

**T.C.  
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKCİĞER ADENOKARSİNOMUNDA RASSF1A VE SPARCL1  
GENİ METİLASYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Gülzade EKER**

**Danışman Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ  
Jüri Üyesi Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER  
Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Fadime MUTLU İÇDUYGU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KASTAMONU - 2018**

## TEZ ONAYI

**Gülzade EKER** tarafından hazırlanan " **Akciğer Adenokarsinomunda RASSF1A ve SPARCL1 Geni Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ  
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER  
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Fadime MUTLU İÇDUYGU  
Giresun Üniversitesi



25/06/2018

Enstitü Müdür V. Doç. Dr. Mehmet Altan KURNAZ



## TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

Gülzade EKER



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AKCİĞER ADENOKARSİNOMUNDA RASSF1A VE SPARCL1 GENİ METİLASYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Gülzade EKER

Kastamonu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ

DNA metilasyonu yoluyla transkripsiyonel sessizleşme ile, hücre siklusu kontrolü, hücre farklılaşması, sinyalizasyon ve apoptoz gibi hücre fonksiyonlarının kontrolü sağlanır. Normal hücrelerde, spesifik genlerde promotör CpG adaları genellikle unmetile durumda olmasına karşın, genom global olarak metiledir. Kanserde tümör supresör genlerin promotör metilasyonu, erken meydana gelen bir olaydır ve global hipometilasyon mevcuttur. Yapılan çalışmalarda, tümör supresör genlerin metilasyon durumu ile akciğer adenokarsinomu prognozunun ilişkisi olduğu ve bu genlerin hipermetilasyonunun, prognoz için biyomarker olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı; küçük hücre dışı akciğer kansinomunun en sık görülen tipi olan akciğer adenokarsinomunda, RASSF1A ve SPARCL1 genlerinin metilasyon durumlarının belirlenmesidir. Çalışmaya akciğer adenokarsinomlu kırk hastaya ait, 40 tümör ve 40 normal kontrol dokusu dahil edildi ve parafine gömülü doku örneklerinde, DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, bisülfid uygulamasını takiben, RASSF1A ve SPARCL1 geni metilasyonu, real-time PCR yöntemi ile analiz edildi. Çalışmamızda RASSF1A metilasyon frekansı % 42,5, SPARCL1 metilasyon frekansı % 32,5 olarak tespit edilmiş olup, metilasyon durumu, akciğer adenokarsinomu tümör dokularında, kontrol dokularından anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,000$ ), ancak klinopatolojik parametrelerle, metilasyon durumu arasında bir ilişki saptanmadı. Türk hastalara ait adenokarsinom tümör dokularında, RASSF1A ve SPARCL1 geni metilasyon durumlarını ilk defa birlikte değerlendiren çalışma sonuçlarımız, benzer çalışmaların sonuçlarıyla paralellik gösterdi

**Anahtar Kelimeler:** RASSF1A, SPARCL1, akciğer adenokarsinoma, DNA metilasyonu, küçük hücreli dışı akciğer kanseri.

**2018, 91 sayfa**  
**Bilim Kodu: 203**

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### DETERMINATION OF RASSFA1 AND SPARCL1 GENE METHYLATION LEVELS IN LUNG ADENOCARCINOMA

Gülzade EKER

Kastamonu University  
Institute of Science  
Department of Biology

Supervisor: Dr. Asuman ÖZGÖZ

Cell functions; including cell cycle control, cellular differentiation, signaling, and apoptosis, can be controlled with transcriptional silencing via DNA methylation process. In normal cells, the promotor CpG islands in specific genes are usually in the unmethylated state, although the genome is globally methylated. In cancer, the promotor methylation in the tumor suppressor genes, is a prematurely emerging event besides global hypomethylation. Studies in the literature suggest an association between the status of methylation in the tumor suppressor genes and the prognosis of lung adenocarcinoma; proposing that these genes can be used as biomarkers to predict the prognosis. The aim of this study is to determine the methylation status of RASSF1A and SPARCL1 genes in lung adenocarcinoma, the most common type of non-small cell lung carcinomas. 40 tumor tissues and 40 normal tissues from 40 patients with lung adenocarcinoma, were included in the study. Following DNA isolation from the paraffin embedded tissue samples, bisulfite application was performed and then, the methylation in the RASSF1A and SPARCL1 genes were analyzed with the real-time PCR method. In our study, the frequency of methylation in RASSF1A and SPARCL1 were found to be 42,5% and 32,5%, respectively. The status of methylation was significantly higher in the lung adenocarcinoma tissues compared to the control tissues ( $p=0.000$ ), however; there were no associations between the clinicopathological parameters and the status of methylation. Our study is the first one that evaluates the status of methylation in the RASSF1A and SPARCL1 genes together, at the same time in the adenocarcinomatous tumor tissues of Turkish patients. It is found that the results of the current study are parallel with the results of other similarly designed studies.

**Key Words:** RASSF1A, SPARCL1, lung adenocarcinoma, DNA methylation, non–small cell lung cancer.

**2018, 91 pages**

**Science Code: 203**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren değerli tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ'e teşekkür ederim. Tezimde kullanılan patolojik arşiv materyallerinin sağlanması ve olguların değerlendirilmesi aşamasında katkılarından dolayı Gayrettepe Florence Nightingale Hastanesi Patoloji Bölümü hocaları, Prof. Dr. Fatma AKTEPE'ye, Prof. Dr. Gülen BÜLBÜL DOĞUSOY'a, Doç. Dr. İpek ÇOBAN'a; çalışmamın istatistikî analizlerini yapan Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbî Genetik AD. öğretim üyesi, Dr. Öğr. Üyesi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK'e ve katkıları için Fazıl Boyner Sağlık Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi, Dr. Öğr. Üyesi Filiz ÖZEL'e teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam sırasında bilgilerimi ve yardımlarımı benden esirgemeyen Fen - Edebiyat Fakültesi öğretim üyelerine, okul ve iş arkadaşlarıma, tez projemi destekleyen Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, çok teşekkür ederim. Her zaman ve her koşulda yanımda olan annem başta olmak üzere, aileme de teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Gülzade EKER  
Kastamonu, Haziran, 2018

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Akciğerlerin Anatomisi .....	2
1.2. Kanser ve Kanser Türleri .....	5
1.3. Akciğer Kanseri.....	6
1.3.1. Epidemiyoloji .....	6
1.3.2. Etyoloji .....	7
1.3.2.1. <i>Genetik faktörler</i> .....	7
1.3.2.2. <i>Diğer faktörler</i> .....	8
1.3.3. Akciğer Kanserinin Semptomları .....	9
1.3.4. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması .....	10
1.3.4.1. <i>Küçük hücreli akciğer kanseri</i> .....	13
1.3.4.2. <i>Küçük hücre dışı akciğer kanseri</i> .....	13
1.3.4.2.1. <i>Adenokarsinoma</i> .....	14
1.3.4.2.2. <i>Skuamöz hücreli karsinom</i> .....	15
1.3.4.2.3. <i>Büyük hücreli karsinom</i> .....	15
1.3.5. Akciğer Kanserinin Evrelemesi .....	16
1.4. Epigenetik Mekanizmalar.....	19
1.4.1. DNA Metilasyonu.....	20
1.4.2. Histon Modifikasyonları.....	27
1.4.3. Kodlamayan RNA'lar .....	27
1.4.3.1. <i>miRNA</i> .....	29
1.4.3.2. <i>siRNA</i> .....	30

1.5. Akciğer Kanserinde Genetik Değişimler .....	31
1.5.1. Akciğer Kanserinde Polimorfizm .....	31
1.5.2. Akciğer Kanserinde Görülen Mutasyonlar .....	33
1.5.3. Akciğer Kanserinde Gen Ekspresyon Profili.....	37
1.6. RASSF1A Geni .....	38
1.7. RASSF1A Geni ve Akciğer Kanseri .....	41
1.8. SPARCL1 (SPARC-like protein 1) .....	42
1.9. Sparcl1 ve Kanser .....	43
2. MATERYAL VE METOT .....	45
2.1. Çalışma Grupları .....	45
2.2. Ekipman.....	45
2.2.1. Kimyasal Maddeler.....	45
2.2.2. Araçlar ve Cihazlar .....	46
2.3. Parafine Gömülü Tümör ve Normal Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	46
2.4. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .....	49
2.5. Bisüfit Uygulaması.....	49
2.5.1. CT Conversion Reagent Hazırlanması .....	49
2.5.2. M-Wash Buffer Hazırlanması.....	49
2.6. Primer Dizaynı .....	51
2.7. Real-Time PCR Analizi.....	53
2.8. Analiz .....	56
2.9. İstatiksel Değerlendirme.....	57
3. BULGULAR .....	58
3.1. Çalışma Grubu.....	58
3.2. Metilasyon Profili.....	59
4. TARTIŞMA .....	69
5. SONUÇ .....	77
KAYNAKLAR .....	79
ÖZGEÇMİŞ .....	91



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5m-C	5-metil Sitozin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AJCC/UICC	The American Joint Committee on Cancer and the International Union Against Cancer
AK	Akciğer Kanseri
C	Sitozin
-CH3	Metil Grubu
COSMIC	Kanserde Somatik Mutasyonlar Katalogu
CRC	Kolorektal Kanser
DNMT	DNA metiltransferaz
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FHIT	Frajil Histidin Triad
GSTP1	Glutasyon S-Transferaz 1
HAT	Histon Asetiltransferaz
HDAC	Histone Deasetiltransferaz
IASLC	International association for the study of lung cancer
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
KKİP	Kanser Kayıt ve İnsidans Projesi
LOH	Loss of Heterogenite
MAP	Mikrotübüle Bağlı Protein
MBP	metil-CpG Binding Proteinler
MIF	Migration Inhibitory Factor
mRNA	Mesajcı RNA
npcRNA	Non-Protein-Coding RNA
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
RA	RAS asosiasyon domainine
RASSF1A	Ras association domain family member 1A
Rb	Retinoblastoma
RNAi	RNA enterferans
SCC	Skvamöz Hücre Karsinoma
siRNA	Small İnterfering RNA
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SPARCL1	SPARC-like protein 1
TCGA	Kanser Genom Atlası
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörleri
TNF $\alpha$	Tümör Nekroz Faktörü $\alpha$
TNM	T: primer tumor; N: bölgesel lenf bezleri; M: uzak metastaz
TPA	Doku Plasminojen Aktivatör
TSGs	Tümör Süpresör Genler
XPC	Asp312Asn
XPD	Lys751Gln
XRCC1	Arg399Gln
XRCC3	Thr241Met

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. Akciğerler, Plevra, Göğüs Boşluğu .....	3
Şekil 1.2. Sağ Akciğerin (A) ve Sol Akciğerin (B) Bronkopulmoner Segmentlerinin Önden Görünümü .....	4
Şekil 1.3. Plevra Zarları.....	4
Şekil 1.4. Akciğer Adenokarsinomlarının Mutasyon Profili.....	35
Şekil 1.5. RASSF1A Geninin 3p21.3'deki Lokalizasyonu.....	38
Şekil 1.6. RASSF1A'nın Yer Aldığı ve İlişkili Olduğu Yolaklar .....	40
Şekil 1.7. SPARCL1 Geninin 4q22'deki Lokalizasyonu .....	42
Şekil 2.1. RASSF1A Genine Ait Metilasyon Erime Eğrileri.....	56
Şekil 2.2. SPARCL1 Genine Ait Metilasyon Erime Eğrileri.....	56
Şekil 3.1. AT 25 No'lu Olguya Ait RASSF1A Geni Metile Profil Gösteren Erime Eğrisi.....	60
Şekil 3.2. AK3 No'lu Olguya Ait RASSF1A Geni Unmetile Profil Gösteren Erime Eğrisi.....	60
Şekil 3.3. AT4 No'lu Olguya Ait RASSF1A Geni Metile+Unmetile Profil Gösteren Erime Eğrisi.....	60
Şekil 3.4. AT 1 No'lu Olguya Ait SPARCL1 Geni Metile Profil Gösteren Erime Eğrisi.....	61
Şekil 3.5. AK 6 No'lu Olguya Ait SPARCL1 Geni Unmetile Profil Gösteren Erime Eğrisi.....	61
Şekil 3.6. AK4 No'lu Olguya Ait SPARCL1 Geni Metile+Unmetile Profil Gösteren Erime Eğrisi.....	61
Şekil 3.7. Akciğer Adenokarsinoma Dokusunda RASSF1A Geni Metilasyon Dağılımları.....	63
Şekil 3.8. Kontrol Dokusunda RASSF1A Geni Metilasyon Dağılımları .....	63
Şekil 3.9. Akciğer Adenokarsinoma Dokusunda SPARCL1 Geni Metilasyon Dağılımları.....	63
Şekil 3.10. Kontrol Dokusunda SPARCL1 Geni Metilasyon Dağılımları .....	63

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 1.1. 2012 Yılında Dünya Çapında Her İki Cinste de 10 Kanserin Görülme Sıklığına İlişkin Tahmini Vaka Sayısı .....	6
Tablo 1.2. Akciğer Kanserinin Genel Sınıflandırılması .....	11
Tablo 1.3. Malignant Akciğer Tümörlerinde Histolojik Sınıflandırma .....	12
Tablo 1.4. Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi .....	17
Tablo 1.5. Akciğer Kanserin TNM'ye Göre Evre Grupları .....	18
Tablo 1.6. Birkaç Anhtar Genin DNA Metilasyon Değişiklikleri ve Akciğer Kanserindeki Rollerini .....	26
Tablo 1.7. Bazı ncRNA'lar ve işlevleri .....	29
Tablo 2.1. RASSF1A ve SPARCL1 Unmetile ve Metile primer dizileri.....	52
Tablo 2.2. PCR İçin Reaksiyon Karışım Hacimleri.....	53
Tablo 2.2. Cihaz Protokolü.....	55
Tablo 3.1. Çalışmada Yer Alan Hastalara Ait Demografik ve Klinik Veriler	59
Tablo 3.2. Akciğer Adenokarsinomunda RASSF1A ve SPARCL1 Geni Metilasyon Dağılımları.....	62
Tablo 3.3. Akciğer Adenokarsinomunda Evrenin SPARCL1 Metilasyon Durumuyla İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	65
Tablo 3.4. Akciğer Adenokarsinomunda Tümör Histolojik Derecesinin SPARCL1 Metilasyon Durumuyla İlişkisinin Değerlendirilmesi..	65
Tablo 3.5. Akciğer Adenokarsinomunda Lenf Nodunun SPARCL1 Metilasyon Durumuyla İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	66
Tablo 3.6. Akciğer Adenokarsinomunda Evrenin RASSF1A Metilasyon Durumuyla İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	66
Tablo 3.7. Akciğer Adenokarsinomunda Tümör Histolojik Derecesinin RASSF1A Metilasyon Durumuyla İlişkisinin Değerlendirilmesi..	67
Tablo 3.8. Akciğer Adenokarsinomunda Lenf Nodunun RASSF1A Metilasyon Durumuyla İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	67

## 1. GİRİŞ

Kanser, çeşitli nedenlerle hücre bölünme kontrolünü sağlayamayan hücrelerin, kontrolsüz bir şekilde aşırı bölünmesiyle karakterize bir hastalıktır. Akciğer kanseri (AK), bronş epitelinden köken alan, tüm dünyada en sık görülen kanser türüdür. Dünyada cinsiyet fark etmeksizin, kansere bağlı ölümlerde en önde gelmektedir ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Murray vd., 2004; Yaykaşlı, Hatipoğlu, Kaya ve Yaykaşlı, 2012; Ergelen ve Çimşit 2013).

KHDAK, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'nini oluşturmakta ve hastaların üçte ikisinden fazlası ileri evrede tespit edilmektedir. Cerrahi sonrası KHDAK 5 yıllık sağkalım oranı, sadece % 17'dir. Evre IA KHDAK hastalarında dahi, 5 yıllık sağkalım oranı % 67'yi geçmemektedir. En yaygın KHDAK türleri, büyük hücreli karsinom, adenokarsinoma ve skuamöz hücre karsinoma (SCC)'dir (Yaren ve Öztop, 2006; Zhou vd., 2015).

Adenokarsinoma, akciğer kanserlerinin yaklaşık yarısını oluşturmakta olup, sigara kullanımı ile ilişkisi en zayıf olan tiptir. Hastaların çoğunluğunu sigara içmeyen kadın hastalar oluşturmaktadır. Akciğer kanserli hastalar arasında, adenokarsinomlu hasta sayısının yıllar içinde giderek artması, bu hasta grubu üzerinde çalışmaları artırmıştır (Ak vd., 2009; Ergelen ve Çimşit, 2013).

Yapılan araştırmalarda, aralarında akciğer kanserinde bulunduğu birçok kanser tipinde epigenetik mekanizmaların rol aldığı bulunmuştur. Epigenetik mekanizmalar, genotoksik mekanizmalardan farklı olarak, DNA dizilimini değiştirmeden gen ifade seviyesini düzenlemektedir (Yaykaşlı, Hatipoğlu, Kaya ve Yaykaşlı, 2012).

Son zamanlarda üzerinde en çok araştırma yapılan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizma, DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH<sub>3</sub>) eklenmesiyle, 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıyla karakterizedir ve CpG adalarının yoğunlaştığı bölgelerde meydana gelmektedir. CpG adaları, genellikle genlerin promotör bölgelerinde

yerleşim gösterirler. DNA metilasyonu, CpG adalarının metillenmesini sağlayarak ilgili genin susturulmasına neden olur (Güler ve Peynircioğlu, 2016).

DNA metilasyonu akciğer kanseri erken tanısında, prognoz tayininde, ayırıcı tanıda, çeşitli vücut sıvılarında noninvaziv olarak çalışılabilecek epigenetik belirteçler sunmaktadır. DNA hipermetilasyonu kanserde erken evrelerde meydana gelmektedir. Akciğer karsinogenezinde potansiyel DNA metilasyon biobelirteçleri olarak, APC, CDH1, CDH13, DAPK1, FHIT, MGMT, p16INK4a, RARβ, RASSF1A (Ras association domain family member 1A), RUNX3 ve SHOX2'nin hipermetilasyonu bildirilmektedir. Çeşitli kanser tiplerinde SPARCL1 (SPARC-like protein 1) metilasyonu da gösterilmiştir (Lewandoska, 2015; Yüce ve Ersoy, 2016).

RASSF1A'nın hipermetilasyonu, akciğer, böbrek, mesane, beyin, meme, melanom, kolon, özofageal, mide, over, pankreas, baş-boyun, karaciğer, servikal, tiroid kanserleri, hepatosellüler karsinoma, osteosarkoma, kolanjiokarsinoma, hodgkin lenfoma, çocukluk çağı tümörleri, testiküler germ hücre tümörleri, nazofaringeal karsinom gibi birçok kanser türünde tespit edilmiştir. SPARCL1'in downregülasyonu ise pankreas, prostat, mesane, yumurtalık, meme ve küçük hücreli dışı akciğer tümörleri gibi çeşitli tümörlerde bulunmuştur (Prefier ve Dammann, 2005; Zhang vd., 2011).

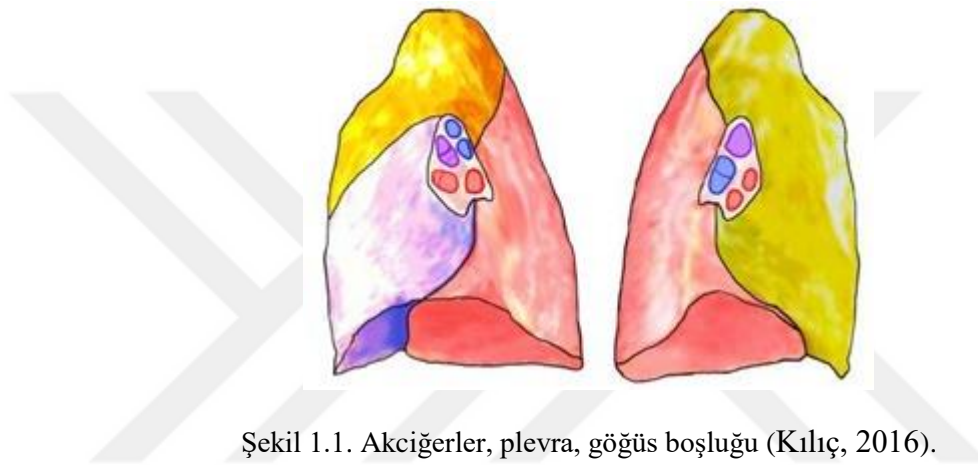
Bu çalışmada küçük hücre dışı akciğer kanserleri arasında en sık görülen tip olan, akciğer adenokarsinoma tanısı almış, formalinle fiske edilmiş akciğer adenokarsinomlu kırk hastaya ait, 40 tümör ve 40 normal kontrol dokusu dahil edilmiş, Türkiye'de daha önce bildiğimiz kadarıyla birlikte çalışılmamış olan RASSF1A ve SPARCL1 genlerinin adenokarsinoma tümör ve normal dokuları arasındaki metilasyon durumu oranındaki farklılığın belirlenmesi amaçlanmıştır.

### **1.1. Akciğerlerin Anatomisi**

Akciğerler göğüs boşluğu içinde bulunmaktadır. Akciğerlerin ağırlıkları yaklaşık olarak 1200-1300 gramdır. Sağ ve sol olmak üzere iki parçadan meydana gelmektedir ve bu parçaların üst kısımları dar, alt kısımları daha geniştir. Sağ akciğer

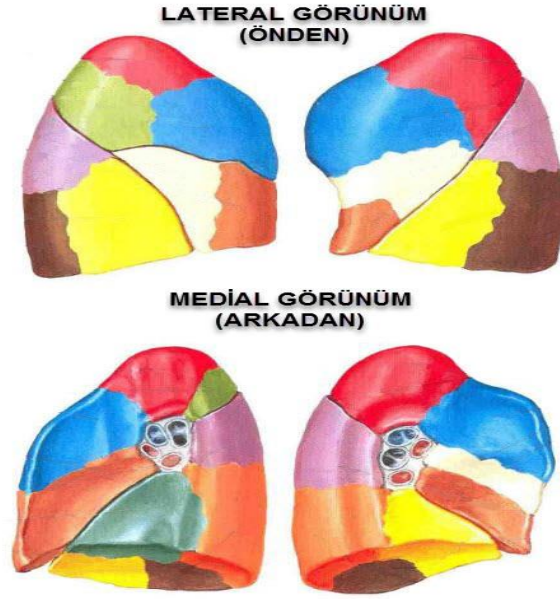
ve sol akciğerin büyüklükleri aynı değildir. Sağ akciğer üç loptan, sol akciğer iki loptan oluşmaktadır (Semiz, 1990).

Akciğerin içinde bronşiyal ağaç ve akciğer alveolleri dahil olmak üzere, ana bronş ve distalinde bulunan solunum sisteminin tüm yapıları bulunmaktadır. Her akciğer dört yüzeye sahiptir (Şekil 1.1). Akciğerin mediastinal yüzeyinde pulmoner damarlar, sinirler ve bronşların geçtiği, hilum pulmonis denilen dikey bir yarık vardır ve mediastinal yüzey hafif iç bükeydir (Kılıç, 2016).



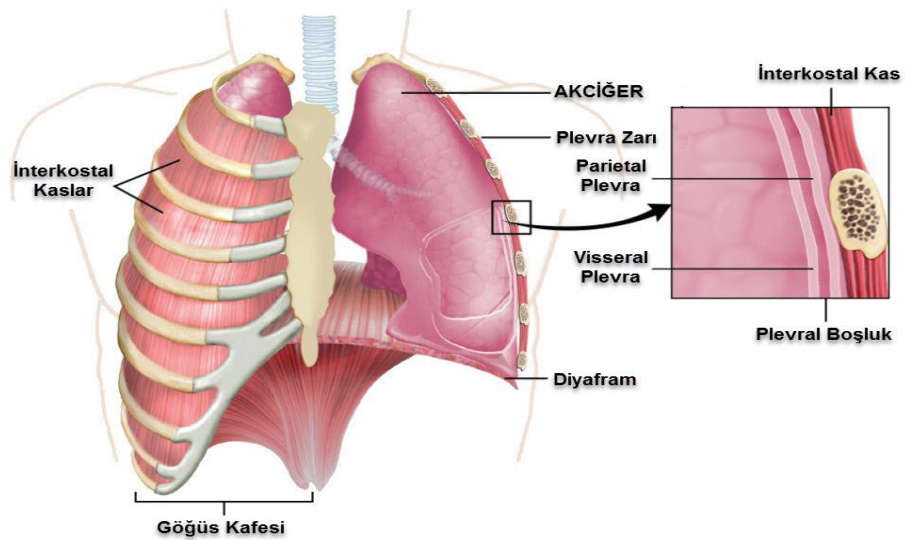
Şekil 1.1. Akciğerler, plevra, göğüs boşluğu (Kılıç, 2016).

Akciğerin alt yüzeyi, basis pulmonis olarak adlandırılır. Diyaframın dışbükey kubbesi üzerine uygun olarak, alt yüzeyi olan basis pulmonis konkavdır. Akciğerin üst yüzeyi, apex pulmonis olarak adlandırılır ve köprücük kemiğinin seviyesinin üzerinde uzanır. Facies costalis, akciğerlerin en geniş yüzünü oluşturur ve kaburgaların iç yüzü ile temastadır. Akciğerin her bir lobu, pulmoner alveolleri içeren küçük lobüllere ayrılmıştır. Pulmoner alveoller, akciğerlerin gaz değişiminin meydana geldiği fonksiyonel birimleri oluştururlar. Trachea, bifurcatio trachea'dan sonra, iki ana bronşa ayrılır ve bunlar akciğer içine uzanırlar. Bronkopulmoner segment, piramit şeklindedir ve tepesi hilum pulmonis'e doğru yönelmiş olup, tabanı ise akciğer dış yüzüne doğrudur (Şekil 1.2.). Visceral pleura'nın uzantısı olan bağ dokusu ile sarılmıştır. Her segmental bronşun yanında, akciğer segmentine gelen sinirler ve bir arter dalı bulunur (URL-1, 2018).



Şekil 1.2. Sağ akciğerin (A) ve sol akciğerin (B) bronkopulmoner segmentlerinin önden görünümü (URL-1, 2017).

Sağ ve sol akciğeri çevreleyen çift katlı, seröz, iki yapraklı zara plevra denir. Göğüs duvarına yapışık plevranın dıştaki yaprağına parietal plevra, akciğerlerin üzerini çevreleyen içteki yaprağına, visseral plevra denir. Bu iki zar arasında, çok az miktarda sıvı bulunmakta olup, birbirlerinden ayrılmaları oldukça zordur. Plevra yaprakları arasındaki negatif basınç, plevranın büzülmemesini sağlamaktadır (Tuncel, 2006) (Şekil 1.3.) (URL-2, 2016).



Şekil 1.3. Plevra zarları (URL-2, 2016).

## 1.2. Kanser ve Kanser Türleri

Kanser terimi ilk olarak Hipokrat (M.Ö. 460-370) tarafından kullanılmıştır. Kanser, Yunancada karkinos kelimesinden köken almakta olup, en eski bulgulara, eski Mısır döneminde (M.Ö. 1600)'de, mumyalarda rastlanılmıştır. Kanser, ölüme neden olma açısından, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada karşımıza çıkmaktadır (Sudhakar, 2009).

Kanser, genotipik ve fenotipik düzeyde, uzun süreli ve çok adımlı bir süreçtir. Kanser oluşumunda kalıtım kadar; virüsler, radyasyon, beslenme alışkanlığı, çeşitli kimyasallar gibi birçok faktör de sorumlu tutulmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanserler; başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımlarına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre sınıflandırılmaktadır. Tüm kanserlerde, anormal hücre büyümesi ve bölünmesi, hücrelerin vücudun diğer bölümlere yayılmasını ve istilasını engelleyen normal sınırlamadaki anormallikler, ortak özelliklerdir (William, Spencer ve Cummings, 2012).

Çok hücreli organizmalarda, genel ihtiyaçlar doğrultusunda, her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağkalımı düzenlenir. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepki göstermeyerek, kontrolsüz bir şekilde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürürler. Bunun sonucunda, normal doku ve organları istila edip, yayılırlar. Kanser hücrelerinde çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, çok hücreli sistemlerde biriken anomalilerin sonucunda meydana gelir (Cooper ve Hausman, 2006).

Hücrenin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan tümör, çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan, olduğu yerde kalırsa, selim tümör olarak adlandırılır. Çevredeki normal dokuya ya da vücudun diğer bölgelerine, kan veya lenfatik sistem aracılığıyla yayılan tümörler, malin olarak adlandırılır. Malin ve selim tümörler, türedikleri hücreye göre, karsinom, sarkom ve lösemi veya lenfoma olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Karsinomlar, epitel hücrelerinden kaynaklanmakta olup tümörlerin yaklaşık % 90'ını oluştururlar. Sarkomlar, bağ dokusundan (kas, kemik,



kıkırdak, fibröz doku gibi) gelişen solid tümörlerdir. Lösemi veya lenfomalar ise kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişirler (Cooper ve Hausman, 2006).

### 1.3. Akciğer Kanseri

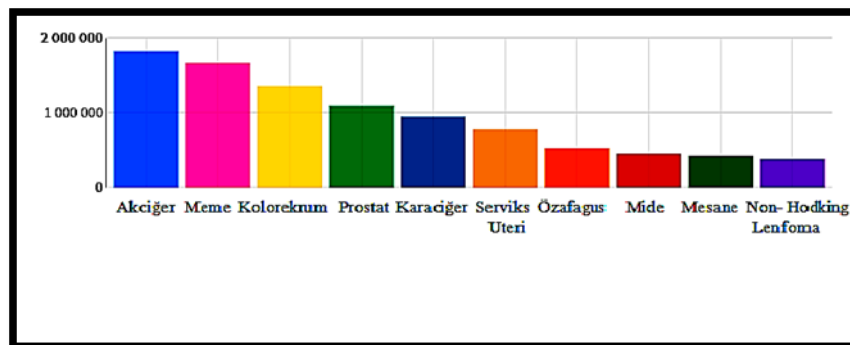
Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması sonucu oluşan hastalıktır. Akciğer kanseri, onkoloji, göğüs cerrahisi, göğüs hastalıkları, radyoloji, nükleer tıp gibi birçok anabilim dalını ilgilendiren bir hastalıktır (Serilmez, Soydiç, Çamlıca, Topuz ve Duranyıldız, 2010; Öz, Ulaşlı, Günay, Uysal, Ahsen ve Solak, 2013).

Akciğer kanseri, tüm kanserlerin % 12 ile % 16'sını oluşturmaktadır olup, 5 yıllık sağkalım süresi % 10-15'i geçmemektedir. Kansere bağlı ölümlerin % 17,8 ile % 28'i akciğer kanseri nedeniyle olmaktadır. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Derneği "Kanser Kayıt ve İnsidans Projesi" (KKİP), 1995 yılı verilerine göre, % 22,6 oranıyla akciğer kanseri Türkiye'de en sık görülen kanserdir (Günel, Gülbahar, Öztürk ve Dural, 2016).

#### 1.3.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri, en yaygın kanserlerden biridir ve dünyadaki kanser ölümlerinin önde gelen sebebidir. Erkeklerde, akciğer ve prostat kanseri en sık görülen kanserler iken, kadınlarda akciğer kanseri dördüncü sırada görülmektedir (Tablo 1.1.) (Müller, Minna ve Gazdar, 2002; Kefeli, 2015).

Tablo 1.1. 2012 yılında dünya çapında her iki cinsten kanserin görülme sıklığına ilişkin tahmini vaka sayısı (URL-3, 2008).



Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2013 yılında, 222 000'in üstünde yeni akciğer kanseri tanısı konmuştur. Bunların % 80'i KHDAK'dir. Medyan yaş 69 olarak bulunmuş olup, giderek yükseliş göstermektedir. Avrupa Birliği ülkelerinde, her yıl 381 500 yeni akciğer kanseri tanısı konduğu bildirilmekte ve bunların 341 800'ü ölüm ile sonuçlanmaktadır. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 1999 yılında akciğer kanseri insidansı, erkeklerde 7,8/ 100 000, kadınlarda 1,2/ 100 000 olarak gösterilmiştir. Ülkemizde yapılan bir araştırmada, akciğer kanseri insidansının erkeklerde % 90,5, kadınlarda % 9,5 oranında olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmada, tüm Türkiye'de yaşa göre akciğer kanseri insidans hızının, erkeklerde 74,2/ 100 000, kadınlarda ise 9,3/ 100 000 olduğu saptanmıştır. Tüm Türkiye'de, yıllık yeni olgu sayısı 29 314 olarak tahmin edilmektedir (Kefeli, 2015).

### **1.3.2. Etiyoloji**

#### **1.3.2.1. Genetik faktörler**

Bireylerin akciğer kanserine yatkınlığını; DNA hasarının onarımı, hücre siklusunun kontrolü ile ilişkili genlerdeki polimorfizmler ve karsinojen metabolizması etkileyebilmektedir (Dubey ve Powell, 2009).

Akciğer kanserli bireylerin ailelerinde, akciğer kanseri ve diğer kanser tiplerinin görülme sıklığı, önemli derecede yüksektir. Akciğer kanserli hastaların akrabalarında, akciğer kanseri riskinin 2,4 kat arttığı bildirilmiştir (Köktürk, Kırıçoğlu ve Öztürk, 2003; Özbayer vd., 2005).

Erken başlangıçlı (genç yaşta) akciğer kanserlerinde, aile öyküsünün önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, birinci derece akrabalarında akciğer kanseri aile öyküsü olan kişilerde, akciğer kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir. Riskin hiç sigara içmemiş olanlarda ve kadınlarda daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Ak vd., 2009).

Sigara dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi karsinojenler, P450 enziminin faz 1'i tarafından, DNA hasarına neden olan reaktif ara metabolitlere dönüştürülürler. Glutatyon S-transferaz enzimi, PAH'ın reaktif

metabolitlerini inaktifleştirir. Bu enzimlerde görülen bazı polimorfizmlerin, akciğer kanseri gelişme riskini artırdığı gözlenmiştir (URL-4, 2013).

Kanserleşme sürecini, kronik karsinojen maruziyeti sonucu, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların gelişmesi başlatmaktadır. Akciğer kanserinde iki dominant onkogen; akciğer adenokarsinomlarında görülen K-ras mutasyonları ve küçük hücreli karsinomlarda görülen c-Myc'dir. Ayrıca p53, retinoblastoma (Rb) mutasyonları ve kromozom 3'ün kısa kolundaki delesyonlar da, sık karşılaşılan varyasyonlardır (Ak vd., 2009; Yılmazbayhan ve Özlük, 2010).

### **1.3.2.2. Diğer faktörler**

Akciğer kanseri etiyojisinin en önemli faktörü olan sigara, vakaların yaklaşık % 85-90'ından sorumludur. Akciğer kanseri riski, sigara içenlerde içmeyenlere oranla 30 kat artmaktadır (Aydiner ve Can, 2010).

Akciğer kanseri gelişme riskini, sigaraya başlama yaşı, içme süresi, içilen sigara tipi (filtresiz, filtreli, puro, düşük katran ve nikotin içeriği vb.) ve günlük tüketilen sigara miktarı etkilemektedir. Pasif sigara içiminde risk, % 3,5 olarak karşımıza çıkmaktadır. Sigara içiminin akciğer kanseri ile direkt ilişkisi, kadınlarda % 90, erkeklerde % 79 oranında bulunmuştur. Sigaranın bırakılması, kanser riskini tamamen ortadan kaldırmamakta olup, riski azaltmaktadır. Risk, puro içenlerde üç kat, pipo kullananlarda ise sekiz kat artmaktadır. Filtreli ya da düşük katran içeren "light" sigara içenlerde, kanser riski azalmamaktadır. Gelişmiş ülkelerde sigara içimi prevalansı kadınlarda % 20-40 iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran % 2-10'dur. Erkeklerde sigara içimi prevalansı gelişmiş ülkelerde % 30-40, gelişmekte olan ülkelerde % 40-60'dır. Ülkemizde sigara içme oranı erkeklerde daha yüksek olup % 63 iken, kadınlarda bu oran % 24'tür (Akar ve Şahin, 2012).

Yapılan çalışmalarda, akciğer kanserli olgularda tümör tipiyle sigara alışkanlığı arasında, anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Sigara içenlerde skuamöz hücreli karsinom daha sık bulunurken, sigara içmeyenlerde adenokarsinom daha sık gözlenmiştir (Erbaycu, 2009).

Akciğer kanseri oluşumunda etkili çevresel faktörler arasında, radyasyon en önemlilerinden biridir. X, gama ışınları, nükleer emisyonlar, ultra viole ışınları gibi radyoaktif ışınımlar, biyolojik makromoleküllere doğrudan etki edebilecek yeterli intrinsik (quantum) enerjiye sahiptirler. Biyolojik makromoleküllerden elektron kopartabilir ya da bunları pozitif yükle yükleyebilirler ve bunun sonucunda, DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ile, nükleotid yapılarında modifikasyonlara neden olurlar (Yılmazbayhan ve Özlük, 2010; Yokuş ve Çakır, 2012).

Uranyum ve radyum, toprak ve kayalarda değişken konsantrasyonlarda ve sıklıkla bulunabilen elementlerdir. Topraktan havaya geçen doğal bir radyoaktif gaz olan radonun yoğunluğu, toprakta bulunan uranyum konsantrasyonuna bağlı değişiklik göstermektedir. Radon normal sıcaklıklarda, radyumdan bozunmayla meydana gelen inert bir gazdır ve radon bozunma parçalarının akciğere inhalasyonunun ve alfa parçacıklarının yayılımının, hücrelere ve genetik materyale zarar verebileceği bildirilmiştir. Radon gazı evlere bina çatlaklarından, zemindeki boşluklardan ve drenajdan girmektedir (Alar ve Şahin, 2012; Taştepe, 2014).

Asbest maruziyeti de, akciğer kanseri riskinin artmasına neden olmaktadır. Asbest minerali, çevresel (ak toprak ve zeolit) ve endüstriyel (gemi ve otomotiv sanayi, izolasyon) alanlarda kullanılmaktadır. Asbestosiz oluşumu için, uzun ve yoğun asbest maruziyeti gerekli olduğundan, mesleksi olmayan çevresel asbest maruziyetlerinde akciğer kanseri riski çok düşüktür. Ak toprak, ülkemizin birçok bölgesinde bulunur ve kırsal kesimde sıva ve boya amacıyla kullanılmaktadır. Zeolit Kapadokya'daki peri bacalarında bulunan mineraldir. Arsenik, klormetil eter, nikel ve bileşenleri, krom, berilyum, kadmiyum ve formaldehit diğer endüstriyel etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır (Yılmazbayhan ve Özlük, 2010; Alar ve Şahin, 2012; Taştepe, 2014).

### **1.3.3. Akciğer Kanserinin Semptomları**

Akciğer kanserinde en fazla görülen belirti, hava yolu obstrüksiyonu, enfeksiyon ve akciğer baskısına bağlı olarak meydana gelen öksürüktür. Öksürüğü, kilo kaybı izlemektedir (Alar ve Şahin, 2012).

Ağızdan kan gelmesi hastaları en çok korkutan yakınmadır. Hastaların % 60'ında, artan öksürük ve balgam sonucu nefes darlığı görülmektedir. Rekürren larengeal sinir felci, % 2-18 sıklıkta bildirilmiştir. Göğüs duvarı tutulumuna bağlı olarak hastaların % 50'ye yakını, hastalık sürecinin bir döneminde göğüs ağrısından şikayetçidir. Ağrı sıklıkla künt, sürekli, öksürük ve nefes almakla değişmeyen şekildedir. Plevra tutulumu akciğer kanserli hastaların % 8-15'inde mevcuttur (URL-4, 2013).

Ayrıca akciğer kanserinde, plevral efüzyona bağlı dispne, kemik ağrısı, çomak parmak, ses kısıklığı, yutma güçlüğü görülebilmektedir. Akciğer kanseri tanısı, çoğunlukla ileri evrede konulmaktadır. Bunun nedeni, akciğer ve bronş sisteminin ağrı duyusundan yoksun olması ve öksürüğün sigara içenlerde belirti olarak kabul edilmemesidir. Hastalar primer kansere ait şikayetle değil de, metastazlara ait şikayetlerle daha çok, sağlık kuruluşlarına başvurabilmektedirler (Alar ve Şahin, 2012).

En çok metastaz yaptığı yerler karaciğer, surrenal bezler, kemik, santral ve sinir sistemidir. Akciğer kanseri en çok, büyük bir oranla, beyin metastazlarına neden olmaktadır ve yapılan otopsi serilerinde, % 34 oranında beyin metastazı gözlenmiştir (Akşahin ve Çolak, 2011; Alar ve Şahin, 2012).

#### **1.3.4. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması**

Akciğer kanseri küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olmak üzere iki ana tipe ayrılmaktadır (Tablo 1.2.). KHDAK'nin adeno, skuamöz ve büyük hücreli olmak üzere alt tipleri mevcuttur. Tedavinin seçilmesi ve prognozun belirlenmesi için, bu ayrımların yapılması önemlidir (Alar ve Şahin, 2012).

Tablo 1.2. *Akciğer kanserinin genel sınıflandırılması* (Abraham, Allegra ve Gulley, 2009).

<b>AKCİĞER KANSERİ</b>
<b>A)Küçük Hücreli Akciğer Kanseri</b>
<b>B)Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri</b>
✓ Adenokarsinoma
✓ Skuamöz Hücreli Karsinom
✓ Büyük Hücreli Karsinom
<b>C)Diğerleri</b>
✓ Karsinod Tümörler, Pulmoner Lenfoma, Mukoepidermoid Karsinom, Adenoid Kistik Karsinoma, Sarkomlar

Tablo 1.3. *Malignant akciğer tümörlerinde histolojik sınıflandırma (DSO 2004).*

	Skvamöz Hücre Karsinomu
I	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Papiller</li> <li>2. Berrak Hücreli</li> <li>3. Küçük Hücreli</li> <li>4. Bazaloid</li> </ol>
II	Küçük Hücre Karsinomu
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kombine Küçük Hücre Karsinomu</li> </ol>
	Adenokarsinoma
III	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asiner</li> <li>2. Papiller</li> <li>3. Bronkioloalveolar Karsinoma <ul style="list-style-type: none"> <li>• Müsinöz Olmayan</li> <li>• Müsinöz</li> <li>• Müsinöz ve Müsinöz Olmayan Karışık</li> </ul> </li> <li>5. Müsinli Solid Adenokarsinoma</li> <li>6. Karışık Alt Tipli Adenokarsinoma</li> <li>7. Varyantlar <ul style="list-style-type: none"> <li>• İyi Ayrılmamış Fetal Karsinoma</li> <li>• Müsinöz (Kolloid) Karsinoma</li> <li>• Müsinöz Kistadenokarsinoma</li> <li>• Taşlı Yüzük Adenokarsinom</li> <li>• Berrak Hücreli Adenokarsinom</li> </ul> </li> </ol>
	Büyük Hücreli Karsinom
IV	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinoma <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kombine Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinoma</li> <li>• Bazaloid Karsinoma</li> <li>• Lenfo Epitelyoma Benzeri Karsinoma</li> <li>• Berrak Hücreli Karsinoma</li> <li>• Rabdoid Fenotipinde Büyük Hücreli Karsinoma</li> </ul> </li> </ol>
V	Adenoskvamöz Karsinoma
VI	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Plemorfik Karsinoma, Sarkomatoid veya Sarkomatöz Elementler <ul style="list-style-type: none"> <li>• İğ Hücreli veya Dev Hücreli Karsinom</li> <li>• İğ Hücreli veya Dev Hücreli Karsinom</li> <li>• İğ Hücreli Karsinoma</li> <li>• Pulmoner Blastom</li> </ul> </li> </ol>
	Diğer Tipler
	Karsinoid Tümör
VII	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tipik Karsinoid</li> <li>2. Atipik Karsinoid</li> </ol>
	Tükrük Bezi Tipindeki Karsinoma
VIII	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mukoepidemoid Karsinoma</li> <li>2. Adenoid Kistik Karsinoma</li> <li>3. Diğer Tipler</li> </ol>
IX	Sınıflandırılmamış Karsinoma

#### **1.3.4.1. Küçük hücreli akciğer kanseri**

Küçük hücreli akciğer kanseri, tüm akciğer tümörlerinin yaklaşık % 15'ini oluşturmaktadır. Bu % 15'lik grubun, yaklaşık olarak 1/3'ü sınırlı evrededir. Küçük hücreli akciğer kanseri, daha hızlı tümör ikilenme zamanına sahip olması ve buna bağlı uzak metastazların erken gelişimi, kemoterapi ve radyoterapiye dramatik yanıt vermesi gibi özellikleriyle, küçük hücreli dışı akciğer kanserinden ayrılmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanserinde prognoz, yıllar içinde daha etkili tedaviler geliştirilmesine rağmen, halen kötüdür. Hastalık agresiftir ve sınırlı evre KHAK için, beş yıllık sağkalım oranları yaklaşık % 25'tir (Yıldırım vd., 2015).

Küçük hücreli akciğer kanserinin en çarpıcı özelliği, hızlı tümöral büyüme ve erken metastaz yapmasıdır. Küçük hücreli akciğer kanserleri, sıklıkla santrale yerleşirler, ileri derecede mediastinal invazyon yaparlar ve erken dönemde, paraneoplastik sendromun da dahil olduğu ekstratorasik metastazlarla karakterizedirler (Aydiner ve Can, 2010; Alar ve Şahin, 2012).

Küçük hücreli akciğer kanseri, daima sigara içenlerde görülmektedir ve son yıllarda kadınlardaki yüzdesi artış göstermiştir. Küçük hücreli akciğer kanseri, kemoterapi ve radyoterapiye karşı duyarlı olmasına rağmen, bu tür akciğer kanseri 1-2 yıl içerisinde tedaviye dirençli hale gelebilmektedir (Aydiner ve Can, 2010).

#### **1.3.4.2. Küçük hücre dışı akciğer kanseri**

Akciğer kanserlerinin % 80'ini oluşturan, küçük hücreli dışı akciğer karsinoması, akciğer kanserinin en sık görülen türüdür. En yaygın KHDAK türleri, büyük hücreli karsinoma, adenokarsinoma ve skuamöz hücreli karsinomadır. KHDAK'nın karsinogenezi; hücre büyümesi, farklılaşması, göçü, istilas ve apoptozda görevli gen mutasyonları birikiminin neden olduğu, çok basamaklı bir işlemdir (Zhou vd., 2015).

KHDAK, başlangıç tedavisindeki radyoterapiye ya da kemoterapiye az duyarlıdır. İlerlemesi ve metastazı anjiyogenez ile yakından ilişkilidir. Erken evre KHDAK



tedavisinde, ilerleme kaydedilmesine rağmen, ileri evre KHDAK'nın sağkalım oranı çok düşük seyretmektedir (Chen, Jiao, Jia ve Li, 2015; Qian vd., 2016).

Ulusal Kanser Enstitüsü'nden alınan verilere göre, olguların % 55'inde ileri bir aşamada teşhis konulmakta ve akciğer kanseri hastalarının yarısından çoğu tanıdan sonra bir yıl içinde ölmektedir. Buna ek olarak, 5 yıllık sağkalım oranları Evre 1A'da % 67, Evre 2B'de % 39 olarak bildirilmiştir ve ameliyat edilemeyen ileri evrede olan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranları % 3,3'e ulaşamamaktadır. KHDAK'da erken tanı için minimal invaziv bir belirteç bulunması, böylece hastalığın prognozunun iyileştirilmesi gerekmektedir (Hou, Meng, Chan, Cho ve Wong, 2016).

#### **1.3.4.2.1. Adenokarsinoma**

Skvamöz hücreli karsinom, KHDAK'ları arasında en sık görülen tip iken, adenokarsinom son zamanlarda hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen, KHDAK alt tipi olmuştur. Adenokarsinom, bütün akciğer kanserlerinin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (Travis, vd., 2011; URL-4, 2013).

Akciğer kanserli hastalar arasında adenokarsinomlu hasta sayısının yıllar içinde giderek artması, bu hasta grubu üzerinde çalışmaları artırmıştır. Adenokarsinomlar, erken metastaz yapmalarının yanısıra, genellikle altta yatan bir akciğer hastalığına bağlı gelişirler (Ak, vd., 2009; Alar ve Şahin, 2012).

Erken evre akciğer adenokarsinomları, çoğunlukla asemptomatiktir ve sıklıkla teşhisi, daha sonraki bir klinik aşamada konulur. Bu durum cerrahi rezeksiyonun, iyileştirici bir strateji olmasını imkansız hale getirmektedir (Tai, vd., 2016).

Akciğer adenokarsinomunun, geç evre tespiti ve geç evre tedavilerin yetersizliği nedeniyle, ortalama 5 yıllık sağkalım oranının % 15 olduğu bildirilmiştir. Sigara kullanımı, tartışmasız bir şekilde akciğer kanserinin önde gelen sebebi olmasına rağmen, akciğer adenokarsinomunda hastaların yaklaşık % 10'unun hiç sigara içmemiş olduğu bildirilmiştir. Akciğer adenokarsinomları, sıklıkla 40 yaş altındaki, sigara içmeyen kadınlarda görülür (Ding, vd., 2008; Küçük, Küçük ve Sunay, 2014).

Sigara kullanmayan kişilerde görülen en sık karsinom tipi olması, sigara kullanımı dışındaki, ailesel hikaye, genetik faktörler, mesleki-çevresel karsinojen maruziyeti ve pasif içiciliği gibi faktörleri gündeme getirmektedir (Memiş, 1996; Özkan ve Er, 2003).

Akciğer adenokarsinomunun en çarpıcı özelliği, akciğer skarı zemininde gelişimidir. Genellikle akciğer periferine yerleşmesinin nedeni, bronşiyal veya alveol epitelyumundan köken almasıdır. Adenokarsinom, vakaların % 75'inde akciğer periferinde soliter nodül şeklinde gözlenir ve çoğunlukla üst loblarda ve subplevral parankimde yerleşmektedir. Erken evrede santral sinir sistemi ve adrenal beze metastaz yapabilir. Adenokarsinomların yaklaşık olarak yarısı, akciğerde bül komşuluğunda gelişip, bül içerisindeymiş gibi görünmektedir (Kara ve Öztürk, 2012).

#### **1.3.4.2.2. Skuamöz hücreli karsinom**

Daha önceden en yaygın histolojik tip olduğu bildirilen skuamöz hücreli karsinom, yerini adenokarsinoma bırakmıştır. Skuamöz hücreli karsinoma, KHDAK olgularının %30'unu oluşturmaktadır. Skuamöz hücreli kanser, kadınlara oranla erkeklerde daha fazla görülmektedir. Sigarayla ilişkisi, yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak % 90 olarak gösterilmiştir (Yılmazbayhan ve Özlük, 2010; Krimsky vd., 2016).

Akciğerin skuamöz hücreli karsinomları, diğer karsinom tipleri ile kıyaslandığında, toraksa sınırlı kalma eğilimindedir. Uzak organ metastazları, diğer karsinom türlerine göre daha azdır (Canpolat, Cemil, Eskioğlu ve Han, 2009).

En genel ölüm nedeni, lokal tekrarlar ve uzak metastazlardır. Sıklıkla santral yerleşme göstermesine rağmen, periferalde de yerleşme gözlenmektedir. Evre, histolojik alt tip ve diferansiyasyon derecesi, prognozu belirlemede önemlidir (Ermiş, Haltaş, Yıldırım ve Edalı, 2004; Kaynak vd., 2007; Yılmazbayhan ve Özlük, 2010).

### **1.3.2.2.3. Büyük hücreli karsinom**

Büyük hücreli karsinom, akciğer kanserlerinin yaklaşık % 5'ten daha az kısmında görülür. Sigara kullanımı ile yakın ilişkilidir ve erken metastaz yapma eğilimi gösterir. Olguların % 60'ından fazlasında tanı konulduğunda, tümör 3 cm'den büyüktür ve iç kısmında nekrotik alanlar görülebilmektedir. Tümörün radyolojik görünümü, histopatolojik yapısı ve prognozu, adenokarsinoma benzemesine rağmen; hücrelerin büyük boyutlu olması bakımından, adenokarsinomdan ayrılmaktadır (Kara ve Öztürk, 2012).

Tümör, büyük hücrelerden meydana gelmekte ve tümör hücreleri; belirgin çekirdekçik, iri çekirdek ve orta derecede sitoplazma içermektedir. Genellikle periferalde yerleşmesine rağmen santral yerleşimli de olabilmektedir (Yılmazbayhan ve Özlük, 2010).

### **1.3.5. Akciğer Kanserin Evrelemesi**

Tümör sınıflandırmasındaki amaç, hastalığın anatomik yaygınlığını doğru şekilde ortaya koymaktır. Akciğer kanserinin tümör, nod ve metastaz (TNM) sınıflamasının yedinci versiyonu 2009'da yayınlanmış ve 2010'da yürürlüğe girmiştir. Yeni revizyon, Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği (IASLC) tarafından oluşturulmuş ve 19 ülkenin katılımıyla analiz edilmiştir. Bu analizde, T, N ve M faktörleri ile sağkalımlar arasındaki ilişki incelenmiş ve evrelemedeki değişiklikler, bu bağıntılara göre yapılmıştır. Sekizinci TNM Sınıflaması, Türkiye'de Ocak 2017'de kullanılmaya başlanmıştır (Tablo 1.4.) (Turna, vd., 2017).

Tablo 1.4. *Akciğer kanseri TNM evrelemesi* (Çok, 2018).

<b>Primer tümör (T)</b>	
<b>Tx</b>	Tümörün değerlendirilemediği veya malign hücrelerin balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile belirlenemediği durumlar
<b>T0</b>	Primer tümör belirtisi yok
<b>Tis</b>	Karsinoma in situ
<b>T1</b>	Normal akciğer veya viseral plevra ile çevrili, en geniş çapı $\leq 3$ cm tümör
<b>T1mi</b>	Minimal invaziv adenokarsinom
<b>T1a</b>	Tümörün en geniş çapı $\leq 1$ cm
<b>T1b</b>	Tümörün en geniş çapı $>1$ cm, $\leq 2$ cm
<b>T1c</b>	Tümörün en geniş çapı $>2$ cm, $\leq 3$ cm
<b>T2</b>	Tümörün en geniş çapı $>3$ cm, $\leq 5$ cm veya şu özelliklere sahip tümör - Karinaya uzaklığına veya invazyonuna bakılmaksızın ana bronş invazyonu - Viseral plevra invazyonu - Hiler bölgeye uzanan atelektazi (lobar veya total) veya obstrüktif pnömoni
<b>T2a</b>	Tümörün en geniş çapı $>3$ cm, $\leq 4$ cm
<b>T2b</b>	Tümörün en geniş çapı $>4$ cm, $\leq 5$ cm
<b>T3</b>	Tümörün en geniş çapı $>5$ cm, $\leq 7$ cm veya aynı lobda tümör nodülü(leri) olması veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon: - Göğüs duvarı invazyonu (parietal plevra ve superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikard
<b>T4</b>	Tümörün geniş çapı $>7$ cm veya ipsilateral farklı bir lobda tümör nodülü(leri) olması veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon: - Diyafram, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra korpusu ve karina -Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül/nodüller
<b>Bölgesel lenf nodları(N)</b>	
<b>Nx</b>	Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi
<b>N0</b>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
<b>N1</b>	İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf nodlarına ve/veya intrapulmoner lenf nodlarına metastaz veya direkt invazyon
<b>N2</b>	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarına metastaz
<b>N3</b>	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklavikular lenf nodlarına metastaz
<b>Uzak metastaz (M)</b>	
<b>M0</b>	Metastaz yok
<b>M1</b>	Metastaz var
<b>M1a</b>	Karşı taraf akciğerde ayrı tümör nodülü(leri), plevral veya perikardiyal nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon
<b>M1b</b>	Tek ekstratorasik organda, tek metastaz
<b>M1c</b>	Tek veya birçok organda birden çok metastaz

Tablo 1.5. Akciğer kanserinin TNM'ye göre evre grupları (Çok, 2018).

<b>EVRE</b>		<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Gizli (Occult karsinom)</b>		TO	NO	MO
<b>Evre 0</b>		Tis	NO	MO
<b>EVRE 1</b>	IA1	T1mi	NO	MO
		T1a	NO	MO
	IA2	T1b	NO	MO
<b>EVRE 1</b>	IA3	T1c	NO	MO
	IB	T2a	NO	MO
<b>EVRE 2</b>	IIA	T2b	NO	MO
		T1a	N1	MO
		T1b	N1	MO
		T1c	N1	MO
		T2a	N1	MO
	IIB	T2b	N1	MO
		T3	N1	MO
		T1a	N2	MO
		T1b	N2	MO
		T1c	N2	MO
<b>EVRE 3</b>	IIIA	T2a	N2	MO
		T2b	N2	MO
		T3	N1	MO
	IIIB	T4	NO	MO
		T4	N1	MO
		T1a	N3	MO
		T1b	N3	MO
<b>EVRE 3</b>	IIIB	T1c	N3	MO
		T2a	N3	MO
		T2b	N3	MO
	IIIC	T3	N2	MO
		T4	N2	MO
<b>EVRE 4</b>	IIIC	T3	N3	MO
		T4	N3	MO
		Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
<b>EVRE 4</b>	IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b
	IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

#### 1.4. Epigenetik Mekanizmalar

Conrad Hal Waddington tarafından 1940'lı yılların başında ortaya atılan 'Epigenetik' terimi, fenotipin ortaya çıkmasını sağlayan genlerle, bunların ürünleri arasındaki etkileşim olarak ifade edilmiştir (Yaykaşlı, Hatipoğlu, Kaya ve Yaykaşlı, 2012).

Epigenetik, gen diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın, gelişme ve hücre çoğalması sırasında gerçekleşen gen ekspresyon potansiyelinde kararlı bir değişiklik olarak tanımlanabilir. DNA diziliminde değişiklik yapmadan, gen ifade seviyesini düzenlemesi bakımından, DNA diziliminde değişikliklere (mutasyon) sebep olan genotoksik mekanizmalardan ayrılır. Birey, kendi epigenetik profilini değiştirebilmekte ve oluşturduğu epigenetik profili bir sonraki nesile aktarabilmektedir (Das ve Singal, 2004; Yaykaşlı vd., 2012).

Epigenetik, hızla gelişen bir araştırma alanı olmuştur. Son yıllardaki araştırmalar, epigenetiğin kanser biyolojisinde, viral enfeksiyonlarda, DNA'daki mobil elementlerin aktivitesinde, somatik gen terapisinde, klonlamada, transgenik teknolojilerde, genomik imprintingde, gelişim anormalliklerinde, zihinsel sağlıkta ve X inaktivasyonunda önemli olduğunu göstermiştir (Das ve Singal, 2004).

Epigenetik mekanizmalar, normal gelişim ve doku spesifik ekspresyonda yer alırlar. Kanser, genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi ile uzun zamanda oluşur. Kanserde epigenetik düzenlenmenin bozulmasıyla birlikte, genlerin fonksiyonunda değişme ve neoplastik oluşum meydana gelir. Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kodlamayan RNA'lar olmak üzere 3 farklı gruba ayrılırlar (Gürel, Nursal ve Yiğit, 2016).

Bu üç mekanizma, transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan proteinlerin aktivitelerini; DNA ve kromatinde meydana gelen modifikasyonları düzenlemektedir. Kromatinler DNA ve DNA-protein komplekslerinden oluşmaktadır ve gen ifadesinin kontrolü, kromatinin yapısındaki değişikliklerle sağlanmaktadır. Kromatin sıkılaşmış ve yoğunlaştığında (heterokromatin) genler inaktif (sessiz) durumdayken, kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (ökromatin) ise genler aktif

durumdadır. Kromatinin yapısındaki denge, DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanmaktadır. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları enzimatik reaksiyonlardır. Bu mekanizmalar geri dönüşümlüdür (Güngör ve Ünal, 2015; Yüce ve Ersoy, 2016).

#### **1.4.1. DNA Metilasyonu**

Ökoryotik genomlar düzenli şekilde metillenmemiştir. Genomun geri kalanının aksine, 0,5 ile 5 kb arasında değişen ve yaklaşık olarak her 100 kb'de bir yer alan, CpG adaları olarak adlandırılan DNA'nın daha küçük bölgelerinin, belirgin özellikleri vardır. CpG adaları, GC açısından zengindir. Normal hücrelerde, tekrar dizilerindeki CpG dinükleotidleri metile durumdayken, genlerin % 50'sinin promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıkları demetiledir. CpG adaları, hem housekeeping genler, hem de doku spesifik ifade kalıplarına sahip genler üzerinde bulunmaktadır (Singal ve Ginder, 1999; Sayın, 2008).

DNA metilasyonu, sitozin halkasının karbon 5 pozisyonuna, bir metil (CH<sub>3</sub>) grubunun eklenmesiyle sonuçlanan, kovalent kimyasal modifikasyondur. Çoğu sitozin metilasyonu, 5' CG 3' dizisi bağlamında (CpG dinükleotidi olarak da isimlendirilir) meydana gelmesine rağmen, bazıları CpA ve CpT dinükleotitlerinde oluşmaktadır (Das ve Singal, 2004).

Metillenmiş sitozinler, DNA'nın diğer bazlarına göre, endojen ve eksojen mutajenik süreçler tarafından modifikasyona uğratılmaya daha duyarlıdır. CpG bölgelerindeki mutasyon hızlarının, diğer transisyonel mutasyonlara göre yaklaşık 40 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Bilinen tüm somatik ve germline mutasyonların yaklaşık üçte biri, CpG dinükleotidlerindeki C'nin yerine T'in geçişiyledir; fakat tümör türüne göre mutasyonlarda farklılıklar gözlenmektedir (Jovanovic, Ronneberg, Tost ve Kristensena, 2010).

DNA metilasyonu, DNA metil transferazlar (DNMT) olarak bilinen bir grup enzimle sağlanır ve bugüne kadar tanımlanan üç tane DNMT vardır. Bunlar; DNMT1, DNMT2, DNMT3'tür. DNA metilasyonu iki farklı şekilde oluşur (de novo metilasyon ve sürdürme metilasyonu) ve her iki metilasyon süreci de farklı

DNMT'lerce gerçekleştirilir. De novo metilasyon, erken embriyo gelişimi sırasında metilasyon paternini kurmaktadır. DNMT3a ve DNMT3b, de novo metilasyon için başlıca metil transferazlardır. Sürdürme metilasyonu, DNA replikasyonu sırasında, metillenmiş atasal zincirdeki metilasyon paternini yeni sentezlenen zincire kopyalar ve kurulan metilasyon modelini korumak için organizmanın yaşamı boyunca çalışır. DNMT1, sürdürme metilasyonu için ana metil transferazdır (Das ve Singal, 2004; Lafon-Hughes vd., 2008).

DNMT1, memelilerde sürdürme metilasyonunda, başlıca metil transferaz olarak kabul edilen bir enzimdir. DNMT1, in vitro hemimetilatlanmış DNA için tercih göstermektedir. Bu enzim hemimetil hale getirilmiş DNA üzerinde, metil olmayan substrata oranla 7-20 kat daha aktiftir. DNMT1, X kromozomunun inaktive edilmesi ve memeli embriyolarında genomik imprinting için gereklidir. DNMT1, birkaç izoforma sahiptir. Bunlar; somatik DNMT1, bir splice varyant (DNMT1b) ve bir oosite spesifik izoformdur (DNMT1o). Rekombinant DNMT2'de hiçbir metil transferaz aktivitesi tespit edilememiştir. DNMT2 "esrarengiz metiltransferaz" olarak isimlendirilmiştir. DNA metil transferazların DNMT3 ailesi, hemimetilatlanmış ve metilleştirilmemiş CpG'yi, aynı oranda metilatlandırabilir. Bilinen üç üyesi vardır: DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L. DNMT3a ve DNMT3b, yapısal heterokromatin replikasyonu sırasında, geç S fazında oluşan replikasyon çatalıyla ilişkilidir. DNMT3L, maternal genomik imprinting oluşturulması için gerekli olduğundan, gametogenez sırasında ifade edilmektedir (Hughes, Tomasa, Acuna ve Lopez, 2008).

DNA metilasyonu ve kanser ilişkisi ilk kez 1983 yılında yapılan bir araştırmada, kanser hücre genomlarının, normal hücrelere göre hipometile olduğunun gözlenmesiyle bulunmuştur (Güler ve Peynircioğlu, 2016).

CpG adacıklarında metilasyon az ise (hipometile) gen aktif yani açık, metilasyon çok ise (hipermetile) gen sessiz, yani kapalıdır. Kanserde genomik hipermetilasyon, gen bölgelerindeki CpG adalarında çok sık görülürken, heterokromatik DNA tekrarları, dağınık retro transpozonlar ve endojen retroviral elemanlar da dahil olmak üzere, kanserde hem çok hem de orta derecede tekrarlanan DNA sekanslarında, çok sık hipometilasyon görülmektedir (Ehrlich, 2002; Özbayer vd., 2005).



Tüm epigenetik modifikasyonlar arasından, gen sessizleştirmesine yol açan tümör süpresör genlerin promotör bölgelerinin transkripsiyonunu baskı altına alan hipermetilasyon, kapsamlı olarak çalışılmıştır. Promotör DNA hipermetilasyonu, promotör bölgelerde bulunan CpG adalarının hipermetile olması durumudur. Bir genin promotör bölgesindeki artmış metilasyon, ekspresyonun azalmasına yol açmaktadır (Das ve Singal, 2004; İzmirli, 2013).

DNA metilasyonu yoluyla transkripsiyonel baskıyı açıklamak için, çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Sıklıkla gerçekleşen mekanizmalardan biri, spesifik transkripsiyon faktörlerinin, kendi promoterlerindeki tanıma bölgelerine bağlanmaları ile direkt müdahaledir. AP-2, c-myc/Myn, siklik AMP-bağımlı aktivatör, CREB, E2F ve NFkB de dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü, CpG kalıntılarını kapsayan dizileri tanır ve bu transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasının metilasyon tarafından engellendiği gösterilmiştir (Singal ve Ginder, 1999).

Spesifik transkripsiyon baskılayıcılarının metillenmiş DNA'ya direkt bağlanması, sıklıkla gerçekleşen diğer bir mekanizmadır. DNA metilasyon sinyalleri, metil-CpG-bağlayıcı proteinler tarafından analiz edilir, bu proteinlerin hedefi 5' metillenmiş CpG dizisidir. Memelilerde beş tane bilinen metil-CpG bağlama proteini bulunmaktadır. Bunlar; MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 ve Kaiso'dur. MeCP1, MBD1, MBD2 ve MBD4, metil CpG bağlanma alanı (MBD) vasıtasıyla 5mCpG'ye bağlanır; ancak Kaiso, MBD vasıtasıyla bağlanmaz. MBD4, DNA tamiri ile ilişkili iken, MBD1, MBD2, MeCP2 ve Kaiso'nun, histon deasetilaz kompleksleri ile etkileşerek hem in vitro hem de in vivo (hücre kültürü) çalışmalarda, proliferasyonu baskıladığı bulunmuştur (Prokhortchouk ve Hendrich, 2002).

Literatürde kanser alanında hipermetilasyon çalışmaları, kanserdeki hipometilasyon çalışmalarından fazladır. CpG adalarının aşırı metilasyonunu önleyen, birkaç koruyucu mekanizma vardır. Bunlar; aktif transkripsiyon, aktif demetilasyon, replikasyon zamanlaması ve DNA metil transferaza erişimi engelleyen lokal kromatin yapısıdır. Bugüne kadar kanserde pek çok genin hipermetilasyona uğradığı bulunmuştur ve son zamanlarda yapılan çalışmalarda, insan karsinogenezinde DNA hipermetilasyonunun kritik rolü üzerinde yoğunlaşmıştır (Ehrlich, 2002; Das ve Singal, 2004).

Global hipometilasyon 1980'lerde keşfedilmiştir ve bu durum, tüm genomda 5-metilsitozin içeriğinin azalması olarak bilinmektedir. Tüm genom hipometilasyonu başlıca genomun % 40'ından fazlasını oluşturan, oldukça metile olan tekrarlayan dizilerde meydana gelir ve hemen hemen tüm kanserlerde gözlenmektedir. Global hipometilasyon, genomik instabilitenin indüklenmesi ve hücre transformasyonuna katkıda bulunmaktadır (Kulis ve Esteller, 2010; Gürel vd., 2016).

Genom çapında hipometilasyonun, çeşitli kanserlerde sıklıkla meydana geldiği görülmektedir. DNA hipometilasyonu, insan karsinogenezinde erken bir olaydır ve hepatosellüler karsinom, meme kanseri, akciğer kanseri, nazofaringeal kanser, düz kas sarkomu ve nöroendokrin tümör bulunan hastaların plazma DNA'larında hipometilasyon gösterilmiştir (Chan vd., 2013).

Erken teşhis birçok kanser tipinin başarılı şekilde tedavisi için önemlidir. Geleneksel teşhis yöntemleri (sitoloji, histopatoloji, immünohistokimya, seroloji vb.) yararlıdır; ancak moleküler belirteçler, tümörleri daha alt sınıflara ayırabilmektedir. Metilasyon profilinin, tümör tiplerini ve alt tiplerini, belki de kemoterapötik ajanların yanıtlarını ve hayatta kalma süresini tahmin ve ayırt etmede kullanılabileceği bildirilmiştir. Metilasyon değişiklikleri genellikle, belirgin malign değişikliklerin öncesinde görülür ve bu nedenle kanserin erken teşhisinde yararlanılabilir. Dahası, birçok durumda, kanser hücrelerinin metilasyon durumunun hassas olarak tespiti plazmadan yapılabilmektedir (Laird, 2003).

Akciğer karsinomlarında tümör baskılayıcı genlerin anormal promotör metilasyonu ile epigenetik inaktivasyonu, sıklıkla görülür ve bu durum, tümör türünün patogenezi için önemlidir. Anormal metilasyonun, akciğer kanseri risk değerlendirmesi ve kemoprezervasyon çalışmalarının izlenmesi için ideal bir biyobelirteç olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, anormal metilasyonun akciğer kanserinde, kansere bağlı genlerin inaktive edilmesinde yaygın bir mekanizma olabileceğini ortaya koymaktadır (Müller, Minna ve Gazdar, 2002).

Akciğer tümörlerinde, SCGB3A1, ID4 ve CCND2 en sık metilasyona uğrayan genler olarak tespit edilmiştir. Yanagawa vd., yaptıkları çalışmada, akciğer kanserinde DAPK, FHIT, H-cadherin, MGMT, p14, p16, RAR-beta, RASSF1A, RUNX3, TIMP-3 genlerinde hipermetilasyon göstermiştir (Castro vd., 2010; Lu ve Zhang, 2011; Yüce ve Ersoy, 2016).

Akciğer kanserinde, özellikle KHDAK sınıfında, P16, RASSF1A, DAPK, MGMT, CDH13, CDH1, Adenomatöz Polipozis Coli (APC), p15<sup>INK4b</sup>, Rb, p14, hMLH1, GSTP1, Glutathion S-transferase P1, CDH1, TMS1 RARb 'nin de aralarında bulunduğu yüzlerce genin, promotör bölgesindeki CPG adalarında yoğun metilasyon gösterdiği tespit edilmiştir. KHDAK sınıfında metilasyona uğrayan bazı genlerin, metilasyon oranları; RARb % 40-43, p16 % 25-41, DAPK % 16-44, MGMT % 16-27 ve RASSF1A % 30-40 olarak bildirilmiştir. Zhang vd., normal dokularla, KHDAK'li dokuları karşılaştırdıklarında, dokuz genin (APC, CDH13, KLK10, DLEC1, RASSF1A, EFEMP1, SFRP1, RARy, p16 (INK4A)) anlamlı derecede daha yüksek metilasyona uğradığını (p=0,001), çalışılan diğer on bir genin ise (RUNX3, hMLH1, DAPK, BRCA1, p14 (ARF), MGMT, NORE1A, FHIT, CMTM3, LSAMP ve OPCML) nispeten düşük duyarlılık veya özgüllük gösterdiğini bulmuşlardır (Zhang vd., 2011; Lu ve Zhang, 2011; Uludağ vd., 2013).

Uludağ vd. (2013), KHDAK tanısı almış 100 olguda, akciğer kanserli tümöral ve çevre akciğer dokularında, birbirlerine yakın oranlarda olmak üzere, en sık CDKN2B, BRCA1, CDH13 ve HIC1 genlerinde metilasyon tespit etmişlerdir. Ayrıca tümöral ve çevre dokularda, PTEN, TIMP3, ATM, VHL, CD44, CDKN1B, RASSF1, IGSF4 ve ESR1 genlerinde de metilasyon gözlemişlerdir. APC, CDKN2A, MLH1, RARB, CHFR ve GSTP1 genlerinde farklı oranlarda, tümöral dokularda metilasyon tespit ederken, çevre akciğer dokularında metilasyon gözlememişlerdir (Uludağ vd., 2013).

Adenokarsinoma ve skuamöz hücreli kanser karşılaştırıldığında; adenokarsinomlarda; RARB, TWIST1 ve CACNA1A en sık metilasyona uğrayan genler olarak tespit edilmiş, skuamöz hücreli karsinomlarda ise en sık metilasyona uğrayan genler SCGB3A1, ID4, SFRP4, SFRP5, DCL1, BNIP3, H2AFX, CACNA1G, TGIF, TIMP3 ve BCL2 olarak belirlenmiştir. Castro vd. (2010), ID4, BNIP3, H2AFX, CACNA1G, TGIF'in, skuamöz tümörlerde daha sık metile olduğunu, HTLF ve CACNA1A'nın ise adenokarsinomlarda daha sık metile olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca SCGB3A1, DLC1 ve SFRP4 metilasyonunu, erken farklılaşma ve evre ile ilişkili, erken olaylar olarak tanımlamışlar, HTLF, SFRP5 ve TIMP3'ün metilasyonunun ise genel sağkalım ile anlamlı olarak ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Birkaç anahtar genin DNA metilasyon değişiklikleri ve akciğer kanserindeki rolleri Tablo 1.6.'da gösterilmiştir (Castro vd., 2010; Lu ve Zhang, 2011; Uludağ vd., 2013).

Tablo 1.6. Birkaç anahtar genin DNA metilasyon değişiklikleri ve akciğer kanserindeki rolleri (Lu ve Zhang, 2011).

Metilasyon Değişiklikleri	Gen	Fonksiyon	Hücre Tipi	Referans
Hipermetilasyon	<i>P16</i>	Hücre siklusu kontrolü	KHDAK	Belinsky (1998), Belinsky (2002)
	<i>RASSF1A</i>	Ras sinyali	NSCLC, SCLC	Damman (2001), Honorio (2001), Dammann (2005)
	<i>APC</i>	Hücre çoğalması, hücre göçü ve adhezyonun düzenlenmesi	NSCLC, SCLC	Brabender (2001)
	<i>RB</i>	Hücre siklusu kontrolü	NSCLC, SCLC	Ohtani - Fujita (1993), Joseph (2004)
	<i>TGFBR2</i>	Epitelyal hücre büyümesinin inhibisyonu	KHDAK	Zhang (2004)
	<i>DAPK</i>	Proapoptotik	NSCLC, SCLC	Zochbauer - Muller (2001)
	<i>MGMT</i>	DNA onarımı	KHDAK	Belinsky (2005)
	<i>CDH13</i>	Hücre adhezyonunun düzenlenmesi	KHDAK	Toyooka (2001)
	<i>CDH1</i>	Hücre siklusu regülasyonu	NSCLC, SCLC	Toyooka (2001)
	<i>RARp</i>	Hücre farklılaşması ve çoğalmasının düzenlenmesi	NSCLC, SCLC	Virmani (2000)
	<i>FHIT</i>	Proapoptotik	KHDAK	Zochbauer - Muller (2001)
	<i>GSTP1</i>	Detoksifikasyon	KHDAK	Zochbauer - Muller (2001)
	<i>SEMA3B</i>	Hücre hareketliliğinin ve hücre adhezyonunun düzenlenmesi	KHDAK	Kuroki (2003)
	<i>hOGG1</i>	DNA onarımı	KHDAK	Liu (2008)
<i>BLU</i>	Hücre siklusu regülasyonu	KHDAK	Liu (2008)	
Hipometilasyon	<i>MAGE</i>	Bilinmeyen	KHDAK	Jang (2001)
	<i>SNCG</i>	Bilinmeyen	Akciğer kanseri	Liu (2005)

### 1.4.2. Histon Modifikasyonları

Histonlar, ökaryotik kromatinde, DNA paketlenmesinin ilk aşamasında görev alırlar. Histon proteinleri, yüksek oranda artı yüklü aminoasit (lizin ve arjinin) içerirler ve bu aminoasitler eksi yüklü DNA'ya sıkı bir şekilde bağlanırlar. Histonlar, DNA'dan sadece DNA replikasyonu sırasında geçici olarak ayrılırlar. Transkripsiyon sırasında DNA ile birlikte dirler (Can ve Aslan, 2016).

Hücre, yaşamı boyunca dinamik olarak, nükleozomlarda bulunan histon proteinlerinin amino uçlarından, asetilasyon/deasetilasyona maruz kalır. Histon asetilasyonu; gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde direkt rol oynamaktadır ve histon proteinlerinin belirli bazı aminoasitlerine asetil gruplarının (-COCH<sub>3</sub>) bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Deasetilasyon ise, asetil gruplarının uzaklaştırılmasıdır. Histon asetilasyonu dinamik bir işlemdir. Histon ve histon olmayan proteinlerin asetilasyonu ve deasetilasyonu, sırasıyla histon asetiltransferaz (HAT) ve histone deasetiltransferaz (HDAC) enzimleri tarafından katalizlenir. Genel olarak HAT enzimleri, A ve B olmak üzere iki sınıftan meydana gelmektedir ve tip-A HAT'lar çekirdekte, tip-B HAT'lar ise stoplazmada yer almaktadır (Yaykaşlı vd., 2012; Can ve Aslan, 2016; Gürel vd., 2016).

Gen ekspresyon değişimini, histon modifikasyonları, kromatin yapısını etkileyerek yapmaktadır. Asetilasyonlar, gen ifade seviyesini, sinyal iletişim yolları yardımıyla düzenlemektedir. Histon proteininin lizin aminoasitinden asetillenmesi, histon kuyruğundaki pozitif yükü nötralize ederek, kromatin yapısının gevşemesine neden olur ve bu gevşek kromatin yapısı, transkripsiyon faktörlerinin, hedef gene ulaşmasına yardımcı olur. Böylelikle asetilasyon, gen transkripsiyonuna kolaylık sağlamış olmaktadır. Bunun tam tersi olarak deasetilasyon ise, kromatin yapısını sıkılaştırarak transkripsiyonu zorlaştırır (Yaykaşlı vd., 2012).

### 1.4.3. Kodlamayan RNA'lar

Genom sekanslama çalışmalarında, toplam RNA molekülünün yaklaşık olarak % 1,5'lük kısmını, protein kodlamadan sorumlu genomun oluşturduğu, çok büyük bir kısmını ise non-coding RNA (ncRNA; protein kodlamayan RNA) olarak

adlandırılan, kodlanmayan düzenleyici elemanların oluşturduğu bildirilmiştir (Karaaslan ve Serin, 2016).

Posttranskripsiyonel (transkripsiyon sonrası) gen susturma olarak da adlandırılan RNA interferans, spesifik mRNA molekülünün yıkımına neden olarak, gen ekspresyonunu inhibe eder. Gen ifadesinin susturulmasını sağlayan RNAi yolları, small interfering RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA), ribozim ve antisens oligonükleotitler adı verilen küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan RNA ve DNA parçacıklarının aracılığıyla meydana gelmektedir. Gelişimsel süreçlerden, hücresel cevaba, biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinden, hücresel savunmaya kadar pek çok olayda, ncRNA'lar işlevde sahiptirler. Kodlamayan RNA'larda oluşan değişimlerle meydana gelen hastalıklar arasında, kanserler de yer almaktadır (Akkaya ve Dinçer, 2013; Ecevit, Motor ve İzmirli, 2013).

1998 yılında bir nematod olan *C.elegans* ile yapılan bir çalışmada, kodlanmayan RNA'ların gen ifadesini susturmada rol aldığı ortaya konmuştur. RNAi konusunda yapılan çalışmalar, 1995 yılından günümüze kadar, oldukça gelişme göstermiştir. RNAi mekanizmasının düzenlenmesi, miRNA'lar ve siRNA'lar tarafından sağlanmaktadır (Güzelgöl ve Aksoy, 2009; Görür ve Tamer, 2011).

ncRNA'lar genel olarak uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır. Nükleotit sayısı 200'den daha uzun olan ncRNA'lar uzun kodlanmayan RNA (long non-coding RNAs-lncRNAs) olarak, 200 nükleotitten daha kısa olanlar ise küçük kodlanmayan RNA olarak tanımlanmaktadır. Bazı ncRNA'ların sınıflandırılması ve işlevleriyle ilgili bilgiler Tablo 1.7.'de verilmektedir (Güngör ve Ünal, 2015).

Tablo 1.7. Bazı ncRNA'lar ve işlevleri (Güngör ve Ünal, 2015).

<b>Kısa ncRNA'lar</b>	
miRNA	Translasyonun baskılanması, DNA metilasyonu ve kromatin modifikasyonu ile, genin transkripsiyon sonrası regülasyonundan sorumludur ve gelişim, hücre ölümü ve hücre farklılaşmasında rol oynar.
siRNA	Transkripsiyon sonrası (mRNA'nın parçalanması) regülasyon, histon ve/veya DNA modifikasyonu ile, heterokromatin yapının oluşumunda yer alır.
piRNA	Memelilerin eşey hücrelerinde transpozon ve retro elementlerin baskılanmasından ve DNA metilasyonundan sorumludur.
tiRNA	Transkripsiyonun düzenlenmesinden sorumludur.
shRNA	Genomik baskılanmadan sorumludur.
snoRNA, snRNA, gRNA, RNaz P, telomeraz RNA	Post-transkripsiyonel modifikasyonda veya DNA replikasyonunda yer almaktadırlar.
<b>Uzun ncRNA'lar</b>	
Xist RNA	X kromozomunun inaktivasyonu, histon deasetilasyonu ve metilasyonundan sorumludur.
Tsix RNA	X kromozomunun inaktivasyonundan sorumludur.
Linc RNA	X inaktivasyonu, imprinting, transkripsiyonda aktif genlerin regülasyonu ve embriyonik pluripotent hücrelerin üreme hücrelerine farklılaşmasında rol alırlar.

#### 1.4.3.1. miRNA

Mikro RNA'lar (miRNA'lar), ~ 22 nükleotitten oluşan, endojen kodlamayan RNA'lardır. miRNA'ların ekspresyonu, hem genetik hem de epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. miRNA genlerinin yaklaşık yarısı, delesyon, duplikasyon ya da translokasyon ile ilişkili fragil bölgelerdedir. Bu durum, miRNA genlerinde oluşan değişikliklerin, tümör hücrelerinde daha genel bir kusur olarak ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Son zamanlarda keşfedilen



epigenetik süreçlerle, artan sayıdaki miRNA'ların, tümör hücrelerinde, epigenetik değişimlerden etkilenebileceği tespit edilmiştir (Liu vd., 2013).

Memeli transkripsiyonunun ~% 60'ından fazlasının, miRNA'ların kontrolünde gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonu kontrolünde, miRNA'lar görev alır. miRNA'lar hedef gen ekspresyonunun azaltılmasını, mRNA'ların 3' UTR bölgeleriyle baz eşleşmesi yapıp hedef mRNA yıkımını sağlayarak, veya translasyona uğramalarını engelleyerek yaparlar (Bissels, Basio ve Wagner, 2012; Özbayer vd., 2014).

Kanser türlerinin, kendilerine özgü miRNA ekspresyon profilleri olduğu görülmektedir. Tümör dokusunda miRNA ekspresyon profilinin, tümörün tipi ve farklılaşması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, miRNA'ların kanserde hücre büyümesi, bölünmesi ve çoğalması gibi hücresel süreçlerle bağlantısı olduğu da bulunmuştur (Görür ve Tamer, 2011; Güzelgül ve Aksoy, 2015).

MiRNA'ların disregülasyonu ve kanserdeki epigenetik düzenleyicilerle olan etkileşimleri, miRNA'ları klinik uygulamalarda çekici biyolojik belirteçler ve prospektif terapötik hedefler haline getirmiştir (Liu vd., 2013).

#### **1.4.3.2. siRNA**

Small interfering RNA yada short interfering RNA olarak bilinen siRNA'lar, 20-25 baz çifti uzunluğunda, eksojen yada endojen kökenli olabilen çift iplikli, in vitro sentezlenen RNA'lardır. Hedef dizilerle mükemmel eşleşme göstermesi, bu yapıları gen çalışmaları için uygun araçlar haline getirmiştir. Bu özelliği kullanılarak siRNA'lardan, kanser, insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu ve çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde, klinik uygulamaya geçişte yararlanılabileceği düşünülmektedir (Bodur ve Demirpençe, 2010; Ecevit, Motor ve İzmirli, 2013).

miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin anlaşılmasıyla birlikte, akciğer kanserinde spesifik hücre tiplerinde miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiş, normal ve patolojik dokular arasında farklılık gösterdikleri bulunmuştur (Bağcı, 2014).

Let-7 ailesine ait miRNA'lar, tümör baskılayıcı özelliğe sahiptir ve hücre büyümesini, hücre siklusunun ilerlemesini baskılamaktadır. Normal şartlarda Let-7 ailesine ait miRNA'ların, akciğer dokusunda yüksek oranda bulunduğu in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmesine karşın, akciğer kanserinde sıklıkla kaybolduğu bildirilmiştir. Akciğer kanserli dokularda yapılan çalışmalarda, miR-21 ve miR-201'de değişim olduğu ve serum örneklerinde miR-10b ve miR-205'de ekspresyon durumunun arttığı bulunmuştur (Karaaslan ve Serin, 2016; Zamani, A. G., ve Zamani, A., 2013).

KHDAK'larda kanser dokusu, normal akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında, bu iki dokudaki hücrelerin, farklı hsa-miR-125a-3p ve hsa-miR-125a-5p ekspresyon profillerine sahip olduğu bulunmuştur. Roa vd., miR-21, miR-155, miR210, miR-143 ve miR-372'den oluşan beşli panelin, KHDAK'li hastaların balgamlarında erken tanıda kullanılabileceğini düşünmüşlerdir. Bir adaptör protein olan proto-onkogen c-Crk (CRK), hücre adezyonu, proliferasyonu ve migrasyonunu artıran intraselüler sinyal yollarında görev yapmaktadır ve adenokarsinomlarda CRK benzeri görevi olan Flt1, miR-200 tarafından baskılanmaktadır (Zamani, A. G., ve Zamani, A., 2013; Yüce ve Ersoy, 2016).

Yapılan çalışmalarda, küçük hücreli akciğer kanseri ile KHDAK arasında ve KHDAK patolojik subtipleri arasında, miRNA profillerindeki farklılıklardan yararlanılabileceği, bu profillerin ayırıcı tanıda kullanılabileceği belirtilmiştir. Bazı vücut sıvısı örneklerinde, miR-29a ve miR-375'in KHAK ve KHDAK ayırıcı tanısında; miR-205 ve miR-34a'nın skuamöz hücreli kanser ve adeno karsinom ayırıcı tanısında kullanılabileceği bildirilmiştir (Yaykaşlı vd., 2012).

## **1.5. Akciğer Kanserinde Genetik Değişimler**

### **1.5.1. Akciğer Kanserinde Polimorfizm**

Akciğer kanseri gelişiminde polimorfizm, önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Farklı polimorfizmler ve akciğer kanseri riski arasındaki ilişki üzerine çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. NOQ1 polimorfizmi ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar da, bu çelişkili çalışmalar arasında yer

almaktadır. NQO2, NQO1'e benzer aktiviteye sahip bir enzimi kodlamaktadır ve akciğer kanseri riskini belirlemede daha önemli olabileceği düşünülmektedir. CYP1, başlıca epitelyal dokularda ifade bulan bir genidir. Bu genin tanımlanmış 11'den fazla alleli bulunmaktadır. Çeşitli etnik gruplar arasında CYP1A1, CYP2D6 ve CYP2E1 allellerindeki gibi bazı metabolik genlerin polimorfizmlerinin prevalansında farklılıklar vardır (Kiyohara, Otsu, Shirakawa, Fukuda ve Hopkini, 2002; Zamani ve Yıldırım, 2014).

hOGG1 Ser326Cys polimorfizmi ve akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi belirlemek için bazı çalışmalar yapılmıştır. Li vd., hOGG1 Ser326Cys polimorfizmi ile artmış akciğer kanseri yatkınlığı riski arasında ilişki bulamazken, Guan vd., hOGG1 Ser326Cys polimorfizminin, beyaz ırk için akciğer kanseri riski oluşturduğunu bildirmiştir (Zhong, Li, Long, Wu ve Hu, 2012).

DNA onarımında görev alan (OGG1, ERCC1, XRCC1, XRCC2, XRCC3, XPC, XPD, XPF, BRCA2, MRE11, NBS1, Ku70/80, LIG4, RAD vb.) genlerin polimorfizmleri, proteinlerin işlevinde ve bireylerin hasarlı DNA'yı onarma kapasitesinde değişimler meydana getirmektedir. Eksik onarım kapasitesi sonucunda, genetik kararsızlık ve dolayısıyla kanser oluşumu tetiklenmektedir. Yapılan bir araştırmada, XPC (Asp312Asn) ve XPD (Lys751Gln) polimorfizmlerinin, akciğer kanseri gelişme riskini arttırdığı, buna karşın XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) polimorfizmleri ile akciğer kanseri riski arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı tespit edilmiştir (Lopez vd., 2007; Ekmekçi, Konaç ve Önen, 2008).

Siklin D1 geninin 4. eksonunda tanımlanan A870G tek nükleotit polimorfizmi (SNP), sigaranın indüklediği akciğer kanseri riskine etki edebilmektedir. CDKI ailesi üyelerinden p16<sup>INK4A</sup> (CDKN2A) geninde tanımlanan A148T varyantı, erken yaşta gelişen akciğer kanserinin de aralarında bulunduğu çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. p21CIP1/WAF1 (CDKN1A) geninin 31. kodonundaki C/A transversiyonu sonucu oluşan AA genotipinin, akciğer gelişimi ile ilişkisi gösterilmiştir (Ekmekçi, Konaç ve Önen, 2008).

Glutasyon S-Transferaz (GSTP1) enziminin ekson 6 polimorfizminin, akciğer kanseri ile ilişkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, Wang vd., akciğer kanserine yakalanma riski ile ilgili kuvvetli bir ilişki olduğu sonucuna varırken, Watson vd., ise ilişkinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Bazı çalışmalardaki bulgular ise, GSTP1 genindeki polimorfizmlerin tek başına akciğer kanseri riskini etkilemediği, fakat bazı genetik polimorfizmlerle birlikte olmaları halinde, riski değiştirebileceği yönünde olmuştur. Saib vd. ve Booton vd., GSTP1 ekson 6 polimorfizminin, KHAK'de risk faktörü olmadığını saptamışlardır. Watson vd., GSTP1 geninin ekson 6 polimorfizminin, akciğer kanserine yakalanma riskine etkisinin, farklı populasyonlar için, farklı olabileceğini bildirmişlerdir (Akbaş, Seyrek, Erdoğan, Şenli ve Helvacı, 2012).

Akciğer kanseri riskini gösteren spesifik genetik polimorfizmler hakkında bilgi sahibi olmak, hem hastalığın erken belirlenmesinde, hem de çevresel maruziyetin bireyde hasar yapma olasılığını belirlemede yardımcı olabilecektir (Ece ve Kömürcü, 2010).

### **1.5.2. Akciğer Kanserinde Görülen Mutasyonlar**

Akciğer kanseri oluşumundaki en önemli iki değişiklik, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve KRAS genlerindeki somatik mutasyonlardır. Bu mutasyonlar, akciğer adenokarsinomasında, skuamöz hücreli karsinomdan daha sık görülmektedir ve tedavi seçimine etkileri vardır. Histolojik tipin adenokarsinoma veya skuamöz hücreli karsinom olup olmadığına; sigara öyküsü ve statüsüne bağlı olarak değişen, çok sayıda mutasyon KHDAK'da tanımlanmıştır (Pehlivan vd., 2002; Garzón vd., 2016).

p53, hücre siklusunun kontrolü, apoptozis, gen transkripsiyonu, kromozomal segregasyon ve genomik stabilite gibi hücresel fonksiyonlarda görev almaktadır. Tüm insan kanserlerinin % 50-55'inde p53 mutasyonları bulunur. p53 genindeki mutasyonlar, KHDAK'larda % 50 oranında ve KHAK'larının % 50-55'inde meydana gelmektedir (Pehlivan vd., 2002; Şen, Gönüllü ve Akar, 2005).

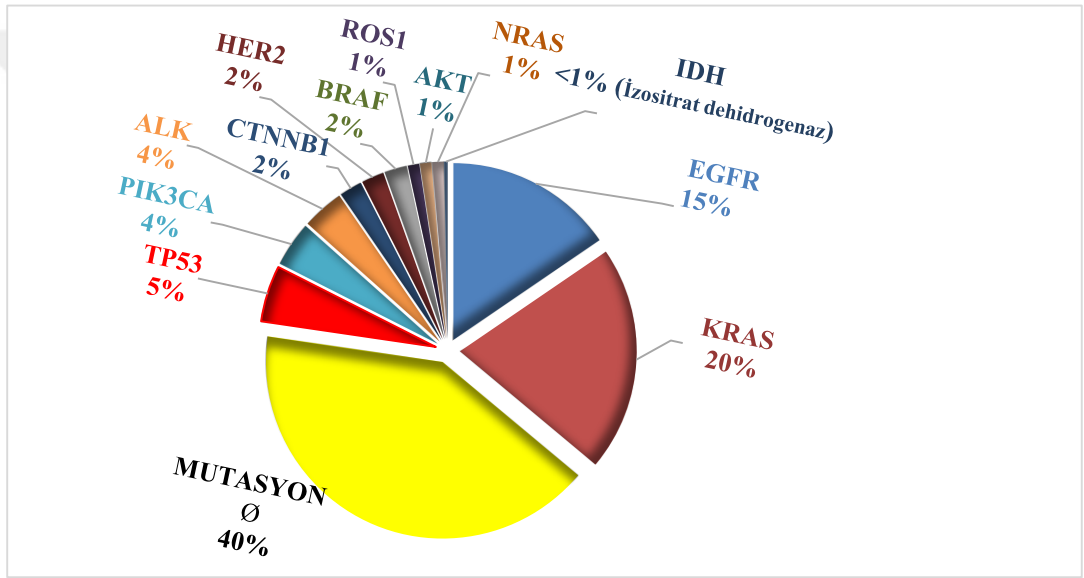
Kanser Genomu Atlas Araştırma Ağı (2014), rezeke edilen 230 akciğer adenokarsinomunda, mRNA, mikroRNA, kopya sayısı değişimleri, metilasyon ve proteomik analizlerle birlikte, DNA dizi analizi kullanarak moleküler profillemeye gerçekleştirmişler ve yüksek somatik mutasyon oranları gözlemişlerdir. Yapılan çalışmada, RIT1, MYC ve MGA dahil olmak üzere 18 gende, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek mutasyon bulunmuştur (URL-5, 2016).

Akciğer kanserinin en önemli nedenlerinden biri olan sigara dumanında bulunan N-nitrosamin ve PAH ise, genom başına 100 kadar mutasyona yol açmaktadır. Yine sigara dumanının, FAS/FAS ligand ekspresyonunu etkilediği ve akciğer kanseri oluşumunda azalmış FAS ekspresyonu ve/veya artmış FASL ekspresyonunun da rol oynadığı bilinmektedir. Çünkü akciğer kanserinde FASL üretilebilmesine rağmen, FAS reseptörleri olmadığı için FAS'a bağlı apoptoz gerçekleşmemektedir. FAS-1377 AA genotipinin, sigara içen kişilerde, akciğer kanseri riskini belirlemede rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca fragil histidin triad (FHIT) geninin hipermetilasyonunun da, p16 metilasyonu ile ilişkili olduğu ve sigara dumanına maruz kalan kişilerde, skuamöz hücreli akciğer kanserinin gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (Ece ve Kömürcü, 2010).

“Tümör Sekanslama Projesi” konsorsiyumunun çalışmaları kapsamında yer alan Ding vd., sistematik olarak, 188 akciğer adenokarsinomu örneğindeki somatik mutasyonların listesini çıkarmışlardır. Analizde, akciğer adenokarsinomu ile ilişkisi bilinen veya şüpheli bağlantısı olan 600 gene odaklanılmıştır. Toplam 1,013 somatik mutasyon saptanmış, 823'ü daha önce “Kanserde Somatik Mutasyonlar Katalogu”nda (COSMIC) ve “Online Mendelian Inheritance in Man” (OMIM) veritabanında bildirilmemiştir. Bu çalışmada mutasyonları bildirilen tümör supresör genler, NF1, RB1, ATM ve APC ve proto-onkogenler ERBB4, KDR, FGFR4, EPHA3 ve NTRK'dır. TP53'te daha önceden bilinen akciğer adenokarsinomu mutasyonları ile, DDKN2A, STL11, KRAS, EGFR ve NRAS mutasyonları doğrulanmıştır. Moleküler yollardaki mutasyon dağılımının analizi ile, MAPK, Wnt ve PI3K/AKT sinyal yollarında, ilişkili mutasyonlar belirlenmiştir. Bunlardan Wnt yolağı, daha önce akciğer adenokarsinomu ile ilişkilendirilmemiştir (Dubey ve Powell, 2009).

Akciğer kanserinde DOK2 geni delesyonunun, Berger vd., 199 primer insan akciğer adenokarsinomu örneğinden % 37'sinde saptamışlardır. Samuels vd. (2004), yaptıkları çalışmada, incelenen 24 akciğer kanserinin 1'inde (% 4) PIK3CA geninde somatik bir mutasyon gözlemişlerdir (URL-5, 2016).

Yapılan çalışmalarda, akciğer adenokarsinomlarının % 40-55'inde, birbirini dışlayan tek bir yönlendirici mutasyon olduğu bildirilmiştir. Birbirini dışladığı bilinen en eski mutasyonlar, KRAS ve EGFR 'dir. Ayrıca ALK, HER2, PIK3CA, BRAF, ROS1, AKT1 genlerinde de mutasyonlar yer almaktadır (Şekil 1.4.) (URL-4, 2013).



Şekil 1.4. Akciğer Adenokarsinomlarının mutasyon profili.

KRAS mutasyon oranı, KHDAK'larda % 20-% 30 oranında görülmektedir ve sıklıkla adenokarsinoma sınıfında oluşmaktadır. KRAS mutasyonları genellikle, guaninin timine transversiyonu olarak, % 70 oranında kodon 12'de meydana gelmektedir. KRAS mutasyonları ilk olarak yaklaşık 30 yıl önce tespit edilmiştir, ancak son yıllarda KRAS biyolojisinin anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Doğan vd., 2014; Garzón vd., 2016).

Sigara içenlerin, hiç sigara içmemiş olanlara kıyasla, KRAS mutasyon sıklığı daha yüksektir. Ahrendt vd., yaptığı bir çalışmada, KRAS mutasyonları 106 tümörün

40'ında (% 38) tespit edilmiş ve sigara içenlerde, sigara içmeyenlerle kıyaslandığında daha sık rastlanılmıştır (Garzón vd., 2016; URL-5, 2016).

Adenokarsinomlarda ikinci en sık görülen mutasyon EGFR mutasyonlarıdır. EGFR 7. kromozomun ekzon 18-24 aralığında kodlanmaktadır. Bu ekzonlar arasında en sık mutasyon, ekzon 19'daki delesyondur. İkinci sıklıktaki mutasyon, 21. ekzondaki nokta mutasyonudur. EGFR mutasyonları, sigara içmemiş ya da az içmiş, Asya etnik kökenli kadınlarda, yaklaşık % 40 oranında saptanırken, batı toplumlarında % 10-15 oranında saptanmıştır. EGFR mutasyonları olan hastalar, EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler) ile tedavi edilebilmektedirler (URL-4, 2013; Garzón vd., 2016).

KHDAK'larının % 2-7 oranında, ALK geni ile ilişkili birçok mutasyon gösterilmiştir. ALK bir tirozin kinaz olup, kromozom 2'de kodlanmaktadır. Genç, sigara içmemiş erkeklerde ALK mutasyonlarına daha sık rastlanılmıştır. KHDAK'larında, % 1-7 oranında da MET geni amplifikasyonu görülmektedir. Diğerlerinden farklı olarak, birbirini dışlayan değil, bir arada görülebilen mutasyonlardır (URL-4, 2013).

BRAF geni mutasyonları, KHDAK'larında, % 1-3 oranında, sigara içen hastalarda saptanabilmektedir. Malign melanomda da bildirildiği gibi, tirozin kinaz domaini, ekzon 15'te ve 11'de mutasyon gözlenmektedir. KHDAK'de BRAF'ın rolü, kolorektal karsinom ve malign melanomda olduğu kadar açık değildir. Naoki vd., 127 primer insan akciğer adenokarsinomasında, BRAF geni sekans analizi gerçekleştirmiş ve biri ekzon 11 ve diğeri ekzon 15'te olmak üzere, 2 tümör örneğinde mutasyonlar bulmuştur (URL- 4, 2013; Doğan vd., 2014; URL-5, 2016).

HER2 geni mutasyonu, KHDAK'larında % 2-4 oranında, en sık ekzon 20'de in-frame insersiyon tarzında, somatik mutasyon olarak gözlenir. Sigara içmemiş, kadın hastalarda daha sık bildirilmektedir (URL-4, 2013).

### 1.5.3. Akciğer Kanserinde Gen Ekspresyon Profili

Gen ekspresyon profili ile akciğer kanserinin histolojik sınıflaması arasında, ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Skuamöz akciğer kanser hücreleri, yüksek moleküler ağırlıklı keratin (34βE12), sitokeratin 5/6, CEA eksprese etmektedir. Ayrıca düşük molekül ağırlıklı keratin (35βH11), TTF-1 ve sitokeratin 7 ekspresyonu da görülebilmektedir. Büyük hücreli akciğer kanserinde, HMGI aşırı ekspresyonu, FOS ilişkili antijen 1 aşırı ekspresyonu, E-kaderin düşük ekspresyonu, PAX 8 düşük ekspresyonu gibi, epitelyalden mezenkimale geçişi yansıtan gen ekspresyon profilleri mevcuttur (Bhattacharjee vd., 2001; Garber vd., 2001; Yılmazbayhan ve Özlük, 2010; Yüce ve Ersoy, 2010).

Akciğer tümörlerinin gen ekspresyonu profillemesi çalışmaları, prognoz ve sağkalım ile ilgili önemli bilgiler sağlamanın yanında, genetik değişikliklerin akciğer tümörü ve metastazını nasıl etkilediğine ilişkin bilgiler sunarak, potansiyel terapötik hedefleri belirlemeye yardımcı olmaktadır (Borczuk, Toonkel ve Powell, 2009).

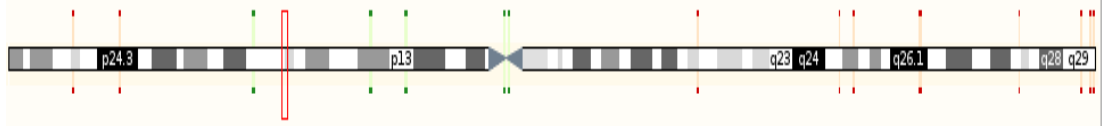
Desmoglein 3 ekspresyon eksikliğinin, histolojik tip ne olursa olsun, akciğer kanserinde kısa sağkalımı gösterdiği belirtilmektedir. Adenokanserde apoptotik potansiyelin kontrolünde görev alan Kaspaz-4 ve p63 proteinlerinin bulunması ve artan MUC1 ekspresyonu, prognozun kötü olduğunu göstermektedir. MMP-9 ekspresyonu adenokanser progresyonu ile ilişkilidir. KHAK için TTF-1, ELAV4 ve CAPS gen ekspresyonu iyi prognozu ortaya koyarken, FOX-C1 ve TSGA1 ekspresyonu kötü prognozu belirtmektedir. CD9'un düşük ekspresyonunun, KHAK'nin daha agresif olduğunu gösterdiğine inanılmaktadır (Ece ve Kömürcüoğlu, 2010).

Gen ekspresyon analizinin, akciğer metastazlarını doğrulamak ve tanımlamak için bir teşhis aracı olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Metastatik KHDAK'de MMP ve tripsinojen-C/4B ekspresyonu yanında, S100P ve S100A2'nin bulunmasının karakteristik olduğu belirtilmektedir. Yine aynı şekilde KHAK'de de, S100A7'nin aşırı ekspresyonunun, beyin metastazı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Bhattacharjee vd., 2001; Ece ve Kömürcüoğlu, 2010).



## 1.6. RASSF1A Geni

RASSF1A geni, kromozom 3p21.3'de lokalizedir (Şekil 1.5.). RASSF1A, RASSF ailesinin bir üyesidir ve ailenin diğer üyeleriyle % 30-50 aminoasit homolojisi paylaşmaktadır (Han vd., 2016; URL-6, 2016).



Şekil 1.5. RASSF1A geninin 3p21.3'deki lokalizasyonu (URL-6)

RASSF1 lokusu, alternatif promotör seçimi ve alternatif mRNA splicing ile birkaç büyük transkripti kodlar. RASSF1, alternatif splicing ile RASSF1A, RASSF1B ve RASSF1C dahil olmak üzere, çeşitli izoformları kodlamaktadır. RASSF'in iki büyük izoformu A ve C ortak bir RAS asosiyasyon domainine (RA) sahiptir; ancak sadece RASSF1A'nın amino terminal bölgesinde, sistein bakımından zengin bir diaçilgliserol bağlama alanı (C1 bölgesi) vardır. Yapılan çalışmalar RASSF1C'nin, RAS-sinyalizasyonunda rol oynarken, RASSF1A'nın G1-S geçişinde, hücre döngüsü ilerlemesiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Murray vd., 2004; Choi vd., 2005).

RASSF1A (Ras association domain family member 1A), mutasyonel olaylardan ziyade, sıklıkla metilasyonla inaktive edilir. Bu gen, akciğer, meme, böbrek, gastrik, mesane, nöroblastoma, medulloblastoma, gliomalar dahil birçok yetişkin ve çocukluk kanserinde, promotör bölge hipermetilasyonu ile susturulur ve sıklıkla inaktivedir. Yapılan araştırmalar, RASSF1A'nın, kanser, apoptoz ve hücre döngüsünde işlev gördüğünü ortaya koymuştur (Agathangelou, Cooper ve Latif, 2005).

Yapılan RNAi çalışmalarında, RASSF1A'nın, hücre döngüsü kontrolünün kaybedilmesinde, genetik istikrarsızlığın artmasında, hücrenin hareketliliğinde ve K-Ras'a ve tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 'ya bağlı apoptoza dirençte, downregüle olduğu gösterilmiş; böylece RASSF1A'nın, çoklu biyolojik süreçleri düzenlediği düşünülmüştür (Donninger, Vos ve Clark, 2007).

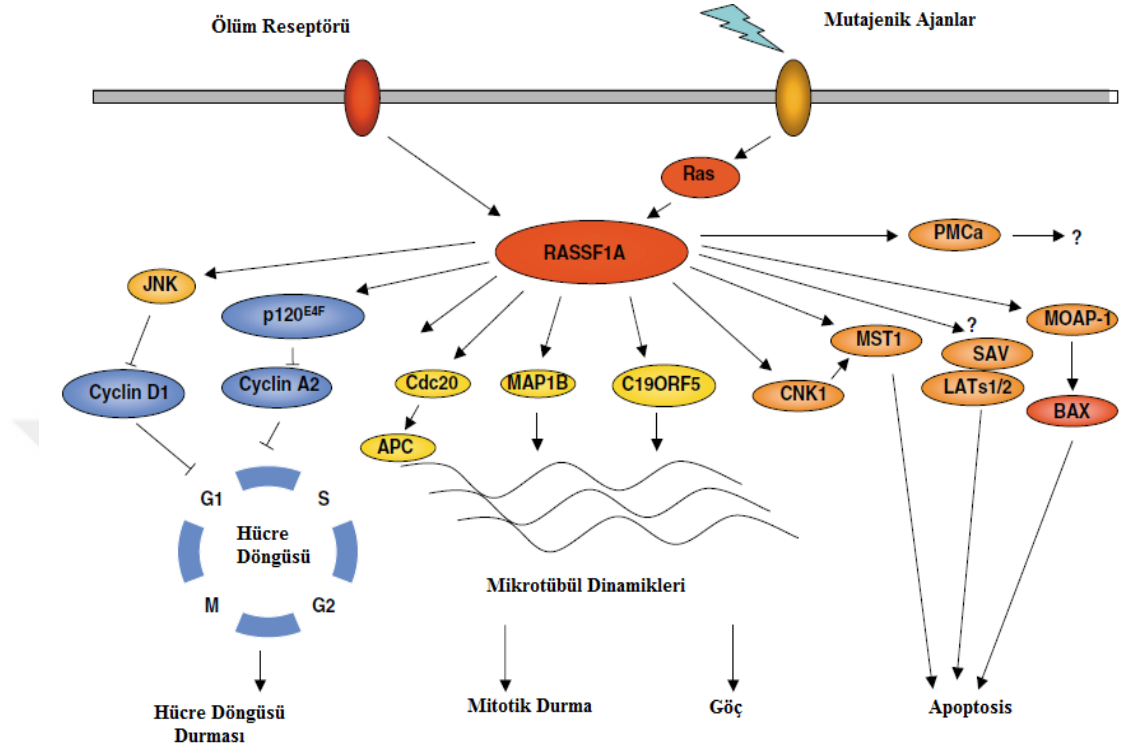
RASSF1A, mikrotübül stabilizasyonu, apoptozis ve hücre motilite gibi birçok hücre süreçte yer alır. RASSF1A proteinin, siklin D1 birikimini inhibe ederek, hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Xu, Zhan ve Chen, 2016).

Ökaryotik hücrelerde çeşitli mikrotübül ilişkili proteinler (MAP'ler) ifade edilir. MAP1 familyası proteinleri, mikrotübül kafes boyunca bağlanan, klasik mikrotübül ilişkili proteinlerdir. Mikrotübüller, dinamik instabilite gösterirler. RASSF1A, mikrotübüller ile kompleks oluşturarak, polimerizasyonun artmasını sağlamaktadır. Bu özellik, RASSF1A'nın hücre döngüsünü modüle etmesine izin verir. RASSF1A  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -tübülünlere eşlik eder; fakat tam olarak RASSF1A'nın tübülün ile nasıl etkileşime girdiği belirsizliğini korumaktadır. RASSF1A'nın doğrudan, MAP1B, MAP4 ve C19ORF5 (MAP1S) gibi birkaç MAP'a bağlandığı bulunmuştur. Bu proteinler doğrudan tübülünü bağladığından, RASSF1A'nın tübülün ile etkileşiminin, MAP'ler aracılığıyla dolaylı olabileceği düşünülmektedir. Mikrotübüllere ve hücre döngüsüne ek olarak, RASSF1A, apoptotik yolak olan Hippo ve Bax'ın da kontrolünü sağlamaktadır. RASSF1A, Hippo yolağını, MST1 ve MST2 kinazlarını doğrudan bağlayarak, aktive eder. Bax aktivatörü MOAP-1'i doğrudan bağlayarak, Bax'ı aktive eder. Bu nedenle RASSF1A, hem apoptozu indüklemeye, hem de hücre döngüsünü kısıtlayabilme yeteneğine sahiptir (Halpain ve Dehmelt, 2006; Donniger vd., 2014).

RASSF1A ile indüklenen G0 / G1 arresti ve siklin D1 downregülasyonu, akciğer kanseri ve nöroblastoma hücre hatlarında saptanmıştır. RASSF1A'nın mikrotübüle lokalize olduğu ve mikrotübül stabilitesinin korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir. APC-Cdc20 kompleksinin inhibisyonu yoluyla, mitotik siklinlerin stabilitesini ve mitotik progresyonunu düzenler. RASSF1A'nın E1A tarafından kontrol edilen transkripsiyon faktörü p120E4F ve CNK1 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Chow vd., 2006).

Genomik istikrarsızlık, transforme hücrelerin ayırt edici özelliklerinden biridir. İğ regülasyonundaki bozukluklar, genomik istikrarsızlığa neden olabilir. RASSF1A, sentrozom ve mitoz iğine lokalize olduğundan ve tübülün dinamiklerini modüle

edebildiğinden, RASSF1A'nın genomik stabilitenin sağlanmasında rol aldığı düşünülmektedir (Şekil 1.6.) (Donninger, Vos ve Clark, 2007).



Şekil.1.6. RASSF1A'nın yer aldığı ve ilişkili olduğu yollar (Donninger, Vos ve Clark, 2007).

RASSF1A en az üç mikrotübüle bağlı protein (MAP) aracılığıyla, mikrotübüllerle kompleksleri bağlar ve mitojenik veya apoptotik uyarılara yanıt olarak mitoz, hücre döngüsü ve apopitozu düzenler. RASSF1A ve mikrotübüle bağlı proteinler arasındaki doğrudan etkileşim, RASSF1A'yı mikrotübüllere lokalize eder, onları sabitleştirir ve böylece mitozu düzenler. A ve D1 siklinlerinin, RASSF1A ile baskı altına alınması, hücre döngüsü durması ve CNK1, MST1, Salvador ve MOAP1 ile etkileşimler sonucunda RASSF1A'nın apopitozu modüle etmesine izin verir (Donninger, Vos ve Clark, 2007).

RASSF1A geninin kaybı veya değiştirilmiş ifadesi sonucu, genin tümör baskılayıcı işlevini kaybettiği gösterilmiş ve bu durum çeşitli kanserlerin patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. RASSF1A geni inaktivasyonunun, promotör bölge CpG-adası hipermetilasyonu ile korelasyonlu olduğu bulunmuştur (URL-7, 2016).

RASSF1A inaktivasyonu; nokta mutasyon, delesyon, promotör metilasyonu gibi birçok mekanizmayla olabilmektedir. Resesif kalıtım söz konusu olduğundan inaktivasyon için her iki RASSF1A gen allellinin fonksiyon kaybına uğraması gerekmektedir (çift vuruş=double hit). Diğer taraftan allellerden birinin önceden mutasyon varlığı ve diğerinde delesyon olması halinde de [heterozigosite kaybı (LOH)] RASSF1A geni inaktif hale gelir. RASSF1A hipermetilasyonunun, insan kanserlerinin en sık rastlanılan tümör supresör gen değişikliği olduğu, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Özdemir S., ve Özdemir, Ö., 2014).

### **1.7. RASSF1A Geni ve Akciğer Kanseri**

İnsan kanserlerinin moleküler genetiğindeki son gelişmeler, çoklu TSG değişimlerinin, insan akciğer karsinogenezine karıştığını ortaya koymuştur. Kromozom 3p allel kaybı, akciğer kanseri gelişiminde sık görülen olaydan biridir. Ayrıntılı allelotip çalışmaları ile, 3p bölgesinin akciğer ve diğer kanserlerde sıklıkla allellik kayıplar gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum 3p'de birçok TSG olduğunu akla getirmektedir. Akciğer kanseri ve meme kanseri hücre hatlarında, 630 kb, 3p21.3 homozigot delesyon bölgesi ile ilgili kapsamlı araştırma yapılmıştır. RASSF1A geni, bu bölgeden bir aday TSG olarak izole edilmiştir (Murray vd., 2004).

3p21.3 bölgesinden genetik materyal kaybı, akciğer kanserinin patogenezinde en yaygın ve en erken olaylardan biri olarak tanımlanmıştır. RASSF1A'nın yüksek metilasyon sıklığı, meme kanseri, yumurtalık, gastrik ve mesane kanserleri gibi diğer kanserlerde de görülmektedir. Sıklıkla 3p21.3 bölgesindeki heterozigotluk kaybı (LOH) ve homozigot delesyon varlığı, tümörogenezde 3p21.3 bölgesinin kritik bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Choi vd., 2005; Pfeifer vd., 2005).

RASSF1A genindeki mutasyonlar yaygın olmamasına rağmen, bu bölgede birçok polimorfizm keşfedilmiştir. Birçok çalışma, RASSF1A'daki farklı SNP'lerin, akciğer kanseri, meme kanseri ve renal hücreli karsinom gibi maligniteler ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. RASSF1A, farklı tümör türlerinde geniş çapta çalışılmıştır. Bir tümör baskılayıcı gen olarak, anormal ifadesinin tümörogenez ile ilişkili olduğu

düşünülmektedir. RASSF1A geni promotör metilasyonunun, küçük hücreli dışı akciğer kanserinin gelişimi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Xu vd., 2016).

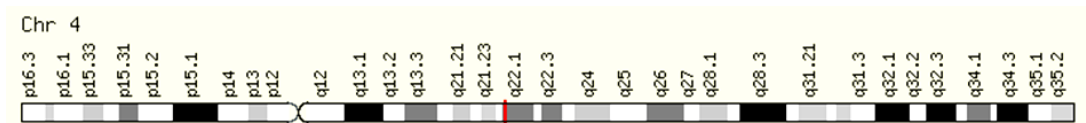
RASSF1A'nın normal bronşiyal epitel hücrelerinde eksprese edildiği, fakat KHAK'lerinin % 80-100'ünde ve KHDAK'lerin % 30-60'ında eksprese olmadığı belirtilmiştir. RASSF1A'nın tümör hücrelerinde inaktivasyonu, RASSF1A promotör bölgesindeki CpG adasının metilasyonundan kaynaklanmaktadır (Choi vd., 2005).

Akciğer karsinogenezinde, RASSF1A promotörünün hipermetilasyonu, nispeten geç ortaya çıkmaktadır ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri progresyonunda RASSF1A'nın önemli olabileceği düşünülmektedir (Wang, 2004).

### 1.8. SPARCL1 (SPARC-like protein 1)

SPARC ailesinin, hücre biyolojisinde, hücrel yapışma, hücre çoğalması, hücre şekil modülasyonu, hücre döngüsü inhibisyonu, hücre dışı matriks sentezi gibi birçok fizyolojik olayda görevi vardır. Bu protein ailesi, ekstrasellüler matriks proteinleri ve büyüme faktörleri ile etkileşim yoluyla işlev görür. SPARC ailesinde, on protein üyesi vardır ve bunlardan biri SPARCL1'dir (Zhang, Widegren, Wang ve Sun, 2011).

SPARCL1 proteini, oldukça asidik olan bölge I, bir follistatin benzeri bölge ve bir hücre dışı kalsiyum (EC) bağlanma bölgesi varlığı ile tanımlanır. SPARCL1, sinir sisteminin gelişimi için hayati önem taşıyan, malignite baskılama potansiyeli olan bir, hücre dışı matris glikoproteinidir. Hevin, SC1 veya MAST9 olarak da bilinir. SPARCL1 geni, 4q22'de lokalizedir ve insanlarda korunmuştur (Şekil 1.7.). Beyin proteinlerinin immünblotlarında, SPARCL1, 116 ve 120 kDa'lık bir çift bant olarak tespit edilmesine karşın, aminoasit sekansından öngörülen molekül kütlesi 70,6 kDa'dır (Hu vd., 2012; Jakharia, Borkakoty ve Singh, 2016).



Şekil 1.7. SPARCL1 geninin 4q22'deki lokalizasyonu (URL-8).

SPARCL1'in, hücre adezyonu, hücre çoğalması, merkezi sinir sistemi gelişimi ve B-lenfosit matürasyonu gibi, fizyolojik fonksiyonlarda rol aldığı bulunmuştur. SPARCL1, beyin, kalp, akciğer, kas, kolon ve böbrek gibi normal dokularda yaygın olarak eksprese edilirken; ekspresyonu, çeşitli karsinomlarda downregüle edilmektedir (Hu vd., 2012; Jakharia, Borkakoty ve Singh, 2016).

SPARCL1'in downregülasyonu, pankreas, prostat, mesane, yumurtalık, göğüs ve küçük hücreli dışı akciğer tümörleri gibi, çeşitli tümörlerde bulunmuştur ve SPARCL1'in kanser teşhisi ve terapisi için potansiyel hedef gen ve bir tümör supresör gen adayı olabileceği düşünülmüştür (Zhang vd., 2011).

### **1.9. SPARCL1 ve Kanser**

Yapılan çalışmalarda, kolorektal karsinomlarda SPARCL1 mRNA'sının downregülasyonu gösterilmiştir. Yapılan bazı pilot çalışmalarda, yüksek SPARCL1 ekspresyon düzeyinin, kolorektal kanserlerde (CRC'lerde) iyi diferansiye edilmiş durum, daha az metastaz ve daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar, SPARCL1'in ekspresyonunun artışının Dukes evre B'den D ye ilerlemede azalmaya sebep olduğunu bildirmiştir. Ancak, bazı veriler SPARCL1'in ekspresyonunun CRC'lerde kötü sağkalıma yol açtığını bildirmiştir. Bu nedenle, SPARCL1'in prognostik değerinin, daha geniş katılıma sahip, birden fazla merkezli daha büyük çalışmalarla araştırılması önerilmektedir (Hu vd., 2012).

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda, SPARCL1 mRNA düzeylerinin downregüle edildiği bulunmuştur. SPARCL1 geninin akciğer veya diğer bazı kanserlerde downregüle olmasından sorumlu sebebin, genin delesyonu veya mutasyonu olduğuna dair bir bulgu bulunmamaktadır. Araştırmacılar, akciğer kanserinde SPARCL1 downregülasyonunun, diğer farklı faktörler aracılığıyla olabileceğini düşünmektedirler. SPARCL1'in G1'den S fazına geçişle, veya uzun süre G1 fazında tutma yoluyla, hücre progresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir ve çoğu malignant hücrede oldukça downregüle olduğu bulunmuştur (Bendik vd., 1998; Isler vd., 2004; Zhang vd., 2011).

SPARCL1'in downregülasyonunun, pankreatik kanserde, prostat, mesane, ovaryum, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde bulunmuş olması, SPARCL1'in bir tümör supresör gen adayı olabileceğini ve bu tümörlerde tanı ve terapi için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmüştür (Claeskens vd., 2000; Zhang vd., 2011).



## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Çalışma Grupları

Çalışmaya Gayrettepe Florence Nightingale Hastanesi Patoloji Bölümü arşivinde bulunan, akciğer adenokarsinomu tanısı almış 40 hastaya ait, 40 tümör ve 40 normal kontrol dokusu olmak üzere, 80 doku örneği dahil edilmiştir.

Çalışmaya başlanmadan önce, Karabük Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 28.03.2018 tarih 4/28 nolu karar ile, etik kurul onayı alınmıştır.

### 2.2. Ekipman

#### 2.2.1. Kimyasal Maddeler

- % 96-100 Etanol
- DNA izolasyon kiti içeriği (Thermo Scientific GeneJET FFPE DNA Purification Kit)
  - ✓ Digestion Buffer
  - ✓ Proteinase K solüsyonu
  - ✓ RNase A solüsyonu
  - ✓ Binding Buffer
  - ✓ GeneJET DNA Purification Column
  - ✓ Wash Buffer 1
  - ✓ Wash Buffer 2
  - ✓ Elution Buffer
- Bisülfid Uygulaması kiti içeriği (EZ DNA Methylation-Gold Kit)
  - ✓ CT Conversion Reagent solüsyonu
  - ✓ Zymo-Spin™ IC Column
  - ✓ M-Binding Buffer
  - ✓ M-Wash Buffer
  - ✓ M-Desulphonation Buffer



### ✓ M-Elution Buffer

- Enzim Karışımı (LightCycler® 480 SYBR Green I Master)
- Forward Primer (F)
- Reverse Primer (R)

### 2.2.2. Araçlar ve Cihazlar

- Santrifüj (Wispin CF\_10)
- Mikropipetör (10-100 µl ve 100-1000)-(Microlit ve Socorex)
- Mikropipet uçları (100 µl ve 1000 µl)-(Biologix)
- Eppendorf tüpü (Isolab)
- Otoklav (Daihan WiseClave®)
- Derin dondurucu (-20) (Bosch)
- Su banyoları (Miprolab)
- Vorteks (Dragonlab MX-F)
- Eldivenler (Dolphin)
- Deiyonize su
- Kağıt havlu
- Enjektör
- Parafilm (Parafilm M)
- Roche LightCycler 480 II
- PCR cihazı (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler)
- Plate santrifüj cihazı (Beckmann Coulter Allegra X-15R)
- PCR tüpü

### 2.3. Parafine Gömülü Tümör ve Normal Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu

İzolasyon, Thermo Scientific GeneJET FFPE DNA Purification Kit kullanılarak yapıldı. İzolasyon için her biri her biri 10 µm kalınlığında olan 7 kesitlik formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) doku örnekleri kullanıldı.

Saklama Koşulları: Açılmamış Proteinase K ve RNase A solüsyonları oda sıcaklığında saklandı. Solüsyonlar açıldıktan sonra ise -20°C’de muhafaza edildi. Kitin diğer bileşenleri oda sıcaklığında (15-25°C) saklandı.

Biri 65°C diğeri 90°C olmak üzere 2 adet su banyosu kullanıldı.

### **Prosedür;**

Wash Buffer 1 solüsyonu hazırlamak için, 10 ml konsantre wash solüsyonuna, 30 ml etanol (% 96) eklenerek, total hacim 40 ml’ye tamamlandı.

Wash Buffer 2 solüsyonu hazırlamak için, 10 ml konsantre wash solüsyonuna, 30 ml etanol (% 96) eklenerek, total hacim 40 ml’ye tamamlandı.

1. Mikrosantrifüj tüpünde 7 kesit içeren FFPE doku örneği üzerine, 200 µl Digestion Buffer solüsyonu eklendi. 90°C’de 9 dakika inkübe edildi. İnkübasyon esnasında, doku örneklerinin Buffer solüsyonunun içinde bulunduğundan emin olana kadar, tüp hafifçe birkaç kez sallanarak örnekler karıştırıldı. İnkübasyondan sonra, tüp parafinin çözünmesi için vortekslendi. Örnekler oda ısısına gelene kadar soğutulup, tüp kapağının temizlenmesi için kısa süreli spin yapıldı.
2. 20 µl Proteinase K solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde etmek amacıyla vorteksle iyice karıştırıldı. Tüp kapağının temizlenmesi için kısa süreli spin yapıldı.
3. Örnekler, ara ara vortekslenmek suretiyle, 65°C su banyosunda 120 dakika inkübe edildi.
4. Örnekler 90°C’ye getirilmiş, diğer su banyosuna alınıp 40 dakika bekletildi.
5. Örnekler oda ısısına geldikten sonra, 7000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve elde edilen lizattan 200 µl alınarak, 1,5 µl’lik yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

6. 10 µl RNase A solüsyonu eklenerek iyi bir şekilde vortekslendi. Kısa süreli spinin ardından örnekler, 10 dakika oda ısısına bırakıldı.
7. 200 µl Binding Buffer eklendi ve homojenizasyonu sağlamak için, 10 sn. vortekslenip kısa süreli spin yapıldı.
8. 400 µl etanol (% 96) eklendi ve homojenizasyon için 10 sn. vortekslendi. Kısa süreli spin yapıldı.
9. Lizat, Collection Tube içine yerleştirilmiş GeneJET DNA Purification Column'a aktarıldı. 7000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Collection tüp sıvıyla birlikte atılarak, GeneJET DNA Purification Column, yeni bir collection tüpe konuldu.
10. 500 µl Wash Buffer 1 solüsyonu eklendi. 8 500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Collection tüpte toplanan sıvı, atığa boşaltılıp column tekrar collection tüpe yerleştirildi.
11. 500 µl Wash Buffer 2 eklendi. 3 dakika, 1350 rpm'de santrifüj edildi. Collection tüp boşaltılarak, column tekrar collection tüpe yerleştirildi ve membranı kurutmak için 1 dakika 1350 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası collection tüp atıldı. GeneJET DNA Purification Column, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
12. 45 µl Elution Buffer, column membranının tam ortasına gelecek şekilde eklendi. Oda sıcaklığında, 2 dakika bekletildi ve 8 500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Elde edilen DNA -20°C de saklandı.

## 2.4. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilmiş olan DNA'ların konsantrasyonları, spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanlarının ölçülmesiyle saptandı.

## 2.5. Bisüfit Uygulaması

DNA örneklerinin metilasyon durumunu belirleyebilmek için, Real Time PCR öncesinde bisüfit uygulaması "EZ DNA Methylation-Gold Kit" ile yapıldı.

### Kit İçeriğinin Hazırlanması:

#### 2.5.1. CT Conversion Reagent Hazırlanması

Kitle birlikte liyofilize halde sağlanan CT Conversion Reagent aşağıda belirtildiği şekilde kullanıma hazır hale getirildi:

- ✓ CT Conversion Reagent tüpüne sırasıyla 900 µl dH<sub>2</sub>O, 300 µl M-Dilution Buffer ve 50 µl M-Dissolving Buffer konuldu.
- ✓ Oda sıcaklığında 10 dk. boyunca vortekslendi.

#### 2.5.2. M-Wash Buffer Hazırlanması

- ✓ Kitle birlikte sağlanan M-Wash Buffer içerisine 24 ml etanol (% 96-100) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

### **Prosedür;**

1. 130 µl CT Conversion Reagent, PCR tüpü içine koyulan 20 µl DNA örneğine ilave edildi. Pipetaj yapılarak karıştırıldı ve kısa bir santrifüj yapıldı.
2. PCR tüpleri, Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek aşağıdaki basamaklar uygulandı.

- ✓ 98°C de 10 dak
  - ✓ 64°C de 2.5 saat
  - ✓ 4°C bekletme
3. Zymo-Spin™ IC Column, Collection Tube içine yerleştirildikten sonra üzerlerine 600 µl M-Binding Buffer eklendi.
  4. 2. Basamakta elde edilen örnek, M-Binding Buffer içeren kolona yüklendi, kapak kapatılarak alt üst edilip karıştırıldı.
  5. 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve collection tüpteki sıvı atıldı.
  6. 100 µl M-Wash Buffer, kolona ilave edilerek 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Collection tüpteki sıvı atıldı.
  7. 200 µl M-Desulphonation Buffer, kolona eklendi, oda ısısında (20-30°C) 15-20 dakika inkübe edildi ve sonra, 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Collection tüpteki sıvı atıldı.
  8. 200 µl of M-Wash Buffer, kolona ilave edildi, 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Collection tüpteki sıvı atıldı. Tekrar 200 µl of M-Wash Buffer, kolona eklendi, 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edilip, Collection tüpteki sıvı atıldı.
  9. Santrifüj sonrası kolonlar, Collection tüplerden alınarak steril, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Doğrudan kolon matriksi üzerine, 10 µl M-Elution Buffer eklenerek 10 000 g'de 30 sn. santrifüj edildi.
  10. Bisülfid uygulaması işlemi tamamlanmış DNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

## 2.6. Primer Dizaynı

RASSF1 ve SPARCL1 gen bölgelerinin, metilasyon durumunu belirlemek için kullanılan primerler, bu genlerin CpG adalarına spesifik metile ve unmetile olarak, NCBI ve ENSEMBLE gen bankaları kullanılarak, MethPrimer Software ile dizayn edildi.

Çalışmada kullanılan RASSF1A ve SPARCL1 Unmetile ve Metile primer dizileri, Tablo 2.1.'de verilmiştir.



Tablo 2.1. *RASSF1A* ve *SPARCL1* unmetile ve metile primer dizileri

Gen ismi	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	
<i>RASSF1A</i>	Unmetile	Forward	GAGAGTGTGTTTAGTTTTGTTTT
		Reverse	CCCATACTTCACTAACTTTAAACAC
	Metile	Forward	GAGAGCGCTTTAGTTTCGTTTC
		Reverse	ACCCGTACGTTCGCTAACTTTAAACG
<i>SPARCL1</i>	Unmetile	Forward	AAGAGATTGAGATTATTTTGGTTAATATG
		Reverse	CCAAATAACTAAAACACTACAAACACC
	Metile	Forward	AGATCGAGATTATTTTGGTTAATACG
		Reverse	CGAATAACTAAAACACTACAAACGCC

## Primerler İçin Optimizasyon;

İlk olarak primerler, yanında gelen kullanım kılavuzlarında belirtilen 100 µm için gerekli su miktarı eklenerek, 100 µm'a (yani 100 pmol/µl'ye) sulandırıldı. Sulandırılan primerlerden, her parametre için aşağıda belirtilen ara stoklar oluşturularak, Real-Time PCR analizi için hazır hale getirildi.

## Primer Ara Stok Hazırlanışı;

Metile ve unmetile primerlerin her biri için, Forward ve Reverse primerlerden 10 µm ara stok oluşturuldu. Bunun için, 100 µm'lık ana stoktan, 10 µl alınarak, üzerine 90 µl su eklendi.

Ara stoklar hazırlanırken  $M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$  klasik formülü kullanıldı.

## 2.7. Real-Time PCR Analizi

Bisülfıt uygulanmış DNA örneklerinin metilasyon profilini belirlemek amacıyla, RASSF1A ve SPARCL1 gen bölgeleri için dizayn edilen primerler ile LightCycler® 480 SYBR Green I Master kullanılarak, Roche LightCycler 480 II cihazı ile çalışıldı.

Hem metile hem de unmetile PCR ile profil analizi için, aşağıda belirtilen aynı reaksiyon karışımı kullanıldı (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. PCR için reaksiyon karışım hacimleri

Bileşenler (Tek Reaksiyon İçin)	Hacim
Su, PCR-grade	1,9 µl
Forward Primer (F) (ara stok 10 µM)	0.3 µl
Reverse Primer (R) (ara stok 10 µM)	0.3 µl
Enzim Karışımı (LightCycler® 480 SYBR Green I Master)	5 µl
	+
Bisülfıt uygulanmış DNA örneğİ	2,5 µl
Toplam Reaksiyon Hacim	10 µl



Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için bileŐenlerin her birinden (DNA hariç) eklendi ve reaksiyon sayısı ile çarpılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.

- Plate'lere her bir reaksiyon için, 7,5  l reaksiyon karıŐımından transfer edildi.
- 2,5  l DNA  rneği, her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 10  l olacak Şekilde ilave edildi.
- Negatif Kontrol olarak, kalıp DNA yerine PCR-grade su kullanıldı.
- Pozitif Kontrol olarak, kalıp DNA yerine Zymo Research-Bisulfite-Converted Universal Methylated Human DNA Standard, kullanıldı.
- Hazırlanan platelerin üzeri kapatılarak, plate santrifüj cihazı ile santrifüj edildi ve aşağıda belirtilen cihaz protokolü ile çalışma yapıldı (Tablo 2.3.).

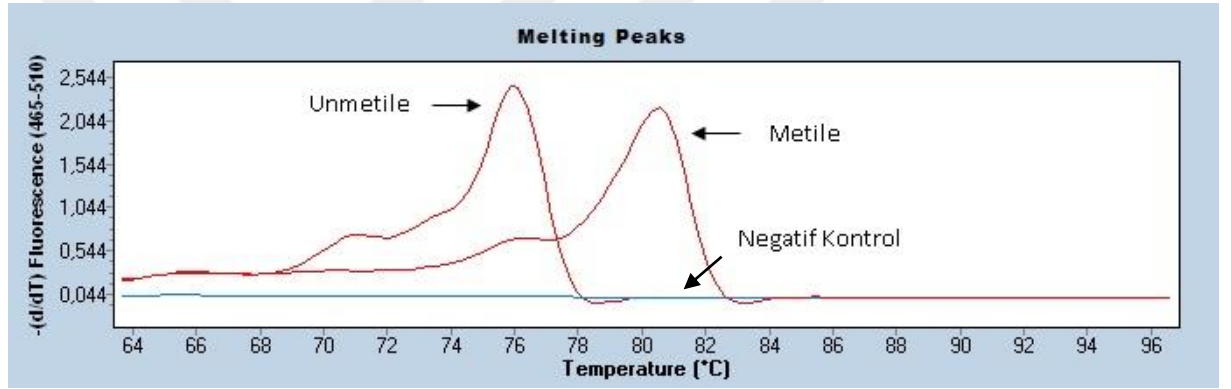
Tablo 2.3. Cihaz protokolü.

	Pre - İnkübasyon	Amplifikasyon			Meltingcurve			Soğutma
Parametre								
Analiz Modu	Yok	KuantifikasyonModu			Erime Eğrisi Modu			<b>Yok</b>
Döngü Sayısı	1	45			1			<b>1</b>
Hedef [°C]	95	95	59	72	95	64	97	<b>40</b>
Süre	00:05:00	00:00:10	00:00:10	00:00:10	00:00:05	00:01:00	00:00:00	<b>00:00:30</b>
Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]	4,8	4,8	2,5	4,8	4,8	2,5	0.11	<b>2,5</b>
Okuma Mode	<b>Yok</b>	<b>Yok</b>	<b>Yok</b>	<b>Tek</b>	<b>Yok</b>	<b>Yok</b>	<b>Continuous</b>	<b>Yok</b>

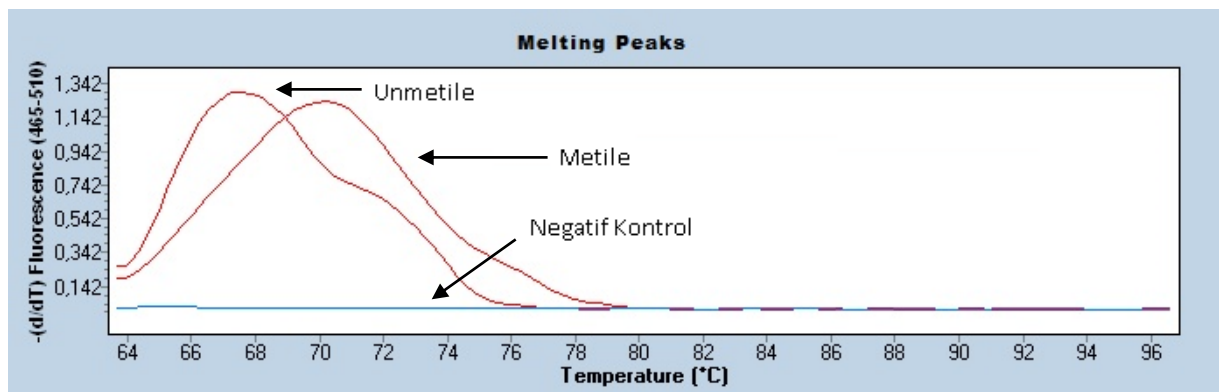
## 2.8. Analiz

Real Time PCR sonunda elde edilen verilerin analizi, LightCycler 480 yazılımında, “Tm Calling” modunda gerçekleştirildi. Her bir örneğin, metile ve unmetile primer setinde bir Tm farkı olup olmadığına bakılıp, metile veya unmetile olduğunun tespiti yapıldı. Her örneğin metilasyon durumu doğrulaması, pozitif metile kontrol DNA’sı; Zymo Research-Bisulfite-Converted Universal Methylated Human DNA Standard ile yapıldı.

RASSF1A ve SPARCL1 genlerine ait metilasyon erime eğrileri Şekil 2.1. ve Şekil 2.2.’de verildi.



Şekil 2.1. RASSF1A genine ait metilasyon erime eğrileri.



Şekil 2.2. SPARCL1 genine ait metilasyon erime eğrileri.

## 2.9. İstatistiksel Değerlendirme

RASSF1A ve SPARCL1 geni metilasyon profili ile patolojik evre, histolojik derece ve lenf nodu tutulumu olmak üzere klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla analiz Statistical Package for Social Sciences (PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.) programı kullanılmış ve tüm analizler için Fisher'ın ki kare testi yapılmıştır. P değeri <0,05 olduğunda karşılaştırılan parametreler arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiştir.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya akciğer adenokarsinomlu, kırk hastaya ait 40 tümör ve 40 normal kontrol dokusu dahil edildi. Klinik parametrelerin, akciğer adenokarsinomunda RASSF1A ve SPARCL1 geni metilasyonu ile olan asosiyasyonunu değerlendirmek üzere, hastaların hastalık evresi, histolojik derecesi ve lenf nodu tutulumu kıyaslanmıştır.

Çalışmadaki hastaların yaş ortalaması, 59,2 olarak bulundu. Hastaların 33'ünün (% 82,5) 50 yaş ve üzerinde, 7'sinin (% 17,5) 50 yaşın altında olduğu belirlendi. Erkeklerin yaş ortalaması 60,7 ve kadınların yaş ortalaması 56,9 olarak tespit edildi. Cinsiyet dağılımına bakıldığında; hastaların 16'sının (% 40) kadın, 24'ünün (% 60) erkek olduğu bulundu. Klinik evrelemeye göre, Evre 1A'da 16 (% 40) hasta, Evre 1B'de 7 (% 17,5) hasta, Evre 2A'da 3 (% 7,5) hasta, Evre 2B'de 7 hasta, Evre 3A'da 5 (% 12,5) hasta ve Evre 3B'de 2 (% 5) hasta mevcuttu. Tümörlerin N-evre sınıflandırması bölgesel lenf nodu metastaz varlığına dayanmaktadır. N0 (Lenf nodu metastazı yok) ve N1-N2 (Lenf nodu metastazı var) olmak üzere 2 grupta değerlendirilmektedir. Buna göre, hastaların 30'unda (% 75) bölgesel lenf nodu metastazının olmadığı ve 10'unda (% 25) lenf nodu metastazı olduğu bulunmuştur. Histolojik dereceye göre değerlendirildiğinde, Grade I'de 1 (% 2,5) hasta, Grade II'de 15 (% 37,5) hasta, Grade III'te 23 (% 57,5) hasta mevcuttu. Çalışmada yer alan hastalara ait demografik ve klinik veriler Tablo 3.1.'de gösterildi.

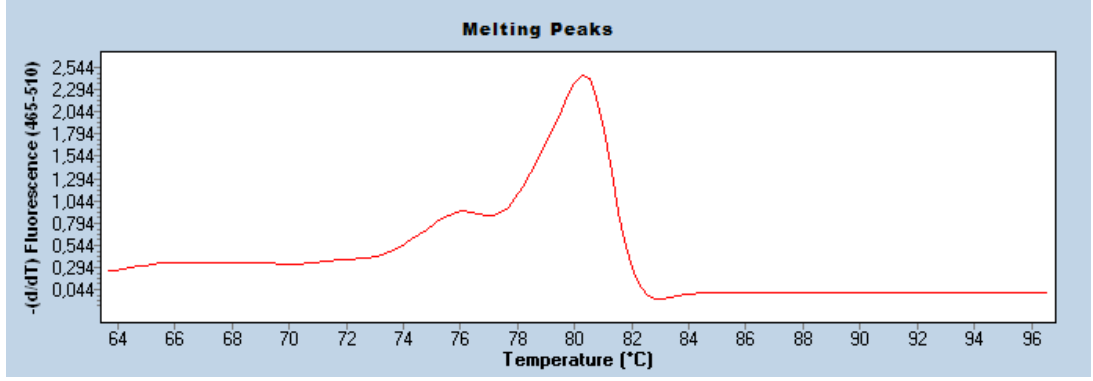
Tablo 3.1. Çalışmada yer alan hastalara ait demografik ve klinik veriler.

Özellik	Alt Özellik	n	%
Yaş	≥50	33	82,5
	<50	7	17,5
Cinsiyet	Kadın	16	40
	Erkek	24	60
Histolojik derece	Grade I	1	2,5
	Grade II	15	37,5
	Grade III	23	57,5
	Bilinmeyen	1	2,5
Evre	Evre 1A	16	40
	Evre 1B	7	17,5
	Evre 2A	3	7,5
	Evre 2B	7	17,5
	Evre 3A	5	12,5
	Evre 3B	2	5
Lenf Nodu Tutulumu	Var	10	25
	Yok	30	75

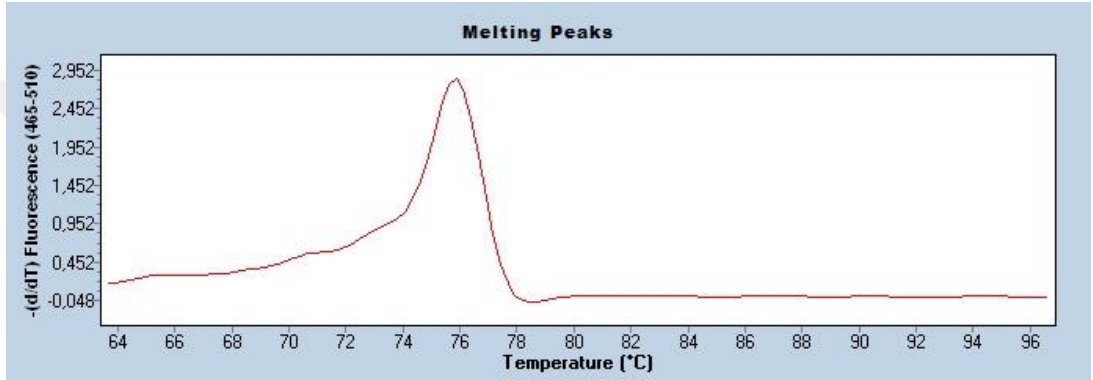
Tablo 3.1. incelendiğinde, hasta grupları arasında yaş grubuna göre, 50 yaştan büyük olan hasta sayısının fazla olduğu; cinsiyete göre, erkek sayısının fazla olduğu; histolojik dereceye göre, Grade III'ün en fazla olduğu; evrelemede, Evre 1A'nın en fazla olduğu ve lenf nodu tutulumunun ise az olduğu görülmektedir.

### 3.2. Metilasyon Profili

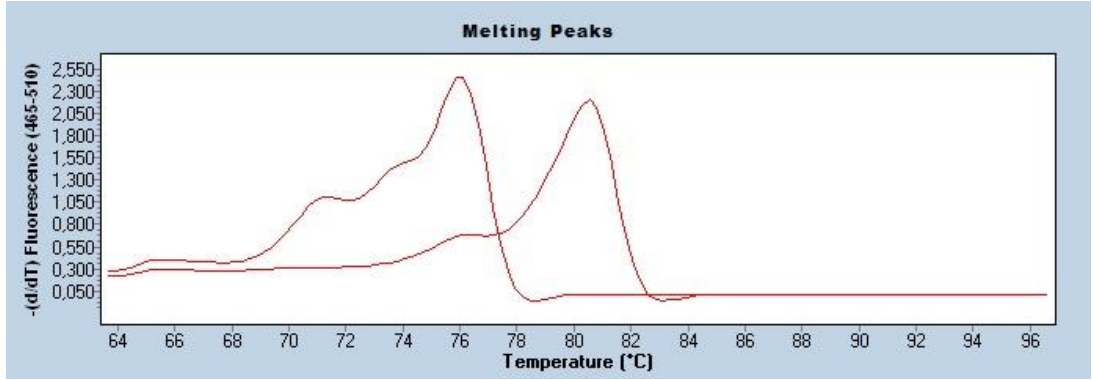
Çalışmaya akciğer adenokarsinomlu kırk hastaya ait, 40 tümör ve 40 normal kontrol dokusu dahil edildi. Parafine gömülü doku örneklerinden DNA izolasyonu, Thermo Scientific GeneJET FFPE DNA Purification kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra bisülfid uygulamasını takiben, RASSF1A geni promotör metilasyonu Şekil 3.1., 3.2. ve 3.3.'te bazı hastalardaki örneklerle gösterildiği gibi, real-time PCR yöntemi ile tespit edildi. Aynı şekilde SPARCL1 geni intron 11-12 metilasyonu, Şekil 3.4., 3.5. ve 3.6.'da bazı hastalardaki örneklerle gösterildiği gibi, real-time PCR yöntemi ile tespit edildi.



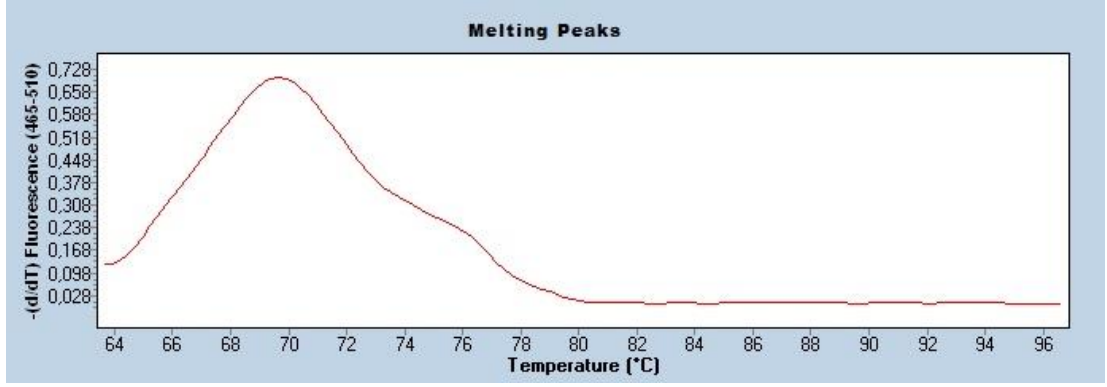
Şekil 3.1. AT 25 No'lu olguya ait RASSF1A geni metile profil gösteren erime eğrisi.



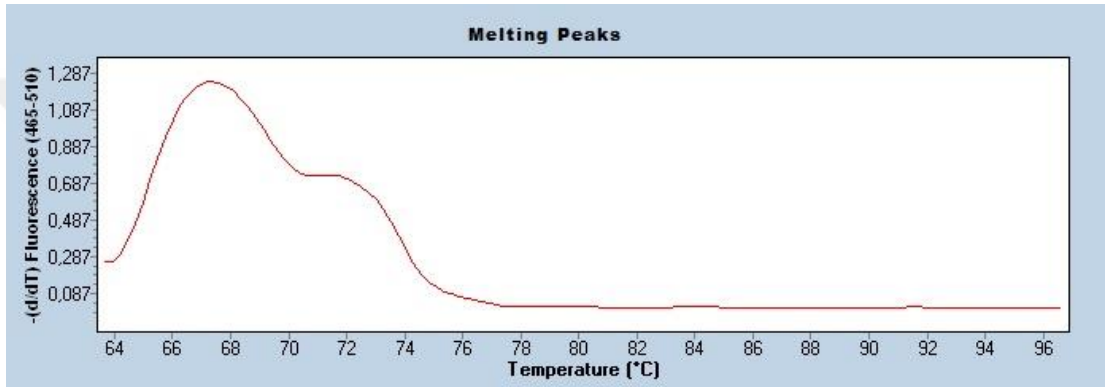
Şekil 3.2. AK3 No'lu olguya ait RASSF1A geni unmetile profil gösteren erime eğrisi.



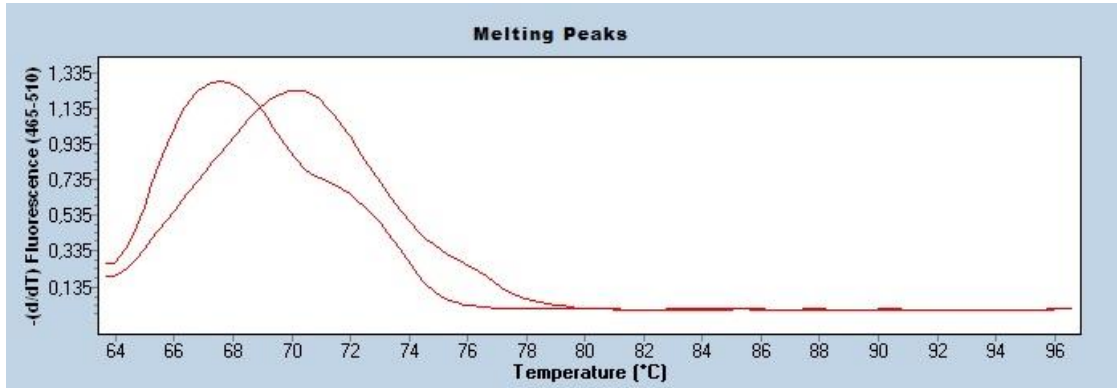
Şekil 3.3. AT4 No'lu olguya ait RASSF1A geni metile+unmetile profil gösteren erime eğrisi.



Şekil 3.4. AT 1 No'lu olguya ait SPARCL1 geni metile profil gösteren erime eğrisi.



Şekil 3.5. AK 6 No'lu olguya ait SPARCL1 geni unmetile profil gösteren erime eğrisi.



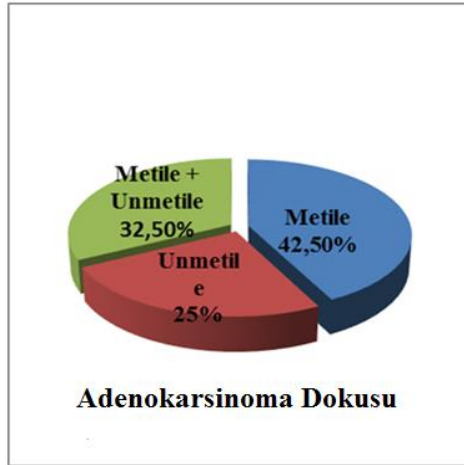
Şekil 3.6. AK4 No'lu olguya ait SPARCL1 geni metile+unmetile profil gösteren erime eğrisi.



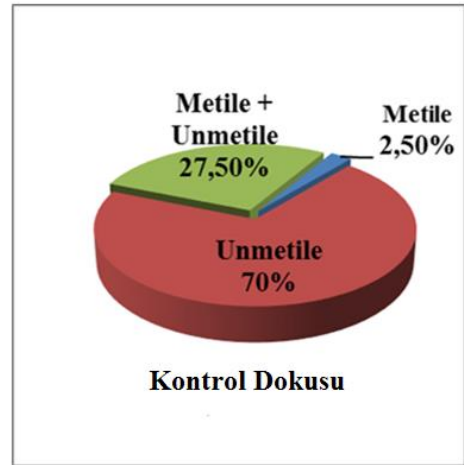
Tablo 3.2. Akciğer adenokarsinomunda RASSF1A ve SPARCL1 geni metilasyon dağılımları.

Metilasyon durumu	Adenokarsinom Dokusu (n=40)	Kontrol Dokusu (n=40)	X <sup>2</sup> p-value
<b>RASSF1A</b>			0,000
Metile	17 (% 42,5)	1 (% 2,5)	
Unmetile	10 (% 25,0)	28 (% 70,0)	
Metile+Unmetile	13 (% 32,5)	11 (% 27,5)	
Metilasyon durumu	Adenokarsinom Dokusu (n=40)	Kontrol Dokusu (n=40)	X <sup>2</sup> p-value
<b>SPARCL1</b>			0,000
Metile	13 (% 32,5)	0 (% 0,0)	
Unmetile	1 (% 2,5)	11 (% 27,5)	
Metile+Unmetile	26 (% 65,0)	29 (% 72,5)	

Tablo 3.2. incelendiğinde, akciğer adenokarsinoma hastalarının, tümör dokularında ve kontrol dokularında RASSF1A geni metilasyonu varlığı açısından, anlamlı bir fark gözlemlendi (p=0,000). Akciğer adenokarsinoma dokusunda, RASSF1A promotör bölgesinde metile profile sahip 17 (% 42,5) hasta, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profile sahip 10 (% 25) hasta ve RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profile sahip 13 (% 32,5) hasta saptandı (Şekil 3.7.). Kontrol dokusunda RASSF1A promotör bölgesinde, metile profile sahip 1 (% 2,5) hasta, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profile sahip 28 (% 70) hasta ve RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profile sahip 11 (% 27,5) hasta saptandı (Tablo 3.2. ve Şekil 3.8.).

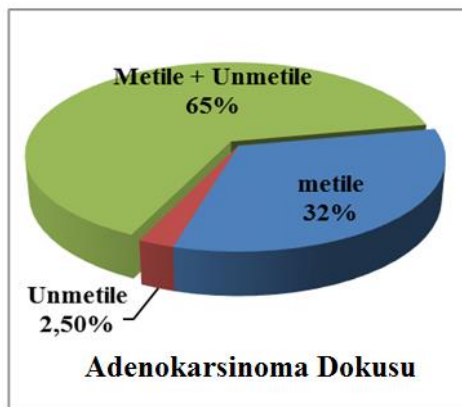


Şekil 3.7. Akciğer adenokarsinoma dokusunda RASSF1A geni metilasyon dağılımları.

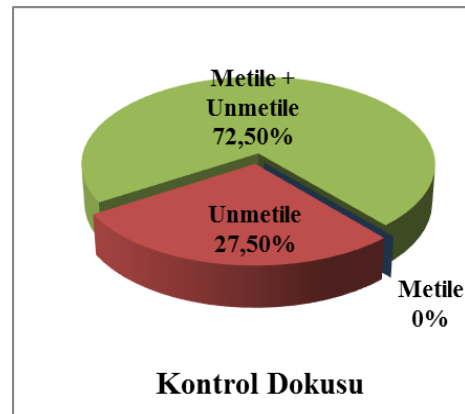


Şekil 3.8. Kontrol dokusunda RASSF1A geni metilasyon dağılımları.

Tablo 3.2 incelendiğinde, akciğer adenokarsinoma hastalarının, tümör dokularında ve kontrol dokularında, SPARCL1 geni metilasyonu varlığı açısından anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p=0,000$ ). Akciğer adenokarsinoma dokusunda SPARCL1 geni, metile profile sahip 13 (% 32,5) hasta, SPARCL1 geni unmetile profile sahip 1 (% 2,5) hasta ve SPARCL1 geni metile+unmetile profile sahip 26 (% 65,0) hasta saptandı (Şekil 3.9.). Kontrol dokusunda, SPARCL1 geni metile profile sahip hasta bulunmazken, SPARCL1 geni unmetile profile sahip 11 (% 27,5) hasta ve SPARCL1 geni intron 11-12 bölgesinde metile+unmetile profile sahip 29 (% 72,5) hasta saptandı (Tablo 3.2. ve Şekil 3.10.).



Şekil 3.9. Akciğer adenokarsinoma dokusunda SPARCL1 geni metilasyon dağılımları.



Şekil 3.10. Kontrol dokusunda SPARCL1 geni metilasyon dağılımları.

Tablo 3.3. Akciğer adenokarsinomunda evrenin SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisinin değerlendirilmesi.

	SPARCL1			P değeri	
	Metile	Unmetile	Metile+Unmetile		
EVRE	<b>1A (n)</b>	5	0	11	0,498
	<b>%</b>	% 38,5	% 0	% 42,3	
	<b>1B (n)</b>	4	0	3	
	<b>%</b>	% 30,8	% 0	% 11,5	
	<b>2A (n)</b>	0	0	3	
	<b>%</b>	% 0	% 0	% 11,5	
	<b>2B (n)</b>	2	1	4	
	<b>%</b>	% 15,4	% 100	% 15,4	
	<b>3A (n)</b>	2	0	3	
	<b>%</b>	% 15,4	% 0	% 11,5	
	<b>3B (n)</b>	0	0	2	
	<b>%</b>	% 0	% 0	% 7,7	

40 akciğer adenokarsinomlu hastada evrenin, SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisine baktığımızda; Evre 1A'da 5 (% 38,5) hastanın, Evre 1B'de 4 (% 30,8) hastanın, Evre 2B'de 2 (% 15,4) hastanın, Evre 3A'da 2 (% 15,4) hastanın SPARCL1 geninde metile profil belirlenirken; Evre 2A ve Evre 3B'de hiçbir hastada metile profil belirlenmedi. Yalnızca Evre 2B'de 1 (100) hastada SPARCL1 geninde unmetile profil belirlendi Evre 1A'da 11 (% 42,3) hastanın, Evre 1B'de 3 (% 11,5) hastanın, Evre 2A'da 3 (% 11,5) hastanın, Evre 2B'de 4 (% 15,4) hastanın, Evre 3A'da 3 (% 11,5) hastanın, 3B'de 2 (% 7,7) hastanın SPARCL1 geninde metile+unmetile profil belirlendi. Tablo 3.3.'te gösterildiği üzere, akciğer adenokarsinomunda evrenin, SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,498).

Tablo 3.4. Akciğer adenokarsinomunda tümör histolojik derecesinin SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisinin değerlendirilmesi.

		SPARCL1			P değeri
		Metile	Unmetile	Metile+Unmetile	
<b>HİSTOLOJİK DERECE</b>	<b>Grade 1 (n)</b>	0	0	1	0,519
	<b>%</b>	% 0	% 0,0	% 3,8	
	<b>Grade 2 (n)</b>	6	1	8	
	<b>%</b>	% 50	% 100	% 30,8	
	<b>Grade 3 (n)</b>	6	0	17	
	<b>%</b>	% 50	% 0	% 65,4	

Akciğer adenokarsinomunda, tümör histolojik derecesinin SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisine baktığımızda; Grade1’de metilasyon gözlenmezken, Grade 2’de 6 (% 50) hastanın, Grade 3’te 6 (% 50) hastanın SPARCL1 geninde, metile profil belirlendi. Yalnızca Grade 2’de 1 (% 100) hastanın, SPARCL1 geninde unmetile profil belirlendi. Grade1’de 1 (% 3,8) hastanın, Grade 2’de 8 (% 30,8) hastanın, Grade 3’te 17 (% 65,4) hastanın, SPARCL1 geninde metile+unmetile profil belirlendi. Tablo 3.4.’de gösterildiği üzere, akciğer adenokarsinomunda tümör histolojik derecesinin, SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,519).

Tablo 3.5. Akciğer adenokarsinomunda lenf nodunun SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisinin değerlendirilmesi.

		SPARCL1			P değeri
		Metile	Unmetile	Metile+Unmetile	
<b>LENF NODU</b>	<b>Pozitif (n)</b>	4	1	5	0,158
	<b>%</b>	% 30,8	% 100	% 19,2	
	<b>Negatif (n)</b>	9	0	21	
	<b>%</b>	% 69,2	% 0	% 80,8	

Akciğer adenokarsinomunda, lenf nodunu tutulumunun SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisine baktığımızda; lenf nodu pozitif olan 4 (% 30,8) hastada ve lenf nodu negatif olan 9 (% 69,2) hastada, SPARCL1 geninde metile profil belirlenirken, yalnızca lenf nodu pozitif olan 1 (% 100) hastada SPARCL1 geninde unmetile profil belirlendi. Ayrıca lenf nodu pozitif olan 5 (% 19,2) hastada, lenf nodu negatif olan 21 (% 80) hastada, SPARCL1 geninde metile+unmetile profil belirlendi. Tablo 3.5.’de

gösterildiği üzere, akciğer adenokarsinomunda lenf nodunun, SPARCL1 metilasyon durumuyla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,158).

Tablo 3.6. Akciğer adenokarsinomunda evrenin RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisinin değerlendirilmesi.

	RASSF1A			P değeri	
	Metile	Unmetile	Metile+Unmetile		
<b>EVRE</b>	<b>1A (n)</b>	8	4	4	0,594
	<b>%</b>	% 47,1	% 40	% 30,8	
	<b>1B (n)</b>	2	1	4	
	<b>%</b>	% 11,8	% 10	% 30,8	
	<b>2A (n)</b>	2	1	0	
	<b>%</b>	% 11,8	% 10	% 0,0	
	<b>2B (n)</b>	4	2	1	
	<b>%</b>	% 23,5	% 20	% 7,7	
	<b>3A (n)</b>	1	1	3	
	<b>%</b>	% 5,9	% 10	% 23,1	
	<b>3B (n)</b>	0	1	1	
	<b>%</b>	% 0	% 10	% 7,7	

40 akciğer adenokarsinomlu hastada, evrenin RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisine baktığımızda; Evre 1A'da 8 (% 47,1) hastanın, Evre 1B'de 2 (% 11,8) hastanın, Evre 2A'da 2 (% 11,8) hastanın, Evre 2B'de 4 (% 23,5) hastanın, Evre 3A'da 1 (% 5,9) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlenirken, Evre 3B'de RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlenmedi. Evre 1A'da 4 (% 40) hastanın, Evre 1B'de 1 (% 10) hastanın, Evre 2A'da 1 (% 10) hastanın, Evre 2B'de 2 (% 20) hastanın, Evre 3A'da 1 (% 10) hastanın, Evre 3B'da 1 (% 10) hastanın RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profil belirlendi. Evre 1A'da 4 (% 30,8) hastanın, Evre 1B'de 4 (% 30,8) hastanın, Evre 2B'de 1 (% 7,7) hastanın, Evre 3A'da 3 (% 23,1) hastanın, Evre 3B'da 1 (%7,7) hastanın RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profil belirlenirken, Evre 2A'da metile+unmetile profile sahip hasta belirlenmedi. Tablo 3.6.'da gösterildiği üzere akciğer adenokarsinomunda evrenin, RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,594).

Tablo 3.7. Akciğer adenokarsinomunda tümör histolojik derecesinin RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisinin değerlendirilmesi.

		RASSF1A			P değeri
		Metile	Unmetile	Metile+ Unmetile	
<b>HİSTOLOJİK DERECE</b>	<b>Grade 1 (n)</b>	1	0	0	0,782
	<b>%</b>	% 5,9	% 0	% 0	
	<b>Grade 2 (n)</b>	6	3	6	
	<b>%</b>	% 35,3	% 33,3	% 46,2	
	<b>Grade 3 (n)</b>	10	6	7	
	<b>%</b>	% 58,8	% 66,7	% 53,8	

Akciğer adenokarsinomunda, tümör histolojik derecesinin, RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisine baktığımızda; Grade 1’de 1 (% 5,9) hastanın, Grade 2’de 6 (% 35,3) hastanın, Grade 3’te 10 (% 58,8) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlendi. Grade1’de hiçbir hastada unmetilasyon belirlenmezken, Grade 2’de 3 (% 33,3) hastanın, Grade 3’te 6 (% 66,7) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profil belirlendi. Grade 1’de hiçbir hastada metile+unmetilasyon belirlenmezken, Grade 2’de 6 (% 46,2) hastanın, Grade 3’te 7 (% 53,8) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profil belirlendi. Tablo 3.7.’de gösterildiği üzere, akciğer adenokarsinomunda, tümör histolojik derecesinin, RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,782).

Tablo 3.8. Akciğer adenokarsinomunda lenf nodunun RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisinin değerlendirilmesi.

		RASSF1A			P değeri
		Metile	Unmetile	Metile+ Unmetile	
<b>LENF NODU</b>	<b>Pozitif (n)</b>	2	4	4	0,221
	<b>%</b>	% 11,8	% 40	% 30,8	
	<b>Negatif (n)</b>	15	6	9	
	<b>%</b>	% 88,2	% 60	% 69,2	

Akciğer adenokarsinomunda lenf nodu tutulumunun RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisine baktığımızda; lenf nodu pozitif olan 2 (% 11,8) hastada ve lenf nodu negatif olan 15 (% 88,2) hastada, RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlenirken, lenf nodu pozitif olan 4 (% 40) hastada ve lenf nodu negatif olan 6 (%

60) hastada, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profil belirlenmiştir. Ayrıca, lenf nodu pozitif olan 4 (% 30,8) hastada ve lenf nodu negatif olan 9 (% 69,2) hastada, RASSF1A promotör bölgesinde, metile+unmetile profil belirlenmiştir. Tablo 3.8.'de gösterildiği üzere, akciğer adenokarsinomunda lenf nodunun, RASSF1A metilasyon durumuyla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,221).



#### 4. TARTIŞMA

DNA metilasyonu, en fazla çalışılan epigenetik mekanizmalardan biridir. Metilasyon oranının, genetik mutasyon oranından daha hızlı olduğu düşünülürse, epigenetik mutasyonların genetik mutasyonlara kıyasla, neoplazileri başlatma olasılığının daha yüksek olabileceği tahmin edilmektedir. Artan kanıtlar, epigenetik değişikliklerin kanser gelişiminden önce ortaya çıkabileceğini göstermektedir ve bu değişimler tümörün başlatılması için muhtemel bir olay olarak düşünülmektedir (Hughes, Tomasa, Acuna ve Lopez, 2008).

DNA metilasyonu, ilgili gendeki transkripsiyonel sessizleşme, hücre siklusu kontrolü, farklılaşma, sinyalizasyon ve apoptoz gibi hücre fonksiyonlarının kontrolü sağlanmaktadır (Yüce ve Ersoy, 2016).

DNA metilasyonu, gen transkripsiyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve karsinogenezdeki rolü, son yıllarda önemli bir konu haline gelmiştir. DNA metilasyonundaki değişiklikler, çeşitli tümörlerde ve tümörlerin gelişiminde sık meydana gelmektedir (Das ve Singal, 2004).

Kanserde genomik hipermetilasyon en yaygın olarak, genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarında görülmüştür. Bununla birlikte kanserde, heterokromatik DNA tekrarları, dağılık retrotranspozonlar ve endojen retroviral elemanlar da dahil olmak üzere, hem çok hem de orta derecede tekrarlanan DNA sekanslarında, sıklıkla hipometilasyon meydana gelmektedir (Ehrlich, 2002).

DNA metilasyon seviyelerinde, bölgesel artışların olduğu, birçok çalışmada bildirilmiştir. Baylin vd., çeşitli insan tümörlerinde 3p, 11p ve 17p kromozomal bölgelerde, hipermetilasyon için bölgesel sıcak noktalar bulmuşlardır. Bunlar, in vivo olarak hiç metilleştirilmemiş CpG adalarını içerir, fakat tümör dokularında metilasyon olduğu gözlenmiştir (Laird ve Jaenisch, 1994).

Çok sayıda farklı malignitelerde, RASSF1A promotör hipermetilasyonun yüksek frekansları bildirilmiştir. Sırasıyla akciğer, meme ve prostat kanserlerinde % 88, %



95 ve % 99 olarak bildirilen yüksek RASSF1A hipermetilasyon frekansı, normal çevre dokusunda % 0'a kadar düşmektedir (Gravenda ve O'Neill, 2015).

Akciğer kanserinde epigenetik mekanizmalardan metilasyon, sık çalışılmıştır. Akciğer kanserinde gen metilasyonunun, prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Lu ve Zhang, 2011). Bu çalışmada 40 Akciğer adenokarsinomlu arşiv doku ve 40 kontrol arşiv doku örneğinde, RASSF1A geni promotör bölgesi ve SPARCL1 geni intron 11-12 metilasyon profilinin, saptanması hedeflenmiştir. Bu profillerin patolojik evre, histolojik derece ve lenf nodu tutulumu gibi, klinopatolojik parametrelerle ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmamızda, 40 akciğer adenokarsinomlu tümör doku örneğinde yapılan çalışma sonucu, RASSF1A metilasyon frekansı, % 42,5; SPARCL1 metilasyon frekansı, % 32,5 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, olgularımızda bulunan metilasyon oranı yüksekliği, literatür çalışmalarını desteklemektedir.

Ökaryot genlerinin transkripsiyonunu promotör, enhancer ve silencer olarak isimlendirilen farklı düzenleyici elemanlar etkilemektedir. Farklı DNA sekanslarından oluşan bu elemanlar, DNA'nın belirli bir bölgesine bağlanan proteinler için bağlanma bölgelerini oluşturmaktadır. Enhancerler, transkripsiyonu düzenlemek için promotör ile etkileşime girmektedirler (Büyükgüzel, 2000).

Jones ve arkadaşları, genlerin promotör bölgelerinde bulunan CpG adalarının, promotör dışında bulunan CpG adalarına göre, de novo metilasyona karşı daha duyarlı olduklarını göstermişlerdir. Örneğin, MCJ geninin transkripsiyonel susturulmasında, intron 1 bölgesinde bir CpG adasının metilasyonunun ve CpG adasının yanı sıra genin promotör bölgesinde histon asetilasyonunun azaltılmasının etkisi bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, SPARCL1 geninin intron 11-12 bölgesinde hipermetilasyonun bulunması, bu bölgenin muhtemel bir enhancer bölge, barındırdığını düşündürmektedir (Zhang vd., 2010).

Agathangelou vd., (2001), Japon popülasyonunda yaptıkları çalışmalarında RASSF1A promotör bölgesi metilasyon frekansını, KHAK'da % 72 (21/29),

KHDAK'da % 34 (14/41) olarak bildirmişlerdir. Japon etnik grubunda yapılan başka çalışmalarda, Dammann vd., (2000) bu oranı, küçük hücreli dışı akciğer tümörlerinde % 40 (24/60) ve yine Dammann vd., (2001) küçük hücreli akciğer primer tümörlerinde % 79 (22/28) olarak bildirilmişlerdir. Honorio vd., (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, RASSF1A promotör bölgesi metilasyonu analizi, Japon popülasyonunda, bronkoskopi ile elde edilen balgam örneklerinde (KHAK: 8-KHDAK: 24) gerçekleştirilmiş, RASSF1A'nın hipermetilasyonu, küçük hücreli akciğer kanserinin % 50'sinde (4/8) ve küçük hücre dışı akciğer kanserinin % 21'inde (5/24) belirlenmiştir. Yanagawa vd., (2003), Japon popülasyonunda, 75 KHDAK dokusunda ve 75 neoplastik olmayan akciğer dokusunda -APC, DAP-kinaz, E-kadherin, GSTP1, Hmlh1, p16, RASSF1A ve RUNX3 genlerinin promotör metilasyon durumunu incelemişler ve KHDAK dokularında RASSF1A metilasyon oranını % 43 (32/75) ve neoplastik olmayan akciğer dokularında RASSF1A metilasyonu oranını % 4 (3/75) olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada yine, p16, RASSF1A ve RUNX3'ün, KHDAK'li hastalarda moleküler biyomarkır olarak kullanılabileceğini de bildirmişlerdir. Chen vd., (2006), Çin popülasyonunda, 114 primer KHDAK olgusunda, RASGRF2 ve RASSF1A metilasyon oranını sırasıyla, % 34 (39/114) ve % 39 (44/111) olarak saptanmışlardır. Wang vd., (2004), ABD'de yaptıkları çalışmada, küratif amaçlı cerrahi girişim uygulanan KHDAK'li, 119 hasta üzerinde p16INK4a ve RASSF1A promotör metilasyonu sırasıyla, 58 (% 49) tümör ve 46 (% 39) tümörde bulmuşlardır. Wang vd., (2007), ABD'de yaptıkları başka bir çalışmada, 80 KHDAK'li hastanın serum DNA'sında, RASSF1A hipermetilasyonunu % 33,8 olarak saptamışlardır. Toyooka vd., (2004), Japon popülasyonunda, akciğer kanserlerinde sıklıkla metillenmiş olan ve akciğer kanserlerinin moleküler patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülen beş genin (p16INK4a, RASSF1A, APC, RARβ ve CDH13) metilasyon durumunu, 351 KHDAK olgusunda incelemişlerdir ve bu çalışmada, P16INK4a 86 olguda (% 25), RASSF1A 120 olguda (% 34), APC 131 olguda (% 37), RARβ 98 olguda (% 28) ve CDH13 104 olguda (% 30) metile olarak bildirilmiştir. Seng vd., (2008), Avustralya popülasyonunda yaptıkları çalışmada 92 (% 38,7) adenokarsinom (ADC), 54 (% 22,7) büyük hücreli karsinom (LCC) ve 92 (% 38,7) skuamöz hücreli karsinomdan (SCC) oluşan toplam 238 KHDAK olgusunda, RASSF1A promotör metilasyon frekansını olarak % 32,6 (78/238) bildirilmişlerdir. Bu oran RBSP3 için % 85,

RASSF1A için % 67 ve NPRL2 için % 73'dür. Ayrıca çalışılan tüm genlerin adenokarsinomun ilerlemesine katıldığı gözlenmiştir (Agathangelou vd., 2001; Dammann vd., 2000; Dammann, Takahashi ve Pfeifer, 2001; Honorio vd., 2003; Yanagawa vd., 2003; Chen vd., 2006; Wang vd., 2004; Toyooka vd., 2004; Seng vd., 2008). Literatürdeki bu çalışmaların ortak özelliği akciğer kanserinde gen metilasyonlarında yükseklik tespit edilmesidir.

Li vd., (2003), Amerika popülasyonunda, 33 adenokarsinom, 12 büyük hücreli karsinom ve 20 skuamöz hücreli karsinom içeren 65 primer KHDAK'li hastada yaptıkları çalışmada, RASSF1A promotör metilasyon durumunu araştırmışlardır. RASSF1A promotör bölgesi metilasyonunu, akciğer adenokarsinomlarının % 55'inde, büyük hücreli karsinomların % 25'inde ve skuamöz hücreli karsinomların % 25'inde belirlemişlerdir. Choi vd., (2005), Kore popülasyonunda yaptıkları çalışmada, 116 KHDAK vakasında RASSF1A'nın erken tanı markırı olarak veya KHDAK için prognostik belirteç olarak kullanılabilir olup olmadığını araştırmışlardır. Sonuç olarak RASSF1A'nın metilasyon düzeyini, genel tümörler için % 40,5 (47/116), adenokarsinoma için % 48,6 (17/35) ve skuamöz hücreli karsinom için % 37,0 (30/81) olarak belirlemişlerdir. Marsit vd., (2004), Amerika popülasyonunda yaptıkları çalışmada, RASSF1A'nın hipermetilasyonunu, KHDAK'li olguların alt gruplarında incelemişlerdir. RASSF1A'nın 96 akciğer adenokarsinomun % 52'sinde (50/96), 61 skuamöz hücreli karsinomun % 31'inde (22/61), hipermetile olduğu bildirilmiştir. Niklinska vd., (2009), Polonya popülasyonunda yaptıkları çalışmada, 70 KHDAK'da RASSF1A promotör hipermetilasyonu, genel olarak tümörlerin % 26 (18/70)'sında, akciğer adenokarsinoma tümörlerinin % 45'inde, skuamöz hücreli karsinomların % 17'sinde ve büyük hücreli karsinomların % 22'sinde bildirilmiştir (Li vd., 2003; Choi vd., 2005; Marsit vd., 2004; Niklinska vd., 2009). Bu sonuçlar, 40 olguda, akciğer adenokarsinom dokusunda RASSF1A metilasyonu frekansının % 42,5 ve 40 kontrol dokusu metilasyon frekansının % 2,5 bulunduğu, Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızla tutarlıdır. Bu sonuç, RASSF1A promotör metilasyonunun, akciğer adenokarsinomu dokusunda yüksek frekansa sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde çalışılan tüm popülasyonlarda ve Türk popülasyonunda da yüksek RASSF1A promotör metilasyon profilinin gözlenmiş

olması, metilasyon profili açısından etnik farklılıktan etkilenmeyen RASSF1A geninin, erken tanı için aday biomarkır olabileceğini düşündürmektedir.

Yan vd., (2017), tarafından yapılan bir çalışmada, 82 akciğer adenokarsinomu doku örneğinde, tüm dokularda SPARCL1 ekspresyonunda downregülasyon ve % 99 promotör bölge hipermetilasyonu saptanmış ve bu da, SPARCL1'in akciğer adenokarsinomu için bir tümör supresör olduğunu, akciğer adenokarsinomu için biomarkır veya ilaç hedefi olabileceğini düşündürmüştür (Yan vd., 2017). Zhang vd., (2015), tarafından yapılan başka bir çalışmada ise SPARCL1, akciğer adenokarsinomunda en fazla hipermetilasyon gösteren ve downregüle olan 20 genin içinde 5. sırada yer almıştır (Zhang vd., 2015). Bu sonuçlar, 40 olgunun akciğer adenokarsinomu dokusunda SPARCL1 metilasyonu frekansının % 32,5 bulduğumuz ve 40 kontrol dokusunda metilasyon tespit etmediğimiz, Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızla tutarlıdır. Bizim sonuçlarımız da, SPARCL1 metilasyonunun, akciğer adenokarsinomu dokusunda yüksek frekansa sahip olduğunu göstermektedir. Türk popülasyonunda, yüksek SPARCL1 metilasyon profilinin gözlenmiş olması, tanı konusundaki aday biomarkır olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, patolojik evre, histolojik derece ve lenf nodu tutulumu gibi, klinopatolojik parametrelerle SPARCL1 metilasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Liu vd., (2007)'nin, beyaz ırkta ve Batı Pensilvanya'da, 122 KHDAK'li olguda yaptıkları çalışmada, RASSF1A promotör metilasyonu, tümör dokularının % 46,7'sinde tespit etmişlerdir ( $p=0,063$ ). Niklinska vd., (2009), Polonya popülasyonunda yaptıkları, 70 küçük hücreli olmayan akciğer kanserli olgunun değerlendirildiği, evre 1 ve evre 2'yi birlikte gruplandıkları çalışmada, RASSF1A metilasyonu evre 3A'da daha yüksek bulunmuştur. Niklinska vd., RASSF1A metilasyonu ile TNM evreleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir ( $p=0,03$ ). (Liu vd., 2007; Nilsinki vd., 2009). Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, KHDAK alt tipi olan akciğer adenokarsinomunda, evre 1 tümörlerde RASSF1A metilasyonu daha yüksek bulunmuş olup, RASSF1A promotör metilasyonunun, tümör evresiyle ( $p=0,594$ ), anlamlı bir ilişkisinin olmadığı tespit edilmiştir; çalışmamızın sonuçları, RASSF1A promotör metilasyonunun,

tümör evresiyle ilişkili olduğunu gösteren Liu vd., (2007), Nilsinki vd., (2009)'nın sonuçlarıyla, uyumsuzluk göstermektedir.

Endoh vd., (2003), Japon popülasyonunda, 67 akciğer adenokarsinom, 26 skuamöz hücreli karsinom, 4 büyük hücreli karsinom ve 3 adenoskuamöz karsinomun yer aldığı, 100 rezeke edilmiş KHDAK tümöründe yaptıkları çalışmada, RASSF1A promotör metilasyon frekansının % 42 olduğunu ve RASSF1A promotör metilasyonunun, tümör evresiyle ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Tomizawa vd., (2002), Japon popülasyonunda 110 adet, Evre 1 akciğer adenokarsinomaolgununda yaptıkları çalışmada, RASSF1A metilasyon frekansını, % 32 (35/110) olarak bildirmişler ve RASSF1A metilasyonu ile tümör evresi arasında anlamlı bir korelasyon bulamamışlardır. Choi vd., (2005), Kore popülasyonunda 116 KHDAK olgununda yaptıkları çalışmada, RASSF1A metilasyon frekansıyla, TNM evresi arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (Endoh vd., 2003; Tomizawa vd., 2002; Choi vd., 2005). Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, KHDAK alt tipi olan akciğer adenokarsinomunda, RASSF1A promotör metilasyonunun, tümör evresiyle anlamlı bir ilişkisi olmadığı ( $p=0,594$ ) bulunmuş olduğundan; çalışmamızın sonuçları RASSF1A promotör metilasyonunun, klinopatolojik verilerden tümör evresiyle, ilişkili olmadığını gösteren Endoh vd., (2003), Tomizawa vd., (2002) Choi vd., (2005) sonuçlarıyla, uyumluluk göstermektedir.

Endoh vd., (2003)'nin, Japon popülasyonunda, 100 rezeke edilmiş KHDAK'li tümörde yaptıkları çalışmada, RASSF1A promotör metilasyonu ile tümör histolojik derecesinin ilişkili olmadığını bildirilmiştir (Endoh vd., 2003). Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, KHDAK alt tipi olan akciğer adenokarsinomunda, RASSF1A promotör metilasyonunun, histolojik dereceyle anlamlı bir ilişkisinin olmadığını ( $p=0,782$ ) bulunmuş olduğundan, çalışmamızın sonuçları, RASSF1A promotör metilasyonunun, tümör derecesiyle ilişkili olmadığını gösteren Endoh vd., (2003)'nin sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

Gao vd., (2016)'nın, Çin popülasyonunda, 50 KHDAK'li hastanın ve 50 kontrol bireyinin periferik kan örnekleriyle yaptıkları çalışmada, histolojik derece ile RASSF1A metilasyonu arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmiş, RASSF1A

metilasyonunun, Grade 2 ve Grade 3 tümörlerde, Grade 1 tümörlerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir ( $p=0,02$ ). Choi vd., (2005), Kore popülasyonunda, 116 KHDAK'li olgu ile yaptıkları çalışmada, RASSF1A metilasyonu ile; proliferatif tümör hücrelerinin farklılaşması arasında anlamlı bir ilişki belirlemişlerdir ( $p=0,0039$ ) (Gao vd., 2016; Choi vd., 2005). Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, KHDAK alt tipi olan akciğer adenokarsinomunda, RASSF1A promotör metilasyonunun, tümör histolojik derecesiyle, anlamlı bir ilişkisinin olmadığı ( $p=0,782$ ) bulunmuş olduğundan, çalışmamızın sonuçları, RASSF1A promotör metilasyonunun, tümör derecesiyle ilişkili olduğunu gösteren Gao vd., (2016), Choi vd., (2005), sonuçlarıyla uyumsuzluk göstermektedir.

Choi vd., (2005), Kore popülasyonunda, 116 KHDAK'li olguda yaptıkları çalışmada, RASSF1A'nın metilasyonu ile lenfatik permeasyon arasında ilişki bulamamışlardır (Choi vd., 2005). Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, KHDAK alt tipi olan akciğer adenokarsinomunda, RASSF1A promotör metilasyonunun, lenf nodu tutulumuyla anlamlı bir birlikteliği olmadığı ( $p=0,221$ ) bulunmuş olduğundan, çalışmamızın sonuçları, RASSF1A promotör metilasyonu ile lenf nodu tutulumu arasında anlamlı bir ilişki olmadığını gösteren, Choi vd., (2005)'nin sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

Chen vd., (2017), Çin popülasyonunda, 65'i skuamöz karsinom, 42'si adenokarsinom ve 15'i adenoskuamöz karsinom olmak üzere, 122 KHDAK tümör dokusunda, lenf nodu metastazı ile RASSF1A'nın ekspresyon yoğunluğundaki azalışın, istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir ( $p<0,01$ ). Gao vd., (2016), Çin popülasyonunda, 50 KHDAK'li hastanın ve 50 kontrol bireyinin periferik kan örnekleriyle yaptıkları çalışmada, RASSF1A hipermetilasyon frekansını, % 62 olarak bulmuşlar ve hipermetilasyonla, lenf nodu metastazı arasında güçlü bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir ( $p=0,031$ ) (Chen vd., 2017; Gao vd., 2016). Türk popülasyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, KHDAK alt tipi olan akciğer adenokarsinomunda, RASSF1A promotör metilasyonu ile lenf nodu tutulumu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı ( $p=0,221$ ) bulunmuş olduğundan, çalışmamızın sonuçları RASSF1A promotör metilasyonunun lenf nodu tutulumuyla,

anlamli bir iliŒki içinde olduğunu gösteren Chen vd., (2017) ile Gao vd., (2016)'nın sonuçlarıyla, uyumsuzluk göstermektedir.

Akciğer adenokarsinoma doku rneklelerinin değerlendirildiği çalışmamızdan elde edilen veriler, literatürdeki bulgular ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. Benzer çalışmalarda farklı bulguların elde edilmesi, çalışmalarda değerlendirilen örnek tipi, bisülfit uygulaması, MSP yöntemi ve bu yöntemlerde kullanılan primer dizilerindeki farklılıklar ile açıklanmıştır. Bislfit uygulama basamağı, metilasyon profilini belirlemede çok önemli bir basamaktır. Bu uygulama sırasında kullanılan kimyasalların etkisi ile DNA'da sıklıkla değerasyonlar meydana gelebilmektedir. Sitozinlerin deaminasyonu sonucu ortaya çıkan urasiller gibi, 5-metilsitozin uygunsuz dönüşümü ile ortaya çıkan timinler, PCR sırasında adenin ile eşleşmekte ve bunun sonucunda, uygunsuz dönüşüme uğrayan 5-metilsitosinler, metillenmemiş olarak yanlış yorumlanabilmektedir. Uygun olmayan dönüşüm gerçekleştiğinde ve veri analizinde göz ardı edildiğinde, genomik metilasyon yoğunluklarında eksik tahminlerine yol açabilmektedir (Genereux vd., 2009).

## 5. SONUÇ

DNA metilasyonu, kanserle ilişkili genlerin aktivasyonuna/inaktivasyonuna neden olan mekanizmadan biridir. KHDAK gibi birçok kanser türünde, hedef genlerin hipermetilasyonunun tanı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kanserleşme sürecinde, özellikle tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonunun, erken evrede gözlenen bir olay olması, hipermetilasyonun erken tanı için bir marker olabileceğini düşündürmektedir. RASSF1A hipermetilasyonunun, insan kanserlerinin, en sık rastlanılan tümör supresör gen değişikliği olduğu, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. SPARCL1'in downregülasyonu, çeşitli tümörlerde bulunmuş ve SPARCL1'in kanser teşhisi ve terapisi için potansiyel hedef gen ve bir tümör supresör gen adayı olabileceği düşünülmüştür. SPARCL1, bir allelinde bir mutasyon olup, diğer allelinde de mutasyona uğrayan klasik bir tümör supresör gen olma özelliği göstermemektedir. Bu yüzden SPARCL1'in tümör supresyon özelliğinin kaybının, metilasyonla olma durumu ihtimali yüksektir.

RASSF1A geni promotör metilasyonu ile, akciğer adenokarsinomu arasındaki asosiyasyon, farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda, küçük hücre dışı akciğer karsinomunun, en sık görülen tipi olan akciğer adenokarsinomunda, RASSF1A ve SPARCL1 genlerinin metilasyon durumlarının, Türk popülasyonunda belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha önce, başka popülasyonlarda yapılan çalışmalarda RASSF1A ve SPARCL1 genlerinin metilasyonu ile akciğer adenokarsinomu arasında asosiyasyon bulunmasına karşın, klinopatolojik verilerle asosiyasyon açısından çelişkiler bulunmaktadır. Çalışmamızda akciğer adenokarsinomu tümör dokularında, RASSF1A metilasyon frekansı % 42,5, SPARCL1 metilasyon frekansı % 32,5 olarak tespit edilmiştir ve metilasyon frekansı, akciğer adenokarsinomu tümör dokularında, kontrol dokularından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,000$ ); ancak tümör dokusu metilasyonu ile klinopatolojik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik bulunmamaktadır. Bu sonuç, literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla RASSF1A ve SPARCL1 geni metilasyon durumunu akciğer adenokarsinomunda birlikte değerlendiren ilk çalışmadır. Literatürde olduğu gibi,



bizim çalışmamızda da, kontrol dokularına göre anlamlı derecede yüksek metilasyon görülmesi, bu genlerin hipermetilasyonunun adenokarsinom tanısında biomarker olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abraham, J., Allegra, C. J., & Gulley, J. (2009). Klinik Onkoloji El Kitabı, Cem Parlak ve Alpaslan Mayadagi, *Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s35.*
- Agathangelou, A., Cooper, W. N., & Latif, F. (2005). Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Research, 1*;65 (9):3497-508.
- Ak, G., Metintaş, M., Yıldırım, H., Metintaş, S., Erginel, S., & Alataş, F. (2009). Akciğer Adenokarsinomlu Olguların Sigara Öyküsüne Göre Özellikleri. *Türk Toraks Dergisi, 10*, 69-74
- Akbaş, E., Seyrek, E., Erdoğan, E. N., Şenli, H., & Helvacı, İ. (2012). Glutathione S-transferase P1 geni ekson-6 (ala114val) polimorfizminin akciğer kanseri etyolojisindeki olası etkileri. *Dicle Tıp Dergisi, 39*(3), 344-349.
- Akkaya, Y. Z., & Dinçer, P. (2013). Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal, 26*, 18-10
- Akşahin, A., & Çolak, D. (2011). Meme Kanserli Hastalarımızın Beyin Metastazı Açısından Retrospektif Gözden Geçirilmesi. *Ortadoğu Tıp Dergisi, 3* (2), 54-60.
- Alar, T., & Şahin, M. E. (2012). Akciğer Kanseri: Birinci Basamakta Tanı, Tedavi ve Korunma. *Smyrna Tıp Dergisi, 68-74.*
- Aydiner, A., & Can, G. (2010). Akciğer Kanserinde Tedavi ve Bakım. 10/11/2016 tarihinde [http://www.akad.org.tr/userfiles/file/akciger\\_kanser\\_kitap.pdf](http://www.akad.org.tr/userfiles/file/akciger_kanser_kitap.pdf) adresinden erişilmiştir.
- Bağcı, Ö. (2014). mikroRNA'lar (miRNA) ve Kanser. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 40* (2), 105-109.
- Bendik, I., Schraml, P., & Ludwig, C. U. (1998). Characterization of MAST9/Hevin, a SPARC-like protein, that is down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Research 58*: 626-629,
- Bhattacharjee, A., Richards W. G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., vd. (2001). Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 20*;98 (24):13790-5.
- Bissels, U., Bosio, A., & Wagner, W. (2012). MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica, 97* (2), 160–167.

- Bodur, E., & Demirpençe, E. (2010). Kodlamayan RNA'lar ve Gen Susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 82-89
- Borcuk, C. A., Toonkel, L. R., & Powell, A. C. (2009). Genomics of Lung Cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 15; 6 (2): 152–158.
- Büyükgüzel, K. (2000). Ökaryotlardaki Transkripsiyonu Düzenleyici Proteinler. *Turkish Journal of Biology*, 24, 521–531
- Can, İ. M., & Aslan, M. (2016). Epigenetik Mekanizmalar ve Bazı Güncel Çalışmalar. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6 (2), 445-45.
- Canpolat, F., Cemil, Ç. B., Eskiöglü, F., & Han, Ü. (2009). Deri Metastazı Olan Akciğer Skuamöz Hücreli Karsinomlu Bir Olgu. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi*, 19 (2), 118-21.
- Castro, M., Grau, L., Puerta, P., Gimenez, L., Venditti, J., Quadrelli, S., & Sánchez-Carbayo, M. (2010). Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *Journal Translational Medicine*, 8: 86.
- Chan, K. C., Jiang, P., Chan, W. C., Sun, K., Wong, J., Hui, P. E., Chan, L. vd. (2013). Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 19; 110 (47): 18761–18768.
- Chen, H., Suzuki, M., Nakamura, Y., Ohira, M., Ando, S., Iida, T., Nakajima, T., Nakagawara, A., & Kimura, H. (2006). Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol Reports*. 15 (5):1281-5.
- Chen, S., Jiao, S., Jia, Y., & Li, Y. (2015). Effects of targeted silencing of FOXC1 gene on proliferation and in vitro migration of human non-small-cell lung carcinoma cells. *American Journal of Translational Research*, 8 (8), 3309-3318.
- Chen, T., Sun, Z., Liu, F., & Wang, Q. (2017). RASSF1A and SIRT6 in non-small cell lung cancer: Relationship with clinical outcome. *Oncol Letters*.14 (5): 5759–5764.
- Choi, N., Son, D., Lee, H., Lim, Y., Song, M., Lim, D., Lee, J., Kim, H., & Kim, J. (2005). RASSF1A is not appropriate as an early detection marker or a prognostic marker for non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer Research*, 115, 575–581.
- Chow, L. S., Lam, C. W., Chan, S. Y., Tsao, S. W., To, K. F., Tong, S. F. vd., (2006). Identification of RASSF1A modulated genes in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, (25), 310-316.

- Claeskens, A., Ongenaes, N., & Neefs, J. M., vd., (2000). Hevin is down-regulated in many cancers and is a negative regulator of cell growth and proliferation. *British Journal of Cancer*, 82: 1123-1130,
- Cooper, M. G., & Hausman, E. R. (2006). *Hücre Moleküler Yaklaşım*. (3. Basım). İzmir, İzmir Tıp.
- Çok, G. (2018). Akciğer Kanserinde TNM Evrelemesi. *Nükleer Tıp Seminerleri*, (4), 1-5.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J. H., Çene, P. L., Bates, S., & Pfeifer, G. P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Natura Genetic*, 25 (3):315-9
- Dammann, R., Takahashi, T., & Pfeifer, G. P. (2001). The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene*, 14 ;20 (27):3563-7.
- Das, M. P., & Singal, R. (2004). DNA Methylation and Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*, 22 (22).
- Ding, I., Getz, G., Wheeler, A. D., Mardis, R. E., McLellan, D. M., Cibulskis, K., vd. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455, 1069-1075.
- Doğan, M., Demirkazık, A., Tutkun, A., Sak, D. S., Ceyhan, K., Yalçın, B., Akbuluk H., & İçli, F. (2014). The Relationship Between Common EGFR, BRAF, KRAS Mutations and Prognosis in Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer with Response to the Treatment in. *Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 1 (24). doi: 10.4999/uhod.13083.
- Donninger, H., Clark, J. A., Monaghan, M. K., Schmidt, M. L., Vos, M., & Clark, J. G. (2014). Cell Cycle Restriction Is More Important Than Apoptosis Induction for RASSF1A Protein Tumor Suppression. *The Journal of Biological Chemistry*, (29) 45, 31287–31295.
- Donninger, H., Vos, D. M., & Clark, J. G. (2007). The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of Cell Science*, 120, 3163-3172.
- Dubey, S., & Powell, A. C. (2009). Akciğer Kanseri 2008 Güncelleme. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179, 860-868.
- Ece, F., & Kömürcüoğlu, B. (2010). Akciğer Kanserinde Proteomik ve Genomik Yaklaşım. *Solunum*, 12 (2), 59–65.
- Ecevit, H., Motor, S., & İzmirli, M. (2013). Genden Tedaviye Yeni Yaklaşımlar: Kodlamayan Nükleik Asitler. *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Dergisi*, (4), 13.

- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, (21): 5400-5413.
- Ekmekçi, A., Konaç, E., & Önen, İ. (2008). Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal*, 21 (3),282-295.
- Endoh, H., Yatabe, Y., Shimizu, S., Tajima, K., Kuwano, H., Takahashi, T., & Mitsudomi, T. (2006). RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication. *International Journal of Cancer*, 10; 106 (1):45-51.
- Erbaycu, E. A. (2009). Sigara İçenlerde ve İçmeyenlerde Akciğer Kanseri: Genel Özelliklerde Farklılık Var mı? *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, (2), 19.
- Ergelen, R., & Çimşit, Ç. N. (2013). Akciğer Tümörleri. *Toraks Cerrahi Bülteni*, 4 (3), 178-188.
- Ermış, H., Haltaş, H., Yıldırım, Z., & Edalı, N. M. (2004). Akciğerin Skuamöz Hücreli Karsinomunun Meme Cildine Metastazı: Olgu Sunumu. *Solunum Hastalıkları*, 15, 105-108.
- Gao, W., Zhou, Z., Liu, Y., Liu, D., Feng, Q., & Xu, Y. (2016). Prognostic significance of BRCA1 and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer patients. *International journal of clinical and experimental pathology*, 9 (8): 8544-8549
- Garber, M. E., Troyanskaya, O. G., Schluens, K., Petersen, S., Thaesler, Z., Pacyna-Gengelbach, M., vd., (2001). Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 20; 98 (24): 13784-9.
- Garzon, M., Villatoro, S., Teixidó, C., Mayo, C., Martínez, A., Gil, L. M., Viteri, S., Morales-Espinosa, D., & Rosell, R. (2016). KRAS mutations in the circulating free DNA (cfDNA) of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Transl Lung Cancer Res*, 5 (5), 511–516.
- Genereux, D. P., Johnson, W. C., Burden, A. F., Stöger, R., & Laird, C. D. (2008). Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic Acids Research*. 37 (15): 5235.
- Görür, A., & Tamer, L. (2011). MikroRNA'ların Terapötik Kullanımı. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi*, 4 (2).
- Gravenda, M. A., & O'Neill, E. (2015). Clinical utility of RASSF1A methylation inhumanmalignancies. *British Journal of Cancer*, 113, 372–381.
- Güler, C., & Peynircioğlu, B. B. (2016). DNA Metilasyonu ve Hastalıklarla İlişkisi *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 61-68.

- Günel, N., Gülbahar, G., Öztürk, B. E., & Dural, K. (2016). Akciğer Kanserinde Prognostik Faktörler. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*, 7 (2), 39-47.
- Güngör, F. Ö., & Ünal, N. (2015). Epigenetik ve genomik baskılanma. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 55 (2) 73-81.
- Gürel, Ç., Nursal, F. A., & Yiğit, S. (2016). Epigenetik ve Kanser. *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topic*, 2 (1), 45-51.
- Güzelgül, F., & Aksoy, K. (2009). Kodlanmayan Rna'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları. *Arşiv Tarama Dergisi*, 18, 141-55.
- Güzelgül, F., & Aksoy, K. (2015). Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24 (4), 472-493.
- Halpain, S., & Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 7 (6): 224.
- Han, J., Xu, F., Qi, G., Wei, Y., Li, Y., Zhang, Y., Li, Y., Wang, X., Li, X., Jin, L., Jia, J., & Ma, Z. (2016). Promoter methylations of RASSF1A and p16 is associated with clinicopathological features in lung cancers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12 (1), 340-9.
- Honorio, S., Agathangelou, A., Schuermann, M., Pankow, W., Viacava, P. E. R., Maher., & Latif, F. (2003). Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients. *Oncogene* 22, 147–150
- Hou, J., Meng, F., Chan, C. W. L., Cho, S. C. W., & Wong, C. C. S. (2016). Circulating Plasma MicroRNAs As Diagnostic Markers for NSCLC. *Frontiers in Genetics*, 7, 193.
- Hu, H., Zhang, H., Ge, W., Liu, X., Lorea, S., Chu, P., Chen, H., Peng, J., Zhou, L., Yu, S., Yuan, Y., Zhang, S., Lai, L., Yen, Y., & Zheng, S. (2012). Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteines-like 1 Suppresses Aggressiveness and Predicts Better Survival in Colorectal Cancers. *Clinical Cancer Research*, 18 (19); 5438–48.
- Hughes, L. L., Tomasa, V. M., Acuña, M. L., & Lopez, M. W. (2008). Chromatin-remodelling mechanisms in cancer. *Mutation Research*, (65), 191-214.
- Isler, S. G., Ludwig, C. U., Chiquet-Ehrismann, R., & Schenk, S. (2004). Evidence for transcriptional repression of SPARC-like 1, a gene downregulated in human lung tumors. *International Journal of Oncology*, 25: 1073 1079.
- İzmirli, M. (2013). Epigenetik Mekanizmlar Ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20 (1), 48-51.

- Jakharia, A., Borkakty, B., & Sing, S. (2016). Expression of SPARC like protein 1 (SPARCL1), extracellular matrix-associated protein is down regulated in gastric adenocarcinoma. *Journal of Gastrointest Oncology*, 7 (2), 278–283.
- Jovanovic, J., Ronneberg, A. J., Tost, J., & Kristensena, V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology*, (4), 242-254.
- Kara, K., & Öztürk, E. (2012). Akciğer Kanseri Radyoloji. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 11 (6),749-753. 5
- Karaaslan, Ö. Z., & Serin, S. M. (2016). Hastalıkların tanı ve tedavi stratejilerinde miRNA ve diğer non-protein-coding RNA'lar. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi*, (9) 3.
- Kaynak, K., Akgöz, B., Demirkaya, A., Erflen, E., Kara, M., & Öz, B. (2007). Akciğer Evre I Epidermoid Karsinomlu Olgularda Otokrin Hareket Faktör Reseptörü Varlığının Sağkalıma Etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahi Dergisi*, 15 (3),233-237.
- Kefeli, U. (2015). Akciğer Kanseri Sağkalımı Etkileyen Klinikopatolojik Özellikler. *Marmara Medical Journal*, 28, 21-26.
- Kılıç, C. (2016). Akciğerlerin Anatomisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, DOI: 10.4328/JCAM.964.
- Kiyohara, C., Otsu, A., Shirakawa, T., Fukuda, S., & Hopkini, M. J. (2002). Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a Review. *Lung Cancer*, (37) 241-256.
- Konaç, E., Önen, İ. H., & Sözen, S. (2010). miRNA'ların Yeri ve Önemi. *Üroonkoloji Bülteni*, (1).
- Köktürk, N., Kırıçoğlu, E. C., & Öztürk, C. (2003). Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. *Solunum*, 5, 127-138.
- Krimsky, W., Muganlinskaya, N., Sarkar, S., Vulchi, M., Patel, P., Rao, S., Hammer, J., Evans, R., Qureshi, M., & Harley, D. (2016). The Changing Anatomic Position Of Squamous Cell Carcinoma Of The Lung – A New Conundrum. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, 15 (6), 33299.
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics*, (70), 27-56.
- Küçük, G. İ., Küçük, Ş., & Sunay, D. (2014). Sol Klavikula Ağrısı İle Gelen Hastada Saptanan Akciğer Adenokarsinom Olgusu. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 15 (1) 51-54.

- Lafon-Hughes, L., Di, T. M. L., Mendez-Acuna, L., & Martinez-Lopez, W. (2008). Chromatin-remodelling mechanisms in cancer. *Mutation Research*, 658 (3): 191-214
- Laird, W. P. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, (3) 253-266.
- Laird, W. P., & Jaenisch, R. (1994). DNA Methylation and Cancer. *Human Molecular Genetics*, (3) 1487-95.
- Lewandoska, P. D., Kordiak, J., Sęk, M. M., Czarnecka, H. K., Antczak, A., Gorski, P., Nawrot, E., Kiszalkiewicz, M. J., Domanska, D., & Lasota, B. E. (2015). Quantitative analysis of mRNA expression levels and DNA methylation profiles of three neighboring genes: FUS1, NPRL2/G21 and RASSF1A in non-small cell lung cancer patients. *Respiratory Research* 16 (1), 76.
- Li, J., Zhang, Z., Dai, Z., Popkiew, P. A., Plassy, C., Morrisony, C., Wang, Y., & You, M. (2003). RASSF1A Promoter Methylation and Kras2 Mutations in Non Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia*, 5 (4), 362-366.
- Liu, X., Chen, X., Yu, X., Tao, Y., Bode, M. A., Dong, Z., & Cao, Y. (2013). Regulation of MicroRNAs by Epigenetics and Their Interplay Involved in Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32: 96.
- Liu, Y., Gao W., Siegfried, M. J., Weissfel, L. J., Luketich, D. J., & Keohavong, P. (2007). Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53 and EGPR in lung tumors from smokers and never- smokers. *BMC Cancer*, 7: 74.
- Lopez-Cima, F. M., Gonzalez-Arriaga, P., Garcia-Castro, L., Pascual, T., Marron, G. M., Puente, S. X., & Tardon, A. (2007). Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. *BMC Cancer*, (7) 162.
- Lu, F., & Zhang, H. (2011). DNA Methylation and Nonsmall Cell Lung Cancer. *The Anatomical Record*, 294: 1787–1795.
- Marsit, J. C., Kim, D-H., Liu, M., Hinds, W. P., Wiencke, K. J., Nelsons, H. H., & Kelsey, T. K. (2005). Hypermethylation of RASSF1A and BLU tumor suppressor genes in non-small cell lung cancer: Implications for tobaccosmokingduringadolescence. *International Journal of Cancer*, 114, 219–223.
- Memiş, L. (1996). Akciğer Adenokarsinomları. *Ankara Patoloji Bülteni* 13 (2), 5-7.
- Murray, G. P., Qiu, G., Waites, R. E., Srivastava, G., Heys, D., Agathangelou, A., vd., (2004). Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, 23, 1326–1331.



- Müller, Z. S., Minna, D. J., & Gazdar, F. A. (2002). Aberrant DNA Methylation in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. *Oncologist*, (7) 451-457.
- Niklinska, W., Naumnik, W., Sulewska, A., Kozlowski, M., Pankiewicz, W., & Milewski, R. (2009) Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47 (2): 275-80
- Öz, G., Ulaşlı, S. S., Günay, E., Uysal, M., Ahsen, A., & Solak, O. (2013). Akciğer Kanseri Konusunda bilimsel yayınlar: Türkiye'den bir bakış, *Tüberk Toraks*, 61 (4): 351-354
- Özbayer, C., Değirmenci, İ., Üstüner, D., Ak, G., Saydam, F., Çolak, E., Güneş, V. H., & Metintaş, M. (2014). DNA Metiltransferaz-3b ve Metil Bağlayan Bölge Proteini-1'i Hedefleyen Mirna Gen. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 36 (2), 16-26.
- Özdemir, S., & Özdemir, Ö. (2014). Tiroid kanserinde moleküler etyolojik faktörler, *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 36, 128-146.
- Özkan, M., & Er, Ö. (2003). Rezeke Edilemeyen Akciğer Adenokarsinomlarında Klinik Seyir. *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 13 (4), 212-217.
- Pehlivan, M., Yılmaz, U., Koyuncuoğlu, M., İtil, O., Sevinç, C., & Akkoçlu, A. (2002). Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde p53 Ekspresyonunun Kemoterapiye Yanıt ve Sağkalım Üzerine Etkisi. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 50 (1), 29-33.
- Pfeifer, P. G., Yoon, H. J., Liu, L., Tommasi, S., Wilczynski, P. S., & Dammann, R. (2005). Methylation of the RASSF1A Gene in Human Cancers. *Biological Chemistry*, 383 (6), 907–914.
- Pfeifer, P. G., & Dammann, R. (2005). Methylation of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Human Tumors. *Biochemistry (Moscow)*, 70 (5): 576-583.
- Prokhortchouk, E., & Hendrich. (2002). Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs?. *Onkogene*, 21, 5394–5399.
- Qian, J., Gao, Z., Dong, Y., Pei, J., Ma, M., & Han, B. (2016). Downregulation of HIF-1 $\alpha$  inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer NCI-H157 cells. *Oncology Letters*, 11 (3), 1738-1744.
- Rong, R., Jin, W., Zhang, J., Sheikh, S. M., & Huang, Y. (2004). Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest. *Oncogene*, 23, 8216–8230.
- Sayın, B. D. (2008). Metilasyon ve Kanser. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28: 513-514

- Semiz, D. B. (1990). *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi Fizyolojisi*. Marmara Üniversitesi Yayını No:15, İstanbul.
- Seng, T. J., Currey, N., Cooper, W. A., Lee, C. S., Chan, C., Horvath, L., Sutherland, R. L., Kennedy, C., McCaughan, B., & Kohonen-Corish, M. R. (2008) DLEC1 and MLH1 promoter methylation are associated with poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *British Journal of Cancer*, 22; 99 (2): 375-82.
- Serilmez, M., Soydiç, O. H., Çamlıca, H., Topuz, E., & Duranyıldız, D. (2010). Akciğer kanserinde hematolojik parametreler. *Türk Onkoloji Dergisi*, 25 (3), 87-92.
- Singal, R., & Ginder, D. G. (1999). DNA Methylation. *Blood*. 93: 4059-4070
- Sudhakar, A. (2009). History of Canser, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Canser Science and Therapy*, 1 (2), 1-4.
- Şen, E., Gönüllü, U., & Akar, N. (2005). The detection of quantitative serum p53 protein in lung cancer. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 53 (3), 231-237.
- Tai, C. M., Yanagisawa, K., Nakatochi, M., Hotta, N., Hosono, Y., Kawaguchi, K., Naito, M., Taniguchi, H., Wakai, K., Yokoi, K., & Takahashi, T. (2016). Blood-borne miRNA profile-based diagnostic classifier for lung adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 6: 31389.
- Taştepe, A. İ. (1998). *Akciğer Kanserinde Güncel Tanı ve Tedavi Yaklaşımı*, (Editör: Abdullah İrfan Taştepe), Akciğer Kanseri Etiyolojisi, Derman Tıbbi Yayıncılık, Ankara.
- Tomizawa, Y., Kohno, T., Kondo, H., Otsuka, A., Nishioka, M., Niki, T., Yamada, T., Maeshima, A., Yoshimura, K., Saito, R., Minna, D. J., & Yokota, J. (2002). Clinicopathological Significance of Epigenetic Inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in Stage I Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 8, 2362–2368.
- Toyooka, S., Suzuki, M., Maruyama, R., Toyooka, O. K., Tsukuda, K., Fukuyama, Y., Iizasa, T., Aoe, M., Date, H., Fujisawa, T., Shimizu, N., & Gazdar F. A. (2004). The relationship between aberrant methylation and survival in non-small-cell lung cancers. *British Journal Cancer*, 16; 91(4): 771–774.
- Travis, D. W., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, G. A., Geisinger, R. K., Yatabe, Y., vd., (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6, 2.

- Tuncel, N., Aydın, S., & Zeytinöğlü, M. (2006). *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi*. Anadolu Web-Ofset Tesisleri, Eskişehir, ISBN 975-492-997 28.12.2017 tarihinde [https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=ynWgCp9KzfYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=solunum+sistemi+anatomisi&ots=QCcHdQzE-v&sig=xQP0yUi9cuEKDXltnHJEN1EIsiI&redir\\_esc=y#v=onepage&q=1&f=false](https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=ynWgCp9KzfYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=solunum+sistemi+anatomisi&ots=QCcHdQzE-v&sig=xQP0yUi9cuEKDXltnHJEN1EIsiI&redir_esc=y#v=onepage&q=1&f=false) adresinden erişilmiştir.
- Turna, A., Ak, G., Kömürcüoğlu, E. B., Yurt, S., & Yılmaz, Ü. (2017). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sekizinci evreleme veuygulamadaki etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 25 (3): 484-498.
- Uludağ, A., Artan, S., Tepeli, E., Büyükpınarbaşılı, N., Müslümanoğlu, H. M., Özdemir, M., Öznur, M., Aslan, H., & Çilingir, O. (2013). Analysis of Methylation Patterns of Some Tumor Suppressor Genes in Non-Small Cell Lung Cancer Using the Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification [MLPA] Method. *International Journal of Clinical Research*, 1 (2): 58-66.
- URL-1. 09.05.2018 tarihinde <https://humananatomyly.com/segments-of-the-lung/segments-of-the-lung-segments-of-the-lung-human-anatomy-labelled-2/> adresinden erişilmiştir.
- URL-2. 27.12.2017 tarihinde <http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46551.html> adresinden erişilmiştir.
- URL-3. 14/12/2016 tarihinde [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color\\_palette=default](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default) adresinden erişilmiştir.
- URL-4. Kanser Gündemi Dergisi (Ed: Ergüney, S.),Türkiye Kanserde Savaş Derneği, 09.10.2016 tarihinde [http://www.kanservakfi.com/yayinlar/akcigerkanseri\\_sayi1/index.html](http://www.kanservakfi.com/yayinlar/akcigerkanseri_sayi1/index.html) adresinden erişilmiştir.
- URL-5. 18/12/2016 tarihinde <https://omim.org/entry/211980> adresinden erişilmiştir.
- URL-6. 10/11/2016 tarihinde [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG0000068028;r=3:50329788-50340912;t=ENST00000359365](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG0000068028;r=3:50329788-50340912;t=ENST00000359365) adresinden erişilmiştir.
- URL-7. 26/12/16 tarihinde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11186> adresinden erişilmiştir.
- URL-8. 14/08/2017 tarihinde <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPARCL1> adresinden erişilmiştir.

- Wang, J., Lee, J., Wang, L., Liu, D. D., Lu, C., Fan, H., Hong, K. W., & Mao, L. (2004). Value of p16INK4a and RASSF1A Promoter Hypermethylation in Prognosis of Patients with Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10, 6119–6125.
- Wang, Y., Yu, Z., Wang, T., Zhang, J., Hong, L., & Chen, L. (2007). Identification of epigenetic aberrant promoter methylation of RASSF1A in serum DNA and its clinicopathological significance in lung cancer. *Lung Cancer*, 56 (2) 289–294
- William, S. K., Spencer, A. C., & Cummings, R. M. (2011). *Genetik Kavramlar*. (8. Basım). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Xu, H., Zhan, W., & Chen, Z. (2016). Ras-Association Domain Family 1 Isoform A (RASSF1A) Gene Polymorphism rs1989839 is Associated with Risk and Metastatic Potential of Osteosarcoma in Young Chinese Individuals: A Multi-Center, Case-Control Study. *Medical Science Monitor*, 16; 22, 4529–4535.
- Yan, H., Guan, Q., He, J., Lin, Y., Zhang, J., Li, H., Liu, H., Gu, Y., Guol, Z., & He, F. (2017). Individualized analysis reveals CpG sites with methylation aberrations in almost all lung adenocarcinoma tissues. *Journal of Translational Medicine*, 15: 26.
- Yanagawa, N., Tamura, G., Oizumi, H., Takahashi, N., Shimazaki, Y., & Motoyama, T. (2003). Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Scientific*, 94, (7) 589–592
- Yaren, S., & Öztop, İ. (2006). Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserinde Adjuvan Kemoterapi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 26, 649-654.
- Yaykaşlı, O. K., Hatipoğlu, F. Ö., Kaya, E., & Yaykaşlı, E. (2012). Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser. *Düzce Tıp Dergisi*, 14 (3), 58-68.
- Yıldırım, C. H., Ergen, A. Ş., Tiken, E. E., Zalova, G., Turna, H., Öksüz, Ç. D., & Dinçbaş, Ö. F. (2015). Sınırlı evre küçük hücreli akciğer kanseri: Tedavi sonuçları ve prognostik faktörler. *Türk Onkoloji Dergisi*, 30 (4), 188-194.
- Yılmazbayhan, D., & Özlük, Y. (2010). Küçük Hücre Dışı Akciğer Karsinomlarında Patoloji. DOI: 10.4328/JCAM.35.
- Yokuş, B., & Çakır, Ü. D. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (2): 7-18.
- Yüce, D. G., & Ersoy, O. E. (2016). Akciğer Kanseri ve Epigenetik Değişiklikler. *Tuberk Toraks*, 64 (2), 163-170.

- Zamani, G. A., & Yıldırım, A. (2014). Biyomarker Olarak Sitokrom P450 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi. *Tip Araştırmaları Dergisi*, 12 (1): 37-42.
- Zamani, G. A., & Zamani, A. (2013). MikroRNA'lar ve Akciğer Kanseri. *Tuberk Toraks*, 61 (1), 57-62.
- Zhang, H., Widegren, E., Wang, D. W., & Sun, X. F. (2011). SPARCL1: a potential molecule associated with tumor diagnosis, progression and prognosis of colorectal cancer. *Tumour Biology*, 32 (6), 1225-31.
- Zhang, Q. H., Dai, X. H., Dai, Z. M., & Cai, Y. N. (2015). Genome-scale meta-analysis of DNA methylation during progression of lung adenocarcinoma. *Genetics and Molecular Research*, 7; 14 (3): 9200-14.
- Zhang, X., Wu, M., Xiao, H., Lee, M., Levin, L., Leung, Y., & Ho, S. (2010). Methylation of a Single Intronic CpG Mediates Expression Silencing of the PMP24 Gene in Prostate Cancer. *Prostate*, 15; 70 (7): 765–776
- Zhang, Y., Wang, R., Song, H., Huang, G., Yi, J., Zheng, Y., Wang, J., & Chen L. (2011). Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Letter*, 1; 303 (1): 21-8.
- Zhong, D., Li, G., Long, J., Wu, J., & Hu, Y. (2012). The hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Increased Lung Cancer Susceptibility in Caucasians: An Updated Meta-Analysis. *Scientific Reports*, 2: 548.
- Zhou, W., Yin, M., Cui, H., Wang, N., Zhao, L. L., Yuan, L. Z., Yang, X. P., Ding, X. M., Men, F. Z., Ma. X., & Na, R. J. (2015). Identification of Potential therapeutic target genes and mechanisms in non-small-cell lung Carcinoma in non-smoking women based on bioinformatics analysis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19 (18): 3375

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülzade EKER  
Doğum Yeri ve Yılı : Karabük/ 1991  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : melek\_gul\_91@hotmail.com



### Eğitim Durumu

Lise : Karabük Sağlık Meslek Lisesi  
Önlisans : Bülent Ecevit Üniversitesi Ahmet Erdoğan Sağlık Hizmetleri  
Meslek Yüksek Okulu  
Lisans : Kastamonu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji  
Bölümü  
Yüksek Lisans : Kastamonu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji  
Bölümü

### Mesleki Deneyim

İş Yeri : Kastamonu Devrekâni İlçe Devlet Hastanesi 2012/ (Halen)

### Yayımları:

Küçükbaşmacı, İ., Şahin,S., & Eker, G. (2016). *Corythucha ciliata* (Say, 1832)'nın (Heteroptera, Tingidae) Kastamonu Şehir Merkezinde Bulunan *Platanus orientalis* L. Türü Üzerindeki Yoğunluğunun Araştırılması. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 16 (1): 74-82