

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİNDE İNTERFAZ FISH ANALİZİ İLE
KROMOZOMAL ANÖPLOİDİLERİN SAPTANMASI**

Feyza Tuba EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd.Doç.Dr. Ayşe Gül ZAMANI

KONYA-2012

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİNDE İNTERFAZ FISH ANALİZİ İLE
KROMOZOMAL ANÖPLOİDİLERİN SAPTANMASI**

Feyza Tuba EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd.Doç.Dr. Ayşe Gül ZAMANI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10202053 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2012

L.ÖNSÖZ

Yüksek lisans dönemim süresince eğitimime ciddi bir biçimde yön veren, bu süreçte destek ve tavsiyelerini esirgemeyen danışmanım Yrd.Doç.Dr. Ayşe Gül ZAMANI'ye, desteklerini gördüğüm Prof.Dr. Adil ZAMANI'ye, tavsiyelerinden faydalandığım Prof.Dr.M.Selman YILDIRIM'a, yaşamım boyunca her aşamada beni destekleyen aileme ve hayatıma girmesinden mutluluk duyduğum, bu zorlu süreçte sabırla beni destekleyen eşime çok teşekkür ederim.

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİL DİZİNİ	vii
ÇİZELGE DİZİNİ	viii
II. İÇİNDEKİLER	
1. GİRİŞ	1
1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	3
1.2. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi.....	3
1.2.1. Sigara İçiciliği	4
1.2.2. Pasif İçicilik	4
1.2.3. Çevresel Etki	5
1.2.4. Mesleki Maruziyet	5
1.2.5. Diyet	6
1.2.6. Genetik Faktörler.....	6
1.3. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması ve Bu Sınıflama İçin Kullanılan Uluslararası Yöntemler.....	8
1.3.1. Skuamöz (Epidermoid) Karsinom	11
1.3.2 Küçük Hücreli Karsinom	11
1.3.3 Adenokarsinom	11
1.3.4. Büyük Hücreli Karsinom	12
1.4.Akciğer Kanseri Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	12
1.4.1. Bronkoskopi.....	13

1.4.2. Endobronşiyal Forseps Biyopsi.....	14
1.5. Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi.....	15
1.6. EGFR, HER2 ve cMET genleri	
1.6.1. Epidermal Büyüme Faktörleri.....	18
1.6.2. EGF Reseptörleri (EGFR).....	20
1.6.3. MET protoonkogeni.....	26
1.7. Floresans In Situ Hibridizasyon (FISH).....	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
2.1. Hasta Seçimi.....	29
2.2. Preparat Hazırlama.....	29
2.2.1. Lamların temizlenmesi.....	29
2.2.2. Lamların Hazırlanması	29
2.3. FISH Yöntemi.....	30
2.3.1. Ön Hazırlık İşlemi.....	30
2.3.2. Hibridizasyon.....	30
2.3.3. Hibridizasyon Sonrası Yıkama.....	30
2.4. Analiz ve Değerlendirme.....	31
2.4.1. İnterfaz Fish Skorumla Kriteerleri.....	31
2.4.2. EGFR Probu İçin Sonuç Yorumlama Kriteerleri.....	32
2.4.3. Her 2 Probu İçin Sonuç Yorumlama Kriteerleri.....	32
2.4.4. c-Met Probu İçin Sonuç Yorumlama Kriteerleri.....	32
2.4.5. Problar İçin cut off Değeri Oluşturma.....	33
2.5. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı.....	33
2.6. Kullanılan Problar	33
3. BULGULAR	34

3.1. Yönteme İlişkin Bulgular	35
3.1.1. EGFR Probu ile Yapılan FISH Analizlerinin Sonuçları.....	37
3.1.2. HER2 Probu ile Yapılan FISH Analizlerinin Sonuçları.....	38
3.1.3. c-MET Probu ile Yapılan FISH Analizlerinin Sonuçları.....	40
3.2. İstatistiksel Bulgular	41
3.2.1. Kontrol ve Hasta Gruplarının Karşılaştırılması	42
3.2.2. Kontrol ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Gruplarının Oluşturulması ve İstatistiksel Değerlendirilmesi	50
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
6. ÖZET	68
7. SUMMARY	69
8. KAYNAKLAR	70
9. EK	75
10. ÖZGEÇMİŞ	76

III. SİMGE VE KISALTMALAR

AC: Adenokarsinom

AR: Amphiregulin:

BTC: Betacellulin

c-MET/HGFR: Hepatocyte Growth Factor Receptor

CYP1A1: Sitokrom P4501A1

CYP2E1: Sitokrom P4502E1

CYP450: Sitokrom P450

DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylidole / Antifade

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EBUS: Endobronşiyal ultrason

EFB: Endobronşiyal forseps biyopsi

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EPR: Epiregulin

FISH : Floresan in situ hibridizasyon

GEF: guanine-nükleotid exchange factor

GSTM1: Glutatyon S-transferazın izoenzimi M1

HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor

HGF: hepatosit büyüme faktörü

IASLC: International Association for the Lung Cancer

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

LCC: Büyük hücreli karsinom

MAPK: mitogen-activated protein kinases

NGF: Sinir büyüme faktörünü

NRG: Neuregulin-1

NRG2: Neuregulin-2

NRG3: Neuregulin-3

NRG4: Neuregulin-4

NSCLC: Non-small cell lung cancer

PI3K: fosfatidilinositol 3-kinaz

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PIP₂: phophptidylinositol-4,5-bisphoshate

SCC: Squamous cell carcinoma:

SCLC: Small cell lung cancer:

SF: Dağılım faktörü

SSC : Saline Sodium Citrate

STST: Signal transducer and activator of transcription

TGF-alfa: Transforme edici büyüme faktörü-alfa

UHY-ME: Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkililik Projesi

WHO: World Health Organization

IV. ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. EGF reseptör ailesi ve ligandları.....	20
Şekil 1.2. EGF reseptör yapısı ve çalışma şekli.....	21
Şekil 1.3. EGF sinyal üretim ara yolları.....	22
Şekil 1.4. RAS ara yolağı işleyiş mekanizması.....	24
Şekil 1.5. FISH tekniği uygulama şeması.....	27
Şekil 2.1. FISH sinyali skorlama kriterleri.....	32
Resim 3.1. EGFR gen kopya sayısı artışına sahip bir hücrenin FISH görüntüsü.....	35
Resim 3.2. HER-2/neu geni için gen amplifikasyonuna sahip hücrelerin bulunduğu bir olguya ait FISH görüntüsü.....	36
Resim 3.3. c-MET gen kopya sayısı artışına sahip ve normal hücrelerin bir arada bulunduğu bir olgunun FISH görüntüsü.....	36
Şekil 3.1. EGFR geni için kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmasına ait grafik örneği.....	42
Şekil 3.2. EGFR geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği.....	43
Şekil 3.3. EGFR geni için EGFR sinyalinin CEP/7 sinyaline oranının hasta ve kontrol gruplarına ait dağılımını gösteren grafik örneği.....	44
Şekil 3.4. Her2 geni için kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmasına ait grafik örneği....	45
Şekil 3.5. Her2 geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği.....	46
Şekil 3.6. Her2 geni için gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği.....	47
Şekil 3.7. Her2 geni için Her2 sinyalinin Alfasatellit 7 sinyaline oranının hasta ve kontrol gruplarına ait dağılımını gösteren grafik örneği.....	47
Şekil 3.8. c-Met geni için kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmasına ait grafik örneği...48	
Şekil 3.9. c-Met geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği.....	49
Şekil 3.10. c-Met geni için c-Met sinyalinin CEP/7 sinyaline oranının hasta ve kontrol gruplarına ait dağılımını gösteren grafik örneği.....	50

V. ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. Akciğer kanseri ile ilişkili mesleki maruziyete yol açan maddeler.....	5
Çizelge 1.2. Akciğer Kanserinin 2004-DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) Tarafından Yapılan Sınıflaması.....	10
Çizelge 1.3. Akciğer kanseri yeni evreleme sistemi.....	16
Çizelge 1.4. Yeni evreleme sistemindeki TNM sistemi.....	18
Çizelge 3.1. Benign histopatolojik tanı alan olgulardan oluşan kontrol grubunun cinsiyet, yaş, sigara kullanımı ve histopatolojik tanıları.....	34
Çizelge 3.2. Akciğer kanseri histopatolojik tanısı alan olgulardan oluşan hasta grubunun cinsiyet, yaş, sigara kullanımı ve histopatolojik tanıları.....	34
Çizelge 3.3. Kontrol grubunda EGFR geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları.....	37
Çizelge 3.4. Akciğer kanserli olgu grubunda EGFR geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları.....	38
Çizelge 3.5. Kontrol grubunda HER2 geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları.....	39
Çizelge 3.6. Akciğer kanserli olgu grubunda HER2 geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları.....	39
Çizelge 3.7. Kontrol grubunda c-MET geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları.....	40
Çizelge 3.8. Akciğer kanserli olgu grubunda c-MET geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları.....	41
Çizelge 3.9. Olgularda EGFR geni için hasta ve kontrol gruplarının sayısal olarak gösterilmesi.....	42
Çizelge 3.10. EGFR geni için değerlendirme kriterlerinin karşılaştırılmasında hasta ve kontrol gruplarına ait istatistiksel değerler.....	43
Çizelge 3.11. Olgularda HER2 geni için hasta ve kontrol gruplarının sayısal olarak gösterilmesi.....	44
Çizelge 3.12. HER2 geni için hasta ve kontrol gruplarına ait istatistiksel değerler.....	45
Çizelge 3.13. Olgularda c-Met geni için hasta ve kontrol gruplarının sayısal olarak gösterilmesi.....	48
Çizelge 3.14. c-Met geni için hasta ve kontrol gruplarına ait istatistiksel değerler.....	49
Çizelge 3.15, 3.17, 3.19, 3.21. EGFR /kontrol grubu.....	51
Çizelge 3.16, 3.18, 3.20, 3.22. EGFR /Hasta Grubu.....	52
Çizelge-3.23: EGFR Geni için %10 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	54

Çizelge-3.24: EGFR Geni için %20 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	55
Çizelge-3.25: EGFR Geni için %30 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	55
Çizelge-3.26: EGFR Geni için %40 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	55
Çizelge 3.27, 3.29, 3.31, 3.33. HER2 Kontrol Grubu.....	56
Çizelge 3.28, 3.30, 3.32, 3.34. HER2 Hasta Grubu.....	56
Çizelge-3.35: HER2 Geni için %10 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	60
Çizelge-3.36: HER2 Geni için %20 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	60
Çizelge-3.37: HER2 Geni için %30 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	60
Çizelge-3.38: HER2 Geni için %40 eşik değerine göre analiz sonuçları.....	60

1. GİRİŞ

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre tüm dünyada her yıl 12.4 milyon yeni kanser vakası tanı almakta, 25 milyon kanserli hasta bulunmakta ve 7.6 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmektedir (www.saglik.gov.tr). Kanser vakalarının yarısından fazlası ve ölümlerin %60'ı az gelişmiş ülkelerde meydana gelmektedir (www.saglik.gov.tr). Akciğer kanseri, tüm dünyada kanserden kaynaklanan ölüm sebeplerinin başında gelmektedir ve batı ülkelerinde insidansı giderek artmaktadır (Uzun 2008). Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1983-1989 yılları arasında ülkemizdeki kanser sıklığı 32/100 bin iken son zamanlarda kanser insidansı 229/100 bin yükselmiştir. Bunun % 26'lık bölümünü ilk sırada yer alan akciğer kanseri oluşturmaktadır (www.saglik.gov.tr). Mevcut verilere göre, akciğer kanseri ülkemizde erkeklerde daha sık olarak ortaya çıkmaktadır (Uzun 2008). Türkiye ulusal düzey erkeklerde ve kadınlarda kanserlere bağlı 2000, 2010, 2020 ve 2030 yılında beklenen ölüm sayılarına göre kanserlere bağlı gerçekleşmesi beklenen ölüm sayısı erkekler için 2010 yılında 44.616, 2020 yılında 61.076 ve 2030 yılında 89.117 olarak tahmin edilmektedir. Buna göre kanserlere bağlı gerçekleşmesi beklenen ölüm sayısı kadınlarda 2010 yılı için 25.307, 2020 yılı için 31.099 ve 2030 yılı için 39.094 olarak tahmin edilmektedir (<http://www.ukdk.org/pdf/kitap/8.pdf>). Son yıllarda kadınlarda sigara içiciliğinin giderek artmasıyla, akciğer kanserinin kadınlarda da görülme sıklığı artmış ve görülme sıklığı açısından akciğer kanseri meme kanserinden sonra ikinci sıraya yerleşmiştir (Philip ve Nasca 2008).

Kanser normal hücrelerden farklılaşma ile oluşan, DNA replikasyonu, hücre bölünmesi, hücre ölümü ve gen ekspresyonu gibi hücresel olayların yeniden düzenlenmesi ile karakterize bir hastalıktır. Genlerde spontan veya kalıtsal olarak meydana gelen mutasyonlar, hücre proliferasyonu ve/veya hücre farklılaşması ile ilişkilidir (Philip ve Nasca 2008). Kanser hücrelerinde ortaya çıkan kromozomal değişiklikler akciğer kanserlerinde ayırıcı özelliğe sahiptir. Sitolojik örneklerde kromozom ve gen kopya sayısı değişiklikleri floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile kolaylıkla saptanabilen değişikliklerdir (Buldendorf ve ark. 2005).

Akciğer kanserinin yüksek mortalite oranının sebebi genellikle hastalığın geç döneminde tanı almasıdır. Hastaların büyük bir kısmı erken tanı alamamaktadır. Bu yüzden sağ kalım oranı düşük olmaktadır (Mountan 1997). Dolayısıyla, akciğer kanserinin erken tanısı çözülmesi gereken bir sorun olmaya devam etmektedir.

Hastalığın başlangıç süreci oldukça yavaştır. Bu nedenle, bu süreçte tanı koymak için stratejiler geliştirmek gereklidir. Bronkoskopi, klinik ve radyolojik olarak akciğer karsinomundan şüphelenilen hastalarda sitolojik veya histopatolojik kesin tanının konulmasında sıklıkla kullanılan tanı koydurucu bir yöntemdir. Forseps biyopsi, fırçalama, yıkama ve transbronşiyal ince iğne aspirasyon biyopsisi rutin olarak uygulanan tanı koydurucu araçlardır. Bu yöntemler akciğer kanserinde %85 oranında gerçek tanıya ulaşılmasını sağlarlar.

Çalışmamızın amacı,

- 1.Akciğer kanserlerinde HER-2/neu, EGFR ve MET onkogenlerinin FISH tekniği için dizayn edilmiş sentromer ve lokus spesifik propları ile gen bölgelerini inceleyerek bu genlerdeki olası amplifikasyonları belirlemek,
- 2.Klinik ve radyolojik olarak akciğer kanseri tanısı almış hastaların bronkoskopik yolla elde edilen materyallerinde FISH analizinin tanı koyduruculuğunu değerlendirmektir.

1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Kanser tüm dünyada başlıca sağlık sorunudur. Akciğer kanseri, erkekler ve kadınlar arasında kanserden ölüm sebeplerinin başında gelir. Ortalama yaşam süresi 8 aydır. Avrupa ülkelerinde erkekler arasında tüm kanser olgularının %21'i, gelişmekte olan ülkelerde ise %15'i akciğer kanseridir (Metintaş 2010).

Akciğer kanseri son yıllarda erkeklerde sigara içme oranının azalmasına rağmen hala en yaygın görülen ikinci kanser türüdür. Amerika'da kadınlarda akciğer kanseri görülme sıklığı 1998'e kadar stabil iken, bu yıldan sonra sigara içme oranının artması ile birlikte kolorektal kanserlerini geçerek ikinciliğe yerleşmiştir (Philip ve Nasca 2008).

Her yıl dünyada 965.241'i erkek, 386.891'i kadın olmak üzere toplam 1.352.132 kişi akciğer kanserine yakalanmakta ve 1.180.000 kişi bu hastalık sebebi ile ölmektedir (Metintaş 2010). Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkililik Projesi (UHY-ME)'nin sonuçlarına göre Türkiye'de tüm yaş gruplarında akciğer kanseri nedeni ile toplam 11,586 ölüm görülmüştür. Tüm yaş gruplarında ölüme neden olan ilk on hastalığın arasında 7. sırada, % 2.7 oranı ile akciğer kanseri yer almaktadır (Metintaş 2010).

Bu kanser tipinin zaman içinde değişmeyen özelliklerden birisi 1 ve 5 yıllık sağkalım oranlarıdır. Dünyada en yüksek 5 yıllık sağkalım oranları % 15 seviyesinde ABD'den bildirilmiştir. Bu rakamlar, Avrupa'da %10, gelişmekte olan ülkelerde % 8.9 olarak gösterilmiştir. Böylece gelişmiş ülkelerde sağkalım oranlarının gelişmekte olan ülkelere daha yüksek olduğu görülmektedir (Metintaş 2010).

1.2. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi

Akciğer kanserinin etiyolojisinde cinsiyet, ırk ve genetik yatkınlık gibi değiştirilemeyen özellikler bulunduğu gibi engellenebilir dış etkenler de söz konusudur. Bunlar sigara içiciliği, sigara dumanına maruziyet, mesleki olarak karsinojenlere maruziyet, hava kirliliği ve diyetdir (Philip ve Nasca 2008).

1.2.1. Sigara İçiciliği

Sigara içmenin yaygın olduğu ülkelerde tüm akciğer kanserli olguların %90'ından sigara içiciliği sorumludur. Sigara içenler ile içmeyenler karşılaştırıldığında sigara kullananlarda akciğer kanseri görülme riskinin 20 kat arttığı gözlenmiştir. Bu riskte ortalama tüketim, tüketim süresi, tütün kullanmanın bırakılmasından itibaren geçen zaman ve başlanılan yaş etkilidir (Metintaş 2010).

Amerika'da yapılan çalışmalarda sigara içmeyenlerde akciğer kanserinden ölüm oranı 3-4/100000 iken, günde yarım veya 1 paket sigara içenlerde 59.3/100.000, günde 2-3 paket sigara içenlerde bu oran 217.3/100.000'tür (Alan ve Weithberg 2002).

Sigara içen erkeklerde akciğer kanseri mortalitesi her yıl 0.90/1000 oranında artmıştır. Bu oran hiç sigara içmeyenlerden 0.07/1000'den daha fazladır. Çoğu akciğer kanseri, kişilerin sigara içmemesi ile engellenebilmektedir (Alan ve Weithberg 2002).

Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunmaktadır. 60'dan fazlasının kanıtlanmış karsinojen özelliği vardır. Bunların bir kısmı radyoaktif özellikteki radon, kurşun, bizmut ve polonyumdur. Polisiklik hidrakerbonlar ve N-nitrozamin özellikle prokarsinojenik olarak tanımlanmıştır (Müsellim 2007). Ayrıca sigaranın mesleki karsinojenlerin çoğunun etkisini olumsuz yönde arttırdığı da tespit edilmiştir (Metintaş 2010).

1.2.2. Pasif Sigara İçiciliği

Sigara içmeyen bireylerin istemeden sigara dumanına maruz kalmasına pasif içicilik denir. Pasif olarak sigara dumanı inhale eden kişilerde de akciğer kanseri sıklığının arttığı bildirilmiştir. ABD'de her yıl 3 bin akciğer kanseri ölümü pasif içicilik nedeniyle olmaktadır. Pasif içicilik ile ilgili güçlü kanıtlar meta analiz çalışmalarından gelmektedir. Boffetta tarafından 2002 yılında yayımlanan meta-analizde sigara içenlerle evli olanlarda akciğer kanseri riskinin % 25, Taylor'un yaptığı meta-analizde ise eşi sigara içen kadınlarda bu riskin % 29 oranında arttığı belirtilmiştir (Metintaş 2010).

1.2.3. Çevresel Etki

Akciğer kanseri riski ve hava kirliliği arasında, pek çok çalışmanın sonucunda zayıf bir ilişki saptanmıştır (Metintaş 2010). Doll ve Peto 1981 yılında yayımladıkları bir makalede hava kirliliğini, tüm akciğer kanseri olgularının % 1-2'sinden sorumlu tutmuşlardır.

Hava kirliliğinin yanı sıra, fazla miktarda biriken radon gazı ve yüksek oranda radyasyona maruz kalma akciğer kanserine sebebiyet veren çevresel etkenler arasındadır (Metintaş 2010).

1.2.4. Mesleki Maruziyet

Birçok meslek grubunda, farklı maddelere (asbest, eter, radon, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, krom, nikel, inorganik arsenik bileşikleri gibi) maruziyet sonrası akciğer kanseri riskinin arttığı belirtilmiştir. Tüm akciğer kanserli olguların % 9-15'inden mesleki karsinojenler sorumlu tutulmuştur (Müsellim 2007). Bilinen karsinojenlerin listesi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Akciğer kanseri ile ilişkili mesleki maruziyete yol açan maddeler (İtil 2000).

Karsinojen	Risk oranı	İlgili meslek
Asbest Sigara içen Sigara içmeyen		Madenciler,çimento,tekstil,izolasyon,tersane
Uranyum Sigara içen Sigara içmeyen		Uranyum maddeleri
Kömür kurumu,katran	2-6	Havagazı işçileri,asfalt,madenciler
Hardal gazı	2-36	Hardal gazı işçileri
Vinil klorür	4	Plastik sanayi işçileri
Arsenik	3-8	Maden ve kaynak işçisi,böcek öldürücüler,Petrokimya işçileri
Krom	3-40	Çamaşır suyu üretimi,cam-seramik,itfaiyeciler

1.2.5. Diyet

Değiştirilebilir risk faktörleri içinde diyetin rolü üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır. Meyve ve sebzelerde antioksidanlar ve mikroelementler yoğun olarak bulunmaktadır. Diyetteki yüksek antioksidan içeriğinin oksidatif DNA hasarını azaltacağı ve böylece kansere karşı koruyucu olabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda akciğer kanseri ile beta karoten arasında güçlü bir ilişki olduğu, vitamin C ile ise zayıf olmakla birlikte yine de koruyucu ilişki bulunduğu gösterilmiştir (Metintaş 2010). İnsanlarla yapılan çalışmalarda betakaroten/retinol den zengin diyet alan kişilerde akciğer kanseri riskinin %40 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Müsellim 2007). Sigara içimi direkt olarak diyetel faktörlerin konsantrasyonunu etkileyebilmektedir. Sigara içenlerde antioksidan konsantrasyonları düşük olma eğilimindedir (Metintaş 2010).

1.2.6. Genetik faktörler

Akciğer kanseri üzerinde genetik faktörlerin etkili olduğu uzun süredir bilinmektedir. Vaka kontrol ve kohort çalışmalarında ailesel kümelenme gösterilmiştir (Alberg ve ark. 2007). Birinci derece akrabalar arasında kanser hastalığı bulunanlarda akciğer kanseri oluşma riski 2.4 kat artmış olarak gözlenmiştir (Müsellim 2007). Karsinojenleri içeren toksik ajanların metabolizmasında rol oynayan enzimlere ait polimorfizm ve mutasyonların kanser gelişimine yatkınlık oluşturduğu yönünde yayınlar da son zamanlarda literatürde yer almaktadır. Karsinojenleri içeren toksik ajanların metabolizması genellikle iki fazda ilerlemektedir. Faz 1'de sitokrom P450 enzimlerinden CYP2D6, CYP1A1 ve CYP2E1 yer alır. CYP1A1 için iki spesifik polimorfizm gösterilmiştir. Glutasyon S-transferaz faz 2 enzimidir. Polisiklik aromatik hidrokarbonların detoksifikasyonunu sağlar. Glutasyon S-transferazın izoenzimi M1 (GSTM1), benzo(a)pireni inaktive etmektedir. GSTM1 geni olmayanlarda akciğer kanser riski yüksek olarak saptanmıştır. Onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir kapasitesi, sigara içenlerde yatkınlığı belirlemedeki diğer etkenlerdir. Tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün mutasyonları, küçük hücreli akciğer kanserinde (KHAK) % 90'dan fazla, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) ise % 50'den fazla görülmektedir (Alberg ve ark.2007).

Akciğer kanseri patogenezinde katkıda bulunan genetik değişiklikler aşağıda verildiği şekilde özetlenebilir;

1. Kromozom sayısında ortaya çıkan değişiklikler
2. Kromozom yapısında ortaya çıkan değişiklikler
3. Allelik değişim veya heterozigote kaybı
4. Nokta mutasyonları, amplifikasyonlar ve delesyonlar

İlk üç değişiklik genomik düzeyde olmakla birlikte sonuncusu protein kodlama düzeyindedir (Zamani 2007).

Akciğer kanserinde çok çeşitli kromozomal anomaliler gözlenmektedir. En yaygın görülenleri; 1p,1q,2p,3p,5q,6p,7q,8p,8q,9p,9q,11q,13p14p,15p,18q,21q, ve Xq kromozomlarını içeren kayıplar iken, 1q,3q,8q,15q kromozomlarının ve 11q13 bölgesinin kazanımlarını içeren anomalilerdir (Demirhan ve ark.2010).

Nokta mutasyonları, DNA'daki bir tek ya da bitişik birkaç baz çiftindeki değişiklikleri tanımlamaktadır. Bu mutasyonlar baz değişiklikleri ve baz eklenmeleri (insersiyon) ya da baz eksilmeleri (delesyon) olarak ikiye ayrılmaktadır (Ekmekçi 2006).

Proto-onkogenlerin önemli bir temsilcisi olan RAS gen ailesi akciğer kanserinin alt tiplerinde görülmektedir. Proto-onkogenlerin mutant aktif formları onkogen olarak tanımlanmaktadır (Ekmekçi 2006). Dominant bir onkogen olan RAS, sinyal iletilişinde ve hücre çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır. RAS, büyümeyi teşvik eden sinyaller varlığında aktive edilir ve bu sayede MAPK (mitojenle aktive olan kinaz) kaskadı başlatılır. RAS genleri (k-ras, h-ras, n-ras) üç farklı guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı protein kodlamaktadırlar. GTP'nin guanozin difosfata (GDP) hidroliz olması RAS büyüme başlatıcı sinyalini inaktive etmektedir. Onkogenik RAS mutasyonlarının varlığında (ki bunlar çoğunlukla KRAS genindeki nokta mutasyonlarıdır), GTP molekülü GDP'ye hidroliz edilemez ve büyümeye teşvik edici olan RAS-GTP aktif formunun oluşmasıyla sonuçlanır. RAS mutasyonlarına KHAK'de nadiren rastlanmaktadır fakat KHDAK'nin %15-20'sinde bu mutasyonlar mevcuttur. Bu mutasyonların %70'i sigara dumanı kökenli BPDE (benzopiren dietiloksit) ve nitrözamin gibi DNA'ya kovalent bağlanan mutajenlerden kaynaklanan G-T baz değişimleridir. Bu durum KRAS mutasyonları ve sigara kullanımı arasındaki bağlantıya açıklık getirmektedir. Hem erken hem de geç fazdaki KHDAK'lerinde KRAS mutasyonları kötü prognozla birlikte karşımıza çıkmaktadır (Demirkan 2006).

Gen amplifikasyonu, genomik DNA'nın normalden fazla replike olması sebebiyle ortaya çıkar ve genellikle homojen olarak boya alan bölgelere (HSR) veya double-minute kromozomlar (DM) olarak ifade edilen karyotipik bozukluklara sebep olur. Amplifikasyon hücre büyümesi için seçici bir avantaj sağlayarak genlerin ekspresyonunun artmasına yol açar. Gen amplifikasyonu, bir hücrede onkogen kopya sayısını birkaç kattan birkaç yüz kata kadar arttırabilir. Bu durum ise karşılık gelen onkoproteinin çok miktarda üretilmesi ile sonuçlanır. Bu değişimler tümörlerin yaklaşık olarak %10'unda genellikle erken dönemden çok, geç dönemde ortaya çıkarlar (Uzun 2008).

Son yıllarda kanserin etyolojisine ve tedavisine yönelik çalışmalarda en çok araştırılan konulardan biri epidermal büyüme faktörü reseptörleri ve ara yolağıdır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz bu yolda yer alan EGFR, HER2 ve c-MET genleri ile ilgili bilgi daha sonraki bölümlerde verilmiştir.

1.3. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması ve Bu Sınıflama İçin Kullanılan Uluslararası Yöntemler

Akciğer karsinomları histopatolojik özellikleri açısından önemli ölçüde heterojen bir grup oluşturmaktadır. Histopatolojik sınıflamanın temeli hücre ayırımına dayanmaktadır. Ancak son yıllarda immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve genetik çalışmaların ışığında birçok tümörün çıkış hücresi üzerinde farklı görüşler meydana gelmiştir (Uzun 2008).

Akciğer tümörlerinin uzun yıllardır kullanılan klasifikasyonu 1981 yılında yenilenmiş olan WHO (World Health Organization) klasifikasyonudur. 1988 yılında IASLC (International Association for the Lung Cancer) grubunun önerisi ile bazı yenilemeler yapılmıştır. Akciğer ve plevra tümörlerinin klasifikasyonunun köklü bir şekilde yenilenmesi 1998 yılında WHO/ IASLC patoloji panel üyelerinin oluşturdukları kurul tarafından yapılmış ve 2000 yılında kullanıma girmiştir. Bu klasifikasyon, ilk WHO klasifikasyonundan (1967) bu yana, akciğer ve plevra tümörlerinin anlaşılmasında klinik, epidemiyolojik, histogenetik ve moleküler bazda ortaya çıkan gelişme sonucunda oluşturulmuştur (Onataslan 2006).

Akciğer kanserlerinin günümüzde kullandığımız sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 yılında yaptığı sınıflamadır (Travis ve ark.2004). Bu sınıflamaya göre akciğer kanserleri şu başlıklar altında toplanmaktadır.

1. Skuamöz hücreli kanser
2. Küçük hücreli kanser
3. Adenokanser
4. Büyük hücreli kanser
5. Adenoskuamöz kanser
6. Sarkomatoid kanser
7. Karsinoid tümör
8. Tükruk bezi tipi kanserler
9. Preinvaziv lezyonlar

Bu kanser tipleri arasında skuamöz hücreli kanser, adenokanser, küçük hücreli ve büyük hücreli kanserler en sık görülen kanser tipleridir. Bu ana grupların her biri kendi içinde alt tiplere ayrılır (Çizelge 1-2). Bunun yanı sıra tedaviye dayalı değerlendirmeler nedeniyle bu histolojik tipler basitçe su şekilde tasnif edilmektedir:

1-Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK ya da small cell lung cancer= SCLC)

2-Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK ya da non-small cell lung cancer= NSCLC)

a-Skuamöz (Epidermoid) akciğer karsinomu(Squamous cell carcinoma= SCC)

b-Adenokarsinom; tüm alt gruplarıyla (Adenocarcinoma= AC)

c-Büyük hücreli akciğer kanseri (Large cell carcinoma= LCC) (Onataslan 2006).

Akciğer karsinomlarının %90-95 gibi büyük çoğunluğunu ilk 4 tip oluşturmaktadır. Bu 4 tipin insidansı ülkeye göre değişiklik göstermektedir. Birçok Avrupa ülkesinde 4 tipin görülme sıklığı skuamöz hücreli karsinom için %40, adenokarsinom için %25, küçük hücreli karsinom için %25, büyük hücreli karsinom için %10 olarak bildirilmektedir (Akkoçlu ve Öztürk 1999).

KHAK ve skuamöz hücreli karsinom çoğunlukla santral yerleşimli, adenokarsinomlar ve büyük hücreli karsinomlar ise genellikle periferik yerleşimlidir (Akkoçlu ve Öztürk 1999).

Çizelge 1.2. Akciğer Kanserinin 2004-DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) Tarafından Yapılan Sınıflaması (Travis ve ark.2004).

1-Skuamoz hücreli kanser	a- Papiller b- Seffaf hücreli c- Küçük hücreli d- Basaloid	
2-Küçük hücreli kanser	a- Kombine küçük hücreli kanser	
3- Adenokanser	a- Mikst b- Asiner c- Papiller d- Bronşioalveoler kanser e- Müsin yapan solid adenokanser	d1- Non-müsinöz d2- Müsinöz d3- Mikst müsinöz ve non-müsinöz veya indeterminate e1- Fetal adenokanser e2- Müsinöz (kolloid) kanser e3- Müsinöz kistadenokanser e4- Taşlı yüzük hücreli adenokanser e5- Şeffaf hücreli adenokanser
4- Büyük hücreli kanser	a- Büyük hücreli nöroendokrin kanser b- Basaloid kanser c- Lenfoepitelyoma benzeri kanser d- Seffaf hücreli kanser e- Rabdoid fenotipli büyük hücreli kanser	a1- Kombine büyük hücreli nöroendokrin kanser
5- Adenoskuamöz kanser		
6- Sarkomatoid kanser	a- Pleomorfik kanser b- İğsi hücreli kanser c- Dev hücreli kanser d- Karsinosarkom e- Pulmoner blastom	
7- Karsinoid tümör	a- Tipik karsinoid b- Atipik karsinoid	
8- Tükürük bezi tümörleri	a- Mukoepidermoid kanser b- Adenoid kistik kanser c- Epitelyal-miyoepitelyal kanser	
9- Preinvaziv lezyonlar	a- Skuamöz karsinoma insitu b- Atipik adenomatöz hiperplazi c- Diffüz idiyomatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi	

Farklı histolojik tiplerdeki akciğer karsinomlarının klinik seyri ve tedaviye yanıtları da farklı olduğu için doğru histolojik tanı klinik olarak önem arz etmektedir (Akkoçlu ve Öztürk 1999).

1.3.1 Skuamöz (Epidermoid) Karsinom (SCC):

Cinsiyet açısından bakıldığında erkeklerde daha sık ortaya çıkmaktadır. Etyolojisine bakıldığında sigara içimi ile önemli bir bağlantısı olduğu görülmektedir. SCC, ana bronş kökenli, santral yerleşimlidir. İnsitu lezyon bronş mukozasında kabalaşma şeklinde görülür. Akciğer parankimi içine doğru yayılır. Bununla birlikte lenf gangliyonlarına invaze olabilmektedir. Kitlenin ortasında sıklıkla nekroz meydana gelir ve bol mitoz dikkati çeker. Epidermoid karsinom rezeke edilebilme oranı yüksek, metastaz oluşturma potansiyeli düşük bir tiptir (Onataslan 2006).

1.3.2 Küçük Hücreli Karsinom(KHK):

Çoğunlukla perihiler büyük bronşlardan köken alır. Genellikle bronş lümenini daraltırlar. Erken safhada mediastinal ve hiler lenf bezlerine metastaz yaptıklarından, tanı anında nadiren lokalize halde bulunmaktadır. En hızlı yayılım gösteren akciğer kanseri olması sebebiyle tanı konulduğunda olguların 2/3'sinde metastatik odaklar tespit edilebilir. Tanı esnasında hastaların yaklaşık %10'unda santral sinir sistemi metastazı belirtileri ve bulguları vardır. Küçük hücreli kanser ismini hücre tipinden alır. Bronş epitelinde dağınık olarak yer alan çok dar sitoplazmalı olan Kulchitsky hücreleri köken hücreleridir. Geniş nekroz alanları ve yumuşak kitleleri oluşturur. Hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı, lenfositten yaklaşık iki kat büyük hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler birbirlerine yaslanmış görünümündedir. Bol mitoz ve yaygın nekroz gösterirler. Sitolojik olarak dar sitoplazmalı, organel fakiri hücrelerdir. Sitoplazmada nöroendokrin salgı özelliği bulunan yoğun granüller görülmüştür (Onataslan 2006). Tüm akciğer kanserlerinin %30'unu oluştururlar. KHK, gelişmiş ülkelerde adenokarsinomlardan sonra ikinci sıklıkta görülen akciğer kanseridir. Ancak ülkemizde resmi veriler olmamakla birlikte en sık görülen akciğer kanseri olarak bilinmektedir (Zamani 2007).

1.3.3 Adenokarsinom (AC):

Sigara içimi ile ilgisi diğer tiplere göre daha az görülmüş olan kanser tipidir. Genç yaştaki kadınlar, sigara içmeyen veya sigarayı bırakan kişilerde görülmektedir.

Gelişmiş ülkelerde en sık görülen kanser tipidir (Zamani 2007). Olguların yaklaşık 3/4'ü periferik yerleşimlidir. Tek veya multipl kitleler şeklinde izlenir. Nadiren santralde yer aldığı görülmüştür. Bronkoalveolar tipi solid periferik nodül, multipl nodüler ya da periferik infiltrasyon şeklinde izlenir. Terminal bronşiyol veya alveollerden kaynaklanır. Histolojik olarak akciğer parankim yapısını bozmadan duvar boyunca yayılır. Nekroz görülebilir, buna karşılık kavitasyon sık olmamaktadır. Periferik olanlar plevrayı çeker, kalınlaştırır ya da invaze edebilir. Uzun yıllar santral skarların, adenokanserin öncü lezyonu olduğu sanılmış ancak sonra adenokanserin bir sonucu olduğu anlaşılmıştır. Tümör dokusundan salınan sitokinlerin fibrosizi indüklemesi sonucunda skar gelişiminin gerçekleştiği düşünülmektedir. Tümör, müsinde zenginse jeletinöz bir görünümü vardır (Zamani 2007). En önemli özellikleri gerçek lümen oluşturmalarıdır. İntrasellüler veya intersellüler boşluklar, iyi gelişmiş desmosomal bağlantılar mevcuttur. Adenokarsinomda metastatik yayılım yüksektir ve sıklıkla beyin, karaciğer ve kemik metastazları görülmektedir (Onataslan 2006).

1.3.4 Büyük Hücreli Karsinom (BHK):

BHK, çoğunlukla periferik, az oranda santral yerleşimli olarak tespit edilir. Nekroz alanları içerebilir. Büyük hücreli akciğer kanserinde periferik yerleşim yaklaşık %61-63 oranındadır (Onataslan 2006). Lezyonlar daha çok 4 cm'den büyük olmaktadır. Histolojik olarak belirgin pleomorfizm gösteren, belirgin nükleuslu, iri düzensiz nükleuslu, oval, fusiform ya da poligonal, soluk ya da eosinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşur. Mitoz sık görülür. Berrak hücreli tiplerde sitoplazmada belirgin berrak bir görünüm, dev hücreli tipte ise eritrosit ve polimorf nüveli lökosit fagositozu gösteren pleomorfik dev hücreler görülür (Onataslan 2006).

1.4. Akciğer Kanseri Tanısında Kullanılan Yöntemler

Akciğer kanserli olguların %2-20'si tanı konulduğunda semptomsuzdur. Bu olguların çabuk ve doğru değerlendirilmesi, en önemlisi erken evrede saptanabilmesi, küratif tedavi olanağını arttırmaktadır. Semptom ve bulgular yönünden bazı farklılıklara karşın tüm akciğer kanserleri benzer özellikler gösterir (Onataslan 2006).

Akciğer kanserli hastalarda görülen yaygın semptomlar; iştahsızlık, kilo kaybı, öksürük, kanlı balgam, göğüs duvarı veya kemik ağrısı, ateş, ses kısıklığı, nefes darlığı, plöral ağrı ve baygınlık geçirmedir. Bu semptomların birkaçı veya hepsi radyografik araştırma yapmayı gerektirir. Klinisyenin hastanın risk profilini ve tümörün histolojik türünü belirlemesi için güvenilir tanı yöntemleri kullanması gerekir(Alan ve Weithberg 2002).

Asemptomatik bir hastada akciğer tümörleri, büyük çaplı olarak gelişebilir (>3 cm). Çünkü akciğer parankiması ağrı algılama hissinden yoksundur. Bu yüzden tümörler ağrı algılanmadan büyür. Genellikle bir kütle, başka yapılara geçip onları istila etmeden fark edilmez. Bu yapılar daha çok kan damarı, öksürme reseptörü, plevral ağrı reseptörü veya uzak bir bölgedir(Alan ve Weithberg 2002).

Akciğer kanseri şüphesi olan hastalarda kullanılacak tanı yönteminin seçimi primer tümörün yerleşimi ve boyutuna, metastaz olup olmasına ve hastanın klinik durumuna göre yapılır. Tanı yöntemini seçerken, hastalığın yaygınlığını belirlemek ve histopatolojik örnekleme yapmak amaçlanmalıdır.

Akciğer kanseri tanısında kullanılan bazı tanı yöntemleri; (Alan ve Weithberg 2002).

1. Bronkoskopi
2. Balgam sitolojisi
3. Transbronşiyal ince iğne aspirasyonu ve biyopsisi
4. Mediastinoskopi,
5. Torasentez ve plevra biyopsisi
6. Torakotomi
7. Plöroskopi
8. Video yardımcı torakoskopi
9. Skalen lenf bezi biyopsisi
10. Açık akciğer biyopsisidir

1.4.1. Bronkoskopi

Bronkoskopi, hızlı bir gelişim göstererek göğüs hastalıkları ve yoğun bakım gibi disiplinlerin bünyesinde önemli bir öge olarak yerini almıştır. Fiberoptik bronkoskopun 1970'li yıllarda uygulanmaya başlaması, göğüs hastalıkları pratiğinde neredeyse kalp kateterininkine benzer bir biçimde etki yapmıştır. Göğüs hastalıkları uzmanları bu gelişmeyle birlikte tanı sürecine ve tedaviye daha fazla doğrudan

katılma imkanı elde etmişlerdir. Halihazırda bronkoskopi hem tanı hem de çeşitli havayolu lezyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Bronkoskopide kullanılan tanı yöntemlerinin yelpazesi oldukça geniştir. (Zamani 2010).

Bronkoskopik Tanı Yöntemleri

1. Endoskopik inspeksiyon
2. Santral örnekleme (bronş içi)
 - Endobronşiyal forseps
 - Endobronşiyal iğne aspirasyonu
 - Bronşiyal fırçalama
 - Bronş lavajı
 - Otofloresans bronkoskopi
3. Periferik örnekleme
 - Transbronşiyal akciğer biyopsisi
 - Eletromanyetik yöngüdümlü bronkoskopi
 - Bronkoalveoler lavaj
4. Bronş dışı örnekleme
 - Transbronşiyal iğne aspirasyon biyopsisi
 - Endobronşiyal ultrasonografi

1.4.2. Endobronşiyal Forseps Biyopsi

Endobronşiyal forseps biyopsi (EFB), bronş mukozası ve bronş duvarından histolojik örnekleme imkanı sağlar. Bronş biyopsisi, malignansi tanısında ve tümör hücre tiplerinin belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. EFB ile mukoza, lamina propria ve kas tabakası (kıkırdak dokusu ile birlikte veya olmaksızın) örneklenir.

Endoskopik olarak görünen akciğer kanserindeki EFB'nin tanısal verimi ortalama olarak %80'dir (%51-%97). Submukozal ve peribronşiyal hastalıklarda ise egzofitik kitle lezyonlarına göre tanısal verim daha düşük olmaktadır. EFB'nin akciğer kanserinin farklı histolojik alt tipleri için tanısal doğruluk oranları farklıdır. Primer akciğer kanserinde EFB ve torakotomi arasındaki histolojik tanısal uyum genel olarak iyi düzeyde olmakla birlikte, büyük hücreli karsinomda bu uyum en düşük seviyede olmaktadır. Muhtemelen, biyopsi örneklerinin küçük olması ve tümöral hücre heterojenliği, doğru tanı konulmasını güçleştiren faktörlerdir. Alınan biyopsi sayısı histolojik verimi etkileyebilir. Endoskopik olarak görünen tümörden

alınan bir adet biyopsideki malignite pozitiflik oranı %65.2 iken, beş veya üzerindeki biyopsi sayısı tanısal verimlilikte %90'dan daha fazla bir artış sağlayabilir. Ayrıca, patoloji laboratuvarının niteliği tanısal verimi etkileyebilmektedir. Hücre tipi ile ilgili hatalar genellikle küçük hücreli dışı karsinomun alt tipleri arasında görülmektedir (Zamani 2010).

EFB, basit bir işlem olup genellikle görünen lezyonu olan olgularda sadece minimal komplikasyonlarla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte altta yatan damarsal bir anomali (pulmoner veya bronşiyal arter dalı, vasküler malformasyon) varlığında işleme bağlı katastrofik veya fatal kanama görülebilir.

Bronkoskopi sırasında vasküler lezyondan şüphelenilirse biyopsi işlemi ertelenmeli ve öncelikle pulmoner/bronşiyal arter anjiyografisi yapılmalıdır. İntrabronşiyal lezyonun vasküler yapısının tanınmasında endobronşiyal ultrason'un (EBUS) yardımcı olabileceği bildirilmektedir(Zamani 2010).

1.5. Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi

Akciğer kanserinde evreleme çalışmaları yıllar içinde farklılıklar göstermiştir. Primer tümörün durumu (T), bölgesel lenf nodları (N) ve metastatik tutulumu (M) dayalı akciğer kanserinin sınıflandırıldığı ilk sistem Denoix tarafından 1946 yılında önerilmiştir.

1953 yılında Uluslararası Kansere Mücadele Birliği (UICC) TNM sistemine dayalı tümörlerin anatomik sınıflandırılması için bir komite kurmuştur. 1968 yılında bu komite malign tümörlerinin TNM sınıflandırmasını ilk kez yayımladıktan sonra 1973 yılında Amerikan Kanser Birliği (AJCC) TNM sistemine dayalı olarak kendi sınıflandırmasını yapmış ve tümörleri üç evreye ayırmıştır. Evre I ve II operabl, evre III ise inoperabl tümör olarak sınıflandırılmıştır. 1986 ve 1997 yıllarında UICC ve AJCC tarafından bazı değişiklikler yapılmış ve bu değişiklikler çerçevesinde şekillenen yeni evreleme sistemi tüm tanımlarıyla Çizelge 1.3 ve Çizelge 1.4'te belirtilmiştir.

KHAK biyolojik ve klinik davranışı ile KHDAK'inden oldukça farklıdır. KHAK'inde TNM evreleme sistemi sadece cerrahi ya da cerrahi tedaviyi de içeren multimodal tedavileri içeren küçük hasta serilerinde uygulanmış olmasına rağmen; cerrahi şansının çok az olduğu ve tedavinin belirlenmesinde genellikle hastalığın bir hemitoraksa sınırlı olup olmamasının rol oynadığı bu kanser tipinde, "sınırlı" ve

“yaygın” olarak ikili evreleme sistemi klinik pratikte çok daha yaygın olarak kullanılmaktadır. KHAK’de ilk evreleme sistemi 1958 yılında Veteran’s Administration Lung Cancer Study Grup (VALSG) tarafından sınırlı ve yaygın hastalık olarak kullanılmıştır. Tümör köken aldığı hemitoraksa sınırlı, aynı taraf mediasten, supraklavikuler lenf nodlarında tutulum var ve ekstratorasik tutulum yoksa “sınırlı hastalık”, tümör bir hemitoraksa sınırlı değil ve uzak metastaz var ise “yaygın hastalık” olarak değerlendirilir. 1989 yılında ise IASLC tarafından evrelemede değişiklik önerilmiştir (Modifiye VALG). Tümör bir hemitoraksa sınırlı; aynı ya da karşı tarafa hiler, mediastinal ve supraklavikular lenf bezi metastazı ; aynı taraf plevral effüzyon (sitoloji +/-) ise “sınırlı hastalık” (TNM’ye göre Evre I, II, III) olarak değerlendirilirken, sınırlı hastalık kapsamına girmeyen tümör ise “ yaygın hastalık (TNM’ye göre Evre IV) olarak nitelendirilmiştir.

Amerikan Kanser birliği ve UICC tarafından önerilen TNM sistemi KHAK için de uygulanabilir, ancak KHAK olgularının %5’inden daha azını oluşturan ve cerrahi tedavi şansı olan “çok sınırlı” olgularda kullanılmaktadır(Yurdakul 2010).

Çizelge 1.3. Akciğer kanseri yeni evreleme sistemi (Yurdakul 2010).

T: Primer Tümör

Tx:Primer tümör değerlendirilemedi ya da sitolojisinde veya bronşiyal lavajda malign tespit edildi ancak görüntüleme yöntemleriyle veya bronkoskopi ile gösterilemedi.

T0: Primer tümöre ait bir bulgu yok.

T1: Tümörün en büyük çapı 3cm veya daha küçük, akciğer veya visseral plevrayla çevrilmiş, brankoskopide lobar bronştan daha proksimale ulaşmamış (ana bronшта tümör yok.)

T1a: Tümörün en büyük çapı 2cm veya daha küçük

T1b: tümörün en büyük çapı 2cm’den daha büyük fakat 3cm’e eşit veya daha küçük

T2: Tümörün en büyük çapı 3cm’den büyük fakat 7cm’den daha büyük değil; veya tümör aşağıdaki durumlardan birine sahip

. Karinadan 2 cm veya daha uzak noktada ana bronş tutulmuş

. Visseral plevra invazyonu var

. Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif

pnömoni

T2a: Tümörün en büyük çapı 3cm'den daha büyük fakat 5 cm'e eşit veya daha küçük

Çizelge 1.3''Devam'' Yeni Akciğer kanseri evreleme sistemi

T2b: Tümörün en büyük çapı 5cm'den daha büyük fakat 7cm' eşit veya daha küçük

T3: Tümörün çapı 7cm'den büyük veya aşağıdaki durumlardan birine sahip

Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikard invazyonu

. Tümör ana bronшта karinayı tutmadan 2cm'den daha yakın mesafede

. Akciğerin tamamını kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni

. Tüm aynı lobda satellit nodül

T4: Aşağıdaki yapıları invaze eden herhangi bir büyüklükteki tümör

. Mediasten, kalp, büyük damarlar, trake, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra gövdesi, karina

. Primer tümörle aynı akciğerde fakat ayrı lobda satellit nodül.

N: Bölgesel lenf nodları

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf nodları metastazı yok

N1: İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler ve intrapulmoner lenf nodlarında metastaz

N2: İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarında metastaz

N3: Kontrateral mediastinal ve/veya hiler, ipsilateral ve/veya kontrateral skalen veya supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

M: Uzak metastaz

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

M1a: Kontrateral akciğerde metastatik nodül; malign plevral veya perikardial effüzyon veya plevrada tümör nodülleri

M1b: Uzak organ metastazı

Çizelge 1.4. Yeni evreleme sistemindeki TNM sistemi (Yurdakul 2010).

Gizli karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a, b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a, b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Evre IIB	T2b, a	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1a, b, T2a, b	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Evre IIIB	T4	N2	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a, b

1.6. EGFR, HER2 ve cMET genleri

1.6.1 Epidermal Büyüme Faktörleri

Epidermal büyüme faktörü (EGF) 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından izole edilmiştir. Cohen, sinir büyüme faktörünü (NGF) izole etmek için yaptığı çalışmalar sırasında elde ettiği bu maddeyi yeni doğan farelere hergün verdiği gözkapaklarının erken açıldığını ve dişlerinin erken çıktığını saptamıştır. Dolayısıyla, bu maddeye, epidermin gelişimini hızlandırdığı için epidermal büyüme faktörü (EGF) adını vermiştir (Cohen 1991).

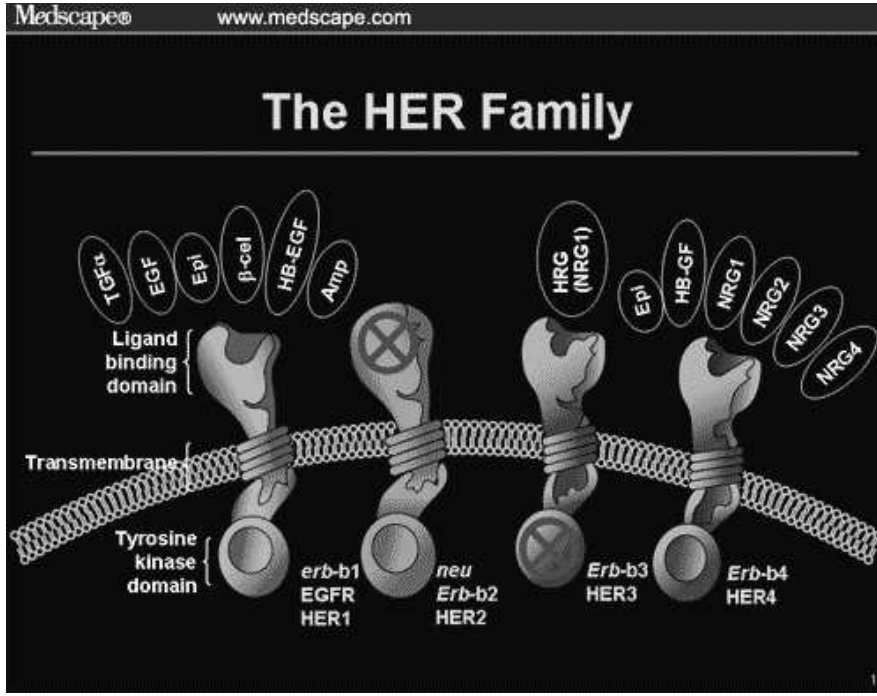
EGF'nin aminoasit dizilimi 1972 yılında ortaya konulmuştur. EGF, 6kDa molekül ağırlığında 53 aminoasitlik tek zincirli bir polipeptittir. Birçok vücut sıvısında ve dokularda varlığı gösterilmiştir. İnsan dokularında RT-PCR analizleri ile yapılan bir çalışmada böbreklerde, tükürük bezi, serebrum ve prostat dokusunda yüksek derecede EGF ekspresyonu gösterilmiştir. Trakea ve tiroide orta, kemik iliği, kalp, dalak, timus ,uterus ve kolonda düşük derecede EGF ekspresyonu izlenmiştir. Adrenal bez, karaciğer, akciğer, serebellum, plasenta ve ince barsaklarda EGF ifadesi saptanmamıştır (Groenestege ve Thébault 2007).

EGF; epitelyal ve mezotelyal kökenli hücrelerde mitojenik etkiye sahiptir. Epidermal büyüme faktörü hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi için, etkilenecek olan hücrenin yüzeyinde kendisini tanıyan bir reseptörün olması gerekir. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba yol açan bir seri sinyal ortaya çıkar. EGF, kendi reseptörü olan epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) bağlanarak etkisini gösterir. Etkin olduğu hücrelerde iyon alınımını, glikolizi, DNA ve RNA sentezini arttırıcı özelliği vardır (Cohen 1991). EGF ile uyarılan hücre, sonuçta DNA sentezi ve hücre bölünmesine yol açan bir dizi olayı başlatır.

EGF, EGF protein ailesinin bir üyesidir. Bu aileye mensup olan proteinler oldukça benzer bir yapıya ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. EGF dışında bu aileye ait olan proteinler aşağıda verilmiştir (Dreux ve ark. 2006).

1. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)
2. Transforming growth factor- α (TGF- α)
3. Amphiregulin (AR)
4. Epiregulin (EPR)
5. Epigen
6. Betacellulin (BTC)
7. Neuregulin-1 (NRG1)
8. Neuregulin-2 (NRG2)
9. Neuregulin-3 (NRG3)
10. Neuregulin-4 (NRG4)

Birinci grup ligandlar EGFR reseptörüne(EGFR, ErbB-1, HER-1) bağlanır. Bunlar epidermal büyüme faktörü, TGF-alfa (transforme edici büyüme faktörü) amphiregulin (AR), heparin binding-EGF (HB-EGF), betaselulin, epiregulindir. İkinci grup hem cerbB-1 hem de cerbB-4 reseptörlerine bağlanan betaselulin, HB-EGF, epiregulin ligandlarıdır.



Şekil 1.1. EGF reseptör ailesi ve ligandları (www.medscape.org/viewarticle/544922) adresinden alınmıştır.

1.6.2. EGF Reseptörleri (EGFR)

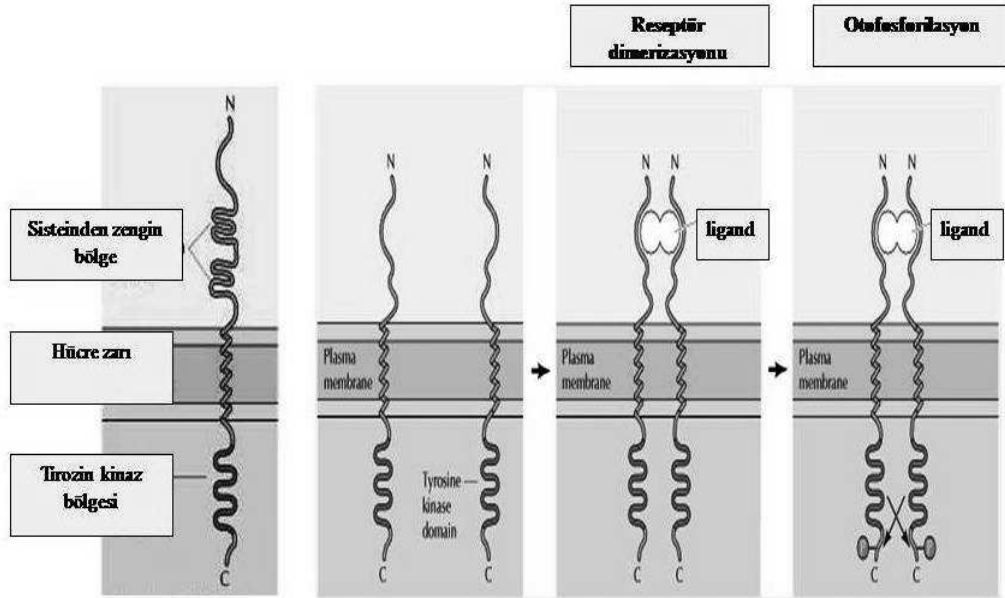
EGF reseptörleri O'Keefe ve arkadaşlarınınca saptanmış, daha sonra Cohen tarafından izole edilmiştir (Mc Kay 2002). EGFR reseptörü (EGFR, ErbB-1, HER-1) ilk keşfedilen tirozin kinaz reseptörüdür. Daha sonra aynı reseptör ailesine ait üç reseptör daha bulunmuştur. Bunlar, ErbB-2 (HER-2/Neu), ErbB-3 (HER-3), ErbB-4 (HER-4)'dür (Mitelman 1994). Ligandların EGFR ile etkileşmesi sonucu EGFR'de dimerizasyon ve ardından otofosforilasyon gerçekleşir. Bunun sonucunda mitojenik sinyalizasyonda yer alan sitoplazmik proteinlerin aktivasyonu meydana gelir. ErbB-2 ise bilinen hiçbir ligandla bağlanamaz. ErbB-3 sinyalizasyonu ise eksik kalır. ErbB-2/ErbB-3 heterodimer yaparak ayrı bir reseptör oluşturur (Geschwind ve ark.2004).

EGF reseptörlerinin yapısı

Bu grupta yer alan reseptörler tek bir polipeptit zincirinden oluşurlar. Peptit ekstraselüler sıvıdan sitozole kadar uzanır. Üç bölgeden oluşurlar:

- 1.N-ucu hücre dışı ligand bağlama bölgesi
- 2.Transmembranik segment membranı geçen bir α -heliks yapısıdır.
- 3.Sitozolde protein tirozin kinaz aktivitesi olan bir C-ucu bölgesi (sitozolik kuyruk)

Sitozolik kuyruk tirozin rezidüleri içerir. Tirozin-kinaz bazen reseptörün uzantısı şeklinde bazen de reseptörden ayrı olarak bulunur.



Şe

kil 1.2. EGF reseptör yapısı ve çalışma şekli

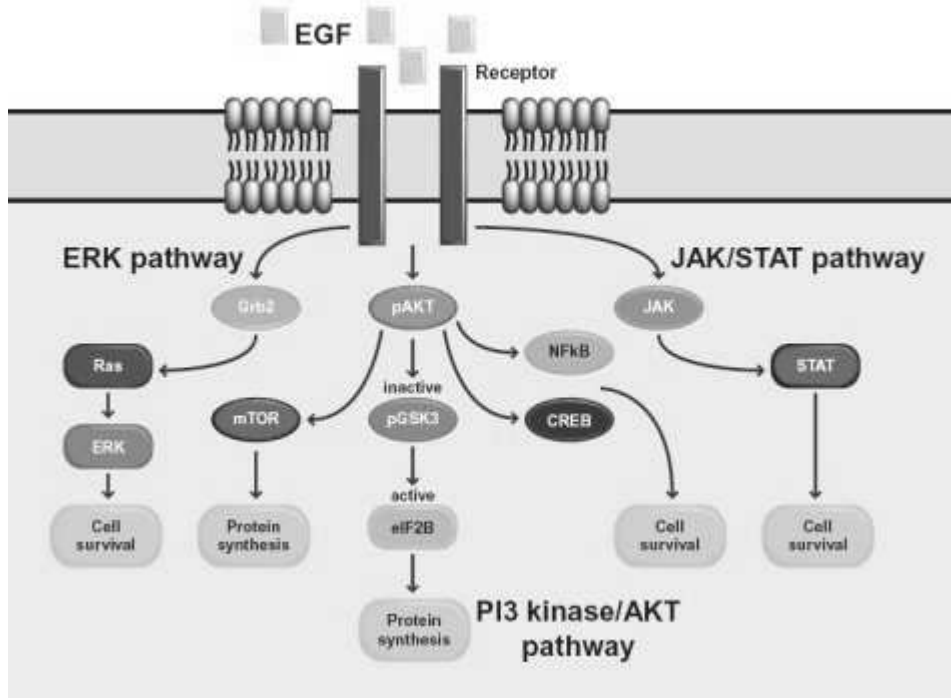
(www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9866/) internet adresinden alınarak modifiye edilmiştir.

Genelde tirozinkinaz reseptörleri plazma membranında ikili(dimerik) bir yapı oluştururlar. Ligantın bağlanması ile reseptör tirozin kinaz aggregate olur. TKR'nin sitozolik kısmında yer alan tirozin rezidülerinin otofosforilasyonu ligandın bağlanması ile gerçekleşir. Reseptör böylece çok sayıda sitozolik proteinin kendisi ile temasa geçmesine izin verir. Proteinler fosforillenmiş tirozin rezidülerine bağlanırlar. Bu proteinlerin bağlantıyı gerçekleştirebilmesi için reseptördeki fosfotirozin rezidülerini ve bunlara komşu aminoasitleri tanıyan bir aminoasit dizilimine sahip olmaları gerekir. Proteinlerin bu tanıma bölgelerine "SH₂domain: src homologik-domain " denir. Bu bölgeler src proteini ile benzerlik gösterir. Farklı SH₂ domainine sahip proteinler farklı sinyal üretim ara yollarını çalıştırır (Becker ve ark.2006). Sonuç olarak, TKR'ler aynı zamanda bir çok sinyal üretim ara yolağını aktive eder. Bunlar:

1-RAS ara yolağı,

2.PI3 kinaz/AKT (PI-3 kinaz/protein kinaz B) ara yolağı,

3-JAK/STAT ara yolağıdır.



Sekil 1.3. EGF sinyal üretim ara yolları

(www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10723&pid=10628 adresinden alınmıştır).

EGF reseptörleri sinyal ara yolları

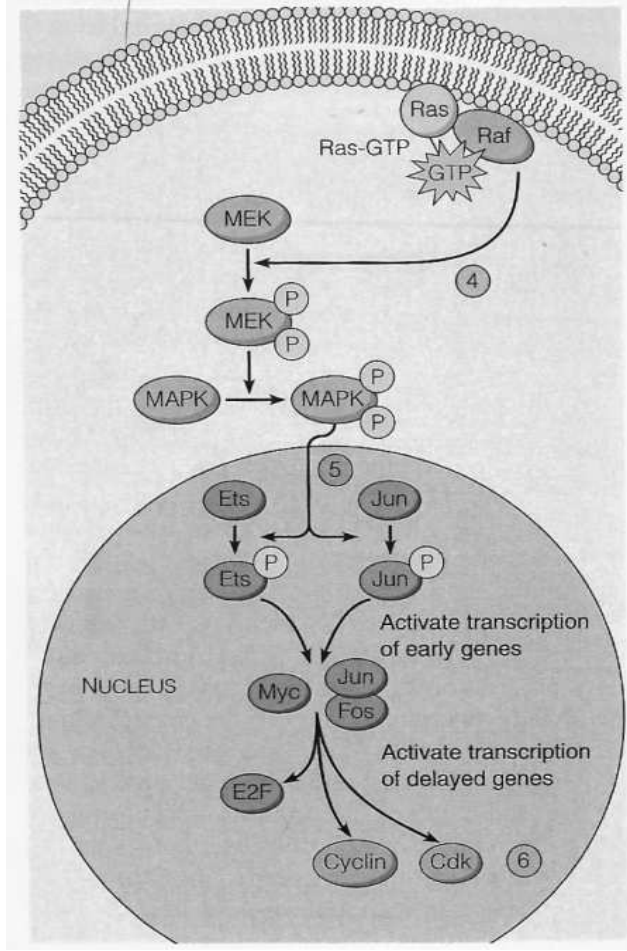
RAS ara yolağı,

Ras arayolu ile hücre büyümesi ve gelişimi aktive olur. Ras proteini hücre büyümesinin regülasyonunda önemli bir proteindir. Tek bir alt üniteye sahiptir. GDP veya GTP'ye bağlanabilir. Normalde GDP'ye bağlı inaktif halde bulunur. GTP'ye bağlı iken aktif haldedir. Aktif hale geçebilmesi için guanine-nukleotid exchange factor(GEF): guanine nükleotidi değiştirme faktörü olarak adlandırılan bir proteine ihtiyaç duyar. Fosforile olan reseptörün adaptör bir protein olan GRB2 ile bağlanması ve bu proteinin etkisi ile Ras'ı aktive eden GEF SOS(son of sevenless) proteininin hücre zarına toplanması gerekir. SOS etkisiyle GTP'ye bağlanan RAS aktif hale döner (Zarich ve ark. 2006).

Ras basamaklı bir protein kinaz sistemini aktive eder(Şekil 4). Aktif hale dönüşen Ras proteini bir protein kinaz enzimi olan Raf proteinini fosforiller. Raf proteini de MEK protein kinaz enzimini serin ve threonine rezidülerini

fosforilleyerek aktif forma dönüştürür. MEK'de MAPK(mitogen-activated protein kinases)'ları threonine ve tirozin rezidülerini fosforilleyerek aktif hale dönüştürür. MAPK'ın orijinal ismi başlangıçta "ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinazlar" (ERKs) ve "mikrotübül ilişkili protein kinaz (MAPK) olarak bilinmekteydi.

ERK tarafından fosforile edildiği anlaşılan ilk protein mikrotübül ilişkili protein (MAP) idi. MAPK tarafından fosforile edilen birçok hedef protein daha sonra bulunmuştur. Bunun sonucunda isimlendirme tekrar yapılarak, ismi "mitojenle aktive protein kinaz MAPK olmuştur (Downward 2003). MAPK'ların aktivasyonu Jun ve Ets transkripsiyon faktörleri ailesini fosforilleyerek aktive eder. Bu transkripsiyon faktörleri erken genler (early genes) denilen başka transkripsiyon faktörlerine ait genlerin okunmasını ve sentezlenmesini başlatır. Bunlar Myc,Fas ve Jun transkripsiyon faktörleridir. Bunlar da "delayed genes" denen bir gen ailesinin transkripsiyonunu başlatırlar. Delayed genlerden bir tanesi E₂F diğerleri cdk ve siklin genleridir. Cdk-siklin molekülleri Rb proteinini fosforiller ve G1-S geçişi tetiklenir. Genellikle ras mutasyonlarında bu yol sürekli açık kalır. Ras'a bağlanan GTP ras'dan ayrılamaz ve ras hep aktif kalır. Ras proto-onkogeninin 12. ve 61. aminoasitleri glisindir. Eğer bir nokta mutasyonu sonucunda 12. glisin arjinine dönüşürse K-ras onkogeni, 61. glisin lözine dönüşürse H-ras onkogeni ve 61. aminoasit arjinine dönüşürse N-ras onkogeni oluşur.



Şekil 1.4. RAS ara yolu işleyiş mekanizması (Becker ve ark.2006).

PI3 kinaz/AKT (PI-3 kinaz/protein kinaz B) ara yolu:

Reseptör aktive olduğunda PI3K (phosphatidylinositol-3 kinaz =PI3-kinase=PI3K) reseptörde bulunan uyarı ile fosforile olan tirozin rezidüleri ile bağlanarak aktive olur. Daha sonra bir hücre zarı lipiti olan PIP₂'yi (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) fosforiller. Dolayısı ile PIP₂, PIP₃'e dönüşür. PIP₃ plazma membranının içyüzünde yer alan inaktif protein kinazları da fosforilleyerek aktif hale dönüştürür .Bu aktif protein kinazlara kısaca Akt denilir. Akt bir çok anahtar hedef proteinin fosforillenmesini katalizler. Akt normalde apoptozisi baskılar ve hücre siklusunun duraklamasını engeller. PI3K-Akt sinyalizasyon arayolunun net etkisi hücre çoğalması ve canlılığının devamını sağlamaktır. Ras arayolunda çıkan herhangi bir problem (örn:mutasyonlar) bu arayolun açık kalmasına yol açar. PTEN(Phosphatase and tensin homolog) proteini

ise direkt olarak PI3K-Akt arayolunu engelleyerek kanserli hücrelerin apoptozise girmesini sağlar ve çoğalmayı engeller. PIP₃'den fosfat rezidülerini ayıran PTEN Akt'ın etkisini ortadan kaldırır. PTEN etkisinin ortadan kalkması Akt üzerindeki kontrolü de kaldırır ve kontrolsüz hücre bölünmesi izlenir. Prostat kanserlerinin %50'sinde, rahim kanserlerinin % 35'inde PTEN mutasyonu mevcuttur (Becker ve ark. 2006).

AKT, anti-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu arttırarak hücre sağkalımını teşvik etmektedir. Bu süreçte yer alan NFkB ve CREB transkripsiyon faktörleridir. AKT'nin başka bir hedefi ise glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'dür. GSK3 guanin nükleotid değişim faktörü olan ve protein translasyonunu kontrol eden eIF2B'nın fosforilasyonu ve inhibisyonundan sorumlu olan bir proteindir. Bu nedenle, AKT tarafından GSK3 ün inaktivasyonu üzerine, eIF2B defosforile olur. Protein sentezi ve amino asit depolanmasını arttırır (Lizcano ve Alessi 2002). AKT ayrıca promosyon A'ya defosforilize konumundadır. AKT, EIF-4E bağlayıcı protein ve inhibisyonu ile(4E-BP1)(Asnaghi ve ark, 2004) protein sentezini teşvik ederek rapamisin (mTOR) aktive eder. Rapamisin, p70 ribozomal S6 kinaz (p70s6k) üzerinden bu etkiyi gerçekleştirirken, EIF-4E bağlayıcı protein (4E-BP1) inhibe eder (Asnaghi ve ark, 2004). Sonuçta, bu işlemler EGF'ye yanıt olarak hücre büyümesi ve sağ kalımını teşvik eder.

JAK/STAT ara yolağı:

“Signal transducer and activator of transcription”(STAT) proteinleri 90'lı yılların başında interferon aracılı gen transkripsiyonunu düzenleyici molekül olarak tanınmıştır. Günümüzde çeşitli sitokinlerin de bu yolu aktive ettiğini biliyoruz. Bu proteinler STAT1, STAT 2, STAT 3, STAT4, STAT 5a, STAT 5b ve STAT 6 olmak üzere 7 adet olarak tanımlanmışlardır. EGF hücre yüzey reseptörüne bağlanır. JAK proteinleri reseptörü fosforiller. İnaktif STAT molekülleri reseptörü ile etkileşir. STAT molekülleri homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılırlar. DNA üzerine heterodimer veya homodimer olarak bağlanarak transkripsiyonda hücre canlılığını sağlayan ve hücre yaşam süresini uzatan genlerin okunmasını sağlarlar (Kisseleva ve ark.2002; Henson and Gibson 2006).

1.6.3. MET protoonkogeni

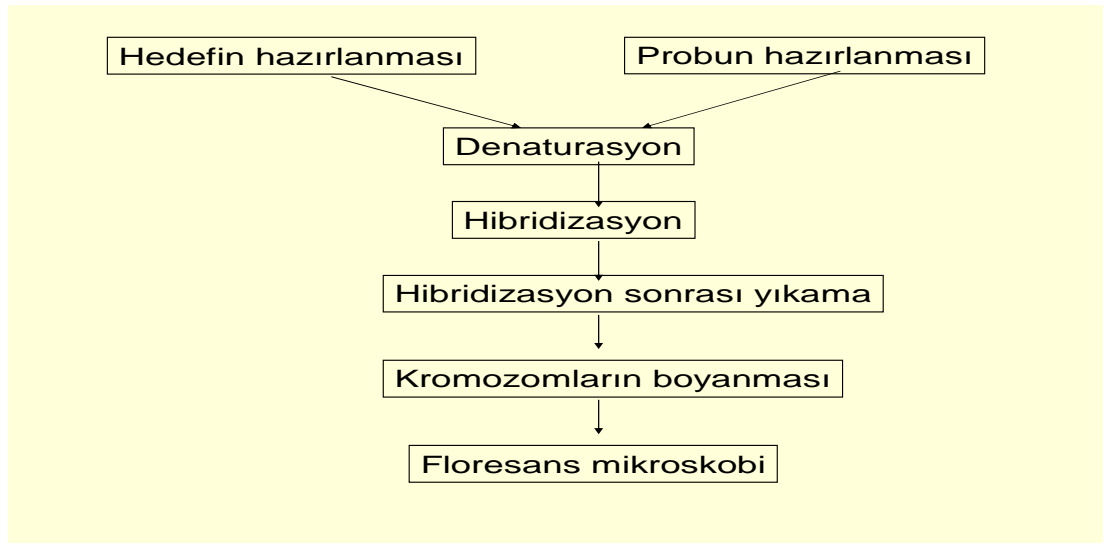
MET geni 7p31'de yerleşmiş bir proto-onkogendir. Met geni 1408 amino asitlik bir glikoprotein olan transmembranik bir hücre yüzey reseptörünü kodlar. Bu reseptörün ligandı hepatosit büyüme faktörü / dağılım faktörü (HGF / SF)dir (Park ve ark.1987). Dean ve arkadaşları bu genin tirozin kinaz reseptör ailesinden bir onkogen olduğunu göstermişlerdir (Dean ve ark.1985). İnsan insülin reseptörü ve ABL onkogeni ile oldukça benzer bir dizilimi vardır. MET, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) AKT ve MAPK arayolağını aktive eder. Normal fibroblast hücre dizilerini transforme etme yeteneğine sahiptir ve daha sonraları pek çok farklı doku hücresinde de gösterilmiştir (Cooper ve ark. 1984). Met-HGF/SF aktivasyonu çok sayıda hedef hücrede mitojenik, motojenik morfojenik ve anti-apoptotik etkiler ortaya çıkarır (Ma ve ark.2003). Tümör hücrelerinde mutasyon, amplifikasyon ve aşırı ekspresyonu yoluyla aktif hale gelebilir. Tirozin kinaz ve ekstramembran bölgelerindeki mutasyonlar reseptör aktivasyonu ile sonuçlanır. MET mutasyonları papiller böbrek karsinomu, çocukluk hepatoselüler karsinomu ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu dahil olmak üzere insan kanserlerinde tespit edilmiştir (Birchmeier ve ark.2003).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR; 131.550) kinaz inhibitörleri gefitinib ve erlotinib, EGFR aktive edici mutasyonları olan akciğer kanserleri için etkili tedavi edici ajanlardır, ancak bazı tümörler ilaca karşı direnç geliştirebilir. (Engelman 2007). Engelman, gefitinibe karşı MET protoonkogen odaklı amplifikasyon sonucu direnç geliştiğini, gefitinib duyarlı bir akciğer kanseri hücre dizisinde göstermiştir. Gefitinib veya erlotinib direnci gelişen 18 akciğer kanseri örneğinin 4'ünde (% 22) MET amplifikasyonu tespit edilmiştir. Bu örneklerde MET sinyal arayolağı inhibisyonu, gefitinib için hassasiyeti eski haline döndürür. MET amplifikasyonunun bu etkiyi EGFR / ErbB ailesi reseptörlerinden ERBB3 (HER3)-bağımlı olarak aktive olan PI3K arayolağı üzerinden gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (Engelman 2007).

1.7. Floresans İn Situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği:

Sitogenetik ve moleküler genetik teknikleri bir araya getiren bir tetkiktir. Genomda istenilen hedef DNA bölgesinin, floresan veren DNA veya RNA probları ile boyanarak “in situ” olarak gözlenmesine imkan tanır. İnterfaz hücre çekirdeğinin ve metafaz kromozomlarının değerlendirilmesini sağlar. Yöntemin temelinde, görüntülenmesi hedeflenen DNA bölgesine komplementer florokromlarla (floresans veren moleküller) işaretlenmiş olan tek iplikçikli (oligonukleotid) DNA dizileri kullanılır. Bu florokromlarla işaretli DNA dizilerine Prob denir. Morfolojik olarak korunmuş kromozom preparasyonlarına, fikse edilmiş hücrelere ya da doku kesitlerine uygulanabilmektedir. Sayısal ve yapısal anomalilerin, kromozomal mikrodelsiyonların, kriptik translokasyonların, marker kromozomların tanımlanmasında, tümör gelişiminde ortaya çıkan anomalilerin tanımlanmasında ve gen haritalamada kullanılan bir tetkiktir (Barch ve ark.1997, Wegner 1999, Nussbaum 2001, Zamani AG 2007).

FISH prosedürü genel olarak şu basamaklardan oluşur.



Şekil 1.5. FISH tekniği uygulama şeması

-Hedef DNA (metafaz kromozomu ya da interfaz nükleusu) ve prob hazırlanır.

-Hedef DNA ve prob birlikte ya da ayrı ayrı yüksek ısıda denature edilir (72-75°C). DNA'nın çift zincirli yapısı açılarak tek zincirli hal alır.

-Hedef DNA ve probun 37°C'de hibridizasyonu sağlanır (süre probun tipine göre değişir: 1 saat- 16 saat). Bu aşamada probalar hedef kromozom üzerindeki komplementeri oldukları bölgeye ya da bölgelere bağlanır.

-Hibridizasyon süresi bitince non-spesifik bağlanmalardan ve artefaktlardan (kirliliklerden) kurtulmak için çeşitli sıcaklıklarda ve çeşitli yoğunluklardaki tuz ve deterjan türevi maddelerle yıkama işlemi yapılır (Posthibridizasyon yıkama).

-Ardından kromozomlar kontrast oluşturan bir renkle (örnek DAPI=4'-6-diamidino-2-phenylidole / Antifade) boyanarak görünür hale getirilir.

- Floresans mikroskopta incelenir.

Hedef kromozom ya da kromozom bölgesine ve amaca bağlı olarak kullanılan çeşitli probalar vardır:

a). Tüm Kromozom Boyama Problemleri (Kromozom Painting Prob): Kromozom ya da kromozom kollarının identifikasyonu için kullanılan problemlerdir.

b). Sentromer Spesifik Problemler: Sentromer yakınındaki alfa satellit bölgesine özgü problemlerdir. Sadece 13/21 ve 14/22 kromozomları sentromerik bölgelerinde homolog dizilere sahiptirler. Ayırt edilebilmeleri için ekstra bir prob ile kombine edilirler.

c). Lokus Spesifik Problemler = Tek Gen Problemleri : Delesyon ya da duplikasyonları tespit etmek ve gen lokalizasyonunu belirlemek için kullanılan bir gen/lokus bölgesine özgü problemlerdir. Tümör genetiğinde sıklıkla kullanılır (Barch ve ark.1997, Wegner 1999, Nussbaum 2001, Zamani AG 2007).

d). Telomerik Problemler: Kromozomların terminal bölgelerini tanımlayan problemlerdir. Hücre yaşlanması (senescence), kromozomal yeniden düzenlenmeler ve delesyonların araştırılmasında kullanılır. Her kromozoma özgü telomerik problemler bulunmaktadır.

2-GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hasta Seçimi

Çalışma kapsamına S.Ü.M.T.F. Göğüs Hastalıkları Kliniğinde takip edilen, radyolojik olarak pulmoner lezyon saptanan 39 hasta alındı . Histopatolojik olarak akciğer kanseri tanısı alan olgular (n=24) Grup 1', benign akciğer hastalığı tanısı alan olgular(n=15) ise Grup 2'yi oluşturdu. Tüm bronkoskopik işlemler deneyimli bir göğüs hastalıkları uzmanı tarafından gerçekleştirildi.

Tüm olgulara premedikasyon (atropin), lokal anestezi (lidokain) ve sedasyon (midazolam) yapıldıktan sonra fiberoptik bronkoskop (Olympus, Japan) ile oturur pozisyonda transnazal yoldan girildi.

Bronkoskopik olarak direkt tümör bulgusu (endobronşiyal tümör veya tümöral infiltrasyon) saptanan tüm Grup 1 olgularında lezyonlu bölgeden biyopsi örnekleme yapıldı. Grup 2'de ise bronkoskopik biyopsi örnekleri , radyolojik olarak saptanan lezyonun bulunduğu taraftaki ilgili inflamasyonlu bronş mukozasından alındı. İşlemden önce tek kullanımlık biyopsi forsepsi (oval kepçeli) kullanıldı. Tüm olgularda, ilk alınan biyopsi materyali, steril serum fizyolojik içeren ependorf tüpü içine konularak sitogenetik çalışma için hemen genetik laboratuvarına, diğer biyopsi örnekleri ise patoloji laboratuvarına gönderildi.

Çalışma tamamlanana kadar histopatolojik tanımlar sadece göğüs hastalıkları uzmanı tarafından bilinmekteydi. Genetik bölümü tanılardan haberdar değildi.

2.2. Preparat Hazırlama

2.2.1 Lamların Temizlenmesi:

- Frostlu lamlar sabunlu suda bir süre bekletildikten sonra ilk önce çeşme suyu altında 3 kere yıkandı.
- Distile sudan geçirildi
- Fixatif solüsyonundan geçirilerek temiz bir bez yardımı ile silindi.

2.2.2 Lamların Hazırlanması:

- Steril serum fizyolojik içeren ependorf tüpü içinde gönderilen doku parçalarından-daha önceden temizlenmiş soğutulmuş- lamlara dokundurma yolu ile preparasyon (Touch preparasyon) yapıldı. Işık mikroskobu altında hücre yoğunluğu tespit edilerek işaretlendi.

- Lamlar, bir prob için bir adet olmak üzere, her hastadan toplamda 3 adet olacak şekilde hazırlandı.
- FISH yönteminin uygulanacağı zamana kadar -20°C de saklandı.

2.3. FISH Yöntemi

Hazırlanan preparatlara EGFR, HER2, c-Met gen bölgelerinin probları (CytoCELL/aquarius) kullanılarak (Flouresan in situ hybridization) FISH yöntemi uygulandı.

2.3.1. Ön hazırlık işlemi:

Preparatlar sırası ile 2×SSC, ve %70, %85, %100'lük alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi. Havada kurutuldu.

2.3.2. Hibridizasyon:

- Lamlar kuruduktan sonra işaretlenmiş olan bölgelere ilgili proplardan 10 µl eklendi ve üzeri lamel ile kapatıldı.
- Lamelin etrafı entellan veya uygun bir yapıştırıcı ile hava almayacak bir biçimde yapıştırıldı.
- Lamlar hot-plate de(Hychrome/Eureoclone) 37⁰C sıcaklıkta 10 dk bekletildi.
- Hot-plate'in sıcaklığı 75⁰C ye yükseltildi ve preparatlar 2 dk bu sıcaklıkta bekletildi.
- Sıcaklık tekrar 37⁰C ye düşürüldü ve cihazın su haznesine su eklenip, preparatlar 1 gece bu şekilde bırakıldı.

2.3.3. Hibridizasyon sonrası yıkama:

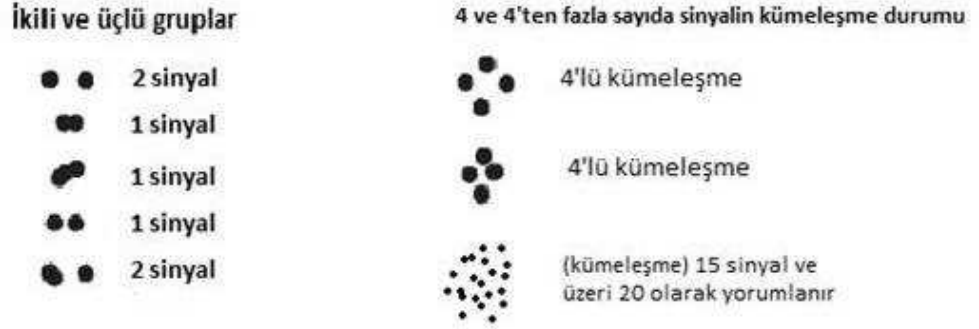
- Benmarinin sıcaklığı 72⁰C ye ayarlandı; 4×SSC'nin sıcaklığı , benmarinin sıcaklığına ulaşıncaya kadar bekletildi.
- Lamların üzerindeki yapıştırıcı ve lamel uzaklaştırıldıktan sonra lamlar, 4×SSC de 2 dk ve oda sıcaklığındaki 2×SSC de 30 sn bekletildi.
- Preparatların işaretli bölgeleri üzerine 10 µl DAPI ilave edilerek lamelle kapatıldı ve preparat analiz edilene kadar -20⁰C de bekletildi.

2.4. Analiz ve Değerlendirme

Preparatlar Nikon ECLIPSE E 600 floresan mikroskopta uygun filtreler kullanılarak incelendi . FISH sinyalleri içeren nükleuslar analiz edildi ve fotoğraflandı.

2.4.1 İnterfaz FISH Skorlama Kriterleri

1. Her probun dalga boyuna özgü filtreler kullanıldı ve veriler her prob için ayrı ayrı kaydedildi.
2. Sadece sınırları belli olan nükleuslar değerlendirildi, sınırları olmayan veya belirsiz olan ve hasara uğramış interfaz çekirdekleri değerlendirilmedi.
3. Nükleus içindeki eşit yoğunlukta olan sinyaller değerlendirildi. Düşük düzeyli spesifik olmayan hibridizasyon sinyalleri sayıma dahil edilmedi. Bu sinyaller düşük yoğunlukları ve farklı şekilleri ile kolayca tanımlanabildi.
4. Çiftli, bölünmüş, üçlü ve kümelenmiş sinyaller özel ve değerlendirmede oldukça dikkat gerektiren durumlar olduğu bu sinyaller için aşağıdaki şekilde sayıldı(Şekil 6):
 - i. Birbiri ile bağlantılı görünen veya temas halinde olan ikili ve üçlü sinyaller tek sinyal olarak
 - ii. Birbiri ile aynı hizada ama ayrı olan sinyallerin arasında büyük olan sinyalin çapı kadar boşluk varsa bu sinyaller tek sinyal olarak
 - iii. En fazla 15 adet sinyalin bir arada bulunduğu sinyal grupları ise küme (cluster) olarak sayıldı.
 - iv. 15 sinyalin (<15) üstünde sinyal içeren gruplar ise innumerable=sayısız olarak olarak sayıldı ve '16' olarak nitelendirildi.
5. Kullanılan değerlendirme probu ve kontrol probunun sinyal oranı elde edildi.
6. Değerlendirmede toplamda 200 interfaz hücre sayısına ulaşıldı. Değerlendirme sonucunda olgular, FISH pozitif ve FISH negatif olarak 2 gruba ayrıldı.



Şekil 2.1. FISH sinyali skorlama kriterlerinin şematize hali(Varella-Garcia ve ark.2009).

2.4.2 EGFR Probu İçin Sonuç Yorumlama Kriterleri:

- Her bir olguda Sayılan hücrelerin %40'ından fazlasında EGFR gen bölgesine ait gen kopyası ≥ 4 olduğunda amplifikasyon pozitif olarak kabul edildi.
- Yine her bir olguda sayılan tüm hücrelerdeki EGFR sinyal sayısının CEP 7, (kontrol probu) sinyal sayısına bölüldüğünde çıkan oran ≥ 2 büyük ise bu durum amplifikasyon pozitif olarak kabul edildi.
- Her bir olguda değerlendirilen hücrelerin %10 dan fazlasında gen kopya sayısı ≥ 15 ise bu durum amplifikasyon pozitif olarak kabul edildi.
- Sayılan hücrelerin %40'dan azı ≥ 4 sinyal verdiği bu durum amplifikasyon negatif olarak kabul edildi(Varella-Garcia ve ark.2009).

2.4.3. HER2 Probu İçin Sonuç Yorumlama Kriterleri:

EGFR analizi için kullanılan kriterlere uyuldu.

2.4.4 c-Met Probu İçin Sonuç Yorumlama Kriterleri:

Her bir olguda, sayılan hücrelerde c-Met geni için ≥ 4 gen kopya sayısı yüzdesi, "cut off" değeri olarak belirlenen yüzdenin (%2) ≥ 3 katı ise amplifikasyon pozitif olarak değerlendirildi (Zeng ve ark. 2008).

2.4.5. Problar İçin "cut off" Değeri Oluşturma

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirirken yararlanacağımız ‘‘cut-off’’ değerini belirlemek için gönüllü olarak çalışmamıza katılan 5 sağlıklı kişiden alınan periferik kandan kültür yapılarak elde edilen interfaz hücreleri FISH prosedürüne uygun olarak preparasyon yapıldı ve incelendi. İnceleme sonucunda problemler için ‘‘cut off’’ değeri oluşturulduktan sonra skorlama değerlendirmeleri yapıldı.

2.5. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı:

20xSSC:

17,5 gr NaCl (Merck kimya) 100cc distile su içerisinde çözdürüldü,

8,8 gr Sodyum Sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)(Merck kimya) başka bir kaptaki 100cc distile su içerisinde çözdürüldü, son olarak iki çözelti karıştırıldı.

2xSSC:

1 birim 20xSSC, 9 birim distile su olacak şekilde 20xSSC’den dilüe edilerek hazırlandı.

4xSSC:

2 birim 20xSSC, 8 birim distile su olacak şekilde 20xSSC’den dilüe edilerek hazırlandı.

%70’lik etil alkol:

30cc distile su üzerine 70cc absöü etil alkol eklenerek hazırlandı.

%85’lik etil alkol:

15cc distile su üzerine 85cc absöü etil alkol eklenerek hazırlandı.

Hibridizasyon sonrası yıkama solüsyonları:

2xSSC ve 4xSSC içerisinde 50µl Tween 20 eklenerek hazırlandı.

2.6 Kullanılan Problemler

Çalışmamızda,

- EGFR (7p11.2) (Cytocell,UK)
- HER2 (17q11-12) (Cytocell,UK)
- c-MET (7q31) (Cytocell,UK) ticari amplifikasyon problemleri kullanıldı.

3. BULGULAR

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalından, histopatolojik olarak tanı almış, yaşları 26-82 arasında olan(ortalama: 60), 7'si kadın 32'si erkek toplam 39 birey çalışmaya dahil edildi. Olguların yaş, cinsiyet ve sigara içme bilgileri toplanarak değerlendirildi. Akciğer kanseri ve benign hastalık histopatolojik tanısına göre iki grup oluşturuldu. Benign hastalık histopatolojik tanısı alan grup kontrol grubu olarak kabul edildi.

Çizelge 3.1. Benign histopatolojik tanı alan olgulardan oluşan kontrol grubunun cinsiyet, yaş, sigara kullanımı ve histopatolojik tanıları (n=15).

No	Ad-Soyad	Cinsiyet	Yaş	Sigara (paket-yıl)	Histopatolojik Tanı
6	T.K.	E	26	6	Miliyer TB
7	F.E.	K	66	YOK	Multipl nodüller
8	A.B.	K	57	15	Pnömoni
10	M.B.	E	62	YOK	Bronşektazi
16	H.Ç.	E	77	60	Kronik bronşit
17	H.S.	E	67	30	Endobronşiyal tüberküloz
18	A.K.	E	49	25	Idiyopatik pulmoner fibrozis
19	G.P.	K	40	YOK	Akciğer bülü
20	A.M.	E	43	10	Pnömoni
21	F.K.	K	57	2.5	Malign mezotelyoma
22	M.Y.	E	80	YOK	Multipl akc. Nodülleri
23	T.G.	K	69	1	Idiyopatik pulmoner fibrozis
24	A.A.	E	67	YOK	Antrakofibrozis
35	A.B	K	49	0	Fibrotik band
39	D.M	K	31	5	Sarkoidoz

Çizelge 3.2. Akciğer kanseri histopatolojik tanısı alan olgulardan oluşan hasta grubunun cinsiyet, yaş, sigara kullanımı ve histopatolojik tanıları (n=24)

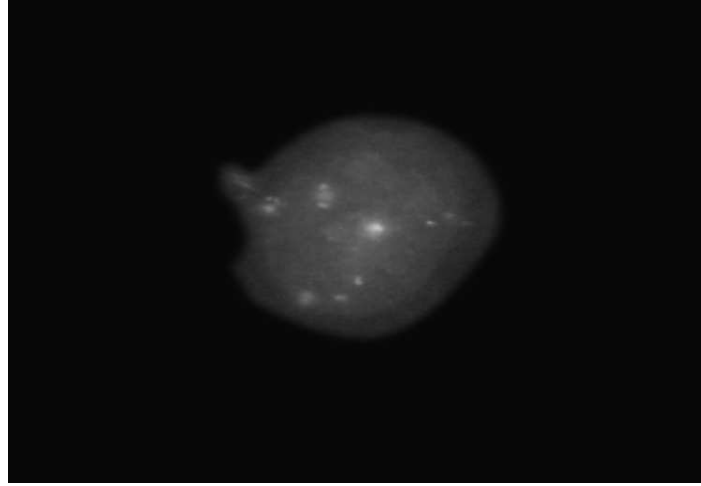
No	Ad-Soyad	Cinsiyet	Yaş	Sigara (paket-yıl)	Histopatolojik Tanı
1	A.K.	E	62	60	Küçük hücreli CA
2	A.U.	E	64	90	Epidermoid CA
3	Ş.Y.	E	62	40	Epidermoid CA(az dif)
4	A.A.	E	60	60	Epidermoid CA(az dif)
5	M.H.	E	49	33	Epidermoid CA
9	M.E.	E	66	27	Epidermoid CA
11	İ.T.	E	67	2	Epidermoid CA
12	Ö.Ç.	E	57	50	Adenokarsinom
13	G.Ç.	E	60	40	Epidermoid CA
14	İ.Ç.	E	68	90	Adenokarsinom
15	M.Ş.	E	53	80	Epidermoid CA
25	M.T.	E	48	70	Epidermoid CA
26	A.S.B.	E	49	30	Küçük hücreli CA

Çizelge 3.2. "Devam" Akciğer kanseri histopatolojik tanısı alan olgulardan oluşan hasta grubunun cinsiyet, yaş, sigara kullanımı ve histopatolojik tanıları (n=24)

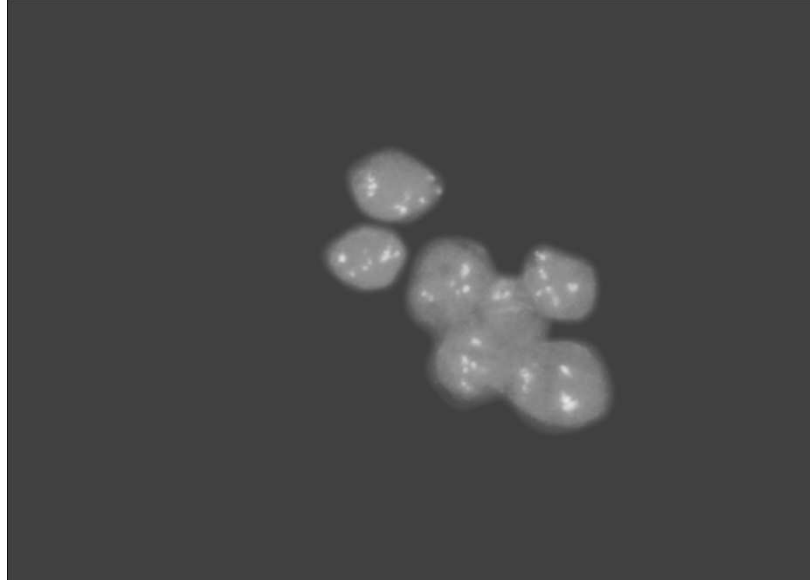
27	K.G.	E	64	110	Epidermoid CA
28	M.K.	E	65	50	Küçük hücreli CA
29	M.N.	E	82	140	Küçük hücreli CA
30	İ.A.	E	73	25	Epidermoid CA
31	H.K.	E	55	35	Adenokarsinom
32	N.K.	E	59	70	Küçük hücreli CA
33	M.Ö.	E	58	70	Malign Mezotelyoma
34	Y.A.Ö	E	50	60	Az differansiye KHDAK
36	D.Ç	E	54	50	AdenoCa. KHDAK
37	O.E	E	73	53	Epidermoid CA
38	İ.K	E	73	75	KHDAK

3.1. Yönteme İlişkin Bulgular

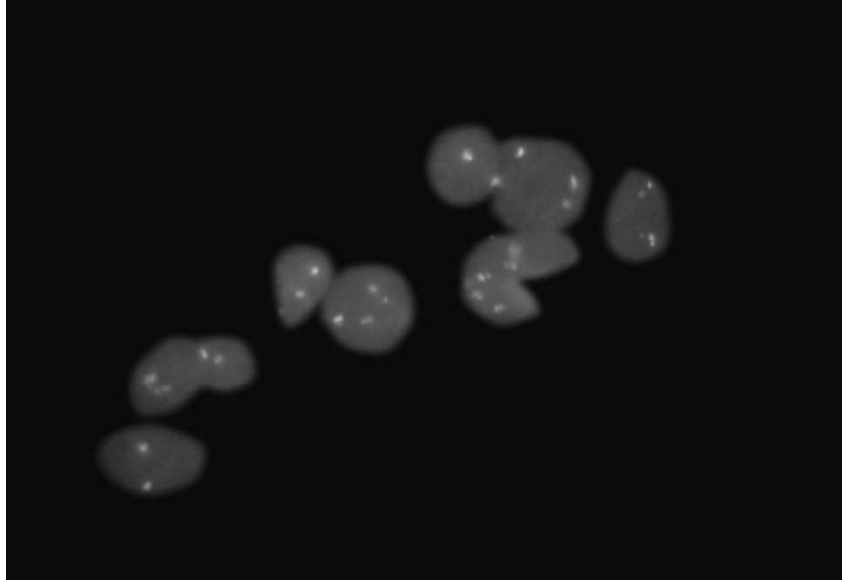
Bronkoskopi işleminin sonrasında hemen çalışılmak üzere laboratuvarımıza gelen numunelerden preparasyon yapılarak FISH yöntemi ile incelendi. FISH sinyalleri içeren nükleuslar analiz edildi ve fotoğraflandı (Resim 3.1, Resim 3.2, Resim 3.3).



Resim 3.1. EGFR gen kopya sayısı artışına sahip bir hücrenin FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).(27 no'lu olgu)



Resim 3.2. HER-2/neu geni için gen amplifikasyonuna sahip hücrelerin bulunduğu bir olguya ait FISH görüntüsü (Alfasatellit7 yeşil sinyal, HER-2/neu kırmızı sinyal) (4 no'lu olgu)



Resim 3.3. c-MET gen kopya sayısı artışına sahip ve normal hücrelerin bir arada bulunduğu bir olgunun FISH görüntüsü (25 no'lu olgu)

3.1.1. EGFR Probu İle Yapılan FISH Analizlerinin Sonuçları

EGFR gen probu ile yapılan çalışmalarda kontrol grubunda yer alan 6, 8, 39 ve akciğer kanserli olgu grubunda yer alan 30, 31, 37,38 numaralı örnekler EGFR ve kontrol probunun sinyalleri izlenemediği için ve kontrol grubunda yer alan 21 ve hasta grubunda yer alan 33 numaralı hastaların tanısı malignite olduğu için çalışma dışında bırakıldı. Dolayısıyla bu prob için kontrol grubunda 11, akciğer kanserli olgu grubunda 19 hasta değerlendirilmiş oldu. Kontrol grubunda amplifikasyon gözlenmezken, kanserli olgu grubunda yer alan 3 hastada amplifikasyon izlendi ve bu durum amplifikasyon pozitiflik olarak kabul edildi (Çizelge 3.3, Çizelge 3.4, Resim 3.1). Normal olarak değerlendirilen olgular amplifikasyon açısından negatif olarak değerlendirildi.

Çizelge 3.3. Kontrol grubunda EGFR geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirmesi bulguları

No	Ad-Soyad	EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi	EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücre yüzdesi	EGFR sinyal/CEP7 sinyal oranı	SONUÇ
6	T.K.	-	-	-	-
7	F.E.	17.04	0	1.19	NEGATİF
8	A.B.	-	-	-	-
10	M.B.	5.71	0	0.99	NEGATİF
16	H.Ç.	11.10	0	1.12	NEGATİF
17	H.S.	1.94	0	1.01	NEGATİF
18	A.K.	0	0	0	NEGATİF
19	G.P.	3.14	0	1	NEGATİF
20	A.M.	0.96	0	1	NEGATİF
21	F.K.	13.79	0	1	NEGATİF
22	M.Y.	20.17	0	1.72	NEGATİF
23	T.G.	0.47	0	1	NEGATİF
24	A.A.	11.70	0	1	NEGATİF
35	A.B.	0,11	0	1	NEGATİF
39	D.M.	0	-	-	-

Çizelge 3.4. Akciğer kanserli olgu grubunda EGFR geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirmesi bulguları

No	Ad-Soyad	EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi	EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücre yüzdesi	EGFR sinyal/CEP7 sinyal oranı	SONUÇ
1	A.K.	15.78	0	1	NEGATİF
2	A.U.	34.97	19.75	2.40	POZİTİF
3	Ş.Y.	21.42	1.78	1.26	NEGATİF
4	A.A.	16.77	0	1	NEGATİF
5	M.H.	0	0	1	NEGATİF
9	M.E.	6.81	0	1	NEGATİF
11	İ.T.	0	0	1	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0	0	0.97	NEGATİF
13	G.Ç.	40.18	1.92	1	POZİTİF
14	İ.Ç.	17.58	5.49	1	NEGATİF
15	M.Ş.	25.33	0	1	NEGATİF
25	M.T.	1.89	0	1	NEGATİF
26	A.S.B.	0.90	0	1	NEGATİF
27	K.G.	45.55	0	1.80	POZİTİF
28	M.K.	5.00	0	1.05	NEGATİF
29	M.N.	9.7	0	1	NEGATİF
30	İ.A.	-	-	-	-
31	H.K.	-	-	-	-
32	N.K.	0	0	1	NEGATİF
33	M.Ö.	3.04	0	1.03	NEGATİF
34	Y.A.Ö	25.75	0	1	NEGATİF
36	D.Ç.	18.55	0	1	NEGATİF
37	O.E	0.31	-	-	-
38	İ.K	-	-	-	-

3.1.2. HER2 Probu İle Yapılan FISH Analizlerinin Sonuçları

HER2 gen probu ile yapılan çalışmalarda kontrol grubunda yer alan 6, 8, 24 ve akciğer kanserli olgu grubunda yer alan 1, 31,38 numaralı örnekler HER2 ve kontrol probunun sinyalleri izlenemediği için, kontrol grubunda yer alan 21 numaralı ve hasta grubundaki 33 numaralı hastaların tanısı malignite olduğu için çalışma dışında bırakıldı. Dolayısıyla bu prob için kontrol grubunda 11, akciğer kanserli olgu grubunda 20 hasta değerlendirilmiş oldu. Kontrol grubunda amplifikasyon gözlenmezken, kanserli olgu grubunda yer alan beş hastada amplifikasyon izlendi (Çizelge 3.5,3.6). Amplifikasyon pozitiflik olarak kabul edildi. Normal olarak değerlendirilen olgular amplifikasyon açısından negatif olarak değerlendirildi.

Çizelge 3.5. Kontrol grubunda HER2 geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları

No	Ad Soyad	HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi	HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücre yüzdesi	HER2 sinyal /Alfasatellit 7 sinyal oranı	SONUÇ
6	T.K.	-	-	-	-
7	F.E.	0	0	0.87	NEGATİF
8	A.B.	-	-	-	-
10	M.B.	11.48	11.48	1.86	NEGATİF
16	H.Ç.	0	0	1	NEGATİF
17	H.S.	0.48	0	1	NEGATİF
18	A.K.	0	0	1	NEGATİF
19	G.P.	5,66	0	1.035	NEGATİF
20	A.M.	5,34	0	1	NEGATİF
21	F.K.	15,90	0	1	NEGATİF
22	M.Y.	0	0	1	NEGATİF
23	T.G.	0	0	1	NEGATİF
24	A.A.	-	-	-	-
35	A.B.	0.21	0	0	NEGATİF
39	D.M.	0.4	0	0	NEGATİF

Çizelge 3.6. Akciğer kanserli olgu grubunda HER2 geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları.

No	Ad-Soyad	HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi	HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücre yüzdesi	HER2 /Alfasatellit 7 sinyal oranı	SONUÇ
1	A.K.	-	-	-	-
2	A.U.	32.25	15.32	2.04	POZİTİF
3	Ş.Y.	41.17	1.7	1.3	POZİTİF
4	A.A.	91.15	27.87	2.31	POZİTİF
5	M.H.	1.61	0	1	NEGATİF
9	M.E.	7.69	0	1.67	NEGATİF
11	İ.T.	0.85	0	1	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0.48	0	1	NEGATİF
13	G.Ç.	12.96	0	1	NEGATİF
14	İ.Ç.	7.44	0	1	NEGATİF
15	M.Ş.	4.21	0	1.03	NEGATİF
25	M.T.	45,65	0	1.53	POZİTİF
26	A.S.B.	0	0	1	NEGATİF
27	K.G.	1,82	0	1	NEGATİF
28	M.K.	2,29	0	1.05	NEGATİF
29	M.N.	4,87	0	1	NEGATİF
30	İ.A.	1,40	0	1	NEGATİF
31	H.K.	-	-	-	-
32	N.K.	40.78	0	1.37	POZİTİF
33	M.Ö.	12.72	0	1.22	NEGATİF
34	Y.A.Ö	23.57	0	1.3	NEGATİF
36	D.Ç.	6.81	0	1	NEGATİF
37	O.E.	0	0	0	NEGATİF
38	İ.K.	-	-	-	-

3.1.3. c-MET Probu ile Yapılan FISH Analizlerinin Sonuçları

c-MET gen probu ile yapılan çalışmalarda kontrol grubunda yer alan 6, 7, 8 ve akciğer kanserli olgu grubunda yer alan 1,29,31,38 numaralı örnekler c-MET ve kontrol probunun sinyalleri izlenemediği için çalışma dışında bırakıldı. Kontrol grubunda yer alan 21 ve hasta grubundaki 33 numaralı hastaların tanısı malign mezotelyoma idi. Bu tanıyı alan örneklerin de bizi yanıltabileceği düşünülerek değerlendirme dışında bırakıldı. Dolayısıyla bu prob için kontrol grubunda 11, akciğer kanserli olgu grubunda 19 hasta değerlendirilmiş oldu. Kontrol grubunda yer alan bir, kanserli olgu grubunda yer alan yedi hastada amplifikasyon izlendi(Çizelge 3.7-3.8). Amplifikasyon pozitiflik olarak kabul edildi. Normal olarak değerlendirilen olgular amplifikasyon açısından negatif olarak değerlendirildi.

Çizelge 3.7. Kontrol grubunda c-MET geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirmesi bulguları

No	Ad-Soyad	c-Met için gen kopya sayı artışı(%)	c-Met sinyal/CEP7 sinyal oranı	SONUÇ
6	T.K.	-	-	-
7	F.E.	-	-	-
8	A.B.	-	-	-
10	M.B.	0	1	NEGATİF
16	H.Ç.	0	1	NEGATİF
17	H.S.	3.05	1	NEGATİF
18	A.K.	0	0	NEGATİF
19	G.P.	0.49	1	NEGATİF
20	A.M.	0.96	1	NEGATİF
21	F.K.	21.875	1	POZİTİF
22	M.Y.	0	0.83	NEGATİF
23	T.G.	76.19	1.76	POZİTİF
24	A.A.	1.58	1	NEGATİF
35	A.B.	0.21	0	NEGATİF
39	D.M.	0.4	0	NEGATİF

Çizelge 3.8. Akciğer kanserli olgu grubunda c-MET geni için kriterlere göre yapılan negatiflik–pozitiflik değerlendirme bulguları

No	Ad-Soyad	c-Met için gen kopya sayı artışı (%)	c-Met sinyal/CEP7 sinyal oranı	SONUÇ
1	A.K.	-	-	-
2	A.U.	20.94	1.81	POZİTİF
3	Ş.Y.	9.01	1.25	POZİTİF
4	A.A.	0	1	NEGATİF
5	M.H.	0	1	NEGATİF
9	M.E.	9.37	1	POZİTİF
11	İ.T.	0	1	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0.92	0.95	NEGATİF
13	G.Ç.	18.86	1	POZİTİF
14	İ.Ç.	0	1	NEGATİF
15	M.Ş.	0	-	NEGATİF
25	M.T.	70	1.41	POZİTİF
26	A.S.B.	0	1	NEGATİF
27	K.G.	2.75	1.02	NEGATİF
28	M.K.	2.06	1	NEGATİF
29	M.N.	-	-	-
30	İ.A.	0	1	NEGATİF
31	H.K.	-	-	-
32	N.K.	28.57	1.32	POZİTİF
33	M.Ö.	24.52	1.24	POZİTİF
34	Y.A.Ö.	1	1	NEGATİF
36	D.Ç.	7.31	1	POZİTİF
37	O.E.	0	0	NEGATİF
38	İ.K.	-	-	-

3.2. İstatistiksel Bulgular

Bu çalışmada istatistiksel olarak iki farklı şekilde değerlendirme yapılmıştır. İlk olarak kontrol grubu ve histopatolojik olarak kanser tipi ayrımı yapılmadan sonuçlar karşılaştırılmış daha sonra akciğer kanseri olgularından, küçük hücreli dışı akciğer kanseri grubu oluşturularak ikinci bir karşılaştırma yapılmıştır. Yapılan bu ikinci karşılaştırmada EGFR ve HER2 genleri için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %10, %20, %30 ve %40 eşik değerleri alınarak karşılaştırılmıştır.

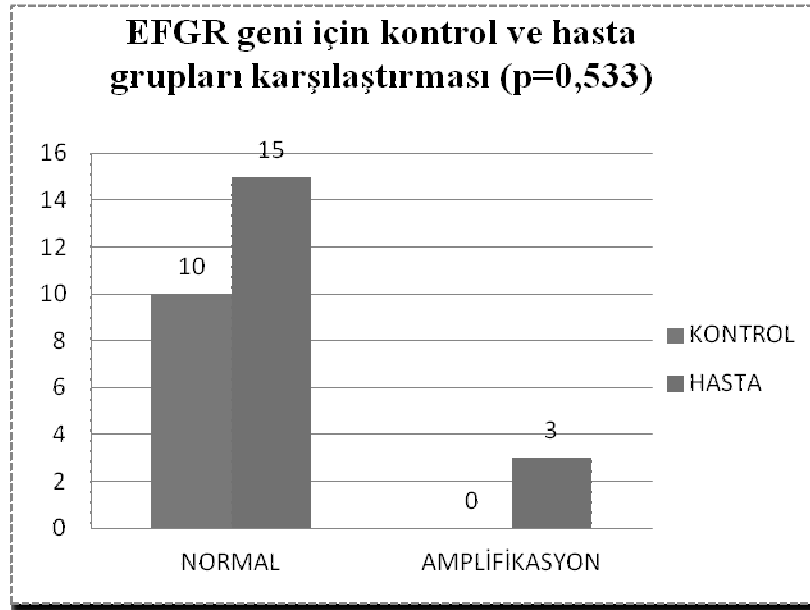
3.2.1.Kontrol ve Hasta Gruplarının Karşılaştırılması

EGFR Geni İçin Negatiflik ve Pozitiflik Açısından İstatistiksel Değerlendirme

EGFR geni için kontrol ve hasta grupları arasında çıkan sonuçlar bakımından(negatiflik ve pozitiflik) Fisher's Exact Ki-kare testi kullanılarak yapılan değerlendirme sonucunda iki grup arasında farklılık bulunmamıştır ($p=0,533$).

Çizelge 3.9. Olgularda EGFR geni için hasta ve kontrol gruplarının sayısal olarak gösterilmesi

	NORMAL	AMPLİFİKASYON	TOPLAM
KONTROL	10	0	10
HASTA	15	3	18
TOPLAM	25	3	28



Şekil 3.1. EGFR geni için kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmasına ait grafik örneği

Yukarıdaki şekli incelediğimizde kontrol grubunda “normal” olanların yüzdesi %100 iken hasta grubunda %83,3 çıkmıştır ve yüzdeler arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu analizde Mann Whitney U testi kullanılmıştır. ($p=0,533$).

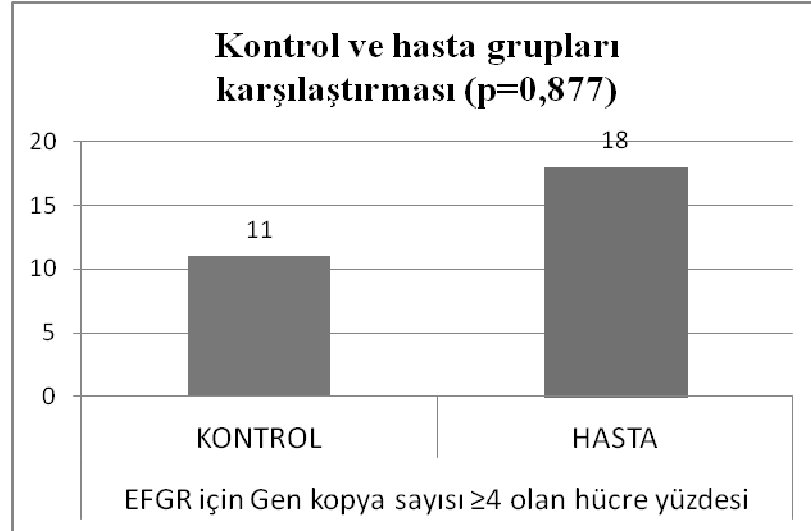
EGFR Geni İçin Değerlendirme Kriterleri Açısından İstatistiksel Değerlendirme

Çizelge 3.10. EGFR geni için değerlendirme kriterlerinin karşılaştırılmasında hasta ve kontrol gruplarına ait istatistiksel değerler

		N	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
EFGR için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi	Kontrol	11	7,82	7,23	5,71	0	20,17
	Hasta	18	12,13	14,51	7,01	0	45,55
EFGR sinyal/CEP7 sinyal oranı	Kontrol	11	1	0,40	1	0	1,72
	Hasta	18	1,14	0,37	1	0,97	2,40

EFGR geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin yüzdesi için;

Hasta ve kontrol grubunda mevcut değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. ($p=0,877$) Çizelgeyi incelediğimizde kontrol grubunun ortalama değeri $7,82 \pm 7,23$ iken hasta grubunda $12,13 \pm 14,51$ olarak gösterilmiştir.

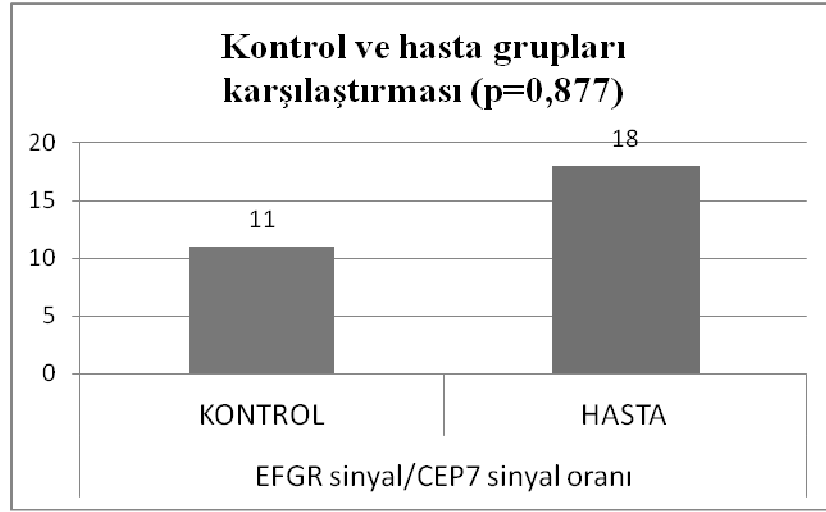


Şekil 3.2. EGFR geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği

EFGR sinyal/CEP7 sinyal oranı için;

Hasta ve kontrol grupları arasındaki mevcut değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır ($p=0,877$). Çizelgeyi incelediğimizde

kontrol grubunun ortalama değeri $1 \pm 0,40$ iken hasta grubunda $1,14 \pm 0,37$ olarak gösterilmiştir.



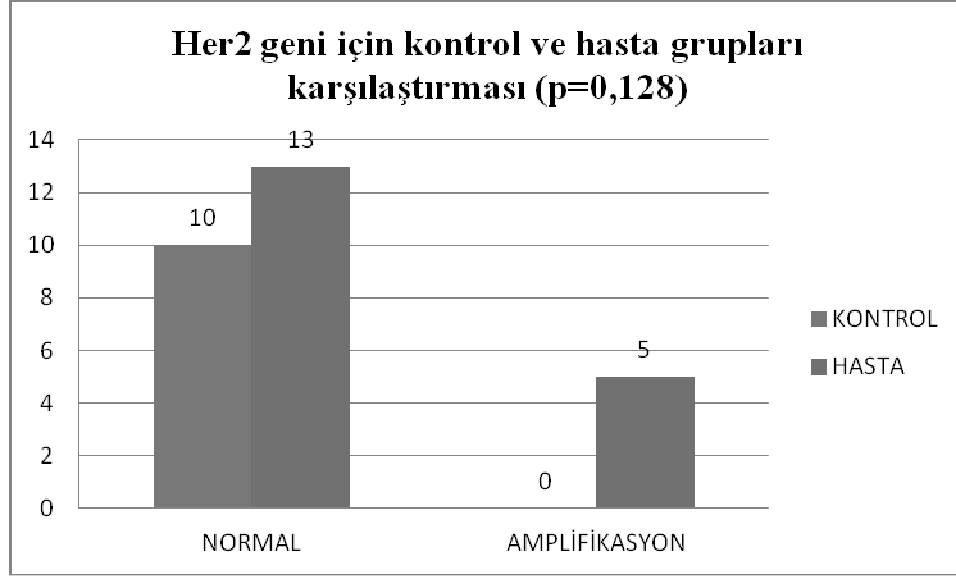
Şekil 3.3. EGFR geni için EGFR sinyalinin CEP/7 sinyaline oranının hasta ve kontrol gruplarına ait dağılımını gösteren grafik örneği

HER2 Geni İçin Negatiflik ve Pozitiflik Açısından İstatistiksel Değerlendirme

HER2 geni için kontrol ve hasta grupları arasında çıkan sonuçlar bakımından (negatiflik ve pozitiflik) Fisher's Exact Ki-kare Testi kullanılarak yapılan analiz ile değerlendirildiğinde aralarında farklılık bulunmamıştır ($p=0,128$).

Çizelge 3.11. Olgularda HER2 geni için hasta ve kontrol gruplarının sayısal olarak gösterilmesi

	NORMAL	AMPLİFİKASYON	TOPLAM
KONTROL	10	0	10
HASTA	13	5	18
TOPLAM	23	5	28



Şekil 3.4. HER2 geni için kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmasına ait grafik örneği

Yukarıdaki şekli incelediğimizde kontrol grubunda “normal” olarak ifade edilenlerin yüzdesi %100 iken, hasta grubunda bu değer %72,2 çıkmıştır ve yüzdeler arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu analizde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

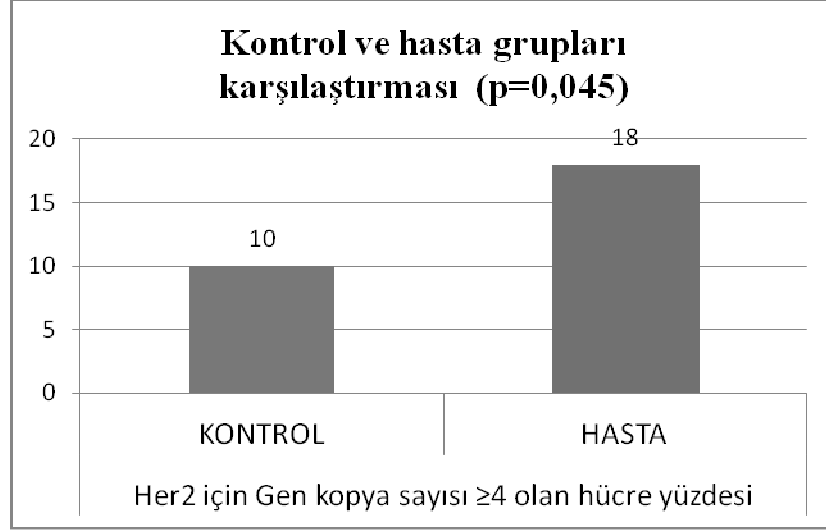
HER2 Geni İçin Değerlendirme Kriterleri Açısından İstatistiksel Değerlendirme

Çizelge 3.12. HER2 geni için hasta ve kontrol gruplarına ait istatistiksel değerler

		N	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi	Kontrol	10	3,89	5,72	0,24	0	15,90
	Hasta	18	16,89	24,41	6,16	0	91,15
HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücre yüzdesi	Kontrol	10	1,15	3,63	0	0	11,48
	Hasta	18	2,49	7,29	0	0	27,87
HER2 sinyal/CEP7 sinyal oranı	Kontrol	10	1,08	0,28	1	0,87	1,86
	Hasta	18	1,25	0,40	1,02	1	2,31

HER2 geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin yüzdesi için;

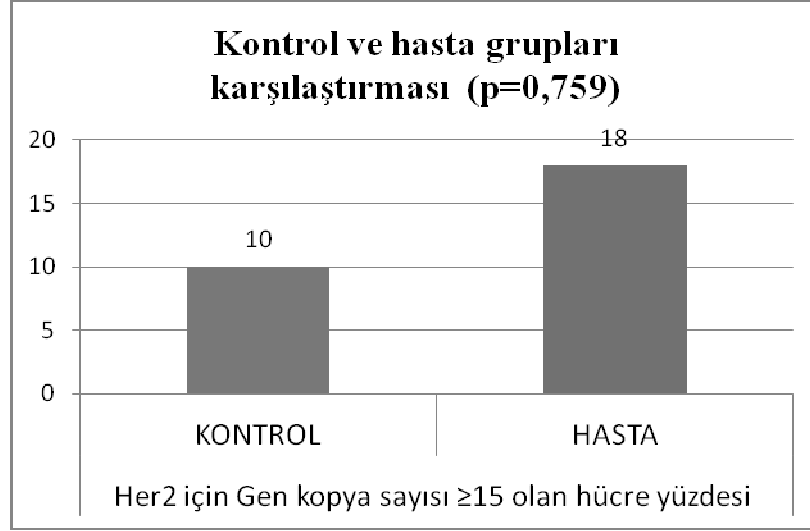
Hasta ve kontrol gruplarında bulunan değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık vardır ($p=0,045$). Bu sonuç yukarıdaki Çizelgede kontrol grubunun ortalama değeri $3,89 \pm 5,72$ iken, hasta grubunda $16,89 \pm 24,41$ olarak görülmektedir.



Şekil 3.5. HER2 geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği

HER2 geni için gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücrelerin yüzdesi için;

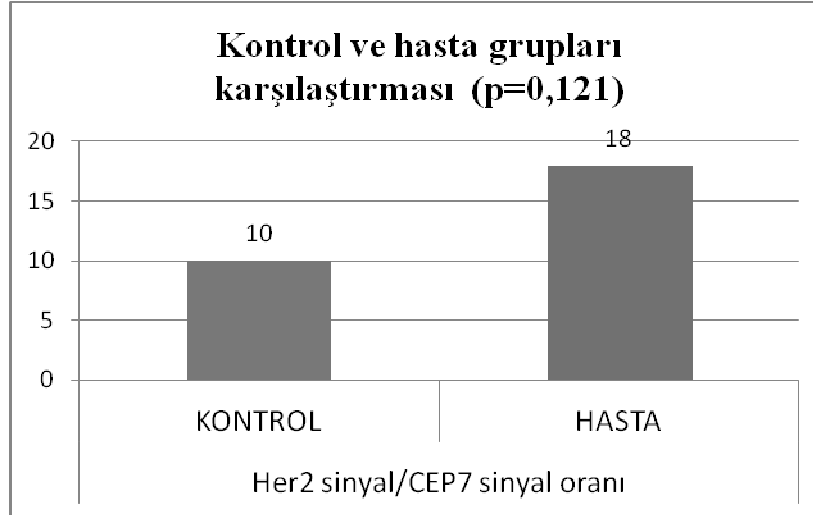
Hasta ve kontrol gruplarının almış olduğu değerler karşılaştırıldığında olgular arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır ($p=0,759$). Yukarıdaki Çizelgede bu sonuçlar kontrol grubunun ortalama değeri $1,15 \pm 3,63$ iken, hasta grubunda $2,49 \pm 7,29$ şeklinde gösterilerek ifade edilmiştir.



Şekil 3.6. HER2 geni için gen kopya sayısı ≥ 15 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği

HER2 geni için HER2 sinyali/Alfasatelit 7 sinyal oranı;

Hasta ve kontrol gruplarında mevcut değerler karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak farklılık görülmemektedir ($p=0,121$). Bu sonuç Çizelgede kontrol grubunun ortalama değeri $1,08 \pm 0,28$ iken, hasta grubunda $1,25 \pm 0,40$ 'dır şeklinde gösterilmiştir.



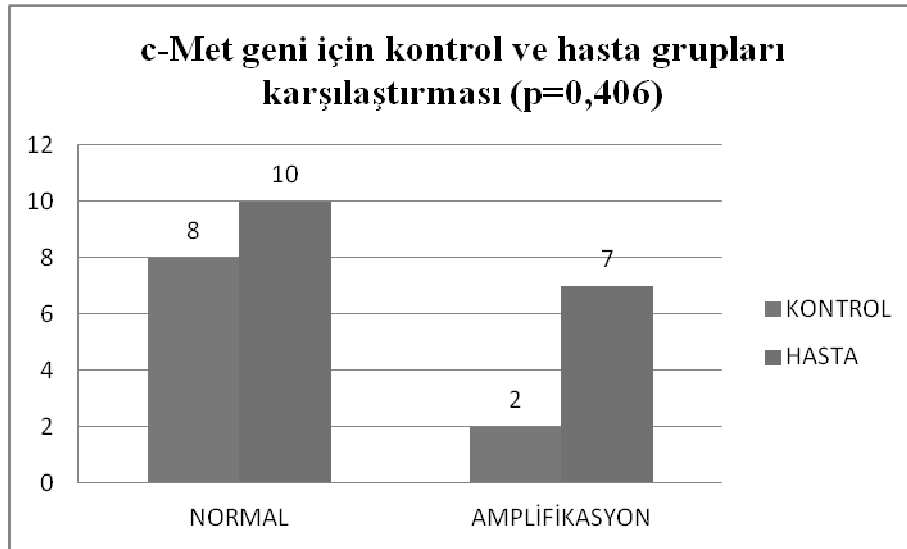
Şekil 3.7. HER2 geni için HER2 sinyalinin Alfasatellit 7 sinyaline oranının hasta ve kontrol gruplarına ait dağılımını gösteren grafik örneği

c-Met Geni İçin İstatistiksel Değerlendirme

c-Met geni hasta ve kontrol gruplarında bulunan değerler karşılaştırıldığında, Fisher's Exact Ki-kare Testi kullanılarak yapılan analizlerde çıkan sonuçlar (negatiflik ve pozitiflik) bakımından farklılık bulunmamıştır ($p=0,406$)

Çizelge 3.13. Olgularda c-Met geni için hasta ve kontrol gruplarının sayısal olarak gösterilmesi

	NORMAL	AMPLİFİKASYON	TOPLAM
KONTROL	8	2	10
HASTA	10	7	17
TOPLAM	18	9	27



Şekil 3.8. c-Met geni için kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmasına ait grafik örneği

Şekli incelediğimizde, kontrol grubunda “normal” olanların yüzdesi %80 iken, hasta grubunda %58,8 çıkmıştır ve yüzdeler arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu analizde Mann Whitney U Testi kullanılmıştır.

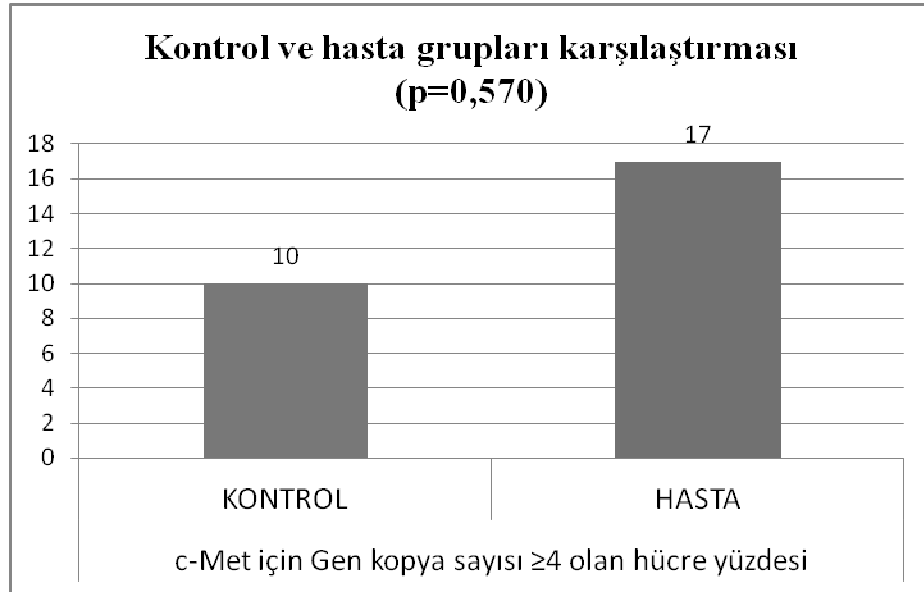
c-Met Geni İçin Değerlendirme Kriterleri Açısından İstatistiksel Değerlendirme

Çizelge 3.14. c-Met geni için hasta ve kontrol gruplarına ait istatistiksel değerler

		N	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
c-Met için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi	Kontrol	10	3,99	7,26	0,725	0	21,87
	Hasta	17	11,00	18,09	2,06	0	70
c-Met sinyal/CEP7 sinyal oranı	Kontrol	10	0,96	0,42	1	0	1,76
	Hasta	16	1,13	0,23	1	0,95	1,81

c-Met Geni İçin Gen Kopya Sayı Artışı Olan Hücre Yüzdesi:

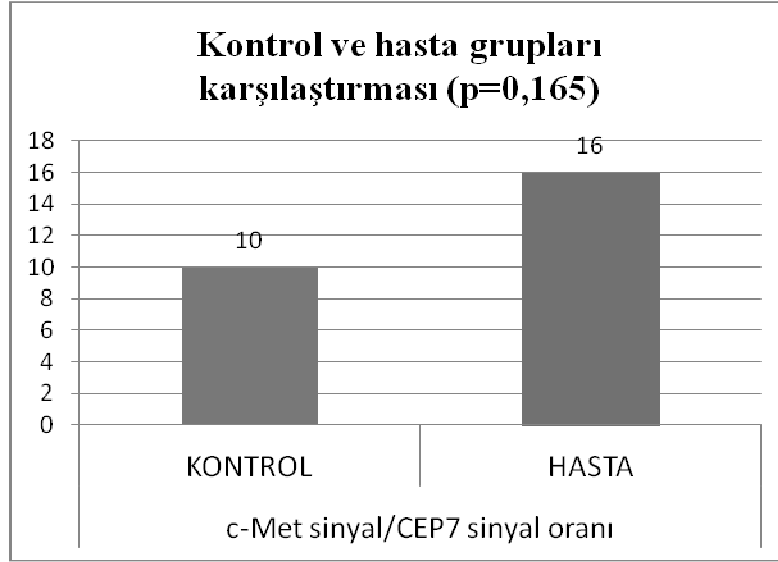
Hasta ve kontrol grupları arasında alınmış olunan değerler arasında karşılaştırma yapıldığında, istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir ($p=0,570$). Çizelgeyi incelediğimizde, kontrol grubunun ortalama değeri $3,99 \pm 7,26$ iken, hasta grubunda $11,00 \pm 18,09$ 'dur. Aradaki farkın anlamlı olması beklenebilir, ancak istatistiksel olarak anlamsız çıkmasının sebebi standart sapmaların çok büyük olmasıdır.



Şekil 3.9. c-Met geni için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücrelerin kontrol ve hasta gruplarının dağılımını gösteren grafik örneği

c-Met Geni İçin Prob Sinyali/CEP7 Sinyal Oranı:

Hasta ve kontrol grupları arasında mevcut değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık yoktur ($p=0,165$). Çizelgeyi incelediğimizde kontrol grubunun ortalama değeri $0,96 \pm 0,42$ iken, hasta grubunda $1,13 \pm 0,23$ olduğu görülmektedir.



Şekil 3.10. c-Met geni için c-Met sinyalinin CEP/7 sinyaline oranının hasta ve kontrol gruplarına ait dağılımını gösteren grafik örneği

3.2.2. Kontrol ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Gruplarının Oluşturulması ve İstatistiksel Değerlendirmesi

EGFR Geni İçin Kontrol Gruplarının ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Gruplarının Oluşturulması

EGFR gen probu ile yapılan çalışmalarda kontrol grubunda yer alan 6, 8 ve akciğer kanserli olgu grubunda yer alan 30, 31,37,38 numaralı örnekler EGFR ve kontrol probunun sinyalleri izlenemediği için çalışma dışında bırakıldı. Kontrol grubunda değerlendirilen hastalardan birinin histopatolojik tanısı malign mezotelyoma idi. Bu tanıyı alan 21 ve 33 numaralı örnekler de bizi yanıltabileceği düşünülerek değerlendirme dışında bırakıldı. Hasta grubunda yer alan 1, 26,28,29,32 numaralı hastalar da histopatolojik tanıları küçük hücreli akciğer kanseri olduğu için değerlendirme dışında bırakıldı. Dolayısıyla bu prob için kontrol grubunda 12,

akciğer kanserli olgu grubunda 14 hasta değerlendirilmiş oldu. Değerlendirmede gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi kriteri esas alındı. Hücre yüzdesi %10, %20, %30 ve %40 eşik değeri olarak alınarak, sonuçlar negatiflik-pozitiflik açısından değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme her yüzdedeki negatiflik-pozitiflik için ayrı ayrı yapıldı.

D). EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %10 ve üzeri için negatiflik pozitiflik değerlendirmesi

Çizelge 3.15. EGFR /Kontrol Grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%10$)	SONUÇ
7	F.E.	17.04	POZİTİF
10	M.B.	5.71	NEGATİF
16	H.Ç.	11.10	POZİTİF
17	H.S.	1.94	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	3.14	NEGATİF
20	A.M.	0.96	NEGATİF
22	M.Y.	20.17	POZİTİF
23	T.G.	0.47	NEGATİF
24	A.A.	11.70	POZİTİF
35	A.B.	0,11	NEGATİF
39	D.M.	0	NEGATİF

Çizelge 3.16. EGFR /Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%10$)	SONUÇ
2	A.U.	34.97	POZİTİF
3	Ş.Y.	21.42	POZİTİF
4	A.A.	16.77	POZİTİF
5	M.H.	0	NEGATİF
9	M.E.	6.81	NEGATİF
11	İ.T.	0	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0	NEGATİF
13	G.Ç.	40.18	POZİTİF
14	İ.Ç.	17.58	POZİTİF
15	M.Ş.	25.33	POZİTİF
25	M.T.	1.89	NEGATİF
27	K.G.	45.55	POZİTİF
34	Y.A.Ö.	25.75	POZİTİF
36	D.Ç.	18.55	POZİTİF

II). EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %20 ve üzeri için negatiflik pozitiflik değerlendirilmesi

Çizelge 3.17. EGFR /Kontrol Grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%20$)	SONUÇ
7	F.E.	17.04	NEGATİF
10	M.B.	5.71	NEGATİF
16	H.Ç.	11.10	NEGATİF
17	H.S.	1.94	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	3.14	NEGATİF
20	A.M.	0.96	NEGATİF
22	M.Y.	20.17	POZİTİF
23	T.G.	0.47	NEGATİF
24	A.A.	11.70	NEGATİF
35	A.B.	0.11	NEGATİF
39	D.M.	0	NEGATİF

Çizelge 3.18. EGFR /Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%20$)	SONUÇ
2	A.U.	34.97	POZİTİF
3	Ş.Y.	21.42	POZİTİF
4	A.A.	16.77	NEGATİF
5	M.H.	0	NEGATİF
9	M.E.	6.81	NEGATİF
11	İ.T.	0	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0	NEGATİF
13	G.Ç.	40.18	POZİTİF
14	İ.Ç.	17.58	NEGATİF
15	M.Ş.	25.33	POZİTİF
25	M.T.	1.89	NEGATİF
27	K.G.	45.55	POZİTİF
34	Y.A.Ö.	25.75	POZİTİF
36	D.Ç.	18.55	NEGATİF

III). EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %30 ve üzeri için negatiflik pozitiflik değerlendirilmesi

Çizelge 3.19. EGFR /kontrol grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 30)	SONUÇ
7	F.E.	17.04	NEGATİF
10	M.B.	5.71	NEGATİF
16	H.Ç.	11.10	NEGATİF
17	H.S.	1.94	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	3.14	NEGATİF
20	A.M.	0.96	NEGATİF
22	M.Y.	20.17	NEGATİF
23	T.G.	0.47	NEGATİF
24	A.A.	11.70	NEGATİF
35	A.B.	0.11	NEGATİF
39	D.M.	0	NEGATİF

Çizelge 3.20. EGFR /Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 30)	SONUÇ
2	A.U.	34.97	POZİTİF
3	Ş.Y.	21.42	NEGATİF
4	A.A.	16.77	NEGATİF
5	M.H.	0	NEGATİF
9	M.E.	6.81	NEGATİF
11	İ.T.	0	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0	NEGATİF
13	G.Ç.	40.18	POZİTİF
14	İ.Ç.	17.58	NEGATİF
15	M.Ş.	25.33	NEGATİF
25	M.T.	1.89	NEGATİF
27	K.G.	45.55	POZİTİF
34	Y.A.Ö.	25.75	NEGATİF
36	D.Ç.	18.55	NEGATİF

IV). EGFR için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %40 ve üzeri için negatiflik pozitiflik değerlendirilmesi

Çizelge 3.21. EGFR /Kontrol Grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 40)	SONUÇ
7	F.E.	17.04	NEGATİF
10	M.B.	5.71	NEGATİF
16	H.Ç.	11.10	NEGATİF
17	H.S.	1.94	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	3.14	NEGATİF
20	A.M.	0.96	NEGATİF
22	M.Y.	20.17	NEGATİF
23	T.G.	0.47	NEGATİF
24	A.A.	11.70	NEGATİF
35	A.B.	0.11	NEGATİF
39	D.M.	0	NEGATİF

Çizelge 3.22. EGFR /Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	EGFR için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 40)	SONUÇ
2	A.U.	34.97	NEGATİF
3	Ş.Y.	21.42	NEGATİF
4	A.A.	16.77	NEGATİF
5	M.H.	0	NEGATİF
9	M.E.	6.81	NEGATİF
11	İ.T.	0	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0	NEGATİF
13	G.Ç.	40.18	POZİTİF
14	İ.Ç.	17.58	NEGATİF
15	M.Ş.	25.33	NEGATİF
25	M.T.	1.89	NEGATİF
27	K.G.	45.55	POZİTİF
34	Y.A.Ö.	25.75	NEGATİF
36	D.Ç.	18.55	NEGATİF

EGFR Geni İçin Kontrol Grubu ve KHDAK Grubunun Eşik Değerlerine Göre İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

Çizelge-3.23: EGFR Geni için %10 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Total
Kontrol	8 (%66,7)	4 (%33,3)	12
Hasta	5 (%35,7)	9 (%64,3)	14
Total	13	13	26

Pearson ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,116$). Sensitivite: 0,692 Spesifisite: 0,333

Çizelge-3.24: EGFR Geni için %20 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Total
Kontrol	11 (%91,7)	1 (%8,3)	12
Hasta	8 (%57,1)	6 (%42,9)	14
Total	19	7	26

Fisher Kesin ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,081$). Sensitivite: 0,429 Spesifisite: 0,083

Çizelge-3.25: EGFR Geni için %30 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Total
Kontrol	12 (%100)	0 (%0)	12
Hasta	11 (%78,6)	3 (%21,4)	14
Total	23	3	26

Fisher Kesin ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,225$). Sensitivite: 0,214 Spesifisite: 0

Çizelge-3.26: EGFR Geni için %40 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Total
Kontrol	12 (%100)	0 (%0)	12
Hasta	12 (%85,7)	2 (%14,3)	14
Total	24	2	26

Fisher Kesin ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,483$). Sensitivite: 0,143 Spesifisite: 0

HER2 Geni İçin Kontrol ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Gruplarının Oluşturulması

HER2 gen probu ile yapılan çalışmalarda kontrol grubunda yer alan 6, 8, 24 ve akciğer kanserli olgu grubunda yer alan 31,37,38 numaralı örnekler HER2 ve kontrol probunun sinyalleri izlenemediği için çalışma dışında bırakıldı. Kontrol grubunda değerlendirilen hastalardan birinin histopatolojik tanısı malign mezotelyoma idi. Bu tanıyı alan 21 ve 33 numaralı örnekler de bizi yanıltabileceği düşünülerek değerlendirme dışında bırakıldı. Hasta grubunda yer alan 1,26,28,29,32 numaralı hastalar da histopatolojik tanıları küçük hücreli akciğer kanseri olduğu için değerlendirme dışında bırakıldı. Dolayısıyla, bu prob için kontrol grubunda 11, akciğer kanserli olgu grubunda 15 hasta değerlendirilmiş oldu. Değerlendirmede gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi kriteri esas alındı. Hücre yüzdesi %10, %20, %30 ve %40 eşik değeri olarak alınarak, sonuçlar negatiflik-pozitiflik açısından değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme her yüzdedeki negatiflik-pozitiflik için ayrı ayrı yapıldı.

D). HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %10 ve üzeri için negatiflik pozitiflik değerlendirilmesi

Çizelge 3.27. HER2 Kontrol Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%10$)	SONUÇ
7	F.E.	0	NEGATİF
10	M.B.	11,48	POZİTİF
16	H.Ç.	0	NEGATİF
17	H.S.	0,48	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	5,66	NEGATİF
20	A.M.	5,34	NEGATİF
22	M.Y.	0	NEGATİF
23	T.G.	0,35	NEGATİF
35	A.B.	0,21	NEGATİF
39	D.M.	0,4	NEGATİF

Çizelge 3.28. HER2 Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%10$)	SONUÇ
2	A.U.	32,25	POZİTİF
3	Ş.Y.	41,17	POZİTİF
4	A.A.	91,15	POZİTİF
5	M.H.	1,61	NEGATİF
9	M.E.	7,69	NEGATİF
11	İ.T.	0,85	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0,48	NEGATİF
13	G.Ç.	12,96	POZİTİF
14	İ.Ç.	7,44	NEGATİF
15	M.Ş.	4,21	NEGATİF
25	M.T.	45,65	POZİTİF
27	K.G.	1,82	NEGATİF
30	İ.A.	1,40	NEGATİF
34	Y.A.Ö.	23,57	POZİTİF
36	D.Ç.	6,81	NEGATİF

II). HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %20 ve üzeri için negatiflik pozitiflik değerlendirilmesi

Çizelge 3.29. HER2 Kontrol Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 20)	SONUÇ
7	F.E.	0	NEGATİF
10	M.B.	11,48	NEGATİF
16	H.Ç.	0	NEGATİF
17	H.S.	0,48	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	5,66	NEGATİF
20	A.M.	5,34	NEGATİF
22	M.Y.	0	NEGATİF
23	T.G.	0,35	NEGATİF
35	A.B.	0,21	NEGATİF
39	D.M.	0,4	NEGATİF

Çizelge 3.30. HER2 Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 20)	SONUÇ
2	A.U.	32,25	POZİTİF
3	Ş.Y.	41,17	POZİTİF
4	A.A.	91,15	POZİTİF
5	M.H.	1,61	NEGATİF
9	M.E.	7,69	NEGATİF
11	İ.T.	0,85	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0,48	NEGATİF
13	G.Ç.	12,96	NEGATİF
14	İ.Ç.	7,44	NEGATİF
15	M.Ş.	4,21	NEGATİF
25	M.T.	45,65	POZİTİF
27	K.G.	1,82	NEGATİF
30	İ.A.	1,40	NEGATİF
34	Y.A.Ö.	23,57	POZİTİF
36	D.Ç.	6,81	NEGATİF

III). HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %30 ve üzeri için Çizelgeler

Çizelge 3.31. HER2 Kontrol Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%30$)	SONUÇ
7	F.E.	0	NEGATİF
10	M.B.	11,48	NEGATİF
16	H.Ç.	0	NEGATİF
17	H.S.	0,48	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	5,66	NEGATİF
20	A.M.	5,34	NEGATİF
22	M.Y.	0	NEGATİF
23	T.G.	0,35	NEGATİF
35	A.B.	0,21	NEGATİF
39	D.M.	0,4	NEGATİF

Çizelge 3.32. HER2 Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi ($\geq \%30$)	SONUÇ
2	A.U.	32,25	POZİTİF
3	Ş.Y.	41,17	POZİTİF
4	A.A.	91,15	POZİTİF
5	M.H.	1,61	NEGATİF
9	M.E.	7,69	NEGATİF
11	İ.T.	0,85	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0,48	NEGATİF
13	G.Ç.	12,96	NEGATİF
14	İ.Ç.	7,44	NEGATİF
15	M.Ş.	4,21	NEGATİF
25	M.T.	45,65	POZİTİF
27	K.G.	1,82	NEGATİF
30	İ.A.	1,40	NEGATİF
34	Y.A.Ö.	23,57	NEGATİF
36	D.Ç.	6,81	NEGATİF

IV). HER2 için Gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi %40 ve üzeri için Çizelgeler

Çizelge 3.33. HER2 Kontrol Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 40)	SONUÇ
7	F.E.	0	NEGATİF
10	M.B.	11,48	NEGATİF
16	H.Ç.	0	NEGATİF
17	H.S.	0,48	NEGATİF
18	A.K.	0	NEGATİF
19	G.P.	5,66	NEGATİF
20	A.M.	5,34	NEGATİF
22	M.Y.	0	NEGATİF
23	T.G.	0,35	NEGATİF
35	A.B.	0,21	NEGATİF
39	D.M.	0,4	NEGATİF

Çizelge 3.34. HER2 Hasta Grubu

No	Ad-Soyad	HER2 için gen kopya sayısı ≥ 4 olan hücre yüzdesi (≥ 40)	SONUÇ
2	A.U.	32,25	NEGATİF
3	Ş.Y.	41,17	POZİTİF
4	A.A.	91,15	POZİTİF
5	M.H.	1,61	NEGATİF
9	M.E.	7,69	NEGATİF
11	İ.T.	0,85	NEGATİF
12	Ö.Ç.	0,48	NEGATİF
13	G.Ç.	12,96	NEGATİF
14	İ.Ç.	7,44	NEGATİF
15	M.Ş.	4,21	NEGATİF
25	M.T.	45,65	POZİTİF
27	K.G.	1,82	NEGATİF
30	İ.A.	1,40	NEGATİF
34	Y.A.Ö.	23,57	NEGATİF
36	D.Ç.	6,81	NEGATİF

HER2 Geni İçin Kontrol Grubu ve KHDAK Grubunun Eşik Değerlerine Göre İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

Çizelge-3.35: HER2 Geni için %10 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Toplam
Kontrol	10 (%90,9)	1 (%9,1)	11
Hasta	9 (%60)	6 (%40)	15
Toplam	19	7	26

Fisher Kesin Ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,178$). Sensitivite: 0,400 Spesifisite: 0,091

Çizelge-3.36: HER2 Geni için %20 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Toplam
Kontrol	11 (%100)	0 (%0)	11
Hasta	10 (%66,7)	5 (%33,3)	15
Toplam	21	5	26

Fisher Kesin Ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,053$). Sensitivite: 0,333 Spesifisite: 0

Çizelge-3.37: HER2 Geni için %30 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Toplam
Kontrol	11 (%100)	0 (%0)	11
Hasta	11 (%73,3)	4 (%26,7)	15
Toplam	22	4	26

Fisher Kesin Ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,113$). Sensitivite: 0,267 Spesifisite: 0

Çizelge-3.38: HER2 Geni için %40 eşik değerine göre analiz sonuçları

	Negatif	Pozitif	Toplam
Kontrol	11 (%100)	0 (%0)	11
Hasta	12 (%80)	3 (%20)	15
Toplam	23	3	26

Fisher Kesin Ki-kare testine göre Gruplar arasında pozitif-negatiflik bakımından farklılık yoktur ($p=0,238$). Sensitivite: 0,200 Spesifisite: 0

4.TARTIŞMA

Çalışmamızda akciğer kanseri ön tanısı almış fakat histopatolojik olarak tanı almış hastalarda EGFR, HER2, c-Met onkogenlerinin kopya sayılarındaki artışların tanı koyduruculuğunu belirlemeyi hedefledik. Bu çalışma için bronkoskopi yolu ile alınan doku örneklerinden direk preparat hazırlayarak FISH tekniğini kullandık.

Akciğer kanseri en sık ölüme yol açan kanser türüdür. Batı ülkelerinde artan sigara kullanımına paralel olarak, erkeklerden sonra kadınlarda da en sık rastlanan kanser türü haline gelmiştir. Tüm akciğer kanseri vakalarının %80'ini ise küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) oluşturur.

Son yıllarda hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesiyle EGFR onkogeninin mutasyonları, amplifikasyonu ve proteinin ekspresyon düzeyindeki artış klinik açıdan önem kazanmıştır. EGFR geni, insanda 7. kromozomun 7p11.2 bölgesinde lokalizedir. Yirmi sekiz ekzonlu bir gen olup, 170 kDA' luk bir glikoprotein kodlar. EGFR tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran bir proteindir ve hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. Amplifikasyon olan hastalarda EGFR inhibitör (gefitinib) hassasiyetinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Uzun 2008). Bu hassasiyetin EGFR mutasyonu belirlenen hastalarda daha fazla olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur. Hirsch ve arkadaşları FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında EGFR gen amplifikasyonun KHDAK'lı hastalarda % 10 oranında olduğunu saptamışlardır. EGFR gen amplifikasyonu saptanan her hastada EGFR proteininde ekspresyonunun arttığı da saptanmıştır. Amplifikasyon olmadığı halde protein ekspresyonunun artması gene ait somatik mutasyonlar, transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel faktörlerle ilintili olarak değerlendirilmiştir (Hirsch 2003).

Suzuki ve ark.'nın çalışmasında ise % 23 oranında EGFR gen amplifikasyonu immünohistokimyasal boyama yöntemiyle % 34 oranında gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. Sanja ve ark.'nın KHDAK tanısı almış hastalarda immünohistokimyasal değerlendirme ile yaptığı bir çalışmada EGFR protein ekspresyon düzeylerinin önemi araştırılmış ve bu hastalarda % 9,5 oranında (179 hastada 17 amplifikasyon) amplifikasyon saptanmıştır. Aynı hastalarda protein ekspresyon düzeylerinin ise %11,2 oranında artmış olduğu gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada, FISH yöntemi ile % 30,2 oranında EGFR gen amplifikasyonu belirlenmiş ve sigara kullanan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark

saptanmıştır. Protein düzeyindeki artış skuamöz hücreli karsinomlarda amplifikasyon düzeyleri ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuş. Bu ilişki adenokarsinomlarda gözlenmemiştir(Jeon 2006). Bir başka çalışmada da, EGFR gen amplifikasyonları incelenmiş ve %12 oranında gen amplifikasyonu bulunmuştur (Sholl ve ark.2007). Tsao ve ark. KHDAK'lı 125 hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada % 47 EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır. Adenokarsinomlu hastalarda EGFR gen amplifikasyonunun KHDAK'li hastalara göre daha yüksek oranda bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada EGFR amplifikasyonu saptanan hastalarda yine bir tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib amplifikasyon saptanmayanlara oranla daha iyi yanıt alındığı belirtilmiştir (Tsao ve ark.2005).

Bozetti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 31 hasta örneğinin 28 tanesine FISH yöntemi uygulanmış, primer tümörlerin %36'sında ve metastaz gerçekleşen bölgelerdeki tümörlerin %61'inde EGFR amplifikasyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bozetti ve ark.2008). Cappuzzo ve ark. ise FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %33 oranında EGFR gen amplifikasyonu tespit etmişler ve EGFR gen amplifikasyonu bulunan hastaların gefitinib tedavisine anlamlı derecede olumlu cevap verdiği irdeleyerek ve FISH yönteminin gefitinib tedavisinin başlamasında karar vermek için kullanılabilecek etkili bir yöntem olduğu ileri sürmüşlerdir (Cappuzzo ve ark. 2005).

Bizim yaptığımız çalışmada akciğer kanserli örneklerin %10.34'ünde (3/29) ve KHDAK olguların % 14.28 (2/14)'inde EGFR gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Görüldüğü üzere literatürdeki farklı çalışmalarda bu oran %8.6-%47 arasında farklılık göstermektedir (Cappuzzo 2005, Bozetti 2008, Sholl 2007, Jeon 2006, Suzuki 2005, Sanja 2006, Hirsch 2003). Çalışmamızda ortaya çıkan bu değer literatürle uyumlu olarak değerlendirilmektedir.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz bir başka gen olan HER-2 geni 17. kromozomun 17q11-q21 bölgesinde lokalizedir. Yirmi yedi ekzon içerir ve 185 kDA'luk bir transmembran glikoproteini kodlar. HER-2 tirozin kinaz reseptörü olan bir transmembran proteindir. Epidermal kökenli hücrelerin büyümesinin düzenlenmesinde önemli yere sahiptir. Tan ve ark.'nın KHDAK tanısı almış 131 hasta ile yaptıkları FISH analizi kullanılan çalışmalarında %5.3 oranında HER-2 amplifikasyonu saptamışlar ve gen amplifikasyonunun daha çok adenokarsinomlarda gözlemlendiğini ifade etmişlerdir (Tan ve ark. 2003). Bir başka çalışmada, Nakamura ve

arkadaşları KHDAK'lı hastalarda %44 oranında HER-2 gen amplifikasyonu tespit etmiştir. Ayrıca, KHDAK'lerinde meme kanserinden farklı olarak HER-2 gen amplifikasyonunun düşük "grade"li tümörlerde daha sık görüldüğünü belirtmişlerdir. KHDAK tanı almış hastalarda FISH, IHK ve Real Time Revers Transkripsiyon PCR (RT PCR) tekniklerini kullanarak yapılan bir çalışmada ise 115 hasta değerlendirilmiş ve 41 hasta FISH tekniği ile analiz edilmiştir. Amplifikasyon oranı %22 (9/41) olarak bulunmuştur. FISH yöntemi ile HER-2 gen amplifikasyonu bulunan hastaların tümünde RT PCR yöntemiyle HER-2/neu geninin mRNA ekspresyon artışı saptanmış. Ayrıca FISH tekniği ile negatif bulunan 11 hastada RT PCR mRNA miktarında artış bulmuştur (Pellegrini ve ark. 2003). Başka bir çalışmada ise genel olarak KHDAK'inde Her2 amplifikasyonunun pozitifliğinin kesin olarak görülmediği belirtilmektedir (Hirashima ve ark. 2001). Yıldırımcan tarafından yapılan bir çalışmada KHDAK'li 24 olguyu 17. kromozom açısından değerlendirmiş olguların %23'ünde dizomi, bir olguda dengeli quadrozomi saptanmış fakat hiç birinde Her2 geninin gerçek amplifikasyonu gözlemlenmemiştir (Yıldırımcan 2006).

Zinner ve arkadaşları KHDAK tanısı almış 360 hastada IHK yöntemle %13 oranında HER-2 gen ekspresyonu saptamıştır.

Bizim yaptığımız çalışmada akciğer kanserli örneklerin % 10.34'ünde (3/29) ve KHDAK olguların % 20 (3/15)'sinde HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Görüldüğü üzere literatürdeki farklı çalışmalarda bu oran %8.6-%47 arasında değişmektedir(Tan ve ark.2003, Nakamura ve ark.2003, Pellegrini ve ark.2003, Zinner ve ark.2004). Çalışmamızda ortaya çıkan bu değer literatürle uyumlu olarak değerlendirilmektedir.

EGFR ve HER-2 gen amplifikasyonlarının bir arada değerlendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır. Capuzzo ve ark. KHDAK'de EGFR ve HER2 genlerinin protein aşırı ekspresyonu ve EGFR veya HER2 gen kopya sayısındaki artışın kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada 101 hasta FISH analizi ile değerlendirilmiştir. Olguların %41'inde EGFR ve %22.8'inde HER2 amplifikasyonu gözlenmiştir (HER2 FISH pozitif). HER2 ve tümör histopatolojisi arasında bir ilişki bulunamamıştır (Cappuzzo ve ark. 2005). Diğer bir çalışmada

HER2 mutasyonuna sahip 8 örneğin 5'i EGFR geni için 7'si ise HER2 geni için FISH pozitif olarak değerlendirilmiştir (Li ve ark. 2012).

Biz tanı koyduruculuğu artırır mı düşüncesiyle bir KHDAK grubu oluşturarak, bu grubu ve kontrol grubunu %40,%30, %20 ve %10 luk amplifikasyon değerlerini eşik değer olarak kabul ederek karşılaştırdık. İki grup arasında bir farklılık bulamadık, ama değer azaldıkça KHDAK grubunda amplifikasyon gösteren hasta yüzdesinde hem EGFR hem de HER2 genleri için bir artış izledik. EGFR için %40,%30, %20 ve %10'luk amplifikasyon değerlerini eşik değeri olarak kabul ettiğimizde amplifikasyon yüzdeleri sırasıyla %14, %21, %42, %64 oranlarında izlenmiştir. Aynı şekilde, bu eşik değerlerini HER2 geni için düşünersek bu oranlar sırasıyla şu şekilde olmaktadır; %20, %26, %33, %40. Dolayısıyla, var olan eşik değerinin bir miktar aşağı çekilmesi, amplifikasyon değerlendirmesi açısından tanı koyduruculuğun artmasına sebep olabileceğini düşündürmektedir. Hasta sayısı arttırılırsa benign ve malign grubu karşılaştırılmasında da anlamlı bir farklılık izlenebilir diye düşünmekteyiz.

Aslında yapılan çalışmaların çoğunda amplifikasyon değerlendirmeleri tümör rezeksiyonu sonrası parafin bloklardan elde edilen çok sayıda preparatta FISH analizi yapılmasıyla gerçekleşmiştir(Yıldırımcan 2006, Hirashima 2001, Pellegrini 2003). Bizim çalışmamızda ise örnekleme yapıldıktan sonra değdirme yöntemi ile çok sınırlı sayıda preparat hazırlanmış, dolayısıyla çok daha az sayıda hücreyle çalışılmış ve amplifikasyon yine de saptanmıştır. Bu nedenle eşik değerinin bir miktar aşağı çekilmesi bronkoskopik materyalle amplifikasyon saptanmasındaki yüzdeyi arttıracaktır.

Amplifikasyonunu değerlendirdiğimiz üçüncü gen olan MET, hepatosit büyüme faktörü için bir reseptördür ve KHDAK'ını de içeren birçok kanserde aşırı eksprese olur (Ma 2003, Christensen 2005, Ichimura 1996, Masuya 2004, Tsao 2005). Akciğer kanserlerinde, MET genine ait jukstamembran yapısında delesyonla sonuçlanan somatik bir mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyon in vitro olarak MET bağımlı transforme edici aktivitede uyarılmaya yol açmaktadır (Kong-Beltran M 2006). Birçok büyüme faktörünün proliferatif ve antiapoptotik etkisine ek olarak , MET reseptörü aktivasyonunda hücre-hücre ayrılması, hücre göçü ve invazyonu uyarılmaktadır (Birchmeier ve ark. 2003). Preklinik bir çalışmada, MET gen

amplifikasyonlu akciğer kanseri hücre dizilerinde, gen amplifikasyonunun hücre büyümesi ve sağ kalımı ile yakından ilgili olduğu gösterilmiştir (Lutterbach ve ark.2007). Engelman ve ark. KHDAK'ın EGFR-TKI inhibisyonunun üstesinden gelebilmek için EGFR ailesinin ve PI3K-AKT hücre sağkalım yolunun bir elemanı olan HER3'ü etkinleştirmek için MET onkogen amplifikasyonunu devreye soktuğunu rapor ettiler. Bu çalışma insanlarda EGFR-TKI kazanılmış direnç gelişimi ile ilişkili ilk çalışma olmuştur (Engelman ve ark. 2007). Bir diğer çalışmada da, gefitinib veya erlotinib direnci gelişmiş olan hastaların % 21'inde tedavi uygulanmayan hastaların ise sadece% 3 ünde MET gen amplifikasyonu saptanmıştır. Bu bize EGFR-TKI kazanılmış direnci olan hastalarda MET'in tedavi ile ilgili bir hedef olabileceğini göstermektedir(Bean ve ark.2007). Aslında verilere göre, MET amplifikasyonu KHDAK'de nadir görülmekte ve hastaların sadece % 7 sinde izlenmektedir (Bean 2007,Capuzzo 2008, Weir 2007). Bizim vakalarımızda da hasta grubunda bulunan bireylerin %35'inde c-Met amplifikasyonu gözlenmiştir. Çalışmamız sonucunda ortaya çıkan bu değer literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri, kanserden kaynaklanan ölüm sebeplerinin başında gelmektedir ve insidansı giderek artmaktadır.

Normal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kanser hücrelerinde meydana gelen değişiklikler içerisinde kromozom yapısındaki anormallikler akciğer kanseri için ayırt edici bir özelliğe sahiptir. Bu anomaliler gen mutasyonlarını da içermektedir. Kanserde hedefe yönelik tedavilerin gelişmeye başlaması ile genlerin mutasyonu, amplifikasyonu ve protein ekspresyon düzeylerinin bilinmesi klinikte önem kazanmıştır.

FISH yöntemi, hücrede amplifikasyon tespiti için altın standart olarak görülmektedir. Çalışmamızda bronkoskopi yolu ile alınan ve histopatolojik olarak tanı almış akciğer kanserli olan hastalardan elde edilen dokulardan touch yöntemi ile preparasyon yapıldı. Taze dokudan hazırlanan bu preparatlara FISH yöntemi uygulanarak EGFR, Her2, c-Met onkogenlerindeki sayı artışının akciğer kanseri ile ilişkisi araştırıldı.

Yedisi kadın, 32'si erkek toplam 39 bireyin dahil edildiği çalışmada olgulardan akciğer kanseri ve benign hastalık olmak üzere iki grup oluşturuldu. Benign hasta grubu kontrol grubu olarak değerlendirildi. Yapılan bu sınıflandırmanın sonucunda FISH uygulamasında EGFR geni için kontrol grubunda amplifikasyon gözlenmezken, kanserli olgu grubunda yer alan iki hastada amplifikasyon izlendi. Her2 geni için kontrol grubunda amplifikasyon gözlenmezken, kanserli olgu grubunda yer alan üç hastada amplifikasyon izlendi. c-Met geni için kontrol grubunda yer alan bir, kanserli olgu grubunda yer alan altı hastada amplifikasyon izlendi. İki grubun karşılaştırılması ile birlikte elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ayrıca hasta grupları içerisinde KHDAK histopatolojik tanısı alan hastalar ayrılarak tekrar değerlendirildi. Bu analiz sonucunda da iki grup arasında bir fark bulunamadı. Fakat artış yüzde olarak değerlendirildiğinde akciğer kanserli olgularda EGFR genine ait amplifikasyon yüzdesi %11, Her2 genine ait amplifikasyon yüzdesi %16, c-Met geni için amplifikasyon yüzdesi ise %35 olarak tespit edildi. Bu durum ise var olan çalışmalarla uyumlu olarak değerlendirildi.

Literatürdeki ilgili başka çalışmalara baktığımızda görülen, daha çok tümör dokusundan parafin bloklar elde edilip bu yöntemle hücre eldesine gidilmesi şeklindedir. Böylece daha fazla hücre numunesine sahip olunmuş ve FISH analizinde daha fazla veri ortaya çıkma söz konusu olabilmıştır. Bizim çalışmamızda ise taze dokudan direkt preparasyon yapılarak daha az sayıda hücre analiz edilebilmiştir. Ancak çalışmamızda, literatürdeki oranlarla uyumlu olarak amplifikasyon saptanmıştır. Daha büyük hasta grupları ile çalışma yapılması ve bu alanda yapılan çalışma sayısının artması ile istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Akciğer Kanserinde İnterfaz FISH Analizi ile Kromozomal Anöploidilerin Saptanması

Feyza Tuba Eroğlu

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2012

Akciğer kanseri dünya çapında kanserden ölümler arasında başlıca ölüm sebebidir. Erken tanısı hastanın yaşam süresini uzatan bir faktördür. Bununla birlikte tanı konulan hastaların ancak küçük bir kısmı klinik olarak evre I'de tanı almaktadır. Hastalığın başlangıç süreci oldukça yavaşır dolayısıyla bu süreçte tanı koymak için yeni stratejiler geliştirmek gereklidir.

Bronkoskopi, klinik ve radyolojik olarak akciğer karsinomundan şüphelenilen hastalarda sitolojik veya histopatolojik kesin tanının konulmasında kullanılan tanı koydurucu bir yöntemdir. Bronkoskopi, akciğer kanserinde büyük oranda gerçek tanıya ulaşılmasını sağlar.

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), floresan boyalarla işaretlenmiş DNA problemleri ile mikroskopik olarak interfaz hücrelerinde kromozom anomalilerini tespit etmek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Kanser hücreleri normal hücrelere göre çok sayıda yapısal ve sayısal kromozomal anomali içermektedir. FISH kanser tanısıyla uyumlu kromozomal anomalileri saptamak için kullanılmaktadır .

Çalışmamızda, bronkoskopik yolla elde edilen dokulardan hazırladığımız preparatlara FISH yöntemi uygulayarak EGFR, HER2 ve c-Met onkogenlerinde meydana gelen gen kopya sayı artışlarının akciğer kanseri ile ilişkisi araştırılmıştır. EGFR genine ait amplifikasyon yüzdesi %11, HER2 genine ait amplifikasyon yüzdesi %16, c-Met geni için amplifikasyon yüzdesi ise %35 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Akciğer Kanseri; Bronkoskopi; c-Met; EGFR; FISH; HER2

7. SUMMARY

Detection Of Chromosomal Aneuploidies by By Interphase FISH Technique In Lung Cancer

Lung cancer is the primary death cause among the cancer patients in the world. Early diagnosis of lung cancer, is a factor in extending the patients life. However, only a small part of patients are diagnosed in stage (I) clinically. Early stage of lung cancer is relatively slow, so for period it is necessary to develop new strategies for diagnosis.

Bronchoscopy is the diagnostic method used in definite cytological or histopathological diagnosis of patients with clinically and radiologically suspected lung carcinoma. Bronchoscopy helps to reach the true diagnosis in lung cancer.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a method, used to identify chromosomal abnormalities in interphase cells by DNA probes labeled with fluorescent dyes. When compared with normal cells, cancer cells contain a number of structural and numerical chromosomal abnormalities. FISH method is used to detect chromosomal abnormalities compatible with a diagnosis of cancer.

In our study, we applied FISH technique on prepared tissue slides obtained from bronchoscopically way to detect EGFR, Her2 and c-Met gene copy numbers and their relationship with lung cancer. It was determined that the EGFR gene amplification percentage was 11%, Her2 16% and c-met 35%. These results were in accordance with the literature.

Key Words: Bronchoscopy; c-Met; EGFR; FISH; Her2; Lung cancer

8.KAYNAKLAR

Akkoçlu A, Öztürk C. Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım. Patolojik Tanı ve Sorunları. Toraks Kitapları, Ankara. 1999;1:23-28.

Alan B, Weithberg MD. Cancer of the lung: From molecular biology to treatment guidelines, Humana Press, 2002;6-8.

Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. ACCP evidence based clinical practice guidelines. Chest, 2nd edition, 2007;132:29-55

Asnaghi L, Calastretti A, Bevilacqua A, D'Agnano I, Gatti G, Canti G, Delia D, Capaccioli S, Nicolin A. Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. Oncogene., 2004;23:5781-5791.

Aydiner A, Can G. Akciğer kanserinde tedavi ve bakım. İstanbul, 1.baskı, Haziran 2010;191-193

Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. The AGT cytogenetics laboratory manual, 3rd ed. Washington: Lippincott-Raven; 1997.

Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang WC, Yu CJ, Gazdar A, Pass H, Rusch V, Gerald W, Huang SF, Yang PC, Miller V, Ladanyi M, Yang CH, Pao W., Met amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. PNAS,2007;104:20932-20937.

Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J. The world of the cell. New York Pearson 6th edition, 2006, 186 (1): 38–53.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003;4:915–925.

Bozzetti C, Tiseo M, Lagrasta C, Nizzoli R, Guazza, Leonardi F, Gasparro D, Spiritelli E, Rusca M, Carbognani P, Majori M, Franciosi V, Rindi G, Ardizzoni A. Comparison between epidermal growth factor receptor (EGFR) gene expression in primary non-small cell lung cancer (NSCLC) and in fine-needle aspirates from distant metastatic sites. J Thorac Oncol. 2008;3:18-22.

Buldendorf L, Müller P, Jaos L, Grilli B, Vogel S, Herzog M, Barascud A, Feichter G, Dalquen P, Tamm M, Multitarget fish analysis in the diagnosis of lung cancer. Am J Clin Pathol, 2005; 123:516-523.

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregore V, Doglioni C, Sidoni A, Tanato M, Franklin MA, Crino L, Bunn PA, Vorella-Garcia M, Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib Sensitivity in non-small-cell lung cancer., Journal of the National Cancer Institute, 2005, 97; 9: 443-655.

Cappuzzo F, Janne PA, Skokon M, Finocchioro G, Rossi E, Ligario C, Zucali PA, Terracciano L, Toschi L, Roncalli M, Destro A, Incarbone M, Alloisio M, Santoro A, Varella-Garcia M., Met increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients, Annals of Oncology, 2009; 20: 298-304.

Cappuzzo F, Skokan M, Gajapathy S, et al. MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in never smokers or EGFR FISH positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Ann Oncology, 2009;20:298-304.

Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. Cancer Lett, 2005; 225: 1–26.

- Cohen S, Epidermal growth factor, *Bioscience Reports*, 1986;6: 1017-1028
- Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 1984; 311: 29–33.
- Cox G, Vyberg M, Melgaard B, Askaa J, Oster A, O'Byrne KJ., Herceptest: Her2 expression and gene amplification in non-small-cell lung cancer. *J Cancer*,2001;92:480-483.
- Dacic S, Flanagan M, Cieply K, Ramalingam S, Luketich J, Belani C, Yousem S., Significance of EGFR protein expression and gene amplification in non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Pathol*,2006;125:860-865.
- Dean M, Park M, Le Beau M M, Robins T S, Diaz MO, Rowley JD, Blair DG, Vande Woude G. F.The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature*, 1985;318: 385-388.
- Demirhan O, Taştemiir D, Hastürk S, Kuleci S, Hanta İ. Alterations in p16 and p53 genes and chromosomal findings in patients with lung cancer: Fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies. *Cancer epidemiology*, 2010;34:472-477.
- Demirkan A. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hastalarda retinoik asit reseptör beta geni promotör metillenmesinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 2006.
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy". *Nature Reviews Cancer*,2003;3 (1): 11–22.
- Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA (May 2006). "The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative roEGF signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal.*,2006;18:2089-2097.
- Ekmekçi A. Erbas D. Kanserin Moleküler Mekanizması, Ankara, 1991; 136-168.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N,Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316(5827):1039-1043.
- Gandhi J, Zhang J, Xie Y, Soh J, Shigematsu H, Zhang W, Yamamoto H, Peyton M, Girard L, Lockwood WW, Lam LW, Warella-Garcia M, Minna DJ, Gazdar FA. Alterations in gene of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. *Plos One*. Feb.2009;4,2:1-11.
- Geschwind A, Fischer O.M, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinaes: targets for cancer therapy, *Nature*,2004; 4: 361-370.
- Groenestege WM, Thébault S, Wijst J, Berg D, Janssen R, Tejpar S, Heuvel LP, Cutsem E, Hoenderop JG, Knoers NV, Bindels RJ. Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest.*, 2007;117:2260-2267.
- Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal*.2006 ;18:2089-97.
- Hirashima N, Takahashi W, Yoshii S, Yamane T, Ooi A., Protein overexpression and gene amplification of c-erbB-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study, *Mod Pathol*,2001;14(6):556-562.
- Hirsch FR, Varella- Garcia M, Bunn PA, Di Maria MV, Veve R, Bremnes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA. Epidermal Growt Factor Receptor in Non-small-cell Lung carcinomas; Correlation

Between Gene copy number and protein expression and impact on Prognosis. *J Clin Oncol.* 2003; 21 ; 3798-3807.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, Veve R, Chen L, Helfrich B, Zeng C, Baron A, Bunn PA., Evaluation of Her2/neu gene amplification and protein expression in non-small-cell lung carcinomas. *B J of Cancer*, 2002;86:1449-1446.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, Bunn PA, Franklin WA, Cravley J, Gondara DR., Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinil in Patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a southwest oncology group study., *J clin Oncol*, 2005, 23; (28): 6838-6845.

Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T et al. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance, *Jpn J Cancer Res*, 1996; 87: 1063–1069.

İtil O. Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi. İn: Haydaroğlu A, Akciğer Kanserleri; Tanı ve Tedavi. 1. Baskı, İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 2000;15-34.

Jeon, YK, Sung SW, Chung JH, Park WS, Seo JW, Kim CW, Chung DH. Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 2006, 54: 387;398103:1265-1273, 8 p.

Jiang F, Katz RL. Use of interphase fluorescence in situ hybridization as a powerful diagnostic tool in cytology. *Diagn Mol Pathol.* 2002;11:47-57.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 2002;285:1-24.

Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res*, 2006; 66: 283–289.

Li C, Sun Y, Fang R, Han X, Luo X, Wang R, Pan Y, Hu H, Zhang Y, Pao W, Shen L, Ji H, Chen H. Lung adenocarcinomas with Her2-activating mutations are associated with distinct clinical features and Her2/EGFR copy number gains, *Thorac oncol.*, 2012;7:85-89.

Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. *Curr Biol.*,2002;12:R236-8.

Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, et al. Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res*, 2007; 67:2081-2088.

Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. c-Met:structure, functions and potential for herapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22:309–325.

Masuya D, Huang C, Liu D et al. The tumour–stromal interaction between intratumoral c-Met and stromal hepatocyte growth factor associated with tumour growth and prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*, 2004; 90: 1555–1562

Mc Kay JA. Evaluation of the EGFR in colorectal tumours and lymph node metastases. *European journal of cancer.* 2002;38:2258-2264.

Meert AP, Martin Benoit, Verdebout JM, Noel S, Ninane V, Sculier JP., Is there a relationship between c-erbB-1 and c-erbB-2 amplification and protein overexpression in NSCLC., *Lung Cancer*, 2005; 47: 325-336

Metintaş S. Akciğer kanseri epidemiyolojisi , İç: Özlü T, Metintaş M, Karadağ M, Kaya A. editörler. solunum sistemi ve hastalıkları, İstanbul Tıp Kitabevi, 2010; 1319-1337.

Mitelman. Chromosomes, genes and cancer, *Cancer*, 1994; 44: 133.

Mountain CF. Revisions in the International system for staging lung cancer. *Chest*, 1997;111:1710–17.

Müsellim B. Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri sempozyum dizisi, İstanbul, No:58, Kasım 2007; 113-118

Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Kato H. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the Her2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int.J.Cancer*, 2003;103:61-66

Nasca PC, Pastides H. *Fundamentals of cancer epidemiology*. Sudbury: Jones and Bartlett;2008;11-12.

Nussbaum LR, Malnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. *Thompson and Thompson genetics in medicine 6th ed*. Philadelphia: WB Saunders; 2001.

Onataslan N A, Akciğer kanserinde büyüme faktörleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya A.D., Yüksek Lisans Tezi, 2006.

Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda, Woude GV. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84. 1987;6379–6383.

Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, Cassani B, Miozzo M, Buttitta F, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. HER2/neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real-time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry, *Clin Cancer Res*, 2003;9: 3645-3652.

Rajbir KG, Madeline FV, Kramer A, Hames M, Zhang L, Haddad-Haselmayer K, Ried T, Shilo K, Henschke C, Yankelevitz D, Jen J. Using genetic markers to identify lung cancer in fine needle aspiration samples. *Clin Cancer Res.*, 2008; 14(22):7481-7487.

Sanja D, Melina F, Kathleen C, Suresh R, James L, Chandra B, Samuel Y. Significance of EGFR Protein Expression and Gene Amplification in Non-Small Cell Lung Carcinoma, *American Society for Clinical Pathology*, 2005 125(6):860-865,5p.

Sholl LM, John Iafrate A, Chou YP, Wu MT, Goan YG, Su L, Huang YT, Christiani DC, Chirieac LR. Validation of chromogenic in situ hybridization for detection of EGFR copy number amplification in non-small cell lung carcinoma, *Modern Pathology*, 2007, 20; 1028-1035, 7 p.

Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein Overexpression and Gene Amplification of Epidermal Growth Factor Receptor in Non-small Cell Lung Carcinomas, *American Cancer Society*, 2005.

Tan D, Deeb G, Wang J, Slocum HK, Winston J, Wiseman S, Beck A, Sait S, Anderson T, Nwogu C, Ramnath N, Loewen G. Her-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-III non-small cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization, *Mol Pathol.*, 2003;12:201-211p.

Travis V, Brambilla E, Müller-Hermelinke K, Haris CC, Pathology and Genetics of Tumours of the lung, Pleura, Thymus and Heart., *WHO Classification of Tumours IARC Vol: 10 Third Edition*, 2004.

Tsao M.S, Sakurada A, Cutz J.C. et al, Erlotinib in Lung Cancer Molecular and Clinical Predictors of Outcome, *N Engl J Med*, 2005; 353: 133-144p.

Tsao MS, Liu N, Chen JR et al. Differential expression of Met/hepatocyte growth factor receptor in subtypes of non-small cell lung cancers, *Lung Cancer*, 1998; 20: 1–16.

Uludağ P. Küçük hücreli olmayan akciğer kanser dokularında Her2/neu ve EGFR genlerinin Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile incelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik A.D. Yüksek lisans tezi, 2008.

Uzun D. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında Her-2/Neu ve EGFR genlerinin real-time PCR yöntemi ile incelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik A.D. Yüksek lisans tezi, 2008.

Varella- Garcia M, Nagelmeier I, Rüsçüff J, Schmitt M, Arbogast S, Cappuzzo F., EGFR fluoreseence in situ hybridisation assay; guidelines for application ton on-small-cell lung cancer., J Clin Pathol. 2009; 62: 970-977.

Wegner RD. Diagnostic cytogenetics. Berlin: Springer-Verlag; 1999.

Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma, Nature, 2007; 450:893-898.

www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10723&pid=10628

www.medscape.org/viewarticle/544922

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9866/

www.saglik.gov.tr

www.ukdk.org/pdf/kitap/8.pdf.

Yaman M. Akciğer kanserinde tedavi yaklaşımı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri sempozyum dizisi, İstanbul, No:58, Kasım 2007;157-168

Yıldırımcan Ş. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde fluoreсан in-situ hibridizasyon ile Her2/neu amplifikasyonunun saptanması. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans ve Doktora Tezi, İzmir, 2006.

Yurdakul AS, Akciğer kanserinde yeni evreleme sistemi Toraks Dergisi. 2010;11:173-180.

Zamani A. Tanısal Bronkoskopi. İç: Özlü T, Metintaş M, Karadağ M, Kaya A. Editörler. Solunum sistemi ve hastalıkları. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2010:365-379.

Zamani AG. Genetik tanı yöntemleri. İç:Toraks Derneği 10.Yıllık Kongresi, Kurs kitabı, Antalya 2007:143-161.

Zarich N, Oliva JL, Martínez N, *et al.* Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1". *Molecular Biology of the Cell.*, 2006,**17**(8): 3591–3597.

Zeng ZS, Weiser MR, Kuntz E, Chen CT, Khan SA, Forslund A, Nash G, Gimbel M, Yamaguchi Y, Culliford AT, D'Alessio M, Barany F, Pathy PB. C-met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Letters*, 2008 (256); 258-269.

Zinner R.G, Glisson B.S, Fossella F.V, Pisters K.M, Kies M.S, Massarelli E. et al. Trastuzumab in Combination With Cisplatin And Gemcitabine Impatients with HER2 Overexpressing Untreated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Report of A Phase 2 Trial And Findings Regarding Optimal Identification Of Patients with HER2 Overexpressing Disease, *Lung Cancer*, 2004 ;44(1): 99-110p.

10.ÖZGEÇMİŞ

Feyza Tuba EROĞLU

1984 yılında Konya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya’da tamamladı. Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2008 yılında mezun oldu. 2008 yılı Eylül ayında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimine halen devam etmektedir