etyolojisinde yer aldığı bildirilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Sigaradan çıkan dumandaki toksinler

Toksin	Sigaradan çıkan duman / ağızdan çıkan duman
Karbonmonoksit	15
Nikotin	21
Formaldehit (silia inhibisyonu)	50
Benzo(α)piren (karsinojen)	20
β -naftilamin (karsinojen)	39
4-aminobipenil (karsinojen)	31
Dimetilnitrozamin (karsinojen)	130
Amonyak (irritan)	170

Sigara içimine bağlı açığa çıkan duman, iki grupta toplanabilir:

1) Ağızdan çıkan sigara dumanı: Bu duman aktif içici yani sigara içen kişi tarafından solunur ve 4700 farklı bileşen içermektedir. Bu bileşenlerin büyük çoğunluğu sigaranın kendine özgü tad duyusunun alınması ve daha kolay yanmasını sağlamak amacı ile sigara üretimi sırasında eklenmektedir.

2) Sigaradan çıkan duman: Aktif olarak sigara tüketmeyen, ancak sigaradan çıkan dumanı soluyan kişiler “pasif içiciler” olarak tanımlanırlar. Daha yüksek sıcaklıkta yanması ve filtre edilmemesi nedeniyle, sigaradan çıkan duman ağızdan çıkan dumandan daha tehlikelidir. Aynı zamanda, sigaradan çıkan duman daha yüksek miktarda benzen, nikotin ve karbonmonoksit içermektedir.

Pasif sigara içimi ile akciğer kanseri arasında pozitif ilişki bulunduğu ve pasif içicilerde hiç sigara dumanına maruz kalmayan bireylere göre akciğer kanser riskinin en az %25 arttırdığı rapor edilmiştir (Boffetta 2006). Hackshaw ve ark. (1997)'nin 4626 vaka ile yaptıkları çalışmada, meta analizi ile pasif içicilerde akciğer kanseri gelişiminde 1,14-5,20 arasında relatif risk artışı hesaplanmıştır. Daha dramatik olan da çocukluk çağlarında pasif sigara içimine maruz kalan bireylerin, yetişkin dönemde akciğer kanserine yakalanma oranlarının 3,6 kat arttırdığının rapor edilmesidir (Vineis vd 2005). Pasif sigara içiminin Amerika'da her yıl yaklaşık 3000 bireyde akciğer kanserinden ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir (Garland 1990).

Grup A karsinojen olarak kabul edilmesi ve Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından insanlarda kanser nedeni olarak sınıflandırılması, pasif sigara içiminin önemini bir kez daha belirtmektedir. Belli süre pasif sigara içimine maruz kalan sağlıklı yetişkinlerde, akciğer fonksiyonunda azalma gözlemlendiği bilinmektedir. Restoran, bar ve benzeri yerlerde çalışan ve pasif sigara içimine maruz kalan bireylerin en az %50'sininin, akciğer kanser oluşum riskine sahip olabilecekleri rapor edilmiştir (USEPA 1992, Siegel 1993).

Alkol:

Alkol tüketiminin sonucu olarak akciğer kanser riski, 1962'den bu yana epidemiyolojik araştırma konularından biridir. Alkol, bir karsinojen olan asetaldehite oksitlenir. Alkolün akciğer dokusunda akciğer membran lipidleri üzerinde pro-oksidan olarak etki edebildiğine dair kanıt bulunmaktadır. Alkolün, karsinojen metabolizmasıyla ilişkili enzimlerin ekspresyonunu indükleyebileceği ve alkollü içeceklerde etanol dışında başka bileşenlerin de karsinojenik etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Song 1996, Bandera vd 2001). Freudenheim ve ark., 399.767 katılımcı ve 3.137 akciğer kanser olgulu 7 prospektif çalışmada, günde en az 30 g/dl alkol tüketen insanların alkolden kaçınanlardan daha fazla akciğer kanser riskine sahip olduğunu göstermişlerdir (Freudenheim vd 2005).

Mesleki ve çevresel maruziyet:

Endüstri ve madencilikte kullanılan pek çok kimyasal maddenin akciğer kanserinin sebebi olduğu düşünülmektedir. Endüstride kullanılan asbestos, bu kimyasallar içinde en önemlisidir. Asbestosa maruz kalan işçilerde akciğer kanser riski 6-10 kat, sigara içen işçilerde ise bu risk 90 kat artmaktadır. Bir diğer önemli kimyasal madde de radondur ve doğal olarak uranyum madenlerinde, toprakta ve kayalarda bulunmaktadır. Uranyum madeninde çalışanlarda ve radon içeren malzemelerden yapılan evlerde yaşayan insanlarda akciğer kanser riskinin belirgin olarak arttığı bildirilmiştir.

Nikel, biklorometileter, bikromatlar, arsenik, silika, toksik gazlar, vinil klorid, radyoaktif izotopların da karsinojenik oldukları rapor edilmiştir. Kanada'da yapılan bir çalışmada, kanserlerin yaklaşık %1'inin mesleki faktörlerle ilişkili olduğu ve bu kanserlerin %80'den fazlasının akciğer ve plevral kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (Karlıkaya 2005).

Diyet ve ek gıda ürünleri:

Antioksidan bakımından zengin meyve ve sebzelerin, özellikle karotenoidlerin, akciğer kanseri ve diğer kanser türlerinin oluşum riskini azaltarak sağlık açısından yararlı olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalar karotenoidlerin akciğer kanser riskini azalttığını göstermişse de diğer çalışmalar yüksek-doz supplementlerin akciğer kanseri için zararlı olabileceğini göstermektedir. Lutein, zeksantin, likopen ve α -karotenin kanserden koruyucu rollerinin olduğu vurgulanmaktadır. Vitamin C ve E için de benzer koruyucu rolün olduğuna dair kanıtlar sunulmuştur. (Molina vd 2008). Bu nedenlerle dengeli beslenme halkasındaki herhangi bir aksaklık, kanser oluşum riski açısından büyük öneme sahiptir.

Egzersiz ve fiziksel aktivite:

Araştırmalar, fiziksel olarak aktif bireylerde akciğer kanser riskinin daha düşük olduğunu ileri sürmektedir. Aynı zamanda fiziksel aktivitenin, ağır sigara içiciler arasında akciğer kanser riski ve mortalitede azalmaya yardım edebildiği bildirilmiştir (Lee 2003, Alfano vd 2004).

Genetik:

Ağır sigara içicilerin sadece %20'sinde akciğer kanseri görülmesi, genetik faktörlerin de akciğer kanser gelişiminde rol oynadığını düşündürmüştür. Ailesel kanser hikayesi olan ağır sigara içicilerde akciğer kanser riski, sigara içmeyen ve aile hikayesi olmayanlardan 30-47 kat daha fazladır. Ailesinde akciğer kanseri öyküsü bulunan bireylerin akciğer kanseri ile birlikte diğer kanserlere yakalanma risklerinin yüksek olması, ailesel genetik faktörlerin rolünü düşündürmektedir. Bu faktörlerin başında karsinojenlere karşı duyarlılık ve/veya direnç gelmektedir. Aynı zamanda, ilaç metabolize eden P450 izoform enzimlerinin ve aril hidrokarbon hidroksilaz enzim sistemlerinin akciğer kanseri gelişiminde rol oynadığına dair de güçlü kanıtlar vardır (Karlıkaya 2005).

Akciğer kanseri oluşumu, genomda kayıplar ve kazanımlar gibi pek çok klonal moleküler genetik değişimleri içeren kompleks ve heterojen bir süreçtir. Tekrarlayan kromozomal değişimler, akciğer kanser oluşumu için gerekli kritik olaylara neden olabilirler (Edgardo vd 2009). Büyüme faktörleri, tümör baskılayıcı genler, onkogenler de araştırılan genetik faktörlerdir. Akciğer kanseri oluşumunda yer alan genetik faktörler, “2.8 Akciğer kanseri oluşumunun moleküler mekanizması” ana başlığında detaylı bir biçimde yer almaktadır.

2.5. Akciğer Kanserin Tipleri

Akciğer kanserinde histolojik sınıflama, standart histolojik boyama tekniklerine ve ışık mikroskopunda inceleme esasına dayanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü Akciğer Kanseri Sınıflaması'na göre temelde dört tip akciğer kanseri bulunmaktadır: Skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom, adenokarsinom, ve küçük hücreli karsinom (SCLC). Akciğer kanseri ile detaylı sınıflama ise Tablo 2.2'de yer almaktadır. Bu temel sınıflardan ilk üçü, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olarak değerlendirilmektedir. NSCLC, SCLC'den daha yaygındır, akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (www.who.int).

2.5.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC)

SCLC ve NSCLC'in biyolojik davranışları birbirlerinden oldukça farklıdır. SCLC, erkeklerde daha sık gözlenir ve sigara içimi ile ilişkilidir. Tümör hücreleri dar sitoplazmalı, sitoplazma sınırları iyi seçilemeyen, ince granüler kromatin yapısına sahip çekirdekli ve çekirdekçiği seçilemeyen, yuvarlak, oval veya iğsi morfolojiye sahiptirler. Mitotik indeksin yüksek olması, önemli bir özelliğidir. Küçük hücreli akciğer kanseri, akciğerin nöroendokrin hücrelerinden köken alır. Bu hücreler nörona-özgün enolaz, adrenokortikotropik hormon, kalsitonin, gastrin salgılayıcı peptid ve kromogranin-A gibi polipeptid hormonları salgırlar (Tel 2000, Yılmazbayhan 2007). SCLC son derece agresif malignan özelliğe sahiptir ve çoğu kez erken evrede yaygın metastazlarla karşılaşılır. Erken evrede metastaza eğilimli olmaları nedeniyle cerrahi müdahale için kontrendikasyona sahip olma, kötü prognoz ve nispeten kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı olma özellikleriyle karakterizedir. SCLC'de tedaviye yanıt oranı %50'den fazla iken, bu oran NSCLC'de %15'lerdedir (Spiro ve Silvestri 2005)

2.5.2. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC)

SCLC'nin aksine, NSCLC genel olarak çok daha yavaş ilerler ve yayılır. NSCLC'li hastalarda erken evrede metastaz yapma eğilimi çok daha azdır ve erken evrede cerrahi müdahale için uygun adaylardır. Bu nedenle SCLC veya NSCLC olarak sınıflandırma yapılması, tedavi yöntemini değiştireceğinden büyük bir klinik öneme sahiptir. Akciğer kanseri vakalarının sadece %5-7'sinde bu iki ana tipi belirlemede zorluklar yaşanabileceği bildirilmiştir (Butnor vd 2004) .

NSCLC vakalarında histolojik alt tiplendirme her ne kadar temel tedavi seçeneğini değiştirmese de, hastaların pato-fizyolojik özelliklerini ve klinik paternlerini göstermesi açısından son derece önemlidir.

Epidermoid karsinom:

Epidermoid karsinom; yassı epitel hücreli ya da skuamöz hücreli karsinom olarak da adlandırılır. Değişik derecelerde keratinizasyon ve hücresel bağlantılar oluşturan epitelyal hücrelerin oluşturduğu malign bir tümördür. Akciğer kanserinin en sık görülen

tipidir. Erkeklerde daha yaygın olmakla birlikte sigara içimi ile yüksek oranda ilişkilidir. Tümör çoğunlukla ana bronş kökenli santral yerleşimlidir. Bronş içine doğru polipoid tarzda gelişme ve yüzeyde ülserasyon oluşabilir. İyi diferansiye tipte keratinizasyon keratin incileri şeklinde görülürken, az diferansiye tipte keratinizasyon ise, tek hücre keratinizasyonu şeklinde görülebilir veya görülemeyebilir (Karlıkaya 2005, Memiş vd 2007).

Adenokarsinom:

Genelde kadınlarda ve sigara içmeyenlerde görülür (Tel 2000). Sıklıkla periferik yerleşimlidir ve periferde yerleşen tipleri, mezotelyomalara benzeyebilmektedir. Bazı primer tümörler de meme, tükrük bezi, gastrointestinal sistem tümörlerine benzeyebilir. Tümörlerin çoğu Klara hücre ve tip II pnömosit kökenlidir. Adenokarsinomlar diğer subtiplerden daha küçük kitleler halinde gelişim gösterirler ve daha erken evrede metastaz yaparlar. Tümörlerde papiller yapılar, psammom cisimcikleri ve müsin damlları görülebilir. Tümör hücreleri belirgin nükleoluslu, veziküler nükleuslu, büyük soluk veya eosinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. En önemli özelliği gerçek lümen oluşmasıdır. İnter veya intrasellüler boşluklar ve iyi gelişmiş desmosomal bağlantılar gözlenir. Histolojik olarak asiner, papiller, bronkiyalveolar, müsin içeren solid tip veya bunların karışımı olmak üzere alt tipleri bulunmaktadır (Karlıkaya 2005, Yılmazbayhan 2007).

Bir adenokarsinom tipi olan bronkioloalveolar karsinomalar, bronkioloalveolar büyüme paterni gösterirler. Bu karsinoma tipinde stromal, plevral ve vasküler invazyon görülmez. Müsinöz ve müsinöz olmayan olmak üzere iki tipten oluşur. Müsinöz tip tek bir nodül, multinodüler ya da pnömonik tipte görülebilir. Müsinöz olmayan tip ise Klara hücre ve tip II pnömosit kökenlidir (Yılmazbayhan 2007).

Büyük hücreli karsinom:

Hücreler belirgin çekirdekçik, iri çekirdek ve orta derece büyüklükte sitoplazmaya sahiptirler. Skuamöz, adeno, küçük hücreli karsinom özelliklerine sahip olmayan az diferansiye bir tümördür. Daha detaylı yapısal incelemelerde, hücrelerde fokal skuamöz ve adenokarsinom yönünde diferansiyasyon gözlenmiştir. Büyük hücreli karsinomun

varyantları; büyük hücreli nöroendokrin karsinom, bazaloid karsinom, lenfoepitelyomaya benzer karsinom, berrak hücreli karsinom ve rabdoid fenotipli büyük hücreli karsinomdur (Yılmazbayhan 2007).

Tablo 2.2 2004 Dünya Sağlık Örgütü akciğer kanserleri sınıflandırması - Malign epitelyal tümörler

I	Skvamöz hücreli karsinom Varyantları: 1. Papiller 2. Belirgin hücreli 3. Bazaloid
II	Küçük hücreli karsinom Varyantları: 1. Kombine küçük hücreli karsinom
III	Adenokarsinom 1. Asiner 2. Papiller 3. Bronkioloalveolar karsinom <ul style="list-style-type: none"> • Müsinöz olmayan (Klara/ tip II pnömosit) • Müsinöz • Karışık müsinöz veya müsinöz olmayan 4. Müsinli solid adenokarsinom 5. Karışık alt tipli adenokarsinom 6. Varyantlar <ul style="list-style-type: none"> • İyi diferansiye fetal adenokarsinom • Müsinöz (kolloid) adenokarsinom • Müsinöz kistadenokarsinom • Yüzük hücreli adenokarsinom • Belirgin hücreli adenokarsinom
IV	Büyük hücreli karsinom Varyantları: 1. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom <ul style="list-style-type: none"> • Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom 2. Bazaloid karsinom 3. Lenfepitelyum-benzeri karsinom 4. Belirgin hücreli karsinom 5. Rabdoid fenotipli büyük hücreli karsinom
V	Adenoskuamöz karsinom
VI	Pleomorfik, sarkomatoid veya sarkamatöz elementli karsinomlar 1. İğ veya dev hücreli karsinomlar <ul style="list-style-type: none"> • Pleomorfik karsinom • İğ hücreli karsinom • Dev hücreli karsinom 2. Karsinosarkom 3. Pulmoner blastom

	4. Diğerleri
VII	Karsinoid tümör 1. Mukoepidermoid karsinom 2. Adenokistik karsinom 3. Diğerleri
VIII	Tükruk-bezi tipi karsinomlar 1. Mukoepidermoid karsinom 2. Adenokistik karsinom
IX	Sınıflandırılmamış karsinomlar

2.6. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinde Histolojik Alt Tiplerin Dağılımı

Akciğer kanseri tiplerinin görülme sıklığı ülkelere göre değişkenlik göstermektedir. Skuamöz hücreli karsinom, dünyada en sık görülen histolojik tiptir. Türkiye’de de Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi’nin raporuna göre, en sık görülen histolojik tipin skuamöz hücreli karsinom olduğu belirtilmektedir. Yurdakul ve arkadaşları, 2216 primer akciğer kanserli vaka ile yaptıkları çalışmada, kadınlarda en sık adenokarsinomun (%45.9) ve erkeklerde en sık skuamöz hücreli karsinomun (%42.2) gözlemlendiğini rapor etmişlerdir (Yurdakul vd 2002). Kadınlarda yıllar içerisinde adenokarsinomda artış olduğu, erkeklerde ise skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom tipinde azalma olduğu, adenokarsinomda ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Akciğer kanserlerinin histolojik tiplerinin zamanla değişiminde rol oynayan faktörler; sigara tüketiminin azalması, tüketilen sigaraların yapısı ile birlikte içimindeki değişiklikler ve histopatolojik tanı ölçütlerindeki değişiklikler sayılabilir (El-Torky vd 1990, Jöckel vd 1998).

Sigara içmeyenlerde daha çok görülen histolojik tip adenokarsinomdur. Bunda sigara dışında ailede akciğer kanseri öyküsü, kişinin bağışıklık sisteminin özellikleri ve hormonlar gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca pasif sigara içiciliği, diyet ve mesleki maruziyet de diğer önemli faktörlerdir. Taioli ve Wynder, kadınlarda ekzojen ve endojen östrojenin adenokarsinom gelişiminde önemli olduğunu, östrojen tedavisinin adenokarsinom riskini artırdığını belirtmişlerdir (Taioli ve Wynder, 1994).

2.7. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinde TNM Sınıflaması

Tüm dünyada önemli sağlık sorunu olan akciğer kanserinin evrelendirilmesi, hastalığa karşı önlem alınması, prognozun tahmin edilmesi ve tedavi yönteminin belirlenmesinde önemli veriler sağlamaktadır. Özellikle NSCLC'lerinde histolojik tipin belirlenmesi, tedavi yöntemi olarak cerrahi veya cerrahi ile birlikte kemoterapi/radyoterapi arasındaki seçimde temel parametredir.

Amerika Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Mücadele Birliği (UICC), 1997 yılında akciğer kanseri için primer tümörün büyüklüğü ve yaygınlığına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N), uzak metastazın varlığına (M) dayanan TNM evrelendirme sınıflamasını modifiye etmişlerdir ve günümüzde bu evreleme kriterleri kullanılmaktadır (Karlıkaya 2005).

PRİMER TÜMÖR (T):

T0: Primer tümörün bulunmamasıdır.

Tx: Bronkopulmoner sekresyonlarda malign hücre vardır, ancak radyolojik ve bronkoskopik yöntemlerle saptanamaz.

T1s: *In situ* karsinomdur.

T1: 3 cm veya daha küçük çaplı, akciğer parankimi veya visseral plevra ile çevrilmiş tümör, bronkoskopik olarak lob bronşunun proksimaline invazyon olmaz.

T2: 3 cm'den daha büyük tümör veya herhangi boyuttaki tümörün visseral plevraya yayılması veya hiler bölgeye kadar ulaşan atelektazi ve obstrüktif pnömoniye neden olmasıdır. Bronkoskopik tanıda, karınaya 2 cm veya daha uzakta olan tümördür.

T3: Tümörün göğüs duvarı, diyafram, mediastinal plevra, parietal perikarda yayılması veya tüm akciğeri içine alan atelektazi ve obstrüktif pnömoniye neden olması veya bronkoskopik tanıda karınaya 2 cm'den daha az uzakta fakat karınaya yayılmamış olmasıdır.

T4: Tümörün mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özofagus, vertebra ve karınaya yayılması veya malign plevra ve perikard sıvısı saptanması veya akciğerin aynı lobunda birden fazla neoplastik nodül bulunmasıdır.

NODAL TUTULUM (N):

N0: Rejyonel lenf nodlarında metastaz olmamasıdır.

N1: Aynı taraf peribronşial ve/veya hiler lenf bezlerinde metastaz veya direkt yayılım vardır.

N2: Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerinde metastaz varlığıdır.

N3: Karşı taraf hiler veya mediastinal lenf bezlerinde metastaz saptanması, aynı taraf veya karşı taraf skalen veya subraklaviküler lenf bezlerinde metastaz varlığıdır.

UZAK METASTAZ (M):

M0: Uzak metastazın olmamasıdır.

M1: Uzak metastaz varlığıdır.

Bu temel evreleme kriterleri, belli aralıklarla revize edilmekte ve öneri olarak yayınlanmaktadır. En son değişiklik önerilerinin yer aldığı evreleme kriterleri Tablo 2.3'de gösterilmiştir (Rami-Porta vd 2007).

Tablo 2.3 Akciğer kanserinin TNM sınıflaması için önerilen değişimler

Sınıflandırma Komponenti	Önerilen Değişimler
T	Tümör çapına göre T1 alt sınıflandırmasında - T1a: ≤ 2 cm ve - T1b: >2 cm fakat ≤ 3 cm
	Tümör çapına göre T2 alt sınıflandırmasında - T2a: >3 cm fakat ≤ 5 cm - T2b: >5 cm veya ≤ 7 cm
	>7 cm T2 tümörleri = T3
	Primer tümörün yer aldığı lobda ek nodüller varsa, T4 tümörleri = T3
	Diğer lobda ek nodül/nodüller varsa M1 = T4
	Malignant plevral efüzyonlu T4 tümörleri = M1a
N	Değişim yok
M	M1'in alt sınıflandırılmasında - M1a: Kontralateral akciğerde ayrı tümör nodülleri; plevral nodüllü veya malign plevral (veya perikardiyal) efüzyonlu tümörler - M1b: Uzak metastaz

2.7.1. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde klinik evreler

Evre I tümörler, IA ve IB olmak üzere ikiye ayrılırlar. Evre I'de lezyonlar akciğer içerisinde yerleşiktirler ve uzak metastaz veya lenf bezi tutulumu yoktur. Beş yıllık sağkalım evre IA'da %67 ve evre IB'de %57 olarak belirtilmektedir. Bu hastalarda tercih edilen rezeksiyon tipi lobektomidir ve gerekli olduğunda geniş rezeksiyona da gidilebilmektedir.

Evre II tümörler, sağkalım sürelerine göre IIA ve IIB olmak üzere ikiye ayrılırlar. Evre IIA hastaların 5 yıllık sağkalımı %55 iken, IIB evre hastalarında %38'dir. Bu evredeki hastalarda tedavi cerrahi olarak tümörün tam rezeksiyonu ile sağlanır.

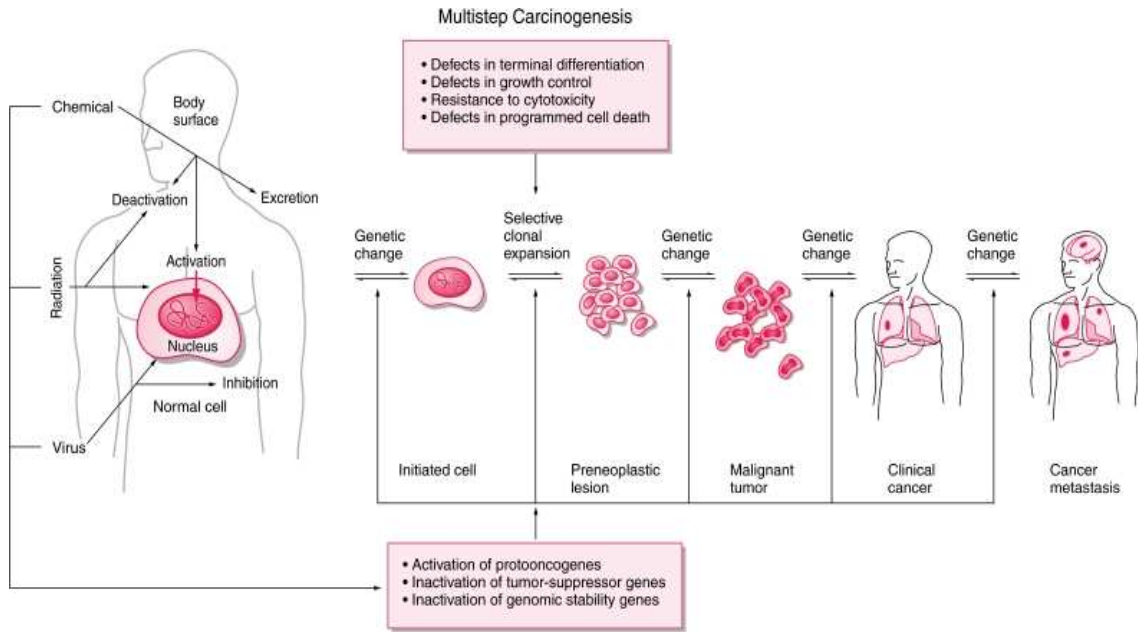
Evre III tümörler cerrahi olarak rezekte edilebilirliğine göre, IIIA ve IIIB olmak üzere ikiye ayrılır. Evre IIIA'da aynı taraf mediastinal veya subkarinal lenf bezlerine yayılım karakteristik bir özelliktir ve tümörün akciğer dışına yayılımı ve/veya sınırlı lenf bezi yayılımı gözlenebilir. Tedavi değişken olmakta ve hastalara kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavinin birlikte uygulanması önerilmektedir. Evre IIIA hastaların 5 yıllık sağkalımı %23'tür. Evre IIIB hastalarda akciğer dışı yayılım, karşı taraf hiler ve mediastinal lenf bezlerine, aynı veya karşı taraf skalen ve supraklavikuler lenf bezlerine ve yaygın mediastinal lenf bezlerine yayılım görülebilir. Hastalara palyatif tedavi önerilmektedir ve 5 yıllık sağkalım oranı ise %5'tir.

Evre IV hastalarda da metastatik yayılım gözlenir. Hastalara palyatif tedavi uygulanır ve 5 yıllık sağkalım oranı %1 olarak belirtilmektedir (Karlıkaya 2005).

2.8. Akciğer Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları

Kanser gelişimi çok aşamalı bir olaydır. Meme ve kolon kanserleri gibi solid kanserlerde etyoloji, patogenez ve progresyonu aydınlatan birçok genetik mekanizma belirlenmiş olup, son yıllarda akciğer kanserinde de ilgili genetik mekanizmalar aydınlatılmaya başlanmıştır. Sigara içimi önemli bir faktör olmakla beraber, sigara içenlerin sadece %20'sinde akciğer kanserinin görülmesi, genetik faktörlerin de akciğer kanserinin etyolojisinde yadsınamayacak düzeyde rol oynadığını düşündürmektedir

(Şekil 2.5). Liu ve ark., ailesinde daha önceden akciğer kanserine yakalanan 194 kişinin genetik profili ile, ailesinde bu kansere rastlanmayan 219 kişinin genetik profilini karşılaştırmışlardır. 300 binden fazla genetik farklılığının incelendiği bu araştırmada, akciğer kanserinin görüldüğü ailelerde birçok kromozom üzerinde genetik farklılıklar belirlenmiş, ve özellikle 15. kromozom üzerindeki genetik farklılıkların kanserle daha güçlü ilişkili olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, aynı zamanda ailesinde akciğer kanseri görülen ve 15. kromozomlarında genetik farklılıklar olan kişilerin, sigara içiminden bağımsız olarak, akciğer kanserine yakalanma riskinin kontrol grubuna göre 5,7 ila 7,2 kat fazla olduğunu rapor etmişlerdir (Liu vd 2008). Bu ve benzeri çalışmaların sonuçları, genetik farklılıkların hücre çoğalması üzerindeki etkinliklerinin kesin rolünün belirlenmesi ve tedavide moleküler belirteç olarak değerlendirilebilmeleri açısından daha detaylı klinik araştırmalara gereksinim olduğunu açıkça göstermektedir.

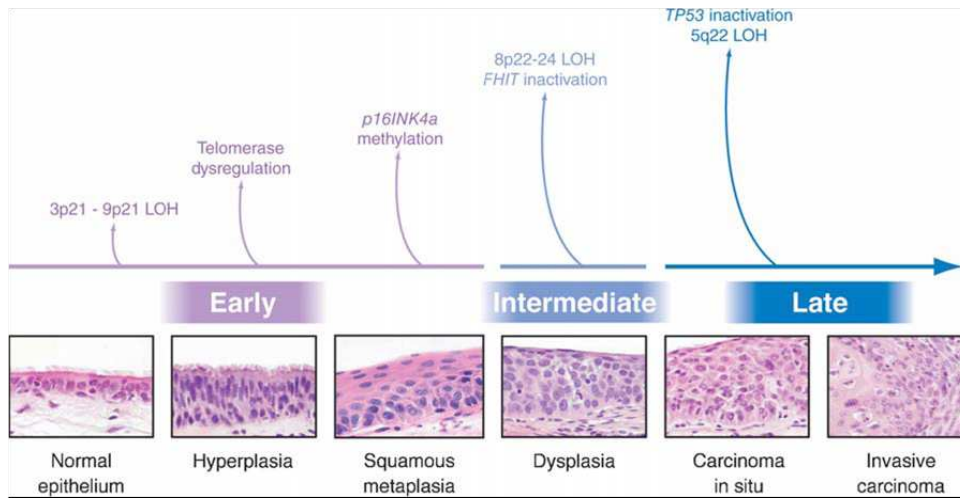


Şekil 2.5 Karsinogenez basamakları. Temelde karsinogenez basamakları 4 grupta değerlendirilir: Başlangıç basamağı, ilerleme basamağı, malign değişim basamağı ve tümör progresyon basamağı. Protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, farklı karsinojenik maddelere maruz kalma sonucu DNA hasarı ile sonuçlanan mutasyonel olaylardır. Mutasyonların birikimi çok evreli karsinogenezi oluşturur (Kufe vd 2003).

Bugüne kadar elde edilen veriler akciğer karsinogenez sürecinde, başlıca onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve *ERCC1*'in de içinde yer aldığı DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler olmak üzere farklı türdeki genlerin etkili olduğunu göstermiştir (Olaussen vd 2006, Azuma vd 2007, Bepler vd 2008). Şekil 2.6'da örnek olarak skuamöz hücreli karsinogenez sürecinde yer alan histopatolojik ve moleküler değişimler gösterilmiştir.

2.8.1. Protoonkogenler ve onkogenler

Protoonkogenler hücre içi sinyal iletim molekülleri, transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörleri olmak üzere 5 kategoride değerlendirilebilirler. Mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonal disregulasyon ile aktive olan bu genler, anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olarak karsinogenez sürecine katılırlar.



Şekil 2.6 Akciğerin skuamöz hücreli karsinom patogenezi süresince birbirini izleyen histopatolojik ve moleküler değişimler (Wistuba ve Gazdar 2006)

Onkogenler, normalde hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden protoonkogenlerden köken alan, fonksiyonu veya ifade değişimi sonucunda hücre bölünmesi ve proliferasyonunun anormal olarak uyarılmasına neden olan mutant genlerdir. Genelde normal hücre genlerinin (protoonkogenler) mutant allelleri olabildiği gibi telomerazları kodlayan veya apoptozu bloke eden genler de olabilirler.

Onkogenler proliferasyonu uyarma, tümör anjiyogenezini artırma ve apoptozu engelleme gibi özellikleriyle malign transformasyon oluşumuna katılırlar (Aktaş 2005).

Ras ailesi:

Ras ailesi, düşük moleküler ağırlıklı (20-35 kDa) ve intrinsik GTPaz aktivitesine sahip küçük GTPaz süper ailesidir. Bu süper aile insanlarda 100'den fazla üyeyi içermektedir. Bu süper ailede RAS, RHO, ARF, RAB, RAN ve RAD olmak üzere toplam 6 aile bulunur. İnsan kanserlerinin yaklaşık %30'unda *Ras* genlerinde onkogenik mutasyonlar gözlenir ve NSCLC'de sıklıkla *KRAS* mutasyonu rapor edilmiştir.

RAS ailesi H-RAS, K-RAS, M-RAS, N-RAS ve R-RAS olmak üzere 5 RAS proteini, RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B olmak üzere 4 RAP proteini ve RALA ve RALB olmak üzere 2 RAL proteini içerir. RAS proteinleri hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz regülasyonu ve hücre adezyonunu içeren farklı biyolojik süreçlerle ilişkilidirler. RAS, GTP'ye bağlanarak aktif hale gelir. RAS-GTP kompleksi mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadları, sinyal iletme ve transkripsiyon aktivatörleri (STATs) ve fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3Ks) olmak üzere 3 önemli sinyal yolağını aktive edebilir ve aktive olan sinyal yolağına göre hücrel yanıt şekillenir (Adjei 2001, Riely vd 2009).

Gao ve ark., NSCLC'li vakaların %48'inde *KRAS* nokta mutasyonunun varlığını bildirmişlerdir. *KRAS* mutasyonuna benzer olarak sigara içimi de akciğer kanser hastaları arasında yaygın bir özelliktir. Bu nedenle sigaraya maruz kalma ve *KRAS* mutasyonu arasında önemli bir ilişki olduğu düşünülmekle birlikte, Gao ve ark.'nın çalışmasında sigara içen ve sigara içmeyen NSCLC hastaları arasında *KRAS* mutasyonunun varlığı açısından bir farklılık gözlenmemiştir (Gao vd 1997).

Myc (Avian Myelositomatozis Viral Oncogene Homolog) ailesi:

Akciğer kanserinde *Myc* gen ailesinin üyeleri MYC, N-MYC ve L-MYC'dir. Bu genler translokasyon veya gen amplifikasyonu ile aktive edilen ve hücre döngüsü regülasyonunda önemli yeri olan nükleer fosfoproteinleri kodlarlar. *MYC* onkogeninin,

SCLC'nin varyant alt tipleri başta olmak üzere çeşitli insan tümörlerinde amplifiye olduğu rapor edilmiştir. *MYC* genlerinin birinin NSCLC'deki amplifikasyonu tümörlerin %8'i ve hücre dizilerinin %20'sinde bulunmuştur (Fong vd 1995).

NSCLC'nin %50'sinde mitojenik kaskadların (RAS-RAF-MEK-ERK) aktivatörlerini kodlayan genlerde mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu kaskadların aktivasyonu β -*katenin* ve *c-myc* genini indüklemekte ve hücre çoğalması ve farklılaşması gibi hücre sel yanıtına neden olmaktadır. Özellikle *c-myc* amplifikasyonu olan hücrelerde büyüme faktörü gereksinimi azalır, hücre döngüsünde G1 fazı kısalmır ve proliferasyon gözlenir. NSCLC'de *c-myc* geninde amplifikasyonu ile birlikte yeniden düzenlenmelerin gözlemlendiği ve bu değişimlerin tümör büyüme hızında artış ve sağkalım süresinde azalma ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Yokota vd 1988, Köktürk vd 2003).

Hücre içi sinyal iletim molekülleri ve nükleer transkripsiyon faktörleri:

Bu grupta başlıca *c-erb B-1*, *c-erb B-2*, *c-fms*, *c-met*, *c-src*, *c-raf-1*, *c-fos* ve *c-jun* yer alır. Bu genler, çeşitli büyüme faktörlerini ve reseptörlerini kodlarlar. Bazı akciğer kanser türlerinde ekspresyonlarının arttığı rapor edilmiştir.

Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR); tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteindir. EGFR; HER2/neu (Erb-B2), HER3 (Erb-B3) ve HER4 (Erb-B4) içeren EGFR ailesinin prototipik üyesidir. Her2 reseptör overekspresyonu NSCLC tümörlerinin %11-%32'sinde bulunur. NSCLC'li olguların %11-32'sinde EGFR ve HER2'nin yüksek düzeyde ifade edildiği ve artmış EGFR ve/veya HER2 ifadesinin ileri evre hastalık, metastatik fenotip gelişimi ve kötü prognozla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda, NSCLC'de *EGFR* veya *HER2* gen kopya sayılarındaki artışının kısa sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Cappuzzo vd 2005). Riely ve arkadaşları, *EGFR*'nin tirozin kinaz domain'indeki somatik mutasyonların NSCLC'de gefitinib ve erlotinibe karşı duyarlılıkla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada aynı zamanda, *EGFR* mutasyonlarının hiç sigara içmeyen hastalardan alınan tümörlerde daha yaygın olduğu belirtilmiştir. Jang ve arkadaşları, *EGFR* mutasyonlarının yüksek sıklıkta görüldüğünü ve *EGFR* mutasyonları ile cinsiyet, sigara içimi, histolojik derece, yaş, bronkoalveolar

komponentler veya kanser evresi arasında bir ilişkinin olmadığını saptamıştır. Aynı zamanda, *EGFR* mutasyonlu tümörlerin gefitinibe yüksek duyarlılıkta olduğu fakat anti-*EGFR* ajanlarına karşı hastaların farklı yanıtlar verdikleri gözlemlenmiştir (Jang vd 2009). Akciğer adenokarsinomlu hastalarda, *EGFR* mutasyonlarının yüksek sıklıkta görülmesi ve *EGFR* mutasyonlarının *K-ras* mutasyonlu tümörlerde hiç bulunmaması, *EGFR* mutasyonlarının pulmoner adenokarsinom tanı ve tedavisi için olası önemini göstermektedir (Jang vd 2009).

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, NSCLC'li hastalarda da *EGFR*'yi hedefleyen terapötik amaçlı en yaygın kullanılan ajan, HER2 monoklonal antikoru trastuzumab (herseptin)'dir. HER2'nin ekstraselüler domainine hedef alan bu insan monoklonal antikorunun, antikor bağımlı hücrel sitotoksitenin aktivasyonuna ve/veya HER2 reseptörünün degradasyonuna yol açarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Trastuzumab'ın aynı zamanda *PTEN* (fosfataz ve tensin homolog) aktivasyonunu ilerleterek ve PI3K/AKT yolunu inhibe ederek etki gösterebileceği de rapor edilmiştir (Swanton vd 2006).

Büyüme faktörleri ve büyüme faktörleri reseptörleri:

Büyüme faktörleri ve büyüme faktör reseptörleri; büyüme ve farklılaşmanın normal sürecinde fizyolojik rol oynarlar. Büyüme faktörünün reseptöre bağlanması reseptörün dimerizasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive reseptörler bir seri sitoplazmik proteinleri fosforilleyerek nükleusta transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve mRNA sentezinde artışa neden olur. mRNA translasyonu sonucu artan protein sentezi, hücrelerde hem büyümeye hem de farklılaşmaya yol açar (Rajkumar 2001).

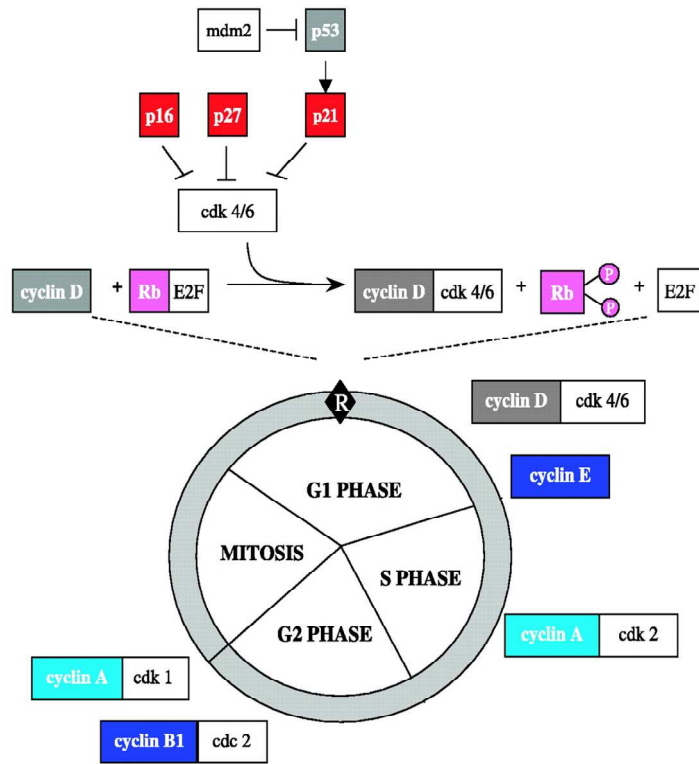
Büyüme faktörü reseptörleri; hücre dışı parça, transmembranöz parça ve hücre sitoplazmasındaki intrastoplazmik parçalardan oluşmaktadır. İntrasitoplazmik parça tirozin kinaz aktiviteli olup, bu aktivitenin uyarılması sonucu sinyal, sinyal iletili moleküller ile nükleusa iletilir. Eğer reseptörler onkogenik özellik kazanırsa, mutant reseptörler oluşur ve bunlar da hücre içine sürekli mitojenik sinyaller gönderirler (Ayhan 2007).

Hücre döngüsü ve regülasyonu

Hücre döngüsü regülasyonunu siklin adlı moleküller ile siklinlere bağlanan ve onları yıkan siklin bağımlı kinaz (cdk) molekülleri sağlar. Bu nedenle, siklinler ve onlarla ilişkili siklin bağımlı kinazlar (CDK) hücre döngüsü progresyonunu kontrol eden merkezi sistemdir. Bir kez aktive olunca, siklin/CDK'lar diğer proteinlerin ve siklin/CDK komplekslerinin fosforilasyonunu başlatan kompleksleri oluştururlar. Bu proteinlerdeki değişiklikler, hücre döngüsünün devam etmesine neden olur ve sonuçta malign fenotip oluşur.

G1-S geçişinde hücre döngüsünün durmaması, kontrol edilemeyen hücre proliferasyonuna sebep olabilir. Retinoblastom gen ürünü, G1-S geçişinde merkezi rol oynar (Jin vd 2001). İnsanlarda Cdk+siklinler, retinoblastom proteininin (Rb) fosforilasyonu sağlar ve hücre proliferasyonuna neden olurlar. *Rb*, tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gendir. Yapılan çalışmalar mesane ve meme kanseri gibi akciğer kanserli vakaların çoğunda da *Rb*'nin ortadan kalktığını ya da inaktive olduğunu göstermektedir (Dalay 2006).

Siklin D1 aşırı ifadesinin hücre döngüsünün regülasyonunda önemli olduğu bilinmektedir ve bu genin ekspresyonundaki artış G1 kısıtlama noktasının fonksiyon kaybına olanak sağlar. NSCLC'de siklin D1'in önemi ile ilgili bugüne kadar yapılan temel çalışmaların sonuçlarının birbirleriyle uyumsuz olduğu bulunmuştur ve bu çalışmalardan bazıları siklin D1 ekspresyonunun sağkalımda artışla ilişkili olduğunu belirtirken diğer çalışmalar sağkalım süresinde azalma ile ilişkili olduğunu belirtmektedir (Singhal vd 2005, Gautschi vd 2007) (Şekil 2.7). Evre I ve II ile yapılan bir başka çalışmada, siklin D1 ekspresyonu daha kısa sağkalım, daha kötü prognoz ve p16 ekspresyon kaybı ilişkilendirilmiştir (Jin vd 2001).



Şekil 2.7 Hücre döngüsü yolağı. NSCLC prognozunda belli hücre döngüsü genlerinin ifade artışının etkisi iyi, kötü ve tartışmalı olarak ve bu genlerin prognozla ilişkisinin belirlenmesinde elde edilen kanıt düzeylerine göre de güçlü ve zayıf olarak değerlendirildiğinde: **Kırmızı**; yüksek ekspresyon için güçlü kanıt = iyi prognoz, **Koyu pembe**; yüksek ekspresyon için zayıf kanıt = iyi prognoz, **Mavi**; yüksek ekspresyon için güçlü kanıt = kötü prognoz, **Fosfor yeşili**; yüksek ekspresyon için zayıf kanıt= kötü prognoz, **Gri**; tartışmalı prognostik marker, **Beyaz**; yeterli bilgi bulunmayanlar (Singhal vd 2005).

2.8.2. Tümör baskılayıcı genler (TSG)

p53:

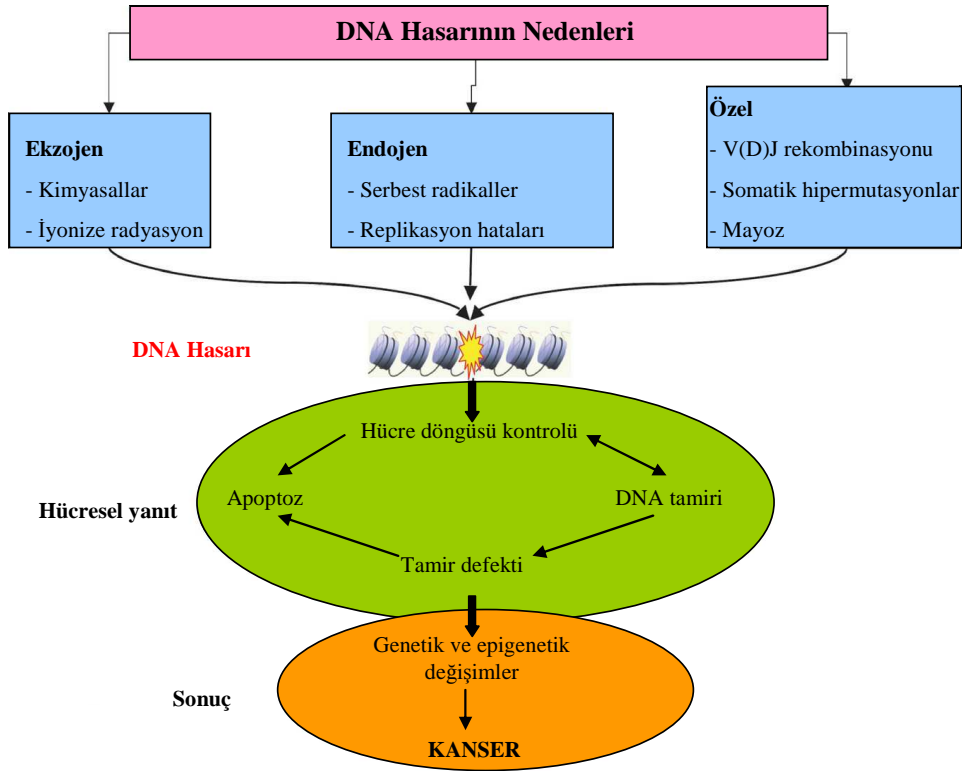
p53 geni DNA hasarında aktive olan ve hücre döngüsünün inhibisyonunu sağlayarak hücreyi son ana kadar korumaya çalışan bir tümör baskılayıcı gendir ve en önemli kontrol noktasını oluşturur. İnsan kanserlerinde en sık karşılaşılan mutant gen olup, 17p13 lokusuna yerleşmiştir. P53 proteini; DNA sentez ve tamiri, gen transkripsiyonu, genetik stabilitenin korunması, hücre döngüsünün durdurulması, büyümenin sonlandırması ve programlı hücre ölümleri olmak üzere temel hücresel fonksiyonlarda görev alır. *p53* gen fonksiyon kaybı sonucunda hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri yapılmaksızın hücre döngüsü kontrolsüz olarak çoğalır. *p53* gen mutasyonları karsinogenezin erken basamaklarında görülür ve *p53* ile birlikte *ras* mutasyonları, akciğer kanserinde erken tanıda önem taşırlar (Köktürk vd 2003).

Retinoblastom (*Rb*) geni:

Rb geni, tanımlanan ilk TSG'dir ve 13q14'de lokalizedir. Hücrel diferansiyasyonda çok önemli role sahiptir. Nonsense mutasyonlar, delesyonlar ile inaktive olabilir ve azalmış RNA ifadesi veya anormal protein yapımı ile sonuçlanabilir. NSCLC'lerin %10-40'ında *Rb* geninde homozigot delesyonlar ve nokta mutasyonları saptanmıştır. Aynı zamanda hem SCLC hem de NSCLC'de RB protein yokluğu rapor edilmiştir (Köktürk vd 2003).

2.8.3. DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler

Ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle, genetik materyalin moleküler bütünlüğünde meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır. Tamir edilmemiş DNA hasarı, apoptozun aktivasyon veya inhibisyonunda görev alan protoonkogen ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara neden olur (Şekil 2.8).

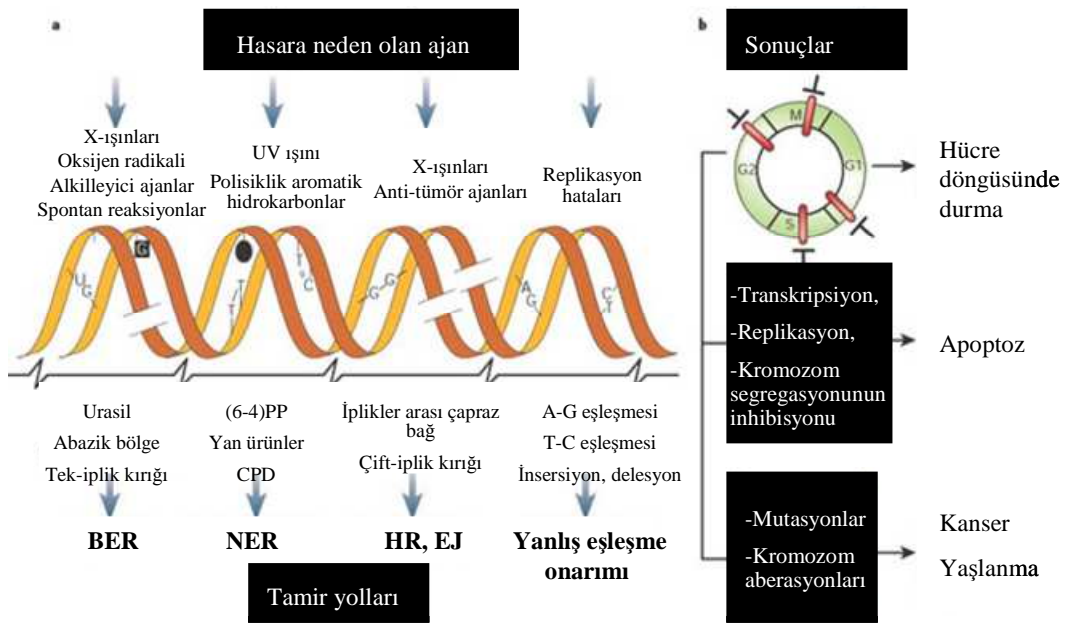


Şekil 2.8 DNA hasarına neden olan etmenler ve hücreyel yanıt (www.who.int adresinden alınmış ve Türkçe'ye çevrilmiştir)

2.8.3.1 Kesip-çıkarma (Eksizyon) onarımı

Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (BER):

Baz kesip-çıkarma onarımı, hasarlı tek bazın tanınıp DNA'dan uzaklaştırıldığı onarım mekanizmasıdır. DNA'daki hatalı baz, deoksiriboz ile baz arasındaki bağı koparan DNA glikozilaz tarafından çıkarılır. DNA glikozilaz etkinliğinin sonucu olarak DNA'da bazsız bir deoksiriboz (AP bölgesi) bölgesi oluşur. Bu bölge DNA zincirini kesen AP endonükleaz tarafından tanınır. Kalan deoksiriboz deoksiribozfosfodiesteraz ile uzaklaştırılır. Oluşan boşluk DNA polimeraz ile doldurulur ve ligaz ile bağlantı tamamlanıp, doğru bazın yerleştirilmesi sağlanır (Sercan, 2006).



Şekil 2.9 Kanser önlemede genomun korunma mekanizmaları: **a)** Yaygın DNA hasar ajanları (üstte); bu ajanlarla indüklenen DNA lezyonlarının örnekleri (ortada); ve lezyonların kaldırılmasından sorumlu en uygun DNA tamir mekanizması (en alt). **b)** Hücre döngüsünün ilerlemesinde DNA hasarının akut etkileri, G1, S, G2 ve M fazlarında (üstte) ve DNA metabolizmasında (ortada) durma ile etkisini gösterir. DNA hasarının uzun dönemde etkileri (altta), DNA dizisinde kalıcı değişiklikleri ve bu değişikliklerin biyolojik etkilerini içerir. Kısaltmalar: (6-4) PP ve CPD, sırasıyla 6-4 fotoürün ve siklobütan pirimidin dimeri (her ikisi de UV ile indüklenir); BER ve NER, sırasıyla baz ve nükleotid eksizyon tamiri; HR, homolog rekombinasyon ve EJ, end joining (Hoeijmakers vd 2001 makalesinden alınmış ve Türkçe'ye çevrilmiştir).

Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (NER):

DNA onarım mekanizmaları arasında NER mekanizması, ultraviyole ışığın neden olduğu deri kanserinden sorumlu DNA hasarlarının onarımını sağlayan en önemli mekanizmadır. Bunların dışında sigara içenlerde akciğer kanserine yol açan benzo (α) piren guaninin oluşturduğu DNA hasarları, polisiklik karsinojenler, karaciğer kanserine neden olduğu belirtilen asetilaminofluoren guaninin oluşturduğu DNA hasarları ve kanser tedavisinde kullanılan bazı kemoterapotiklerin oluşturduğu DNA hasarları da bu mekanizma ile onarılmaktadır (Şekil 2.9). Baz kesip-çıkarma onarım mekanizmasının yeterli olmadığı hallerde de etkili olduğu belirlenmiştir (Kulaksız ve Sancar 2007). Sigaradaki kimyasalların DNA'ya bağlanmasıyla oluşan yapılar, NER mekanizması ile onarılırlar (Neumann vd 2005).

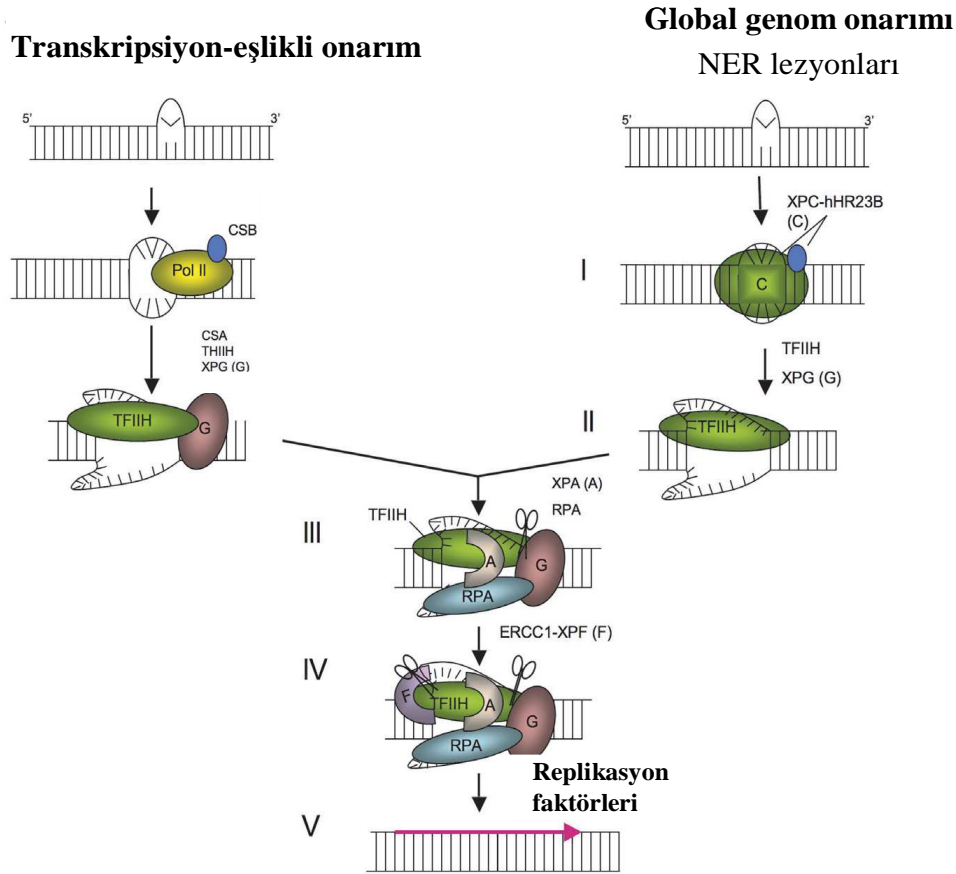
E.coli'de nükleotid çıkarma onarımı; *uvrA*, *uvrB* ve *uvrC* genlerinin ürünleri tarafından katalizlenir. UvrA proteini hasarlı DNA'yı tanır, UvrB ve UvrC'nin hasarlı bölgeye gelmesini sağlar. UvrB ve UvrC birlikte hasarlı bölgeyi sırasıyla 3' ve 5' kısımlarından keserek, oligonükleotid parçayı çıkarırlar. UvrABC kompleksi, oligonükleotid çıkarabilme özelliği nedeniyle eksinükleaz olarak da adlandırılmaktadır. Oluşan boşluk DNA polimeraz I ile doldurulup, ligaz ile uçlar bağlanır.

Memelilerde NER mekanizmasının basamakları;

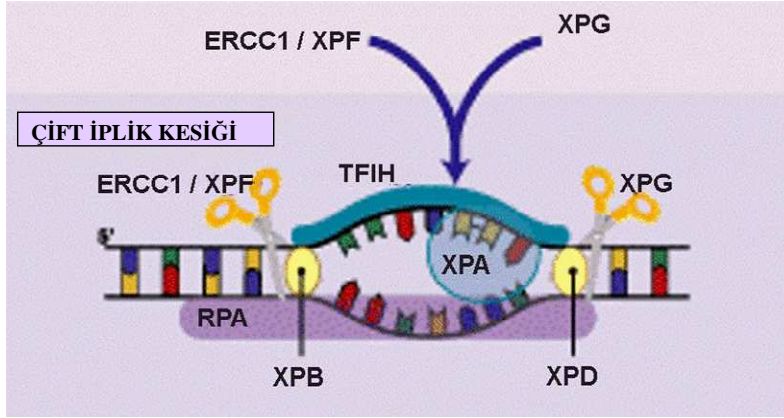
- 1) Hasarın tanınması,
- 2) Protein kompleksinin hasarlı bölgeye bağlanması,
- 3) Hasarlı bölgeyi içeren yaklaşık 24-32 nükleotid uzunluğunda bir fragmanın kesilmesi (eksizyon),
- 4) Hasarlı bölgeyi içeren bu oligonükleotid fragmanının uzaklaştırılması (degredasyon),
- 5) Hasarlı DNA sarmalı üzerinde oluşan boşluğun DNA polimeraz enzimleri ile doldurulması (polimerizasyon),
- 6) Ligasyon'dur (Şekil 2.10).

Memeli hücrelerindeki NER mekanizmasında, 30'dan fazla protein görev almaktadır (Costa vd 2003). Kseroderma pigmentosum (XP), Cockayne Syndrome (CS) ve Trichothiodystrophy (TTD) sendromlu bireylerin NER mekanizmasında bozukluklar belirlendiğinde, bu mekanizmada görev alan genler ve proteinler sendrom kısaltmaları ile adlandırılmışlardır (Örneğin, XPA, B, C proteini gibi). NER yolu XPA, Excision Repair-Cross Complementing Group 1 (*ERCC1*), *ERCC2/XPD*, *ERCC4/XPF* ve *ERCC5/XPG*'nin yer aldığı excision repair-cross complementing group (*ERCC*) veya Kseroderma Pigmentosum (*XP*) olarak adlandırılan pek çok gen içerir (Hanawalt vd 2003). NER mekanizmasında, DNA hasarı XPC/Hhr23B kompleksi tarafından tanınır. XPB, XPD ve XPG proteinleri hasarlı bölgeye gelir. XPB ve XPD transkripsiyon faktörünün (TFIIH) bileşenidir ve helikaz aktivitesine sahiptir. XPA proteini ile hasar doğrulanır. Yapı-spesifik endonükleazlardan XPF (Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F, *ERCC4*), kendi katalitik partneri olan *ERCC1* ile XPF-*ERCC1* heterodimeri oluşturulmasında etkindir. XPF-*ERCC1* heterodimeri, memeli NER eksizyon kompleksine katılan son faktördür. XPF/*ERCC1* heterodimeri ve XPG, hasarlı DNA'yı sırasıyla 5' ve 3' bölgelerinden kesen endonükleazlardır (Şekil 2.11).

Aynı zamanda XPF-ERCC1 heterodimerinin rekombinasyonel DNA tamirinde ve DNA baz paylaşım hataları tamirinde de yer aldıkları bilinmektedir (Niedernhofer vd 2004, Cummings vd 2006). NER mekanizmasının son basamağında, hasarlı oligonükleotidin çıkarılmasıyla oluşan boşluk DNA polimeraz ile doldurulur ve ligaz ile bağlantı tamamlanır.



Şekil 2.10 Nükleotid eksizyon onarımının evreleri: UV ve karsinojenle uyarılan DNA lezyonlarının kaldırılmasını içeren 2 çeşit NER yolu vardır. NER yolu hasar tanıma proteinleri (XPA, XPC, RPA), helikazlar (XPB, XPD) ve nükleazlar (XPF, XPG) olmak üzere çok sayıda protein içerir. Transkripsiyon-eşlikli NER yolunda, DNA lezyonları RNA polimeraz II durunca tanımlanırken, global genom NER’de lezyonlar XPC ve hHR23B proteinleri ile tanınır (I). Lezyonların tanıma aşamasından sonraki tüm aşamalar benzerdir. TFIIH transkripsiyon faktörü ile birlikte bulunan XPB ve XPD helikazları, lezyonun bulunduğu bölgedeki çift iplikli DNA’yı çözer (II). Tek-ipliğe bağlanan bir protein olan RPA, ara yapıyı stabilize eder (III). XPG ve ERCC1-XPF, lezyonu içerecek şekilde hasarlı ipliği kenarlarından keser (IV). DNA replikasyon faktörleri ile boşluklar dolar (V). (www.who.int adresinden alınmış ve Türkçe’ye çevrilmiştir).



Şekil 2.11 ERCC1/XPF heterodimeri ve XPG'nin hasarlı DNA'yı sırasıyla 5' ve 3' bölgelerinden kesimi (www.ecancermedicalscience.com adresinden alınmıştır)

NER mekanizmasının alternatif formu, transkripsiyon eşlikli onarım (transcription-coupled repair) olarak adlandırılır ve aktif transkribe edilen gen içerisindeki hasarların onarımını gerçekleştirir. RNA polimeraz, transkribe olan DNA ipliğindeki hasarla karşılaşınca durur. Duran RNA polimerazı, Cockayne sendromundan sorumlu genler tarafından kodlanan CSA ve CSB proteinleri tanır. Onarım daha sonra genel NER mekanizması ile gerçekleştirilir (Sercan 2006).

Yanlış eşleşme onarımı (Mismatch repair):

Bu onarım DNA replikasyonunda yanlış eşleşmiş bazları tanır. Birçok yanlış eşleşmiş baz DNA polimerazın kendi yanlışını düzeltme etkinliği ile uzaklaştırılırken, düzeltilmeyenler yeni sentezlenmiş DNA'yı tanıyan yanlış eşleşme onarım sistemi ile onarılır. Yanlış eşleşme onarım sistemi *E. coli*'de yeni sentezlenen DNA'yı metillenmemiş olmasıyla atasal iplikten ayırt edip yanlış eşleşmiş bazı bulma esasına dayanır. Bu onarımda MutS, MutL, MutH gen ürünleri rol oynar. Memelilerde de benzer proteinlerin görev aldıkları bilinmektedir (Sercan 2006).

2.8.4. Genetik varyasyonlar: mutasyonlar ve polimorfizmler

Mutasyon, DNA'nın nükleotid dizilerinde veya düzenlenmelerinde görülen değişikliklerdir. Genom mutasyonları, kromozomun hatalı ayrılması sonucu olduğundan hücrede kromozom sayılarını etkiler (anöplöidi). Kromozom mutasyonları, kromozomların yapılarını değiştiren mutasyonlardır ve kromozomun

yeniden düzenlenmesi ile oluşur. Kromozom mutasyonlarına duplikasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlar örnek verilebilir. Gen mutasyonları ise DNA dizilerindeki değişikliklerdir. Gen mutasyonlarına örnek olarak nokta mutasyonları verilebilir (Emre 2005).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) genom dizisindeki tek nükleotid değişimleridir. İnsan genomunda %0,1'lik yapısal farklılığın büyük kısmını SNP'ler oluştururlar. SNP'ler genlerin protein kodlayan ekzonlarında ve protein kodlamayan intronlarında bulunur. Genin ekzonlarındaki bir nükleotid değişimi aminoasidin farklı şekilde kodlanmasına neden olacak ve aminoasidin yapısında farklılığa göre proteinin ağır fonksiyon kaybindan daha hafif kayıplara kadar değişen oranlarda etkileşimine yol açacaktır. Genomun çok küçük bir bölümü gen kodladığından, SNP'lerin çoğu gen kodlamayan bölgelere yerleşiktir. Gerek kodlayan bölgelerde gerekse kodlamayan bölgelerde var olan SNP'ler bireylerin hastalığa yatkınlık derecesini, aynı hastalığın farklı bireyler arasında neden farklı seyrettiğini, bireylerin neden tedaviye farklı şekilde yanıt verdiğini anlamada önemli veriler sağlarlar. (Battaloğlu ve Başak, Gündüz vd 2009).

Genetik çeşitliliğe yol açan değişikliklerden biri olan polimorfizmlerin çoğunluğu yukarıda bahsedildiği gibi tek nükleotid düzeyindedir (insanda on milyon kadar). Ancak ikili, üçlü nükleotid tekrar sayılarında değişiklikler ve daha az da kromozom düzeyinde bazı yapısal düzenlemeler olarak da genetik polimorfizmler gözlenmektedir (Ekmekçi vd 2008) .

İnsan Genom Projesi'nin tamamlanması ile birlikte elde edilen bilgilerin daha iyi anlaşılması, klinik veriler arasında bağ kurulabilmesi ve klinik kullanıma dönüştürülmesi için başlatılan projelerin başında genomun haplotip haritasının oluşturulması yer almaktadır. Herhangi 2 insanın DNA dizisi %99.5 benzerlik göstermesine karşın geride kalan küçük bir oranın genetik varyasyonların açıklanmasında büyük öneme sahip oldukları düşünülmektedir. Bu amaçla, insan genomundaki DNA dizi varyasyonlarının ortak paternlerini belirlemek amacı ile Uluslararası HapMap Projesi planlanmış ve yapılmıştır (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Bu proje çerçevesinde gelecekte beklenen yararlar herhangi bir hastalığı etkileyen dizi varyantlarının ortaya çıkarılması, tanı araçlarının

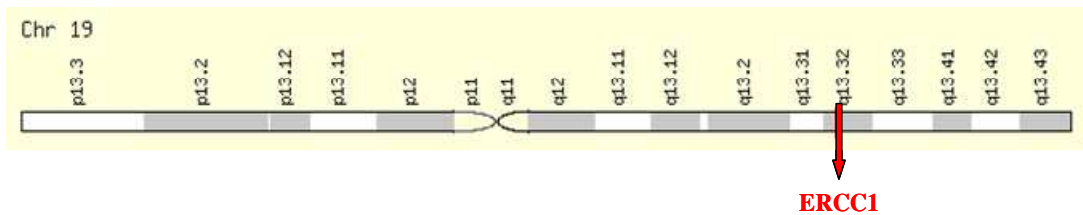
gelişimini kolaylaştıracak hedeflerin belirlenmesi ve tedavi amacı ile kullanılacak hedeflerin belirlenmesi olarak sıralanmıştır. Ayrıca, HapMap Proje verilerinin çevresel faktörlere farklı yanıtların alınmasından sorumlu genetik faktörlerin belirlenmesinde de güçlü veri kaynağı olacağı beklenmektedir. Ekim 2002'de başlayan proje, dünyanın birçok ülkesinden çeşitli araştırma laboratuvarlarının işbirliği ile yürütülmektedir. Proje 3 aşama olarak planlanmıştır. Her aşamada Afrika, Avrupa ve Asya kökenli ırklardan alınan DNA örneklerinden yararlanılarak insan türünün genetik yapısındaki çeşitli varyasyonlara ait bilgiler ortaya konmaktadır.

Akciğer kanser hastaları sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında daha düşük DNA tamir kapasitesine sahip oldukları bulunmuştur (Shen vd 2003) ve moleküler epidemiyolojik çalışmalar, varyant DNA tamir genotiplerinin akciğer kanserine yatkınlığı etkileyebildiğini göstermektedir (Misra vd 2003, Hung vd 2005).

2.8.4.1. Excision repair-cross complementing group 1 (*ERCC1*) geni ve polimorfizmleri

Gen; fonksiyonel bir ürün oluşturmak için gerekli olan DNA dizisi olarak tanımlanır. Bu ürün bir polipeptid veya fonksiyonel RNA molekülü olabilir (Yurter 2005).

ERCC1 geni kromozom 19q13.2- q13.3'e lokalizedir ve 15 kb'dan büyük bir genoma yayılmış 10 ekzona sahiptir (Şekil 2.12). *ERCC1* proteini 297 aminoasitlik bir proteindir ve moleküler ağırlığı yaklaşık 32,5 kDa'dur (Park vd 1995).



Şekil 2.12 *ERCC1* geninin lokalizasyonu (www.genecards.org adresinden alınmıştır.)

ERCC1 geni gibi DNA tamir mekanizmasında yer alan genlerdeki polimorfizmler, DNA tamir kapasitesinde farklılıklara neden olabilirler ve yüksek düzeyde *ERCC1* proteinini eksprese eden, yüksek tamir kapasitesine sahip olan akciğer hücrelerinde karsinogenez sürecini başlatabilirler veya etkileyebilirler. NSCLC'lerinde farklı *ERCC1* gen plimorfizmlerinin farklı fonksiyonları ilgili farklı çalışmalar bulunmakla birlikte, T19007C (rs11615) ve C8092A (rs3212986) SNP'leri bu çalışmalarda yer alan en yaygın iki polimorfizmdir (Isla vd 2004, Zhou vd 2005, Zienolddiny vd 2006).

ERCC1'in kodon 118'inde C/T değişimi ile karakterize T19007C SNP'inin, *ERCC1* ekspresyon değişiminin bir belirteci olarak fonksiyonel öneme sahip olabileceği rapor edilmiştir (Smith vd 2007). Bu polimorfik kodon aynı aminoasidi yani asparajini kodlar, ancak kodon AAC ile karşılaştırıldığında AAT kodonunun transkripsiyonunda %50'lik bir azalma olduğu gösterilmiştir (Yu vd 1997). Aynı zamanda CC genotipinin akciğer kanseri risk azalması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Zienolddiny vd 2006).

ERCC1 C8092A polimorfizmi, genin 3' UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan bir sessiz varyanttır ve mRNA stabilitesini etkilediği rapor edilmiştir. NSCLC'lerinde hem kemosenitivite hem de kanser riski açısından birçok çalışmada değerlendirilmiş bir parametredir (Zhou vd 2004, Zhou vd 2005, Takenaka vd 2009). Takenaka ve ark, C8092A polimorfizminde CA genotipini lenfatik invazyon pozitif olgulu hastalarda daha sık gözlemlemişlerdir (Takenaka vd 2009). Birçok çalışmada da C8092A CC genotipinin daha iyi klinik sonuçla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Zhou vd 2004, Takenaka vd 2009).

Lee ve arkadaşları, platinyum bazlı kemoterapi ile tedavi edilmiş ileri evre NSCLC hastalarında P53, Bax, Bcl-2 (apoptozla ilişkili proteinler) ve *ERCC1* proteininin prognozla ilişkisini araştırmışlardır. P53, Bcl-2, Bax'ın yüksek ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olmadığını ve *ERCC1*'in yüksek ekspresyonunun platinyum bazlı palyatif kemoterapi ile tedavi edilmiş ileri evre NSCLC hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Lee vd 2009).

Azuma ve arkadaşları, sisplatin ve dosetakselli eş zamanlı kemoradyoterapi alan NSCLC hastalarında sınıf III β -tubulin ekspresyonunun sağkalım ile ilişkili olmadığını, *ERCC1* için negatif hastaların *ERCC1* için pozitiflerden daha yüksek kemoterapi yanıt

oranına ve daha uzun ilerlemeden bağımsız sağkalım (progression free survival)'a sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ERCC1 protein ekspresyon düzeyinin belirlenmesinin, bireye-özü kemoterapi düzenlenmesi için bilgi sağlayabileceğini ve bir marker olarak değerlendirilebileceğini öne sürmüşlerdir (Azuma vd 2009).

3. MATERYAL-METOD:

3.1. Materyal

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi Patoloji Bölümü'nde, histopatolojik olarak incelenen ve NSCLC tanısı alan 92 adet %10 formaldehit solusyonu ile tespit edilmiş ve sonrasında parafin bloklara gömülmüş (FFPE) doku örneği kullanıldı. Doku örneklerinin elde edildiği vakalara ait yaş, cinsiyet, sigara içimi, TNM evre ve histolojik tip olmak üzere tüm klinikopatolojik parametreler, patoloji raporları yeniden incelenerek kaydedildi.

3.2. FFPE Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

FFPE akciğer doku örneklerinden DNA izolasyonları ticari kit yardımıyla yapılmıştır (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Almanya). DNA izolasyonu için uygulanan basamaklar aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Dokuların etrafını saran fazla parafin bölümleri steril bistüri ve pens yardımıyla mekanik olarak uzaklaştırıldı.
2. Deparafinizasyon amacıyla, tüm örneklere 1200 µl ksilen (Merck) eklenip, kuvvetlice vortekslendi. 56 °C' ye ayarlı etüvde bir gece (en az 16-18 saat) inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrası, örnekler oda ısısında 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Mikropipet yardımıyla pelete dokunulmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Tüm örneklere tekrar 1200 µl ksilen eklendi, kuvvetlice vortekslendi, oda ısısında 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Mikropipet yardımıyla pelete dokunulmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Rezidüe ksileni uzaklaştırmak için 1200 µl etanol (Merck) (%96-100) eklendi ve kuvvetlice vortekslendi. Oda ısısında 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Mikropipet yardımıyla pelete dokunulmadan etanol uzaklaştırıldı.

6. Tüm örnekler tekrar 1200 µl etanol (%96-100) eklendi ve kuvvetlice vortekslendi. Oda ısısında 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Mikropipet yardımıyla pelete dokunulmadan etanol uzaklaştırıldı.

7. Etanolün tamamen uzaklaşması için 37 °C etüvde 15 dk inkübe edildi.

8. İnkübasyon sonrası doku peleti, 180 µl doku lizis tamponunda (Buffer ATL) süspanse edildi. 20 µl proteinaz K eklendi ve vorteksenerek karıştırıldı. Dokunun lizise olması için 56°C'ye ayarlı su banyosunda bir gece inkübasyona bırakıldı.

9. İnkübasyon sonrası örnekler 200 µl lizis tamponu (Buffer AL) eklendi, 15 sn kuvvetlice vortekslendi (pulse-vorteks) ve 70 °C'de 10 dk inkübe edildi.

10. İnkübasyon sonrası örnekler 200 µl etanol eklendi ve 15 sn kuvvetlice vortekslendi (pulse vorteks) ve kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.

11. Karışım, kitle sağlanan QIAamp Mini spin kolonlara aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonlar kitle sağlanan temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı.

12. Dikkatlice spin kolonlar açıldı ve 500 µl yıkama tamponu (Buffer AW1) eklendi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonlar temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı.

13. Dikkatlice spin kolonlar açıldı ve 500 µl yıkama tamponu (Buffer AW2) eklendi. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.

14. Kolonlar tekrar temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı. 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

15. Kolonlar steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpleri atıldı. 100 µl elusyon tamponu (Buffer AE) kolonlara eklendi. Oda ısısında 1 dk inkübe edildi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

16. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

3.2.1. Genomik DNA örneklerinin konsantrasyonlarının ve saflık değerlerinin belirlenmesi

92 adet NSCLC doku örneklerinden izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri, spektrofotometrik yöntemle (Biophotometer, Eppendorf) belirlendi. Ölçümler sırasında tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri (Eppendorf) kullanıldı.

Konsantrasyon ölçümü yapılmadan önce, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde DNA örneklerinin 1/50 oranında dilüsyonları hazırlandı. Bu amaçla, mikrosantrifüj tüplerine 49 µl steril, DNaz-free su konuldu ve izole edilen DNA örneklerinden 1 µl alınıp suyun içerisine bırakıldı. Mikropipet yardımı ile 5 kez pipetaj yapılarak homojenize edildi. Daha sonra hazırlanan örnekleri tek kullanımlık spektrofotometre küvetlerine aktarıldı. Konsantrasyon ölçümleri, spektrofotometrenin dsDNA programında gerçekleştirildi ve her örneğin “konsantrasyon, A260, A280 ve A260/280 değerleri” kaydedildi.

3.3. Gerçek-zamanlı PCR (Real-time PCR)

ERCC1 geni T19007C (rs11615) ve C8092A (rs3212986) SNP analizleri, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 2.0, Roche, Almanya) kullanılarak yapıldı. Hedef T19007C ve C8092A SNP'lerinin belirlenmesi amacıyla, sırasıyla 197 bç ve 143 bç'lik fragmanların çoğaltılmasında kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin dizaynı Tıp Molbiol (Berlin, Almanya) tarafından yapıldı. Kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri Tablo 3.1 ve 3.2'de gösterildi.

Tablo 3.1 *ERCC1* T19007C SNP analizinde kullanılan primerlerin ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')

Primer sense	5'-TTCCTGAAGTCTGGGGTGG-3'
Primer antisense	5'-GGCCCTGTGGTTATCAAGG-3'
Prob 1	5'-CGCAACGTGCCCTGGGAAT-3'-FL*
Prob 2	**640-5'-TGGCGACGTAATCCCGACTATGTGCTG-3'

* FL: Floresin, ** 640: LightCycler Red 640 Fluorasan boya.

Tablo 3.2 *ERCC1* C8092A SNP analizinde kullanılan primerlerin ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimi (5' → 3')

Primer sense	5'-AGAGGAAGAAGCAGAGTCAGGAAAG-3'
Primer antisense	5'-GCAGTCTCTGGGGAGGGATT-3'
Prob-1	5'-GACAAGAAGCGGAAGCAGCAGC-3'-FL*
Prob-2	**640-5'-GCAGCAGCCTGTGTAGTCTGCCCCC-3'

* FL: Fluoresin, ** 640: LightCycler Red 640 fluorasan boya.

Gerçek-zamanlı PCR'da her bir SNP analizi için hazırlanan reaksiyon karışımları Tablo 3.3'de gösterildi. Her bir içerik belirtilen sıra ve miktarlarda ependorf tüpüne aktarıldı ve homojenize edildikten sonra kapiller tüplere 18µl olacak şekilde paylaştırıldı. Her bir kapiller tüpe 2 µl DNA örneği eklendi. Negatif kontrol için, DNA örneği yerine 2 µl 'PCR-grade' su kullanıldı. Toplam 20 µL reaksiyon karışımı içeren kapillerler, karusel yardımı ile hedef bölgenin çoğaltılması ve SNP analizi için LightCycler® 2.0 gerçek-zamanlı PCR sistemine yerleştirildi.

Tablo 3.3 T19007C ve C8092A SNP analizi için hazırlanan reaksiyon karışımları

İçerik	Hacim	Final konsantrasyon (T19007C SNP için)	Final konsantrasyon (C8092A SNP için)
PCR-grade su	6,8 µl	-	-
MgCl ₂	1,2 µl	1,5 µM	1,5 µM
Primer sense	2 µl	0,5 µM	0,5 µM
Primer antisense	2 µl	0,5 µM	0,5 µM
Prob 1 (FL)	2 µl	0,045 µM	0,009 µM
Prob 2 (LC 640)	2 µl	0,045 µM	0,009 µM
HybProbe karışım	2 µl	1 X	1 X
DNA örneği	2 µl	-	-
Toplam hacim	20 µl		

Her iki SNP analizi için, SNP analizlerine özgün primer-prob setlerinin Tm dereceleri ve bu setle çoğaltılacak hedef bölgenin büyüklüğüne göre, gerçek-zamanlı PCR protokolünün optimizasyon çalışmaları yapıldı. İlk olarak hedef bölgenin amplifikasyonu sağlandı ve daha sonra amplikonun identifikasyonu erime eğri analizi (melting curve analysis) ile yapıldı. Her iki SNP analizi için optimize edilen gerçek-zamanlı PCR protokolleri Tablo 3.4 ve Tablo 3.5’de verildi.

Tablo 3.4 T19007C SNP için gerçek-zamanlı PCR protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	-
Amplifikasyon					
	45	Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
		Annealing	60 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	10 sn	-
Erime eğrisi					
	1	Denatürasyon	95 °C	30 sn	-
		Annealing	45 °C	20 sn	-
		Melting	80 °C	0 sn	Sürekli
slope=0.2°C/sn					
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; **Pre-inkübasyon:** Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon:** Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması, **Erime eğrisi:** Amplikona ait genotipin belirlenmesi (SNP analizi), **Soğutma:** Sistemde yer alan rotorun ve termal haznenin soğutulması basamaklarını içermektedir.

Tablo 3.5 C8092A SNP için gerçek-zamanlı PCR protokolü

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	-
Amplifikasyon					
	45	Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
		Annealing	59 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	12 sn	-
Erime eğrisi					
	1	Denatürasyon	95 °C	30 sn	-
		Annealing	45 °C	20 sn	-
		Melting	80 °C	0 sn	Sürekli
slope=0.2°C/sn					
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

3.4. İstatistiksel Analiz

Tüm analizler, SPSS programı (version 10.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ile χ^2 testi yapılarak *ERCC1* geni C8092A ve T19007C polimorfizmleri ile yaş, cinsiyet, sigara içimi, TNM evre ve histolojik tip olmak üzere klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkinin önemli olup olmadığı karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar için $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR:

4.1. NSCLC’li Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler

Toplam 92 hastadan 12 hastanın bazı klinikopatolojik parametrelerine ulaşamadığı için, C8092A ve T19007C polimorfizmlerinin klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi 80 hastada değerlendirildi. Toplam 80 hastanın yaş, cinsiyet, sigara içimi, TNM evre ve histolojik alt tip olmak üzere tüm klinikopatolojik özellikleri Tablo 4.2’de özetlenmiştir. TNM evreleme kendi içinde ayrıca patolojik evre, lenf nodu ile ilişkili evre ve klinik evre olmak üzere 3 ayrı grupta daha değerlendirildi. Patolojik evre, patolojik evre tarafından tümörün mikroskop yardımıyla değerlendirildiği evredir ve T1, T2, T3 ve T4 olmak üzere gruplandırıldı. Lenf nodu ile ilişkili evre, bölgesel lenf nodu metastaz varlığını belirtir ve N0 (Lenf nodu metastazı yok) ve N1 (Lenf nodu metastazı var) olmak üzere temelde 2 grupta değerlendirildi. Uzak bölgelere metastazın varlığı da M0 (Uzak metastaz yok) ve M1 (uzak metastaz var) olmak üzere 2 grupta değerlendirildi. Bu her bir tiplendirmenin birlikte değerlendirildiği TNM evreleme sistemi temelde evre I, evre II ve evre III olarak ve detayda da IA, IB, IIA, IIB, IIIA ve IIIB olmak üzere toplam 6 klinik evrede toplandı (Tablo 4.1).

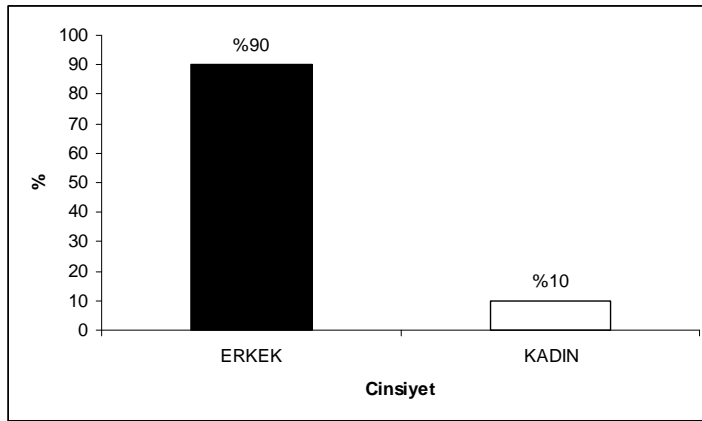
Tablo 4.1 TNM evreleme sistemine göre klinik evrelerin belirlenmesi (Yılmazbayhan 2007)

Evre IA	T1N0M0
Evre IB	T2N0M0
Evre IIA	T1N1M0
Evre IIB	T2N1M0 / T3N0M0
Evre IIIA	T1N2M0 / T2N2M0 / T3N1M0 / T3N2M0
Evre IIIB	T(T1,T2,T3)N3M0 / T4 N(N0,N1,N2,N3)M0

Tablo 4.2 NSCLC hastalarına ait klinikopatolojik parametreler

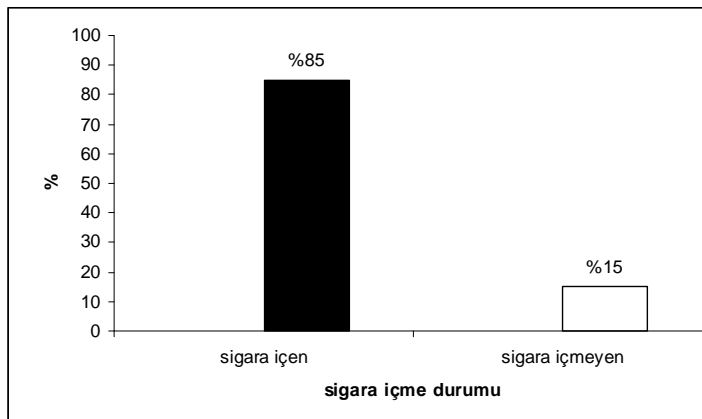
Parametre	Hasta Sayısı (%)
Yaş	55
>50	57 (%71)
<50	23 (%29)
Cinsiyet	
Erkek	72 (%90)
Kadın	8 (%10)
Sigara içimi	
Sigara içenler	68 (%85)
Sigara içmeyenler	12 (%15)
Patolojik evre	
T1	5 (%6,25)
T2	59 (%73,75)
T3	14 (%17,5)
T4	2 (%2,5)
Lenf nodu ile ilişkili evre	
N0	22 (%27,5)
N1	58 (%72,5)
Klinik evre	
IA	3 (%3,75)
IB	13 (%16,25)
IIA	1 (%1,25)
IIB	46 (%57,50)
IIIA	15 (%18,75)
IIIB	2 (%2,5)
Histolojik alt tip	
Skvamöz hücreli karsinom	45 (%56,96)
Adenokarsinom	27 (%34,17)
Bronkioloalveolar karsinom	2 (%2,53)
Adenoskuamöz karsinom	2 (%2,53)
Büyük hücreli karsinom	2 (%2,53)
Müsinöz karsinom	1 (%1,26)

Bu çalışmada değerlendirilen NSCLC'li olguların 8 (%10)'i kadın ve 72 (%90)'si erkek olgu idi (Şekil 4.1).



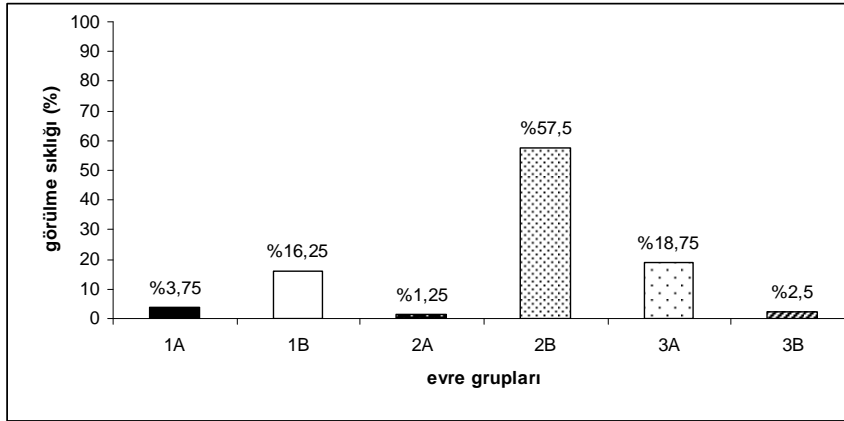
Şekil 4.1. NSCLC'li olguların cinsiyete göre dağılımları

Toplam 80 NSCLC'li olgunun özgeçmişinde 68 (%85) olgunun sigara içtiği ve 12 (%15) olgunun da sigara içmediği belirlendi (Şekil 4.2).



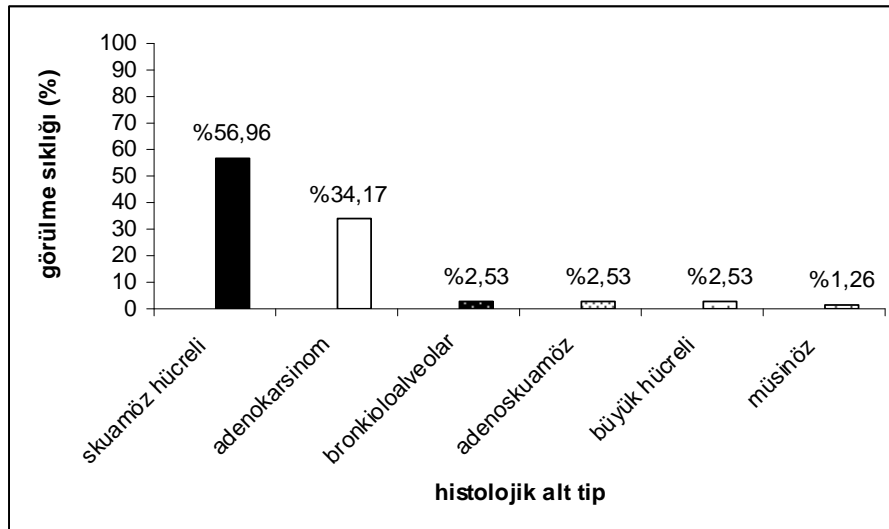
Şekil 4.2 NSCLC'li olgulara ait sigara içen ve sigara içmeyen grupların dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 80 NSCLC'li olguya ait klinik evre grupları ise, evre I'de 16 olgu (evre IA=3 ve evre IB=13 olgu), evre II'de 47 olgu (evre IIA=1 ve evre IIB=46 olgu) ve evre III'de 17 olgu (evre IIIA=15 ve evre IIIB=2 olgu) olarak dağılım gösterdi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 NSCLC'li olguların klinik evrelere göre dağılımı

Klinikopatolojik parametrelerden histolojik alt tiplerin dağılımı değerlendirildiğinde 45 olgunun (%56,96) skuamöz hücreli karsinom, 28 olgunun (%34,17) adenokarsinom, 2 olgunun (%2,53) bronkioloalveolar karsinom, 2 olgunun (%2,53) büyük hücreli karsinom, 2 olgunun (%2,53) adenoskuamöz karsinom ve 1 olgunun (%1,26) da müsinöz karsinom olduğu belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 NSCLC'li olgulara ait histolojik alt tip dağılımları

4.2. Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyonları ve Saflık Değerleri

Toplam 80 adet NSCLC'li dokulardan izole edilen DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.3'de gösterildi.

Tablo 4.3 DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri

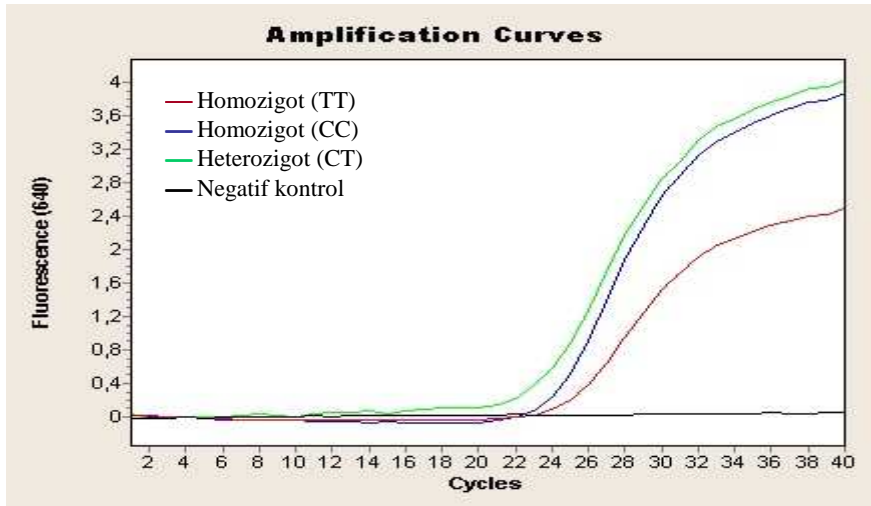
Örnek no	Stok Konsantrasyon (µg/ml)	A260	A280	A260/A280
1	515	0,205	0,113	1,82
2	715	0,286	0,158	1,81
3	425	0,170	0,095	1,79
4	345	0,138	0,078	1,77
5	215	0,086	0,054	1,60
6	295	0,117	0,067	1,74
7	385	0,153	0,088	1,74
8	300	0,120	0,072	1,67
9	675	0,269	0,150	1,80
10	755	0,302	0,168	1,81
11	215	0,087	0,048	1,82
12	395	0,159	0,088	1,79
13	330	0,132	0,072	1,83
14	415	0,167	0,094	1,77
15	205	0,082	0,044	1,87
16	255	0,102	0,052	1,95
17	620	0,248	0,131	1,89
18	515	0,206	0,113	1,82
19	400	0,161	0,085	1,89
20	475	0,189	0,102	1,86
21	850	0,339	0,189	1,79
22	330	0,133	0,075	1,77
23	795	0,319	0,174	1,84
24	955	0,383	0,203	1,88
25	330	0,132	0,073	1,80
26	270	0,108	0,065	1,67
27	610	0,245	0,141	1,74
28	535	0,215	0,119	1,80
29	515	0,206	0,109	1,90
30	1190	0,238	0,130	1,83
31	145	0,058	0,038	1,51
32	360	0,144	0,078	1,85
33	335	0,135	0,074	1,81
34	460	0,185	0,103	1,79
35	230	0,092	0,056	1,64
36	595	0,238	0,128	1,87
37	485	0,195	0,108	1,80
38	355	0,142	0,079	1,80
39	315	0,126	0,056	2,24

(Devamı arkada)

40	120	0,048	0,017	2,82
41	310	0,123	0,057	2,17
42	60	0,023	0,017	1,35
43	295	0,117	0,053	2,22
44	180	0,073	0,035	2,08
45	105	0,043	0,015	2,76
46	240	0,096	0,053	1,82
47	190	0,076	0,035	2,20
48	110	0,044	0,017	2,62
49	185	0,074	0,035	2,12
50	330	0,131	0,060	2,19
51	120	0,048	0,022	2,17
52	560	0,224	0,113	1,98
53	230	0,093	0,043	2,17
54	535	0,215	0,120	1,79
55	390	0,157	0,065	1,84
56	420	0,167	0,093	1,80
57	375	0,151	0,085	1,77
58	270	0,108	0,060	1,79
59	260	0,105	0,063	1,66
60	370	0,148	0,081	1,81
61	165	0,066	0,040	1,66
62	80	0,032	0,019	1,66
63	485	0,194	0,106	1,83
64	640	0,256	0,143	1,79
65	490	0,197	0,108	1,82
66	765	0,306	0,165	1,86
67	200	0,085	0,045	1,79
68	1135	0,453	0,244	1,85
69	160	0,064	0,038	1,66
70	450	0,180	0,101	1,77
71	315	0,127	0,071	1,77
72	330	0,132	0,075	1,75
73	625	0,249	0,135	1,85
74	300	0,119	0,068	1,76
75	315	0,127	0,071	1,79
76	410	0,165	0,090	1,82
77	200	0,079	0,044	1,79
78	550	0,220	0,121	1,82
79	410	0,165	0,092	1,79
80	520	0,208	0,111	1,88

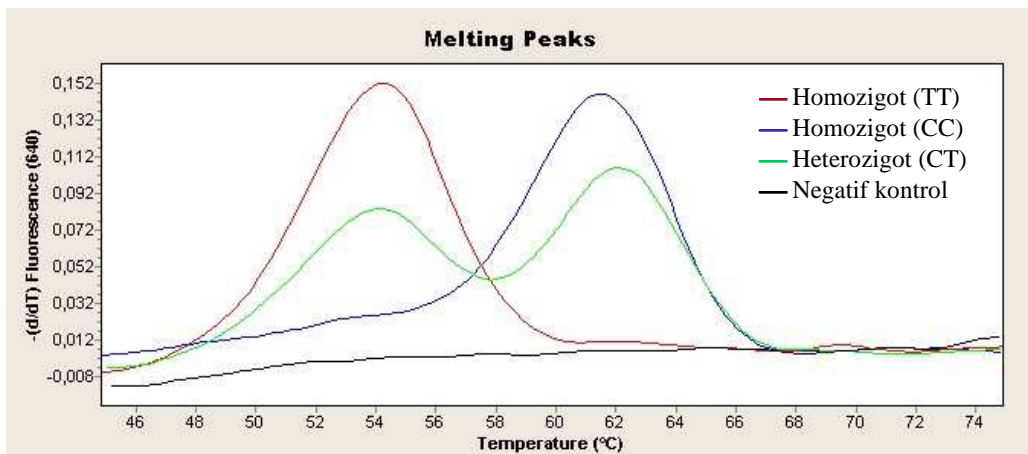
4.3. Gerçek-zamanlı PCR ile T19007C SNP Analizi

Optimize edilen protokolde belirtilen reaksiyon koşullarına göre, primer ve prob seti kullanılarak *ERCC1* geni kodon 118'de yer alan ve hedef SNP'yi içeren 197 bç'lik fragman çoğaltıldı. Amplikonun varlığı, özgün hibridizasyon prob çifti ile gerçekleşen floresan artışı ile belirlendi (Şekil 4.5).



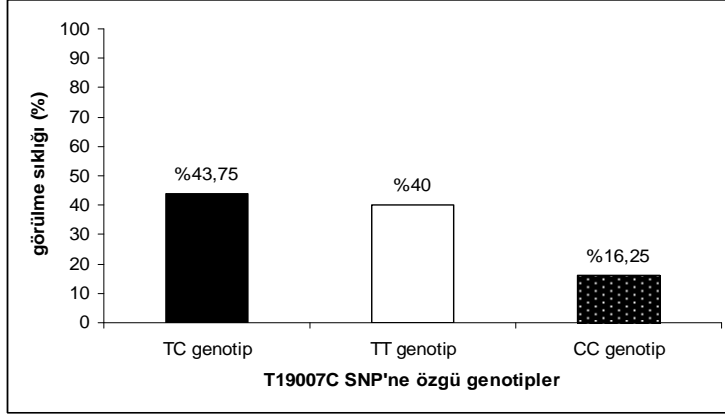
Şekil 4.5 *ERCC1* geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP analizine özgün amplifikasyon eğrisi

Amplikonun identifikasyonu ise gerçek-zamanlı PCR yazılım programında yer alan erime eğrisi analizi ile yapıldı. Her bir örneğe ait 640 nm dalga boyunda ölçülen floresanın negatif türevini ısıya göre değerlendiren ve amplikona özgün erime derecesini (T_m) gösteren grafik elde edildi. Buna göre T19007C SNP için sadece $54 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de erime eğrisi gözlenen örneklerin TT genotipine, $54 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $62 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de erime eğrisi gözlenen örneklerin TC genotipine ve sadece $62 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de erime eğrisi gözlenen örneklerin CC genotipine sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.6).



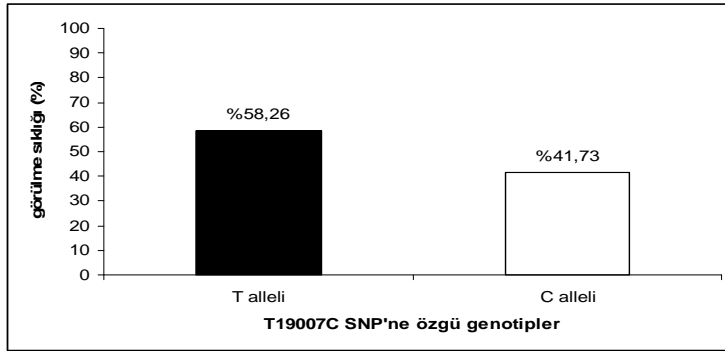
Şekil 4.6 *ERCC1* geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP analizine özgün erime eğrisi

Tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde, T19007C SNP'i TT, TC ve CC genotipine sahip olgu sayıları sırasıyla 32 (%40), 35 (%44) ve 13 (%16) olgu olarak belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 ERCCI geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP'ne özgü genotip dağılımı

Tek bir allel bazında değerlendirildiğinde, 67 (%58,26) olgu sadece T alleleine ve 48 (%41,73) olgu sadece C alleleine sahipti (Şekil 4.8).

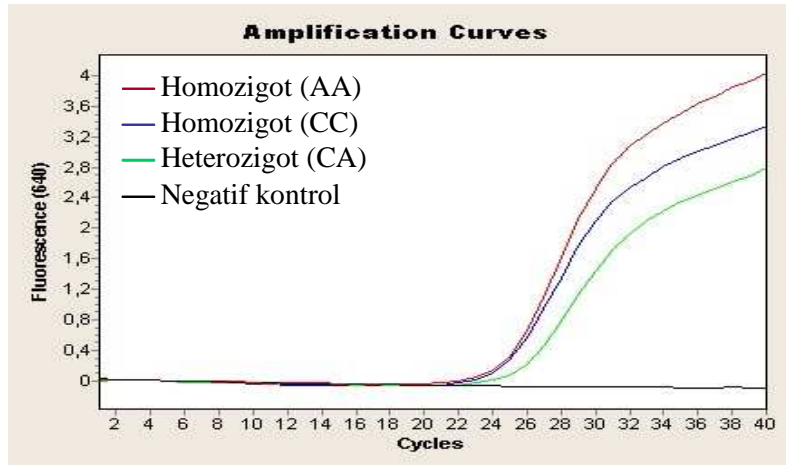


Şekil 4.8 ERCCI geni kodon 118'de yer alan T19007C SNP'ne özgü genotipleri oluşturan allellerin dağılımı

T19007C SNP'ne özgü genotiplerin klinikopatolojik parametrelerle olası korelasyonları analiz edildiğinde, TC genotipinin TNM evre ($p=0.039$) ve klinik evre ($p=0,046$) ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkili olduğu belirlenirken, diğer klinikopatolojik parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

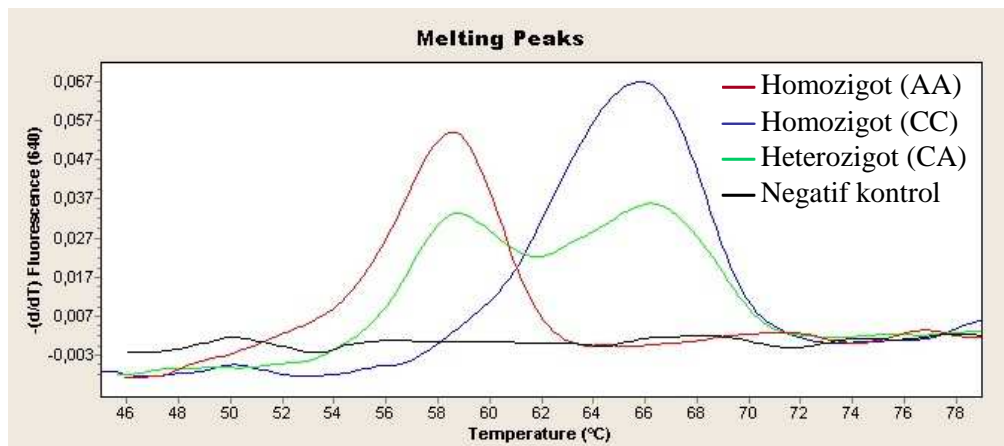
4.4. Gerçek-zamanlı PCR ile C8092A SNP Analizi

Optimize edilen protokolde belirtilen reaksiyon koşullarına göre, primer ve prob seti kullanılarak *ERCC1* geni 3' UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan ve hedef SNP'yi içeren 143 bç'lik fragman çoğaltıldı (Şekil 4.9).



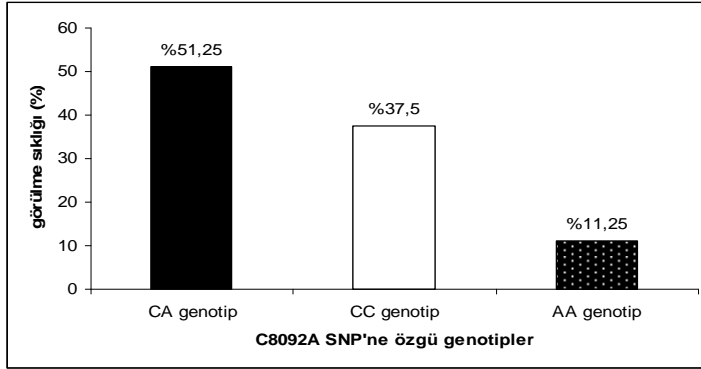
Şekil 4.9 *ERCC1* geni 3' UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan C8092A SNP analizine özgün amplifikasyon eğrisi

Amplikonun varlığı belirlendikten sonra, identifikasyonu amacıyla erime eğrisi analizi yapıldı. Buna göre $67 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de Tm derecesine sahip örneklerin CC genotipine, $59 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $67 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de Tm derecesine sahip örneklerin CA genotipine ve $59 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de Tm derecesine sahip örneklerin de AA genotipine sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.10).



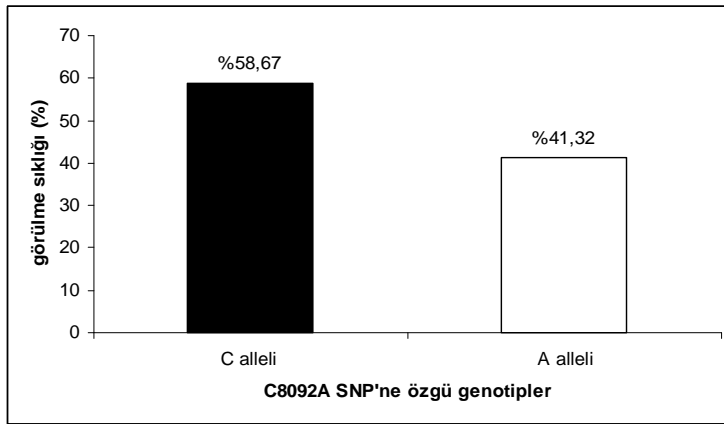
Şekil 4.10 *ERCC1* geni 3' UTR'sinde yer alan C8092A SNP analizine özgün erime eğrisi

Toplam 80 olguda, C8092A SNP'ne özgün CC, CA ve AA genotipleri sırasıyla 30 (%37,50), 41 (%51,25), ve 9 (%11,25) olguda saptandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 *ERCC1* geni 3' UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan C8092A SNP'ne özgü genotip dağılımı

Tek bir allel bazında değerlendirildiğinde, sadece C alleleline sahip 71 (%58,67) olgu ve sadece A alleleline sahip 50 (%41,32) olgunun bulunduğu belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 *ERCC1* geni 3' UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan C8092A SNP'ne özgü genotipleri oluşturan allellerin dağılımı

C8092A SNP'ne özgü genotipler ile klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

5. TARTIŞMA:

Akciğer kanseri, dünyada kanser kaynaklı ölümlerin en önemli nedenidir. Akciğer kanseri olgularının yaklaşık %80-85'ini NSCLC'i oluşturmaktadır ve güncel tedavi yaklaşımlarına rağmen olguların 5 yıllık sağkalım oranları son derece düşüktür. Birçok solid kanserlerde olduğu gibi, akciğer karsinogenez sürecinde de başlıca tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve *ERCCI*'in de yer aldığı DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler olmak üzere farklı türdeki genlerin etkili olduğu rapor edilmiştir. *ERCCI*, NER tamir mekanizmasında 5' endonükleazı kodlayan bir DNA tamir genidir. *ERCCI* genindeki genetik (polimorfizm nedeniyle genetik varyantlar gibi) ve epigenetik değişiklikler, normal dokularda suboptimal DNA tamirine neden olabilmekte ve bu da akciğer kanseri patogenezinde kritik bir basamak olan genomik instabilite ile sonuçlanabilmektedir. Bu çalışma, NSCLC etyolojisinde ve/veya patogenezinde (progresyonunda) etkili olduğu düşünülen *ERCCI* geni T19007C ve C8092A SNP'lerine özgü genotiplerin belirlenmesi ve bu genotip profillerinin yaş, cinsiyet, sigara içimi, TNM evre ve histolojik alt tip olmak üzere klinikopatolojik parametrelerle ilişkilerinin belirlenmesi amacı ile yapıldı.

Klinikopatolojik parametreler tek başına ele alındığında, çalışma grubuna dahil olan olguların %85'i sigara içen gruba dahildi. İster aktif ister pasif içici olsun, sigara dumanına maruz kalan bireylerde sigara içiminin, içerdiği karsinojenler nedeniyle akciğer kanserinin etyolojisinde rol oynadığı birçok çalışma raporlarında da yer almaktadır (Hackshaw vd 1997, Vineis vd 2005, Boffetta 2006).

Skuamöz hücreli karsinom dünyada en sık görülen histolojik alt tiptir. Türkiye'de de Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi'nin raporunda en sık görülen histolojik alt tipin skuamöz hücreli karsinom olduğu yer almaktadır. Bu çalışmada da en sık görülen histolojik alt tipin skuamöz hücreli karsinom (%56,96) olduğu belirlendi. Diğer histolojik tiplerin görülme sıklıkları sırası ile adenokarsinom (%34,17), bronkioloalveolar karsinom (%2,53), büyük hücreli karsinom (%2,53), adenoskuamöz karsinom (%2,53) ve müsinöz karsinom (%1,26)'du. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada kadınlarda en sık adenokarsinom (%45.9) ve erkeklerde en sık skuamöz hücreli karsinom (%42.2)'un görüldüğü bildirildi (Yurdakul vd 2002). Kalikaki ve

ark.'nın 119 NSCLC'li olgu ile tamamladıkları çalışmalarında en sık görülen histolojik alt tiplerin sırasıyla %60,5 oranı ile adenokarsinom ve %23,5 oranı ile skuamöz hücreli karsinom olduğunu bildirmişlerdir (Kalikaki vd 2009). Tibaldi ve ark., da NSCLC'li olgularda histolojik alt tipleri değerlendirmişler ve 24 (%36,9) olguda adenokarsinom, 19 (%29,2) olguda skuamöz hücreli karsinom, 4 (%6,2) olguda büyük hücreli karsinom, 1 (%1,5) olguda bronkioloalveolar karsinom, 17 (%26,2) olguda diğer karsinom alt tiplerinin belirlendiğini rapor etmişlerdir (Tibaldi vd 2008). Tüm bu bulgular, dünyada skuamöz hücreli karsinomun yüksek görülme sıklığına rağmen, NSCLC histolojik alt tiplerinin görülme sıklığının ülkelere göre değişkenlik gösterebileceğini vurgulamaktadır.

İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasından sonra, dünya genelinde HapMap Projesi'nin başlamasının yanısıra her ülke kendi popülasyonuna özgün SNP veritabanlarını oluşturmaya başlamışlardır. Daha genel çerçeveden değerlendirildiğinde, T19007C SNP için Avrupa popülasyonunda CT, TT, CC genotipi sırasıyla %45,8, %41,7, %12,5 oranında; zenci popülasyonda CC, CT genotipi sırasıyla %82,6, %17,4 oranında ve Asya popülasyonunda CC, CT, TT genotipi sırasıyla %70,8, %16,7, %12,5 oranında olduğu bildirilmiştir (www. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11615). Tibaldi ve ark., İtalya'da 65 adet evre 3 ve evre 4 NSCLC'li olguda T19007C SNP için CT, TT, CC genotipi sırasıyla %60, %27,7, %12,3 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Takenaka ve ark., Japonya'da 122 NSCLC'li olguda CC, CT ve TT genotip dağılımının sırası ile %45, %48 ve %7 olduğunu rapor etmişlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir başka çalışmada da ileri evre 128 NSCLC'li olguda TT, CT ve CC genotip sıklıkları sırasıyla %40, %39 ve %21 olarak belirtilmiştir (Zhou vd 2004). Bilgilerimiz dahilinde, bu çalışmanın verileri *ERCC1* SNP'leri ile ilgili ülkemizde rapor edilen ilk verilerdir ve T19007C genotip dağılımını Avrupa ve Amerika profili ile büyük benzerlik göstermekle birlikte, Asya profilinden son derecede farklıdır. T19007C SNP genotipleri tek allel bazında ele alındığında, Avrupa popülasyonunda C, T alellerinin sıklığı sırasıyla; %35,4, %64,6; zenci popülasyonunda sırasıyla %91,3, %8,7; Asya popülasyonunda sırasıyla; %79,2, %20,8 olduğu bildirilmiştir (www. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11615). Bu çalışmanın bulguları, tek allel bazında da Avrupa popülasyonunda bildirilen sıklık oranlarıyla büyük uyum göstermektedir.

C8092A SNP'ne özgün olarak Avrupa popülasyonunda CC, AC ve AA genotiplerinin görülme sıklıkları sırasıyla %60, %35 ve %5; Asya popülasyonunda ise CC ve AC genotipi sırasıyla %70,5 ve %29,5 oranında olduğu belirtilmiştir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3212986). Tek allel bazında değerlendirildiğinde, Avrupa popülasyonunda C ve A alelinin sıklığının sırasıyla; %77,5, %22,5 oranında; Asya popülasyonunda ise sırasıyla %85,2, %14,8 oranında olduğu belirtilmiştir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3212986). Zhou ve ark., 2004 yılında yaptıkları çalışmada NSCLC'li hastalarda *ERCC1* C8092A SNP için CC, CA, AA genotipi sırasıyla %53, %41, %6 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Zhou ve ark., 2005 yılında yaptıkları bir başka çalışmada CC, CA, AA genotipi sırasıyla %56, %37, %7 oranında belirlemişlerdir. Bu çalışma, AA genotipinin en az rastlanan genotip olma özelliği (%11) ile diğer çalışmaların bulgularıyla uyum göstermesine karşın, en sık karşılaşılan CA genotipi (%51) bulgusu ile uyum göstermemektedir.

ERCC1 genine özgü bu iki SNP'nin klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini değerlendiren birçok çalışma bulunmaktadır. Takenaka ve ark., tümör evresini baz aldıklarında, T19007C polimorfizmi için en az bir T aleline sahip NSCLC hastalarının CC genotipli hastalardan daha ileri seviyede olduklarını rapor etmişlerdir. Tibaldi ve ark., 65 NSCLC'li hastada *ERCC1* T19007C SNP ile yaş, cinsiyet, klinik evre, histolojik tip, sigara içme durumu arasında anlamlı fark olmadığını bildirmişlerdir (Tibaldi vd 2008). Zhou ve ark., T19007C polimorfizmi ve akciğer kanser riski arasında anlamlı fark bulmamışlardır (Zhou vd 2005). Zhou ve ark., 128 NSCLC'li hastada *ERCC1* C8092A SNP ile yaş, cinsiyet, klinik evre, performans durumu gibi klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı fark bulmamışlardır (Zhou vd 2004). Aynı araştırmacılar farklı bir çalışmalarında da 1752 akciğer kanser hastasında *ERCC1* C8092A SNP ile yaş, cinsiyet ve histolojik tipler arasında anlamlı fark bulmamışlardır (Zhou vd 2005). Kalikaki ve ark., da benzer şekilde klinikopatolojik parametrelerle ilişki bulamamışlardır (Kalikaki vd 2009). Takenaka ve ark., T19007C SNP'ne özgü genotiplerde en az bir T aleline sahip olguların daha ileri evrede olduklarını ve C8092A SNP'i için CA genotipli olgularda lenfatik invazyonun daha sık gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Takenaka vd 2009).

Bu çalışmada C8092A SNP'nin yaş, cinsiyet, sigara içimi, patolojik evre, TNM evre, klinik evre ve histolojik alt tip olmak üzere klinikopatolojik parametrelerle anlamlı olarak ilişkili olmadığı ($p=0.976$), ancak T19007C SNP'nin klinik evre ile anlamlı olarak ilişkili olduğu ($p=0.046$) bulunmuştur.

NER, sigara ile ilişkili karsinojenlerin sebep olduğu DNA hasarlarının tamirinde önemli bir yoldur ve ERCC1'deki defektler ağır DNA tamir yetersizliği ile ilişkili görülmektedir. Yoğun sigara içicilerinde yüksek oranda DNA hasarı ve sonrasında da preneoplastik hücreler oluşabilir. Wei ve ark., C8092A SNP'inde AA genotipini daha düşük DNA tamir kapasitesi ve daha yüksek akciğer kanseri riski ile ilişkilendirmişlerdir (Wei vd 2000). Bir başka çalışmada ise aynı genotipli bireylerde daha düşük akciğer kanser riski gözlemlenmiş ve yoğun sigara içicilerinde DNA tamir kapasitesinin artması ile ilişkili olarak apoptotik indeksin de artabileceği öne sürülmüştür (Zhou vd 2005). Tibaldi ve ark., NSCLC'li hastalarda *ERCC1* ve *XPD* genotipleri ve sigara içimi arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını bulmuşlardır. Bu çalışma kapsamında değerlendirilen 80 NSCLC'li olguda her iki polimorfizmin, sigara içimi ile ilişkili olmadığı belirlendi.

Sonuç olarak kanserde bireye-ölgün tedavinin büyük önem kazandığı günümüzde, tedavi etkinliğinin belirlenmesinde populasyonların genetik yapıları ile ilgili veri tabanlarının oluşturulmasının gerekliliği bir kez daha vurgulamaktadır. Bu çalışma bilgilerimiz dahilinde ülkemizde *ERCC1* geni T19007C ve C8092A SNP'leri ile ilgili ilk verileri içermesi açısından önemlidir. Aynı zamanda bu çalışmada T19007C SNP'nin Avrupa populasyonunda gözlenen profille büyük bir benzerlik gösterdiği ve NSCLC'inde daha agresif seyir, dolayısıyla progresyonla ilişkili önemli bir biyomarker olabileceğini desteklemektedir.

6. SONUÇ

Optimal olmayan DNA tamir kapasitesi, karsinogenez etyolojisinde ve progresyonunda önemli bir basamaktır. DNA tamir genlerinde polimorfizmler gibi genetik varyantların DNA tamir kapasitesinde farklılıklara neden olabildikleri ve karsinogenezle ilişkili oldukları bilinmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen bu çalışmanın sonuçları aşağıda belirtildiği şekilde maddeler halinde özetlenebilir:

1. Hem dünya hem de ülkemizde yapılan çalışmaların raporları ile uyumlu olarak, NSCLC'li olgularda gözlenen en sık histolojik alt tip skuamöz hücreli karsinomdur ve olguların %57'sini oluşturmaktadır.
2. Bu çalışma, Türk popülasyonunda *ERCCI* geni T19007C ve C8092A SNP'leri ile ilgili ilk verileri içermektedir. T19007C SNP'ne özgü TT, TC ve CC genotip dağılımı sırasıyla %40, %44 ve %16 iken C8092A SNP'ne özgü CC, CA ve AA genotip dağılımı sırasıyla %38, %51 ve %11 olarak belirlendi.
3. T19007C SNP ile ilgili olarak bu çalışmada belirlenen hem genotip dağılımı hem de tek allel bazındaki dağılım, Avrupa popülasyonunda gözlenen dağılımlarla büyük bir benzerlik göstermektedir.
4. T19007C SNP ile TNM evre ($p=0.039$) ve klinik evre ($p=0,046$) arasında anlamlı bir fark bulunurken, diğer klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi. Bu da *ERCCI* T19007C SNP'nin söz konusu genin transkripsiyonunda azalmaya neden olduğunu desteklemekte ve NSCLC progresyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir.
5. Olgulara ait sağkalım oranı, sağkalım süresi, uygulanan tedavi protokolleri ve bu protokollerin etkinliklerine ilişkin verilerin elde edilememesi nedeniyle, söz konusu polimorfizmlerin bu parametrelerle ilişkisi belirlenememiştir.

7. KAYNAKLAR

- Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D., (2007) Epigenetics, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York, 503s.
- Adjei, A. A., (2001) Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93(14): 1062-74.
- Aktaş, D., (2005) Genetik ve kanser, Thompson&Thompson Genetics in Medicine, (Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F.), *Güneş Kitabevi*, İstanbul, s311-333.
- Alfano, C. M., Klesges, R. C., Murray, D. M., (2004) Physical Activity in Relation to All Site and Lung Cancer Incidence and Mortality in Current and Former Smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13(12): 2233-2241.
- Ayhan, A., (2007), Neoplazi 2, Temel Patoloji, (Mocan Kuzey, G., Özdamar, Ş., Zergeroğlu, S.), *Güneş Kitabevi*, Ankara, s149-162.
- Azuma, K., Komohara, Y., Sasada, T., Terazaki, Y., Ikeda, J., Hoshino, T., Itoh, K., Yamada, A., Aizawa, H., (2007) Excision Repair Cross-Complementation Group 1 Predicts Progression-Free and Overall Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Cancer Sci.*, 98(9): 1336-43.
- Azuma, K., Sasada, T., Kawahara, A., Hattori, S., Kinoshita, T., Takamori, S., Ichiki, M., Imamura, Y., Ikeda, J., Kage, M., Kuwano, M., Aizawa, H., (2009) Expression of ERCC1 and Class III β -Tubulin in NSCLC Patients Treated with a Combination of Cisplatin/Docetaxel and Concurrent Thoracic Irradiation. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 64: 565-57.
- Bandera, E. V., Freudenheim, J. L., Vena, J. E., (2001) Alcohol Consumption and Lung Cancer: A review of The Epidemiologic Evidence. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 10:813- 21.
- Battaloğlu, E., Başak, A., N., (2009) Kompleks Hastalık Genetiği: Güncel Kavramlar ve Nörolojik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Genomik Yöntemler. *Klinik Gelişim*, 128-133.
- Boffetta, P., (2006) Human Cancer from Environmental Pollutants: The Epidemiologic Evidence. *Mutat. Res.*, 28; 608(2): 157-162.
- Bremnes, R. M., Camps, C., Sirera, R., (2006) Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer: The Prognostic Impact of Neoangiogenesis and The Cytokines VEGF and Bfgf in Tumours and Blood. *Lung Cancer.*, 51: 143-158.
- Butnor, K. J., Burchette, J. L., Sporn, T. A., Hammar, S. P., Roggli, V. L., (2004) The Spectrum of Kit (CD117) Immunoreactivity in Lung and Pleural Tumors: A Study

- of 96 Cases Using A Single-Source Antibody with A Review of The Literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 128(5): 538-43.
- Bepler, G., Begum, M., Simon, G., R., (2008) Molecular Analysis-Based Treatment Strategies for Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Control*, 15(2): 130-9.
- Cappuzzo, F., Garcia-Varella, M., Shigematsu, H., Domenichini, I., Bartolini, S., Ceresoli, G. L., Rossi, E., Ludovini, V., Gregorc, V., Toschi, L., Franklin, W. A., Crino, L., Gazdar, A. F., Bunn, P., Hirsch, F. R., (2005) Increased HER2 Gene Copy Number Is Associated with Response to Gefitinib Therapy in Epidermal Growth Factor Receptor-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.*, 23:5007-5018.
- Conrad, D. H., Goyette, J., Thomas, P. S., (2007) Proteomics as A Method for Early Detection of Cancer: A Review of Proteomics , Exhaled Breath Condensate , and Lung Cancer Screening. *J. Gen. Intern. Med.*, 23(1): 78-84.
- Cummings, M., Higginbottom, K., McGurk, G. J., Wong, O. G., Köberle, B., Oliver, R. T., Masters, J. R., (2006) XPA Versus ERCC1 as Chemosensitising Agents to Cisplatin and Mitomycin C in Prostate Cancer Cells: Role of ERCC1 in Homologous Recombination Repair. *Biochem. Pharmacol.*, 72(2): 166-75.
- Dalay, N., (2006) Kanser, Hücre Moleküler Yaklaşım, (Sakızlı, M., Atabey, N.), *İzmir Tıp Kitabevi*, İzmir, s631-671.
- Ekmekçi, A., Konaç, E., Önen, H., İ., (2008) Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık *Marmara Medical Journal*, 21(3) :282- 295.
- El-Torky, M., El-Zeky, F., Hall, J. C., (1990) Significant Changes in The Distrubution of Histologic Types of Lung Cancer. *Cancer 1990*; 65: 2361-7.
- Emre, S., (2005), İnsanlarda Genetik Varyasyon: Mutasyon ve Polimorfizm. Thompson&Thompson Genetics in Medicine, (Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F.), *Güneş Kitabevi*, İstanbul, s79-94.
- Eriksson, P., Brattström, D., Hesselius, P., Larsson, A., Bergström S., Ekman, S., Goike, H., Wagenius G., Brodin O., Bergqvist M., (2006) Role of Circulating Cytokeratin Fragments and Angiogenic Factors in NSCLC Patients Stage IIIa-IIIb Receiving Curatively Intended Treatment. *Neoplasma.*, 53:285-290.
- Ersöz, C., (2007) Neoplazi 1, Temel Patoloji, (Mocan Kuzey, G., Özdamar, Ş., Zergeroğlu, S.), *Güneş Kitabevi*, Ankara, s141-162.
- Feinberg, A. P., (2007) Phenotypic Plasticity and The Epigenetics Of Human Disease. *Nature*, 447:433-440.
- Fong, K. M., Zimmerman, P. V., Smith, P. J., (1995) Lung Pathology: The Molecular Genetics of Non-Small Cell Lung Cancer. *Pathology*, 27(4): 295-301.

- Freudenheim, J. L., Ritz, J., Smith Warner, S. A., (2005) Alcohol Consumption and Risk of Lung Cancer: A Pooled Analysis of Cohort Studies. *Am J Clin Nutr.*, 82(3):657-667.
- Garland, F. C. (1990, May 29) New York Times.
- Gao, H. G., (1997) Distribution of P53 and K-ras Mutations In Human Lung Cancer Tissues. *Carcinogenesis*, 18(3): 473-8.
- Gasparini, G., (1996) Angiogenesis Research up to 1996 A commentary on The State of Art and Suggestions for Future Studies. *Eur. J. Cancer*, 32A: 2379-85.
- Gautschi, O., Ratschiller, D., Gugger, M., Betticher, D. C., Heighway, J., (2007) Cyclin D1 in Non-Small Cell Lung Cancer: A Key Driver of Malignant Transformation. *Lung Cancer*, 55(1): 1-14.
- Hackshaw, A. K., Law, M. R., Wald, N. J., (1997) The Accumulated Evidence on Lung Cancer and Environmental Tobacco Smoke. *BMJ.*, 315(7114):980-988.
- Hanawalt, P.C., Ford, J.M., Lloyd, D.R. ,(2003) Functional Characterization of Global Genomic DNA Repair and Its Implications for Cancer. *Mutat. Res.*, 544, 107–114.
- Herbst, R. S., Onn, A., Sandler, A., (2005), Angiogenesis and Lung Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications. *J. Clin. Oncol.*, 23: 3243-3256.
- Hoeijmakers, J. H., (2001) Genom Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer, *Nature*, 411, 366-374.
- Horak, E. R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune S., Smith, K., Stuart N., Greenall M., Stepniewska K., Harris A. L., (1992), Angiogenesis Assessed by Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule Antibodies as Indicator of Node Metastasis and Survival in Breast Cancer. *Lancet*, 340: 1120-4.
- Hung, R. J., Brennan, P., Canzian, F., Szeszenia-Dabrowska, N., Zaridze, D., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Foretova, L., Janout, V., Bencko, V., Chabrier, A., Borel, S., Hall, J., Boffetta, P., (2005) Large-Scale Investigation of Base Excision Repair Genetic Polymorphisms and Lung Cancer Risk in A Multicenter Study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 97, 567–576.
- Isla, D., Sarries, C., Rosell, R., Alonso, G., Domine, M., Taron, M., Lopez-Vivanco, G., Camps, C., Botia , M., Nunez, L., Sanchez-Ronco, M., Sanchez J. J., Lopez-Brea, M., Barneto, I., Paredes, A., Medina, B., Artal, A., Lianes, P., (2004) Single Nucleotide Polymorphisms and Outcome in Docetaxel Cisplatin Treated Advanced NSCLC, *Ann. Oncol.*, 8: 1194-1203.
- Jang, T. W., Oak, C. H., Chang, H. K., Suo, S. J., Jung, M. H., (2009) EGFR and KRAS mutations in Patients with Adenocarcinoma of The Lung. *Korean J. Intern. Med.*, 24: 48-54.

- Jarzynka, M. J., Guo, P., Bar-Joseph, I., Hu, B., Cheng, S. Y., (2006) Estradiol and Nicotine Exposure Enhances A549 Bronchioloalveolar Carcinoma Xenograft Growth in Mice Through The Stimulation of Angiogenesis. *Int. J. Oncol.*, 28: 337-344.
- Jin M., Inoue S., Umemura T., Moriya, J., Arakawa, M., Nagashima, K., Kato, H., (2001) Cyclin D1, p16 and Retinoblastoma Gene Product Expression as A Predictor for Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer at Stages I and II. *Lung Cancer*, 34: 207-18.
- Jöckel, K. H., Ahrens, W., Jahn, I., (1998) Occupational Risk Factors for Lung Cancer, A Case Control Study in West Germany. *Int. J. Epidemiol.*, 27: 549-60.
- Kalikaki, A., Kanaki, M., Vassalou, H., Souglakos, J., Voutsina, A., Georgoulas, V., Mavroudis, D., (2009) DNA Repair Gene Polymorphisms Predict Favorable Clinical Outcome in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 10(2): 118-123.
- Köktürk, N., Kırıçoğlu, C. E., Öztürk, C., (2003) Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. *Solunum 2003*, 5: 127-138.
- Kulaksız, G., Sancar, A., (2007) Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, 32(3): 104-111.
- Lee, I. M., (2003) Physical Activity and Cancer Prevention-Data from Epidemiologic studies. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35(11): 1823-1827.
- Lee, H. W., Choi, Y. W., Han, J. H., Kim, J. H., Jung, J. H., Jeong, S. H., Kang, S. Y., Choi, J. H., Oh, Y. T., Park, K. J., Hwang, S. C., Sheen, S. S., (2009) Expressions of ERCC1 Protein Predicts Poor Outcome in Advanced NSCLC Patients Treated with Platinum-Based Doublet Chemotherapy. *Lung Cancer*, 65: 377-382.
- Liu, P., Vikis, H. G., Wang, D., Lu, Y., Wang, Y., Schwartz, A. G., Pinney, S. M., Yang, P., de Andre, M., Petersen, G. M., Wiest, J. S., Fain, P. R., Gazdar, A., Gaba, C., Rothschild, H., Mandal, D., Coons, T., Lee, J., Kupert, E., Seminara, D., Minna, J., Bailey-Wilson, J. E, Wu, X., Spitz, M. R., Eisen, T., Houlston, R. S., Amos, C. I., Anderson, M. W., You, M., (2008) Familial Aggregation of Common Sequence Variants on 15q24-25.1 in Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 100(18): 1326-30.
- Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M. J., Squartini, F., Angeletti, C. A., (1992) Relation of Neovascularization to Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lancet*, 340: 145-6.
- Martinez, F. D., (1992) U. S. Environmental Protection Agency, Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders, *EPA/600/6-90/006F*, Washington, 525s.
- Misra, R. R., Ratnasinghe, D., Tangrea, J. A., Virtamo, J., Andersen, M. R., Barrett, M., Taylor, P. R., Albanes, D., (2003) Polymorphisms in The DNA Repair Genes

- XPD, XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and The Risk of Lung Cancer Among Male Smokers in Finland. **Cancer Lett.**, 171–178.*
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild S. E., Adjei A. A., (2008) Non-small Cell Lung Cancer : Epidemiology, Risk Factors, Treatment and Survivorship. **Mayo Clin. Proc.**, 83(5): 584-594.
- Morton, M. Z., (1988) Tumors of The Lung. In: Berkow R Ed. Textbook of The Merck Manual, New Jersey: Merck and Co., Inc. Rahway; s695-7.
- Neumann, A. S., Sturgis, E. M., Wei, Q., (2005) Nucleotide Excision Repair as A Marker for Susceptibility to Tobacco-Related Cancers: A Review of Molecular Epidemiological Studies. **Mol. Carcinog.**, 42: 65–92.
- Niedernhofer, L. J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A. F., de Wit J., Jaspers, N. G., Beverloo, H. B., Hoeijmakers, J. H., Kanaar, R., (2004) ERCC1–XPF Is Required to Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double-Strand Breaks. **Mol. Cell. Biol.**, 24(13): 5776-87.
- Olaussen, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., André, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J. P., Tursz, T., Le Chevalier, T., Soria, J. C., (2006) IALT Bio Investigators. DNA Repair by ERCC1 in Non-Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. **N. Engl. J. Med.**, 355(10): 983-91.
- Park, C. H., Bessho, T., Matsunaga, T., Sancar, A., (1995) Purification and Characterization of The XPF-ERCC1 Complex of Human DNA Repair Excision Nuclease. **J. Biol. Chem.** , 270 (39): 22657-60.
- Patroğlu, T. E., (2000), Neoplazi, Temel Patoloji, (Çevikbaş, U.), **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul, s132-175.
- Rajkumar, T., (2001), Growth Factors and Growth Factor Receptors in Cancer. **Current Science**, 81(5).
- Rami-Porta, R., Ball, D., Crowley, J., Giroux, D. J., Jett, J., (2007) The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for The Revision of The T Descriptors in The Forthcoming (seventh) Edition of The TNM Classification for Lung Cancer. **J. Thorac. Oncol.** 2: 593-602.
- Riely, G. J., Marks, J., Pao, W., (2009) KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, 6(2): 201-205.
- Santos, E. S., Blaya, M., Raez, L. E., (2009) Gene Expression Profiling and Non-small-Cell Lung Cancer: Where Are We Now?, **Clinical Lung Cancer**, 10(3): 168-173.
- Sercan, O. H., (2006) Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi, Hücre Moleküler Yaklaşım, (Sakızlı M., Atabey N.), **İzmir Tıp Kitabevi** , İzmir, s179-230.

- Shen, H., Spitz, M. R., Qiao, Y., Guo, Z., Wang, L. E., Bosken, C. H., Amos, C. I. and Wei, Q., (2003) Smoking, DNA Repair Capacity and Risk of Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Cancer*, 107: 84–88.
- Shrivasta, A., Laidler, P., Pavies, R. P., (1988) The Prognostic Significance of Tumor Vascularity in Intermediate Thickness Skin Melanoma: A Quantitative Histologic Study. *Am. J. Pathol.*, 419-23.
- Siegel, M., (1993), Involuntary Smoking in the Restaurant Workplace, A Review of Employee Exposure and Health Effects. *JAMA*, 270: 490-493.
- Singhal, S., Vachani, A., Antin-Ozerkis, D., Kaiser, L. R., Albelda, S. M., (2005) Prognostic Implications of Cell Cycle, Apoptosis, and Angiogenesis Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *Clinical Cancer Research*, 11: 3974.
- Smith, S., Su, D., Longrais, I. A., Schwartz, P., Puopolo, M., Rutherford T. J., Mor, G., Yu, H., Katsaros, D., (2007) ERCC1 Genotype and Phenotype in Epithelial Ovarian Cancer Identify Patients Likely to Benefit From Paclitaxel Treatment in Addition to Platinum-Based Therapy. *J. Clin. Oncol.*, 25: 5172-5179.
- Song, B. J., (1996), Ethanol-Inducible Cytochrome P450 (CYP2E1): Biochemistry, Molecular Biology and Clinical Relevance: 1996 update. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 20: 138A–46A.
- Spiro, S. G., Silvestri, G. A., (2005) One Hundred Years of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 172(5): 523-9.
- Stefanou, D., Batistatou, A., Arkoumani E., Ntzani E., Agnantis N. J., (2004) Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Association with Microvessel Density in Small-Cell and Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *Histol. Histopathol.*, 19(1): 37-42.
- Swanton, C., Futreal, A., Eisen, T., (2006) Her2-Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12(14): 4377-4379.
- Sun, S., Schiller, J. H., Gazdar, A. F., (2007) Lung Cancer in Never Smokers- A Different Disease. *Nature Reviews Cancer*, 7: 778-790.
- Takenaka, T., Yano, T., Kiyohara, C., Miura, N., Kouso, H., Ohba, T., Kometani, T., Shoji, F., Yoshino, I., Maehara, Y., (2009) Effects of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 (ERCC1) Single Nucleotide Polymorphisms on The Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Lung Cancer*, 67(1): 101-7.
- Taşdemiroğlu, E., (2003), Tümör- Metastaz İlişkisi; 154 Pediatrik Solid Malign Tümör Olgusunun Analizi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 13: 8-11.
- Teicher, B. A., Emi, Y., Kakeji, Y., Northey D., (1996) TNP 70/Minocycline/Cytotoxic Therapy: A Systems Approach to Cancer Therapy. *Eur. J. Cancer*, 32A(14): 2461-6.

- Tel, N., (2000) Akciğerler ve Üst Solunum Yolları, Temel Patoloji, (Çevikbaş, U.), *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, s393-439.
- Tibaldi, C., Giovannetti, E., Vasile, E., Mey, V., Laan, A. C., Nannizzi, S., Del Taca, M., Peters, G. J., Falcone, A., Danesi, R., (2008) Correlation Of CDA, ERCC1, and XPD Polymorphisms with Response and Survival in Gemcitabine-Cisplatin Treated Advanced NSCLC Patients. *Clin. Cancer Res.*, 14(6): 1797-1803.
- Vineis, P., Airoidi, L., Veglia, F., Pastorelli R., Autrup H., Dunning, A., Garte, S., Gormally, E., Hainaut, P., Malaveille, C., Matullo, G., Peluso, M., Overvad, K., Tjonneland, A., Clavel-Chapelon, F., Boeing, H., Krogh, V., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Bueno-De-Mesquita, B., Peeters, P., Berglund, G., Hallmons, G., Saracci, R., Riboli E., (2005) Environmental Tobacco Smoke and Risk of Respiratory Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Former Smokers and Never Smokers in The EPIC Prospective Study. *BMJ.*, 330(7486): 265-6.
- Wei, Q., Cheng, L., Amos, C., (2000) Repair of Tobacco Carcinogen-Induced DNA Adducts and Lung Cancer Risk: A Molecular Epidemiologic Study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92: 1764-72.
- Weston, A., Haris, C. C., (2003) Cancer Etiology-Chemical Carcinogenesis, Holland-Frei Cancer Medicine, (Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum R. R., Bast R. C., Gansler T. S., Holland J. F., Frei E.), *BC Decker*, Hamilton.
- Wistuba, I. I., Gazdar, A. F., (2006) Lung Cancer Preneoplasia. *Annu. Rev. Pathol.*, 1: 331-348.
- Wynder, E., L., Hoffmann D., (1994) Smoking and Lung Cancer, Scientific Challenges and Opportunities, *Cancer Res.*, 54: 5284-95.
- Yılmazbayhan, D., (2007) Akciğer Tümörleri ve Plevra Hastalıkları, Temel Patoloji, (Mocan Kuzey, G., Özdamar, Ş., Zergeroğlu, S.), *Güneş Kitabevi*, Ankara , s381-390.
- Yokota, J., Wada, M., Yoshida, T., Noguchi, M., Terasaki, T., Shimosato Y., Sugimura, T., Terada M., (1988) Heterogeneity of Lung Cancer Cells with Respect to The Amplification and Rearrangement of Myc Family Oncogenes. *Oncogene*, 2(6): 607-611.
- Yu, J. J., Mu, C., Lee, K. B., (1997) A Nucleotide Polymorphism in ERCC1 in Human Ovarian Cancer Cell Lines and Tumor Tissues. *Mutat. Res.*, 382: 13-20.
- Yuan, A., Yang, P. C., Yu, C. J., Lee, Y. C., Yao, Y. T., Chen, C. L., Lee, L., N., Kuo, S., H., Luh K. T., (1995) Tumor Angiogenesis Correlates with Histologic Type and Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 152: 2157-62.

- Yuan, A., Yu, C. J., Chen, W. J., Lin, F. Y., Kuo, S. H., Luh, K. T., Yang, P. C., (2000) Correlation of Total VEGF mRNA and Protein Expression with Histologic Type, Tumor Angiogenesis, Patient Survival and Timing of Relapse in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int. J. Cancer*, 89(6): 475-483.
- Yurdakul, A. S., Çalışır, H. C., Demirağ, F., Taci, N., Öğretensoy, M., (2002) Akciğer Kanserinin Histolojik Tiplerinin Dağılımı. *Toraks Dergisi* , 3(1): 59-65.
- Yurter, H. E., (2005) İnsan Genomu: Genlerin ve Kromozomların Yapısı ve Fonksiyonu, Thompson&Thompson Genetics in Medicine (Nussbaum R. L., McInnes R. R., Willard H. F.), *Güneş Kitabevi*, İstanbul, s17-32.
- Zienolddiny, S., Campa, D., Lind, H., Ryberg, D., Skaug, V., Stageland, L., Philips, D. H., Canzian, F., Haugen, A., (2006) Polymorphisms of DNA repair Genes and Risk of Non-Small Lung Cancer. *Carcinogenesis*, 27(3): 560-567.
- Zhou, W., Liu, G., Park, S., Wang, Z., Wain, J. C., Lynch, T. J., Su, L., Christiani, D. C., (2005) Gene Smoking Interaction Associations for The ERCC1 Polymorphisms in The Risk of Lung Cancer . *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14: 491-496.
- Zhou, W., Gurubhagavatula, S., Liu, G., Park, S., Neuberg, D. S., Wain, J. C., Lynch, T. J., Su, L., Christiani, D. C., (2004) Excision Repair Cross-Complementation Group 1 Polymorphism Predicts Overall Survival in Advanced NSCLC Patients Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 10: 4939-4943.
- WEB-1. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü, <http://www.cancer.gov> (2010).
- WEB-2. Globocan 2008, <http://www.who.org> (2010).
- WEB-3. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2008, <http://www.saglik.gov.tr> (2010).
- WEB-4. ecancermedicalscience , <http://www.ecancermedicalscience.com> (2010).
- WEB-5. Weizmann Institute of Science, <http://www.genecards.org> (2010).
- WEB-6. World Health Organization, <http://www.who.int> (2010).
- WEB-7. International HapMap Project, <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov> (2010).
- WEB-8. Karlıkaya's web site. <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/accaders.htm>
- WEB-9. National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11615 (2010).
- WEB-10. National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3212986 (2010).

8. ÖZGEÇMİŞ

1983'de Finike-Antalya'da doğdu. 2001 yılında Antalya Anadolu Lise'sini bitirdikten sonra, 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'nde eğitime başladı. 2006 yılında eğitimini tamamladıktan sonra, 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı.