

HİLAL ŞAHİN

← HİLAL ŞAHİN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ -CERRAHPAŞA  
LİSANS ÜSTÜ EĞİTİM ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

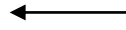
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya

(sol yandaki gibi) olacak .



DOKTORA TEZİ

Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;



Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2018

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HASTALARININ BRONŞ  
LAVAJINDA *PTEN* GENİNİN FLUORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON VE  
İMMÜNOSİTOKİMYA YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

HİLAL ŞAHİN

DANIŞMAN  
PROF.DR. MATEM TUNÇDEMİR

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2018



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HASTALARININ  
BRONŞ LAVAJINDA *PTEN* GENİNİN FLUORESAN İN SİTU  
HİBRİDİZASYON VE İMMÜNOSİTOKİMYA YÖNTEMLERİ  
İLE ARAŞTIRILMASI

HİLAL ŞAHİN

DANIŞMAN  
PROF.DR. MATEM TUNÇDEMİR

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2018

Tez onayı

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



HİLAL ŞAHİN

## İTHAF

Tezimi, canım aileme, biricik ikizim İclal'e ve onun güzel kızı Asude'ye ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle bölümün tüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Tıbbî Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Turgut Ulutin'e teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam süresince her konuda özverisi, sabrı ve bilimsel katkılarıyla yoluma ışık tutan, anında çözümler üreten, her zaman bana moral vererek hep ileriye doğru gitmem için bana destek olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Matem Tunçdemir'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bana aktaran Sayın Prof. Dr. Ayhan Deviren'e, güler yüzüyle bana her zaman bir anne şevkati ile yaklaşan hocam Sayın Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na, derin tecrübeleri ve kıymetli bilgilerinden istifade ettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Nail Yılmaz'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın örneklerini temin etmemde yardımlarından ötürü Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan emekli hocam Sayın S. Serdar Erturan'a, hastaların klinik evrelemesinin yapımında Uzm. Dr. Sait Mulamahmutoğlu'na ve Bronkoskopi Ünitesi hemşiresi sevgili Ayşegül Genç'e teşekkürler.

Doktora eğitimime başladığım günden bu yana öğrettikleri her bilgi için, tezimin gerek deney aşamalarında gerekse yazım aşamasındaki yorumları ve değerli katkıları için öncelikle Dr. Dilhan Kuru'ya, Dr. Şükriye Yılmaz'a, Doç. Dr. Ayşe Çırakoğlu'na ve Doç. Dr. Yelda Tarkan Argüden'e çok teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman destek olan, en sıkıntılı anlarımda bile beni güldüren, çok sevgili yol arkadaşlarım Seda Süsgün, MSc. Başak Çakmak, Handenur Göktan, İlknur Yaldır'a ve Sitogenetik ailesinin diğer tüm üyelerine, arkadaşlarım sevgili Billur Akdeniz'e, MSc. Hülya Arslan'a, MSc. Aslı Karacan'a, MSc. Asuman Çelebi'ye, Ceren Orhan'a ve deney düzeneği kurmamda yardımları için sevgili MSc. Elif Yaprak Saraç'a çok teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini her daim hissettiğim canım annem Melâhat Şahin'e, saygıdeğer babam Dursun Ali Şahin'e ve her biri birbirinden değerli çok sevgili kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23004

## İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER .....	VII
TABLOLAR LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	XIV
ÖZET.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Akciğer Kanseri.....	4
2.1.1. Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	5
2.1.1.1. Çevresel Faktörler;.....	5
2.1.1.2. Genetik Faktörler; .....	9
2.1.2. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	12
2.1.3. Akciğer Kanseri Semptom ve Bulgular.....	12
2.1.4. Akciğer Kanseri Metastaz .....	13
2.1.5. Akciğer Kanseri Sınıflandırması.....	14
2.1.6. Akciğer Kanseri Klinik Safhalar-Evreleme .....	17
2.1.7. Akciğer Kanseri Tanı .....	20
2.2. Akciğer Kanseri Moleküler Mekanizması.....	23
2.2.1. Akciğer Kanseri Gözlenen Genetik Değişiklikler.....	24
2.2.2. Akciğer Kanseri Tümör Baskılayıcı Genler ve Büyüme Faktörleri.....	24
2.3. Akciğer Kanseri Tedavi ve Sağ kalım .....	25
2.4. <i>PTEN</i> Geni.....	27
2.4.1. <i>PTEN</i> Geninin Kısa Tarihçesi.....	28
2.4.2. <i>PTEN</i> Geninin Yapısı.....	28
2.4.3. <i>PTEN</i> Geninin Hücrede Fonksiyonu.....	29
2.4.4. <i>PTEN</i> Protein Yapısı ve Fonksiyonu .....	32



2.4.5. <i>PTEN</i> Gen Mutasyonları .....	32
2.4.6. <i>PTEN</i> Geni ve Kanser ilişkisi .....	34
2.5. In situ Hibridizasyon (İSH) .....	36
2.5.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) .....	38
2.5.2. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar .....	40
2.5.3. FISH Metodunu Temel Alan Uygulamalar .....	41
2.5.4. FISH Endikasyonları .....	41
2.5.5. FISH Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları .....	41
2.5.6. Doğum öncesi ve Sonrası Diyagnostik ve Araştırmada FISH Uygulamaları .	42
2.6. İmmünohistokimya Yöntemi .....	43
2.6.1. Biotin-Streptavidin Sistemi .....	44
2.6.2. Sinyal oluşturan Sistemler .....	44
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>45</b>
3.1. Gereçler .....	45
3.1.1. iFISH Yöntemi için Kullanılan Gereçler .....	45
3.1.2. FISH Yönteminde Kullanılan Cam Malzemeler .....	46
3.1.3. iFISH Yönteminde Kullanılan Kimyasallar .....	47
3.1.4. iFISH Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar .....	47
3.1.5. iFISH yönteminde Kullanılan Prob .....	49
3.1.6. İmmünohistokimya Yöntemi için Kullanılan Gereçler .....	49
3.1.7. İmmünohistokimya Yöntemi için Kullanılan Kimyasallar .....	50
3.1.8. İmmünohistokimya yönteminde kullanılan <i>PTEN</i> Primer Antikoru .....	51
3.2. Yöntem .....	51
3.2.1. Materyal Seçimi .....	51
3.2.2. Materyal Alımı .....	52
3.2.3. İnterfaz FISH (iFISH) Yöntemi .....	52
3.2.3.1. Harvest (Hücre Toplama) .....	53
3.2.3.2. Yayma işlemi .....	54
3.2.3.3. iFISH tekniğinin uygulanması .....	55
3.2.4. İmmünohistokimya Yöntemi (İSK) .....	58
3.2.4.1. Harvest (Hücre toplama) .....	58
3.2.4.2. İSK için hücre kültürü .....	58

3.2.4.3. İSK yönteminin uygulanması.....	59
3.2.4.4. İmmun boyama özgüllüğünün kontrolü.....	61
3.2.4.5. İSK Değerlendirme .....	62
3.2.4.6. İstatistiksel yöntemler .....	62
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>63</b>
4.1. KHDAK olgularının sigara kullanımına göre değerlendirilmesi.....	66
4.2. KHDAK olgularının Evre dağılımlarına göre değerlendirilmesi .....	66
4.3. KHDAK olgularına ait iFISH Sinyal Bulguları.....	67
4.4. KHDAK olgularına ait iFISH Görüntülerinin Değerlendirilmesi .....	71
4.5. Hasta ve Kontrol grubuna ait iFISH görüntüleri .....	71
4.6. KHDAK olgularına ait FISH Bulgularının İstatistiksel Analizleri .....	77
4.7. İmmünohistokimyasal Analiz.....	78
4.7.1. İmmünohistokimyasal Analizlerde Karşılaştığımız Diğer Bulgular.....	86
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>89</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>98</b>
<b>FORMLAR .....</b>	<b>111</b>
<b>ETİK KURUL KARARI .....</b>	<b>113</b>
<b>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....</b>	<b>114</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>115</b>

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1 İnsanda kanserojen olduğu kesin olarak bilinen bazı ajanlar ve maruziyet sonrası neden olduğu kanserler .....	8
Tablo 2-2: Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde genetik mutasyonlar.....	11
Tablo 2-3: Akciğer kanserinde metastazlar ve sıklığı.....	14
Tablo 2-4: Akciğer tümörlerinin WHO'nun Histolojik olarak Sınıflandırması.....	16
Tablo 2-5: TNM Bulgularına göre KHDAK Evreleri.....	20
Tablo 2-6: TNM-7 sınıflamasına göre, T evrelerinin 5 yıllık sağ kalım oranları .....	27
Tablo 3-1: Carnoy Fiksatif .....	47
Tablo 3-2: Hipotonik Solüsyon.....	47
Tablo 3-3: Fosfat Buffer Solüsyonu.....	48
Tablo 3-4: 20xSSC (Salin Sodyum Sitrat).....	48
Tablo 3-5: 2xSSC.....	48
Tablo 3-6: 0,4xSSC.....	48
Tablo 3-7: HCl, Tween20 ve Pepsin Solüsyonu .....	48
Tablo 3-8: Alkol Serileri .....	49
Tablo 4-1: Toplanan tüm olgulara ait tanıların sayısal olarak dağılımı .....	63
Tablo 4-2: KHDAK hastalarının alt tiplerine göre dağılımı .....	63
Tablo 4-3: Hastaların cinsiyet, yaş, tanı ve TNM evrelerine göre dağılımı.....	64
Tablo 4-4: Kontrol grubuna ait yaş, cinsiyet ve sigara kullanımının dağılımı .....	66
Tablo 4-5: KHDAK olgularına ait iFISH bulguları .....	68
Tablo 4-6: Kontrol grubuna ait iFISH bulguları .....	69
Tablo 4-7: KHDAK olgularına ait atipik sinyali olan hücrelerin sayısal dağılımı ....	70
Tablo 4-8: Kontrol grubu olgularına ait atipik sinyalli hücrelerin sayısal dağılımı... 71	
Tablo 4-9: KHAK ve kontrol grubu olgularında iFISH analiz sonuçlarına göre hücrelerdeki sinyal sayılarının karşılaştırılması ve tanımlayıcı istatistikleri. ....	77
Tablo 4-10: <i>PTEN</i> immün boyaması yapılan grupların immün reaksiyon şiddeti açısından değerlendirilmesi.....	78
Tablo 4-11: <i>PTEN</i> immün boyaması yapılan kontrol ve hasta alt grupların immün reaksiyon şiddeti açısından değerlendirilmesi .....	79

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>PTEN</i> geninin lokalize olduğu 10. kromozom. ....	29
Şekil 2-2: PI3K / AKT / mTOR yolağı. ....	31
Şekil 2-3: <i>PTEN</i> geninin fonksiyonu. ....	31
Şekil 2-4: <i>PTEN</i> geninin adezyondaki fonksiyonları (Araki, 2004). ....	34
Şekil 2-5: Hibridizasyon basamaklarını gösteren bir şema. ....	37
Şekil 3-1: FISH probunun 10. kromozom üzerinde işaretlediği iki bölge. ....	49
Şekil 3-2: Yayma kontrolü yapılan bir skuamöz hücreli akciğer kanseri olgusunun bronşiyal lavaj örneğine ait boyanmamış ham hücreleri. ....	55
Şekil 4-1: Kontrol grubuna ait normal (2Y2K) sinyalleri içeren üç hücrenin iFISH görüntüsü. ....	72
Şekil 4-2: Kontrol grubuna ait normal (2Y2K) sinyalleri içeren 6 hücreye ve 1 tane monoallel delesyonlu (2Y1K) hücreye ait iFISH görüntüsü. ....	72
Şekil 4-3: Skuamöz hücreli akciğer kanseri olgusuna ait iFISH görüntüsü. ....	73
Şekil 4-4: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait iFISH görüntüsü ...	73
Şekil 4-5: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait atipik sinyal (1Y2K) içeren bir hücrenin iFISH görüntüsü. ....	74
Şekil 4-6: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait iFISH görüntüsü ...	74
Şekil 4-7: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait monoallel delesyon (2Y1K) içeren bir hücrenin iFISH görüntüsü. ....	75
Şekil 4-8: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait iki hücrenin iFISH görüntüsü. ....	75
Şekil 4-9: Adenokarsinom tanılı bir olguya ait 3Y3K sinyal içeren bir hücrenin iFISH görüntüsü. ....	76
Şekil 4-10: Adenokarsinom tanılı bir olguya ait (6Y4K) sinyal içeren atipik bir hücrenin iFISH görüntüsü. ....	76
Şekil 4-11: Kontrol grubuna ait bir olguda görülen epitel hücresi. ....	80
Şekil 4-12: Kontrol grubuna ait bir olguda, sitoplazması <i>PTEN</i> (+) olan bir epitel hücresi ve etrafındaki hiperplazik hücreler. ....	80
Şekil 4-13: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait bronşiyal lavaj sıvısında hem nükleus hemde sitoplazmada <i>PTEN</i> (+) alanlar. ....	81

Şekil 4-14: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguda epitel hücrenin nukleus ve yoğun olarak sitoplazmasında görülen <i>PTEN</i> (+)'lik.....	81
Şekil 4-15: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait bol mukuslu ve epitel hücreleri bakımından oldukça zengin olan bir alandaki <i>PTEN</i> (+) lenfositler..	82
Şekil 4-16: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait <i>PTEN</i> (+) bir goblet hücresi .....	82
Şekil 4-17: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait <i>PTEN</i> (+) bir lenfosit hücresi .....	83
Şekil 4-18: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait epidermoidal kökenli <i>PTEN</i> (+) tümör hücresi .....	83
Şekil 4-19: Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı dört farklı olguya ait <i>PTEN</i> (+) makrofaj hücreleri .....	84
Şekil 4-20: Adenokarsinom tanılı bir olguya ait bronşiyal lavaj sıvısında gözlenen <i>PTEN</i> (+) bir makrofaj hücresi.....	85
Şekil 4-21: Adenokarsinom tanılı bir olguya ait dört farklı hücre tipi bir arada .....	85
Şekil 4-22: Doku düzeyinde <i>PTEN</i> (+) boyanan kümeleşmiş metaplazik hücre tabakası.....	86
Şekil 4-23: Adenokarsinom tanılı bir akciğer kanseri olgusuna ait bronşiyal lavaj örneğinde az rastlanan bir <i>Candida albicans</i> (Saprofit oportunist) türü mantar.....	87
Şekil 4-24: Kontrol grubuna ait bir olgudan alınan bronşiyal lavaj materyalinde diplokok bakteri kümeleri .....	88

**RESİMLER LİSTESİ**

Resim 3-1 : 50 ml'lik silindir kaptaki alınan bronşiyal lavaj örneği.....	52
Resim 3-2 : iFISH metodunun uygulanması için her örnekten hazırlanan tüpler.....	53
Resim 3-3 : Taban kısmındaki lamelin üzerine lavaj örneğinin ekildiği plate.....	59
Resim 3-4 : İverted ışık mikroskobu.....	61



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

$\mu$ L	Mikrolitre
AK	Akciğer Kanseri
AKT	Protein Kinaz B
AMCA	Amino-metil-kumarin Asteik Asit
BCL2	B cell lymphoma 2 protein
BHAK	Büyük Hücreli Akciğer Kanseri
BRCA1/2	Breast Cancer
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CGH	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
c-Myc	MYC Proto-onkogene
CXR	Akciğer Röntgeni
DAPI	4', 6'-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGF1	Epidermal Büyüme Faktörünü kodlayan gen
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
Egr1	Erken Büyüme Cevabı-1 (Early Growth Response-1)
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FISH	Fluoresan in-situ Hibridizasyon
FITC	Florescein Isothiocyanate
HRP	Horse Radish Peroxidase
ISH	İn-situ Hibridizasyon
iFISH	İnterfaz Fluoresan in-situ Hibridizasyon

İSK	İmmünohistokimya
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilo Dalton
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
LOH	Heterozigozite Kaybı
M-FISH	Multicolour- Fluoren İn-situ Hibridizasyon
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NfκB	Nükleer Faktör Kappa B
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PBS	Fosfat Tamponlu Buffer
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PGT	Preimplantasyon Genetik Tanı
PHTS	PTEN Homortoma Tümör Sendromu
PI3K	Fosfatidil-inozitol-3-kinaz
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinaz Catalytic Subunit Alpha
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SKY	Spektral Karyotipleme
SNP	Single Nükleotid Polymorfizm
SSC	Salin Sodyum Sitrat



TBG	Tümör Baskılayıcı Gen
TGF- $\beta$	Transforme edici büyüme faktör $\beta$
TK	Tirozin Kinaz
TKİ	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TNM	Tümör, nod, metastaz
TP53	Tümör protein 53
TSG	Tümör Supresör Gen
TTİA	Transtorasik ince iğne aspirasyonu
USG	Ultrasonografi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ÖZET

### KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HASTALARININ BRONŞ LAVAJINDA *PTEN* GENİNİN FLUORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON VE İMMÜNOSİTOKİMYA YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

**Giriş ve Amaç;** Akciğer kanserli hastalarda prognoz, tanının konulduğu andaki evre ile ilişkilidir. Akciğer kanserleri küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Akciğer kanseri hastalarının balgamlarında ve bronkoskopik örneklerinde kanser hücrelerinin tespit edilmesi, spesifik anomalilerin ve belirteçlerin araştırılması bakımından önemlidir. Çalışmamızda, KHDAK hastalarının bronşiyal lavaj materyallerinde, *PTEN* geninin interfaz fluoresan in situ hibridizasyon (iFISH) metodu kullanılarak tespit edilmesi ve *PTEN* ekspresyon seviyelerinin ise immünohistokimya (İHK) yöntemi ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

**Metod:** Çalışmamızda KHDAK tanısı alan 30 hasta ve herhangi bir malignitesi bulunmayan 10 kontrol bireyden alınan bronşiyal lavaj materyali kullanıldı. *PTEN* geni iFISH metodu kullanılarak, *PTEN* ekspresyon seviyeleri ise İHK yöntemi ile gösterildi. Elde edilen bulgular istatistiksel olarak analiz edildi.

**Sonuç:** iFISH metodu ile KHDAK hastalarında *PTEN* delesyonunun kontrol grubuna kıyasla artmış olduğunu, buna karşı immünohistokimya yönteminde ise her hastada farklı yoğunluklarda sitoplazmik ve nükleer *PTEN* ekspresyonu olduğunu gözlemledik. Bronşiyal lavaj örneklerinde immünohistokimyasal boyama yönteminin rutinde hem daha hızlı, daha kolay, hem de daha ekonomik olması açısından bir tanı aracı olarak kullanılabileceğini ve ayrıca *PTEN* genindeki genetik değişiklikleri analiz etmede de immünohistokimya yönteminin yanında, daha hassas sonuçlar sağlayan FISH tekniğinin hastalık tanısında uygun bir yöntem olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, *PTEN*, İmmünohistokimya, Fluoresan in-situ Hibridizasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23004

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE *PTEN* GENE IN THE BRONCHIAL LAVAGE OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS WITH FLUORESCENT INSULIN HYBRIDIZATION AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY

**Introduction and Purpose;** The prognosis in patients with lung cancer is related to the stage at the time of diagnosis. Lung cancers are divided into two main groups as small cell lung cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC). The detection of cancer cells in the sputum and bronchoscopic samples of lung cancer patients is important in terms of investigating specific anomalies and markers. In our study, it was aimed to determine the *PTEN* gene by using interfase fluorescent in situ hybridization (iFISH) method in bronchial lavage materials of patients with NSCLC and to demonstrate the expression levels of *PTEN* by immunocytochemistry (ICH) method.

**Methods:** In our study, 30 patients diagnosed with NSCLC from bronchial lavage material and 10 control subjects without any malignancy were used. *PTEN* gene detected with iFISH method and *PTEN* expression levels were determined by ICH method. The results were statistically analyzed.

**Conclusion** We observed by iFISH method that *PTEN* deletion increased in patients with NSCLC, compared to the control group, whereas the immunocytochemistry method showed the cytoplasmic and nuclear *PTEN* expression differed in each patient. We suggest that the immunocytochemical staining method in bronchial lavage samples can be used as a diagnostic tool in routine in terms of being faster, easier and more economical, as well as FISH technique which provides more accurate results can be used as an appropriate method in diagnosis of disease, in addition to immunocytochemistry method for the analysis of genetic changes in the *PTEN* gene.

**Key Words:** Non-small Cell Lung Cancer, *PTEN*, Immunocytochemistry, Fluorescence In-Situ Hybridization.

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit.  
Project No: 23004

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri dünya çapında en sık görülen kanserler arasında ilk sırada yer almaktadır ve tüm kansere bağlı ölümlerinin yaklaşık üçte birini oluşturur (Wong, Lao, Ho, Goggins, & Shelly, 2017). Tümör çoğunlukla ana bronş kökenli olup santral yerleşimlidir. Akciğer kanserleri mikroskop altında izlenen hücrelerin görüntüsüne göre küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'i küçük hücreli dışı grubundadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, tüm olgularının %80-85 kadarından sorumludur ve başlıca üç büyük alt tipi vardır. Bunlar; skuamöz hücreli akciğer kanseri, adenokarsinom ve büyük hücreli akciğer kanseri tipleridir (Adnan Aydın, 2006).

Akciğer kanserli hastalardaki prognoz, tanının aldığı andaki evre ile yakından ilişkilidir (Schramm et al., 2011). Akciğer kanseri tanısı alan hastalarda, klinisyenin tedavi protokolünü tasarlayabilmesi ve hastalığın prognozunu belirlemesi için hastalığın hangi evrede olduğu önem taşır. Akciğer kanserinde erken dönemden ilerlemiş döneme doğru 4 evre bulunmaktadır. Evre I'de tümör yalnızca akciğerin küçük bir bölümünü işgal ederken Evre II'de tümör ya sadece göğüs duvarına ya da en yakın lenf bezine metastaz yapmıştır. Evre III'de tümör akciğer her iki lobuna ya da kalbin bulunduğu boşluktaki lenf bezlerine yayılmıştır ve en ileri safha olan IV. Evrede ise tümör artık beyin, kemik, karaciğer gibi uzak organlara metastaz yapmıştır. Akciğer kanseri tanısı genellikle ileri evrelerde (Evre III ve IV'te) konur. Bu durumdaki hastalarda tedavi şansı daha düşük olmaktadır. Erken dönemde tanı alan akciğer kanseri hastalarında daha iyi bir prognoz sağlayan tedavi kürleri için son yıllarda hızlı tanı yönünde araştırmalar arttırılmıştır. İlk önce fiziksel muayene, daha sonra göğüs röntgeni, bilgisayarlı tomografi (BT), bronkoskopi ve balgam sitolojisi, şüpheli akciğer kanseri tanısı için başvurulan yöntemlerdir. Ancak yine de akciğer kanser taraması rutin bir uygulama değildir (Schramm et al., 2011).

KHDAK hastalarında sağ kalımı ön gören bazı prognostik faktörler bulunmaktadır. İyi prognoz faktörleri; tanı sırasında hastalığın erken evrede olması, performans durumunun iyi olması (*Eastern Cooperative Oncology Group 0, 1 veya 2*), önemli kilo kaybı olmaması (%5'ten daha az) ve kadın cinsiyettir. *KRAS* onkogenlerin ve diğer biyolojik belirteçlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen mutasyonları gibi yeni biyolojik prognostik faktörlerin kötü prognozu öngörmekte önemli olabileceği düşünülmektedir. (Slebos et al., 1990)

Akciğer kanserinde görülen başlıca moleküler değişiklikler; onkojenlerin mutasyonel aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişikliklerdir. Akciğer kanserlerinde görülen genomik dengesizlik ise pek çok sayısal ve yapısal kromozom anomalilerini içerir (Fong & Minna, 2002; Spitz et al., 2007).

Akciğer kanseri, birden bire ortaya çıkan bir hastalık değildir. Hücrelerin kanserleşme yönündeki farklılaşma sürecinde tümörögenезin en son aşamasıdır. Kanser hücrelerinde hücre proliferasyonundan sorumlu olan farklı gen bölgelerinin kaybı, kazancı ya da mutasyona uğraması tümörün başlaması ve ilerlemesine neden olmaktadır. Pek çok araştırmaya göre, akciğer kanseri bronş epitelinin birden farklılaşması ile değil, basamak basamak gerçekleşen genetik ve hücresel değişiklikler sonucunda oluşmaktadır (Larsen & Minna, 2011). Bu genetik değişikliklerden biri de "Fosfataz ve Tensin Homolog geni" olan *PTEN* ile ilişkilidir. *PTEN* geni ilk kez 1997 yılında tanımlanan bir tümör baskılayıcı gendir (Cantley & Neel, 1999). Sıklıkla somatik kanserlerde inaktive olur (Abdulkareem & Blair, 2013) ve en sık mutasyona uğrayan diğer bir tümör baskılayıcı gen olan *p53*'den sonra ikinci sırada yer alır (Georgescu, 2010). *PTEN* geni 10. kromozomun uzun kolunun q23.2 bölgesinde yerleşmiş olan ve pek çok kanserde rol alan önemli bir düzenleyicidir. Tümör baskılayıcı genlerin kaybı, gelişmekte olan tümör hücrelerinin artışı ile ilişkilidir (Chang et al., 2003). Bu genler, allellerden birisinin kalıtsal olarak inaktif olması sebebiyle ailesel kanser sendromları ile ilişkili olup artan kanser riski otozomal dominant şekilde nesilden nesile taşınabilir (Zeynep Topu, 2004).

*PTEN*, yaşlanma, anjiogenez, apoptoz, hücre döngü ilerlemesi, hücre kasılması ve DNA hasarına cevabı da içeren sayısız süreçte görev alır (Abdulkareem & Blair, 2013). Hem lipit hem de proteinleri defosforile etme yeteneğine sahip bir çift spesifik fosfataz kodlayan *PTEN* geni, enzimatik fonksiyonu olduğu bilinen ilk tümör baskılayıcı moleküldür (Govender & Chetty, 2012). Fosfoinozimid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidil-inozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid düzenleyicidir. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur (Govender & Chetty, 2012). *PTEN*, PI3K'yi antagonize ederek bir serin-treonin protein kinaz olan Akt'nin aktivitesini düzenler. Aktive olan fosfo-Akt (p-Akt) hücre sağ kalımının güçlü bir teşvikçisi olması bakımından oldukça önemlidir (Simpson & Parsons, 2001).

*PTEN* tümör baskılayıcı genine ait çalışmalar 2008 den sonra hız kazanmış, yapılan araştırmalar sonucu, pek çok kanserin ilerleyiş sürecinde *PTEN* genindeki değişimlerin önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Li XB. ve arkadaşları primer KHDAK hastalarında *PTEN* ekspresyon seviyelerini ve bunların prognostik etkilerini araştırmışlar, KHDAK hastalarında *PTEN* protein ekspresyon artışının iyi prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek seviyedeki *PTEN* ekspresyonun, tüm KHDAK hastaları için mortalite riskinde % 43'lük bir azalma ile korelasyon gösterdiğini saptamışlardır (X. Li et al., 2015).

Çalışmamızda KHDAK hastalarından alınacak bronşiyal lavaj örneklerinde *PTEN* geninin interfaz Fluoresan İn Situ Hibridizasyon (iFISH) metodu kullanılarak tespit edilmesi ve *PTEN* ekspresyon seviyelerinin ise immünohistokimya (İSK) yöntemi ile gösterilmesi amaçlanmıştır. KHDAK hastalarının klinik evre ve prognozunu ön görmesi bakımından *PTEN* ekspresyonunun bir-biyo belirteç olup olmayacağı araştırılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Beş yıllık akciğer kanseri sağ kalım oranı sadece % 15'tir (J Ferlay et al., 2007) ve akciğer kanseri tek başına her yıl meme, pankreas, kolon ve prostat kanserlerinden daha fazla ölümden sorumludur (Jacques Ferlay et al., 2015). Akciğer kanseri, hem erkeklerde hem de kadınlarda ikinci en yaygın kanserdir: erkeklerde prostat kanseri en yaygın olanı iken, kadınlarda meme kanseri daha yaygındır (Testa, Castelli, & Pelosi, 2018). Akciğer kanseri, erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin (kansere için tüm ölümlerin % 26'sı) ve kadınlarda (tüm ölümlerin % 25'inde) önde gelen sebebidir (Torre et al., 2018). Akciğer kanseri genellikle ileri yaş gruplarında görülür. Bunun nedeni; akciğer kanseri teşhisi konulan çoğu insan 65 yaş ve üzerindedir, ancak sadece bir azınlık hasta grubu 45 yaşın altındadır. Tanıdaki ortalama yaş yaklaşık 70'tir (Torre et al., 2018). Akciğer kanseri insidansı 1930'dan 2000'li yıllara kadar artış göstermiştir ve 1990'da erkeklerde, 2000'de de kadınlarda görülme sıklığı artmıştır. Son on yılda akciğer kanseri mortalitesi erkeklerde ve kadınlarda azalmaktadır. Yakın zamanda yapılan epidemiyolojik analizler, akciğer kanseri insidansının ve mortalitesinin, çeşitli ülkelerin sosyo-ekonomik statüsünden önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir (Testa et al., 2018).

En yaygın akciğer kanseri türü, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) akciğer kanserlerinin % 85'ini oluştururken, % 15'i Küçük Hücreli Akciğer Kanseri sınıfındadır (KHAK) (W. D. Travis, 2011).

KHDAK üç histolojik alt tip içerir: Adenokarsinom, Skuamöz Hücreli Karsinom ve Büyük Hücreli Karsinom. KHDAK'nin % 45'i Adeno ve Skuamöz tipi akciğer kanserleri iken, yaklaşık % 55'i heterojenite gösterir (Kandasamy & Srivastava, 2002).

### 2.1.1. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanseri; genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkilediği bir hastalıktır. İnsidansı ve mortalitesi yüksek olduğu için akciğer kanseri risk faktörleri oldukça önemlidir.

#### 2.1.1.1. Çevresel Faktörler;

##### 1. Tütün Kullanımı:

Akciğer kanserinde en önemli etiyolojik faktörün tütün kullanımı olduğu günümüzde kesin olarak bilinen bir gerçektir. Küresel olarak, tüm akciğer kanseri vakalarının % 80'inden fazlasında tütün kullanımı sorumludur. Akciğer kanseri için en önemli risk faktörü tütün kullanımınıdır.

Akciğer kanserinin sigara ile ilişkisinde, tiplendirilemeyen KHDAK hariç, diğer akciğer kanseri hücreleri analiz edildiğinde, tütün kullananlarda en sık skuamöz hücreli tip (% 40,7) ve kullanmayanlarda ise en sık histopatolojik tanı adenokarsinom (% 39,8) olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Kefeli et al., 2015).

Sigara dumanında bulunan Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH), NNK gibi karsinojenler, DNA'ya kovalent olarak bağlanır. Tamir mekanizmaları bu bağlanmayı farkedip ayırabilir ya da zarar görmüş olan hücreyi apoptoza götürebilirler. DNA tamir mekanizmalarının, DNA'ya bağlanan bu katılımın ayrılmasındaki başarısızlıkları, devamlı mutasyonlara yol açabilir. Karsinojenler, kontrolsüz hücre çoğalması ve karsinogenez ile sonuçlanan, kritik onkogen ve tümör baskılayıcı genleri içeren sinyal aracılı bir takım yolların aktivasyonuna aracılık edebilir. Örneğin NNK'ların *K-RAS* onkogen aktivasyonu ile sonuçlanan DNA mutasyonları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Akciğer adenokansinomların % 24'ünde *K-RAS* onkogen aktivasyonu belirlenmiştir. Bazı çalışmalar sigarayı bırakmış olan adenokarsinomlarda bile bu tip mutasyonların kaçınılmaz olarak geri dönmediğini göstermektedir (Akopyan & Bonavida, 2006)

Uzun süre tütün kullananlarda akciğer kanseri bakımından rölatif risk artışı, hayatında hiç tütün kullanmamış olanlara göre 20 ile 30 kat arasındadır. Akciğer



kanseri riski, kişinin sigara kullanmaya başladığı yaşla, günlük içtiği paket sayısı, inhalasyon derecesiyle ve kullandığı sigaranın içerdiği nikotin-zifir miktarıyla ilişkilidir (Harris, Thun, Mondul, & Calle, 2004).

## **2. Alkol Kullanımı:**

Aşırı alkol tüketimi, hücrelerin yapısında değişikliğe sebep olduğundan pek çok kanserde hastalık riskini arttırdığı düşünülmektedir. Alkolün, vücutta kansere sebep olabilen pek çok molekülden biri olan 'asetaldehit' bileşiğine dönüşerek tümör gelişimini teşvik ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Alkolün karsinogenezdeki rolüne kanıt olarak gösterilebilecek önemli nokta, alkol dehidrojenaz ve aldehit dehidrojenaz ile sırayla katalizlenen biyokimyasal reaksiyonlarda, etanolün oksidasyonundan önce asetaldehide ve daha sonra asetata kadar yıkılmasıdır. Tek başına etanol mutajenik değildir, ancak asetaldehit karsinogenik ve mutajeniktir, DNA ve proteine bağlanır (LoConte, Brewster, Kaur, Merrill, & Alberg, 2018).

Asetaldehit; hücrelerin doğal savunma sistemini bozarak ve DNA onarım mekanizmasını engelleyerek kanserin ilerlemesine neden olur. Alkolün toksik yapısının karaciğer, kolon ve meme kanserlerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Alkol tüketimi ile ağız boşluğu, farinks, larinks, özofagus, karaciğer, kolon, rektum ve kadınlarda meme kanseri arasında nedensel bir ilişki kurulmuştur. Pankreas ve akciğer kanserleri için bir ilişkiden şüphelenilmektedir (Boffetta & Hashibe, 2006).

Yapılan çalışmalar, alkolün etkisinin, etanol metabolizması (örn. alkol dehidrogenazlar, aldehit dehidrojenazlar ve sitokrom P450 2E1) için enzimleri kodlayan genlerde, folat metabolizmasında ve DNA onarımında polimorfizmlerle ilişkili olduğunu göstermektedir (Wei et al., 2018). Bazı çalışmalarda aşırı dozda alkol tüketenlerde pankreas kanseri daha sık olmak üzere, safra yolu ve mesane kanserlerine rastlanma olasılığının yüksek olduğu saptanmıştır (LoConte et al., 2018). Buna karşın Çin'de 2018'de yapılan kohort bir çalışma sonuçlarına göre alkol tüketiminin erkeklerde akciğer kanseri riski ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Wei et al., 2018).

### **3. Kilo- Vücut Ağırlığı ve Beslenme:**

Vücut kitle endeksi (BMI), kişinin boy ve kilo bilgileri temel alınarak sağlık açısından zayıf, normal veya kilolu olup olmadığını tespit etme amacıyla kullanılan bir terimdir. Şişmanlık ve zayıflık göreceli kavramlar gibi algılansa da vücut kitle endeksi hesaplama formülüne göre bu değerler aralıklar halinde belirlenmiştir. BMI ile yapılan bazı kohort çalışmaları obezite ya da aşırı zayıflık ile akciğer kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermiştir. Ancak Hawaii’de yapılan bir çalışmaya göre elma ve soğan tüketimi ile akciğer kanseri arasında ters bir ilişki belirlenmiştir (Knekt et al., 1997). Hayvansal kaynaklı fonksiyonel besinlerden en önemlisi; somon, ton, uskumru, sardalya gibi balıklarda bulunan omega-3 yağ asitleridir. Bu yağ asitlerinin meme ve akciğer kanserini azalttığını gösteren veriler vardır (Le Marchand, Murphy, Hankin, Wilkens, & Kolonel, 2000).

### **4. Mesleki Faktörler:**

Çalışma ortamında ya da endüstriyel fabrikalarda gerekli önlemler alınmadığı takdirde, hücre DNA’sını etkileyerek tümör gelişimine yol açabilecek kimyasal, fiziksel veya biyolojik etmenler çevreye salınır. Bütün kanserlerin ortalama % 2-8 kadarının mesleki etkilenme sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Bu oranın akciğer kanserlerinde ise % 15 olduğu tahmin edilmektedir. Sindirim sistemi kanserlerinde mesleki faktörlerin rolü ancak % 1 kadardır. Mesleki kanserler diğer kanserlere oranla daha genç yaşlarda görülmektedir. Kanser riskinin yüksek olduğu işlerde çalışanlar daha çok erkekler olduğundan, mesleki kanserlerin erkeklerde görülme oranı da daha fazladır.

Etkene maruziyetle, tanı arasındaki sürenin en az 10-15 yıl olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Siegel, Miller, & Jemal, 2017). 1930’larda kömür ve petrol yan ürünlerinde bulunan, bir PAH serisi olan, benzopiren tanımlanabilmiştir. PAH sadece deri kanserine neden olmasının yanı sıra, akciğer, larinks ve özefagus kanserlerine de neden olabildiği bilinmektedir. PAH sigara dumanında bulunur ve birçok işyeri, duman, gaz, kurum ve ısı bozulmaya uğramış yağlar ile kontamine olabilir. Kok kömürü fabrikası işçilerinde PAH içeren dumana maruziyet nedeniyle çok sayıda bronşiyal kanser ölümleri yaşanmıştır.

Kanserojen ajanlara maruziyet ve ilişkili oldukları bazı kanser türleri şöyle sıralanabilir (Erturan); pamuk endüstrisi işçileri ve baca temizleyicilerinde: skrotal kanser, kömür ve petrol işçilerinde: cilt kanseri, akciğer kanseri, asbeste maruziyette: akciğer kanseri, lastik kablo fabrikası çalışanları: mesane kanseri, granit fabrikası-silika maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, tren yolu çalışanları-dizel yakıt maruziyeti: artmış akciğer kanseri riski, çelik işçileri-sülfürik asit maruziyeti: larenks kanseri, formaldehit maruziyeti: nazofarengeal kanser, sentetik lastik, polimer yapımı- 1,3-butadin maruziyeti: Non-Hodgkin lenfoma ile ilişkilendirilmiştir (Micallef et al., 2018). Tablo 2-1'de çalışma alanlarına göre kanserojen ajanların neden olduğu kanserler verilmiştir.

**Tablo 2-1** İnsanda kanserojen olduğu kesin olarak bilinen bazı ajanlar ve maruziyet sonrası neden olduğu kanserler (Erturan, 2010)

ETKEN	İLGİLİ ÇALIŞMA ALANI	İLGİLİ KANSER TÜRÜ
Aflatoksin	Tarım işleri	Karaciğer tümörü
Amino bifenil	Lastik sanayi	Mesane
Arsenik ve bileşikleri	Pestisit işleri	Akciğer, deri
Asbest	İzolasyon işleri	Akciğer, plevra
Benzen	Boya, ayakkabı	Lösemi
Kadmiyum	Pil yapımı, metal işi, pestisit	Prostat
Krom	Krom kaplama	Akciğer
Naftil amin	Lastik sanayi, boya işleri	Mesane
Nikel	Nikel rafinerisi	Burun, akciğer
Radon	Madencilik	Akciğer
Vinil klorür	Plastik sanayi	Karaciğer anjiyosarkomu
İyonizan radyasyon	Sağlık işleri, nükleer santral kazaları	Lösemi, akciğer, kemik
Ultraviyole ışın	Tarım, denizcilik	Deri

## 5. Diğer Çevresel Etkenler:

Hava kirliliği, bazı yakıtlardan çıkan gazlar, radona maruziyet, asbest, krom, kadmiyum ve arsenik gibi bazı metaller ve bazı organik kimyasallar gibi diğer faktörlerin akciğer kanserine neden olabileceği belirtilmektedir (Raaschou-Nielsen et al., 2013). Hem Avrupa'da hem de Çin'de yürütülen bazı çalışmalarda hava kirliliğinin sebep olduğu parçacık maddelerin, akciğer kanseri insidansına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Raaschou-Nielsen et al., 2013).

Bu risk faktörleri, sigara bırakma ve toplumun açık havaya yönlendirilmesi ile önlenebilir olduğundan, akciğer kanseri insidansını ve ölüm oranını toplumlara göre farklı stratejilerle azaltmak mümkün olduğu düşünülmektedir.

### **2.1.1.2. Genetik Faktörler;**

#### **1. Yaş:**

Akciğer kanseri genellikle orta ve ileri yaş grubunda görülen bir hastalıktır. Tanı sırasında hastaların ortalama yaşı 71'dir (Cruz, Tanoue, & Matthay, 2011). Elci ve arkadaşları tarafından Türkiye'deki genç erkeklerde yapılan bir çalışmada, olguların ortalama tanı konma yaşı 53 olarak bildirilmiştir (Elci & Akpınar-Elci, 2007). Bununla birlikte tüm akciğer kanserlerinin %1'i 40 yaşın altındadır ve 35 yaşından önce çok nadiren görülmektedir (Elci & Akpınar-Elci, 2007). Az rastlanır olduğundan genç erişkin hastalarda akciğer kanseri ile ilgili literatür bilgileri oldukça kısıtlıdır. Bu yaş grubu için risk faktörleri ve prognoz hakkında pek az şey bilinmektedir. Özen ve ark. (2012) akciğer kanseri hastalarına genç yaşlarda teşhis konduğunda metastatik olmaya eğilimli olduğu ve en sık metastaz bölgesinin de beyin olduğu bildirmiştir (Özen et al., 2012).

Daha önceki akciğer kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarda, gençlerde en sık rastlanan histolojik tip adenokarsinom olduğu gösterilmiştir (Shimono et al., 1994). Diğer taraftan, Elci ve arkadaşları, Türkiye'de 45 yaşında ve altındaki yaş gruplarında ileri yaş gruplarına oranla KHAK riskinin arttığını bildirmişlerdir (Elci & Akpınar-Elci, 2007). Bazı epidemiyolojik araştırmalarda, 50 yaş grubu hastalarda erken tanının ve erken evrenin toplam sağ kalım süresinde avantajlı olduğu bildirilmiştir (Subramanian et al., 2010) (Ramalingam, Pawlish, Gadgeel, Demers, & Kalemkerian, 1998). Ancak, tanı sırasında lokal evrede olan hasta oranının sadece % 20'nin altında olduğu belirtilmektedir (Ramalingam et al., 1998). Sacher ve ark. (2016) genç hastalarda ortaya çıkan akciğer kanserinin kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Sacher et al., 2016).

#### **2. Cinsiyet:**

Son yapılan araştırmalara göre erkeklerde akciğer kanserine bağlı ölümler azalırken kadınlarda bu oranın artışı hastalıkta erkek/kadın oranını değiştirmiştir

(Thomas, Doyle, & Edelman, 2005). Zamanla meydana gelen bu değişikliklerin nedeni epidemiyolojik bulgulardaki değişikliklerden, sigara alışkanlıklarında değişimin yanı sıra, cinsiyet, yaş ve tümör tipi özellikleri ile de ilişkilendirilebilir (Radzikowska, Głaz, & Roszkowski, 2002; Wisnivesky & Halm, 2007). Çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlar, cinsiyete göre patogeneizde farklılıklar olduğunu ve muhtemelen kadınlarda akciğer kanserine duyarlılığın artmış olduğunu göstermektedir. Ek olarak, önemli veriler, histolojisine veya evreye bakılmaksızın, akciğer kanseri tanısı sonrası tedaviye yanıt ve uzun süreli sağ kalım açısından kadınları destekleyen küçük ama önemli farklılıkları göstermektedir. Hem biyolojideki hem de sonuçtaki bu farklılıklar, akciğer kanseri taraması ve tedavisinin gelecekteki uygulamalarının tasarlanması açısından önemlidir (Wisnivesky & Halm, 2007).

Kefeli ve arkadaşları, kadınlarda en sık gözlenen akciğer kanseri tipinin adenokarsinom (% 42,2), erkeklerde ise skuamöz hücreli karsinom (% 41,5) olduğunu bildirmişlerdir (Kefeli et al., 2015). Erkeklerde en sık rastlanan kanser tiplerinde ilk sırada akciğer ve prostat kanseri gelirken, kadınlarda ise akciğer kanseri dördüncü sırada gelmektedir (J Ferlay et al., 2007). Sulu ve arkadaşlarının (2004) yıllara göre karşılaştırmalı olarak yaptığı bir çalışmada ise, 20 yıllık bir periyoda adenokarsinom oranının kadınlarda % 27'den % 46'ya, erkeklerde ise % 11'den % 23'e yükseldiği bildirilmiştir (Ebru, 2007).

### **3. Kalıtsal Gen Mutasyonları:**

Yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalar, akciğer kanserine yatkın kişilerin, bu özelliklerini kalıtsal olarak genlerle kazanmış olabileceklerini düşündürmektedir (Zeynep Topu, 2004). Akciğer kanserinde kalıtım şekilleri uzun zamandan beri merak konusudur. Bazı araştırmalara göre mutasyona uğramış olan onkogenler ya da tümör baskılayıcı genler, DNA replikasyonu veya onarımındaki anomaliler, kişinin karsinogen etkiye meyilli olması ile ilişkilidir (Cannon-Albright et al., 1994). KHDAK olgularında gözlenen başlıca genetik mutasyonlar Tablo 2-2'de verilmiştir.

**Tablo 2-2:** Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde genetik mutasyonlar (Abraham, Allegra, & Gulley, 2009).

Resesif Onkogenler		Baskın Onkogenler	
Rb Mutasyonu	% 20	Ras mutasyonu	% 30
P53 mutasyonu	> %50	Her 2/neu aşırı ifadesi	% 50
3p delesyonu	> %50	myc aşırı ifadesi	% 50
Mikrosatellit değişimi	Var	bcl-2 aşırı ifadesi	% 50
		Telomeraz ifadesi	% 90

#### 4. Irk ve Etnik Köken:

Pek az çalışma bulgularına göre akciğer kanseri ile etnik köken arasındaki ilişki tütün kullanımı üzerinden yapılmış, tütün kullanımı yüksek olan az gelişmiş ülkelerde akciğer kanseri morbiditesinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Haiman et al., 2006). Bu bulguların değerlendirilmesi, yalnızca tütün kullanımı üzerine yapılmamalı, eğitim düzeyine göre, diyet, meslek ve sosyoekonomik durum gibi bilinen veya şüphelenilen risk faktörlerindeki popülasyonlar arasındaki farklar açısından da incelenmelidir.

#### 5. Aile Öyküsü:

Ailesinde akciğer kanseri hikâyesi olan kişilerin, olmayanlara kıyasla akciğer kanseri olma riskinin daha fazla olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir (Cannon-Albright et al., 1994; Zeynep Topu, 2004). Bunun dışında akciğer kanseri tanısı almış olan kişilerin de birinci dereceden akrabalarında, akciğer kanseri dışındaki kanserlere yakalanma riskinin de fazla olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Akciğer kanseri multifaktöriyel olarak kabul edilen bir hastalıktır (Zeynep Topu, 2004). Bazı ailelerde, normal popülasyona kıyasla, metabolizmada iş gören bazı enzimlerin kalıtsal olarak daha aktif olduğu ve bu enzimlerin akciğer karsinogenezinde rol aldıkları bildirilmiştir (Greenblatt, Reddel, & Harris, 1995). Ortak çevresel değişkenlere maruz kalma açısından ailevi risk araştırılırken, bir

hastalığın ailesel kümelenme olduğunu gösterebilmek için en yakınından başlayarak, bilinen genetik ilişkileri olan bireyler arasında detaylı olarak inceleme yapılmalıdır.

Yapılan son çalışmalara göre akciğer kanserine kalıtsal yatkınlık, pek çok genetik anomaliler ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin; 9p21, 14q11-q24, 11q23, 17p akciğer kanserinde sıklıkla delesyona uğramıştır (Levy, Lovly, & Pao, 2012). Akciğer kanseri hastalarında ailesel yatkınlık veya bazı ailelerde kümelenme olup olmadığı hala araştırmaya değer konulardandır.

### **2.1.2. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi**

Akciğer kanseri insidansı ve mortalite oranlarının kadınlarda olduğu kadar erkeklerde iki kat daha hızlı azalmaya devam etmesi, tütün alımı ve bırakmadaki tarihsel farklılıkları yansıtmaktadır.

Yakın zamandaki bir epidemiyolojik analiz, akciğer kanseri insidansının ve mortalitesinin, çeşitli ülkelerin sosyo ekonomik statülerinden belirgin bir şekilde etkilendiğini göstermiştir. Bu nedenle, ülkeye özgü insani gelişme indeksi, akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi ile sıkı ilişkilidir (Wong et al., 2017). Mortalite eğilimi sırasıyla erkekler arasında dünyada 22 ülkede düşüş insidansı gösterirken, aksine kadınlar arasında, 19 ülkede insidans ve mortalite artmıştır. Kadınlar arasında Brezilya, İspanya ve Kıbrıs en büyük insidans artışını gösterirken Batı, Güney ve Doğu Avrupa'daki tüm ülkelerde mortalitede daha az oranda artış gözlenmiştir (Thun et al., 2013). Bu gözlemler, akciğer kanseri insidansı ve mortalite oranlarının çeşitli ülkelerdeki yüksek sosyo ekonomik gelişme ve üretkenlik ile pozitif ilişkili olduğu ve çeşitli ülkelerdeki akciğer kanserinin temporal eğilimlerinde daha fazla eşitsizliğin gözlemlendiği hipotezini desteklemektedir.

### **2.1.3. Akciğer Kanseri Semptom ve Bulgular**

Akciğer kanseri hastaları ne yazık ki, diğer pek çok solid tümörde olduğu gibi geç tanı aldığından, bu hastaların neredeyse % 90'ı 5 yıl içerisinde kaybedilmektedir. Akciğer kanseri tanısını yeni alanların ancak % 20'si cerrahi operasyona uygun olmakta ve opere edilenlerin yalnızca yarısı 5 yıl yaşayabilmektedir. Akciğer kanseri tanısını yeni alan hastaların % 90'ı semptomatiktir. Prognoz tanı anındaki semptomlarla ilişkilidir. Asemptomatik olan hastaların 5 yıllık sağ kalım şansları

daha fazladır. Hastaların opere edilebilecek dönemde, erken tanı alması prognoz açısından oldukça önemlidir. Bu yüzden akciğer kanseri semptomlarının iyi ayırt edilebilmesi, tanı için oldukça fazla önem arz etmektedir (Avci, 2017). 60 yaşın altında olma, Performans Skoru'na göre iyi performans durumu (% 5'den az kilo kaybı, primer tümörün büyüklüğü, metastaz olmaması ve erken evre) hastalık faktörlerinin sağ kalımı olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir (Kefeli et al., 2015).

Uzun süre geçemeyen öksürük veya öksürük şeklinde değişme, kanlı balgam, göğüs ağrısı, seste çatlama-kısıklık, halsizlik, nefes darlığı, hızlı kilo kaybı, bölgesel kemik ağrısı, yutkunmada güçlük, tekrarlayan ya da rezolüsyonu geciken pnömoni akciğer semptomları arasında yer alır. Bu şikayetlerle hastaneye başvuran risk grubundaki hastalarda; fizik muayenede; lokalize ronküs, horner sendromu belirtileri, vena cava superior sendromu, periferik lenfadenomegali, Akciğer PA ve yan grafisinde; ateletazi konsolidasyon, nodül-kitle, plevra sıvısı, hiler mediastinal genişleme ve de diafragma yüksekliği araştırılmalıdır (Aydiner 2012).

#### **2.1.4. Akciğer Kanseri Metastaz**

Akciğer kanseri olgularında, gerek ilk tanı sırasında gerekse cerrahi müdahale sonrası nükslerde olmak üzere, neredeyse % 80'inde uzak metastaz gelişebilmektedir (Karapinar, 2007). Akciğer kanserlerinde diğer solid tümörlerde olduğu gibi evrenin ilerlemesi metastaz riskini arttırmaktadır. Özellikle KHDAK'de hücre tipi ile asemptomatik metastaz insidansı konusunda çelişkiler vardır. Pek çok çalışmada adenokarsinom olgularında skuamöz hücreli akciğer kanserlerine oranla beyin metastaz insidansının yüksek olduğu gösterilmiştir (Karapinar, 2007). Buna rağmen erken evre olan, evre I ve II akciğer kanserli olgularda yapılan çalışmalarda, metastaz insidansı ile ilgili hiçbir fark bulunmamıştır (Tanaka, Kubota, Kodama, Nagai, & Nishiwaki, 1999)

Beyin, akciğer kanseri olgularında en sık rastlanan metastaz yeridir. Beyin metastazı genellikle tanı aşamasındaki olguların % 10'unda santral sinir sistemi tutulumu olarak gözlenir ve hastalık seyri boyunca bu oran yükselerek % 15-20'lere kadar çıkabilmektedir. Beyin metastazları daha çok kafatası, leptomeninksler ve beyin parenkiminde görülür. Akciğer kanseri olgularında rastlanan metastazlardan karaciğer metastazları ise çoğunlukla hastalığın ilerlemiş evrelerinde ve % 1-35



oranında görülmektedir. Bunun dışında kemik metastazı, ilerlemiş akciğer kanserleri olguların %25'inde gözlenir. Bunların % 80'inden fazlası aksiyal iskelette iken vertebra, pelvis, kosta ve femur en sık tutulan kemiklerdir. Kemik metastazları akciğer kanserli olguların ilk bulgusu da olabilir (Karapınar, 2007). KHDAK hastalarda özellikle organ spesifik semptomların değerlendirilmesinin, metastazları öngörmeye faydalı olabileceği açıktır. Akciğer kanserinde gözlenen metastazlar ve sıklığı Tablo 2-3'te verilmiştir.

**Tablo 2-3:** Akciğer kanserinde metastazlar ve sıklığı (Akkoçlu et al., 2006).

<b>Tutulan bölge</b>	<b>Sıklık yüzdeleri</b>
<b>Santral sinir sistemi</b>	% 0-20
<b>Kemik</b>	% 25- 35
<b>Kalp, perikard</b>	% 20
<b>Böbrek</b>	% 10-15
<b>Gastrointestinal sistem</b>	% 12
<b>Plevra</b>	% 8-15
<b>Adrenal</b>	% 2-22
<b>Karaciğer</b>	% 1-35
<b>Deri, yumuşak doku</b>	% 1-3

### **2.1.5. Akciğer Kanseri Sınıflandırması**

Akciğer Kanseri farklı özelliklerine göre pek çok alt tipe ayrılmaktadır. En kabul gören sınıflandırma mikroskop altında izlenen hücrelerin görüntüsüne göre yapılmıştır. Buna göre Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu sınıflandırma, başlıca klinik bulgularda izlenen farklılıklar, tedaviye cevap ve metastaz durumuna göre yapılmıştır. Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 85'i küçük hücreli dışı grubunda iken, % 15'i küçük hücreli akciğer kanserini oluşturmaktadır (W. D. Travis, 2011).

2015 yılında, akciğer tümörlerinin değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO'nun) yenilenen sınıflandırması önerilmiştir (William D Travis, Brambilla, Burke, Marx, & Nicholson, 2015). Bu sınıflandırma, ilgili histopatolojik ve immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal bulguları içermektedir. Yeni sınıflandırma sadece rezeksiyon örneklerinde değil, aynı zamanda küçük biyopsiler ve sitolojik materyallerde de geçerli olduğundan önemlidir (William D Travis, Brambilla, & Riely, 2013). Akciğer kanserli hastaların yaklaşık %70'inin, hastalığın ilerlemiş aşamalarında olduğu ve tümör rezeksiyonu için uygun olmadığı gerçeği göz önüne alındığında, bu sınıflandırma daha da önem kazanır (William D Travis et al., 2013). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015 yılı sınıflandırmasına göre Akciğer Kanseri şu şekilde sınıflandırılmıştır (William D Travis et al., 2015).

- 1) Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) (%15)
- 2) Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) (%85)
  - Skuamöz karsinom (Epidermoid)
  - Adenokarsinom
  - Büyük hücreli akciğer kanseri (BHAK)
  - Diğer alt gruplar

Akciğer Kanserinin histolojik olarak daha detaylı sınıflandırması Tablo 2-4'te verilmiştir.

**Tablo 2-4:** Akciğer tümörlerinin WHO'nun Histolojik olarak Sınıflandırması (*Modified from the 2004 WHO Classification<sup>6</sup> and the 2011 IASLC/ATS/ERS Classification of Lung Adenocarcinoma.*)(W. D. Travis, 2011; William D. Travis, 2011).

<b>AKCİĞER KANSERİNİN HİSTOLOJİK SINIFLANDIRILMASI</b>		
<b>Preinvaziv lezyonlar</b>		Skvamöz displazi/Karsinom in situ (CIS) Atipik adenomatous hiperplazi (AAH) Adenokarsinom in situ (AIS) (nonmüsinöz, müsinöz, ya da mix nonmüsinöz/müsinöz) Diffuz idiopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi (DIPNECH)
<b>Skvamöz hücreli Karsinom</b>	<b>Tipleri</b>	Papiller Berrak Hücreli Küçük Hücreli Bazaloid
<b>Küçük Hücreli Karsinom</b>		Kombine küçük hücreli karsinom
<b>Adenokarsinom</b>	<b>1) Minimal invaziv Adenokarsinom (MIA) (<math>\leq 5</math> mm invazyon alanı taşıyan, <math>\leq 3</math> mm lepidik predominant tümör)</b>	Nonmüsinöz, müsinöz, mix nonmüsinöz/müsinöz
	<b>2) İnvaziv Adenokarsinom</b>	Lepidik predominant ( $>5$ mm invazyon alanı gösteren, önceden nonmüsinöz Bac paterni)
		Asiner predominant
		Papiller predominant
Mikropapiller predominant		
<b>3) İnvaziv Adenokarsinom Tipleri</b>	Invaziv mmüsinöz adenocarcinom (önceden müsinöz BAC)	
	Kolloid karsinom	
	Fetal varyant (düşük ya da yüksek dereceli)	
	Enterik varyant	
<b>Büyük Hücreli Karsinom</b>		Tipleri Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom (BHNEK)   Kombine Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom (LCNEC) Bazaloid Karsinom Lenfoepiteliyoma benzeri Karsinom Berrak hücreli Karsinom Rhabdoid fenotipli Büyük Hücreli Karsinom
<b>Adenoskvamöz Karsinom</b>		
<b>Sarkomatoid Karsinomlar</b>		Pleomorfik Karsinom İğsi hücreli Karsinom Dev hücreli Karsinom Karsinosarkom Pulmoner blastom Diğer
<b>Karsinoid tümör</b>		Tipik Karsinoid (TC) Atipik Karsinoid (AC)
<b>Tükürük bezi tipinde karsinom</b>		Mukoepidermoid Karsinom Adenoid kistik Karsinom Epitelyal-mioepitelyal Karsinom

### **2.1.6. Akciğer Kanserinde Klinik Safhalar-Evreleme**

Akciğer kanseri evrelemesi kanserin lokal yerleşimli olup olmadığına, akciğerden lenf bezleri ve diğer organlara yayılıp yayılmadığına göre yapılır. Akciğer kanserlerinin evrelemesinde dünya genelinde TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır.

#### **TNM Sınıflandırması**

Akciğer kanseri evrelemesinde tümörün özelliklerinin (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) durumlarının değerlendirildiği TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. Aşağıdaki sınıflandırma, 2016'da güncellenen ve Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği tarafından özet haline getirilip KHDAK 8. Evreleme Özet Kitabı olarak basılan bildiri referans alınarak yapılmıştır. TNM bulgularına göre KHDAK'nin evreleri Tablo 2-5'te gösterilmiştir.

#### **Tümör Durumu (T)**

T faktörü primer tümörün özelliklerini tanımlamaktadır. Bunun için tümörün boyutu, çevresi ve invazyon özellikleri ve ilişkili nodüller gibi faktörler göz önünde bulundurularak değerlendirme yapılmaktadır (Goldstraw et al., 2016) ;

**Tümör boyutu:** Uluslararası kanser grupları tarafından primer tümörün nasıl ölçüleceğine dair net bir fikir sunulmamıştır. Ancak, klinik evreleme için genel uygulama, inspirasyonda elde edilen aksial torakal Bilgisayarlı Tomografi (BT) kesitlerinin parankim penceresinde, tümörün en uzun boyutunun ölçülmesidir. Patolojik evreleme ise, inflasyon sonrası ölçüm yapılarak en uzun tümör boyutu alınarak yapılır. KHDAK Sekizinci Evrelemede tümör boyutu 5 cm'ye kadar olan tümörlerde, tümörün her bir cm'si için T tanımı yapılmış (T1a, T1b, T1c, T2a, T2b), 5cm'den büyük ancak 7 cm ve altındaki tümörler T3, 7 cm'den büyük tümörler ise T4 olarak tanımlanmıştır.

**T:** Tümörün özellikleri.

**Tx:** Primer tümörün saptanamadığı, balgam veya bronkoskopik sıvılarda malign hücrelerin görüldüğü ancak görüntüleme yöntemleri ya da bronkoskopik olarak saptanamayan tümörler.

**T0:** herhangi bir tümör bulgusunun olmaması.

**Tis:** Karsinom in situ tümör olarak değerlendirilmektedir.

Tümör boyutunun ölçümünde inspiyumda çekilen toraks bilgisayarlı tomografisinin aksiyal kesitlerindeki uzun çap dikkate alınmaktadır.

**T1:** Ana bronş tutulumu olmadan akciğer veya visseral plevra ile çevrili, tümörün en büyük çapı 3 cm ve daha düşük, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimalde invazyon bulgusu olmayan (örneğin ana bronşta olmayan\*),

**T1a, T1b, T1c, T2a, T2b:** Tümör boyutu 5 santimetreye kadar olan tümörler birer santimetre arayla,

**T1a (mi):** Minimal invaziv adenokarsinom\*\*,

**T1a:** Tümörün en geniş çapı  $\leq 1$  cm olan tümör,

**T1b:** Tümörün en geniş çapı  $> 1$  cm,  $\leq 2$  cm olan tümör,

**T1c:** Tümörün en geniş çapı  $> 2$  cm,  $\leq 3$  cm olan tümör,

**T2:** Tümörün en geniş çapı  $> 3$  cm,  $\leq 5$  cm veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör\*\*\*,

-Karinayı invaze etmeden, karinaya uzaklığına bakılmaksızın ana bronşu tutan tümör,

-Visseral plevra invazyonu mevcut,

-Hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni oluşturan, akciğerin bir kısmını veya tümünü içeren tümör.

**T2a:** Tümörün çapı 3 cm den büyük ya da 4 cm'e eşit veya 4 cm'den küçük olanlar,

**T2b:** Tümörün çapı 4 cm den büyük ya da 5 cm'e eşit veya 5 cm'den küçük olanlar,

**T3:** 5 santimetreden büyük ancak 7 santimetre ve altındaki tümörler, Primer tümörle aynı lobda metastatik nodül/nodüller, Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, pariyetal perikard gibi yapılardan birine direkt invazyon varlığı,

**T4:** 7 santimetreden büyük tümörler olarak tanımlanmaktadır. Diyafragma, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra korpusu, karina gibi yapılardan birine invazyon varlığı Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül/nodüller,

\* Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayımı da T1 olarak sınıflandırılır.

\*\*Daha baskın olarak lepidikpaterni ve herhangi bir odakta en büyük çapındaki invazyon  $\leq 5$ mm olan soliter adenokarsinom ( $\leq 3$  cm)

\*\*\*Bu özellikleri olan T2 tümör eğer  $\leq 4$ cm veya büyüklüğü belirlenemiyor ise T2a;eğer  $> 4$  cm fakat  $\leq 5$  cm ise T2b olarak sınıflandırılır.

#### **Ayrı Tümör Nodüllerinin Değerlendirilmesi:**

Ayrı Tümör nodülleri denildiği zaman bir adet baskın lezyon ve histolojik olarak aynı tümör olduğu bilinen, bir veya daha fazla solid, ayrı nodüllerin olduğu anlaşılır. Ayrı tümör nodülleri aynı lobda ise T3, aynı tarafta farklı lobda ise T4 ve karşı tarafta ise M1a olarak sınıflandırılır. Tümü için tek bir N ve M kullanılır.

#### **NOD Durumu (N)**

**N:** Bölgesel Lenf Nodları

**Nx:** Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor,

**N0:** Bölgesel lenf bezi metastazı yok,

**N1:** İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve/veya intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon,

**N2:** İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz,

**N3:** Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf bezlerine metastaz.

#### **Metastaz Durumu (M)**

**Mx:** Uzak metastaz belirlenemedi,

**M0:** Uzak metastaz yok,

**M1:** Uzak metastaz var,

**M1a:** Karşı akciğerde metastatik nodül/nodülleri, plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon (paramalign efüzyonlar hariç),

**M1b:** Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz (bölgesel olmayan tek lenf bezi metastazı dahil),

**M1c:** Bir veya birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz.

**Tablo 2-5:** TNM Bulgularına göre KHDAK Evreleri (Güntülü Ak, 2016).

Evre	Alt tip	Tümör Durumu (T)	NOD Durumu (N)	Metastaz Durumu (M)
<b>0</b>		(is)	0	0
<b>I</b>	<b>IA</b>	1a,b	0	0
	<b>IB</b>	2a	0	0
<b>II</b>	<b>IIA</b>	1a,b	1	0
		2a	1	0
		2b	0	0
	<b>IIB</b>	2b	1	0
		3	0	0
<b>III</b>	<b>IIIA</b>	1,2	2	0
		3	1,2	0
		4	1,0	0
	<b>IIIB</b>	4	2	0
		Herhangi	3	0
<b>IV</b>		Herhangi	Herhangi	1a,b

### 2.1.7. Akciğer Kanseri Tanı

Akciğer kanseri, genellikle göğüs radyografisinde normalin dışında bir gölgelenme ile veya yeni ortaya çıkan ya da önceden olup karakter değiştiren bir

klirik bulgu ile kendini göstermektedir. Akciğer kanserli olguların çok büyük bir kısmı tanı döneminde tümörün yeri, büyüklüğü, metastatik veya sistemik etkileri sebebiyle semptomatiktir. Akciğer kanserli hastalarda herhangi bir fiziksel bulgu olmayabilir. Fizik muayenesinde supraklaviküler lenfadenopati, plevral sıvı birikimi, lokalize kemik duyarlılığı, Horner sendromu bulguları, nörolojik bulgular, lokalize ronküs, hepatomegali, periferik motor ya da duyuusal nöropati bulguları görülebilir. Geçmeyen öksürük, genellikle santral yerleşimli tümörlerde sıklıkla rastlanılan bir semptomdur.

Akciğerde çapı 3cm'den küçük yuvarlak ya da oval şekildeki yoğunluklara 'nodül', 3 cm'den daha büyük olanlara ise 'kitle' adı verilir. Özellikle 2 cm'den daha büyük olan nodüllerin birçoğu malign karaktere sahip olma eğilimindedir. Malign lezyon saptanan hastalarda 5 yıllık sağ kalımı nodülün çapıyla ters orantılı olarak azalmaktadır. 1 cm ve daha küçük çaplı olan nodüllerin yaklaşık % 15-20'si, 2 cm ya da daha küçük çaplı nodüllerin yaklaşık % 40-45'i ve çapı 3 cm'den büyük olan nodüllerin de % 80-95'i kansere bağlı olduğu bildirilmiştir (Berkmen, 1997). Asemptomatik risk altındaki popülasyonlarda yapılan çok sayıda çalışmada, balgam sitolojisi gibi ek desteklerle birlikte veya akciğer grafisi taramasının, ya akciğer röntgeni (CXR) ya da bilgisayarlı tomografi (BT) kullanılarak etkinliği araştırılmıştır. Hastalığın erken evrede tanı alması bakımından tarama etkinliğinin altın standart ölçümü, ölüm oranını azaltmaktadır. Bu durum, bir kanserin erken tespit edilmesini ve iyileşme ile sonuçlanabileceğini göstermektedir (Knight et al., 2017)

Akciğer kanseri tanısında kullanılan bronkoskopik yöntemler (günümüzde rijid ve fiberoptik bronkoskopi) bazı tedavi uygulamalarında tedavi sürecini takip etmede kullanılmaktadır.

Bronkoskopi, tanıda endobronşiyal ultrasonun, akciğer kanserinin nodal evrelemesinin belirlenmesinde günümüzde artık kabul edilmiş bir role sahiptir. Yaklaşık % 1'lik ciddi komplikasyon oranları (Hehn, Haponik, Rubin, Lechtzin, & Diette, 2003) ve ayakta tedavi ortamında güvenle yapılabilmesi ile bronkoskopi akciğer kanserinin erken teşhisinde önemli bir yer teşkil etmektedir. Bununla birlikte, bu teşhis ile şüphelenilen hastalarda akciğer kanserinin saptanması için duyarlılık, tümörün büyüklüğüne ve konumuna göre % 34 ila % 88 arasında değişmektedir



(Knight et al., 2017). Akciğer kanseri riski taşıyan hastalara şüpheli radyolojik görüntüleme olmadan, bir tarama olarak uygulandığında duyarlılık daha da düşük olabilir. Akciğer kanseri tanısında bronkoskopinin duyarlılığını artırmak için Spira ve arkadaşları akciğer kanseri şüphesi olan hastalarda bronkoskopi sırasında örneklenen histolojik olarak normal bronş epitelinin RNA ekspresyonunu analiz etmişlerdir (Spira et al., 2007).

### **Bronkoskopik Yöntemler:**

Bronkoskopi, büyük, merkezi lezyonlar için ideal bir yöntemdir ve minimal morbidite avantajı sunar. Bronkoskopi, bronşiyal yıkama, fırçalama, bronşiyal ve transbronşiyal biyopsi için % 65-88'lik bir tanı verimi ile kullanılabilir (Ost et al., 2016). Lezyonun ultrason eşliğinde yapılan biyopsi ile direkt bronkoskopik hava yolu görselleştirmesini birleştirerek, endobronşiyal ultrason büyük, merkezi yerleşimli lezyonlarda % 75-85 tanısal verim sağlar (Ost et al., 2016). Bu çalışmada tanısal yöntem olarak bronş lavajı kullanılmıştır. Bronş lavajı, tanı yöntemleri içinde en basit ve en az travmatik olanıdır. Genellikle malignite, tüberküloz ve bazı diğer akciğer infeksiyonlarının tanısı için kullanılır. İşlem sırasında lavaj devamlı olarak toplandığı için diğer loblar, üst solunum yolları ve ağız boşluğundan kontaminasyon kaçınılmazdır. Lavajın toplanabilmesi amacıyla aspirasyon kanalına polietilen bir lavaj tüpü bağlanır. Bu tüp vasıtasıyla lavaj için %0.9 serum fizyolojik akciğerlere ulaştırılır. Bronkoskopun ucu uygun segment içine yerleştirilerek her defasında yaklaşık 10 ml kadarı uygulanır. Verilen miktarın genellikle %25-50'si geri aspire edilir. Alınan materyal sitolojik inceleme ve/veya enfeksiyöz etken araştırılması için ilgili laboratuvarlara bekletilmeden gönderilir. Lavaj biyopsi ve fırçalama işlemlerinden sonra yapılırsa dökülen hücrelerde aspirasyonla lavaj sıvısı içine geçerek tanı olasılığı arttırılmış olur (Arroliga & Matthay, 1993).

Akciğer kanseri tanısında izlenen rota 3 grupta toplanabilir. Bunlar; radyolojik değerlendirme, sitolojik değerlendirme ve girişimsel yöntemlerdir. Burada en sık kullanılan yöntem bronkoskopidir. Bronkoskopide fiberoptik bronkoskopun esnek oluşu sayesinde manevra yeteneği fazladır ve bu özelliği ile sağ ve sol primer bronşların değerlendirilmesinde avantaj sağlamaktadır. Transtorasik ince iğne aspirasyonu ise akciğerlerde mediastinal kitlelerin tanısında, malignite şüphesi olan nodül, kitle ve konsolidasyon oluşturan lezyonların tanısında, bazı malign

yayımdan şüphe edilen hastaların evrelendirilmesinde ve ayrıca bronkoskopi ile tanı konulamayan hastalarda endikedir. Plevral sıvı aspirasyonu/plevral biyopsinde plevral sıvının sitolojik değerlendirilmesinin tanı değeri % 60-75 olduğu bildirilmiştir (Adnan Aydın, 2006). Adenokarsinomlarda ise tanı değeri daha yüksektir. Bunlardan başka diğer tanı yöntemleri Video aracılı torakoskopi (VATS), Mediastinoskopi, ve Torakotomidir. VATS; sekonder ve tersiyer bronş tümörlerinde, periferik yerleşimli primer bronş tümörlerinde kullanılırken, Mediastinoskopi; trakea, karina, vena cava superior civarında yerleşmiş olan lezyonların tanısında ve Torakotomi de; tanı ve rezeksiyon için uygulanabilmektedir.

## **2.2. Akciğer Kanserin Moleküler Mekanizması**

Hücre büyümesi ve döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sinyal iletimi ile ilişkili genler akciğer karsinogenezinin farklı aşamalarında hasar görebilir. Akciğer kanserinde görülen genomik dengesizlik; pek çok sayısal (anöploidi) ve yapısal kromozom anormalileri (delesyon, amplifikasyon, translokasyonlar) içerir. Klinik olarak akciğer kanseri ortaya çıkana kadar pek çok genetik hasarın oluşması gerektiği bilinen bir gerçektir. Akciğer karsinogenezinde meydana gelen genetik olaylar şu şekilde sıralanabilir;

1. Onkogenlerin mutasyonlarla aktivasyonu,
2. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu,
3. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler,
4. DNA tamirinde görevli olan genlerde ortaya çıkan değişiklikler,
5. Büyüme faktörleri ve reseptörleri ile ilişkili değişiklikler.

Bu gibi değişiklikler toplumda sıklıkla olmasına rağmen bu etiyolojik faktörlere maruz kalan her bireyde kanser hastalığı gelişmemesi tamir sistemlerindeki genetik farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bazı çalışmalar kansere ailevi yatkınlığın sigara kullanımından bağımsız bir risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır (Testa et al., 2018)

### 2.2.1. Akciğer Kanserinde Gözlenen Genetik Değişiklikler

Hücreyi normal hücreden kanserleşmeye doğru götüren hasarın temelinde hücre bölünmesini kontrol eden genlerdeki değişiklikler yatar. Hücrelerin karsinogenez sürecinde yani normal hücreden kanser hücresi gelişimine kadar aldığı yolda (normal, hiperplazi, metaplazi, displazi, karsinom in-situ ve invaziv neoplastik fokus) görülen gen anomalileri, hipermetilasyon ve allel kaybı ile ilgili çalışmalar yapılmış ve 3. kromozomun kısa kolunda allel kaybı en erken rastlanan bulgu olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada 3p delesyonları, özellikle KHAK hastalarında ortalama % 66 oranında bulunmuştur. Diğer önemli anomaliler ise 9p'de ve 8p'de allel kaybı / hipermetilasyonlardır. 3p, 5q, 13q ve 17p bölgelerinde meydana gelen kromozom hasarları, özellikle KHAK'de görülür. KHAK olgularının % 90'ında ve KHDAK olgularının ise % 50'sinden fazlasında, 17p'de mutasyonlar tespit edilmiştir (Arifin et al., 2010).

Retinoblastoma (*Rb*) geni ve proteinleri KHAK'li hastalarda, KHDAK'li hastalara göre yüksek bulunmuştur (Arifin et al., 2010). 17. kromozom üzerinde bulunan ve oldukça önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gören *p53* gen lokusundaki değişiklikler ise daha ileri evrelerde görülmektedir. *EGFR* ve *p53* genindeki anomaliler akciğerde normal bronş epitelinde de görülebilmeye rağmen *KRAS*'daki anomaliler yalnızca erken karsinom evresinde tespit edilmektedir. Dahası displastik hücrelerde görülebilen bu anomaliler sonucunda her lezyonda kanser gelişmemektedir.

### 2.2.2. Akciğer Kanserinde Tümör Baskılayıcı Genler ve Büyüme Faktörleri

Tümör baskılayıcı genlerin (TBG) inaktivasyonuna sebep olacak genetik mutasyonlar akciğer kanserinde rol almaktadır. İnsan kanserlerinde en sık rastlanan TBG, 17. kromozom üzerinde bulunan *p53* ve 13. kromozom üzerinde bulunan Retinoblastoma (*Rb*) genidir (Tahara, Yasui, Ito, & Harris, 2010). *Rb*, hücre döngüsünü baskılayarak, büyümeyi kontrol ederken *p53* geninde meydana gelen mutasyonlar ise büyümeyi hızlandırarak karsinogenezde rol oynar. KHAK'nde çoğunlukla *c-myc* ve *Rb*; KHDAK'nde ise çoğunlukla *RAS*, *PTEN* ve *p16*da

mutasyon olduğu bildirilmiştir. p53 gen mutasyonları akciğer kanseri olgularının % 60-75'inde görülmektedir (Tahara et al., 2010).

Son yıllarda akciğer kanserinde en sık rastlanan mutasyonun epidermal büyüme faktörü reseptöründe (EGFR) olduğu belirlenmiştir (Linardou, Dahabreh, Bafaloukos, Kosmidis, & Murray, 2009). EGFR'yi kodlayan *ERBB1* geni ve *RAS* protoonkogenleri daha sıklıkla KHDAK'li olgularda gözlenen mutasyonlardır. Özellikle *ERBB1*'in exon 19 ve 20 bölgesinde medana gelen bu mutasyonlar hücrelerin çoğalma, tümör invazyonu, apoptozu ve anjiyogenezi etkilemektedir. Bu mutasyon ardışık sinyal üretimi ile sürekli *AKT* aktivasyonuna neden olur. TSG fonksiyonunun kaybedilmesi, akciğer karsinogenezinde önemli bir adımdır ve genellikle her iki allelin kromozomal delesyon veya translokasyon yoluyla bir allel inaktivasyonu ve ikinci alleli inaktive eden nokta mutasyonu, epigenetik veya transkripsiyonel susturma ile inaktivasyonundan kaynaklanır. Akciğer kanserinde yaygın olarak inaktive edilmiş TBG'ler arasında *TP53*, *RBI*, *STK11*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* ve *PTEN* bulunur (Gazdar, 2009).

### 2.3. Akciğer Kanserinde Tedavi ve Sağ kalım

Akciğer kanserinin temel bir tıbbi sorunu temsil ettiği ve bu grup kanserlerin klinik tedavisindeki ilerlemenin, özellikle moleküler düzeyde ilerlemeler ile sağlanabileceği öngörülmektedir.

KHDAK'li hastaların yaklaşık % 90'ında, tütün kullanımı öyküsü vardır. Bu hastaların çoğu, çeşitli tedavilerin iyileştirici olamayacağı ileri bir aşamada tanı alır. Akciğer kanserinde uygulanılacak olan tedavi kürleri, tanın konulduğu andaki evreye göre belirlenir. Genellikle 1. ve 2. evrede olan hastalara cerrahi girişimde bulunulurken, 3. evredeki hastalarının bazılarında cerrahi müdahale, bir kısmına da radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Yine de 3 yıllık sağ kalım 2. evredeki KHDAK hastaları için % 35-50 ve 3. evredeki KHDAK hastaları için ise % 28'dir (Chen et al., 2007). 5 yıllık sağ kalım KHDAK hastalarının genelinde %15 olarak bildirilmiştir (Tang, He, Guo, & Chang, 2006). Buna göre erken evre hastalarının cerrahi müdahale, ilaç tedavisi ve ışın tedavisi ile sağ kalım oranı artmaktadır diyebiliriz. Ancak ileri evre hastalarının büyük bir kısmı, cerrahi operasyona

alınamaması sağ kalım oranını etkilemektedir. Ayrıca ileri evrelerdeki hastaların kemoterapiye ve radyoterapiye olan dirençleri de sağ kalım oranını azaltmaktadır.

Skvamöz hücreli karsinom, KHDAK tanısı alan tüm vakaların yaklaşık % 30'unu temsil eder (W. D. Travis, 2011). İleri yassı hücreli KHDAK tedavisi, tam olarak karşılanmamış bir ihtiyaç olarak varlığını sürdürmektedir; 1999 yılında ikinci basamak tedavisi için *Dosetaksel*'in onaylanmasından bu yana terapötik ilerlemeler kaydedilmiştir. KHDAK tedavisi için yeni ajanların çoğu, toksisiteleri ya da etkinlik eksikliği nedeniyle bu alt-tip için endike değildir ya da aktiviteleri, skuamöz hücreli KHDAK'nde nadiren rastlanan spesifik genetik değişimlere sahip tümörler ile sınırlıdır. Araştırmacılar tek ajan tedavisi, *Dosetaksel* ile görülenlerden daha iyi sağ kalım ile sonuçlandığını bildirmişlerdir (Brahmer et al., 2015).

Araştırmacılar KHDAK hastalığında daha moleküler düzeyde çalışılmasının ve günümüzdeki tedavi süreçlerinin buna göre revize edilmesi gerekliliğinin önemini vurgulamışlardır. Hedeflenen moleküler tedaviler, ilerlemiş KHDAK'nin yönetiminde devrim yaratmış ve *driver* mutasyonları olan hastalar için uluslararası bakım standardı haline gelmiştir (Bui, Cooper, Kao, & Boyer, 2018). Bu bağlamda kişiselleştirilmiş tedavi ile hasta bakımı giderek daha da önem kazanmaktadır. Akciğer kanseri hastalarına en iyi sonuçları verebilmek için tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ) en uygun dizisi, özellikle de onkolojinin immünoterapi döneminde bilinmemektedir. Bu yüzden moleküler direncin daha iyi anlaşılması, yeni tedavilerin geliştirilmesine rehberlik edecek ve tedavi seçimi konusunda karar vermede yardımcı olacaktır.

KHDAK tedavisindeki önemli ilerlemeler, son yirmi yılda, hastalık biyolojisi ve tümör ilerlemesi mekanizmalarını daha iyi anlama ve erken teşhis ve multimodal bakımı ilerletme konusunda daha da artmıştır. Küçük molekülü TKİ'lerinin ve immünoterapinin kullanımı, seçilmiş hastalarda daha uzun sağkalım lehinedir. Ne yazık ki özellikle metastatik hastalıkta KHDAK için genel tedavi ve sağkalım oranları düşük kalmaktadır. Bu nedenle, yeni ilaçlarla ilgili araştırmaya devam edilmesi ve klinik faydayı daha geniş bir hasta popülasyonuna genişletmek ve KHDAK'deki sonuçları iyileştirmek için kombinasyon terapileri gerekmektedir (Herbst, Morgensztern, & Boshoff, 2018).

Tümör boyutu büyüdükçe evre ilerlemekte ve sağ kalım oranları buna göre düşmektedir. 7.TNM evrelemesine göre bu sağ kalım oranları Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 2-6:** TNM-7 sınıflamasına göre, T evrelerinin 5 yıllık sağ kalım oranları.

TNM-7 Evrelemesi	5 yıllık sağkalım %
T1a ( $\leq 2$ cm)	% 77
T1b ( $>2$ cm ve $\leq 3$ cm)	% 71
T2a ( $>3$ cm ve $\leq 5$ cm)	% 58
T2b ( $>5$ cm ve $\leq 7$ cm)	% 49
T3 ( $>7$ cm)	% 35
T3 (aynı lobda satellit nodül)	% 28
T3 (diğer)	% 31
T4 (aynı akciğer, farklı lobda)	% 22

#### 2.4. PTEN Geni

*PTEN* geni, 10. kromozomun 10q23 bölgesinde yer alan tümör baskılayıcı bir genidir ve bu genin bilinen pek çok farklı adı vardır. Bunlar; MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers 1), phosphatase and tensin homolog, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, TEP1 (TGF- $\beta$  düzenleyici ve epitelyal hücre genişletici fosfataz) ve TEP1 phosphatase'dır. *PTEN*'in pek çok kanser türünde ve bazı genetik hastalıklarda ifadesi kaybolmuştur (Strumane, Song, Baas, & Collard, 2008).

*PTEN*'in delesyona uğradığı genetik hastalıklar, Cowden Sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba Sendromu, Humartoma Sendromu, Proteus ve Proteus Sendromları, Genç Polipozis Sendromunun alt tipi ve Ihermitte-Duclos hastalığı sayılabilir (Knobbe, Merlo, & Reifengerger, 2002).

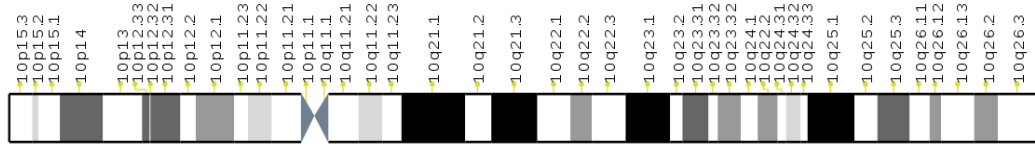
#### 2.4.1. *PTEN* Geninin Kısa Tarihiçesi

Kromozom 10'un kısmi veya tamamen kaybının varlığını ortaya koyan ilk olgulara 1980'lerde sitogenetik ve moleküler çalışmalarla, beyin, mesane ve prostat kanserlerinde rastlanmıştır. Homozigot mutasyonların 10. kromozom üzerinde haritalandırılması, ancak 1997 yılında, 10q23 lokusunda yeni bir aday tümör baskılayıcı geni olarak tanımlamıştır (Cristofano, Pesce, Cordon-Cardo, & Pandolfi, 1998). Aynı yıl, fosfataz ve tensin homologu *PTEN*'in, çok sayıda sporadik tümör tipinde sıklıkla delesyona uğradığı belirlenmiş ve Cowden hastalığı gibi kanser yatkınlık sendromları olan hastalarda germ hattı mutasyonlarının gözlenmesi ile daha çok araştırılması gereken bir hedef haline gelmiştir (Cristofano et al., 1998). Bundan hemen sonra, *PTEN* geni susturulmuş farelerinin üretimi, çoklu doku tiplerinde *PTEN*'in temel tümör baskılayıcı rolünü göstermiştir (Suzuki et al., 1998). Özellikle, bir dizi hipomorfik *PTEN* fare modelinin analizi, *PTEN* seviyelerinin, kanser duyarlılığını belirleyen ve tümör ilerlemesi ile ilgili ilişkileri gösteren fonksiyonel sonuçları ortaya çıkarmıştır (Song, Salmena, & Pandolfi, 2012).

#### 2.4.2. *PTEN* Geninin Yapısı

Çift etkili bir fosfataz olan *PTEN*, hem lipid fosfataz hem de protein fosfataz aktivitesine sahiptir (Knobbe et al., 2002). Protein fosfataz aktivitesinin lipid fosfataz aktivitesinden daha az olduğu bilinmektedir. *PTEN*, 403 amino asitten oluşur ve diğer protein tirozin fosfatazlarının aktif bölgelerinde de bulunan HCXXGXXR (X'in herhangi bir amino asit olduğu) bir katalitik motif içerir. *PTEN* geni, hücrede bölünmenin kontrolü, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozda rol alan ve bu bakımdan pek çok fonksiyonu olan önemli bir tümör baskılayıcıdır.

İnsanda *PTEN* geni 10q23 lokasyonundan kodlanan ve 9 ekzonu bulunan bir gendir (Şekil 2-1). Genomik uzunluğu yaklaşık 100 kb'dır. 3417 baz çifti uzunluğunda bir transkript ve 403 aminoasitlik bir protein kodlar. Transkripsiyonel bölgesi -951. ve -925. nükleotid bölgesinden başlar, pozitif düzenlenmesi -1001 ve -427 nükleotid dizisinde görev alır (Knobbe et al., 2002). *PTEN*'in transkripsiyonu promotorunun -947 ve -939 arasındaki GCGGCGGCG dizisine Egr1 transkripsiyon faktörünün bağlanması ile başlar. *PTEN* promotoru, CpG dinükleotidleri bakımından zengin olduğundan DNA metilasyonu bu bölgede meydana gelmektedir.



**Şekil 2-1:** *PTEN* geninin lokalize olduğu 10. kromozom.

### 2.4.3. *PTEN* Geninin Hücrede Fonksiyonu

*PTEN* geni embriyonik gelişimde, tümör oluşumunda, hücre döngüsünde ve apoptozda rol oynar. Memeli doku kültürü çalışmaları, fosfataz bölgesinin *PTEN*'in hücre döngüsü durdurma ve apoptozdaki rolü için kritik olduğunu göstermektedir (Simpson & Parsons, 2001).

*PTEN* inaktivasyonu, aktif AKT (Protein Kinaz B) ve diğer alt moleküller ile sonuçlanır, bu nedenle TKİ cevabının biyobelirteçleri olarak kullanılabilir (Song et al., 2012). *PTEN*'in hücrede fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir;

- *PTEN* geninin ifadesi lipid fosfataz etkisi ile fosfoinositol (3,4,5) üç fosfatı defosforile etmektedir.
- Aktif PI3K, Fosfoinositol (4,5) di fosfat'ın (PI2P), inositol halkasını 3' ucundan fosfatlayarak fosfoinositol 3,4,5 tri fosfat oluşur (PI3P). Hücrede ikinci mesajcı gibi hareket eder.
- PI3P, PDK1 ve 2'yi aktifleştirerek, AKT'yi treonin 308. aminoasitten ve serin 473. aminoasitten fosfatlar.
- Aktifleşen AKT hücrede yaşamsal yollarda görev alır.
- Akt, NFkB'nin (Nükleer faktör kapa B) inhibitör kinazını (IKK) fosfatlar, fosfatlanan IKK, NFkB'nin inhibitörünü fosfatlar (IKB) ve fosfatlanan IKB, NFkB'den ayrılarak sitoplazmada degrave olur.
- IKB'nin degregasyonu sonucu NFkB aktifleşir.
- Transkripsiyon faktörü olan NFkB birçok hedef genin ifadesini sağlar.

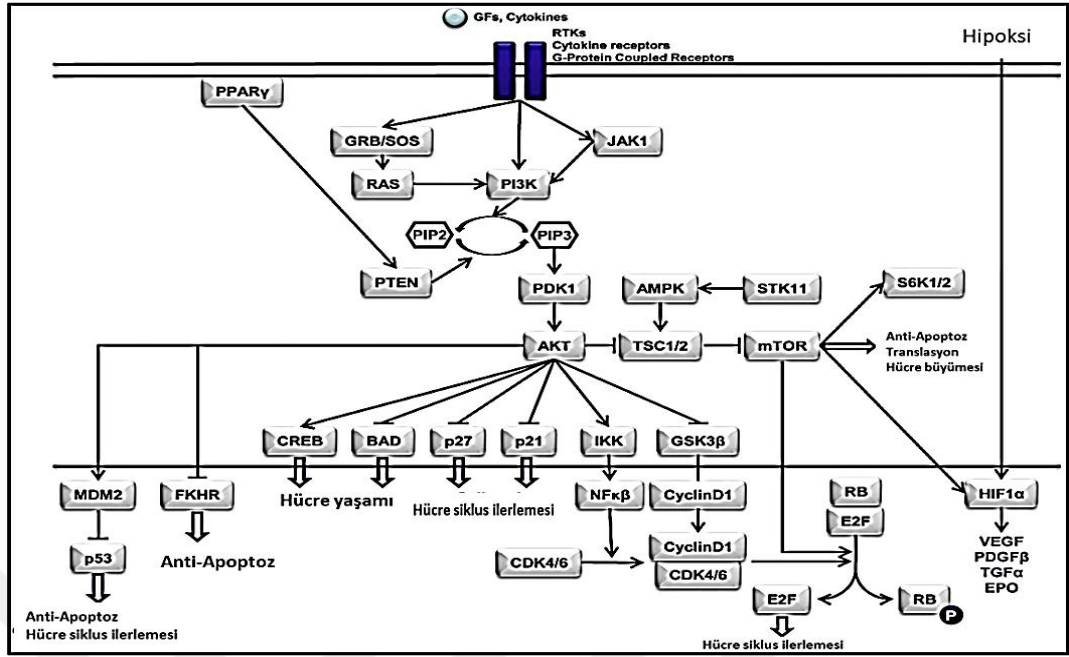


Araştırmacılar, *PTEN*'in hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücreyel süreçler üzerindeki etkisini araştırmak için, farklı hücre hatlarında *PTEN* ifadesine bakmışlardır. *PTEN* geni susturulmuş glioma hücre hatlarında, *PTEN* ekspresyonu büyüme baskılanmasına neden olmuştur. Apoptotik ve hücre döngüsü analizi amacı ile yapılan çalışmalarda, *PTEN* aracılı büyüme baskılanmasının G1 tutukluğuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Georgescu, 2010). *PTEN*'in fosfataz katalitik olarak aktif olmayan mutantları, hücreyel büyüme bastırmaz veya hücre döngüsünün durdurulmasını indüklemez.

### **PI3K / AKT / mTOR Yolağı:**

AKT'nin aşağı doğru (down stream) hedefleri, hücre büyümesi, anjiyogenez, hücre metabolizması, protein sentezi ve apoptozun doğrudan baskılanması veya mTOR'un aktivasyonu ile ilgilidir (Georgescu, 2010). PI3K/AKT/mTOR yolağı Şekil 2-2'de verilmiştir.

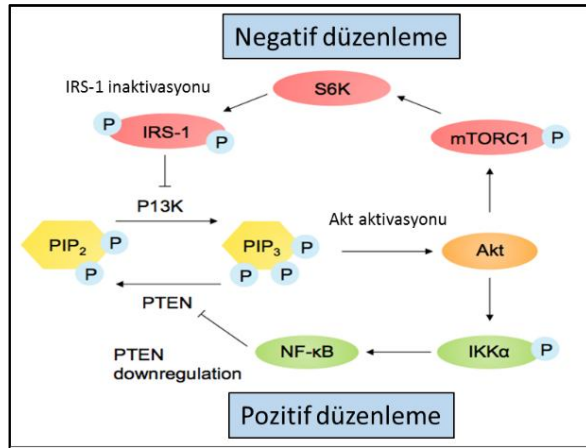
PI3K/AKT yolağının aktivasyonu, fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K) düzenleyici alt birimi olan p85'in SH2-alanlarının, EGFR gibi aktive edilmiş reseptör tirozin kinazların, fosfotirozin kalıntılara bağlanması yoluyla gerçekteşir. Alternatif olarak aktivasyon, PI3K'nin aktif RAS'a bağlanmasıyla gerçekteşebilir. Mutasyon ve daha yaygın olarak, PI3K'nin katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA'nın amplifikasyonu, daha sıklıkla skuamöz hücreli karsinomlarda ortaya çıkmaktadır. PI3K'den aşağı doğru hareket eden bir serin / treonin kinaz olan AKT, aynı zamanda, bu yolakta sürekli aktivasyonuna yol ačan mutasyonlara da sahip olabilir (Kandasamy & Srivastava, 2002).



Şekil 2-2: PI3K / AKT / mTOR yolağı.

AKT'nin primer efektörlerinden biri, proliferasyonu, hücre döngüsü ilerleyişini, mRNA translasyonunu, sito-iskelet organizasyonunu ve hayatta kalmayı düzenleyen bir serin / treonin kinaz olan mTOR'dur.

PI3K / AKT yolunu, PI3K, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat (PIP3) üzerindeki fosfataz aktivitesi ile PI3K / AKT yolunu negatif olarak düzenleyen tümör baskılayıcı *PTEN* geni, akciğer kanserinde mutasyonları ya da ekspresyon kaybını etkisiz hale getirerek sık sık tümörögenezi bastırır. Bu yolak ve ilgili tüm genler Şekil 2.3'te şematize edilmiştir (Larsen & Minna, 2011).



Şekil 2-3: *PTEN* geninin fonksiyonu.

#### 2.4.4. PTEN Protein Yapısı ve Fonksiyonu

Tam uzunluktaki *PTEN* mRNA'sı, 47 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir ve 403 amino asitlik bir protein kodlar.

*PTEN*'in NH<sub>2</sub>-terminalinin yarısı, tensin ve auksilin yanı sıra fosfataz domainine homoloji içeren alan içerir. *PTEN* kristal yapısının belirlenmesi, fosfataz domeinin protein fosfatazlarına yapısal olarak benzer olduğunu ve fosfoinositid substratlarının barındırılması için gerekli olan genişletilmiş bir aktif alana sahip olduğunu göstermiştir. (J.-O. Lee et al., 1999). *PTEN*'nin COOH terminali ise, katalitik aktiviteye sahip değildir, fakat protein stabilitesinin, yarı ömrünün ve fonksiyonel aktivitenin düzenlenmesiyle ilgili olarak önemli işlevlere sahiptir (Georgescu, 2010).

**Normal dokuda** *PTEN* ekspresyonunu inceleyen araştırmacılar, *PTEN* ekspresyonunu embriyonik ve fetal gelişim boyunca beyinde yüksek seviyede olduğunu, erişkinlerin normal dokusunda ise daha düşük bir seviyede olduğunu tespit etmişlerdir (Gimm et al., 2000).

Araştırmacılar fareler üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucu, fare beyinde, *PTEN*'in sadece glial hücrelerde değil, nöronlarda da ifade edildiğini ve nöronal farklılaşmanın, hücre büyüklüğünün ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Lachyankar et al., 2000).

#### 2.4.5. PTEN Gen Mutasyonları

TSG fonksiyonunun kaybedilmesi, akciğer karsinogenezinde önemli bir adımdır. Genellikle her iki allelin kromozomal delesyonu veya bir allel inaktivasyonu, ikinci alleli inaktive eden nokta mutasyonu ya da, epigenetik veya transkripsiyonel susturma ile inaktivasyonundan kaynaklanır. Akciğer kanserinde yaygın olarak inaktive edilmiş TSG'ler arasında *TP53*, *RB1*, *STK11*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* ve *PTEN* bulunur (Breuer, Postmus, & Smit, 2005). *PTEN* geninin her iki allelindeki mutasyonlar, beyin, prostat, meme ve endometriyal kanserler ve ayrıca melanom dâhil olmak üzere pek çok kanser türlerinde, kanserin ilerlemesi sırasında ortaya çıkar; bazı kanserlerde her iki allelde mutasyon sıklığının % 50'ye ulaştığı bildirilmiştir (Simpson & Parsons, 2001).

*PTEN* geni aynı zamanda, Cowden Sendromu gibi kalıtsal kanser sendromlarında ve heterozigot *PTEN* geni mutasyona uğramış fareler ile ilgili çalışmalar sırasında karşımıza çıkar. Bu da *PTEN*'in tümör baskılayıcı rolünü desteklemektedir. *PTEN* geninin hem erken ve daha sonra tümörjenezde (kalıtsal kanser sendromlarında olduğu gibi) hem de ileri kanserlerde mutasyona uğramış olabileceği dikkat çekicidir. Yapılan bir çalışmaya göre, *PTEN*'deki hasarların, ister kalıtsal ya da somatik mutasyon ile isterse epigenetik indirgeme ile ortaya çıkmış olsun, diğer tümör baskılayıcılarının kaybı ve / veya maligniteyi teşvik etmek için onkojenlerin aktivasyonu ile birden çok aşamada işbirliği yapabildiğini göstermiştir (Di Cristofano, De Acetis, Koff, Cordon-Cardo, & Pandolfi, 2001).

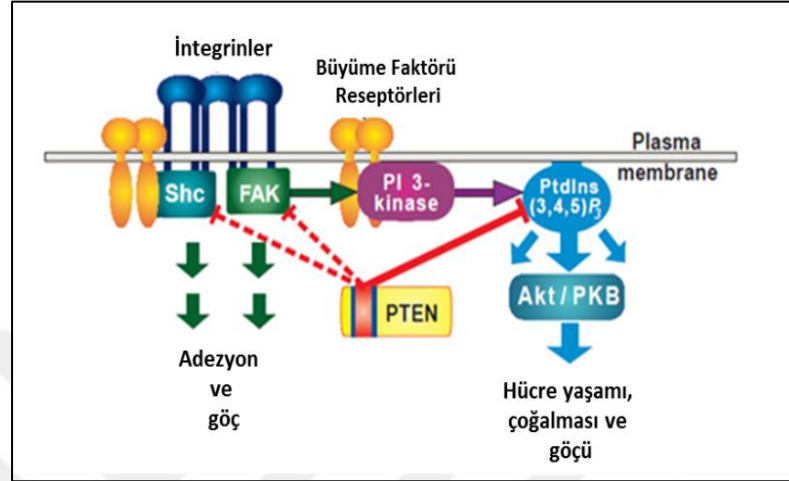
Bir başka çalışmada, *PTEN* ile *p27* veya *Wnt-1*'deki mutasyonlar arasındaki işbirliğinin onkogenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (Y. Li et al., 2001). Bazı çalışmalarda buna ilave olarak, *PTEN*'in hücre dışı matriksle hücre etkileşimlerini düzenleyen tanımlanmış fonksiyonlarının, kanser ilerlemesinin sonraki aşamalarında, özellikle önemli olabileceği gösterilmiştir. Matriks proteinlerine hücre yapışmasında değişiklikler, göç ve apoptoz sonrası matriks ile temas kaybı, tümör invazyonu ve metastazında rol oynamıştır. *PTEN* kaybının, bu tür değişiklikler için merkezi bir mekanizma olduğu bildirilmiştir (Kandasamy & Srivastava, 2002).

*PTEN*'de germline patojenik varyantlar, nörogelişimsel bozuklukların yanı sıra benign ve malign neoplazi için artmış risk oluşturan ve nadir bir otozomal dominant bozukluk olan *PTEN* hamartoma tümör sendromuna (PHTS) neden olmaktadır (Knobbe et al., 2002).

Mutasyonlarla ya da diğer mekanizmalarla *PTEN* fonksiyonunun kaybedilmesi, endometriyal tümör oluşumunda bilinen endokrin risk faktörlerine cevap olarak erken ortaya çıkabilen ve premalign hastalık için immünohistokimyasal biyobelirteç olarak kabul edilen bir olaydır (Mutter et al., 2000).

Ekstraselüler etkileşimler, integrinler ve büyüme faktörü reseptörlerinden gelen sinyalleri tetikler. Şekil 2-4'te *PTEN*'in ana işlevi olarak, hücre büyümesini, hayatta kalmayı ve göçü etkileyen AKT ve kompleks akış yönündeki (downstream) yollarını düzenleyen, 3-kinaz ürünü olan PtdIns(3,4,5)P3'ün akış yönünde düzenlenmesi görülmektedir. Ek olarak, *PTEN*, fokal adhezyon kinaz (FAK) ve

Shc'yi hedefleyebilen ve dolayısıyla diğer karmaşık yolları düzenleyebilen, zayıf protein tirozin fosfataz aktivitesine sahiptir. *PTEN* fosfataz domeini, substrat moleküllerini indirgemekte ve akış yönünde (downstream) düzenlemektedir (Araki, 2004).



Şekil 2-4: *PTEN* geninin adezyondaki fonksiyonları (Araki, 2004).

*PTEN*'in somatik intragenik mutasyonları, endometrial karsinomlarda, malign gliomlarda ve melanomlarda sık görülen bir olaydır. Ayrıca, meme kanseri hücre hatlarını kullanan ilk çalışmalar *PTEN*'in biallelik kaybına sahip olduğunu göstermektedir (Perren et al., 1999). Araştırmacılar bu nedenle, bir *PTEN* allel kaybının tümör oluşumu için yeterli olup olmadığını ya da ikinci allelin inaktivasyonunun mutasyon olaylarından daha çok epigenetik olarak gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini sorgulamışlardır.

Jin ve arkadaşları *PTEN* mutasyonları ile ilgili yaptıkları çalışmada 176 KHDAK tümörünün 8'inde (% 4.5) *PTEN* mutasyonlarının mevcut olduğunu ve bu mutasyonların skuamöz hücreli karsinomda, adenokarsinomdan anlamlı olarak daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir (Jin et al., 2010).

#### 2.4.6. *PTEN* Geni ve Kanser İlişkisi

*PTEN*'i bir aday tümör baskılayıcı olarak tanımlayan ilk raporlar, *PTEN*'deki mutasyonlar için, bazı hücre hatlarının ve primer tümörlerin incelenmesi ile ortaya çıkmıştır (Steck et al., 1997). Bu çalışmalar glioblastoma hücre hatlarının ve primer

tümörlerin heterozigozite kaybı (LOH) eşliğinde yüksek oranda *PTEN* mutasyonlarına sahip olduğunu göstermişlerdir. Multiform glioblastoma, gliomanın en agresif formu olup, hastalık teşhisi konan hastalar için genellikle sağ kalım süresi en fazla 2 yıldır. Glioblastomaların büyük çoğunluğunda *PTEN*'in lokalize olduğu 10q kaybı olduğu gösterilmiştir (Baeza, Weller, Yonekawa, Kleihues, & Ohgaki, 2003).

Li, Sun ve arkadaşları *PTEN*'in TGF $\beta$  tarafından transkripsiyonel olarak azaltılabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, transkripsiyon, Egr1 (erken büyüme cevabı-1 transkripsiyon faktörü)'nin *PTEN* promotörü içinde -47 ila -939 arasındaki nükleotidlerde spesifik bir bağlanma bölgesine (GCGGCGGCG) bağlanmasıyla indüklenebildiğini ve Egr1 ile *PTEN* transkripsiyon indüksiyonunun, radyasyona karşı hücrelerin apoptotik cevabında önemli olduğunu vurgulamışlardır (D.-M. Li & Sun, 1997). Virolle ve arkadaşları ise *PTEN* veya Egr1 fonksiyon kaybının, kanser hücrelerinin radyoterapiye direncine katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (Virolle et al., 2001).

*PTEN* promotörü, transkripsiyonel düzenlenmede ve DNA metilasyonunda rolü olan CpG nükleotidleri açısından zengindir. Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, promoter hipermetilasyonun neden olduğu *PTEN*'in epigenetik susturulmasının, tümörogeneze katkıda bulunabileceğine dair kanıtların olduğu bildirilmiştir (Salvesen et al., 2001; Whang et al., 1998). Ayrıca Fults ve arkadaşları gliomlarda yaptıkları bir çalışma ile *PTEN* ekspresyon seviyelerinin artan malignite derecesiyle birlikte azaldığını ve bununla birlikte, promoter hipermetilasyonunun gliomlarda *PTEN* inaktivasyonunun bir mekanizması olup olmadığını araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir (Fults & Pedone, 2000).

*PTEN* ekspresyon kaybı, prostat (Koksal et al., 2004) ve servikal kanserde sık görülür (Harima et al., 2001). *PTEN* AKT ve PI3K (fosfatidilinositol-3 kinaz) yollarını akış yönünde düzenlediğinden, *PTEN*-null tümörler daha yüksek proliferatif aktiviteye ve büyümeye sahiptir. 109 prostat kanseri olgusunda yapılan bir çalışmada, *PTEN* ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve *PTEN* proteininin kaybı, kötü prognozun patolojik belirteçleri ile ilişkilendirilmiştir (Mazure, Chen, Laderoute, & Giaccia, 1997).

*PTEN*'de yüksek mutasyon sıklığına sahip başka bir tümör tipi, endometriyal karsinomdur. Endometriyal karsinomları inceleyen araştırmacılar, yaygın olarak delesyona uğramış olan iki bölgede 10q22–24 ve 10q25-26 anlamlı LOH olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, endometrioid endometriyal karsinomlar vakalarının % 61'inde *PTEN* protein ekspresyonunun tamamen kaybını ve % 97'sinde ekspresyonun azaldığını da göstermişlerdir (Mutter et al., 2000).

10. kromozomun uzun kolunun sıklıkla kaybını sergileyen bir başka kanser türü melanomadır. Sporadik tümörler 10q22–10qter bölgesinde değişiklik gösterir ve LOH çalışmaları sık sık erken 10q kaybını gösterir. *PTEN* kaybı ya da mutasyonu, malign melanom hücre hatlarında yüksek olsa da (% 40), primer tümörlerde *PTEN* aberasyonlarının sıklığı daha düşüktür (Guldberg et al., 1997). Diğer bazı tümörlerde olduğu gibi, *PTEN* mutasyonlarının geç evre hastalık ile ilişkili olduğu görülmektedir. Yine aynı çalışmada *PTEN*'in allelik kayıp veya mutasyonla bozulması, malign melanomların büyük bir kısmında, patogenez ya da neoplastik evrime katkıda bulunabildiği öne sürülmüştür (Guldberg et al., 1997).

Meme kanseri, kromozom 10q'da yüksek bir LOH sıklığına sahiptir. Buna karşın *PTEN*, meme kanseri vakalarının sadece küçük bir kısmında (% 5) mutasyona uğrar (Ueda et al., 1998).

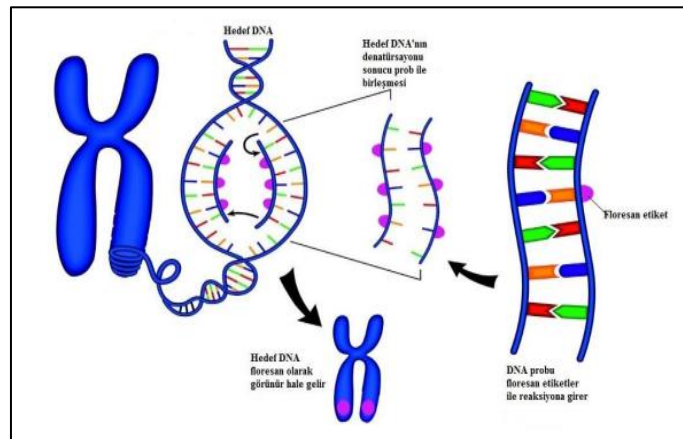
## **2.5. In situ Hibridizasyon (ISH)**

Konvansiyonel sitogenetik yöntemler kromozom üzerinde ancak 5 milyon baz çiftinden daha büyük alanlardaki değişimleri analiz etmeye imkân sağladığından, daha küçük boyutlarda inceleme yapabilmek için araştırmacılar yeni yöntemler arayışına gitmişlerdir. İşte tam bu noktada çok daha küçük ölçekte olan gen düzeyinde kayıpların ya da artışların, mikrolelesyonların ya da sunbmikroskobik delesyonların analizi için moleküler sitogenetik bir metod olan in situ hibridizasyon yöntemleri keşfedilmiştir.

Moleküler tekniklerin, in situ hibridizasyon (ISH) olarak adlandırılan, kromozom preparatlarına ilk uygulamaları, nükleik asit dizilerini, kromozomlar üzerinde tespit etme ve yerleştirme girişimleridir (Gall & Pardue, 1969). ISH tekniği, radyoaktif olarak işaretlenmiş ribozomal RNA'nın akrosentrik kromozomlara hibridize olduğu keşfine dayanmaktadır. 1960'ların başından itibaren insan

kromozomlarına uygulanan hibridizasyon, otoradyografi kullanılarak görselleştirildi. ISH teknolojisinin kullanımı, kromozomların incelenmesine başka bir boyut getirmiş, kromozomlar üzerinde ve moleküler düzeyde hücrelerdeki DNA veya tamamlayıcı RNA dizilerinin incelenmesini kolaylaştırmıştır (Pardue & Gall, 1970). Bununla birlikte, daha önce bu yöntemin kullanımı, radyoaktif izotopların, yüksek oranda tekrarlanan DNA dizilerinin ve sentromerlerin satellitlerindeki eş RNA'nın kullanımı nedeniyle sınırlıydı. Daha sonra Langer ve arkadaşları 1981'de dolaylı işaretleme için radyoaktif olmayan bir probun kullanıldığı İSH tekniğini geliştirmiştir.

İn situ hibridizasyonun amacı, DNA veya RNA dizilerinin varlığını veya yokluğunu belirlemek ve bu dizileri spesifik hücrelere veya kromozomal bölgelere yerleştirmektir (Jensen, 2014). Şekil 2-5'te bu hibridizasyon basamakları gösterilmiştir. Özel diziler, nükleik asitlerin hibridizasyonu için birbirlerine olan çekim kabiliyetleri özelliğinden yararlanılarak hücreler içinde işlem iki tamamlayıcı DNA dizisi ve RNA-DNA ya da RNA-RNA hibridizasyonu şeklinde olur (Jensen, 2014). Hibridizasyon (DNA probu ve hedef dizi), avidin veya streptavidin fluoresan işaretlemeleri ile sinyaller görünür hale gelmiştir. İn situ hibridizasyonda, fluoresan moleküllerin gelişimi ile bu moleküllerin doğrudan (bir fluorokromla birlikte) veya dolaylı olarak (bir ara molekül aracılığı ile) DNA bazlarına bağlanmasına izin vermiştir (Wolff, 2013). Ek olarak, doğal ve yapay nükleik asitler arasında hibridizasyon da mümkündür.



**Şekil 2-5:** Hibridizasyon basamaklarını gösteren bir şema. Hibridizasyon tamamlayıcı zincirdeki nükleotid dizileri bulunduran tek zincirli DNA arasında oluşur (Kezban ÖZDEMİR, 2015).



### 2.5.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)

Son dönemlerde Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) tekniğine dayanan moleküler sitogenetik teknikler, hematolojik maligniteler ve solid tümörler dâhil olmak üzere, neoplastik hastalık ile ilişkili sayısız kromozomal anomalinin teşhis ve tanımlanması için oldukça kullanışlı araçlar haline gelmiştir. Bunun nedeni, bu genetik hastalıkların etiyojilerinin, onkogenlerin amplifikasyonu, tümör baskılayıcı genlerinin delesyonu, gen yeniden düzenlemeleri ve mutasyonlarla fonksiyon kaybı veya kazanılması dâhil olmak üzere çok sayıda edinilmiş genetik anomalilerin karmaşık bir etkileşimini içermesidir (Jensen, 2014). Floresan in situ hibridizasyon yöntemi, belirli kromozomların ve kromozom bölgelerinin, floresan işaretli nükleik asit problemleri kullanılarak in situ hibridizasyon yöntemiyle belirlenmesidir. Başka bir ifadeyle; hücrel incelemlerde işlevsel protein kodlayan DNA dizilerinin kromozomlardaki yerini tam olarak belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerini bir arada kullanma imkânı sunan bu yöntemle, kromozomdaki nükleik asit dizilerinin varlığı ya da yokluğu belirlenir. İncelenmek istenen nükleik asit dizisine tamamlayıcı olan ve belirteç görevi yapacak olan tek zincirli özgün nükleik asit parçalarına 'prob' denir. Floresan işaretli prob, hibridize olduğunda, kromozomlar floresan boyadan yayılan ışığın bir dalga boyunda absorblanması ile görünür hale gelirler. Bu hibridizasyon sinyalinin lokalizasyonu (yani bu prob ile hibridize olan DNA parçasının yeri) floresan mikroskopu kullanılarak belirlenir (Kezban ÖZDEMİR, 2015).

Deoksiribonükleik asit dizilerinin sitolojik ve histolojik preparatlarda belirlenmesini sağlayan bir metod olan FISH, submikroskopik seviyelerde kromozom düzenlemelerinin tanımlanabildiği, çözünürlüğü arttırmış ve bu tekniği, hem klinik teşhis hem de araştırma için uygulanabilir hale getirmiştir. FISH, sitogenetik tekniklerin daha da geliştirilmesinde itici bir güç olmuştur (Riegel, 2014). FISH'in temel ilkesi, hedef DNA'nın, preparatın yüzeyinde denatüre olmasıdır. Prob DNA'sı, ya floresan (doğrudan işaretleme) ve / veya floresan olmayan bir hapten (dolaylı işaretleme) ile konjuge edilen bir nükleotid ile işaretlenmeli ve bu prob denatüre edilen ve işaretlenmemiş olan tekrarlayan DNA ile hibridize edilmelidir. Hibridizasyondan önce, metafaz kromozom süspansiyonu veya interfaz nükleusları, probun erişilebilirliğini arttırmak ve sitoplazma miktarını azaltmak için enzimatik

olarak ön-muameleye tabi tutulur. Hedef ve prob DNA'yı içeren ön muamele edilmiş preparat, DNA'yı denatüre etmek üzere ( $75^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) ısıtılır. Hazırlanan prob, daha sonra hibridizasyon için  $37^{\circ}\text{C}$ 'de ~16-48 saat boyunca preparata uygulanır. Prob ve hedef DNA arasındaki hibridizasyon hızı, kullanılan proba bağlı olarak değişir (Riegel, 2014).

Post hibridizasyon, bağlanmamış tek iplikli DNA'yı, spesifik bağlı olmayan DNA'yı ve istenmeyen bağlanmaları preparattan temizleme aşamasıdır. Hibridizasyon sonrası bu yıkamalar zayıf bağlanan probu temizlemek ve sadece doğru eşleşmiş olan problemleri bırakmak için uygulanır. Yıkandıktan sonra, DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) içeren bir antifade solüsyonu preparata uygulanır ve bir lamel ile kapatılır. DAPI hücrenin yalnızca nükleusunu boyayan bir floresan boyadır (Riegel, 2014). Fluorokromları tanımlamak için sinyaller, özel filtreler içeren mikroskop kullanılarak gözlemlenir. Mikroskoba bağlı kamera, görüntüyü yakalar ve floresan sinyalleri bu sayede gözlenir (Hiraoka, Sedat, & Agard, 1987). Elde edilen görüntüler ticari olarak alınan bilgisayarlı görüntüleme sistemleri kullanılarak analiz edilir. Standart FISH'in geliştirilmesi ile birlikte, daha hassas FISH tabanlı teknikler yavaş yavaş ilerlemiş ve FISH görüntü alımı, görüntü ön işleme ve dijital görüntü analizi için birçok dijital görüntüleme sistemi geliştirilmiştir.

Görüntüleme en sık kullanılan floresan işaretler FITC (fluorescein isothiocyanate) yeşil, teksas kırmızısı ve rodamin kırmızı renkte floresan sinyal yayarlar. FISH, interfaz ve metafaz preparatlarına uygulanabilir. İnterfaz preparatlarına uygulandığında iFISH olarak adlandırılır. FISH'de, bir veya daha fazla DNA probu aynı anda kullanılabilir ve bu problemler, farklı renk ile işaretlenerek ayırt edilebilir. Problemler esas olarak bu moleküler sitogenetik tekniklerin çözünürlüğünü belirler ve saptanan DNA dizilerinin modeline göre sınıflandırılabilir.

ISH için birçok farklı tipte prob kullanılmaktadır. Bunlar arasında cDNA, crRNA ve sentetik oligonükleotid problemleri bulunur. Bu teknikte bir prob seçerken, araştırmacı duyarlılık ve özgüllüğü, üretim tesislerini, probun dokuya ne kadar kolay nüfuz ettiğini, hibritlerin stabilitesini, uygulamayı ve yöntemin ne kadar tekrarlanabilir olduğunu dikkate almalıdır. Kullanılabilen problemler arasında; çift iplikçikli DNA problemleri, tek iplikli antisens RNA problemleri (riboproblemler), polimeraz

zincir reaksiyonu (PZR), sentetik oligodeoksinükleotit problemleri ve oligoriboprolar ile üretilen tek iplikli DNA problemleri bulunur (McNicol & Farquharson, 1997).

### 2.5.2. FISH Tekniğinde Kullanılan Problemler

FISH için birçok tip prob kullanılabilir. Hâlihazırda, bir dizi ticari prob (ör. tüm kromozom boyama problemleri, kromozom-kol boyama problemleri ve subtelomerik, lokus spesifik ve tekrar eden sentromerik problemler) belirli kromozomal anomalilerin saptanması için mevcuttur. Probun en uygun boyutu 50–300 bazdır.

FISH için problemler temel olarak iki kategoriye ayrılabilir; lokus spesifik ve kromozom boyama problemleri. Lokus spesifik problemler, belirli bir gen veya kromozomal alanı tespit etmek için kullanılır ve genellikle DNA dizilerinin delesyonunu veya amplifikasyonu değerlendirmek için uygulanır. Tüm kromozom boyama problemleri ise tam kromozomdan türetilmiştir. Bunlar yapısal olarak normal olmayan kromozomların kökenini tespit etmek ve farklı (yani, homojen olmayan) kromozomları içeren yeniden düzenlemeleri belirlemek için kullanılır (Jensen, 2014; C. Lee, Lemyre, Miron, & Morton, 2001). FISH tekniği, gen haritalamasında, submikroskopik delesyonların incelenmesinde ve kromozom anomalilerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır ve FISH testleri oldukça hassastır.

ISH için kullanılan DNA problemleri, yüksek derecede özgül aktivasyon özelliği taşır ve kullanım öncesinde mutlaka denatürasyonlarının yapılması gerekir. RNA problemleri ise en yüksek stabiliteye sahiptir ve RNaz'larla kolaylıkla yok edilebilirler. Oligonükleotid problemleri genellikle 15-50 nükleotidden oluşur. Bunların hedef diziyeye antisense tasarımları yapılır. Bunlar daha küçük boyutlarda olduklarından hedeflenen bölgeye kolaylıkla hibridize olurlar.

ISH tekniğinde kullanılan problemlerin belirlenmesinde spesifik nükleik asidin cinsi ve uygun etiketleme çeşidi önemlidir (Wolff, 2013). Bazı prob tipleri şöyle sıralanabilir;

- 1) Sentromerik problemler
- 2) Tüm kromozomu işaretleyen problemler
- 3) Lokus spesifik (belirli bir kromozom parçasına ait) problemler

- 4) Subtelomerik (kromozom ucuna yakın bölgeye yönelik işaretleyen) problemler
- 5) Telomerik (kromozom ucuna yönelik işaretleyen) problemler

### **2.5.3. FISH Metodunu Temel Alan Uygulamalar**

FISH, diğer sitogenetik tekniklerin daha da gelişmesine öncülük eden esnek bir tekniktir. Farklı uygulamalar için FISH tabanlı yöntemler kullanan çoklu yaklaşımlar mevcuttur. Örneğin, ters-FISH, FISH-FISH, M-FISH, çok renkli FISH, SKY (spektral karyotipleme), FISH, akış-FISH, Q-FISH (kantitatif FISH), COBRA-FISH (birleşik ikili oran etiketleme FISH), cenM-FISH (sentromere özgü M-FISH), pod-FISH (ebeveyn kökenli FISH tayini), heterokromatin-M-FISH, interfaz FISH (iFISH) ve diğer modifiye FISH yaklaşımları gibi pek çok FISH tabanlı yöntem kullanılmaktadır.

### **2.5.4. FISH Endikasyonları**

FISH tekniğinin uygulandığı belirli endikasyonlar vardır. Bunlardan yaygın olanları şu şekilde sıralanabilir;

1. Mikrodelesyonlar,
2. Delesyonlar (parça kayıpları),
3. \*Kromozom tanımlama (konvensiyonel sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan yeniden düzenlenmeler ve marker kromozomların tayini),
4. Zeka ve gelişim geriliği olan olgular (subtelomerik FISH),
5. Prenatal anöploidi taraması (Hızlı FISH),
6. Kanser (Her türlü hematolojik malignitelerde)
7. Kromozom uç kısımlarının (Telomer bölgelerinin) kaybı
8. Preimplantasyon genetik tanı (PGT)

### **2.5.5. FISH Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları**

FISH, genetik değişikliklerin doğrudan görselleştirilmesini sağlayan etkili bir tekniktir. Bu tekniğin birçok uygulaması vardır ve genellikle kromozomal dengesizlikleri, kromozom parçalarının kazanımı veya kaybını incelemek için ya da

dengelessizliği olan veya olmayan spesifik kırılma noktalarını göstermek için kullanılır (McNicol & Farquharson, 1997). FISH başlangıçta kromozomların sınıflandırılması için kullanılmıştır (Pinkel, Straume, & Gray, 1986), ancak bu teknik çok daha sonra tıbbi ve biyolojik alanlardaki bir dizi uygulamada kabul edilmiştir.

Kovansiyonel sitogenetik yöntemlere kıyasla FISH yöntemi çok daha hassas, hızlı ve daha güvenilir bir yöntemdir. Sitogenetik yöntemlerle belirlenemeyen submikroskopik delesyonlar, telomerik delesyonlar, mikrodelesyonlar ve yeniden düzenlenmeler yüksek çözünürlük sayesinde FISH tekniği ile belirlenebilmektedir.

FISH teknolojisinin avantajlı olan itici gücü, genotip-fenotip ilişkilerini analiz etmek isteyen genetikçiler ve patologlar tarafından artırılmıştır. FISH'in en büyük avantajı sitogenetik analizde yaygın kullanımına imkan vermesidir. FISH tekniği, genetik hastalık ya da neoplazmik bozukluklarla ilişkili genetik anomalileri belirleyen ve interfaz nükleus veya metafaz kromozomlarındaki genomları tespit eden kromozomal gen haritalamasıdır. FSH tekniğinin önemli bir diğer avantajı, elde edilmesi zor olan dokuların en iyi şekilde kullanımına imkan sağlar (örneğin; embriyolar ve klinik biyopsiler). Aynı doku üzerinde yüzlerce farklı hibridizasyon yapılabilir, doku kütüphaneleri oluşturulabilir ve bunlar ileride kullanım için dondurularak belirli bir süre arşivlenebilir (Riegel, 2014).

ISH tekniklerinin uygulanmasının dezavantajı ise, düşük DNA ve RNA kopyalarına sahip olan hedeflerin belirlenmesindeki zorluktur. Bununla birlikte, in situ hibridizasyondan önce hedef nükleik asit dizilerinin çoğaltılması gerekir veya hibridizasyonun tamamlanmasından sonra sinyalin saptanması yoluyla in situ hibridizasyonun duyarlılığının geliştirilmesi için sürekli olarak yeni yaklaşımlar geliştirilmelidir (Jensen, 2014; Thomas Liehr, 2009).

### **2.5.6. Doğum Öncesi ve Sonrası Diyagnostik ve Araştırmada FISH Uygulamaları**

FISH'in önemli bir avantajı, bölünmeyen hücrelerde uygulanabilmesidir. Bu sayede sitolojik preparatlarda ve doku kesitlerinde, kromozomların doğrudan araştırılmasını kolaylaştırmıştır. Klasik sitogenetik analiz, metafaz kromozom yayılımını elde etmek için mitoz geçiren hücrelere bağlıdır. Bu nedenle, hücrelerin, kısa veya uzun süreli olarak in vitro kültürleri yapılmalıdır. Doğum öncesi anöploidi

taraması için kültüre edilmemiş amniyositlere FISH uygulanmasında, zaman alıcı olan hücre kültürü gerekli değildir ve sonuçlar 24-48 saat içinde elde edilebilir. Prenatal tanıdaki interfaz FISH, kültürsüz koryonik villus ve amniyotik sıvı hücrelerin örneklerinde anöploidileri saptamak için hızlı, doğru, duyarlı ve nispeten spesifik bir yöntemdir (Rosner et al., 2013; Stumm, Wegner, Bloechle, & Eckel, 2006). Bu yöntemde kullanılan problardan lokus spesifik problemler, bilinen mikrodelesyon ve mikroduplikasyon sendromlarının klinik teşhislerini doğrulamak için de kullanılır. Ancak FISH, bilinen mikrodelesyon sendromlarının saptanmasında sınırlamalara sahiptir. Bazen, küçük ve olağandışı delesyonları olan hastalar, floresan probunun özgüllüğüne bağlı olarak tespitten kaçabilir. FISH teknikleri telomerlerin analizi, kanser ve yaşlanma araştırmalarında da kullanılmaktadır. Çok renkli FISH uygulamaları kanser sitogenetiği için en değerli olanlardır ve bu yöntemler aynı zamanda yapısal kromozomal anomalileri tespit etmek için de uygulanmıştır ve kompleks karyotiplerde translokasyonları ve markır kromozomları tanımlamaktadır (T Liehr, Starke, Weise, Lehrer, & Claussen, 2004).

## **2.6. İmmünohistokimya Yöntemi (İHK)**

Hibridizasyon işleminin ardından, sinyali görülebilir hale getirme yöntemleri, probu işaretlemeye kullanılan belirtecin tipine bağlı olarak değişir. Kullanılan prob eğer radyoaktif işaretli ise otoradyografik yöntemler, eğer radyoaktif olmayan bir işaretçi kullanıldıysa immünohistokimyasal (İHK) yöntemler kullanılır (Selma Yılmaz, 2017).

Radyoaktif olmayan prob kullanıldığında iki farklı yöntem kullanılır. Bunlardan biri doğrudan işaretlemedir. İşaret doğruca nükleik asit probuna bağlanır ve hibridizasyon hemen mikroskop altında gözlemlenebilir. Diğer bir yöntem, dolaylı yöntemdir. Burada proba bağlanan işaretleyici molekül doğrudan görülemez. Hibridizasyondan sonra ikinci bir molekül probdaki işaretleyiciye bağlanır ve o bölgeyi görünür hale getirir. Burada ikinci molekülün kolay saptanabilir olması gerekliliği önemli bir ayrıntıdır. Radyoaktif olmayan prob işaretlerinin büyük bir kısmı immünojeniktir. Bunlar ancak immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak saptanabilirler. En sık kullanılan radyoaktif olmayan işaretçilerin başında

digoksinin ve biotin gelir. Bunlar kendilerine karşı oluşturulan antikolar ile saptanabilirler (Selma Yılmaz, 2017).

Proba hibridize olan bölgenin saptanabilmesi için sinyal oluşturan sistemler, işarete karşı oluşturulan primer bir antikora bağlanabilirler. Bu yöntem 'tek aşamalı saptama' denir. İki aşamalı olan saptama yönteminde ise primer antikora bağlanan ikinci bir antikor vardır. Bu yöntem her primer antikora sinyal taşıyan birkaç sekonder antikor birden bağlandığından tek aşamalıya kıyasla çok daha duyarlıdır (Selma Yılmaz, 2017).

### **2.6.1. Biotin-Streptavidin Sistemi**

Glikoprotein yapısında olan avidin yumurta akından elde edilir ve biotine karşı aşırı ilgisi vardır. Biotinin saptanmasında ilk adım işaretleyici molekül ya da sinyali taşıyan avidinin, biotinle işaretlenmiş proba bağlanmasıdır. Bir avidin molekülü dört biotin molekülü bağladığından güçlü bir sinyal verir. Avidinden farklı olarak yüksüz bir molekül olan streptavidin ise *Streptococcus avidini*'den elde edilmiştir. Bu molekülün biotine karşı ilgisi daha azdır ve daha az dayanıklıdır.

### **2.6.2. Sinyal Oluşturan Sistemler**

Proba hibridize olduğu bölgenin görünürlüğü antikora ya da avidine bağlanan sinyaller ile sağlanır. Bu aracı moleküller florokromlar, metaller veya enzimlerdir. Sinyale uygun olan dalga boyundaki ışıkta floresan yayan florokromların avidine ya da antikora bağlanabilen farklı tipleri vardır. Bunlardan en sık kullanılanlar Teksas kırmızısı, rodamin kırmızısı, floresein izotiyosiyanat (FITC) yeşil ve amino-metil-kumarin asetik asit (AMCA) ise mavi renk verir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 07/09/2016-327741 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır. Hasta grubu olarak Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na akciğer kanseri şüphesiyle gelen ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tanısı alan 30 hastaya ait bronşiyal lavaj sıvısı kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ise son dönemde viral bir hastalık geçirmemiş, herhangi bir organ kanseri hikâyesi olmayan ve bronkoskopi endikasyonu olan, aynı yaş grubundan 10 bireyden alınan bronşiyal lavaj sıvısı çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Çalışmanın deneysel aşaması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Mayıs 2017- Haziran 2018 tarihleri arasında yapılmıştır.

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. iFISH Yönteminde Kullanılan Gereçler

- Buzdolabı (Arçelik 4042 T Plus +4)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Elektronik Terazı (Precisa XB220A)
- Etüv (Memmert BM400)
- Benmari (Memmert)
- Santrifüj (Hettich Microliter)
- Vortex (Dragon Lab MX-S)
- Manyetik Karıştırıcı (Are Velp Scientifica)
- Hot Plate (J.P. Selecta)
- Denaturasyon ve Hibridizasyon Cihazı (ThermoBrite StatSpin)
- Floresans Mikroskopu (Nikon Eclipse E600, Japan)



- Floresans Mikroskop filtreleri (TxRed, FITC, DAPI UV,Aqua)
- Kamera sistemi (COHU Cooled CCD Camera Applied Imaging, Newcastle,UK)
- Görüntüleme Sistemi (Metasystem- Isis İmaging System)
- Mikropipet (Discovery Comfort (100-1000µl), Medispec plus 10 (0,5-10 µl ) )
- pH stick 0-14 (Isolab)
- Pastör Pipeti
- Pipet uçları
- Ependorf tüpü (1,5 ml)
- Kronometre
- Enjektör (5 cc)
- Termometre
- Cam Kalem (Faber Castell S)
- Eldiven
- Parafilm
- Rubber Cement (Marabu Fixogum)

### **3.1.2. iFISH Yönteminde Kullanılan Cam Malzemeler**

- Lam (Menzel- Glaser Super frost ground edges (90<sup>0</sup>)
- Lamel (Menzel-Glaser 100 Deckglaser 22x22mm)
- Beher (50, 100, 250 ml)
- Balon joje (100, 250, 500 ml)
- Erlenmayer (250, 500,1000 ml)
- Mezür (10, 25, 50, 100, 250, 500 ml)
- Şale (100 ml)

### 3.1.3. iFISH Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

- Methanol (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- Distile su
- HCl (Merck)
- KCl (Merck)
- NaCl (Merck)
- Pepsin (Sigma Aldrich)
- %96'lık Ethanol (Merck)
- İmmersiyon yağı (Merck)
- Potayum Dihidrojen Fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck)
- Tri-Sodyum Sitrat Dihidrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Magnezyum Klorür Hekzahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

### 3.1.4. iFISH Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

**Tablo 3-1:** Carnoy Fiksatifi

<b>Methanol</b>	30 ml
<b>Asetik Asit</b>	10 ml

**Tablo 3-2:** Hipotonik Solüsyon

<b>Potasyum Klorür (KCl) (0,075 M)</b>	5,6 g
<b>Distile su</b>	1000 ml

**Tablo 3-3:** Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) pH:7

<b>NaCl</b>	8 g
<b>KCl</b>	0,2 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	1,4 g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,2 g
<b>Distile su</b>	1000 ml

**Tablo 3-4:** 20xSSC (Salin Sodyum Sitrat) pH:7

<b>NaCl</b>	43,8 g
<b>Tri-Sodyum Sitrat Dihidrat</b> <b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	22,05 g
<b>Distile su (dH<sub>2</sub>O)</b>	250 ml

**Tablo 3-5:** 2 x SSC pH:7

<b>20xSSC</b>	50 ml
<b>Distile su (dH<sub>2</sub>O)</b>	450 ml

**Tablo 3-6:** 0,4 x SSC pH:7

<b>20 x SSC</b>	10 ml
<b>Distile su (dH<sub>2</sub>O)</b>	250 ml

**Tablo 3-7:** HCl, Tween20 ve Pepsin Solüsyonu

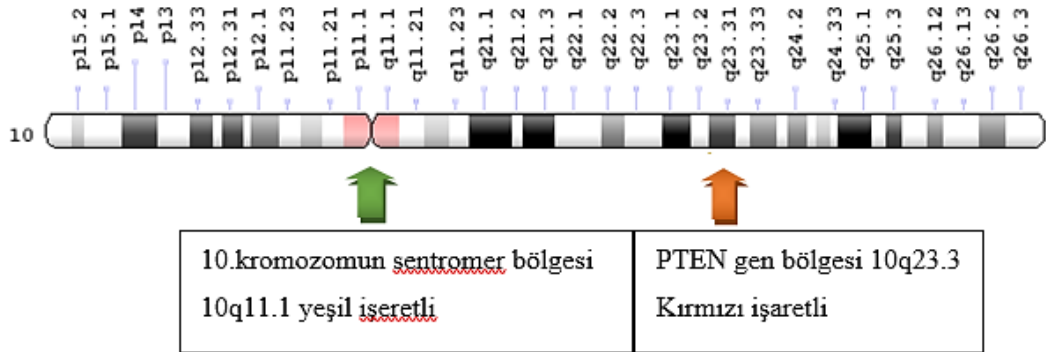
<b>10 nm HCl için</b>	0.83 ml konsantre HCl	1000 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Pepsin için</b>	1 gr pepsin	50 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Tween 20</b>	10 ml	Her örnek için 0,2ml

**Tablo 3-8:** Alkol Serileri

% 70'lik Etanol	70 ml Etanol + 30 ml dH <sub>2</sub> O
% 85'lik Etanol	85ml Etanol + 15 ml dH <sub>2</sub> O
% 100'lük Etanol	100 Etanol

### 3.1.5. iFISH Yönteminde Kullanılan Prob

Çalışmamızda MyProbes *Powered by CytoCell* 'den özel olarak tasarlanmış ve kalite kontrolü Glia Medikal Ltd. laboratuvarında yapılmış olan 10q23.3 *PTEN* DNA FISH prob'u (*Vysis LSI PTEN (10q23) / CEP 10 Dual Color Probe*) (*Abbott Molecular Inc.*) kullanılmıştır. 50 testlik prob 100'er µl'lik tüplerde (5x100 µl) ve aynı miktarda DAPI Solüsyonu ile birlikte kitin içinde hazır olarak satın alınmıştır (*Abbott Cat. Number: LPH025+LPE007*). Bir Delesyon Amplifikasyon probu olan *PTEN* FISH probunun işaretlediği bölgeler Şekil 3-1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3-1:** '*PTEN(10q23.3) / CEP10 Dual Color*' FISH probunun 10. kromozom üzerinde işaretlediği iki bölge.

### 3.1.6. İmmünotokimya Yönteminde Kullanılan Gereçler

- Buzdolabı (Bosh A Plus +4<sup>0</sup> C)
- Derin Dondurucu (Bosh -20<sup>0</sup> C)
- Elektronik Terazi (Precisa XB220A)

- Etüv (Mettler BM400)
- Benmari (Mettler)
- Santrifüj (Hettich Microliter)
- Vortex (Dragon Lab MX-S)
- Manyetik Karıştırıcı (Are Velp Scientifica)
- Işık Mikroskobu (Lyca 2040)
- 24 kuyulu (6x4) Plate (Ardi Medical)
- Lam (Adhesive Positive Charge 90° Beyaz, 72 Ad./Pk)
- Lamel (100 'lük ambalaj, r:18mm daire)
- Pipet
- Ependorf (1ml'lik)
- İnce uçlu pens
- Alimünyum Folyo

### **3.1.7. İmmünohistokimya Yönteminde Kullanılan Kimyasallar**

- *PTEN* primer antikoru (*PTEN* poliklonal tavşan antikoru *AbClonal Cat. No. A11189*)
- Antikor sulandırıcı (Zymed)
- Etanol (Merck)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) (Merck)
- PBS Tablet (Sigma)
- Mouse and Rabbit Specific HRP/AEC (ABC) Detection IHC Kit (*Cat No. ab93705, USA*)
- AEC boyama kit (Invitrogen)
- HRP Large Volume AEC Substrate System
- Methyl Green zinc chloride salt, for microscopy

### 3.1.8. İmmünohistokimya Yönteminde Kullanılan *PTEN* Primer Antikoru

Hücre antijenlerini buldukları yerde göstermek amacıyla İşaretlenmiş poliklonal *PTEN* antikoru (*PTEN*- poliklonal tavşan antikoru *AbClonal Cat. No. A11189*) kullanıldı.

## 3.2. Yöntem

KHDAK tanısını histopatolojik olarak almış olan 30 hasta ve bronkoskopi endikasyonu bulunan 10 kontrol grubuna ait bronşiyal lavaj materyalinden elde edilen hücreler, hem interfaz FISH (iFISH) yöntemi ile hem de immünohistokimyasal (İSK) boyama yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

### 3.2.1. Materyal Seçimi

Yapılan çalışmada Mayıs 2017 ve Haziran 2018 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na akciğer hastalıkları şüphesiyle başvurmuş hastalar arasından KHDAK tanısını alan 30 hastaya ait bronşiyal lavaj örnekleri ile çalışılmıştır. Kesin tanı alamamış ya da KHDAK dışındaki tüm olgular dışlanmıştır. Kontrol grubu olarak son dönemde viral bir hastalık geçirmemiş, histopatolojik olarak akciğerde herhangi bir maligniteye rastlanmayan ve herhangi bir endikasyon ile bronkoskopi işlemi yapılan 10 bireyden alınan bronşiyal lavaj sıvısı ile çalışılmıştır.

Çalışma grubuna alınan hastalardan ve kontrol grubunu oluşturan olgulardan bu çalışma için 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' alınmıştır (*Bkz. Formlar*).

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda takip edilmekte olan hastalardan toplamda 95 bronşiyal lavaj örneği toplanmış ve bu toplanan tüm bronşiyal lavaj materyallerine ön çalışma uygulanmıştır. Tüm olgulardan 43 tanesi KHDAK tanısını kesin olarak almış ancak bunlardan 30 tanesinin bronşiyal lavaj örneğinden hücre elde edilebilmiştir. iFISH yönteminin uygulanması Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarı'nda, İSK yönteminin uygulanması Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışma grubuna dâhil edilen 30 hastanın 21'i skuamöz

hücreli karsinom, 6'sı adenokarsinom ve 3'ü de KHDAK'nin sınıflandırılmayan alt tipidir.

### 3.2.2. Materyal Alımı

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Ana bilim Dalı'na KHDAK tanısını alan, takip edilmekte olan ve bronkoskopi endikasyonu bulunan olgularda çalışılmıştır. Hastaların randevuları gün gün takip edilmiş, materyal aynı gün alınmış ve yine aynı gün çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan bronşiyal lavaj materyali, bronkoskopide lezyon olduğu düşünülen bölgeye uzman doktor tarafından 20 ml kadar soğuk ve steril serum fizyolojik verildikten sonra bronkoskopik boru aracılığı ile aspire edilen sekresyondur. Bu işlemin yapıldığı gün materyal 10 cc'lik enjektör içerisinde ya da 50 ml'lik silindir kapta (Şekil 3-2) taze olarak ve direk ilk elden alınmıştır. Bronşiyal lavajın saklanma koşulu +4<sup>0</sup>C'de en fazla 8 saattir. Bu aşamadan sonra hücre kayıpları oldukça yoğun olduğundan bu konuda hassasiyet gösterilmiştir.

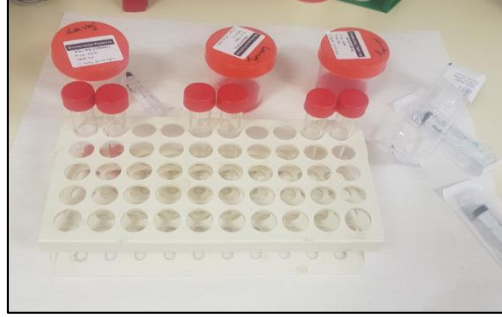


**Resim 3- 1:** 50 ml'lik silindir kapta alınan bronşiyal lavaj örneği

### 3.2.3. İnterfaz FISH (iFISH) Yöntemi

Çalışmamızda, bronşiyal lavaj materyalinden elde edilen hücrelere, özel olarak tasarlanmış ve kalite kontrolü yapılmış olan 10q23.3 *PTEN* DNA dual color FISH prob'u, üreticinin ön gördüğü talimatlara göre uygulanmıştır. 20 cc'lik enjektör içerisinde temin edilen materyal 12 ml'lik kırmızı kapaklı üç tüpe bölünmüş ilk iki

tüp iFISH için üçüncü tüp İSK yöntemi için ayrılmıştır (Şekil 3-3). iFISH yönteminde ilk olarak hücre elde etme kısmı olan Harvest aşaması yapılmıştır.



**Resim 3- 2 :** iFISH metodunun uygulanması için her örnekten hazırlanan tüpler

### **3.2.3.1. Harvest (Hücre Toplama)**

1. Tüpler ilk olarak 2000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım dökülmüştür.
2. Tüplerde kalan pellet üzerine vortex üzerinde taze hazırlanmış 1xPBS çözeltisinden (pH 7) 6 ml. eklenerek hücrelerin ilk yıkaması yapılmıştır.
3. Tekrar 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant kısım dökülmüştür.
4. 37<sup>0</sup>C'de 0,075 mol/l KCl solüsyonu 6 ml. vortex üzerinde eklenerek hücreler için hipotonik ortam sağlanmıştır.
5. Tüpler, sıcaklığı 37<sup>0</sup>C olan etüvde 30 dk. süre ile inkübe edilmiştir.
6. Süre sonunda tekrar 2000 rpm'de bu defa 7 dk. santrifüj edilip süpernatant kısım dökülmüştür.
7. Tüplerde kalan pellet üzerine vortex üzerinde taze hazırlanmış ve soğutulmuş Carnoy fiksatifinden (Methanol/ Asetik asit 3:1) 6 ml. yavaşça damla damla konulmuştur.



8. Tekrar 2000 rpm'de 7 dk. santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant kısım dökülmüştür.

9. Çıkış işlemi tamamlanan tüplerin her birine tekrar vortex üzerinde soğuk fiksatif çözeltisinden hızlıca 6 ml. konulmuş, bu işlem her tüp için 3'er kez tekrarlanarak yayma işlemine hazırlanmıştır.

(Bu aşamada tüplerdeki materyal hala bulanık görülmüşse ya da yoğun mukus parçaları varsa fiksasyon işlemi berraklık sağlanıncaya dek tekrar edilmiştir. Gerektiğinde materyalin sıvı ve berrak olan kısmı yeni tüpe aktarılarak homojenlik sağlanmıştır.)

10. Çalışmadaki ön hazırlık olan, hücre elde etme (harvest) ve fiksasyon işlemi yapılan tüpler hastanın patoloji raporu alınıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### 3.2.3.2. Yayma işlemi

1. Yayma işleminin yapılacağı lamlar önceden distile su ile yıkanmış, kurulanmadan soğutulmuş ve numaralandırılmıştır.

2. iFISH analizi için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış olan tüpler 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı dökülmüştür.

3. Elde edilen pellet vortex üzerinde birkaç saniye döndürüldükten sonra oda sıcaklığında ve nem oranı yaklaşık % 50-60 arasında olan ortamda, lam üzerine çizgi şeklinde 2-3 damla materyalden, 1-2 damla da taze hazırlanmış ve soğutulmuş olan Carnoy fiksatifinden damlatılarak yayma işlemi yapılmıştır.

4. Hazırlanan preparatlar elde hafifçe birkaç defa çevrilerek örneğin lam üzerinden akıp gitmesi önlenmiş ve yatay düzlemde kuruması sağlanmıştır.

5. Yayma işlemi yapılan lamlar diyagramı kapalı olarak ışık mikroskobu altında ve x10 büyütme ile kontrol edilmiştir (Şekil 3-4).

6. Bazı örnekler hücre yoğunluğuna göre çift kat ya da daha yoğun şekilde tekrar yayılmıştır.

7. Bu şekilde üç preparat hazırlanmıştır. iFISH için hangisinin uygun olduğuna, hücre yoğunluğuna bakılarak karar verilmiş ve çalışılmasına karar verilen preparatlar bir gece (*overnight*) oda sıcaklığında yaşlandırılmaya bırakılmıştır.



**Şekil 3-2:** Yayma kontrolü yapılan bir skuamöz hücreli akciğer kanseri olgusunun bronşiyal lavaj örneğine ait boyanmamış ham hücreleri (x10)

### 3.2.3.3. iFISH tekniğinin uygulanması

Ertesi gün hazırlanan preparatlara iFISH tekniğinin uygulanmasına başlanılmıştır.

#### **Preparatların Ön Yıkaması ve Dehidratasyonu:**

1. Yıkama işlemi için 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış benmarideki bir şalenin içine 99 ml. distile su + 1 ml. 1N stok HCl solüsyonu konmuştur. Üzerine 100 µl pepsin eklenerek preparatlar bu hazırlanan solüsyonun içinde yayma kontrolünde ön görülen süreye göre 2 ya da 3 dk. Bekletilmiştir.
2. Süre sonunda preparatlar çıkarılarak oda sıcaklığındaki taze hazırlanmış ve Ph'ı 7 olan PBS solüsyonunda 5 dk. Bekletilmiştir.
3. Daha sonra 2xSSC tuz çözeltisinde 2 dk. Bekletilmiş ardından dehidratasyon için artan alkol serilerinden geçirilmiştir.
4. Sırasıyla % 70'lik, % 85'lik ve % 100'lük alkol serileriyle 3'er dk. Muamele edilmiştir.
5. Preparatlar birkaç dakika oda sıcaklığında dik olarak kurumaya bırakılmıştır.

### **Prob Hazırlığı:**

1. iFISH için kullanılacak olan prob deneye başlanmadan önce  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkartılıp ışık almayan bir ortamda oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. Probdan kullanılacak kadar olanı 0,2 ml'lik küçük ependorf tüpüne ayrılıp geri kalan tekrar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır.
3. Ependorfa aktarılan prob pipetajla ya da vortex üzerinde hafif çevrilerek homojen hale getirilmiştir.
4. Dehidratasyonu tamamlanmış preparatlar üzerinde daha önceden belirlenmiş olan alana her preparat için 4  $\mu\text{l}$  prob dikkatlice damlatılıp, üzerine temiz 22x22 mm'lik lamel ile kapatılmıştır.
5. Probin hava almasının engellenmesi ve kurummasının önlenmesi amacıyla lamelin etrafı yapıştırıcı (Fixo gum) ile çevrilerek preparat denatürasyon aşamasına hazırlanmıştır.

### **Prob Denatürasyonu:**

$77^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış olan hotplate üzerine preparatlar ışık almayacak şekilde 3 dk. süre ile konularak prob denatürasyonu yapılmıştır.

### **Hibridizasyon Aşaması:**

Preparatlar denatürasyon işleminden hemen sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'de ışık geçirmeyen kapalı ve içi nemli olan hibridizasyon cihazına yerleştirilerek minimum 16 saat, maksimum 18 saat hibridize edilmiştir.

### **Hibridizasyon Sonrası Yıkama:**

1. Hibridizasyon süresinin sonunda preparatlar hibridizasyon cihazından çıkartılarak üzerlerindeki yapıştırıcı dikkatlice soyulmuş ve lamelleri kaldırılmıştır.
2. Bunun hemen akabinde preparatlar  $71,5^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış su banyosu (benmari) içindeki 0,4xSSC solüsyonunda 1,5-2 dk. bekletilmiş ve hafifçe çalkalanarak çıkartılmıştır.
3. Daha sonra vakit kaybetmeden, 30 saniye süre ile 2xSSC + 1 damla Tween20 ile hazırlanmış olan solüsyonun içine bırakılmıştır.

4. Süre sonunda preparatlar yine hafifçe çalkalanarak çıkartılmış ve dik bir şekilde süzdürülmüştür.
5. Daha sonra preparatlara, kitin içinden çıkan ve daha önce oda sıcaklığına getirilmiş olan DAPI Antifade'den 5 µl probun üzerine basılmıştır.
6. Son aşamada üzerlerine lamel kapatılıp 15 dk. süre ile -20<sup>0</sup>C'ye kaldırılmıştır.
7. Daha sonra bu preparatlar fluoressan mikroskobunda inceleninceye kadar +4<sup>0</sup>C'ye alınarak saklanmıştır.

#### **iFISH Görüntüleme:**

+4<sup>0</sup>C'de saklanan preparatlar fluoressan mikroskopta incelenmek üzere çıkartılarak ışık almayan bir kutuda oda sıcaklığına getirilmiştir. Preparatlar fluoressan mikroskobu altında, incelenecek alana immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif altında analiz edilmiştir. Analizde Teksas kırmızısı, FITC (yeşil) ve DAPI filtreleri kullanılmış ve "Isisi FISH Görüntüleme Sistemi" programı kullanılarak görüntülenmiştir. İncelenen interfaz hücrelerinde kırmızı (K) ile işaretlenen bölge *PTEN* geninin bulunduğu 10q23.3 bölgesini, yeşil (Y) ile işaretlenen bölge ise 10. Kromozomun sentromer bölgesini işaret etmektedir. Buna göre normal hücre (2Y2K), biallelik delesyonlu hücre (2Y), monoallelik delesyonlu hücre (2Y1K), monozomik hücre (1Y1K) ve atipik sinyaller (1Y2K, 3Y2K, 2Y3K... gibi) içeren çeşitli hücreler analiz edilmiştir.

#### **iFISH Görüntülerinin Değerlendirilmesi:**

KHDAK tanısını kesin olarak alan olgulara ve kontrol grubuna dâhil edilen olgulara ait bronkoskopik lavaj sıvısından elde edilen hücrelerle hazırlanan preparatlara uygulanan iFISH analizinde her grup için en az 100 hücre sayılmış, 100 hücre sayılmayanlarda ise ancak sayılabilen hücreler değerlendirilmiştir.

10q23.3 bölgesinde bulunan *PTEN* genini işaretleyen kırmızı ve 10. kromozomun sentromer bölgesini işaretleyen yeşil renkte ışımaya yapan problemler, kendi dalga boylarına özgü filtreler altında görüntülenmiştir. Hücre sınırları bozuk ya da belli olmayan, hasarlı ya da parçalanmış olan hücreler dışlanmıştır. Ayrıca üst üste

gelmiş nükleuslar ve atipik hücreler değerlendirilmeye alınmamıştır. Aralarına bir sinyal giremeyecek kadar yakın olan sinyaller ve parçalanmış olan sinyaller tek sinyal olarak kabul edilmiştir. Üst üste gelmiş ya da birbirinin içine geçmiş olan hücrelere ait sinyaller dışlanmıştır.

Tüm olgulara ait iFISH görüntülerinin değerlendirilmesi iki bağımsız araştırmacı tarafından İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı - Sitogenetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

### **3.2.4. İmmünohistokimya Yöntemi (İSK)**

İmmünohistokimyasal boyama yöntemini kullanabilmek için ön hazırlıkların yapılması gerekmektedir. Bu uygulamanın aşamaları şu şekildedir;

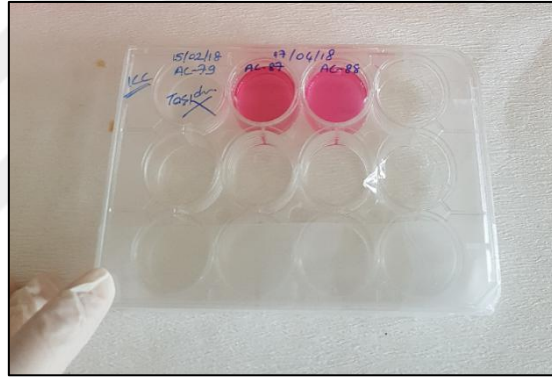
#### **3.2.4.1. Harvest (Hücre Toplama)**

1. ~6-8 ml. enjektör içinde gelen bronşiyal lavaj sıvısı, ilk olarak üç ayrı tüpe bölünmüştür. Birinci ve ikinci tüpler iFISH yöntemi için ayrılmış üçüncü tüp ise İSK yöntemi için kullanılmıştır.
2. Enjektörden 12 ml'lik kırmızı kapaklı tüplere aktarılan örnekler, ilk olarak 1500 rpm.' de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
3. Süre sonunda süpernatant kısmı dökülerek dipte kalan pellet üzerlerine vortex üzerinde 6 ml. taze hazırlanmış (RT pH 6.8) PBS konulmuştur.
4. Tekrar 1500 rpm.'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve yine süpernatant kısmı dökülmüştür. (Eğer örnekte hala bulanıklık görülürse ya da mukus parçaları varsa tekrar PBS ile yıkanmıştır).

#### **3.2.4.2. İSK için Hücre Kültürü**

1. Daha önce distile suyla yıkanmış ve kurulanmış olan 18 mm. çapındaki daire şeklindeki lameller, 12'lik (6x4 kuyulu) plate'in tabanına dikkatlice yerleştirilmiştir.
2. Ön yıkamaları yapılan örneğin dipte kalan pellet kısmı plate'in kuyularına ekilmiştir (Şekil 3-5).

3. Üzerlerine her kuyucuk için 1 ml DMEM konularak 37 °C deki etüve gece boyu inkübasyon için bırakılmıştır.
4. Ertesi gün plate inkübatörden çıkarılarak üzerlerindeki DMEM çekilmiş, yerine 10 dk. süre ile %70'lik etil alkol konularak hücreler fikse edilmiştir.
5. Süre sonunda etil alkol çekilerek yerine her kuyu için 1ml PBS konulmuştur.  
(Eğer materyal hala eritrosit yönünden zengin görünüyorsa bir kez daha alkolle yıkanıp homojenize sağlanmıştır.)
6. Son aşamada, plate içerisinde hazırlanan örnekler çalışılacağı güne kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.



**Resim 3- 3** : Taban kısmındaki lamelin üzerine lavaj örneğinin ekildiği 6x4'lük plate

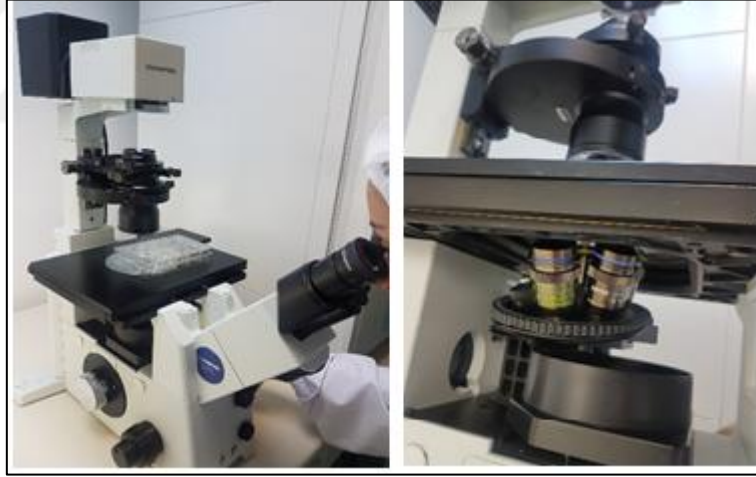
### 3.2.4.3. İSK Yönteminin Uygulanması

İşaretlenmiş poliklonal *PTEN* antikoru (*PTEN- poliklonal tavşan antikoru- AbClonal Cat. No. A11189*) ve Histostain-Plus Bulk Kit (*Mouse and Rabbit Specific HRP/AEC (ABC) Detection IHC Kit (ab93705, USA)*) kullanılarak hücre antijenlerini buldukları yerde göstermek amacıyla Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi kullanılarak immunositokimyasal boyama işlem sırası şu şekildedir:

1. +4 °C'de buzdolabından çıkarılan plate'in kuyularından PBS çekilip ve yerine 5 dk. süre ile 10'ar damla Bloklama Solusyonu (Solition A) konulmuştur.

2. Bu süre içinde primer antikoru 1:250 oranında (2 µl Primer Antikor 498 µl. Antibody Diluent olacak şekilde) Antibody Diluent ile seyreltilmiş ve ışıktan korunarak vortex üzerinde çalkanmıştır.
3. Bloklama aşamasından hemen sonra bloklama solusyonu kuyulardan çekilerek giderilmiştir.
4. Daha sonra her kuyucuk için daha önce hazırlanmış olan primer antikor karışımından 500 µl konulmuştur. Bu şekilde +4 °C'de buzdolabında nemli ortamda bir gece bekletilmiştir.
5. Ertesi gün 3 kez 5 dk. süre ile kuyucuğun tabanındaki lamelin üzerini kaplayacak kadar (4-5) damla PBS ile yıkanmıştır.
6. En son PBS çekildikten sonra Broad Spectrum Second Antibody (Solution B) (*Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Mouse and Rabbit specific HRP*) 15 dk. süre ile her kuyucuğa 10'ar damla konulmuştur.
7. Süre sonunda Sekonder Antikor kuyucuklardan çekilip atılmış ve yine 3'er kez 5 dk. PBS ile yıkamaları yapılmıştır.
8. Son yıkamadan sonra 10 dk. süre ile her kuyucuk için 10'ar damla HRP Streptavidin Peroksidaz (Solution C) (*Mouse and Rabbit specific HRP*) damlatılmıştır.
9. Bu aşamada süre sonunda 3'er kez 5 dk. PBS ile yıkamaları yapılmıştır.
10. Kromojen AEC (*Invitrogen, Thermo Fisher*) firma protokolüne göre hazırlanmıştır. Bu karışım satın alınan kitin içinden çıkan 3 solüsyonla yapılmıştır. Kromojen, A solüsyonundan 1 damla, B solüsyonundan 2 damla ve C solüsyonundan da 1 damla, 1 ml. distile su içine damlatılarak 1 ml'lik ependorfta hazırlanmıştır  
(Hazırlanan kromojen maksimum 20 dk. içinde kullanılmalı ve Alimünyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalıdır).
11. Süre sonunda PBS çekilerek yerine hazırlanan kromojenden her kuyucuk için 500 µl konularak reaksiyon inverted ışık mikroskobu altında takip edilmiştir (Şekil 3-6).

12. İlk 10 dk. içerisinde kırmızı renk değişimi gözlemlenmiştir. Tam bu aşamada reaksiyonu durdurmak için distile su kullanılmıştır.
13. İSK metodunun sonunda daha önceden yıkanmış kurutulmuş ve numaralandırılmış olan lamlara 1'er damla taze hazırlanmış gliserin jel damlatılmıştır.
14. İSK uygulamasının en başında kuyucukların içine yerleştirilen lameller, bükük uçlu iğne ve ince uçlu pens yardımıyla dikkatlice kaldırılarak ters çevrilmiş ve bu lamaların üzerine yapıştırılmıştır.
15. Bu şekilde hazırlanan preparatların 1-2 saat süre ile oda ısısında iyice yapışması ve jelatinin donması beklenilmiştir.
16. Daha sonra preparatlar alınıp ışık mikroskopunda farklı on bölge seçilerek fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.



**Resim 3- 4 :** İverted ışık mikroskobu

#### **3.2.4.4. İmmün Boyama Özgüllüğünün Kontrolü**

**Negatif Kontrol:** İmmün boyamanın kontrolü için bir negatif kontrol kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan bu kuyucuğa primer antikor yerine PBS damlatılarak tüm işlem basamakları aynen uygulanmıştır.



### 3.2.4.5. İSK Değerlendirme

*PTEN* immun reaksiyonunun *LEICA DM500* marka ışık mikroskopunda x40 büyütmede rastgele seçilen 10 alanda bulunan hücrelerde yarı kantitatif olarak tespiti yapıldı. ( -; boyanma yok, +; zayıf boyanma, ++; orta derecede boyanma, +++; şiddetli boyanma). Bu değerlendirmeye göre (-):0, (+):1, (++)2 ve (+++): 3 ile numaralandırılarak istatistiksel olarak analizi yapıldı.

### 3.2.4.6. İstatistiksel Yöntemler

Tüm istatistiksel olarak değerlendirilmesinde gruplar arası kıyaslamalar için One-way ANOVA testi kullanıldı. Çoklu kıyaslama testi olarak ise hem gruplar arasında, hem de grup içinde Tukey-Kramer Multiple Comparisons testi uygulandı. Anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$  olarak seçildi.

## 4. BULGULAR

Hata grubu olarak İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda takip edilmekte olan KHDAK tanılı olgular, kontrol grubu olarak ise bronkoskopi endikasyonu bulunan ve akciğerde herhangi bir maligniteye rastlanmayan 10 bireyden alınan bronşiyal lavaj örneği ile çalışılmıştır.

Toplamda 95 olgudan bronşiyal lavaj örneği toplanmıştır. Tüm olgulara ait tanıların sayısal olarak dağılımı Tablo 4.1 de gösterilmiştir. Toplanan tüm bronşiyal lavaj materyallerine ön çalışma uygulanmıştır. Tüm olgulardan 43 tanesi KHDAK tanısını kesin olarak almış ancak bunlardan 30 tanesinin bronşiyal lavaj örneğinden hücre elde edilebilmiştir.

**Tablo 4-1:** Toplanan tüm olgulara ait tanıların sayısal olarak dağılımı

Toplam olgu sayısı	Toplam Kontrol grubu sayısı	KHAK olgu sayısı	KHDAK olgu sayısı	Tüberküloz hasta sayısı	Opere Edilenlerin sayısı	Tanı Almayanlar
95	21	20	43	2	2	7

Bu 95 olgunun 64 tanesine (43 KHDAK ve 21 kontrol grubu olmak üzere) iFISH protokolü uygulanmış ve bunlardan 40 tanesinde (30 KHDAK ve 10 Kontrol grubu olmak üzere) prob hibridizasyonu başarılı olmuş, sinyal alınabilmiştir. Patoloji sonuçlarına göre KHDAK kesin tanısı olan toplam 43 hasta vardır. Bunların alt tiplerine göre dağılımı Tablo 4.2. de gösterilmektedir.

**Tablo 4-2:** Toplanan tüm olgulardan KHDAK hastalarının alt tiplerine göre dağılımı

KHDAK			
TOPLAM KHDAK olgu sayısı	Alt sınıflandırılması yapılamayan olgu sayısı	Skvamöz hücreli karsinom olgu sayısı	Adenokarsinom olgu sayısı
43	8	28	7

Çalışma grubuna dâhil edilen 30 KHDAK hastanın 21'i skuamöz hücreli karsinom, 6'sı adenokarsinom ve 3'ü de KHDAK sınıflandırılmayan alttipidir. Çalışma grubundaki hastaların %10'u kadın (n=3), %90'ı erkek (n=27) olup yaş ortalamaları kadınlarda 54,6 erkeklerde 65,7'dir. Kontrol grubuna dâhil edilen olguların ise tamamı erkeklerden oluşmuştur. Bu grubun yaş ortalaması 60,6'dır. Hasta grubundaki olgulara ait özellikler Tablo 4.3'te ve kontrol grubundaki olgulara ait özellikler de Tablo 4.4'te verilmiştir.

Yaş, cinsiyet gibi özellikler olgu seçiminde göz ardı edilmiştir. Hastaların Kanser evrelendirilmesi, hastaya ait BT görüntüleri ve PET sonucu göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Bunların dışında son yapılan bildirimler de (Turna, Ak, Kömürcüoğlu, Yurt, & Yılmaz, 2017) dikkate alınarak İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Türkiye Solunum Araştırmacıları Derneğinin hazırlamış olduğu 'Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri'nde 8. Evreleme TNM Özet Kitabı' rehber alınarak göğüs hastalıkları uzmanı tarafından yapılmıştır.

\*Hastaların sigara kullanma durumları paket/ yıl olarak gösterilmiştir. Bu, hastaların günlük içtikleri paket sayısı ile içtiği yılın çarpımı ile elde edilen sayıdır (Örneğin 40 yıl boyunca günde 2 paket sigara kullanan kişinin paket/yıl değeri 80'dir).

**Tablo 4-3:** Hastaların cinsiyet, yaş, tanı ve TNM'ye göre evrelerini gösteren dağılım

Olgu No	E/K	Yaş	Sigara Kullanımı Paket-yıl*	Histopatolojik Tanı	Evre
1	E	69	80 / Bırakmış	KHDAK	Evre IV / M1
2	E	77	30 /Aktif	Adenokarsinom	Evre IIIC / T3N3M0
3	E	62	72 /Aktif	Skuamöz hücreli karsinom	Evre IIIA /T4N1M0
4	E	64	35 / Bırakmış	Skuamöz hücreli karsinom	Evre IIB / T3N0M0
5	K	58	40 /Bırakmış	Adenokarsinom	Evre IV / T2N1M1
6	E	76	110 /Bırakmış	Skuamöz hücreli karsinom	Evre IIIB / T2b N3Mx
7	E	76	50 /Aktif	Skuamöz hücreli karsinom	Evre IIIA / T2N2M0

8	K	45	40 /Aktif	KHDAK	Evre IV
9	E	62	50 /Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIA / T2N2M0
10	E	58	45 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evrelendirilemedi
11	E	41	100 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IV
12	E	69	Bilgi yok	Adenokarsinom	Evrelendirilemedi
13	E	53	30 /Aktif	KHDAK	Evre IV
14	E	60	45 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIA / T2N2Mx
15	E	67	Bilgi yok	Adenokarsinom	Evre IIIB / T2a N3M0
16	E	66	75 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIB / T2b N3M0
17	E	70	40 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIB / T4N2M0
18	E	60	135 / Aktif	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIA / T4N0M0
19	E	55	40 / Aktif	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIB / T3N2M0
20	E	78	5 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIC / T4N3M0
21	E	72	80/ Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evrelendirilemedi
22	E	53	Hiç kullanmadı	Skvamöz hücreli karsinom	Evrelendirilemedi
23	K	61	Bilgi yok	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIB / T1N3Mx
24	E	62	90 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIA / T2aN2M0
25	E	77	Bilgi yok	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IIIA / T2N2M0
26	E	72	85 /Aktif	Skvamöz hücreli karsinom	Evre IV
27	E	78	30 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evrelendirilemedi
28	E	73	Hiç kullanmadı	Adenokarsinom	Evre IIIB / T3N2M0
29	E	59	40 /Aktif	Adenokarsinom	Evre IV
30	E	66	50 / Bırakmış	Skvamöz hücreli karsinom	Evre III /T4NXMX

Kontrol grubunun tamamı Erkelere oluşmuştur. Yaş ortalamaları ise 60,6'dır. Bu gruba ait olguların özellikleri Tablo 4-4'te verilmiştir.

**Tablo 4-4:** Kontrol grubuna ait yaş, cinsiyet ve sigara kullanımının dağılımı

<b>Kontrol grubu Olgu No</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Yaş</b>	<b>Sigara Kullanımı (paket/yıl)</b>
<b>K-1</b>	E	70	150 / Bırakmış
<b>K-2</b>	E	58	25 / Aktif
<b>K-3</b>	E	61	Hiç kullanmadı
<b>K-4</b>	E	57	40 / Bırakmış
<b>K-5</b>	E	48	30 / Bırakmış
<b>K-6</b>	E	59	32 / Bırakmış
<b>K-7</b>	E	65	50 / Bırakmış
<b>K-8</b>	E	64	Hiç kullanmadı
<b>K-9</b>	E	68	Hiç kullanmadı
<b>K-10</b>	E	56	90 / Bırakmış

#### **4.1. KHDAK Olgularının Sigara Kullanımına Göre Değerlendirilmesi**

Çalışma grubuna dâhil edilen KHDAK olgularının % 33,4'ü aktif sigara kullanıcısı, % 66,6'sı ise sigarayı bir süre kullandıktan sonra bırakmıştır (bu gruptan 3 kişinin sigara kullanma alışkanlığı hakkında bilgi edinilememiştir).

#### **4.2. KHDAK Olgularının Evre Dağılımlarına Göre Değerlendirilmesi**

Çalışma grubuna dâhil edilen KHDAK olgularının evrelendirilmesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzman doktorlar tarafından hastaya ait BT görüntüleri ve PET sonuç raporu göz önünde bulundurularak KHDAK 8. evreleme rehberine (Güntülü Ak, 2016) göre yapılmıştır. Bu verilere göre bu gruptaki olguların % 23,4'ü Evre IV, % 56,6'sı Evre III, % 3,4'ü Evre II olarak tespit edilmişken % 16,6'sının ise evrelemesi yapılamamıştır.

### 4.3. KHD AK Olgularına Ait iFISH Sinyal Bulguları

Toplamda 95 olgudan toplanan bronşiyal lavaj örneklerinin tümüne ön çalışma uygulanmıştır. Tüm bu olguların 43 tanesi KHD AK tanısını kesin olarak almış ve bunlardan 30 tanesinin bronşiyal lavaj örneğinden hücre elde edilebilmiştir. Kontrol grubu için de toplamda 21 örnek toplanmış, bunların ancak 10 tanesinden hücre elde edilebilmiştir. Toplamda 64 olguya iFISH tekniği uygulanmış ve bunlardan ancak 40 tanesinden sinyal alınabilmiştir.

KHD AK tanısını kesin olarak alan olgulardan edinilen ve kontrol grubuna dâhil edilen olgulardan alınan bronkoskopik lavaj örneklerinden elde edilen hücrelerle hazırlanan preparatlara uygulanan iFISH analizinde her olgu için iki farklı araştırmacı tarafından en az 100'er hücre sayılmış, hücre sayısı 100'ü bulmayan olgularda ise sayılabilen kadar hücre değerlendirilmiştir.

iFISH analizinde *PTEN* FISH probunun dalga boylarına özgü olan Teksas kırmızısı, FITC (yeşil) ve DAPI filtreleri kullanılmıştır. Her olgu için kromozomlar birbirinden bağımsız olarak incelenmiştir. Hasta grubuna ait iFISH analiz sonuçları Tablo 4.5'te, kontrol grubuna ait analiz sonuçları da Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Çalışma grubundaki KHD AK olgularına ve kontrol grubuna ait atipik sinyal dağılımı Tablo 4.7'de detaylı olarak gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki sonuçlara göre kromozom kazançlarına / kayıplarına rastlanmıştır. Burada en dikkat çeken 23 ve 25 nolu olgulardaki atipik sinyal oranıdır. Bu iki olguda diğer olgulara kıyasla oldukça yüksek seviyede atipik sinyal görülmüştür. Bu olgulara ait bulgular ayrıca değerlendirilmiştir.

**Tablo 4-5: KHDAK olgularına ait iFISH bulguları \***

<b>KHDAK HASTA GRUBU iFISH ANALİZ SONUÇLARI</b>						
<b>HASTA NO</b>	<b>TOPLAM HÜCRE SAYISI</b>	<b>Normal Hücre sayısı (2Y/2K)</b>	<b>Biallelik delesyonlu hücre sayısı (2Y)</b>	<b>Monozomik hücre sayısı (1Y/1K)</b>	<b>Monoallelik delesyonlu hücre sayısı (2Y/1K)</b>	<b>DİĞER Atipik sinyaller içeren hücre sayısı</b>
H-1	326	282	0	11	4	29
H-2	312	295	0	2	5	10
H-3	220	177	0	8	4	31
H-4	215	184	3	4	14	10
H-5	208	185	0	9	5	9
H-6	216	192	0	8	6	10
H-7	308	266	0	12	13	17
H-8	225	206	2	3	7	7
H-9	303	262	0	20	11	10
H-10	211	188	0	11	4	8
H-11	157	132	0	6	5	14
H-12	203	180	0	9	5	9
H-13	224	195	0	8	6	15
H-14	206	179	0	8	7	12
H-15	213	187	0	3	8	15
H-16	196	170	6	10	3	7
H-17	202	180	0	10	2	10
H-18	205	172	0	14	9	10
H-19	180	123	0	15	22	20
H-20	244	195	0	21	7	21
H-21	217	202	0	7	4	4
H-22	188	146	0	9	5	28
H-23	307	187	0	9	2	109**
H-24	215	181	0	13	6	15
H-25	277	65	0	0	4	208**
H-26	186	151	0	8	5	22
H-27	209	192	0	3	5	9
H-28	206	182	0	6	4	14
H-29	221	193	0	7	8	13
H-30	202	190	0	2	2	8

\* (K: kırmızı sinyal-10q23, Y: yeşil sinyal-sentromer) \*\* 23 ve 25 no'lu bu iki olgu Evre III Skuamöz tipi akciğer kanseri (23 no'lu olgu: Evre IIIB / T1N3Mx ve 25 n'olu olgu: Evre IIIA / T2N2M0) tanısı alan ve sırasıyla 61 ve 77 yaşlarındaki hastalardır.

iFISH analiz sonuçlarına göre 23 nolu olguda %35,5 ve 25 nolu olguda da %75 oranında atipik sinyal oranı gözlenmiştir. Bu bulgular birbirinden bağımsız 3 araştırmacı tarafından sayılarak doğrulanmıştır.

**Tablo 4-6:** Kontrol grubuna ait iFISH bulguları \*

<b>KONTROL GRUBU iFISH ANALİZ SONUÇLARI</b>					
<b>Kontrol No</b>	<b>Toplam Hücre Sayısı</b>	<b>Normal hücre sayısı (2Y/2K)</b>	<b>Monozomik hücre sayısı (1Y/1K)</b>	<b>Monoallelik delesyonlu hücre sayısı (2Y/1K)</b>	<b>DİĞER Atipik sinyaller içeren hücre sayısı</b>
K-1	325	315	5	4	1
K-2	108	101	1	3	3
K-3	211	197	7	3	4
K-4	202	185	5	4	8
K-5	208	200	4	0	4
K-6	228	212	2	5	9
K-7	202	190	2	2	8
K-8	104	98	2	2	2
K-9	213	200	4	3	6
K-10	116	107	3	3	3

\*(K: kırmızı sinyal-10q23, Y: yeşil sinyal-10.kromozom sentromer bölgesi)



**Tablo 4-7: KHDAK olgularına ait atipik sinyali olan hücrelerin sayısal dağılımı**

Hasta grubu olgu No	Atipik sinyale sahip hücre sayısı	ATİPİK SİNYALLER									
		1Y/2K	3Y/3K	4Y/4K	6Y/6K	2Y/3K	3Y/2K	5Y/3K	5Y/4K	6Y/4K	2K
1	29	11	13	4	-	1	-	-	-	-	-
2	10	5	3	1	-	-	1	-	-	-	-
3	31	26	-	-	-	3	2	-	-	-	-
4	10	3	2	-	-	1	4	-	-	-	-
5	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	17	5	6	-	-	3	3	-	-	-	-
8	7	2	2	1	-	-	2	-	-	-	-
9	10	5	3	-	-	2	-	-	-	-	-
10	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	9	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
13	15	14	1	-	-	-	-	-	-	-	-
14	12	4	2	-	-	-	4	-	-	-	2
15	15	7	2	-	-	-	5	-	-	-	1
16	6	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	10	6	2	1	-	-	1	-	-	-	-
19	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	21	10	5	-	-	-	1	-	-	-	5
21	4	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
22	24	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	98	98*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	15	8	5	1	-	-	-	-	-	-	1
25	173	1	1	-	1	-	165*	1	3	1	-
26	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	2	2	4	1	-	-	2	-	-	-	-
28	14	6	6	2	-	-	-	-	-	-	-
29	13	4	1	-	-	1	5	-	-	-	2
30	18	12	2	2	-	-	2	-	-	-	-

(K: kırmızı, Y:yeşil sinyal) \*23 ve 25 no 'lu olgularda rastlanan bu yüksek atipik sinyal bulgularına, tartışma kısmında değinilmiştir.

**Tablo 4-8:** Kontrol grubu olgularına ait atipik sinyali olan hücrelerin sayısal dağılımı

Konrol Grubu Olgu No	Atipik Sinyale Sahip Hücre Sayısı	ATİPİK SİNYALLER					
		1Y/2K	3Y/3K	4Y/4K	2Y/3K	3Y/2K	1Y
K-1	1	0	-	-	-	-	1
K-2	3	3	-	-	-	-	-
K-3	4	3	1	-	-	-	-
K-4	8	2	6	-	-	-	-
K-5	4	3	-	-	-	1	-
K-6	9	6	1	-	1	1	-
K-7	8	3	4	1	-	-	-
K-8	2	1	-	-	-	1	-
K-9	6	3	2	-	-	1	-
K-10	3	1	-	-	-	2	-

(K: kırmızı, Y:yeşil sinyal)

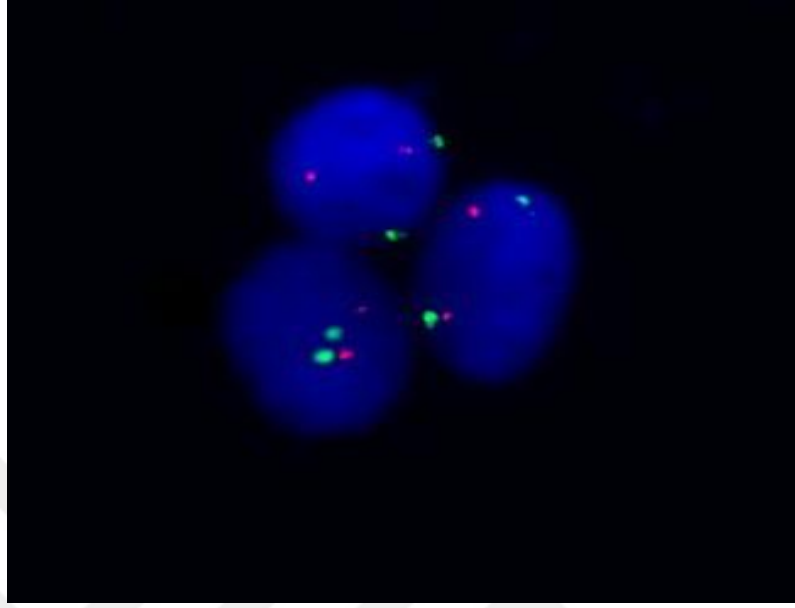
#### 4.4. KHDAK Olgularına Ait iFISH Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada uygulanan tüm iFISH analizleri ve iFISH sonuçlarının görüntülenmesi İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Toplam 64 olguya iFISH tekniği uygulanmış, bunlardan 40 tanesinde değerlendirilebilecek kalitede sinyal alınabilmiştir. iFISH metodu uygulanması için KHDAK olgularına ve kontrol grubu olgularına ait hazırlanan tüm preparatlar İSK sonuçlarından habersiz olan iki bağımsız araştırmacı tarafından analiz edilmiş, iki analizde görülen tüm bulgular birlikte değerlendirilmiştir. Her olgu için en az 100 hücre sayılmıştır. Üst üste gelmiş ya da birbiri içine geçmiş hücrelere ait sinyaller dışlanmıştır. Aralarına tek sinyal girebilecek kadar yakın olan ya da parçalanmış olarak gözlenen sinyaller tek sinyal olarak sayılmıştır. Hücre sınırları belli olmayan, hasarlanmış olan hücreler ya da sitolojik olarak atipik sayılan hücrelere ait sinyaller ise değerlendirmeye alınmamıştır.

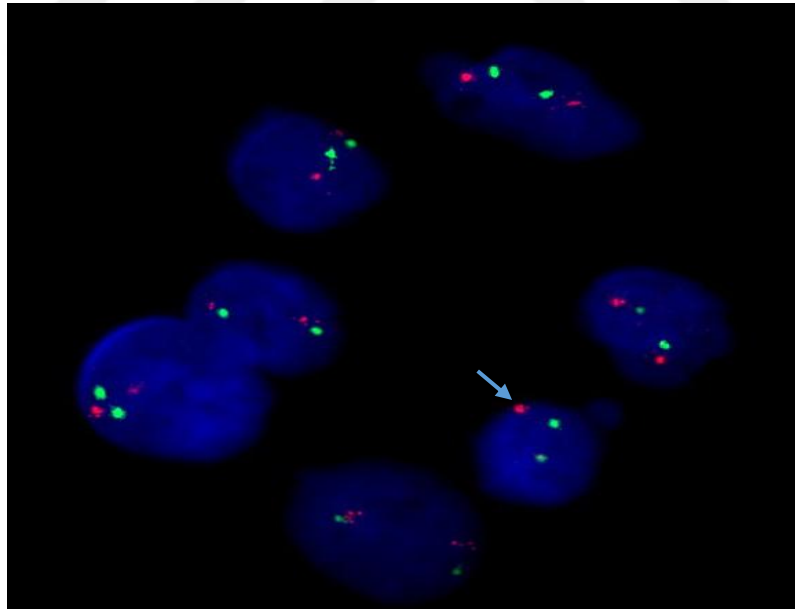
#### 4.5. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait iFISH Görüntüleri

iFISH sonuçlarının görüntülenmesi FISH görüntüleme sistemi olan *Isisi FISH Imaging System* programı kullanılarak yapılmıştır. Bu görüntülerden bazıları Şekil 4.1- Şekil 4.10 arasında verilmiştir. Kırmızı sinyal (K) 10q23.3 bölgesinde bulunan

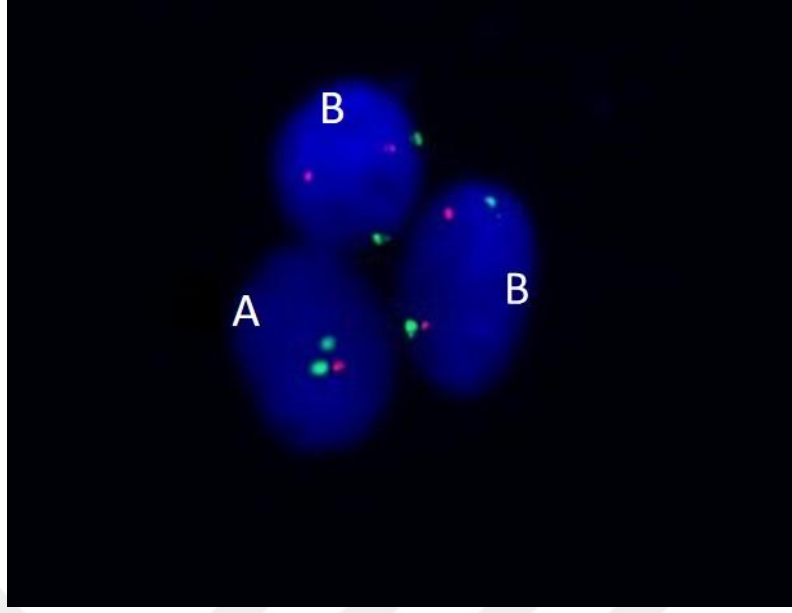
*PTEN* genini, yeşil sinyaller (Y) ise 10. kromozomun sentromer bölgesini işaret etmektedir.



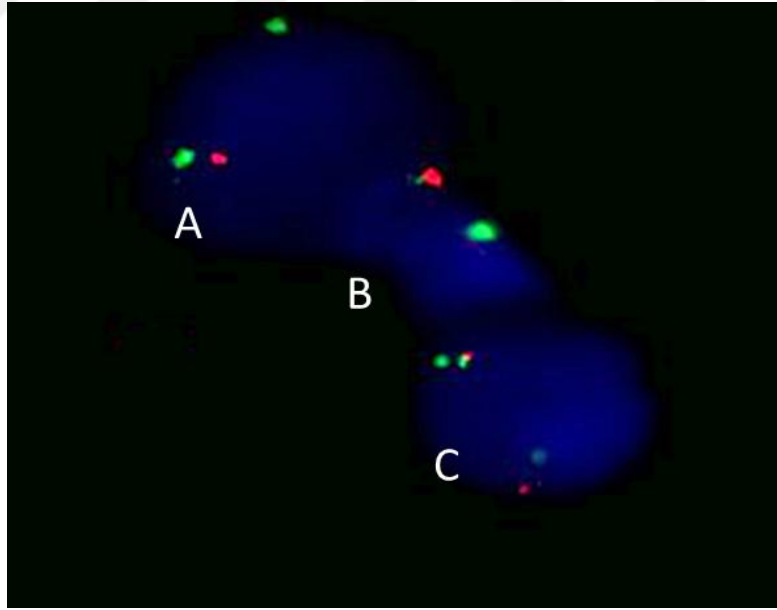
**Şekil 4-1:** Kontrol grubuna ait normal (2Y2K) sinyalleri içeren üç hücrenin iFISH görüntüsü.



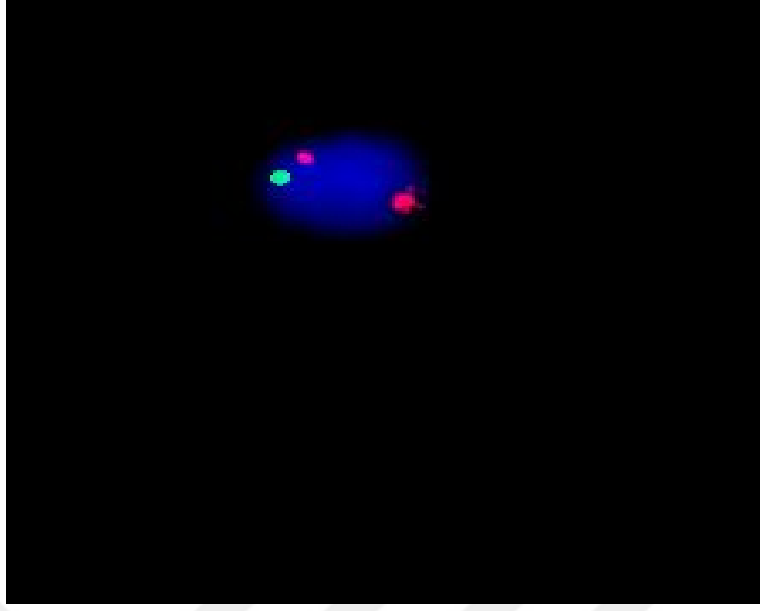
**Şekil 4-2:** Kontrol grubuna ait normal (2Y2K) sinyalleri içeren 6 hücreye ve 1 tane (ok ile gösterilmiş) monoallelik delesyonlu (2Y1K sinyali olan) hücreye ait iFISH görüntüsü.



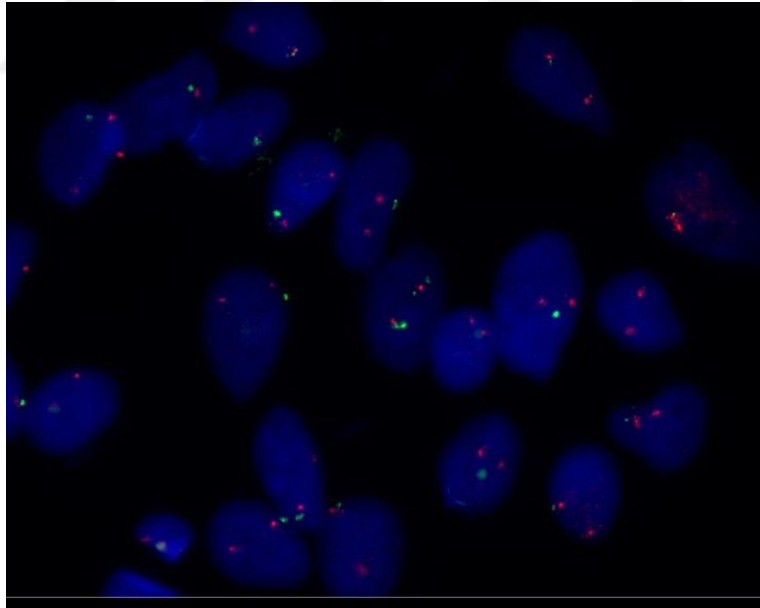
**Şekil 4-3:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri olgusuna ait iFISH görüntüsü. A) Monoallelik (2Y1K) delesyonu içeren hücre B) Normal (2Y2K) sinyal içeren iki hücre.



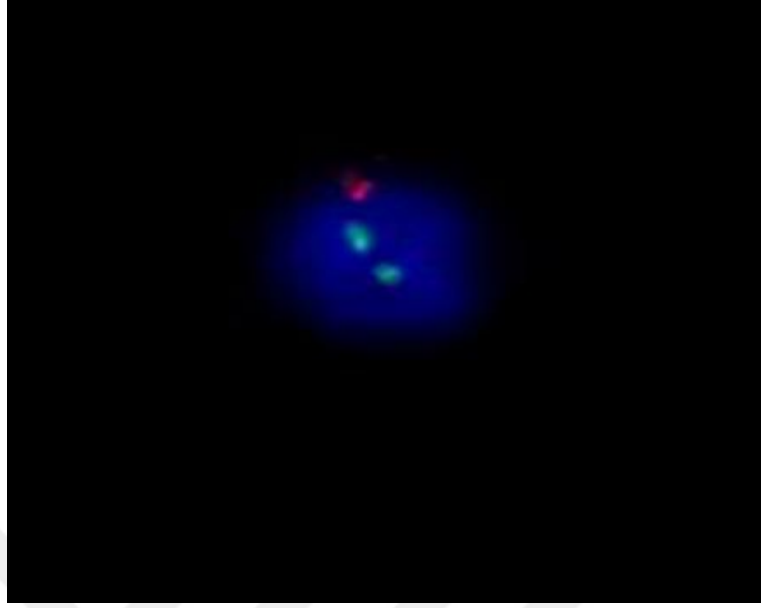
**Şekil 4-4:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanı bir olguya ait iFISH görüntüsü. Aynı alanda monoallelik 2Y1K (A), monozomi (1Y1K) (B) ve normal (2Y2K)(C) sinyali olan hücreler.



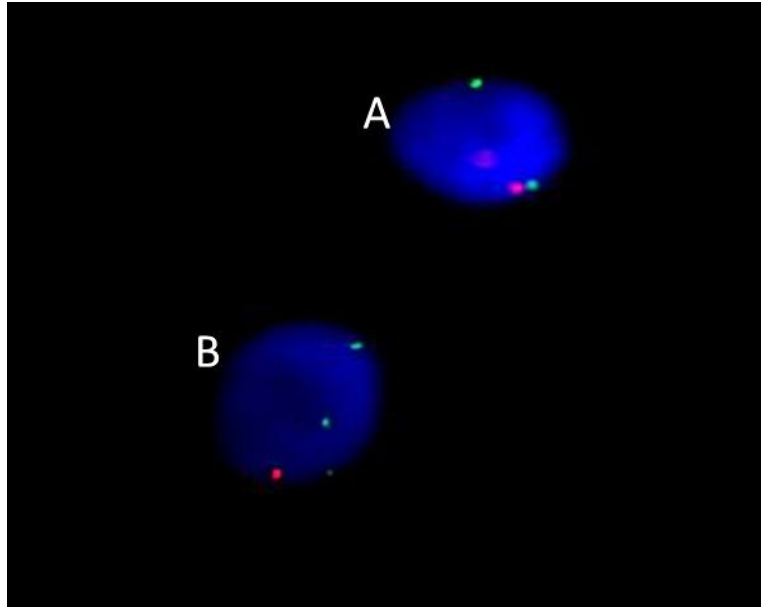
**Şekil 4-5:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait atipik sinyal (1Y2K) içeren bir hücrenin iFISH görüntüsü.



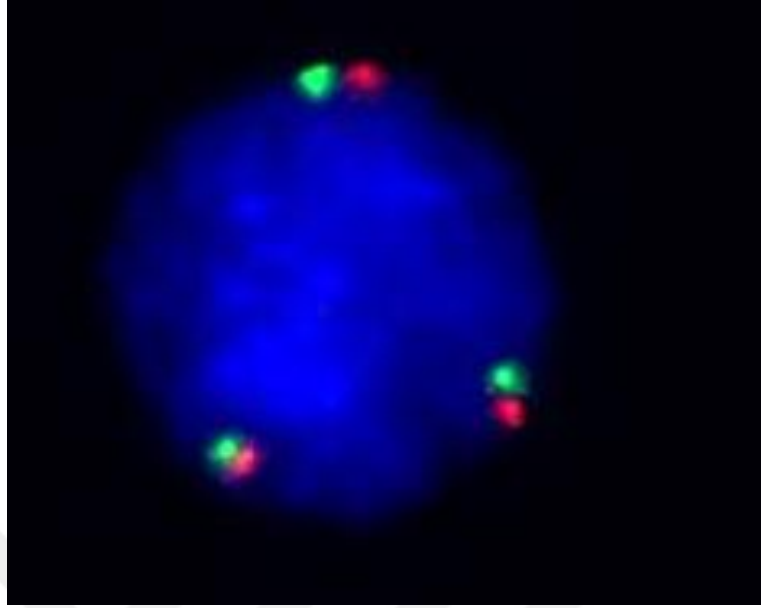
**Şekil 4-6:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait iFISH görüntüsü. Hücrelerin çoğu atipik sinyal (1Y2K) içermektedir.



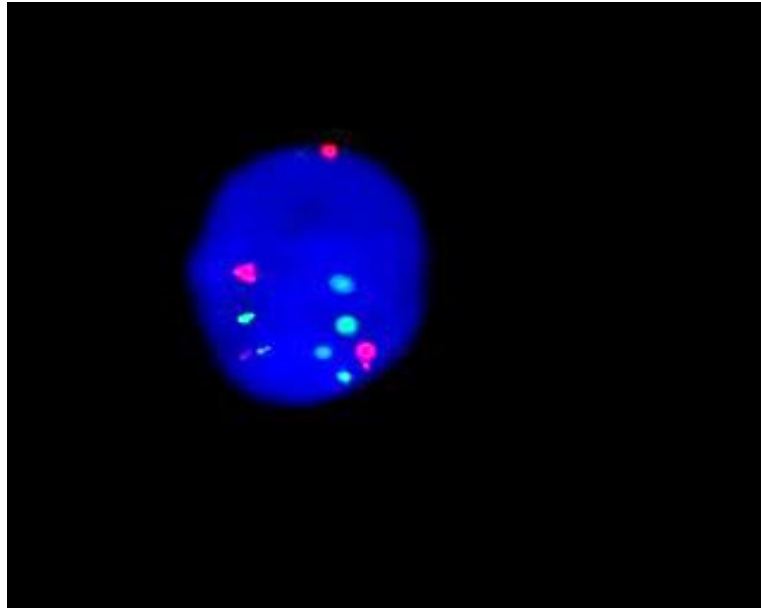
**Şekil 4-7:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait Monoallelik delesyon (2Y1K) içeren bir hücrenin iFISH görüntüsü.



**Şekil 4-8:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait (A) normal sinyal içeren (2Y2K) ve (B) atipik sinyal içeren (2Y1K) iki hücrenin iFISH görüntüsü.



**Şekil 4-9:** Adenokarsinom tanılı bir olguya ait 3Y3K sinyal içeren bir hücrenin iFISH görüntüsü.



**Şekil 4-10:** Adenokarsinom tanılı bir olguya ait (6Y4K) sinyal içeren atipik bir hücrenin iFISH görüntüsü.

#### 4.6. KHDAK Olgularına Ait iFISH Bulgularının İstatiksel Analizleri

Çalışma grubu olan KHDAK olgularına ve kontrol grubu olgularına ait bulgular istatistiksel olarak Tablo 4.9'da gösterildiği üzere değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizde Kolmogorov and Smirnov, Paired T testi kullanılmıştır.

KHDAK hastalarına ait hücreler iFISH analiz sonuçlarındaki sinyal özelliklerine göre değerlendirildi. Hücrelerin normal sinyal alınan hücre sayısına kıyasla istatistiksel olarak değerlendirmesi yapıldı (*Paired T Testi*). Bu değerlendirmelere göre biallelik delesyonlu, monoallelik delesyonlu, monozomik hücre ve atipik sinyal içeren hücre sayılarının, normal sinyal alınan hücrelere kıyasla ileri derecede istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğu saptandı ( $P<0.0001$ ).

Kontrol grubuna ait hücreler iFISH analiz sonuçlarındaki sinyal özelliklerine göre değerlendirildi. Hücrelerin normal sinyal alınan hücre sayısına kıyasla istatistiksel olarak değerlendirmesi yapıldı (*Paired T Testi*). Bu değerlendirmelere göre monoallelik delesyonlu, monozomik hücre ve atipik sinyal içeren hücre sayılarının, normal sinyal alınan hücrelere kıyasla ileri derecede istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğu saptandı ( $P<0.0001$ ).

**Tablo 4-9:** KHAK ve kontrol grubu olgularında iFISH analiz sonuçlarına göre hücrelerdeki sinyal sayılarının karşılaştırılması ve tanımlayıcı istatistikleri.

Hücre sayısı	KHDAK (n=28 <sup>†</sup> )	Kontrol (n=10)	p
<b>Toplam</b>	226.73±43.45	191.70±67.34	0.0213
<b>Normal sinyal</b>	192.39±40.13	180.5±65.62	0.096
<b>Atipik sinyal</b>	13.82±6.98 *	4.8±2.78 *	0.0153
<b>Biallelik delesyonlu</b>	0.39±1.28 *	--	--
<b>Monoallelik delesyonlu</b>	6.64±4.17 *	2.9±1.37 *	0.0075
<b>Monozomik</b>	8.82±4.80 *	3.5±1.84 *	0.0101

*Değerler Ort. ± SS olarak verilmiştir. \*  $p<0.0001$  normal sinyale kıyasla.*

✦ Çalışma grubundaki olgulara ait atipik sinyal dağılımı Tablo 4.7 de detaylı olarak gösterilmiştir. KHDAK grubu olgularından 2 tanesinde yüksek atipik sinyal saptanmıştır. Bu oran diğer olgulara kıyasla oldukça yüksek seviyede görüldüğünden bu iki olgu istatistiksel analizlere dâhil edilmemiştir.



KHDAK hastaları ve kontrol grubuna ait veriler birbirleriyle kıyaslandığında toplam hücre sayısında, kontrol grubunda anlamlı bir azalma saptanırken ( $p=0.0213$ ) normal sinyal sayısında bir azalma gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P=0.096$ ). Monoallelik delesyonlu hücre ( $p=0.0075$ ), monozomik hücre ( $p=0.0101$ ) ve atipik sinyal ( $p=0.0153$ ) içeren hücre sayılarının KHDAK grubuna kıyasla anlamlı düzeylerde azalmış oldukları saptandı.

#### 4.7. İmmünohistokimyasal Analiz

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda takip edilmekte olan hasta ve kontrol gruplarına ait bronşiyal lavaj materyalinden elde edilen hücrelere işaretlenmiş *PTEN* poliklonal tavşan antikorunu kullanılarak immünohistokimyasal boyama uygulandı.

İmmün boyamanın sonuçlarının ışık mikroskopik düzeyde bağımsız 2 araştırmacı tarafından yapılan analiz sonuçlarına göre immünopozitiflik boyama sonucunda nükleus ve sitoplazmaları kırmızı olarak boyanmış hücreler *PTEN* immünopozitif olarak değerlendirildi. *PTEN* immün reaksiyonunun *Leica* marka ışık mikroskopunda x40 büyütmede rastgele seçilen 10 alanda bulunan hücrelerin yarı kantitatif tespiti yapıldı. ( -; boyanma yok, +; zayıf boyanma, ++; orta derecede boyanma, +++; şiddetli boyanma). Bu değerlendirmeye göre (-):0, (+):1, (++) :2 ve (+++) : 3 ile numaralandırılarak istatistiksel olarak analizi yapıldı.

Kontrol ve hasta gruplarına ait immün boyanmaların istatistiksel olarak değerlendirmesinde hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla *PTEN* immün pozitifliğinde çok ileri düzeyde artış saptandı ( $p<0.0001$ ) (Tablo 4-10 ).

**Tablo 4-10:** *PTEN* immün boyaması yapılan grupların immün reaksiyon şiddeti açısından değerlendirilmesi.

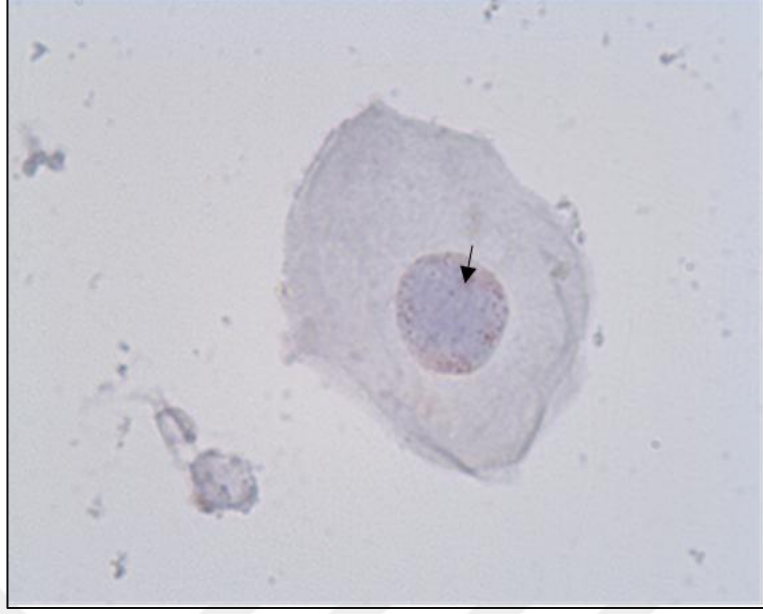
Grup	<i>PTEN</i> İmmünohistokimyasal değerlendirme
Kontrol	1,59±0,11
Hasta	2,55±0,60 <sup>a</sup>
	<sup>a</sup> $p<0.0001$ kontrol gruba kıyasla

Kontrol ve hasta gruplarının kıyaslamasından sonra hasta grubunun alt tiplerinin de (skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve KDHAK'ın sınıflandırılmayan alt tipi) *PTEN* immün pozitifliği bakımından istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Bu değerlendirmelere göre skuamöz hücreli karsinom ve KDHAK hasta gruplarında kontrol grubuna kıyasla *PTEN* immün pozitifliğinde ileri düzeyde anlamlı bir artış saptandı ( $p<0.001$ ). Hasta grubu skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom alt tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-11).

**Tablo 4-11:** *PTEN* immün boyaması yapılan kontrol ve hasta alt grupların immün reaksiyon şiddeti açısından değerlendirilmesi

Grup	<i>PTEN</i> İmmünohistokimyasal değerlendirme
Kontrol	1,59±0,11
Skuamöz	2,55±0,60 <sup>a</sup>
Adenokarsinom	2,05±0,10
KDHAk'ın gruplandırılmayan alt tipi	3,0±0,5 <sup>a,b</sup>
	<sup>a,b</sup> $p<0.001$ vs kontrol, <sup>b</sup> $p<0.05$ vs Adeno

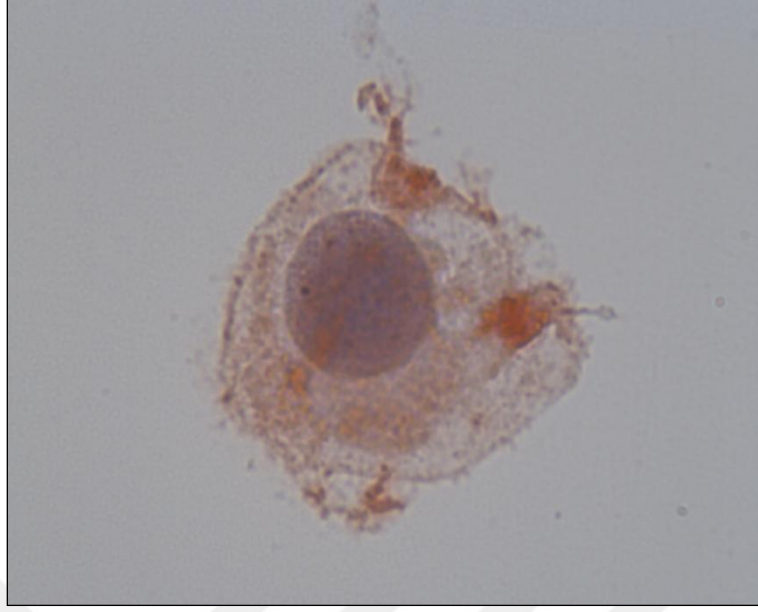
Hasta (skuamöz hücreli akciğer kanseri, adenokarsinom ve KDHAK'nin sınıflandırılmayan alt tipi) ve kontrol gruplarına Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ve poliklonal *PTEN* antikoru (1:250 sulandırma) kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyamanın görüntüleri Şekil 4.11 - Şekil 4.21 arasında verilmiştir.



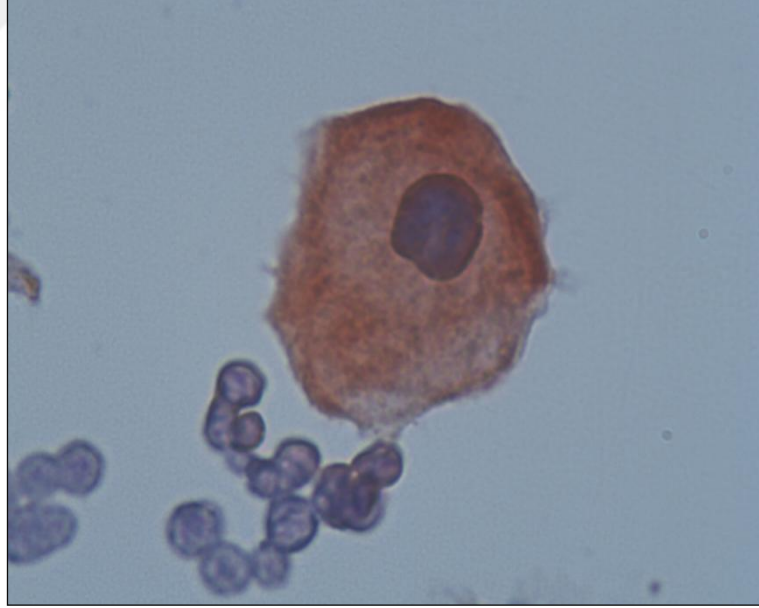
**Şekil 4-11:** Kontrol grubuna ait bir olguda nükleusu ve sitoplazması belirgin şekilde görülen bir epitel hücresi. Nükleusta heterokromatin bölgelerin bazı kısımlarında *PTEN* (+) boyanma görülmekte (→). Zıt boyama: Hematoksilen (x100).



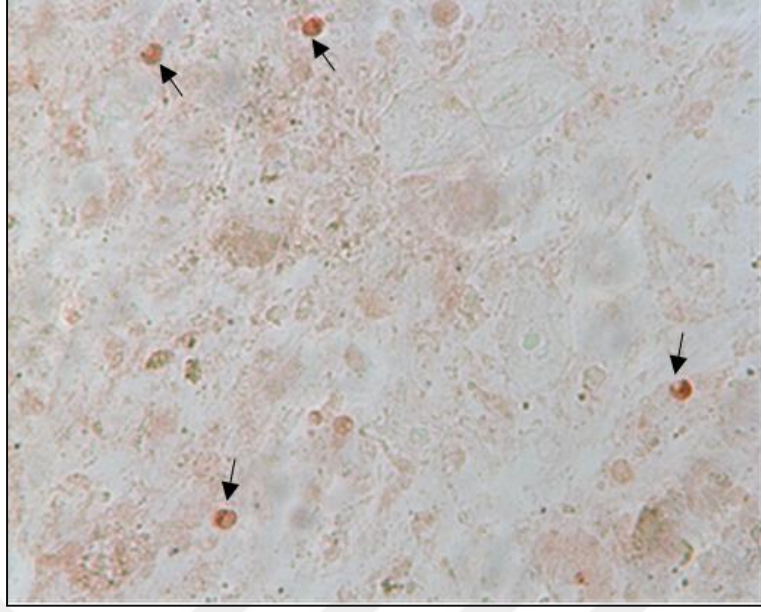
**Şekil 4-12:** Kontrol grubuna ait bir olguda nükleusu ve sitoplazması belirgin şekilde görülen, sitoplazması *PTEN* (+) olan bir epitel hücresi ve etrafında hiperplazik hücreler görülmekte. Zıt boyama: Hematoksilen (x100).



**Şekil 4-13:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait bronşiyal lavaj sıvısında hem nükleus hemde sitoplazmada *PTEN*(+) alanlar görülmekte. Zıt boyama: Hematoksilen, (x100).



**Şekil 4-14:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguda epitel hücrenin nükleus ve yoğun olarak sitoplazmasında *PTEN* (+)'liği görülmekte. Zıt boyama: Hematoksilen, (x100).

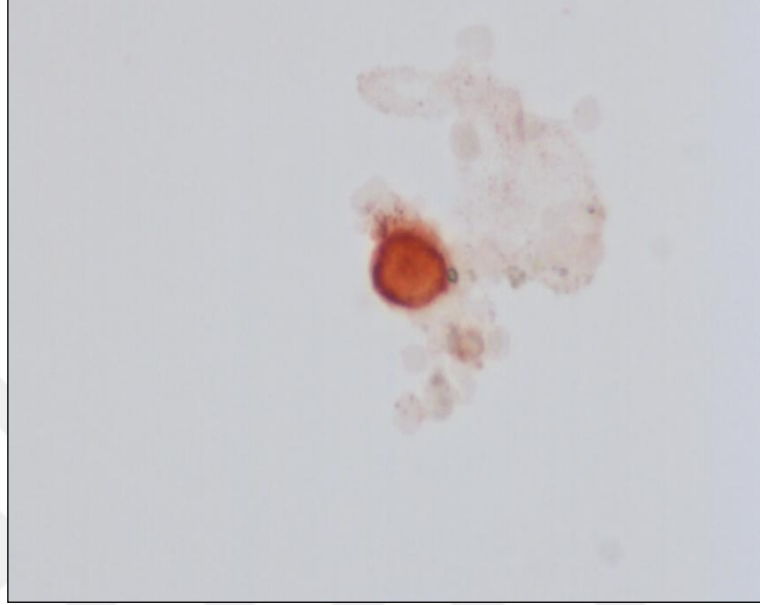


**Şekil 4-15:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait bol mukuslu ve epitel hücreleri bakımından oldukça zengin olan bir alanda *PTEN*(+) lenfositler görülmektedir (→). Zıt boyama: Hematoksilen (x10)

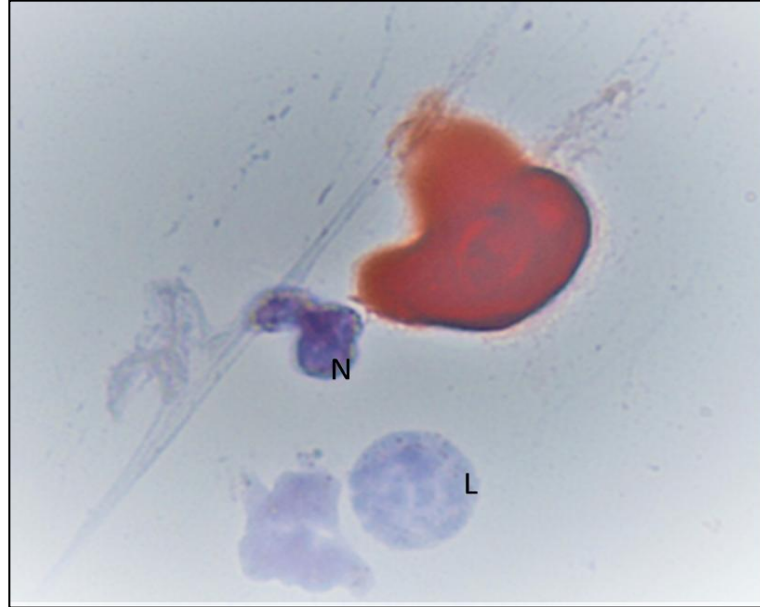


**Şekil 4-16:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait *PTEN* (+) bir goblet hücresi görülmekte. Zıt boyama: Hematoksilen (x100)

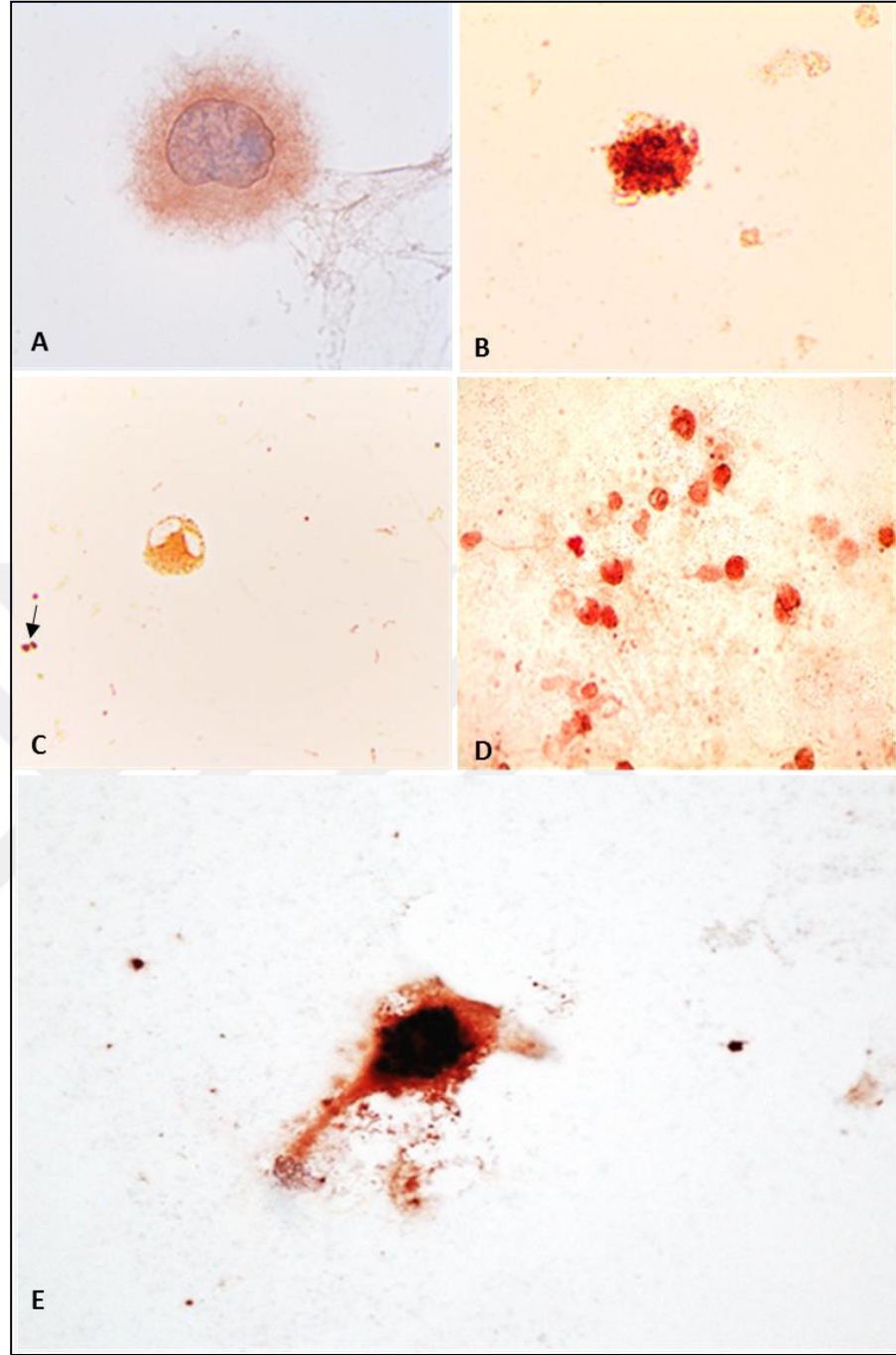
Goblet hücreleri epitel hücreleri arasında yer alan kadeh benzeri morfolojileri olan ve musin salgısı salgılayan hücrelerdir. Musinin dehidrasyonu ile mukus sıvısı oluşur. Mukus kayganlığı ile dokuların kimyasal ya da fiziksel olarak zarar görmelerini engeller.



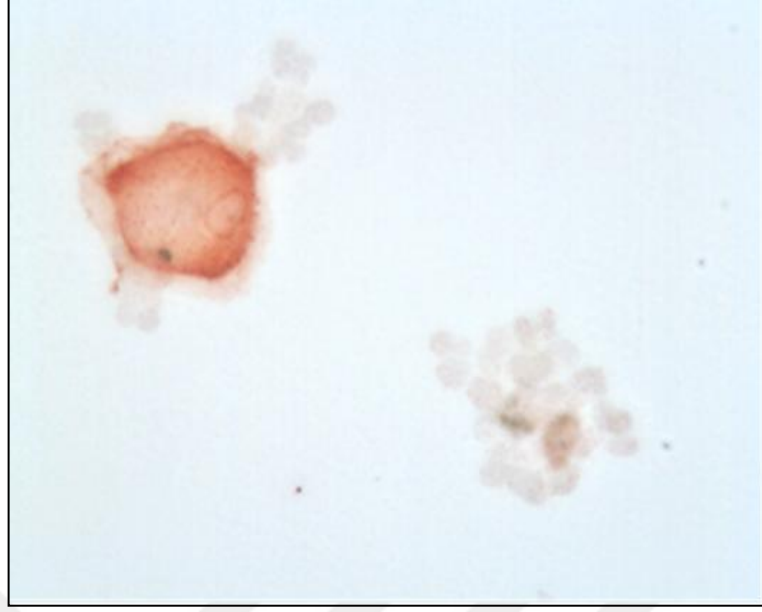
**Şekil 4-17:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait hücre sınırları ve nükleusu oldukça belirgin olan *PTEN* (+) bir lenfosit hücresi görülmekte.



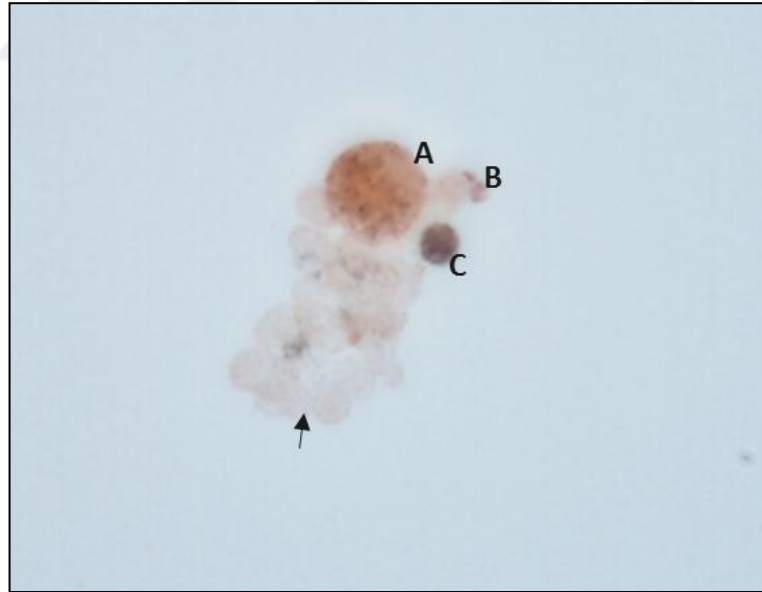
**Şekil 4-18:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı bir olguya ait epidermoidal kökenli *PTEN* (+) tümör hücresi görülmekte. Solunda nötrofil (N) ve onun hemen altında sınırları tam bir yuvarlak *PTEN*(-) lenfosit hücresi (L) görülmekte. Zıt boyama: Hematoksilen (x100).



**Şekil 4-19:** Skuamöz hücreli akciğer kanseri tanılı dört farklı olguya ait *PTEN* (+) makrofaj hücreleri. **A)** Hücre sınırları oldukça belirgin olan aktif *PTEN*(+)bir makrofaj hücresi (X100). **B)** İçi granül dolu yıpranmış ve yaşlanmış bir *PTEN*(+) makrofaj hücresi (X40). **C)** Vokuolleşemiş juvenil bir makrofaj hücresi. Hemen etrafında görülen yoğun *PTEN*(+) boyanmış lenfosit hücreleri (→)(X40). **D)** İçi granüllerle dolu *PTEN*(+) makrofaj hücreleri (X40). **E)** Siliyalı yüzey epitelinin köken alan hasarlanmış yoğun *PTEN*(+) makrofaj hücresi. Zıt boyama: Hematoksilen (x100)



**Şekil 4-20:** Adenokarsinom tanılı bir olguya ait bronşiyal lavaj sıvısında gözlenen *PTEN* (+) bir makrofaj hücresi. Hemen sağ altında bronş epitelleri görülmektedir. Zıt boyama: Hematoksilen (x100)

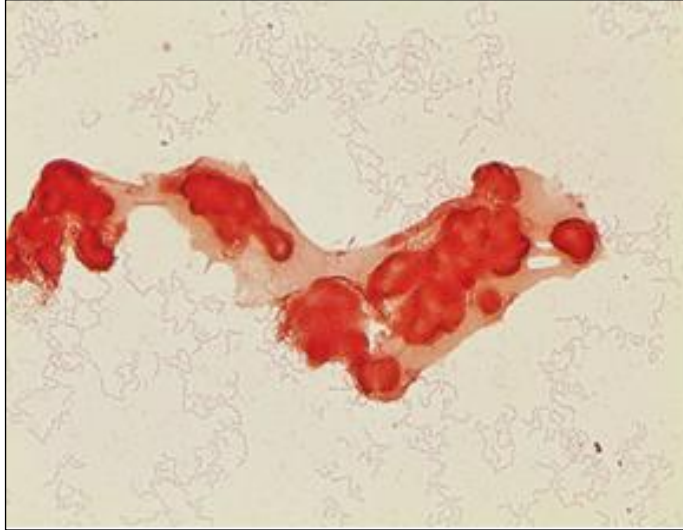


**Şekil 4-21:** Adenokarsinom tanılı bir olguya ait dört farklı hücre tipi bir arada. **A)** *PTEN* (+) olan üstte yuvarlak ve içi granüllü olarak görülen makrofaj hücresi, **B)** İçi parçalı granüllü olarak görülen nötrofil, **C)** Lenfosit hücresi ve en altta bronş epitel hücreleri (→) görülmektedir. Zıt boyama: Hematoksilen (x100).



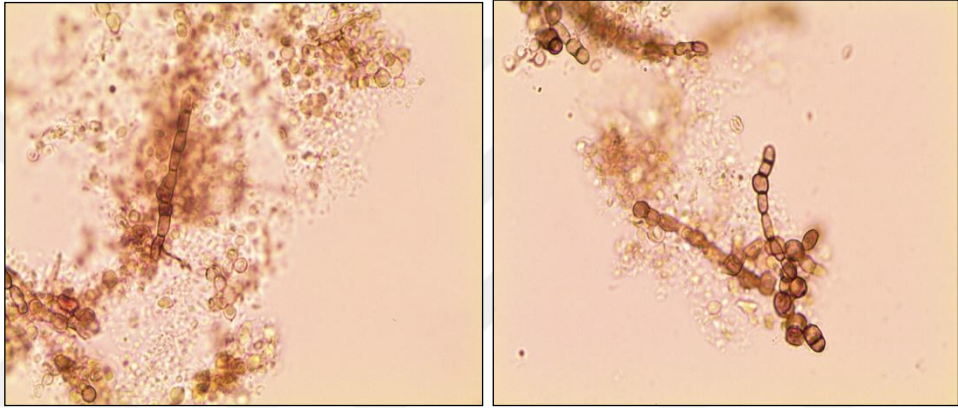
#### 4.7.1. İmmünohistokimyasal Analizlerde Karşılaştığımız Diğer Bulgular

İmmün boyamalarımız tamamlandıktan sonra hazırladığımız preparatları mikroskop altında incelerken, bronşiyal lavaj sıvısında pek de sık karşılaşmayacağımız bazı bulgulara rastladık. Bunların ilki metaplazik hücre kümeleri idi. Metaplazik hücre en basit tanımıyla, özelleşmiş bir hücre grubunun yerini bir başka özelleşmiş hücre grubuna bırakmasıdır. Bu çoğunlukla geri dönüşümlüdür. Bu dönüşüm daha çok anormal bir uyarı sonucu olur. Değişen şartlara uygunluk sağlayamayan hassas bir dokunun, daha güçlü ve dayanıklı bir yapıya dönüşmesi olarak da bilinebilir. Burada özellikle, mekanik ya da kimyasal tahriş olarak veya enfeksiyona karşı olan, savunma durumuna geçme halinin söz konusu olduğu uyum söz konusudur. En fazla metaplazi, üst solunum borularındaki silli prizmatik epitel hücrelerinin sigaranın kullanımı etkisi ile çok katlı yassı epitel hücrelerine dönüşmüş olmasıdır. Şekil 4-22’te epitel hücreden köken alan ancak metaplazik hücre grubuna dönüşen kümelenmiş hücre grupları görülmektedir. Metaplazik hücreler kanser değildir. Ancak kanserin oluşması için çok uygun bir ortam oluşturması nedeniyle oldukça önemlidir.



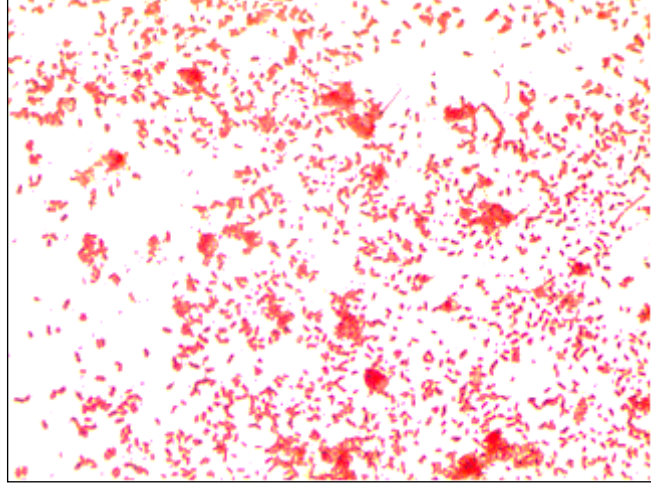
**Şekil 4-22:** Doku düzeyinde *PTEN* (+) boyanan kümeleşmiş metaplazik hücre tabakası görülmekte (x100).

Adenokarsinomlar KHDAK grubunun en agresif seyreden alt tipidir. Bu hastaların immün sistemi oldukça zayıflamış olduğundan diğer organizmalar tarafından daha çabuk ve daha kolay enfekte edilebilirler. Bu tip vakalarda akciğer bronşiyal lavajında mantarların görülmesi az da olsa olasıdır. Şekil 4-23’de olduğu gibi *Candida albicans* tipi mantara rastlanabilir. Bulaşıcı olduğundan, araştırmacı ya da sitolog tarafından gözlenen bu tip olgularda önce hekim bilgilendirilmeli, materyal patolojiye gönderilmeden de patalog bu konuda uyarılmalı ve ona göre bulaşmaya karşı korunma amaçlı önlem alınmalıdır.



**Şekil 4-23:** Adenokarsinom tanılı bir akciğer kanseri olgusuna ait bronşiyal lavaj örneğinde az rastlanan bir *Candida albicans* (Saprofit oportunist) türü mantar. Boncuk şeklinde sporlardan oluşan gövdesi ve hemen etrafında yumurtaları görülmekte (x40).

Her soluk alındığında akciğerlere 700-800 antijen de birlikte alınmaktadır. Bu antijenlere karşı hücrelerin savunma sistemi olan makrofajlarla mücadele edilir. Bazı akciğer enfeksiyonlarında savunma sistemi zayıfladığından zararlı mikroorganizmalara karşı mücadele de zayıflar. Bu durumda Şekil 4-24’teki gibi bazı bakteriler de akciğerlerde çoğalıp barınabilme şansı bulabilmektedir.



**Şekil 4-24:** Kontrol grubuna ait bir olgudan alınan bronşiyal lavaj materyalinde diplokok bakteriler kümeleri (x20)

## 5. TARTIŞMA

Dünya genelinde kansere bağlı gelişen ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olan akciğer kanserinde, beş yıllık sağ kalım oranı sadece % 15 civarındadır (Jacques Ferlay et al., 2015). Tek başına her yıl meme, pankreas, kolon ve prostat kanserlerinden daha fazla ölümden sorumlu tutulan akciğer kanseri, hem erkeklerde hem de kadınlarda görülen ikinci en yaygın kanserdir (Larsen & Minna, 2011). Bu nedenlerle, akciğer kanserinin klinik tedavisindeki ilerlemenin, özellikle hücre düzeyinde, yani moleküler temel ve tümör biyolojisi anlayışımızdaki ilerlemeler ile sağlanabileceği açıktır. En yaygın akciğer kanseri türü, küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK) ve adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç büyük histolojik alt tip içerir. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hastalarının çoğu genellikle çeşitli tedavilerin yeterli düzeyde olamayacağı ileri bir aşamada tanı almaktadır. Bu nedenle erken tanı tedavi şansını arttırmaktadır. Evre IV hastalarında uygulanan kürler ile sağ kalım yine de oldukça düşük düzeydedir. Ayrıca KHDAK genetik açıdan oldukça heterojen bir hastalık olduğundan her hastada uygulanan tedaviye aynı düzeyde cevap alınmadığı bildirilmiştir (Knight et al., 2017).

Ramalingam ve arkadaşlarının yayınladığı 31.266 olguyu kapsayan retrospektif bir çalışmaya göre, akciğer kanserinin genç hastalarda agresif bir hastalık olmadığını ve akciğer kanseri olan tüm hastaların aynı tedavi kılavuzları kullanılarak yönetilmesi gerektiğini bildirmelerine rağmen (Ramalingam et al., 1998), Özen ve arkadaşlarının yayınladıkları akciğer kanseri tanılı 35 yaş altı 17 hastada yaptıkları çalışmada ise, hastalığın etiolojisinin yaşlı hastalarda gözlenen akciğer kanserinden farklı olduğunu ve bu yaş grubu hastaların ayrı değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Özen et al., 2012).

Son yıllarda yapılan sayısız çalışmada, KHDAK'de meydana gelen çok sayıda somatik mutasyonun belirlenmesini sağlamıştır. Diğer kanser türlerinde de olduğu gibi, bu çalışmaların da temel amacı, ilerletici mutasyonlarının, yani tümöral süreci ilerletebilen onkojenik mutasyonların tanımlanmasıdır: bu mutasyonlar,

protein kinazlar gibi sinyal proteinlerini kodlayan genler düzeyinde gözlemlenmiştir. KHDAK ile ilişkili olduğu bilinen, fonksiyonel potansiyeli olan genler daha sık mutasyona uğramıştır. Bu genler: *EGFR* (% 10-30), *FGFR1* (% 20), *KRAS* (% 15-30), *PTEN* (8%), *PIK3CA* (% 2-5), *ERBB2* (*HER2*) (% 2-5), *BRAF* (% 1-3), *ALK* (% 3), *ROS1* (% 1), *MAP2K1/MEK1* (% 1), *RET* (% 1), *NRAS* (% 1) ve *AKT1* (<% 1)dir (Levy et al., 2012). Kopya sayısı değişikliklerine bakıldığında ise *PTEN* burada % 31 olarak karşımıza çıkmaktadır (Kim et al., 2014).

*PTEN*, kromozom 10 üzerinde bulunan bir tümör baskılayıcı gendir. Hücre çoğalması yolunda iki negatif düzenleyici vardır bunlar: *PTEN* ve *AKT*'nin yukarı ve aşağı yönde hareket eden TSC1 / TSC2 kompleksidir. *AKT*'nin aşağı yönde efektörü olan serin/treonin kinaz mTOR, tümör hücrelerinde hücre büyümesi, motilitesi ve sağkalımının düzenlenmesinde önemli bir hücre içi sinyalleşme enzimidir. Bu nedenle günümüzde hem KHDAK hem de KHAK hastalarında PI3K/AKT/mTOR yolağını hedef alan tedaviler, ön plana çıkmıştır (Larsen & Minna, 2011).

*PTEN* ekspresyonunun kaybı, dil kanseri, özofagus kanseri ve oral skuamöz hücreli kanserler daha ileri diferansiye hastalık [36] ile daha kısa sağ kalım sürelerine bağlanmıştır (Tachibana et al., 2002). Genetik değişiklik ve *PTEN* ekspresyonu arasındaki korelasyon, incelenen tümörün türüne bağlı olarak değişmesine ve tutarsız olmasına rağmen, bu ekspresyon kaybı, bazı çalışmalarda allel kaybına ve promotor hipermetilasyonuna yorumlanmıştır (Baeza et al., 2003).

KHDAK'de homozigot delesyon ve *PTEN* mutasyonu nadiren meydana gelir, ancak LOH'un tümörlerde % 50'den fazla olduğu bildirilmiştir. Akciğer tümörögenezinde PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivasyonu, genellikle *PI3K* veya *PTEN*'de olduğu kadar *EGFR* veya *KRAS*'daki mutasyonlar, *PIK3CA*'nın amplifikasyonu, *PTEN* kaybı veya *AKT*'nin aktivasyonu yoluyla patogeneze erken oluşur ve apoptozun inhibisyonuna neden olduğundan patolojik hücre sağ kalımı ile sonuçlanır (Sansal & Sellers, 2004).

Genom dizilemesi kullanılarak yapılan çalışmada akciğer kanserinde DNA kopya sayısındaki ve karmaşık genomik yeniden düzenlemelerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Giangreco, Groot, & Janes, 2007). KHDAK'nin hem adenokarsinomlarında hem de skuamöz hücreli karsinomlarında, *TP53*, *FGFR1*,

*FGFR2*, *FGFR3*, *DDR2* genlerinin ve *PI3K* yolundaki genlerin tekrarlayan mutasyonları, *PTEN* ve *CDKN2A*'nın kantitatif gen anomalilerinin tespit edildiği bildirilmiştir (Testa et al., 2018). Akciğer kanserinin moleküler karakterindeki gelişmeler, yeni tedavi seçenekleri ve ilaç direncinin mekanizmalarını anlamak için güçlü bir gerekçe sağlamıştır. Bu nedenle biz de çalışmamızda KHDAK hastalarında *PTEN* genini hem iFISH hem de İSK boyama yöntemleri ile araştırdık.

*PTEN* geninin somatik hücrelerdeki değişiklikleri, bazı hücre dizilerinde ve beyin tümörleri, melanom, tiroid tümörleri, endometriyal karsinomlar ve prostat karsinomları dâhil olmak üzere primer tümörlerde yaygındır. Ancak meme kanseri, böbrek karsinomları ve baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarında bu tür değişikliklerin daha nadir olarak görüldüğü bildirilmiştir (Tachibana et al., 2002).

*PTEN*'in hücre bölünmesi sinyal yollarındaki görevine bakacak olursak apoptozda önemli bir rolü olan Kaspaz 9'la dolaylı olarak ilişkili olduğunu görürüz. Kaspas-9, PI-3K/Akt yolundan etkilenir. *PTEN*, PI-3K'nın daha düşük bir konsantrasyonuna yol açan PI-3K'yi defosforile eder. Fosforile olan (aktif) Akt konsantrasyonu azalır ve sonuç olarak Akt'in down stream hedefleri azalır (Araki, 2004). KHDAK'nde hücre döngüsünün anahtar proteinlerinden biri olan *P53* inaktivasyonu ve *PTEN* kaybı, apoptoza karşı koruma sağlayabileceği belirtilmektedir (Georgescu, 2010)

Mutasyonlarla fonksiyon kaybı, ekspresyon kaybına kıyasla, KHDAK'de çok düşük seviyededir. Genetik ve epigenetik değişimler (örn. Metilasyon) *PTEN*'in inaktivasyonunda da rol oynar ve *PTEN* ekspresyon kaybı prostat ve servikal kanserlerde sık görülür. *PTEN*, AKT ve PI3K (fosfatidilinositol-3 kinaz) yollarını akış yönünde düzenler. *PTEN*-null tümörler bu nedenle daha yüksek proliferatif aktiviteye, büyümeye ve sağ kalıma sahiptir. *PTEN* inaktivasyonu, AKT ve diğer alt moleküllerin aktifleşmesi ile sonuçlanır, bu nedenle tirozin kinaz inhibitör cevabının biyo-belirteçleri olarak kullanılabilir (Tang et al., 2006).

Skuamöz tipi karsinomlu olgularda *PTEN*'in ileri evre tümörlerde, daha az oranda ifade edildiği belirtilmektedir. Yanagawa ve arkadaşları skuamöz tipi akciğer kanseri hücrelerinde, *PTEN* ekspresyon kaybının anlamlı olarak daha sık görüldüğünü ancak yalnızca adenokarsinomlarda *PTEN* ifadesinin hastalısız sağ

kalım üzerinde önemli bir etki yarattığını bildirmişlerdir (Yanagawa et al., 2012). Bu histolojik ilişkinin, daha önce KHDAK'da bildirilen *PTEN* sonuçlarındaki farklılıkları açıklayabileceğini ve adenokarsinomlarda, *PTEN* kaybıyla ilişkili olan, ancak skuamöz hücreli karsinomda gözlenmeyen prognostik farklılıkların nedenlerini açıklamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu ileri sürmüşlerdir (Yanagawa et al., 2012).

Çalışmamızda; KHDAK tanılı olgulardan elde edilen bronşiyal lavaj sıvısı örneklerinde, *PTEN* genindeki olası delesyon ve amplifikasyonları interfaz fluoresan in situ hibridizasyon (iFISH) metodu kullanılarak araştırdık ve *PTEN* ekspresyon seviyelerini de immünohistokimya (İHK) yöntemi ile mikroskop altında analiz ettik. Daha önceki yapılan çalışmalarda (Lim et al., 2007; Lotan et al., 2011; Mina et al., 2012) akciğer kanseri teşhisi konulmuş hastanın, akciğer dokusundan biyopsi yöntemi ile doğrudan elde edilen hücrelere ya da ticari olarak satın alınan hücre hatlarındaki hücrelere FISH yöntemi kullanarak bazı genlerin delesyon ve amplifikasyonlarına bakılmış olduğunu, fakat literatürde her olguya ait sonuçların birbirinden farklı olarak değerlendirildiğini gözlemledik.

Çalışmamızda KHDAK tanısı alan olguları ve bronkoskopik endikasyonu bulunan ancak malignitesi olmayan kontrol grubu olgularını kullandık. Uzman hekim tarafından bronkoskopi yöntemi ile alınan bronşiyal lavaj sıvısından elde edilen hücrelerde iFISH metodu kullanarak *PTEN* geninin olası delesyon ve amplifikasyonlarını araştırdık. Hastalara ait preparatlar örnek başına minimum 200 hücrede *PTEN* genine özgü sinyalleri skorlayarak değerlendirdik.

Çalışmamızda *PTEN* probu kullanarak uyguladığımız iFISH analizindeki hücrelerin sinyal özelliklerine göre, KHDAK hastalarında normal sinyal alınan hücre sayısına kıyasla; biallelik delesyonlu, monoallelik delesyonlu, monozomik hücre ve atipik sinyal içeren hücre sayılarının anlamlı düzeyde azalmış olduğunu ilk kez bronşiyal lavaj örneklerinde saptamış olduk. Çalışmamızda hasta grubu ile karşılaştırma için kullandığımız kontrol grubuna ait hücrelerin iFISH analiz sonuçlarındaki sinyal özelliklerine göre monoallelik delesyonlu, monozomik hücre ve atipik sinyal içeren hücre sayılarının normal sinyal alınan hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğunu saptadık.

Kanser hücrelerinde genomik dengesizlikler, kromozomal anomaliler ve mutasyon oranları normal hücrelere göre oldukça yüksektir. KHDAK'nde de hem yapısal hem de sayısal pek çok kromozomal anomalinin bulunduğu daha önce bildirilmiştir (Tahara et al., 2010). Bizim bulgularımızda ayrıca bu açıdan göze çarpan iki olgu vardır. Hasta grubumuzda yer alan 23 ve 25 nolu olgularda gözlenen atipik sinyal oranı, grubun diğer olgularına kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur. 23 nolu olguda yüksek oranda gözlenen 1Y2K (Y; 10.kromozomun sentromer bölgesi, K; *PTEN* gen bölgesi) sinyalin varlığı, 10. kromozomun allelerden birinin sentromer bölgesinin kaybolduğu, ancak *PTEN* gen bölgesinin korunduğu bir yeniden düzenlenme olduğunu düşündürmektedir. 25 nolu olguda ise yüksek oranda gözlemlediğimiz 3Y2K atipik sinyallerin kromozom kopya sayısındaki artışla birlikte, *PTEN* gen bölgesinde de bir delesyon olduğuna işaret etmektedir.

KHDAK hastaları ve kontrol grubuna ait verilerin birbirleri ile kıyaslamaları sonucunda, çalışılan tüm örneklerden elde edilen toplam hücre sayısının, kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma olduğunu saptadık. Fakat normal sinyal sayısında gözlenen bu azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kontrol grubunda KHDAK grubuna kıyasla monoallelilik delesyonlu, monozomik hücre ve atipik sinyal görülme oranının da anlamlı düzeylerde azalmış olduğunu saptadık.

iFISH bulgularımıza göre çalışmamıza dâhil ettiğimiz hasta grubunda, normal sinyal (2Y/2K) içeren hücre sayısını % 83 oranında gözlerken, *PTEN* gen kaybını (biallelik delesyonlu hücre % 0.16, monoallelilik delesyonlu hücre % 2.82 ve monozomik hücre % 3.76 oranında) toplamda % 6.74 olarak saptadık. Yine hasta grubumuzda toplam atipik sinyal oranını ise % 10.25 olarak hesapladık. Kontrol grubunda normal sinyal içeren hücrelerin oranını % 94.2 olarak saptadık ve bu grupta biallelik delesyona rastlamadık. Monoallelilik delesyonlu hücre sayısına % 1.5, monozomik hücre sayısına % 1.8 ve atipik sinyal içeren hücre sayısına da % 2.5 oranında rastladık. Hasta grubunda normal sinyal içeren hücre sayısının kontrol grubuna göre % 11.2 azalmış olduğunu tespit ettik.

Yoshimoto ve arkadaşları *PTEN* seviyelerini, sitoplazmik ve/veya nükleer boyanma yoğunluğunun ve yüzdesinin bir ürünü olarak rapor etmiş ve her bir vaka için veri sağlamadıkları halde, *PTEN* protein seviyeleri ile sürekli değişken ve *PTEN*



genomik durumu arasında genel bir korelasyon bulmuşlardır (Yanagawa et al., 2012).

Lotan ve arkadaşları prostat kanseri olgularında immünohistokimyasal olarak *PTEN* boyanmasının, *PTEN* genomik kaybının saptanması için oldukça hassas olduğunu ve FISH yönteminin *PTEN* kaybı olan vakaların yaklaşık % 80'ini ve yüksek çözünürlüklü SNP dizisi kaybı olan vakaların da % 80'inden fazlasını saptadıklarını bildirmişlerdir (Lotan et al., 2011). Aynı araştırmacılar, prostat kanseri olgularında *PTEN* protein kaybının tümör derecesi ve patolojik evre ile ileri derecede korelasyon göstermesine rağmen, iğne biyopsilerinde patolojik tümör evresinin bilinmediğini ve tümör derecesinin rutin olarak az tahmin edildiğini de (vakaların yaklaşık % 20'sinde) öne sürmüşlerdir. Bu şekilde, bir prognostik biyobelirteç olarak, *PTEN* kaybı, hastalığın ilerlemesine eğilimli ve dolayısıyla tedavi gerektiren düşük riskli prostat kanseri hastalarının belirlenmesi için yararlı olabileceği bildirilmiştir (Lotan et al., 2011).

Lim ve arkadaşları KHDAK'li dokulara ait hücrelerden immünohistokimya yöntemi kullanarak yarı kantitatif skorlama ile elde ettikleri bulgulara göre *PTEN* veya pAKT ekspresyonu ile Evre-I KHDAK hastalık için klinik sonuç açısından fark olmadığını, ancak Evre-IV hastalarının daha büyük bir kısmında *PTEN*-delesyonuna rastladıklarını bildirmişler ve analiz sonuçlarına göre ileri evredeki tümörlerde *PTEN* kaybının önemli rolünün olduğunu göstermişlerdir (Lim et al., 2007). Bu araştırmacıların verilerine göre, *PTEN* kaybı veya pAKT'nin aşırı ekspresyonu, kötü prognoza sahip akciğer tümörlerinin agresif bir alt kümesini işaret etmektedir. *PTEN* fonksiyonunu ya da aktive edilmiş AKT, mTOR ve diğer alt sinyal transdüksiyon moleküllerini hedefleyen yeni tedaviler ile hedeflenebilen kötü prognoz belirlenmesini mümkün kılacağını öne sürmüşlerdir (Lim et al., 2007).

Mina ve arkadaşları, 230 primer mide kanseri olgusunu, *PTEN* delesyonu için FISH ile doku mikrodizi formatında analiz etmişler, genomik *PTEN* delesyonunun gastrik adenokarsinomda nadir bir olay olduğunu ancak metastatik hastalık ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Mina et al., 2012)

Olaussen ve arkadaşları KHDAK'nde *PTEN* ifadesinin kaybının, bir prognostik işaretleyici olduğu yargısını desteklemişlerdir. Çalışmalarında akciğer

dokularında immünohistokimyasal analiz kullanarak, klinik takip verileri bulunan ve Evre-I KHDAK'lı 53 hastanın örneklerinde *PTEN* ekspresyonunu retrospektif olarak analiz etmişler, 53 örnekten 7'sinde *PTEN* negatif (-) boyama olduğunu göstermişlerdir. *PTEN* ekspresyonu ve klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamışlardır. Erken evre KHDAK hastalarında *PTEN* geninin genetik değişikliklerinin, özellikle *PTEN* proteini kaybının hiç de nadir olmadığını gözlemlemişlerdir (% 13.2). Burada, *PTEN* protein ekspresyonunun seviyesinin erken evre KHDAK'de bağımsız bir prognostik belirteç olmadığını da bildirilmiştir (Olaussen et al., 2003).

Li ve arkadaşları immünofluoresan analizi kullanarak, *PTEN*'in esas olarak sitoplazmada lokalize olduğunu ortaya koymuşlardır (D.-M. Li & Sun, 1997). Bununla birlikte, çeşitli hücre tipleri için (örneğin, foliküler tiroid hücreleri, keratinositler ve nöronlarda) nükleer ve/veya nükleer membranla ilişkili ekspresyon da bildirilmiştir (Gimm et al., 2000; Lachyankar et al., 2000). Tachibana ve arkadaşları, özafagus tümörlerinin çoğunda sitoplazmik *PTEN* ekspresyonu olduğunu gözlemlemişler, bununla birlikte, sitoplazmik boyanmanın kapsamı ve yoğunluğunun heterojen olduğunu göstermişlerdir (Tachibana et al., 2002). Bizim çalışmamızın sonuçlarında da hem nükleer hem de sitoplazmik *PTEN* boyanmanın her hastada farklı özellikte olduğunu gözlemledik. Bu bakımdan immünohistokimyasal analiz sonuçlarımız bu çalışma ile uyumludur. Bazı araştırmacılar (Ding et al., 2000; Song et al., 2012) *PTEN* proteininin ağırlıklı olarak sitoplazmada lokalize olduğunu ve genellikle güçlü bir şekilde boyanmış olduğunu bildirmişlerdir. Bu farklılık için olası açıklamalar şu şekilde olabilir: İlk olarak, bizim çalışmada kullandığımız *PTEN*'in primer antikoru, diğer araştırmacıların kullandıkları antikordan farklı olabilir. İkinci olarak, incelenen hastalar arasında aile öyküsü, tümör gelişim nedenleri, prognoz ve genetik yapı farklı olabilir. Benzer şekilde, Knobbe ve arkadaşları KHDAK dokusunda olmasada normal nöronlar ve endotelial hücreler de dâhil olmak üzere bir dizi glioblastoma multiform hücrelerinde nükleer veya perinükleer *PTEN* boyanmasının gözlemlendiğini bildirmişler, ancak nükleer *PTEN* ekspresyonunun insidansı hakkında sonuç bildirmemişlerdir (Knobbe et al., 2002).

Li XB. ve arkadaşları primer KHDAK hastalarının *PTEN* ekspresyonu seviyelerini ve bunların prognostik etkilerini araştırmışlar, immunohistokimyasal olarak yüksek düzeyde saptanan *PTEN* protein ekspresyonunun, KHDAK hastalarında daha iyi prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (X. Li et al., 2015). Bu çalışmada yüksek *PTEN* ekspresyonu ile ilişkili uzun sağ kalım KHDAK'ın sadece adenokarsinom histolojik alt tipinde gözlemlenmişler ve bulgularını Yanagawa'nın (Yanagawa et al., 2012) bu yöndeki çalışmasıyla uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı şekilde Coate ve arkadaşları Skuamöz hücreli akciğer kanserinde *PTEN* protein ekspresyon kaybının daha sık görülmesine rağmen, yüksek *PTEN* ekspresyonu ile ilişkili daha uzun sağ kalımın, sadece adenokarsinom hastalarında görüldüğünü ve gözlenen bu farklılıkların nedenleri için daha fazla araştırma yapılması gerektirdiğini bildirmişlerdir (Coate, John, Tsao, & Shepherd, 2009). Biz de çalışmamızda KHDAK hastalarının bronşiyal lavaj sıvılarında immunositokimya yöntemi ile *PTEN* ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlemledik. Ancak ne yazık ki nükleer ve sitoplazmik *PTEN* ekspresyonunun hastalık prognozu ile nasıl bir korelasyon gösterdiği ve hastanın hayatta kalmasını nasıl etkilediği halen tam olarak bilinmemektedir. Nükleer *PTEN* ifadesi, bizim çalışmamızda ilginç sonuçlarla yeni bir gözlemi temsil etse de, bu sonuçların doğrulanabilmesi için daha kesin, daha geniş kapsamlı ve olgu sayısının artırıldığı çalışmalara ihtiyaç olduğu kuşkusuzdur.

*PTEN* tümör baskılayıcı genine ait çalışmalar son on yılda hız kazanmış ve pek çok kanserin ilerleyiş sürecinde önemli bir rolünün olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda daha önce literatürde rastlamadığımız KHDAK hastalarının bronşiyal lavaj örneklerinde *PTEN* genini ve ekspresyon seviyelerini interfaz Fluoresan In Situ Hibridizasyon metodu (iFISH) ve immünohistokimya yöntemi (İSK) kullanarak gösterdik. Çalışmamızın bulgularına göre iFISH metodu ile KHDAK hastalarında *PTEN* gen kaybının kontrol grubuna kıyasla artmış olduğunu (Monoallelik delesyonlu hücre (p=0.0075) ve monozomik hücre (p=0.0101) içeren hücre sayılarının KHDAK grubuna kıyasla) saptadık. Buna karşı immünohistokimya yönteminde ise her hasta da farklı yoğunluklarda sitoplazmik ve nükleer *PTEN* ekspresyonu olduğunu gözlemledik.

İmmünohistokimya, cerrahi ve tedavi kararlarına, düşük maliyetle fayda sağlayabileceğinden, kanser vakalarının % 95'inde tamamlayıcı bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, Matos ve arkadaşları, klinisyenlerin, KHDAK hastalarını tedavi etmek için immünohistokimya ile saptanan *PTEN* ekspresyonunu bir prognostik faktör olarak kullanmasını önermişlerdir (De Matos, Trufelli, De Matos, & da Silva Pinhal, 2010).

Bulgularımız varlığında; bronşiyal lavaj örneklerinden *PTEN* genindeki genetik değişiklikleri analiz etmede immünohistokimya yönteminin yanında, daha hassas sonuçlar sağlayan FISH tekniğinin de hastalık tanısında uygun bir yöntem olarak kullanılabilirliğini gösterdik. Akciğer dokusundan bronşiyal lavaj sıvısına geçen hücrelerin moleküler sitogenetik yöntemlerle araştırılması, hastalığın tanısından tedavisine doğru olan süreçte klinisyenleri hastalığın tedavisini yönlendirmesi bakımından fayda sağlayacağını düşünmekteyiz. Ayrıca immünohistokimyasal boyama yönteminin rutinde hem daha hızlı, daha kolay hem de daha ekonomik olması açısından bir tanı aracı olarak kullanılabilirliğini gösterdik.

**Sonuç olarak;** KHDAK hastalarında *PTEN* gen kaybının araştırılmasında immünohistokimya yöntemine ilave olarak FISH yönteminin de kullanımının faydalı olacağını düşünmekteyiz. Akciğer kanseri tanısında, daha çok biyopsi materyalinden elde edilen doku örneklerine uygulanan immün boyama yönteminin, bronşiyal lavaj örneklerinde de uygulanabilirliği ve bu konuda daha fazla vakada yapılacak olan çalışmalarla klinikte rutin bir tanı aracı olabileceği netleşecektir. Tüm bu gözlemlerimiz ışığında bronşiyal lavaj örnekleri kullanılarak hastalık tanısı koymada daha kesin sonuçlar alınabilecek ileri moleküler teknikler uygulanarak çalışmaların yapılabilirliğini düşünmekteyiz. Kuşkusuz ki daha geniş kapsamlı ve daha çok parametre kullanılarak planlanacak olan çalışmalar, akciğere ait hücrelerin tümörögenез yolunda farklılaşmasının moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abdulkareem, I. H., & Blair, M. (2013). Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association*, 54(2), 79.
- Abraham, J., Allegra, C., & Gulley, J. (2009). Klinik Onkoloji El Kitabı, Cem Parlak ve Alpaslan Mayadağı. *Nobel Tıp Kitabevi*.
- Adnan Aydiner, E. T. (2006). *Akciğer Kanseri Tanı - Tedavi - Takip*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul Nobel Matbaacılık.
- Akkoçlu, A., Savaş, İ., Göksel, T., Yılmaz, U., Akay, H., & Öztürk, C. (2006). Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Rehberi. Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. *Toraks Dergisi*, 7, 1-36.
- Akopyan, G., & Bonavida, B. (2006). Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. *International journal of oncology*, 29(4), 745-752.
- Araki, K. M. Y. a. M. (2004). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 114, 2375-2382.
- Arifin, M., Tanimoto, K., Putra, A. C., Hiyama, E., Nishiyama, M., & Hiyama, K. (2010). Carcinogenesis and cellular immortalization without persistent inactivation of p16/Rb pathway in lung cancer. *International journal of oncology*, 36(5), 1217-1227.
- Arroliga, A., & Matthay, R. (1993). The role of bronchoscopy in lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 14(1), 87-98.
- Avcı, A. G., Suat. (2017). Akciğer Kanserinde Semptom ve Bulgular. *Türkiye Klinikleri Journal of Thoracic Surgery Special Topics*, 8(1), 44-47.
- Baeza, N., Weller, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2003). PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta neuropathologica*, 106(5), 479-485.
- Berkmen, Y. (1997). Tek akciğer nodülünün radyolojik ve klinik değerlendirilmesi. *Türk Radyoloji Derneği*, 32(2), 249-257.
- Boffetta, P., & Hashibe, M. (2006). Alcohol and cancer. *The lancet oncology*, 7(2), 149-156.

- Brahmer, J., Reckamp, K. L., Baas, P., Crinò, L., Eberhardt, W. E., Poddubskaya, E., Holgado, E. (2015). Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(2), 123-135.
- Breuer, R., Postmus, P., & Smit, E. (2005). Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration*, 72(3), 313-330.
- Bui, K., Cooper, W., Kao, S., & Boyer, M. (2018). Targeted Molecular Treatments in Non-Small Cell Lung Cancer: A Clinical Guide for Oncologists. *Journal of clinical medicine*, 7(8), 192.
- Cannon-Albright, L. A., Thomas, A., Goldgar, D. E., Gholami, K., Rowe, K., Jacobsen, M., Skolnick, M. H. (1994). Familiality of cancer in Utah. *Cancer research*, 54(9), 2378-2385.
- Cantley, L. C., & Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4240-4245.
- Chang, F., Lee, J., Navolanic, P., Steelman, L., Shelton, J., Blalock, W., McCubrey, J. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 17(3), 590.
- Chen, H.-Y., Yu, S.-L., Chen, C.-H., Chang, G.-C., Chen, C.-Y., Yuan, A., Kao, S.-F. (2007). A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(1), 11-20.
- Coate, L. E., John, T., Tsao, M.-S., & Shepherd, F. A. (2009). Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *The lancet oncology*, 10(10), 1001-1010.
- Cristofano, A. D., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature genetics*, 19(4), 348.
- Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 605-644.

- De Matos, L. L., Trufelli, D. C., De Matos, M. G. L., & da Silva Pinhal, M. A. (2010). Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker insights*, 5, BMI. S2185.
- Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (2001). Pten and p27 KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nature genetics*, 27(2), 222.
- Ding, Y., Shimada, Y., Kano, M., Itami, A., Kawabe, A., Maeda, M., Kaganoi, J. (2000). PTEN/MMAC1 expression in esophageal squamous cell carcinomas. *International journal of oncology*, 17(4), 695-704.
- Ebru, S. D., Ebru Nergiz, Sema Ertugrul, Muiyesser Salturk, Cunevt Karabay, Esra Ogutcu Yilmaz, Adnan. (2007). Primer akciğer kanserinde tümör tipi ve cinsiyet dağılımı değişiyor mu? 2004 yılı sonuçlarının daha önceki yıllar ile karşılaştırılması. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 55(1), 148.
- Elci, O. C., & Akpınar-Elci, M. (2007). The trend of small cell lung cancer among young men. *Lung Cancer*, 57(1), 34-36.
- Erturan, S. (2010). Mesleki Kanserler. *Klinik Gelişim Dergisi*, 54, 83.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of oncology*, 18(3), 581-592.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- Fong, K. M., & Minna, J. D. (2002). Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in chest medicine*, 23(1), 83-101.
- Fults, D., & Pedone, C. (2000). Immunocytochemical mapping of the phosphatase and tensin homolog (PTEN/MMAC1) tumor suppressor protein in human gliomas. *Neuro-oncology*, 2(2), 71-79.
- Gall, J. G., & Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2), 378-383.

- Gazdar, A. (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28(S1), S24.
- Georgescu, M.-M. (2010). PTEN tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control. *Genes & cancer*, 1(12), 1170-1177.
- Giangreco, A., Groot, K. R., & Janes, S. M. (2007). Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(6), 547-553.
- Gimm, O., Perren, A., Weng, L.-P., Marsh, D. J., Yeh, J. J., Ziebold, U., . . . Lees, J. A. (2000). Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *The American journal of pathology*, 156(5), 1693-1700.
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E., Bolejack, V. (2016). The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of thoracic oncology*, 11(1), 39-51.
- Govender, D., & Chetty, R. (2012). Gene of the month: PTEN. In: BMJ Publishing Group.
- Greenblatt, M. S., Reddel, R. R., & Harris, C. C. (1995). Carcinogenesis and cellular and molecular biology of lung cancer. In *Thoracic oncology* (pp. 5-25): WB Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Guldberg, P., thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A. F., & Zeuthen, J. (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer research*, 57(17), 3660-3663.
- Güntülü Ak, B. E. K., Akif Turna, Ülkü Yılmaz, Sibel Yurt. (2016). *Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Sekizinci Evreleme Özet Kitabı*. İstanbul.
- Haiman, C. A., Stram, D. O., Wilkens, L. R., Pike, M. C., Kolonel, L. N., Henderson, B. E., & Le Marchand, L. (2006). Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(4), 333-342.
- Harima, Y., Sawada, S., Nagata, K., Sougawa, M., Ostapenko, V., & Ohnishi, T. (2001). Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated



- with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *International journal of oncology*, 18(3), 493-497.
- Harris, J. E., Thun, M. J., Mondul, A. M., & Calle, E. E. (2004). Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *Bmj*, 328(7431), 72.
- Hehn, B. T., Haponik, E., Rubin, H. R., Lechtzin, N., & Diette, G. B. (2003). The relationship between age and process of care and patient tolerance of bronchoscopy. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(7), 917-922.
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553, 446. doi:10.1038/nature25183
- Hiraoka, Y., Sedat, J. W., & Agard, D. A. (1987). The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures. *Science*, 238(4823), 36-41.
- Jensen, E. (2014). Technical review: In situ hybridization. *The Anatomical Record*, 297(8), 1349-1353.
- Jin, G., Kim, M. J., Jeon, H.-S., Choi, J. E., Kim, D. S., Lee, E. B., Jung, T. H. (2010). PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*, 69(3), 279-283.
- Kandasamy, K., & Srivastava, R. K. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer research*, 62(17), 4929-4937.
- Karapinar, G. (2007). *Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri İnde Uzak Metastazların Bellirlenmesi Ve Metastaz Varlığı İle İlişkili Faktörler*. (Uzmanlık Tezi), İstanbul.
- Kefeli, U., Ustaalioglu, B. B. Ö., Yildirim, M. E., Erkol, B., Aydın, D., Şener, N., . . . Açıkgoz, Ö.r. (2015). Akciğer kanserinde sağkalımı etkileyen klinikopatolojik özellikler. *Marmara Medical Journal*, 28(1), 021-026.
- Kezban Özdemir, F. D. G. M., Martin Orlinov KANEV. (2015). In situ Hibridizasyon Yöntemleri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3, 613-621.

- Kim, Y., Hammerman, P. S., Kim, J., Yoon, J.-a., Lee, Y., Sun, J.-M., Yoo, Y. K. (2014). Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients. *Journal of clinical oncology*, 32(2), 121.
- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., & Aromaa, A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American journal of epidemiology*, 146(3), 223-230.
- Knight, S. B., Crosbie, P. A., Balata, H., Chudziak, J., Hussell, T., & Dive, C. (2017). Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open biology*, 7(9), 170070.
- Knobbe, C. B., Merlo, A., & Reifenberger, G. (2002). Pten signaling in gliomas. *Neuro-oncology*, 4(3), 196-211.
- Koksal, I. T., Dirice, E., Yasar, D., Sanlioglu, A. D., Ciftcioglu, A., Gulkesen, K. H., Sanlioglu, S. (2004). *The assessment of PTEN tumor suppressor gene in combination with Gleason scoring and serum PSA to evaluate progression of prostate carcinoma*. Paper presented at the Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.
- Lachyankar, M. B., Sultana, N., Schonhoff, C. M., Mitra, P., Poluha, W., Lambert, S., Nabi, R. (2000). A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1404-1413.
- Larsen, J. E., & Minna, J. D. (2011). Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*, 32(4), 703-740. doi:10.1016/j.ccm.2011.08.003
- Le Marchand, L. c., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., & Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 154-160.
- Lee, C., Lemyre, E., Miron, P. M., & Morton, C. C. (2001). Multicolor fluorescence in situ hybridization in clinical cytogenetic diagnostics. *Current opinion in pediatrics*, 13(6), 550-555.
- Lee, J.-O., Yang, H., Georgescu, M.-M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Pavletich, N. P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, 99(3), 323-334.
- Levy, M. A., Lovly, C. M., & Pao, W. (2012). Translating genomic information into clinical medicine: lung cancer as a paradigm. *Genome research*.

- Li, D.-M., & Sun, H. (1997). TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor  $\beta$ . *Cancer research*, 57(11), 2124-2129.
- Li, X., Yang, Y., Zhang, H., Yue, W., Zhang, T., Lu, B., Gao, Y. (2015). High levels of phosphatase and tensin homolog expression predict favorable prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cell biochemistry and biophysics*, 73(3), 631-637.
- Li, Y., Podsypanina, K., Liu, X., Crane, A., Tan, L. K., Parsons, R., & Varmus, H. E. (2001). Deficiency of Pten accelerates mammary oncogenesis in MMTV-Wnt-1 transgenic mice. *BMC molecular biology*, 2(1), 2.
- Liehr, T. (2009). *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) –Application Guide* (T. Liehr Ed.). Berlin-Germany: Springer.
- Liehr, T., Starke, H., Weise, A., Lehrer, H., & Claussen, U. (2004). Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histology and histopathology*, 19(1), 229-237.
- Lim, W. T., Zhang, W., Miller, C., Watters, J., Gao, F., Viswanathan, A., McLeod, H. (2007). PTEN and phosphorylated AKT expression and prognosis in early-and late-stage non-small cell lung cancer. *Oncology reports*, 17(4), 853-857.
- Linardou, H., Dahabreh, I. J., Bafaloukos, D., Kosmidis, P., & Murray, S. (2009). Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nature reviews Clinical oncology*, 6(6), 352.
- Lindsey A. Torre, R. L. S., Elizabeth M. Ward, and Ahmedin Jemal. (2015). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1-12. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0578
- LoConte, N. K., Brewster, A. M., Kaur, J. S., Merrill, J. K., & Alberg, A. J. (2018). Alcohol and cancer: a statement of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*, 36(1), 83-93.
- Lotan, T., Gurel, B., Sutcliffe, S., Esopi, D., Liu, W., Xu, J., . . . Partin, A. (2011). PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. *Clinical cancer research*, clincanres. 1244.2011.

- Mazure, N. M., Chen, E. Y., Laderoute, K. R., & Giaccia, A. J. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood*, *90*(9), 3322-3331.
- McNicol, A. M., & Farquharson, M. A. (1997). In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, *182*(3), 250-261.
- Micallef, C. M., Shield, K. D., Baldi, I., Charbotel, B., Fervers, B., Ilg, A. G. S., Hutchings, S. J. (2018). Occupational exposures and cancer: a review of agents and relative risk estimates. *Occup Environ Med*, oemed-2017-104858.
- Mina, S., Bohn, B. A., Simon, R., Krohn, A., Reeh, M., Arnold, D., Marx, A. (2012). PTEN deletion is rare but often homogeneous in gastric cancer. *Journal of clinical pathology*, *65*(8), 693-698.
- Mutter, G. L., Lin, M.-C., Fitzgerald, J. T., Kum, J. B., Baak, J. P., Lees, J. A., Eng, C. (2000). Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *Journal of the National Cancer Institute*, *92*(11), 924-930.
- Olaussen, K. A., Soria, J.-C., Morat, L., Martin, A., Sabatier, L., Morere, J.-F., Spano, J.-P. (2003). Loss of PTEN expression is not uncommon, but lacks prognostic value in stage I NSCLC. *Anticancer research*, *23*(6C), 4885-4890.
- Ost, D. E., Ernst, A., Lei, X., Kovitz, K. L., Benzaquen, S., Diaz-Mendoza, J., Puchalski, J. (2016). Diagnostic yield and complications of bronchoscopy for peripheral lung lesions. Results of the AQuIRE registry. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *193*(1), 68-77.
- Özen, M., Pepedil, F., Cengiz, M., Kılıçkap, S., Aksoy, S., Türker, A., & Kars, A. (2012). Otuzbeş Yaş Altı Genç Hastalarda Akciğer Kanseri: Tek Merkez Deneyimi. *Acta Oncologica Turcica*, *45*(1), 1-4.
- Pardue, M. L., & Gall, J. G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, *168*(3937), 1356-1358.
- Perren, A., Weng, L.-P., Boag, A. H., Ziebold, U., Thakore, K., Dahia, P. L., Mutter, G. L. (1999). Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in

- primary ductal adenocarcinomas of the breast. *The American journal of pathology*, 155(4), 1253-1260.
- Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2934-2938.
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z. J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Brunekreef, B. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The lancet oncology*, 14(9), 813-822.
- Radzikowska, E., Głaz, P., & Roszkowski, K. (2002). Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Annals of oncology*, 13(7), 1087-1093.
- Ramalingam, S., Pawlish, K., Gadgeel, S., Demers, R., & Kalemkerian, G. (1998). Lung cancer in young patients: analysis of a Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Journal of clinical oncology*, 16(2), 651-657.
- Riegel, M. (2014). Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology*, 37(1), 194-209.
- Rosner, M., Pergament, E., Andriole, S., Gebb, J., Dar, P. e., & Evans, M. I. (2013). Detection of genetic abnormalities by using CVS and FISH prior to fetal reduction in sonographically normal appearing fetuses. *Prenatal diagnosis*, 33(10), 940-944.
- Sacher, A. G., Dahlberg, S. E., Heng, J., Mach, S., Jänne, P. A., & Oxnard, G. R. (2016). Lung cancer diagnosed in the young is associated with enrichment for targetable genomic alterations and poor prognosis. *JAMA oncology*, 2(3), 313.
- Salvesen, H. B., MacDonald, N., Ryan, A., Jacobs, I. J., Lynch, E. D., Akslen, L. A., & Das, S. (2001). PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *International journal of cancer*, 91(1), 22-26.
- Sansal, I., & Sellers, W. R. (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *Journal of clinical oncology*, 22(14), 2954-2963.

- Schramm, M., Wrobel, C., Born, I., Kazimirek, M., Pomjanski, N., William, M., . . . Böcking, A. (2011). Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: Improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNAimage cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer cytopathology*, *119*(3), 177-192.
- Selma Yılmaz, M. Ö., Fatma Kaya Dağıstanlı. (2017). In situ Melezleme. In N. A. Güler Temizkan (Ed.), *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri* (1 ed., pp. 166-169). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Shimono, T., Hayashi, T., Kimura, M., Yada, I., Namikawa, S., Yuasa, H., & Kusagawa, M. (1994). Surgical treatment of primary lung cancer in patients less than 40 years of age. *Journal of clinical oncology*, *12*(5), 981-985.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*, *67*(1), 7-30.
- Simpson, L., & Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental cell research*, *264*(1), 29-41.
- Slebos, R. J., Kibbelaar, R. E., Dalesio, O., Kooistra, A., Stam, J., Meijer, C. J., Mooi, W. J. (1990). K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *New England Journal of Medicine*, *323*(9), 561-565.
- Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(5), 283-296. doi:10.1038/nrm3330
- Spira, A., Beane, J. E., Shah, V., Steiling, K., Liu, G., Schembri, F., Sebastiani, P. (2007). Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. *Nature medicine*, *13*(3), 361.
- Spitz, M. R., Hong, W. K., Amos, C. I., Wu, X., Schabath, M. B., Dong, Q., Etzel, C. J. (2007). A risk model for prediction of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *99*(9), 715-726.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. A., Lin, H., Ligon, A. H., Davis, T. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature genetics*, *15*(4), 356-362.

- Strumane, K., Song, J.-Y., Baas, I., & Collard, J. G. (2008). Increased Rac activity is required for the progression of T-lymphomas induced by Pten-deficiency. *Leukemia research*, 32(1), 113-120.
- Stumm, M., Wegner, R.-D., Bloechle, M., & Eckel, H. (2006). Interphase M-FISH applications using commercial probes in prenatal and PGD diagnostics. *Cytogenetic and genome research*, 114(3-4), 296-301.
- Subramanian, J., Morgensztern, D., Goodgame, B., Baggstrom, M. Q., Gao, F., Piccirillo, J., & Govindan, R. (2010). Distinctive characteristics of non-small cell lung cancer (NSCLC) in the young: a surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis. *Journal of thoracic oncology*, 5(1), 23-28.
- Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Stambolic, V., Elia, A. J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., Fukumoto, M. (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Current Biology*, 8(21), 1169-1178.
- Tachibana, M., Shibakita, M., Ohno, S., Kinugasa, S., Yoshimura, H., Ueda, S., Nagasue, N. (2002). Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 94(7), 1955-1960.
- Tahara, E., Yasui, W., Ito, H., & Harris, C. C. (2010). Recent progress in carcinogenesis, progression and therapy of lung cancer: the 19th Hiroshima Cancer Seminar: the 3rd Three Universities' Consortium International Symposium, November 2009. *Japanese journal of clinical oncology*, 40(7), 702-708.
- Tanaka, K., Kubota, K., Kodama, T., Nagai, K., & Nishiwaki, Y. (1999). Extrathoracic staging is not necessary for non-small-cell lung cancer with clinical stage T1-2 N0. *The Annals of thoracic surgery*, 68(3), 1039-1042.
- Tang, J.-M., He, Q.-Y., Guo, R.-X., & Chang, X.-J. (2006). Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer*, 51(2), 181-191.
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018). Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*, 10(8). doi:10.3390/cancers10080248

- Thomas, L., Doyle, L. A., & Edelman, M. J. (2005). Lung cancer in women: emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest*, 128(1), 370-381.
- Thun, M. J., Carter, B. D., Feskanich, D., Freedman, N. D., Prentice, R., Lopez, A. D., Gapstur, S. M. (2013). 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med*, 368(4), 351-364. doi:10.1056/NEJMsa1211127
- Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*.
- Travis, W. D. (2011). Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med*, 32(4), 669-692.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., & Nicholson, A. G. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of thoracic oncology*, 10(9), 1240-1242.
- Travis, W. D., Brambilla, E., & Riely, G. J. (2013). New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of clinical oncology*, 31(8), 992-1001.
- Turna, A., Ak, G., Kömürçüoğlu, B. E., Yurt, S., & Yılmaz, Ü. (2017). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sekizinci evreleme ve uygulamadaki etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 25(3), 484-498.
- Ueda, K., Nishijima, M., Inui, H., Watatani, M., Yayoi, E., Okamura, J., Miyoshi, Y. (1998). Infrequent mutations in the PTEN/MMAC1 gene among primary breast cancers. *Japanese journal of cancer research*, 89(1), 17-21.
- Virolle, T., Adamson, E. D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., & de Belle, I. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nature cell biology*, 3(12), 1124.
- Wei, L., Li, N., Wang, G., Su, K., Li, F., Chang, S., Li, X. (2018). Alcohol consumption and the risk of lung cancer in males: a prospective cohort study. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi*, 39(7), 909.
- Wang, Y. E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R. E., Tran, C., Vessella, R. L., Sawyers, C. L. (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in



- advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5246-5250.
- William D. Travis, E. B., Masayuki Noguchi. (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), 42.
- Wisnivesky, J. P., & Halm, E. A. (2007). Sex differences in lung cancer survival: do tumors behave differently in elderly women? *Journal of clinical oncology*, 25(13), 1705-1712.
- Wolff, D. J. (2013). *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*: Springer.
- Wong, M. C., Lao, X. Q., Ho, K.-F., Goggins, W. B., & Shelly, L. (2017). Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Scientific Reports*, 7(1), 14300.
- Yanagawa, N., Leduc, C., Kohler, D., Saieg, M. A., John, T., Sykes, J., Shepherd, F. A. (2012). Loss of phosphatase and tensin homolog protein expression is an independent poor prognostic marker in lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*, 7(10), 1513-1521.
- Zeynep Topu, F. Ü., Numan Numanoglu. (2004). Ailesel kanser hikayesi ve akciğer kanseri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 52(2), 130-136.

## FORMLAR

### ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu bir doktora tezidir.

Akciğer kanseri en sık görülen kanserler arasında 1,8 milyon ile ilk sırada yer almaktadır. Tümör çoğunlukla ana bronş kökenli olup santral yerleşimlidir. Akciğer kanseri hastalığının seyri, tanının konulduğu andaki evre ile ilişkilidir. Akciğer kanserleri mikroskop altında izlenen hücrelerin görüntüsüne göre küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'i küçük hücreli dışı grubundadır. Bazı kanser türlerinde, tümör baskılayıcı genlerinden biri olan *PTEN* geni fonksiyonlarının ortadan kaybolduğu, bazılarında ise ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada amaç; KHDAK tanısı almış 30 hastanın bronşiyal lavaj materyallerinde, tümör baskılayıcı genlerinden biri olan *PTEN* geninin fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) metodu kullanarak tespit edilmesi ve *PTEN* ekspresyon seviyelerinin immünohistokimya (IHC) yöntemi ile gösterilmesidir. Bu anlamda yapmayı planladığımız çalışmada *PTEN* ekspresyon seviyelerinin artma ya da azalma durumuna göre prognoza yansımaları incelenecektir.

Bu çalışma için, rutin tetkik amacıyla verdiğiniz bronşiyal lavaj materyaliniz araştırma amacıyla laboratuvarımızda kullanılacaktır. Yurtdışına herhangi bir materyal gönderilmeyecektir.

Kabul etmeniz halinde katılacağınız bu çalışma yalnızca bir araştırmadır. Araştırmanın amacı; sizden alınan bronşiyal lavaj örneğinde, hastalığınız ile ilişkisi olduğu düşünülen *PTEN* geninin ekspresyonunu incelemektir.

Gönüllü olarak katıldığınız bu araştırma üzerinde sizin herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Araştırma boyunca sizden hiçbir maddi katkı talebi olmayacak ve bağlı olduğunuz sağlık kurumuna da (SGK) herhangi bir ücret ödetilmeyecektir. Bu çalışma sizin için herhangi bir rahatsızlık veya risk oluşturmayacaktır. Kısa dönemde size bir fayda sağlamayacak ancak uzun dönemde hastalığınızın seyrinin iyi anlaşılabilmesi ve alternatif tedavi

geliştirebilmesi bakımından yarar sağlayacaktır.

Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde tedavinize engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilecek ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

Siz veya yasal temsilciniz ‘Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu’ nu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız. Kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar gizli tutulacaktır. Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda size veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir.

Sizin araştırma hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir konu hakkında daha fazla bilgi temin edebilmeniz için temasa geçebileceğiniz kişiler ve/veya araştırmacılara günün içinde erişebileceğiniz telefon numarası; (0212) 414 30 00 / 21801’dir. Araştırmada yer alacağınız öngörülen süre maksimum 1 buçuk yıl olacaktır. Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı 30’dur.

“Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarının bronş lavajında PTEN geninin fluoresan in situ hibridizasyonu ve immünohistokimya yöntemleri ile karşılaştırılması” adlı çalışma kapsamında alınan bronşiyal lavaj materyalimin;

1. Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
2. İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
3. Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Bu klinik araştırmaya, gönüllü olarak, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Hasta/ hasta yakını Adı, Soyadı İmzası Tarih

Açıklama yapan araştırmacı Adı, Soyadı İmzası Tarih

Olur alma işlemine tanık olan kişinin Adı, Soyadı İmzası Tarih

## ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 07/09/2016-327741



T.C.  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-  
Konu :Dokt.Öğr. Hilal Şahin'nin etik  
kurul kararı

### TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :19.08.2016 tarih, 66018902-050.99-306809 sayılı yazınıza

Anabilim Dalımız öğretim üyesi **Doç.Dr.Matem TUNÇDEMİR**'in danışmanlığında **Doktora Öğrencisi Hilal ŞAHİN**'in yürütücülüğünde **Prof.Dr.Ayhan DEVİREN** ve **Prof.Dr.Salih Serdar ERTURAN**'ın yardımcılıklarında "**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarının Bronş Lavajında PTEN Geninin Fluoresan in situ Hidridizasyonu ve İmmünohistokimya Yöntemleri ile Karşılaştırılması**" başlıklı Doktora Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **06 Eylül 2016** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalı  
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR  
Başkan

e-İmzalı  
Prof. Dr. Mehmet Yakup TUNA  
Bölüm Başkanı

EK :  
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENNL44NT>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL  
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33  
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HASTALARININ BRONŞ LAVAJINDA PTEN GENİNİN FLUORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON VE İMMÜNOSİTOKİMYA YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

#### ORIJINALLIK RAPORU

% **11**  
BENZERLİK ENDEKSİ

% **9**  
İNT ERNET  
KAYNAKLARI

% **3**  
YAYINLAR

% **3**  
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

- 1** TURNA, Akif, AK, Güntülü, KÖMÜRCÜOĞLU, Berna Eren, YURT, Sibel and YILMAZ, Ülkü. "Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sekizinci evreleme ve uygulamadaki etkileri", Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Derneği, 2017. Yayın % **1**
- 2** Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi % **1**
- 3** www.journalagent.com İnternet Kaynağı % **1**
- 4** adnanaydiner.com İnternet Kaynağı % **1**
- 5** nukleertipseminerleri.org İnternet Kaynağı % **1**
- 6** file.toraks.org.tr İnternet Kaynağı % **1**

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Hilal	<b>Soyadı</b>	ŞAHİN
<b>Doğ.Yeri</b>	Düzce	<b>Doğ.Tar.</b>	27.08.1983
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	73765077754
<b>Email</b>	hilalsahin@yahoo.com	<b>Tel</b>	0555 659 71 97

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mez. Yılı</b>
<b>Doktora</b>	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa / Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2018
<b>Yük.Lis.</b>	Fatih Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü	2011
<b>Lisans</b>	Ankara Üniversitesi / Fen Fakültesi	2006
<b>Lise</b>	Ataköy Lisesi	2000

### İş Deneyimi

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
1.			-

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>	<b>KPDS/ÜDS Puanı</b>	<b>(Diğer) Puanı</b>
İngilizce	İyi	Orta	Orta		YÖK-dil: 68.3

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office	İyi

## **Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**

### Yayınlar

- Alpsoy, L., Sahin H. and Karaman S., "Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of methanolic extract of *Mentha pulegium* on human lymphocyte culture", Toxicology and Industrial Health, Nov. 2010
- Alpsoy, L., Akcayoglu G., Sahin, H., "Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of Carnosine on human lymphocyte culture", Human and Experimental Toxicology , Vol. Accepted, Jan. 2011

### Poster Sunumları

- Investigation of *PTEN* Genes by Fluorescent in-situ Hybridization Method in Bronchial Lavage of Non-Small Cell Lung Cancer Patients - International Symposium on Multidisciplinary Academic Studies Sempozyum Bildiri Kitabı- Poster Presentation IMASES 2018 Berlin / Germany 27-29 Haziran 2018
- Down Sendromu hastalarında görülen hematolojik malignitelerin retrospektif olarak değerlendirilmesi- Poster Sunumu XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi Fethiye/ Muğla 26-29 Ekim 2017
- Polisitemi vera tanılı veya ön tanılı hastalarda gözlenen karyotip anomalilerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi- Poster Sunumu XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Kongre Kitabı- 27-30 Ekim 2015
- Karnozinin insan lenfosit hücreleri üzerine antioksidatif ve antigenotoksik etkilerinin belirlenmesi” Poster Sunumu XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Kongre Kitabı 27-30 Ekim 2013
- Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of methanolic extract of *Mentha pulegium* on human lymphocyte culture” Poster Presentation Turkish FEPS Physiology Congress Yeditepe Üniversitesi-İstanbul 3-7 Ekim 2011

### Sertifikalar

- VII. Multidisipliner Kanser Araştırma & 1.Temel Onkoloji Kongresi- Seferihisar / İzmir 11-14 Ekim 2018
- International Symposium on Multidisciplinary Academic Studies IMASES 2018 Berlin / Germany 27-29 Haziran 2018
- XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi Fethiye/ Muğla 26-29 Ekim 2017
- Moleküler Kanser Zirvesi İstinye Üniversitesi- İstanbul 25-26 Mart 2017

- 24. Biennial International Congress on Thrombosis Haliç Kongre ve Kültür Merkezi-İstanbul 4 Mayıs 2016
- XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Fethiye-Muğla 27-30 Ekim 2015
- VII. Detae Günleri Araştırmanın Merkezinde 70 yıl İstanbul Üniversitesi Kongre ve Kültür Merkezi-İstanbul 11-12 Kasım 2015
- V. Ege Tıp Genetik Çalıştayı Hematolojik Malignitelerde Uygulamalı Real-Time PCR ve FISH Kursu Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi-İzmir 10-11 Mart 2014
- VI. Detae Günleri 'Datae'nin 70. yaşında Hastalık ve Sağlığa Bakış' İstanbul Üniversitesi Kongre ve Kültür Merkezi-İstanbul 24-25 Kasım 2014
- VIII. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi Florence Nightingale Hastanesi-İstanbul 9 Mayıs 2014
- XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Kuşadası-Aydın 27-30 Ekim 2013
- The Erasmus Intensive Programme 'Clasic and Modern Methods for Molecular Diagnostics in Human Pathology' Transilvania University-Lifelong Learning Programme EIP-RO Brasov-Romania 13-24 Mayıs 2013
- I.Hematolojik Genetik Sempozyumu Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi-İzmir 4 Aralık 2013
- GEN'ETİK Prof. Dr. Asım Cenani Günü Sempozyumu İstanbul Üniversitesi CTF. Prof. Dr. Cem Demiroğlu Oditoryumu-İstanbul 14 Aralık.2012
- 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi Karadeniz Teknik Üniversitesi-Trabzon 25-29 Eylül 2012
- Turkish FEPS Physiology Congress Yeditepe Üniversitesi-İstanbul 3-7 Ekim 2011
- XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Konyaaltı-Antalya 27-30 Ekim 2011
- DNA Day Lecture by James Watson Boğaziçi Üniversitesi- İstanbul 18 Nisan 2011

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Kanser. Hematolojik Maligniteler, Sitogenetik, Kanser Genetiği, Moleküler Biyoloji