

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

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ  
DOKULARINDA HER-2/NEU VE EGFR GENLERİNİN  
REAL-TİME PCR YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DERYA UZUN**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU**

**HAZİRAN, 2008**



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

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ**  
**DOKULARINDA HER-2/NEU VE EGFR GENLERİNİN**  
**REAL-TİME PCR YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DERYA UZUN**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU**

**Proje No: 200711010**



## KABUL VE ONAY SAYFASI

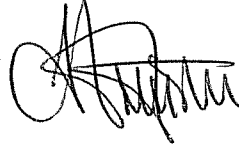
Derya UZUN'un Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Dokularında HER2/neu ve EGFR Genlerinin Real Time PCR Yöntemiyle İncelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

10.06.2008

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU



Üye : Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



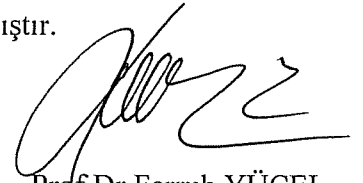
Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Güntülü AK



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16.06/2008. tarih ve 746/3451. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

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

Çalışmanın amacı, kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle akciğer kanserinin de içinde yer aldığı çok sayıda tipte karsinogenezis sürecinde önemli bir yere sahip olan EGFR ve HER2/neu onkogenlerine spesifik olarak dizayn edilmiş prob ve primerleriyle bu gen bölgelerinin amplifikasyonlarının incelenerek ortaya konmasıdır.

Çalışmaya İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek 'akciğer kanseri' tanısı almış 100 hasta dahil edilmiştir. Her hastaya ait parafine gömülü doku örneklerinden, kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışmaya alınmıştır.

Çalışmada, Real-Time PCR ile kantitatif ölçümleri sonucu, akciğer kanserli bu dokuların % 18' inde HER2/neu gen amplifikasyonu, % 26' sında EGFR gen amplifikasyonları belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında da elde edilen bu sonuçlar literatür verileriyle çoğunlukla uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak kantitatif Real-Time PCR yöntemi, gen amplifikasyonlarının belirlenmesi için kullanılabilir, hızlı, güvenilir, ucuz ve nicel sonuç verebilecek bir yöntemdir. Elde edilen tüm verilere göre bu yöntem, gen amplifikasyonlarının belirlenmesine yönelik diğer yöntemler için, bu amaca yönelik alternatif bir yöntemdir.

Anahtar Sözcükler: Akciğer Kanseri, EGFR, HER2/neu, Kantitatif Real-Time PCR

## SUMMARY

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

This study was aimed to determine EGFR and HER2/neu oncogenes amplification that is significantly involved in carcinogenesis in several cancer types including lung cancers by using quantitative Real-Time PCR technique and probes and primers which are designed specifically for this genes.

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

In the study, HER2/neu and EGFR gene amplification measured quantitatively and the amplification ratios were found % 11 and % 26, respectively. These findings obtained in the study is compatible with the literature.

As a conclusion, it was determined that quantitative Real-Time PCR is a technique which can give fast, cheap, reliable and quantitative results for gene amplifications. This technique is an alternative technique for gene amplification determination among other techniques used for this purpose.

Key Words: Lung Cancer, EGFR gene, HER2/neu gene, quantitative Real-Time PCR

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Kanser Tanımı.....	4
2.1.1. Çok Aşamalı Kanser Gelişim Süreci.....	5
2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	6
2.2. Kanser ve Genetik Yapısı.....	7
2.2.1. Kanser Oluşumunda Etkili Genler.....	9
2.2.1.1. Onkogenler.....	10
2.2.1.1.1. Protonkogenlerin fonksiyonları.....	10
2.2.1.1.2. Onkogenlerin aktivasyon mekanizmaları.....	11
2.2.1.1.2.1. Delesyon-nokta mutasyonları.....	11
2.2.1.1.2.2. Gen amplifikasyonları.....	12
2.2.1.1.2.3. Kromozom yeniden düzenlenmeleri.....	13
2.2.1.1.3. Onkogen ürünlerinin tipleri.....	13
2.2.1.2. Tümör süpresör genler.....	15
2.2.1.3. Stabilite genleri (Caretakers).....	16
2.3. Akciğer Kanserleri.....	16
2.3.1. Histolojik Sınıflandırma.....	17
2.3.2. Patogenez ve Etyoloji.....	17
2.3.3. Akciğer Kanser Moleküler Biyolojisi.....	19



2.3.3.1. Akciğer kanserinde onkogen aktivasyonu.....	20
2.3.3.2. Akciğer kanserinde tümör süpresör genlerin inaktivasyonu....	21
2.3.3.3. Akciğer kanserinde DNA tamir genleri ve diğer genler.....	22
2.4. Büyüme Faktörleri.....	22
2.5. Hücre Yüzey Reseptörleri.....	23
2.5.1. Reseptör tirozin kinazlar .....	24
2.6. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri.....	24
2.6.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörlerinin Yapısı.....	25
2.6.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri Sinyal Yolakları.....	26
2.6.3. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri ve Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri.....	28
2.7. Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi.....	29
2.7.1. Kuantitatif Real-Time PCR Metodları.....	29
2.7.2. Real-Time PCR İçin Kullanılan Problar.....	30
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....</b>	<b>33</b>
3.1. Gereçler.....	33
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	33
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	34
3.2. Yöntemler.....	35
3.2.1. Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu İle Parafine Gömülü Dokudan DNA Elde Etme Protokolü.....	35
3.2.2. İzole Edilen DNA Örneklerinin Real-Time PCR Yöntemiyle Analizi....	36
3.2.2.1. HER-2/neu geninin Real-Time PCR ile kantifikasyonu.....	36
3.2.2.2. EGFR geninin Real-Time PCR ile kantifikasyonu.....	38
3.2.2.3. Değerlendirme.....	40
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>42</b>
4.1. Yönteme İlişkin Bulgular.....	43
4.2. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları.....	48

<b>5. TARTIŞMA</b> .....	51
5.1. Parafine Gömülü Dokulardan DNA Elde Etme Protokollerinin Karşılaştırılması.....	51
5.2. HER-2/neu Onkogeni İçin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri İle Karşılaştırılması.....	53
5.3. EGFR Onkogeni İçin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri İle Karşılaştırılması.....	61
5.4. Kantitatif Real-Time PCR Yönteminin Avantajları ve Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması.....	64
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	67
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	70

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kanser gelişim sürecinin temel bir şeması (KUMAR,V.; COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L.; Robbins Temel Patoloji, 6. baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2000, sayfa 146'dan alınmıştır).....	5
Şekil 2.2. EGF reseptör ailesi ve ligandları.....	25
Şekil 3.2. HER-2/neu geni için kullanılan PCR şartları.....	37
Şekil 3.3. HER-2/neu genine ait amplifikasyon döngüleri (PCR' in her basamağının 50 döngü sonunda tamamlandığını gösteren görüntü).....	37
Şekil 3.4. EGFR geni için kullanılan PCR şartları.....	40
Şekil 3.5. EGFR genine ait amplifikasyon döngüleri(PCR' in her basamağının 45 döngü sonunda tamalandığını gösteren görüntü).....	40
Şekil 4.1. HER-2/neu için kullanılan referansa özgü standartların konsantrasyon ve Cp değerleri( $10^1$ - $10^6$ arasında kopya sayısına sahip standartlar).....	44
Şekil 4.2. HER-2/neu için kullanılan referansa özgü standartların amplifikasyon eğrileri(Farklı konsantrasyonlara sahip standartların reaksiyona girdikleri döngüler).....	44
Şekil 4.3. HER-2/neu için incelenen olguların konsantrasyon ve Cp değerleri ( $10^1$ - $10^6$ arasında kopya sayısına sahip standartlar ve olgular).....	45

## ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Sayfa

- Şekil 4.4. HER-2/neu için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri  
(Farklı kopya sayısına sahip bir grup olgununun reaksiyona  
girdikleri döngüler).....45
- Şekil 4.5. EGFR için kullanılan referansa özgü standartların konsantrasyon  
ve Cp değerleri( $10^1$ - $10^6$  arasında kopya sayısına sahip standartlar).....46
- Şekil 4.6. EGFR için kullanılan referansa özgü standartların  
amplifikasyon eğrileri(Farklı konsantrasyonlara sahip standartların  
reaksiyona girdikleri döngüler).....46
- Şekil 4.7. EGFR için incelenen olguların konsantrasyon ve Cp değerleri  
( $10^1$ - $10^6$  arasında kopya sayısına sahip standart ve olgular).....47
- Şekil 4.8. EGFR için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri  
(Farklı kopya sayısına sahip bir grup olgununun reaksiyona  
girdikleri döngüler).....47

## TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Kullanılan HER2/neu LightCycler480 PCR programı.....	36
Tablo 3.2. Real-Time PCR ile gen kopya sayısının hesaplanması.....	38
Tablo 3.3. Kullanılan EGFR LightCycler480 PCR programı.....	39
Tablo 3.4. Real-Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	41
Tablo 4.1. Çalışma olgularının cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları.....	42
Tablo 4.2. Çalışma olgularında Real-Time PCR yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları.....	43
Tablo 4.3. Çalışma olgularında Real-Time PCR yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları.....	49
Tablo 4.4. Çalışma olgularında Real-Time PCR yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların grade ve histopatoloji bilgilerine göre dağılımları.....	50
Tablo 5.1. HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyon sonuçlarının litaretür verileri ile karşılaştırılması.....	60

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ATL:</b>	Tissue Lyses
<b>CDK:</b>	Cyclin Dependant Kinases
<b>CISH:</b>	Cromogenik İn Situ Hibridizasyon
<b>DNA :</b>	Deoksinükleik asit
<b>EGF:</b>	Epidermal Büyüme Faktörleri
<b>EGFR:</b>	Epidermal Büyüme Faktör Reseptör
<b>FISH:</b>	Floresan İn Situ Hibridizasyon
<b>HER-2/neu:</b>	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
<b>IHK:</b>	İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği
<b>kDA:</b>	Kilo Dalton
<b>KHAK:</b>	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
<b>KHOAK:</b>	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
<b>ml:</b>	Mililitre
<b>mRNA:</b>	Messenger Ribonükleik Asit
<b>MW:</b>	Molecular Weight
<b>ng:</b>	Nanogram
<b>PCR:</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA:</b>	Rübonükleik Asit
<b>RTK:</b>	Reseptör Tirozin Kinazlar
<b>RT PCR:</b>	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>rpm:</b>	Round Per Minute
<b>TK:</b>	Tirozin Kinazlar
<b>WHO:</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>µg:</b>	Mikrogram

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser klinik tıbbın en yaygın ve en ciddi problemlerinden biridir. Yapılan istatistiksel çalışmalar kanserin, popülasyonun 1/3' ünden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin %20 kadarından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerdeki toplam tıbbi bakım harcamalarının %10 kadarını kanser tedavi harcamalarının oluşturduğunu göstermiştir. Akciğer kanserinin yıllık 1.2 milyon yeni vaka ile birlikte dünyada en yaygın kanser tipi olduğu bu raporla açıklanmıştır (45,77).

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer almaktadır. 1996 yılında ABD'de 64 bin kadın akciğer kanserinden, 44 bin kadın meme kanserinden ölmüştür. Tüm dünya ortalamasına baktığımızda akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikinci sıradadır(20).

Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl 20 bin-25 bin yeni akciğer kanseri ortaya çıkmakta ve bu rakamın 30 bin-40 bin' e kadar ulaşabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde akciğer kanserlerinin çoğu erkeklerde görülmektedir. Ancak 1980'lerden sonra ülkemizde kadınlarda artan sigara tiryakiliği bu oranı hızla artırmaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1983-1989 yılları arasında ülkemizde kanser sıklığı 32/100 bin'dir. Bunun % 26' lık bölümünü ilk sıradaki akciğer kanseri oluşturmaktadır.1991-1992 verilerine göre solunum sistemi kanserlerinin oranı, tüm kanserler içinde %43' tür. Yine aynı verilere göre yapılan tahminlerde, gerçek kanser sıklığı 120-130 / 100 bin olmalıdır(78).

Karsinojenik etkiler açısından, sigara ve çok daha az derecede diğer çevresel kötü şartların, akciğer kanserinin oluşmasında etkili olduğu ve genetik değişikliklerin meydana gelmesinden sorumlu olduğuna ilişkin güçlü bulgular vardır. Akciğer kanserinin çoğunun, sigara içme alışkanlığına bağlanmasına karşın,

ağır sigara içicilerin yaklaşık %20' sinde akciğer kanseri oluşur. Ailesel soy ağacının analizi, akciğer kanserinin diğer kanserlerle birlikte belli ailelerde daha çok görüldüğünü göstermiştir. Birçok çalışmada akciğer kanserli hastaların ailelerinde, kontrollere nazaran 2–5 kat daha fazla akciğer kanserine rastlandığı gösterilmiştir. Ailelerinde kanser hikâyesi olan sigara tiryakilerinde akciğer kanseri riski, sigara içmeyen ve aile hikâyesi olmayanlardan 30–47 kat daha fazladır. Akciğer kanserli hastaların aile üyelerinde sigara ile akciğer kanseri ve diğer kanserlerin oranındaki artış, konağın karsinojenlere karşı duyarlılık ve direncini etkileyen diğer faktörleri akla getirmektedir. Bunlar, çevresel ve mesleki hava kirliliği gibi faktörlerdir(33, 76).

Kanser, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişimlerden kaynaklanır(42). Kanserde etkili olduğu düşünölen tüm genler birlikte değerlendirildiğinde 3 ana grup altında toplanırlar. Bunlar; onkogenler, tümör süpresör genler, stabilite genleridir(79).

Kanser hücrelerinin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda ortaya çıkan bozukluklar kontrolsüz hücre proliferasyonu ve invaze olabilme yeteneği ile sonuçlanır. Karsinojenik mutasyonlar, sıklıkla hücrelerin apoptozis ve hücre siklusunun kontrol yolunda yer alan genleri etkileyebilmektedir. Normal regölatör gen ürünleri, hücre sayısının artması ya da hücre sayısı artışının inhibe edilmesine göre gruplandırılır(1,9,57).

Birinci grubu oluşturan onkogenlerin aktivasyonu ile ilişkili meydana gelen değişimlerin yanında, çeşitli büyüme faktörü ve reseptörlerini kodlayan ve bazı akciğer kanseri türlerinde ekspresyonları artmış olan bazı hücre içi sinyal ileticileri ve nükleer transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Bu grupta diğer birçoğunun yanında epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) yer alır. EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran protein olup hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR ailesi, sinyal yollarının aktivasyonunun kontrolünde görev alan, normal gelişim sürecinde rol oynamakla beraber, önemli bir kısmını kanserin



teşkil ettiği birçok hastalıkta aktivasyonlarının veya aşırı ekspresyonlarının ilişkisi tespit edilmiştir(29).

Çalışmamızda, nükleik asit miktarını kantitatif olarak ölçebilen 'kantitatif Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Higuchi ve arkadaşlarının 1992 yılında geliştirdikleri Real-Time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süreci boyunca, oluşan ürünün miktarını Real-time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi, Real-time PCR' ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinden tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkân reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü flörsan işaretli prob ile sağlanmaktadır(31,67).

Çalışmamızda EGFR ve HER-2/neu onkogenlerine özgü dizayn edilmiş primer ve prob çiftleri kullanılarak, akciğer karsinogenesinde önemli bir yere sahip söz konusu onkogenlerin kopya sayılarındaki artışlar veya gen amplifikasyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen verilere göre Türk populasyonunda küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin türlerine göre etyolojisinde yer alan bu genlerdeki amplifikasyonlar incelenmiştir. Yöntemin aynı amaca yönelik tekniklere göre avantajları arasında; daha düşük maliyetli, hızlı bir yöntem olmasını, sensivitesinin ve spesifitesinin yüksek olmasını sayabiliriz.

## 2. GENEL BİLGİLER

Kanser, klinikte görülen en yaygın ve en ciddi hastalıklardan biridir. Yapılan istatistiksel çalışmalar, kanserin toplumların yaklaşık 1/3' nden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin % 20' den fazlasından sorumlu olduğunu göstermiştir. 1990-1995 yılları arasında en sık 2. ölüm sebebi kanser olmuştur. Gerçek kanser mortalitesi daha yüksek olmasına rağmen 1995 verilerine göre Türkiye'de kanser mortalitesi 100 bin' de 67.7 bulunmuştur. Son zamanlarda kanserin etyolojisi, patogenezi ve tedavisindeki umut verici gelişmelere rağmen halen tüm dünyada ve ülkemizde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en önemli mortalite nedenidir(45,74,81).

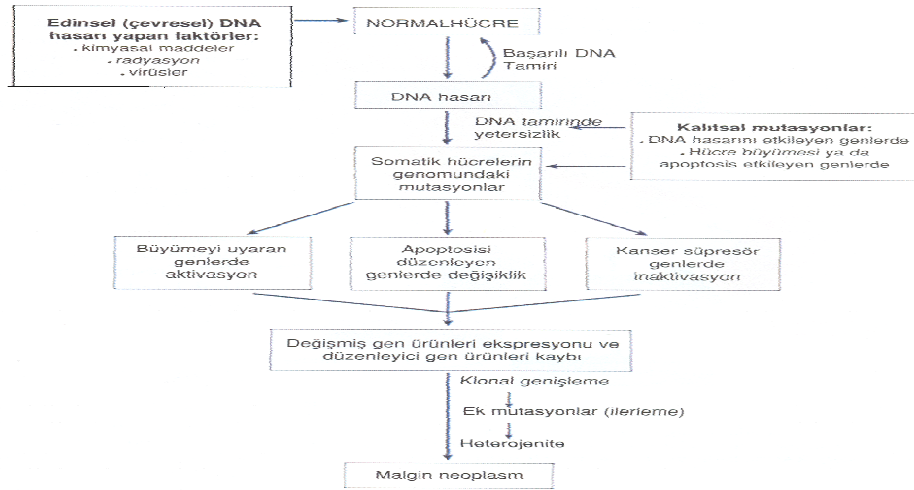
### 2.1. Kanserın Tanımı

Kanser tek bir hastalık olmayıp, daha çok bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığını bildiğimiz kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize edilen neoplazinin daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Neoplazinin kanser olabilmesi için kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi veya metastaz özelliğine sahip olması gerekmektedir. Kanser birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir. Kanserın gelişmesine neden olan temel değişiklik, kanser hücrelerinin sürekli kontrolsüz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere, doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve hücreleri istila ederek metastaz özelliği kazanırlar. Prolifere olan hücreler, hücre siklusuna girer ve mitozu uğrarlar. Programlanmış hücre ölümü nedeniyle oluşan hücresel yok oluş ise apoptozis ile gerçekleşir. Apoptozis mekanizmasında bir bozukluk meydana geldiğinde hücre çoğalması ile hücre ölümü arasında bir dengesizlik meydana gelir ve anormal hücre birikimi meydana gelir. Tüm bu mekanizmalar, gen ürünleri olan proteinler

tarafından düzenlendiğinden, bir gendeki başkalaşım o genin kodladığı proteinin üretilmemesi, yanlış üretilmesi, normalden az ya da çok üretilmesi ile sonuçlanır. Sonuç olarak, ilgili proteinlerin rol aldığı mekanizmalarda normalden sapmalar ortaya çıkar(9,33,45,66).

### 2.1.1. Çok Aşamalı Kanser Gelişim Süreci

Kanserin gelişim süreci ‘karsinogenez’ olarak adlandırılır. Karsinogenez çok aşamalı bir olaydır ve başlangıcında öldürücü olmayan bir genetik hasar yatar. Bu genetik hasar kansere yol açan ajanlara ya da karsinojenlere maruz kalınmasıyla ortaya çıkabilir ancak hemen tümör oluşumuna sebep olmaz. Kimyasal madde, radyasyon gibi karsinojenlerin veya virüslerin etkisiyle hasara uğrayan tek bir hücre, bir dizi olay zinciri sonrasında tümör gelişimine sebep olur(9,33,45).



**Şekil 2.1:** Kanser gelişim sürecinin temel bir şeması (KUMAR,V.; COTRAN,R.S.; ROBBINS,S.L.; Robbins Temel Patoloji, 6' ıncı baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2000, syf:146' dan alınmıştır).

Kanser, tek bir mutant atadan gelen anormal hücre popülasyonunun mutasyon ve doğal seleksiyonun birbirini takip eden döngülerinin sonucudur. Her

aşamada, bir hücre yeni bir mutasyon kazanır ve mutasyon ona diğer hücreler karşısında bir seçicilik ya da üstünlük sağlar. Bu durum ona bulunduğu ortamda yaşamını daha kolay devam ettirebilme şansı kazandırır. İlerleyen tümörün ortam şartları güçleşip, oksijen ve besin miktarı azalabilir ve büyümesi çevredeki normal dokular tarafından engellenebilir. Buna rağmen ortama iyi adapte olabilen kanser hücrelerinin döleri bölünmeye devam eder ve gelişmiş lezyon baskın hale gelir. Böylece tümör artık büyümeye başlar. İlerleme sürecinde ek olarak ortaya çıkabilecek yeni mutasyonlar kanser hücrelerinin iyice büyümesini sağlayacaktır. Bu mutasyonların bir bölümü hücreye daha hızlı çoğalma gibi belirli avantajlar kazandırır, bu hücrelerden türeyen ve söz konusu avantaja sahip olan yeni hücreler tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın nitelik kazanırlar. Kanser hücrelerinin bu gelişimi bu ölçüde şansa kalmaktadır(1,9).

Hücreyel olayların karmaşık ve birbirine bağılı yollarla kontrol ediliyor olması, kanser oluşumu için çok sayıda mutasyon gerçekleşmesini gerektirir. Hücreler kendi davranışlarını yanlışsız olarak kontrol ederler, bunun için de çok fazla düzenleyici mekanizma kullanırlar. Hücrelerin malign bir karakter kazanıp bu sınırlandırmaları ve engelleri aşabilmesi için tüm düzenleyici mekanizmaların bozulması gerekir. Kanserin ilerleme süreci boyunca kanser hücreleri her aşamada daha geniş alanlara yayılmasına rağmen her seferinde yeni engellerle karşılaşırırlar. Örneğın hücreler uzunluk olarak bir veya iki milimetreye ulaştıklarında oksijen ve besin yetersizliğı ile karşılaşırırlar. Kanser hücreleri bu noktada gerekli kaynaklara ulaşamazlar. Ancak her yeni engele karşı ek bir mutasyon kazanarak içinde buldukları güçlüğün üstesinden gelirler(1).

### **2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri**

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması, hücre çoğalmasını düzenleyen mekanizmaları etkileyen değışikliklerin birikmesinin sonucudur. Kanser

hücrelerinde, hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülür. Bütün bunlar bir araya geldiğinde, kanser hücrelerinin bu karakteristik özellikleri malignitenin hücresele düzeyde tanımlanmasını sağlar(9).

Kanser hücrelerinin çoğalması, yoğunluğa bağlı inhibasyondan etkilenmez. Normal hücrelerin çoğalmasını durduran sinyallere uyması yerine, kanser hücreleri kontrolsüz çoğalma davranışlarını sürdürerek, yoğunluğun artmasına rağmen çoğalmaya devam ederler. Kanser hücreleri, hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Bazı durumlarda kanser hücreleri çoğalmak için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileri de salgılayabilir. Bunlar dışında hücre-hücre etkileşimleri açısından normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki en önemli fark kontakt inhibasyondur. Normal hücreler, hücre-hücre teması sonucunda hareket etmeye ve çoğalmaya son verirken, kanser hücreleri çoğalmayı inhibe eden bu temasa karşı duyarsızdır. Kanser hücreleri, hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve komşu dokunun içine yayılıma olanak veren proteazlar, angiogenezi hızlandıran büyüme faktörleri salgırlar. Kanser hücrelerinin bir başka genel özelliği ise normal farklılaşma programını izlemek yerine, sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalmalarıdır. Birçok hücre türünde farklılaşmanın temel öğelerinden olan apoptoz kanser hücrelerinin çoğunda görülmez. Buna ek olarak kanser hücreleri telomeraz enziminin ekspresyonu sayesinde, sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptir. Böylece anormal sağ kalım ve çoğalma yeteneği sayesinde kanser hücrelerinin sınırsız çoğalması mümkün olur(9).

## **2.2. Kanser ve Genetik Yapısı**

Neoplastik hücrelerde genetik aberasyonlar ilk kez 1914 yılında ortaya atılan ‘neoplazinin tek bir hücrede kazanılmış genetik değişikliklerle oluştuğu’ kavramı çok sayıda deneysel veriyle desteklenmiş olup, kanser farklı formlarıyla hücresele

bölünmeyi kontrol eden normal genetik mekanizmanın bozulmasıyla karakterize edilmektedir. Kanser hücrelerindeki genetik sapmalar hücresel genomun farklı organizasyon düzeylerinde gerçekleşmektedir(39).

Hücre bölünmesi ve hücre ölümünü kontrol eden çok çeşitli genler bulunmaktadır. Kanser başlangıcında farklı türlerde genlerin varlığı bildirilmektedir. Bu grupta yer alan genler:

- Hücre proliferasyonunda sinyal iletiminde yer alan proteinler,
- Kontakt inhibasyonun oluşumunda yer alan hücre komponentlerini kodlayan genler,
- Mitotik siklus regülatörlerini kodlayan genler,
- Programlanmış hücre ölüm komponentlerini kodlayan genler,
- Mutasyonların tanımlanması ve tamirinden sorumlu olan proteinleri kodlayan genlerdir.

Kanserin sporadik olarak bireylerde izlenmesine veya herediter bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar edilmesine bakılmaksızın, kanser genetik bir hastalıktır. Kanser ile diğer genetik hastalıklar arasında temel iki farklılık bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kanserin çoğunlukla somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmasıdır. Buna karşın diğer genetik hastalıklar sadece germ hücrelerinde meydana gelmiş bir mutasyon sonucu ortaya çıkar. İkinci temel farklılık, kanserin tek bir mutasyon sonucu ortaya çıkmamasıdır. Kanserin ortaya çıkması için, kanserin tipine bağlı olarak üç mutasyondan yirmi mutasyona kadar daha çok mutasyonun birikimi söz konusudur. Kansere ilişkili genlerdeki ilk mutasyon neoplastik süreçte klonal bir gelişimin başlangıcı sebebiyledir. Bu genlerdeki germline mutasyonlar, kanser yatkınlığının sebebi olurlar. Aslında kanser olma durumu değil, yatkınlık söz konusudur. Böyle bir durumda bu mutasyonlara sahip bir birey neoplastik sürecin başlangıcına da yatkındır ve bu sebepten dolayı bu bireyde sık gelişme olasılığı bulunan çok sayıda tümör daha erken yaşta meydana gelebilir(35,45,79).

Mutasyonların birikimiyle malignensiye doğru gelişim başkalaşım sıklığına bağlıdır. Başkalaşım sıklığı çevredeki mutajenlerden dolayı veya hücre içi defektlerden dolayı fazla olabilir. Ultraviyole ışın sebebiyle DNA' da oluşan bir hatanın DNA tamir mekanizmalarında oluşturduğu defektlerden dolayı ortaya çıkan bir genetik hastalık olan Xeroderma Pigmentosum'lu bireyler bu durum için iyi bir örnektir. İlgili genlerdeki başkalaşımın nedeniyle ultraviyole ışın orjinli DNA defekti tamir edilememektedir. DNA tamiri ve replikasyon hatalarından dolayı kansere yatkınlığın söz konusu olduğu diğer genetik hastalıklarda da (Fankoni Anemisi, Bloom Sendromu) gen defekti germ hücreleri tarafından taşındığından sonraki jenerasyonlara aktarılır. Bu nedenle bu bireylerde farklı kanser tiplerinin gelişimi söz konusudur ve normal populasyona göre riskleri çok daha yüksektir. DNA metabolizmasındaki benzer genetik defektler somatik hücrelerde de oluşabilir. Bu bireylerde yeni gen değişimlerinin görülmesi değişim oranını artırmakla birlikte bireylerde kanser gelişme riskini de arttırmaktadır(1,16,35).

### **2.2.1. Kanser Oluşumunda Etkili Genler**

İnsan kanserlerinde sürekli değişime uğrayan 100'ün üzerinde gen tanımlanmıştır. Buna rağmen keşfedilmeyi bekleyen daha çok sayıda gen olduğu aşikârdır. Bu genlerin tamamı, mutasyonları kanserin sebebine katkıda bulunan genlerdir. Kanser, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişimlerden kaynaklanır(1,9). Kanserde etkili olduğu düşünülen genler 3 ana grup altında toplanırlar:

- 1- Onkogenler
- 2- Tümör süpresör genler
- 3- Stabilite genleri(78)

Kanser hücrelerinin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda ortaya çıkan bozukluklar kontrolsüz hücre proliferasyonu ve invaze olabilme yeteneği ile sonuçlanır. Karsinojenik mutasyonlar sıklıkla hücrelerin apoptozis ve hücre siklusunun kontrol yolunda yer alan genleri etkileyebilmektedir. Normal regülatör gen ürünleri, hücre sayısının artırılması ya da hücre sayısı artışının inhibe edilmesine göre gruplandırılır(1,9,57).

### **2.2.1.1. Onkogenler**

Onkogenlerin kökeni hakkındaki ilk ipucu, yüksek derecede onkojenik virüslerin izolasyon şekline elde edilmiştir. Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücre genlere 'protoonkogen' adı verilmiştir. Bunlar hücrede önemli rol oynayan, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. 'Onkogenler' ise bu protoonkogenlerin mutant eksprese olan şekilleridir(9).

#### **2.2.1.1.1. Protoonkogenlerin fonksiyonları**

Protoonkogenlerin sağlıklı hücrelerdeki görevleri önem taşıdığından başkalaşıma uğradıklarında zararlı hale gelirler. Sinyal iletiminin, hücre farklılaşmanın ve hücre proliferasyonunun kontrolünde üstlendikleri rol ile onkogen ürünlerinin normal fonksiyonlarının kaybı, hücre düzeyde birbirleriyle ilişkilidir. Sinyal iletimi hücre membranından sitoplazmaya ve nükleusa kadar giden karmaşık ve çok basamaklı bir işlemdir.

Protoonkogenlerin protein ürünleri, temel biyolojik olayları düzenlerler. Protoonkogenler sinyal iletiminde 3 temel noktada fonksiyoneldir. Birincisi, ATP'nin fosfat grubunun transferi ile proteinlerin serin, treonin ve tirozin



aminoasitlerinin fosforilasyonudur. Bu durum protein konfigürasyonunda değişikliğe yol açarak proteinin kinaz özelliğini aktive eder. Böylece sinyal iletimini sağlamaya yönelik hedef proteinler için bağlanma bölgeleri oluştururlar. Bu durum EGF (Epidermal büyüme aktörü) ailesi protoonkogenleri için örnek teşkil eder. İkincisi, RAS ailesi protoonkogenleri için bir örnek teşkil eden GTPaz' lardır. Bunlar GDP/GTP döngüsünde aracı olarak görev yaparlar. Üçüncüsü ise, nükleus içinde yerleşmiş olan proteinleri kapsar. Bunlar gen ekspresyonu, DNA replikasyonu ve hücre döngüsünün kontrolünde görev yaparlar(46).

#### **2.2.1.1.2. Onkogenlerin aktivasyon mekanizmaları**

Onkogenlerin aktivasyonu, hücrel protoonkogenlerdeki değişimleri kapsar. Bu genetik değişimlerin getirdiği sonuçlar da hücre için bir büyüme avantajı sağlar. İnsan neoplazmilerinde yer alan onkogenleri üç genetik mekanizma aktive eder. Mutasyonlar, gen amplifikasyonları ve kromozom yeniden düzenlenmeleridir. Bu mekanizmalar protoonkogen yapısında bir takım değişimlerle veya protoonkogen ekspresyonundaki artışlarla sonuçlanabilir(32).

##### **2.2.1.1.2.1. Delesyon-nokta mutasyonları**

Tek baz değişimleri, delesyonlar ve insersiyonlar gibi çeşitli mutasyon tipleri aktive olan protoonkogenlerin özelliğinden kaynaklanır. Buna karşın insan tümörlerinde karakterize birçok onkogen mutasyonları tek baz değişimlerinin sebep olduğu protein içinde yer alan tek bir aminoasidin değişimidir.

Nokta mutasyonları daha çok *ras* ailesi (*K-ras*, *H-ras* ve *N-ras*) protoonkogenlerinde belirlenmiştir. Belirlenmemiş insan tümörlerinin yaklaşık olarak % 15-20' sinin bir *ras* mutasyonu taşıyabileceği tahmin edilmektedir.

Çalışmalarda *ras* ailesi üyelerinin mutasyonlarının sıklığı gösterilmiş olup, çok çeşitli insan tümörlerinde farklı nokta mutasyonları saptanmıştır. *Ras* mutasyonları sonucu *ras* proteininin sinyal iletim fonksiyonu aktive olur.

Aktive olan nokta mutasyonlarına diğer bir örnek multiple endokrin neoplazi tip 2A sendromu ile sonuçlanan *ret* protoonkogenindeki nokta mutasyonudur. Ret reseptörünün jukstramembran domaininde yerleşmiş sisteinlerden birini etkileyen germline nokta mutasyonları, reseptörün tirozin kinaz aktivitesinin ligand bağlanamamasına sebep olmasına yol açan onkogenik bir problem olarak bulunmuştur(32).

#### **2.2.1.1.2.2. Gen amplifikasyonları**

Protoonkogenler, genin çok sayıda kopyasının oluşması ile aktive olurlar. Kısaca gen amplifikasyonu hücre içindeki genomda yer alan genlerin artışı olarak ifade edilebilir. Bu mekanizma, hücreler çevresel stresle karşı karşıya kaldıkları durumda dahi hücrelerin devamlı olabilme özelliğine sahiplerdir. Gen amplifikasyonu genomik DNA'nın gereğinden fazla replike olması sebebiyle ortaya çıkar ve genellikle homojen olarak boyanmış bölgeler (HSR) veya double-minute kromozomlar (DM) olarak ifade edilen karyotipik bozukluklara sebep olur. DM kromozomlar, sentromer içinde yer alan mini kromozom yapıları ile karakterizedir. HSR' ler ise kromozom üzerinde koyu ve açık renkte boyanan bandların normal görüntünün dışına çıkılması ile ortaya çıkan kromozom segmentleridir. DM' ler ve HSR' ler genin birkaç binden fazla kopya sayısında genomik DNA bölgeleri içerdiğini gösterir. Amplifikasyon hücre büyümesi için seçici bir avantaj sağlayarak genlerin ekspresyonunun artmasına yol açar. Gen amplifikasyonu bir hücrede onkogen kopya sayısını birkaç kattan birkaç yüz kata kadar arttırabilir. Bu durum ise karşılık gelen onkoproteinin çok miktarda üretilmesi ile sonuçlanır. Bu değişimler tümörlerin yaklaşık %10' ununda genellikle erken dönemden çok geç

dönemde görülürler. Spesifik protoonkogenlerin amplifikasyonu kesin tümörlerin özelliklerini yansıtabilir ve MYC gen ailesinde sıklıkla görülür. Örneğin N-MYC nöroblastomların %30' unda amplifiyedir. İnsanda akciğerin küçük hücreli karsinomlarında ayrıca N-MYC, c-MYC ve L-MYC gen amplifikasyonlarının olduğu da gösterilmiştir(32,46).

#### **2.2.1.1.2.3. Kromozom yeniden düzenlenmeleri**

Tekrar eden kromozomal yeniden düzenlenmeler sıklıkla solid tümörler olarak sınıflandırılan hematolojik malignensilerde belirlenmiştir. Hematolojik malignensilerde yeniden düzenlenmeler iki farklı mekanizma ile ortaya çıkar. Bunlar protoonkogenlerin transkripsiyonel aktivasyonu ve füzyon genlerinin oluşumudur. Transkripsiyonel gen aktivasyonu, T-hücre reseptör geni veya immüoglobulin genlerinin bir protoonkogene yakın pozisyona yerleşmesi ile yeni bir düzenlenmeyle sonuçlanan bir mekanizmadır. İki farklı gen bölgesi içinde kromozomal kırık noktaları olduğu zaman kromozomal yeniden düzenlenmeler ile füzyon genleri meydana gelir. Bir genin başı ile diğer genin son kısmının bileşik olarak yapılanmasına sebep olur. Bu şekilde değişerek ortaya çıkan füzyon genleri kimerik proteinler kodlar ve birleşimde yer alan her iki gen de kimerik onkoproteinin değişen aktivitesi için katkı sağlar(32).

#### **2.2.1.1.3. Onkogen ürünlerinin tipleri**

1-Büyüme faktörleri: Hücre döngüsünün başlaması ile sona ermesi arasındaki evre geçişlerini kontrol eden yapılar 'büyüme faktörleri' olarak adlandırılır.

**2-Büyüme faktörü reseptörleri:** Onkogenlerin birçoğu büyüme faktörü reseptörlerini kodlayan proteinleri üretir. Bu reseptörlerin özelliği hücrenin normal kontrol mekanizmalarının ilerlemesini sağlayan tirozin kinaz domainlerine sahip olmalarıdır. 40'tan daha fazla tirozin kinaz olduğu belirlenmiştir. Bunlar iki temel tip ayrılabilirler.

- a) Hücre membranı boyunca uzananlar (büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlar).
- b) Sitoplazma içinde yer alanlar (tirozin kinaz reseptörü dışındakiler).

**3-İntraselüler sinyal iletim faktörleri:** İntraselüler sinyal iletim faktörlerini farklı iki tipi belirlenmiştir.

- a) GTPaz aktivitesi olan proteinler
- b) Sitoplazmik serin tirozin kinazlar

**4-DNA'ya bağlanan proteinler:** Spesifik transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. Yakınlarında bulunan DNA dizilerinin aktivasyon veya inaktivasyonunu sağlayarak gen ekspresyonunu düzenlerler.

**5-Hücre döngüsü faktörleri:** Kanser hücrelerinin bölünme ve büyümelerinin artmasıyla veya hücre ölümünün azalmasıyla sayıları artar. Hücre döngüsünün ilerlemesi boyunca iki noktada düzenlenme olur. G1'den S fazına geçip, S fazında DNA sentezlenmeye başlanacağı zaman birinci düzenlenme noktasıdır. G2'den mitoz (M) geçmeden siklin bağımlı kinazlar kontrolü yapar. Hücre döngüsünün regülasyonundaki bozukluklar, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, GTPaz' lar, nükleer proteinler veya baskılayıcı faktörlerin kaybı siklin bağımlı kinazların aktivasyonuna sebep olur(46).

### **2.2.1.2. Tümör süpresör genler**

Tümör süpresör genlerin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yeteneği ancak ilgili genin her iki allelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur. Bu durumu ifade eden hipotez, “Knudson hipotezi” olarak adlandırılmıştır. Günümüzde bu görüş tek bir tümör süpresör genin iki kopyasının da fonksiyon kaybına neden olan hem herediter hem sporadik kanserler için temel kabul edilen bir model oluşturur.

İlk tümör baskılayıcı gen, ender görülen bir çocukluk tümörü olan retinoblastomun incelenmesiyle tanımlanmıştır. Knudson, retinoblastom gelişmesi için iki mutasyonun gerekli olduğunu açıklamıştır. İşlev kaybına neden olan başkalaşımın çoğunlukla heterozigozite kaybıyla birlikte olur. Kişi ilgili Rb geni açısından heterozigottur. Ancak diğer normal olan allelin de başkalaşıma uğraması durumunda gen fonksiyonunu yapamaz hale gelir. Heterozigosite kaybı, birkaç farklı mekanizma aracılığıyla ortaya çıkar. Mitotik non-disjunction sonucu kromozom kayıpları, kromozomal delesyonlar, homolog mutant allel oluşumuna yol açan iki homolog gen arasındaki karşılıklı dönüşüm gibi mekanizmalar genellikle heterozigosite kaybı ile sonuçlanır. Böylece, bir kansere genetik yatkınlık sendromunda ilk inaktive edici başkalaşım germ hücrelerinde, diğer normal allelindeki ikinci başkalaşım ise bu hücrelerden oluşan somatik hücrelerde ortaya çıkar(9,45,57,70).

Diğer bir tümör süpresör gen transkripsiyon faktörü olarak işlev gören bir protein ürünü olan p53'tür. p53 geninin her iki allelinde oluşan başkalaşım, gen ürününün gerekli uyarıları yapamaz hale gelmesine neden olacaktır. Bu durumda haraplı DNA'ya sahip olan hücrenin arreste girmesi ve tamir edilmesi gerçekleşmeyecektir ki bu da başkalaşım sıklığının artmasına ve hücre genomunun dengesiz olmasına neden olacaktır. p53, DNA hasarı sonucunda ortaya çıkan apoptozis için de gereklidir(1,9,72).

### **2.2.1.3. Stabilite genleri (Caretakers)**

Mutasyon oluştuğunda t m roenezis tamamen farklı bir yolda ilerler. Bu sınıf yanlış eşleşme tamiri, nükleotit eksizyon tamiri ve baz eksizyon (kesip çıkarma) tamiri genlerini içerir. Bu genler, normal DNA replikasyon sürecindeki ortaya çıkan hataların ve mutajenlere maruz kalınma durumunda ortaya çıkan hataların tamirinden sorumludur. Diğer stabil genler kromozomal segregasyon ve mitotik rekombinasyon gibi büyük kromozom parçalarını ilgilendiren kontrol sürecinde yer alır. Stabilite genleri, genetik değişimleri minimumda tutmayı sağlar ve onlar inaktive olduklarında diğer genlerde meydana gelecek mutasyon oranı daha çok artar. Bütün genler, mutasyon oranının artması sonucu olabildiğince etkilenir. Fakat sadece onkogen ve tümör s pros r genlerdeki mutasyonlar, hücre büyümesini ve mutant hücreye seçici büyüme avantajını sağlarlar. Tümör s pros r genlerde olduğu gibi stabilite genlerinin de her iki alleli fizyolojik bir etki sonucu aktive olmalıdır(79).

### **2.3. Akciğer Kanseri**

Bu gün için akciğer kanserlerindeki en önemli sorunlar, tüm dünyada her iki cinste hastalığın artış göstermesi, ileri yaş kadar sık olmasa da geç yaşlarda, özellikle kadınlarda ve histolojik tip olarak adeno kanserlerin sıklığında belirgin artma, tüm tedavilere karşın 5 yıllık sürvi oranlarının ancak % 14-15 gibi düşük olması ve ölümcül seyretmesi, maalesef tek nedeni olarak gösterilen sigara gibi önlenebilir faktörlerden tüm uyarılara ve uğraşlara rağmen uzaklaşılamaması, korunma ve erken tanının istenilen düzeyde yapılamamışdır. Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer almaktadır(20,76).

### **2.3.1. Histolojik Sınıflandırma**

Yeni görüşlere göre tüm akciğer kanserleri tek bir hücreden oluşmakta, gen düzeyindeki değişikliklerle hücreler birbirlerine dönüşmektedir. Patolojik olarak akciğer kanserinde 4 ana histolojik grup bilinmektedir: Skuamoz hücreli (epidermoid) karsinom, adenokarsinom, büyük hücreli karsinom, KHAK (Küçük Hücreli Akciğer Kanseri). Hücre tipi hem tedavi ile hem de prognoz ile çok ilişkilidir. KHAK diğer tiplerle karşılaştırıldığında belirgin olarak farklı davrandığı için, klinisyenler akciğer kanserini KHAK ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK) olarak iki grupta sınıflandırmaktadırlar. Dört büyük grup akciğer kanserinin %95'ni oluşturmaktadır.

Akciğer karsinomları histopatolojik özellikleri açısından önemli ölçüde heterojen bir grup oluşturmaktadır. Sitolojide, bronkoskopik küçük biyopsi örneklerinde bu heterojenlik büyük önem kazanmakta biyopsi, rezeksiyon piyesi ve otopsi materyalleri arasında tip yönünden uyumsuzluklar çıkmaktadır. Histopatolojik sınıflamanın temeli hücre diferansiyasyonuna dayanmaktadır. Ancak son yıllarda immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve genetik çalışmaların ışığında birçok tümörün çıkış hücresi üzerinde farklı görüşler oluşmuştur. İyi diferansiye tümörler dışında, az diferansiye tümörlerde % 40'a varan tanısal uyumsuzluk görülmektedir. Bu oran klinik yaklaşımda büyük önemi olan KHAK ve KHOAK ayırımında bile % 10–20 oranına ulaşabilmektedir(76).

### **2.3.2. Patogenez ve Etyoloji**

Tüm malign tümörler germinatif hücrelerden oluşmaktadır. Akciğer kanserlerinde bu hücreler bronş mukozasında bazal tabaka hücreleri, alveollerde tip 2 alveol hücreleri ve plevra endotelinde mezotel hücreleridir. Buna göre epidermoid karsinomlar bronş epiteli bazal membranına paralel yer alan basal hücrelerden,

küçük hücreli kanserler ise bronş mukozasında yer alan muhtemelen nöroektodermal kökenli orijinli Kulchitsky tipi granüler basal hücrelerden köken alırlar. Bu hücreler orjinleri nedeniyle endokrin ve kemoreseptör fonksiyonlarını gösterebilirler. Adeno kanserler bronş epitelinin müsin salgılayan bezlerinden veya daha nadiren bronkoalveoler epiltelden köken alır. Solunum yolları mukozası sigara dumanı gibi karsinojen etkenlerle uzun süre karşılaşırsa epitelyal değişiklikler meydana gelir. Akciğerdeki epitel hücrelerinde kanser yapıcı maddelerin etkisiyle oluşan mutasyonların ve diğer genetik zedelenmelerin onkogenleri uyardığı ve/veya kanser baskılayıcı genleri işlevsiz bıraktığı gösterilmiştir(75, 76).

Karsinojenik etkiler açısından, sigara ve çok daha az derecede diğer çevresel kötü şartların, akciğer kanserinin oluşmasında etkili olduğu ve genetik değişikliklerin meydana gelmesinden sorumlu olduğuna ilişkin güçlü bulgular vardır. Diğer etkenler küçük rol alarak veya tek başlarına bazı akciğer kanserlerinden sorumludurlar. Buna çevresel ve mesleki hava kirliliği de eklenir. Bu tip neoplazide insidensin arttığı, radyoaktif nedenler ve asbestos işçilerinde (özellikle sigara ile beraberse) ayrıca arsenik, krom, uranyum, nikel, vinyl choloride tuzu ve mustard gazı soluyanlarda gösterilmiştir.

Akciğer kanserinin çoğu, sigara içme alışkanlığına bağlanmasına karşın, ağır sigara içicilerin yaklaşık % 20' sinde akciğer kanseri oluşur. Konak faktörleri bu değişik kişisel duyarlılıkta önemli rol oynarlar. Ailesel soy ağacının analizi, akciğer kanserinin diğer kanserlerle birlikte belli ailelerde daha çok görüldüğünü göstermiştir. Birçok çalışmada akciğer kanserli hastaların ailelerinde, kontrollere nazaran 2–5 kez daha fazla akciğer kanserine rastlandığı gösterilmiştir. Ailelerinde kanser hikâyesi olan sigara tiryakilerinde akciğer kanseri riski, sigara içmeyen ve aile hikâyesi olmayanlardan 30–47 kat daha fazladır. Akciğer kanserli hastaların aile üyelerinde sigara ile akciğer kanseri ve diğer kanserlerin oranındaki artış, konağın karsinojenlere karşı duyarlılık ve direncini etkileyen diğer faktörleri akla getirmektedir(33, 76).



### 2.3.3. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi

Bütün kanserlerde olduğu gibi, akciğer kanserleri de onkogenleri ve tümör süpresör genleri etkileyen genetik değişiklikler sonucu meydana gelir. Tüm sigara içicilerinin sadece % 10-20' sinde akciğer kanseri gelişimi, genetik yatkınlığın önemine işaret etmektedir. Artmış ailesel riskin; yaş, cinsiyet, mesleki maruziyet ve sigara içiciliğinden bağımsız olduğu ve akciğer kanserine predispozisyon yaratan nadir bir otozomal genin Mendelyen kodominant kalıtımı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Son 20 yıl içinde akciğer kanseri moleküler biyolojisinde ortaya çıkan gelişmeler ile, belirli hasta gruplarında adjuvan tedavi, konvansiyonel sitotoksik kemoterapi veya yeni gelişmekte olan özel hedeflenmiş ajanların tedavide kullanımları gündeme gelmiştir. Bu nedenle son yıllarda moleküler biyolojiye dayanan uzun süreli sağ kalımı belirleyebilecek yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır(28, 29).

Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur. Bazı genlerin, özellikle de karsinojen metabolizması ile ilişkili genlerdeki kalıtsal polimorfizmin çeşitli çevresel maruziyetler ile stümulasyonu sonucu bireyde akciğer kanseri gelişme olasılığının arttığı gösterilmiştir. Bunun dışında, DNA tamiri, hücre büyümesi, sinyal iletimi ve hücre siklus kontrolü ile ilişkili genler de akciğer karsinogenezinin değişik aşamalarında hasar görebilir. Akciğer kanserlerinde görülen genomik dengesizlik; pek çok sayısal ve yapısal sitogenetik anormallikleri içerir. Anöploidi, mitotik kontrol noktası fonksiyonlarındaki kayıp ile ilişkilidir. Klinik olarak akciğer kanseri gelişene kadar 10–20 adet genetik hasarın oluşması gerektiği bilinmektedir.

Akciğer karsinogenezinde majör genetik olaylar şöyle sıralanabilir: Onkogenlerin aktivasyonu, tümör süpresör genlerin inaktivasyonu, hücre siklus regülasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler, DNA tamirinde

görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler, büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler(29).

### **2.3.3.1. Akciğer kanserinde onkogen aktivasyonu**

Protoonkogenler değişik yollarla aktive olarak onkogen haline gelirler. Genin yapısal bir bölgesindeki değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucu oluşur. Bir başka mekanizma da genin ekspresyonunu regüle eden bölgede oluşan bir değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına rağmen sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün aşırı miktarda üretilmesidir. Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatör bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu ile de hücre içindeki DNA miktarı artar(29).

Nokta mutasyonları sonucu oluşan değişiklikler en sık RAS onkogen ailesinde (HRAS, KRAS ve NRAS) görülür. RAS mutasyonları KHOAK' lerinin %10-15' inde, adenokarsinomların % 20-30' unda görülmekte, KHAK' lerinde de neredeyse hiç görülmemektedir(12,45). Bu mutasyonlar, hot spot bölgelerde yer alan, içsel GTPaz aktivitesine sahip kodon 12, 13, ve 61'i etkiler. RAS ailesi üyesi genlerin her birinin farklı fonksiyonları halen açığa çıkarılmamış olmakla birlikte akciğer kanseri mutasyonlarının birçoğu KRAS mutasyonlarıdır. Sıklıkla gen amplifikasyonları ile onkogen halini alan bir başka gen ailesi ise Myc gen ailesidir. KHOAK' lerinin %8-20' sinde, KHAK' lerinin %18-31' inde Myc ailesi üyelerinden birinin amplifikasyonu görülmektedir(29,40,48). Onkogen aktivasyonu ile ilişkili meydana gelen değişimlerin yanında, çeşitli büyüme faktörü ve reseptörlerini kodlayan ve bazı akciğer kanseri türlerinde ekspresyonları artmış olan bazı hücre içi sinyal ileticileri ve nükleer transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. (29).

### **2.3.3.2. Akciğer kanserinde tümör süpresör genlerin inaktivasyonu**

Hücre çoğalmasını inhibe eden tümör süpresör genler, birçok kanser çeşidinde olduğu gibi akciğer kanserlerinde de önem taşır. Kanser oluşumuna sebep olan en önemli tümör süpresör genlerden en önemlisi p53' tür. p53, insan kanserlerinde sıklıkla mutanttır. KHOAK' lerinin yaklaşık %50' si, KHAK' lerinin ise %90' nında p53 geni mutasyon sonucu aktive olmuştur. Sigara içimi maruziyeti, p53 mutasyonu gelişme riskini artırır. Retinoblastom geni de akciğer kanserlerinde rastlanan bir diğer tümör süpresör genidir. Hücrel diferansiyasyonda çok önemli role sahip olup, KHAK' lerinin hemen hepsinde görülürken, KHOAK' lerinin % 10-30' unda görülür. P19 ve P27 proteinleri de bu yolda adı geçen ve tümör büyümesinde önemli roller üstlenen, P27 ekspresyonunda azalma KHOAK' lerde kötü prognoz ile ilişkili bulunmuş diğer tümör süpresör genlerdir(23,29).

Akciğer kanseri patogeneğinde en sık görülen erken evre genetik değişiklik kromozom 3p' de allel kaybıdır (KHOAK' lerinin %90'ından fazlası ve KHAK' lerin %100'ü). Akciğer kanserlerinde 3p21.3, 3p14.2 ve 3p12 bölgelerini içine alan kromozom 3p üzerinde üç kesikli bölgede kayıp belirlenmiştir. İnsan genomundaki en yaygın frajil bölgelerden biri FHIT gen bölgesidir. Akciğer kanserlerinde FHIT geni homozigot delesyona uğramış olup, genellikle anormal transkriptler bulundurmaktadır. Akciğer kanserleriyle ilişkili tümör süpresör inaktivitesine sahip bir diğer gen de RASSF1A'dır. RASSF1A ekspresyonu KHOAK' lerinin yaklaşık %50' sinde, KHAK' lerin %90' nında sonradan kazanılmış promotor hipermetilasyonu sebebiyle azalmıştır. Bu hipermetilasyon kötü prognoz ile ilişkilidir. Akciğer kanserinin kötü prognozuyla ilişkili bu tümör süpresör genler dışında 10q üzerinde, 1p, 9p ve 17p'de rastlanan kırılma noktaları yer almaktadır. Ayrıca inaktive olmuş tümör süpresör genlerde DNA promotor bölgesindeki metilasyon değişimleri akciğer kanserinde yer alan önemli epigenetik mekanizmalar arasındadır(17,29,40,65).

### **2.3.3.3. Akciğer kanserinde DNA tamir genleri ve diğer genler**

DNA tamiri ve apoptozis hücre döngüsünün devamı için esastır ve hatalı DNA tamiri karsinogenez gelişiminden sorumlu önemli bir faktördür. DNA hasarını gidermek üzere işlev gören başlıca genler kromozom 3p üzerinde lokalizedir. Kromozom 3p kayıpları akciğer kanseri gelişimini 14 kat arttırmaktadır. Kromozomların uçlarında yerleşmiş TTAGGG dizi tekrarlarından oluşan spesifik proteinler olan telomerler, gen kayıplarını ve gen bozulmasını önleyecek şekilde kromozom bütünlüğünü korurlar. Normal hücrede telomerler kısalarak hücre ölümünü gerçekleştirirken, kanser hücresinde telomeraz aktivitesi sebebiyle kısalan telomerlerin hemen heksamerik yapılarla tamamlandığı görülür. KHOAK hastalarında %80, KHAK hastalarının ise neredeyse %100 oranında telomeraz düzeyi belirlenmiştir. Yüksek telomeraz aktivitesi, ilerlemiş patolojik evrelerde, yüksek hücre proliferasyonu olan KHOAK' lerde görülmüştür(29,40). Kanser hücrelerinin önem teşkil eden bir başka özelliği de apoptozisten kaçıştır. BCL2 proteini, apoptozisi inhibe eden bir proteindir. BCL2 protein düzeyinin, KHOAK' lerde %75-95, KHAK' lerde ise %10-35 oranında artmış olduğu saptanarak bu grup hastalarda proteinin aşırı eksprese olduğu saptanmıştır.

Kanser hücreleri tüm bunlar yanında anjiogenezisi uyarırlar. Birçok çalışmada akciğer kanserlerinde anjiogenezisin artışı ölçülmüş, metastaz sıklığı ve hayatta kalma oranı azlığı ile arasında önemli düzeyde örtüşme saptanmıştır. VEGF, anjiogeneziste önemli rol üstlenmiş bir gendir ve akciğer kanserlerinde genellikle yüksek düzeyde bulunduğu belirlenmiştir(40).

## **2.4. Büyüme Faktörleri**

Büyüme faktörleri, afinite gösterdikleri hücre membran reseptörlerine spesifik olarak bağlanan, normal hücre proliferasyonunu uyaran, çok az miktarları

bile hücrenel aktiviteleri etkileyebilen polipeptitlerdir. Büyüme faktörleri hedef hücrelerinin plazma zarlarını geçme yeteneğine sahip olmadıklarından etkilerini hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Polipeptit büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonu kontrolündeki kritik rollerinden dolayı büyüme faktörü sinyal iletimindeki anormallikler pek çok kanser tipini de içeren çok sayıda hastalığın nedenidir(9,19).

Neoplastik hücrelerin de normal hücreler gibi birçok büyüme faktörünün salınımı ile kendilerine çoğalma avantajı sağlayarak kendi büyümelerini uyardıkları bilinmektedir. Büyüme faktörleri otokrin, parakrin ve jukstakrin yollarla kanser büyümesinde rol oynarlar. Eğer bir tümör hücresi, hem bir büyüme faktörü hem de reseptörünü taşıyorsa kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna ‘otokrin büyüme halkası’ denir. Otokrin halkalar normal hücrelerde de bulunur ve sadece fizyolojik uyarılara yanıt verirler(19,29).

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır ve her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörleri bulunmaktadır.

## **2.5. Hücre Yüzey Reseptörleri**

Tüm hücreler çevrelerinden sinyaller alırlar ve bu sinyallere yanıt verirler. Sinyal iletimi, bir hücrenin yüzeyinde eksprese edilen veya salgılanan değişik sinyal iletimi moleküllerinin, bir diğer hücrede eksprese olan reseptörlere bağlanması ile gerçekleştirilir. Birçok sinyal iletimi molekülünün reseptörlerine bağlanması, hücre metabolizması, hareketi, çoğalması, sağ kalımı ve farklılaşmasını içeren, hemen tüm hücre davranışlarını düzenleyen bir seri hücre içi reaksiyonu başlatır. Çok

hücreli organizmaların hücreleri arasındaki bilgi alışverişini, birçok farklı tipte molekül sağlar. Bu moleküllerin tamamı hücreler tarafından eksprese edilen reseptörlerin bağlanan ligandları olarak işlev görürler. Sinyal iletimi moleküllerinin hedef hücrelerindeki etki yolları farklıdır. Hücre sinyal iletimi, ya bir hücrenin komşusu ile doğrudan etkileşimi ya da salgılanan sinyal iletimi molekülleri ile gerçekleşir. Bunlar dışında hücreler komşu hücrelerin yüzeyindeki sinyal iletimi molekülleriyle etkileşime giren çeşitli hücre yüzey reseptörleri eksprese ederler(1).

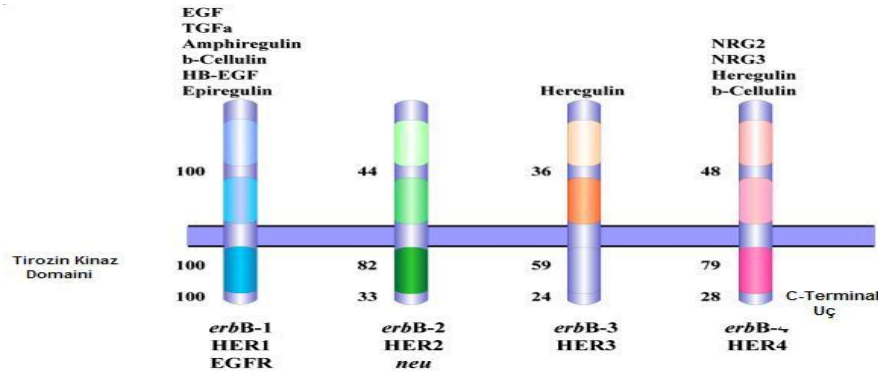
### **2.5.1. Reseptör tirozin kinazlar**

Ligand kontrollü tirozin kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinler tirozin aminoasidine ATP molekülünden fosfat transferini kataliz ederler. Hücrenin dış yüzeyi üzerindeki ligand bağlanma domainine sinyal proteinin bağlanması, hücre içindeki tirozin kinaz domainini aktive eder. Bu domain aktive olduğunda, ATP' den bir fosfat grubu hem reseptör proteinlerin hem de fosforile olmuş reseptörlere bağlanacak olan hücre içi sinyal proteinleri üzerindeki seçilmiş tirozinlere transfer edilir. RTK' lar ve onların büyüme faktörü ligandları, küçük molekül ilaçlar ve antibadiler şeklinde tıbbi ajanlar olarak kullanılmak için makul hedefler haline getirilmiştir(1,21,29).

## **2.6. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri**

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, ErbB-1, HER-1) ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. Ardından aynı reseptör ailesinin üç üyesi daha bulunmuştur. Bunlar, ErbB-2 (HER-2/Neu), ErbB-3 (HER-3), ErbB-4 (HER-4)' dür(39). EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran protein olup hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR ailesi, sinyallerin aktivasyonunu

kontrolünde görev alan, normal gelişim sürecinde rol oynamakla beraber, önemli bir kısmını kanserin teşkil ettiği birçok hastalıkta aktivasyonlarının veya aşırı ekspresyonlarının ilişkisi tespit edilmiştir. EGFR ailesi üyelerine homodimerizasyon veya heterodimerizasyon ile bağlanarak, onların aktivasyonunu sağlayan EGF, transforme edici büyüme faktörü (TGF- $\alpha$ ), heparin bağlayıcı EGF (HB-EGF), amfiregulin (AR), betaselulin (BTC), epiregulin (EPR) ve epigen gibi farklı ligandları vardır. Ancak ErbB-2 bilinen hiçbir liganda bağlanamaz ve ErbB-3 sinyalizasyonu da eksik kalır. Bu sebeple ErbB-2/ErbB-3 heterodimer oluşturarak ayrı bir reseptör oluşturur. Ligandlarının EGFR ile etkileşmesi sonucu EGFR' de dimerizasyon, ve ardından otofosforilasyon olarak, mitojenik sinyalizasyonda yer alan sitoplazmik proteinlerin aktivasyonu meydana gelir(8,21,28,42).



**Şekil 2.2:** EGF reseptör ailesi ve ligandları

([http://www.cancerpublications.com/newsletter/hematological/amger\\_slide/article1/2](http://www.cancerpublications.com/newsletter/hematological/amger_slide/article1/2))

### 2.6.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörlerinin Yapısı

ErbB-1, insanda 7p11.2 pozisyonunda lokalize olmuştur, gen içinde 28 ekzon içerip, 170 kDA' luk glikoprotein kodlar. ErbB-2 ise, 17q11-q21 pozisyonunda lokalize olmuştur, 27 ekzon içeren glikoproteindir. EGFR' ler üç

önemli fonksiyonel domaine sahiptir. Hücre dışında ligandların bağlandığı bir domain, hidrofobik transmembran bir domain ve hücre içinde yer alan sitoplazmik bir tirozin kinaz domaini. Hücre dışı domain L1, CR1, L2 ve CR2 olmak üzere dört farklı bölgeden oluşur. ErbB-1'de L1 ve L2 bölgeleri arasında ligand bağlanırken, ErbB-2'de bu bölgeler arasında güçlü bir etkileşim bulunduğundan ErbB-2'nin ligand bağlama yeteneği kaybolmuştur. Bu sebeple de ErbB-2'nin fonksiyonel olabilmesi için ailenin diğer üyeleriyle heterodimer oluşturması gerekmektedir. CR1 ve CR2 domainleri çeşitli küçük moleküllerden meydana gelmiştir. Her biri bir veya iki disülfid bağıyla bir arada tutulur. Hücre içi domain ise C-terminal düzenleyici bölge ve tirozin kinaz bölgesine sahiptir. TK bölgesi N ve C olmak üzere iki lobtan oluşur. N-terminal lob ve daha büyük C-terminal lob arasında ATP bölgeleri yer alır. EGFR'nin C-terminal lobu tirozin aminoasitleri içerir. Reseptör üzerindeki bu alıcı tirozin aminoasitlerine ATP'nin  $\gamma$ -fosfat gruplarından ATP transfer edilir. Bu şekilde EGFR aracılığıyla sinyal iletimi tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile gerçekleştirilmiş olur(37,42).

### **2.6.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri Sinyal Yolakları**

Reseptör tirozin kinazlar grubunda yer alan EGF1 ve EGF2 reseptörlerinin aldığı sinyallerin hücre içinde takip ettiği 3 yolak vardır:

1-RAS/ERK yolağı: Grb2 veya Shc proteinlerinin fosforile olmuş ErbB resptörlerine bağlanmasıyla ERK yolağı aktive olur. SOS (Son of sevenless) aktive olmuş resptör dimerine bağlanır, daha sonra RAS'ı aktive ederek RAF-1' in de aktive olmasına sebep olur. RAF-1, MEK1 ve MEK2' yi fosforile eder. Daha sonra MEK1, ERK1' i, MEK2 de ERK2' yi aktive eder. Bu yolak hücre proliferasyonu, apoptozis, protein inhibitörünün ve Bcl-2 ailesi üyelerinin artan transkripsiyonu ile sonuçlanır. Böylece hücre devamlılığı sağlanır.



2-PI3 kinaz/AKT (PI-3 kinaz/protein kinaz B) yolağı: EGF önceki yolak yanında bu sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla hücre devamlılığını sağlar. EGF, aktive olan ERBB reseptörüne PI-3 kinazın bağlanması tetikler. Bu olay PI-3' daki domainin fosforile olmuş tirozinlere bağlanması ile gerçekteşir. PI-3 kinazın katalitik alt birimi fosfotidilinozitol(4,5) bifosfatı fosforile ederek PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>' ün oluşmasına yol açar. PI-3 kinaz aynı zamanda RAS' ı da aktive edebilir. Bu, ERK sinyal yolağının aktivasyonu ile hayatta kalım yolakları arasındaki iletişimi gerçekteşirir. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>' ün temel efektörü AKT' tir. AKT, anti-apoptotik proteinlerin transkripsiyonu ile hücre devamlılığını sağlar. Bu süreçte yer alan ara transkripsiyon faktörleri NFKB ve CREB' tür. AKT' nin bir başka downstream hedefi GSK3' tür. GSK3' ün sürekli aktivitesi bazal şartlar altında eIF2B' in fosforilasyonuna ve inhibasyonuna sebep olur. eIF2B protein translasyonunun başlamasını düzenleyen bir proteindir. Bu yüzden GSK' nın AKT ile inaktivasyonu eIF2B' yi defosforile eder. Bu da protein sentezi ve aminoasitlerin depolanmasına yol açar. AKT aynı zamanda mTOR' u aktive eder. mTOR proteini, P70 ribozomal S6 kinaz ve eIF2B bağlama proteinin (4E-BP1) inhibasyonuyla protein sentezini tetikler. Sonuç olarak, bu süreçlerin hepsi EGF' ye yanıt olarak hücre büyümesini ve devamlılığını sağlar.

3-JAK/STAT yolağı: EGF ile başlayan diğer bir sinyal kaskadı JAK/STAT yolağıdır. Bu yolak hücre devamlılığının yanıtlanmasında görev alır. JAK, plazma membranında yer alan STAT proteinlerini fosforile eder. Bu da hücre devamlılığı ile ilişikli genlerin transkripsiyonunu aktive eder(1).

### **2.6.3. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri ve Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri**

EGFR ile karsinogenez arasındaki ilişki normal EGFR' nin aşırı ekspresyonu, reseptörde mutasyon gelişimi ile reseptörün sürekli aktivite kazanması, ligandların aşırı yapımına bağlı olarak fizyolojik ligand-reseptör dengesinin bozulması, fosfotaz aktivitesindeki azalma ve heterodimerizasyondur. Çalışmalarda KHOAK' leri gibi meme, beyin, mesane, kolon, beyin ve over kanserleri gibi çok çeşitli kanserlerde EGFR' nin aşırı eksprese olduğu saptanmıştır. Genellikle immünohistokimyasal metotla araştırılmış hastalarda, KHOAK' lerinin %13-80'inde EGFR ekspresyonu artmış olup, bu artışın hayatta kalabilirlik, tekrarlayabilirlik ve verilecek tedavinin belirlenmesine katkı sağlayabilmesi açısından prognostik önemi vurgulanmıştır. Yapılan pek çok çalışmada ekspresyon artışı olan hastaların küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörlerine karşı da duyarlı olduğu bildirilmiş olup KHOAK hastalarında bu EGFR inhibitörlerinin tedavide kullanılabilir ajanlar olduğunu bildirmişlerdir(34,56). EGFR geninin aşırı ekspresyonundan başka KHOAK' de EGFR' nin tirozin kinaz domaininde çeşitli somatik mutasyonlar rapor edilmiş ve karsinogenez sürecinde ortaya çıkan belli mutasyonlar bildirilmiştir. EGFR geninin 21. ekzonunda, 858. pozisyonunda yer alan lösin-arjinin aminoasit substitasyonu, 19. ekzonundaki karakterize aminoasit 747-750 delesyonları, 20. ekzonunda yer alan 790. pozisyonunda yer alan treonin-metionin aminoasit substitasyonu ile aynı ekzondaki insersiyon tipi delesyonlar ile çok sık görülmemekler birlikte 18. ekzon mutasyonları gen üzerinde saptanmış mutasyonlardır. Bildirilen bu mutasyonların tamamının yine tirozin kinaz inhibitörlerine karşı da duyarlılığı saptanmıştır(7,23,56). Artmış EGFR gen ekspresyonu ve gen mutasyonlarından başka genin kopya sayısında artış KHOAK' lerinde saptanmış değişimlerdendir(47,63).

## 2.7. Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalar, nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniği sunmayı başarmıştır: Real-time PCR tekniği. Bu teknik seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte sonrasında ürün miktarını net olarak belirlemek de oldukça güçtür. Çünkü klasik PCR, başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkarır. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında Real-Time PCR'ı geliştirmişlerdir. Real-Time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süreci boyunca, oluşan ürünün miktarını Real-time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağını takip edilebilmesi, Real-time PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinden tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkân reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü flörsan işaretli probler ile sağlanır(31,67).

### 2.7.1. Kuantitatif Real-Time PCR Metodları

**Mutlak kantifikasyon (Absolute Quantification):** Hedefin konsantrasyonu mutlak değerler olarak ifade edilir. Mutlak kantifikasyon konsantrasyonları önceden bilinen seri olarak dilüe edilmiş eksternal standartların kullanımıyla oluşturulan standart bir eğri yardımıyla yapılır. Konsantrasyonları bilinmeyen örneklerin konsantrasyonlarının belirlenmesi crossing points(Cp) değerlerinin belirlenmesi ile sağlanır. (Cp değeri, PCR içindeki her bir eğriye ait PCR ürünü miktarını gösterdiği varsayılan, bir örneğin PCR amplifikasyonuna başladığı noktayı ifade eder.)

**Rölatif kantifikasyon (Relative Quantification):** Hedefin konsantrasyonu hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. Bu metot ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur(79).

### 2.7.2. Real-Time PCR İçin Kullanılan Problar

Tüm Real-Time PCR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir flörsan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışır. Flörsan boya miktarının ölçümü esasına dayanan bu sistemlerde belli bir diziyeye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan flörsan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziyeye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon problemleri kullanılır.

**Dizi spesifik olmayan flörsan boyalar:** Bu tip boyalar çift iplikli DNA'nın tamamına bağlanabilme özelliği taşıyan etidyum bromid benzeri boyalardır. Real-Time PCR sistemlerinde kullanılan boya SYBR Green I'dir. SYBR Green I, onun emisyon özelliğini önemli ölçüde arttıran bir solüsyon içerisinde bulunduğunda DNA molekülüne bağlanır. PCR boyunca amplifiye olan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak SYBR Green I' in sinyali artacaktır.

**Dizi spesifik flörsan problemler:** Oldukça yüksek hassasiyete sahip floroforlar ile işaretli dizi spesifik problemlerdir. Reaksiyon içerisinde sadece spesifik hedef mevcut ise flörsan artışı gözlenir. Bu reaksiyonlarda ürünün belirlenmesi için melting curve analizine genellikle ihtiyaç duyulmaz. Bu hassas dizi spesifikliğinden dolayı primer dimerleri gibi ürünlere bağlı ekstra görüntüler elde edilmeyecektir. Buna rağmen reaksiyon sırasında bu tip görüntülerle karşılaşılabilen ve bu durum PCR hassasiyetini ve verimliliğini düşürmektedir. Dizi spesifik flörsan problemler de yapılmak istenen çalışmaya göre çeşitlilik gösterir.

**SimpleProbe Format:** Tek işaretli problemler, mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) taranmasında kullanılan, basitçe dizayn edilmiş hibridizasyon problemlerinin özel bir tipidir. ‘SimpleProbe Format’ olarak adlandırılan bu problemler, sadece bir floroforla işaretlenmiş ve sadece bir hibridizasyon probuna ihtiyaç duyan dizi spesifik problemlerdir. Bir prob, SNP’yi içeren hedef diziyeye hibridize olacak şekilde spesifik olarak dizayn edilir. Hedef diziyeye bir kez hibridize olmasıyla, hibridizasyon olmadığı durumda SimpleProbe prob çok miktarda flöresan emer. Bu problemler, flöresan miktarındaki değişikliklerin, sadece probun hibridizasyon düzeyine göre belirleme prensibine göre dizayn edilir.

**Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ile dizi spesifik prob kullanımı:** Çoğu dizi spesifik prob formatları “FRET” olarak adlandırılan teknolojiye dayalı olarak dizayn edilir. FRET, flöresan ile işaretli bir molekülün enerjisinin, bir diğer komşu flöresan moleküle aktarılması prensibine dayanır. FRET için sağlanması gereken temel koşullar vardır. Verici (donor) ve alıcı (acceptor) moleküller birbirlerine oldukça yakın konumlanmalıdır, alıcının uyarım spektrumu, vericinin yayılım spektrumu örtüşmelidir, alıcının ve vericinin dipol yerleşimi neredeyse paralel olmalıdır.

**Hibridizasyon Probe Format:** Hibridizasyon prob formatı özel olarak dizayn edilmiş iki oligonükleotid dizisi kullanır. Yakın pozisyonda hibridize olan bu oligonükleotitler, PCR’ın bağlanma basamağı boyunca amplifiye olan fragmenti içerisindeki dizilerdir. Verici probun 3’ ucu flöresin gibi flöresan bir boya ile, alıcı probun 5’ ucu ise florofor gibi farklı bir flöresan boya ile işaretlenir. İki oligonükleotid PCR’ın bağlanma basamağı sırasında hedef üzerinde yer alan komşu bölgelere bağlandığı zaman bu işaretler birbirlerine yakın konumlanır. FRET’in oluşması ancak böyle bir yerleşimle mümkün olmaktadır. Birinci prob üzerindeki verici boyanın enerjisi ikinci hibrid prob üzerindeki alıcı boyayı uyarır. Bunu takiben farklı dalga boylarında flöresan ışık salınımı gerçekleşir ve Real-Time PCR sistemi bu salınan ışık miktarını belirler. Salınan bu flöresan miktarı PCR boyunca

oluşan hedef DNA miktarı ile orantılıdır. Hibridizasyon prob formatı kantifikasyon için, melting curve çalışmalarında, mutasyon saptama ve SNP analizleri için uygundur.

**Hydrolysis Probes (TaqMan):** Bu problemlerin kullanımında Taq Polimeraz'ın 5'→3' aktivitesinden faydalanılır. Taq Polimeraz'ın 5'→3' aktivitesi ile hidroliz problemleri hidrolize olduğu zaman problemler flöresan yayılımı yapar. Bu yöntem, spesifik hedef DNA dizisinin artışı belirleyen 3'yönünde uzama yapmayan tek bir problemin bağlanması kullanır. Bu tek prob flöresan özelliğe sahip hem raportör (reporter) hem söndürücü (quencher) özellikte boyaya sahiptir. Söndürücü boya, raportör boyaya, raportör boyanın flöresan sinyalinin baskılayabilecek kadar yakın konumlanmıştır. PCR boyunca polimerazın 5'nükleaz aktivitesi probe keser, raportör ile söndürücü ayrılır ve raportör boyanın flöresan salınımına izin verir. PCR ürününün artışı söndürücü boyanın artışı ile direkt olarak izlenebilir. TaqMan PCR yönteminde amplifikasyon sonrası tüm problemler parçalanması melting curve analizine izin vermez. Bu sebeple bu tip çalışmalar mutasyon ve SNP taraması için farklı deneysel yöntemlere ihtiyaç duyar(50).

Kantitatif Real-Time PCR teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren, hassasiyeti iyi olan bir uygulamadır. Farklı dilüsyon oranlarında hazırlanmış standart eğrilerin kullanımı ile örnekler ve deneyler arasında karşılaştırma imkânı sağlayan, internal standartlar yardımı ile başlangıç miktarı farklılığından kaynaklanacak problemlere son veren yüksek verimde sonuçlar sağlamaktadır. Pek çok uygulaması kanser araştırmaları için fırsat yaratmış olmasıyla birlikte, tümör davranışıyla ilgili araştırmacıya ve klinisyene büyük ölçüde bilgi sağlamaktadır(41).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Gereçler

Real-time PCR System (LightCycler480 Roche)

96'lık PCR plakaları ve kapaticıları (Roche)

Spektrofotometre (Eppendorf)

Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Spektrofotometre Küvetleri (Eppendorf)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

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

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Elektroforez aleti (Consort E844)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Su banyosu (Nüve)

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Vorteks (Heidolph)

Pipet uçları (10'luk,200'lük ve 1000'lik)

Deep-freeze (Meraeus)

Buzdolabı (Arçelik)

Santrifüj tüpleri

Eppendorf Tüpü (1,5 ml lik)

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DNA Ekstraksiyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)  
LightCycler® 480 Probes Master Mix (Roche)  
LightMix® Kit *HER2/neu* (TIB MOLBIOL)  
EGFR prob ve primerleri (TIB MOLBIOL)  
Ksilol (Merk-1.08685.2500)  
Doku Parçalayıcı Tampon (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer)(Roche-Lot:  
13562000)  
Etanol (95%) (Tekel)  
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)  
Agoroz (Sigma-Lot: 072K0059)  
Etidyum Bromid (Sigma)  
Proteinaz K (QIAGEN)  
Enjektörlük bidistile su  
Distile su



## 3.2. Yöntemler

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

1. Parafinli dokudan 5 µm ‘ lik kesitler alınmıştır ve ependorf tüpü içerisine konulmuştur.
2. İçinde kesit bulunan ependorf tüpüne 1200 µl ksilol eklenmiş ve 15 saniye vorteks yapılmıştır. Örnekler 70<sup>0</sup> C’ ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. En yüksek devirde (14000 rpm) 3 dakika santrifüj edilerek, süpernatantı atılmış ve aynı işlem iki defa daha tekrarlanmıştır.
3. Pelet üzerine süzölmüş %100’ lük etanoldan 1200 µl konularak 70<sup>0</sup> C’ ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra birkaç saniye hafifçe vorteks yapılmıştır.
4. 3 dakika 14 bin rpm’da santrifüj yapılarak süpernatantı atılmıştır.
5. Pelet, etüvde 20 dakika kurutulmuştur.
6. 180 µl buffer ATL + 20 µl Proteinaz K konularak birkaç saniye vorteks yapılmıştır, 56<sup>0</sup> C‘ de çalkalamalı su banyosunda bir gece bekletilmiştir.
7. İnkübasyon sonunda örnekler birkaç saniye vortekslenerek 8000 rpm’ ye ayarlanmış santrifüjde 2 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatantlar alınarak ayrı bir tüpe aktarılmıştır.
9. İlk tüpteki peletin üzerine tekrar 180 µl buffer ATL + 20 µl Proteinaz K konularak birkaç saniye vorteks yapılmıştır, 56<sup>0</sup> C ‘ de çalkalamalı su banyosunda bir saat bekletilmiştir.
10. Su banyosundan alınan örnekler birkaç saniye vortekslenerek 8000 rpm’ ye ayarlanmış santrifüjde 2 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Süpernatantlar daha önce aktarılan süpernatantlarla birleştirilmiştir.
12. Elde edilen örnekler Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu’na uygun ekstraksiyon protokolü ayarlanarak yüklenmiştir.

### 3.2.2. İzole Edilen DNA Örneklerinin Real-Time PCR Yöntemiyle Analizi

#### 3.2.2.1. HER-2/neu onkogeninin Real-Time PCR ile kantifikasyonu

- LightMix® Kit HER2/neu ile örnek başına 15 µl' lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Plaka kuyucuklarına dağıtıldı.
- Reaksiyon karışımı kit içerisinde yer alan ve kopya sayıları bilinen ( $10^1$ - $10^6$  arasında  $10^3$ 'ar kat aralıklarla) 6 standart için de dağıtıldı.
- Hazırlanan reaksiyon karışımı üzerine örneklerden elde edilen DNA'lardan ve standartlardan 5'er µl (20-250 ng DNA) eklendi.

**Tablo 3.1.** Kullanılan HER-2/neu LightCycler480 PCR programı

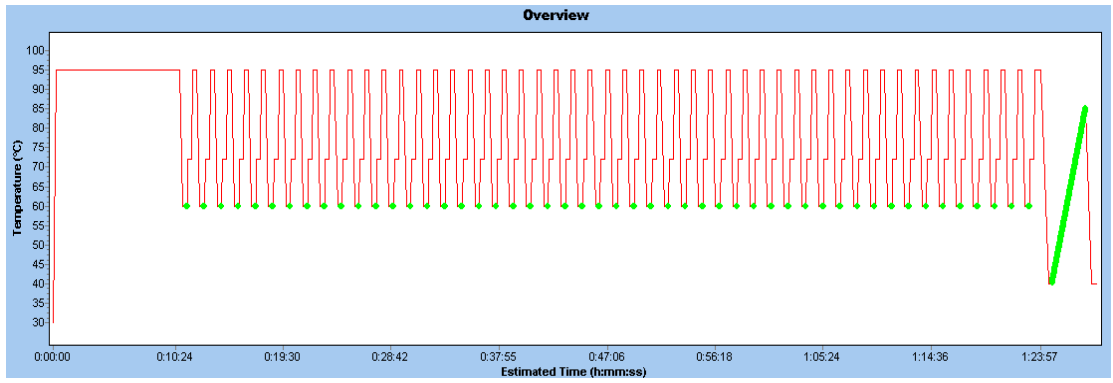
<b>Program:</b>	<b>Denatürasyon</b>	<b>Cycling</b>	<b>Melting</b>	<b>Cooling</b>
<b>Parametre</b>				
<b>Analysis mode:</b>	None	Kantifikasyon	Melting Curves	None
<b>Cycles:</b>	1	50	1	1
<b>Segment:</b>	1	1 2 3	1 2 3	1
<b>Sıcaklık(95°C):</b>	95	95 60 70	95 40 85	40
<b>Süre(mm:ss):</b>	10:00	00:10 00:10 00:10	00:20 00:20 00:20	00:30
<b>Ramp Rate(°C/s):</b>	4.4	4.4 2.2 4.4	4.4 1.5 -	
<b>Acquisition mode:</b>	None	None Single None	None None Continu.	None
<b>Acquisition(per°C)</b>				1

Program Name	Cycles	Analysis Mode
DENATURASYON	1	None
CYCLING	50	Quantification
MELTING	1	Melting Curves
COOLING	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.4	0	0	0	0
60	Single	00:00:10	2.2	0	0	0	0
72	None	00:00:10	4.4	0	0	0	0

Şekil 3.2. HER-2/neu geni için kullanılan PCR şartları



Şekil 3.3. HER-2/neu genine ait amplifikasyon döngüleri (PCR'ın her basamağının 50 döngü sonunda tamamlandığını gösteren görüntü)

### 3.2.2.2. EGFR onkogeninin Real-Time PCR ile kantifikasyonu

- EGFR gen kantifikasyonu bu çalışmaya özel dizayn edilmiş primer ve prob çiftleri kullanılarak belirlenmiştir.
- EGFR geni için kullanılan primer ve prob dizileri:

Primer F: 5'- TGCCAAGTCCTACAGACTCCAA- 3'

Primer R: 5'- GCTCAGGAGGGGAGTCCGT- 3'

Prob FL: GAGGTACTCGTCGGCATCCACC-FL

Prob LC: CGTCGTCCATGTCTTCTTCATCCATC-PH

- **EGFR geni için kullanılan standartların hazırlanması:** EGFR gen kantifikasyonu için hazırlanan prob ve primerler ve bu reaksiyona özgü program kullanılarak bir miktar PCR ürünü elde edildi. Bu PCR ürününün konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülerek; 1 mol = molecular weight (MW) [g] ve 1 mol =  $6 \times 10^{23}$  molecules (= copies) bilgileri eşliğinde aşağıdaki formül kullanılarak 1  $\mu$ l' deki kopya sayısı elde edilmiştir.

**Tablo 3.2.** Real-Time PCR ile gen kopya sayısının hesaplanması

$$\frac{6 \times 10^{23} [\text{kopya/mol}] \times \text{konsantrasyon} [\text{g}/\mu\text{l}]}{\text{MW} [\text{g/mol}]} = \text{Kopya sayısı}/\mu\text{l}$$

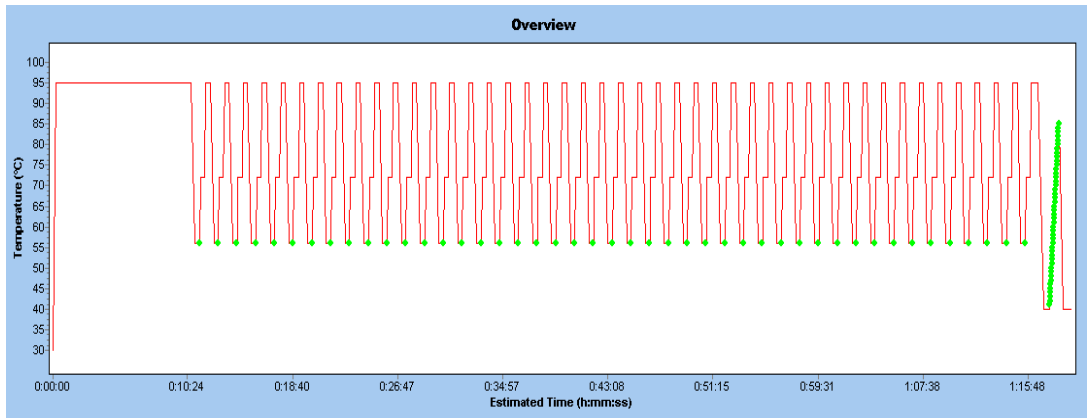
- Elde edilen kopya sayısı üzerinden seri dilüsyonlarla bilinen kopya sayılarında ( $10^3$ - $10^6$  arasında 10'ar kat aralıklarla) ürünler elde edilerek 4 standart elde edilmiştir.
- Örnek başına 15  $\mu$ l' lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Plaka kuyucuklarına dağıtıldı.
- Hazırlanan reaksiyon karışımı üzerine örneklerden elde edilen DNA'lardan ve standartlardan 5'er  $\mu$ l (20-250 ng DNA) eklendi.

**Tablo 3.3.** Kullanılan EGFR LightCycler480 PCR programı

<b>Program</b>	<b>Denatürasyon</b>	<b>Cycling</b>	<b>Melting</b>	<b>Cooling</b>
<b>Parametre</b>				
<b>Analysis mode:</b>	None	Kantifikasyon	Melting Curves	None
<b>Cycles:</b>	1	50	1	1
<b>Segment:</b>	1	1 2 3	1 2 3	1
<b>Sıcaklık(95°C):</b>	95	95 56 70	95 40 85	40
<b>Süre(mm:ss):</b>	10:00	00:10 00:10 00:10	00:20 00:20 00:20	00:30
<b>Ramp Rate(°C/s):</b>	4.4	4.4 2.2 4.4	4.4 1.5 -	1.5
<b>Acquisition mode:</b>	None	None Single None	None None Continu.	None
<b>Acquisition(per°C):</b>				1

Run Protocol		Data		Run Notes			
Setup							
Detection Format	Mono Color Hydrolysis Probe	Block Type	96	Plate ID			
				Reaction Volume	20		
Programs							
Program Name	Cycles	Analysis Mode					
Denaturation	1	None					
Cycling	45	Quantification					
Melting	1	Melting Curves					
cooling	1	None					
Cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.4		0	0	0
56	Single	00:00:10	2.2		0	0	0
72	None	00:00:10	4.4		0	0	0

Şekil 3.4. EGFR geni için kullanılan PCR şartları



Şekil 3.5. EGFR genine ait amplifikasyon döngüleri(PCR'ın her basamağının 45 döngü sonunda tamamlandığını gösteren görüntü)

### 3.2.2.3. Değerlendirme

- Belirtilen PCR programı tamamlandıktan sonra Second Derivative Maximum metodu ile sonuçlar analiz edildi.
- Reaksiyon sırasında kullanılan eksternal standartlar aracılığıyla hedeflerin ve referansların kopya sayıları hesaplandı.

- Tüm örneklerin kopya sayılarına göre hedefler ve referanslar için farklı filtre kombinasyonlarında, hedef için kanal 640, referans için kanal 670 kullanılmak üzere Cp değerleri otomatik olarak hesaplandı.
- Hedefler için mutlak olarak elde edilen kopya sayıları, referans için mutlak olarak elde edilen kopya sayısına oranlanarak sonuçlar değerlendirildi.
- Değerlendirme kit içerisinde belirlenen standart veriye göre yapılmıştır

**Tablo 3.4.** Real-Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

HER2/neu kopya sayısı/ Referans kopya sayısı	<2.0	>2.0
	negatif	<b>pozitif</b>

#### 4. BULGULAR

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olguda EGFR ve HER-2/neu onkogenlerinin amplifikasyonlarının Real-Time PCR yöntemi ile incelenmesi hedeflenmiştir. Olguların cinsiyetleri, sigara kullanımlarının olup olmaması, histopatolojik bulguları ve aile öyküleri hasta dosyalarından temin edilmiştir.

İncelemeye alınan tümör dokularına sahip olguların 32’si kadın, 68’i erkek olup, yaş ortalaması  $58,98 \pm 3,4$  olarak saptandı. Olguların bir kısmı sigara kullanıcısı olmakla birlikte, ailede kanser öyküsü bulunan olgular da mevcut olup bu dağılımlar çizelgelerde ayrıntılı olarak belirtilmektedir(Tablo 4.1. ve 4.2.).

**Tablo 4.1.** Çalışma olgularının cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları

	n	%
<b>Cinsiyet</b>		
Kadın	32	32,00
Erkek	68	68,00
<b>Sigara</b>		
Evet	90	90,00
Hayır	10	10,00
<b>Aile öyküsü</b>		
Var	26	26,00
Yok	74	74,00
<b>Toplam</b>	100	100



**Tablo 4.2.** Çalışma olgularının grade ve histopatoloji bilgilerine göre dağılımları

	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Grade</b>		
1	2	2,00
2	12	12,00
3	86	86,00
<b>Histopatoloji</b>		
Squamöz	46	46,00
Adenokarsinom	54	54,00
<b>Toplam</b>	100	100

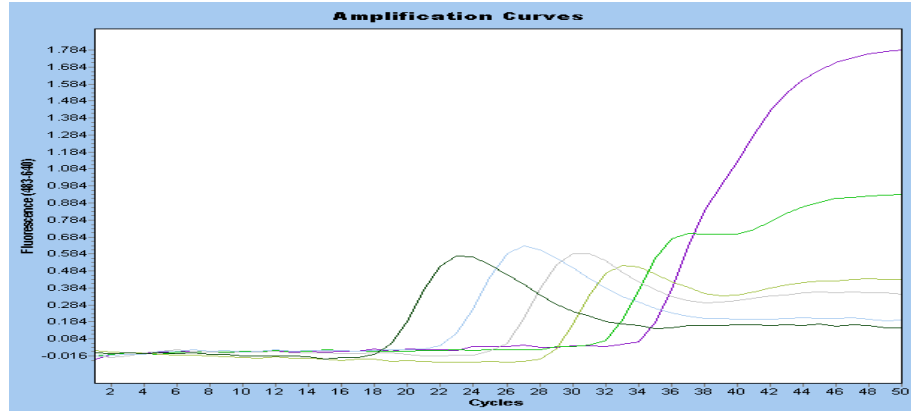
#### 4.1. Yönteme İlişkin Bulgular

Magna Pure Compact DNA ekstraksiyon robotu ile parafine gömülü 100 doku örneğinin her birinden 20-25 ng DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri ile sisteme ve çalışmaya özgü kit içerisinde standart olarak hazırlanmış referans genin kopya sayıları LightCycler480 Real-Time PCR sistemi ile belirlenmiştir. Ayrıca gen kopya sayılarının ölçümü için seri olarak dilüe edilmiş ve kopya sayıları bilinen standartlar kullanılmış olup bu standartlar olgu DNA'ları ile birlikte çalışmaya dahil edilmiştir. Bu standartların gen kopya sayıları ile olgulardan elde edilen gen kopya sayılarının doğru bir şekilde ölçülmesi için HER-2/neu ve referans geni ile EGFR ve referans geni için ayrı birer standart eğri oluşturulmuştur. Hedef ve referans genlerin okunmasında farklı floresan kanallar kullanılarak hedef ve referansların ayırımı yapılabilmektedir. Böylece bu sistem ile tüm DNA örneklerinin ve referans genin kopya sayıları hedeflendiği gibi kantitatif olarak ölçülmüştür.

Real-Time PCR ile HER-2/neu gen amplifikasyonu bulunan olgulara ait elde edilen kantitatif değerlerden hesaplanan ortalama değer 6.87 ve EGFR gen amplifikasyonu bulunan olgulara ait elde edilen kantitatif değerlerden hesaplanan ortalama değer 3.97 olarak saptanmıştır.

Samples				Results		
Include	Color	Pos	Name	CP	Concentration	Stand...
<input checked="" type="checkbox"/>		C1	std-1	34.02	1.00E1	1.00E1
<input checked="" type="checkbox"/>		C2	std-2	31.13	9.89E1	1.00E2
<input checked="" type="checkbox"/>		C3	std-3	27.55	1.19E3	1.00E3
<input checked="" type="checkbox"/>		C4	std-4	24.62	9.10E3	1.00E4
<input checked="" type="checkbox"/>		C5	std-5	21.51	7.91E4	1.00E5
<input checked="" type="checkbox"/>		C6	std-6	17.62	1.18E6	1.00E6
<input checked="" type="checkbox"/>		C7	16597	25.24	5.92E3	
<input checked="" type="checkbox"/>		C8	2693	22.27	4.66E4	
<input checked="" type="checkbox"/>		C9	4030	22.01	5.61E4	

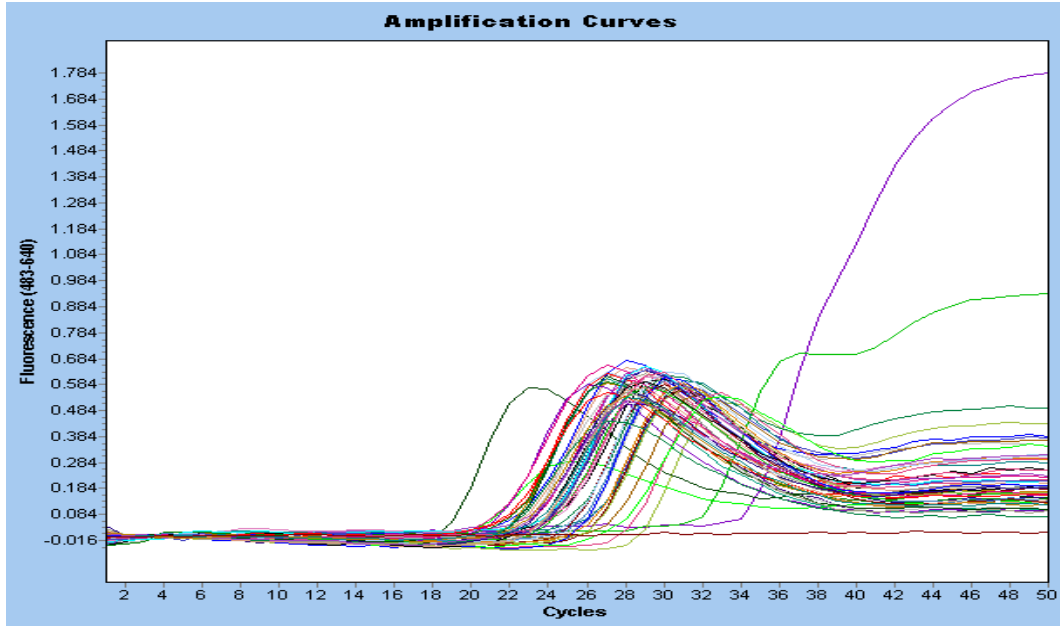
Şekil 4.1. HER-2/neu için kullanılan referansa özgü standartların konsantrasyon ve Cp değerleri( $10^1$ - $10^6$  arasında kopya sayısına sahip standartlar).



Şekil 4.2. HER-2/neu için kullanılan referansa özgü standartların amplifikasyon eğrileri(Farklı konsantrasyonlara sahip standartların reaksiyona girdikleri döngüler).

Samples				Results		
Include	Color	Pos	Name	CP	Concentration	Stand...
<input checked="" type="checkbox"/>			C1 std-1	34.02	1.00E1	1.00E1
<input checked="" type="checkbox"/>			C2 std-2	31.13	9.89E1	1.00E2
<input checked="" type="checkbox"/>			C3 std-3	27.55	1.19E3	1.00E3
<input checked="" type="checkbox"/>			C4 std-4	24.62	9.10E3	1.00E4
<input checked="" type="checkbox"/>			C5 std-5	21.51	7.91E4	1.00E5
<input checked="" type="checkbox"/>			C6 std-6	17.62	1.18E6	1.00E6
<input checked="" type="checkbox"/>			C7 16597	25.24	5.92E3	
<input checked="" type="checkbox"/>			C8 2693	22.27	4.66E4	
<input checked="" type="checkbox"/>			C9 4030	22.01	5.61E4	
<input checked="" type="checkbox"/>			C10 4246	19.15	4.09E5	

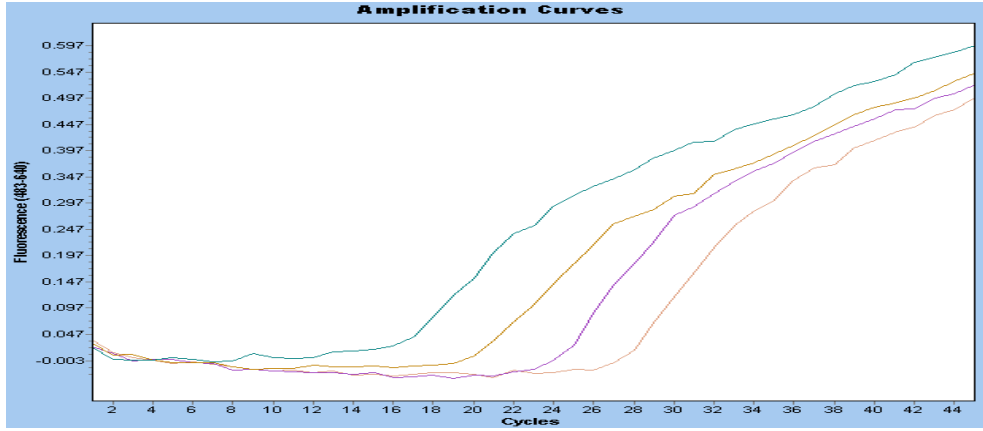
Şekil 4.3. HER-2/neu için incelenen olguların konsantrasyon ve Cp değerleri( $10^1$ - $10^6$  arasında kopya sayısına sahip standartlar ve olgular).



Şekil 4.4. HER-2/neu için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri(Farklı kopya sayısına sahip bir grup olgunun reaksiyona girdikleri döngüler)

Samples				Results		
Include	Color	Pos	Name	CP	Concentration	Stand...
<input checked="" type="checkbox"/>		C1	std-1	34.02	1.00E1	1.00E1
<input checked="" type="checkbox"/>		C2	std-2	31.13	9.89E1	1.00E2
<input checked="" type="checkbox"/>		C3	std-3	27.55	1.19E3	1.00E3
<input checked="" type="checkbox"/>		C4	std-4	24.62	9.10E3	1.00E4
<input checked="" type="checkbox"/>		C5	std-5	21.51	7.91E4	1.00E5
<input checked="" type="checkbox"/>		C6	std-6	17.62	1.18E6	1.00E6
<input checked="" type="checkbox"/>		C7	16597	25.24	5.92E3	
<input checked="" type="checkbox"/>		C8	2693	22.27	4.66E4	
<input checked="" type="checkbox"/>		C9	4030	22.01	5.61E4	

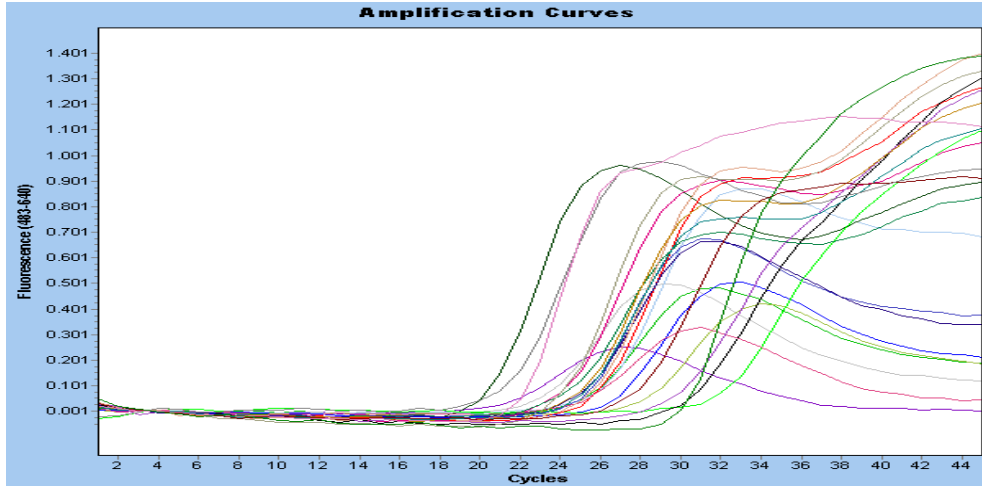
Şekil 4.5. EGFR için kullanılan referansa özgü standartların konsantrasyon ve Cp değerleri( $10^1$ - $10^6$  arasında kopya sayısına sahip standartlar).



Şekil 4.6. EGFR için kullanılan referansa özgü standartların amplifikasyon eğrileri(Farklı konsantrasyonlara sahip standartların reaksiyona girdikleri döngüler).

Samples				Results		
Include	Color	Pos	Name	CP	Concentration	Stand...
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C1	17797	20.69	2.64E5	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C2	1298	24.69	2.05E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C3	16579	27.42	3.12E3	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C4	16211	22.57	8.00E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C5	157	25.79	9.76E3	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C6	1227	19.73	4.86E5	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C7	13594	24.48	2.35E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C8	17611	23.72	3.83E4	

Şekil 4.7. EGFR için incelenen olguların konsantrasyon ve Cp değerleri( $10^1$ - $10^6$  arasında kopya sayısına sahip standart ve olgular).



Şekil 4.8. EGFR için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri(Farklı kopya sayısına sahip bir grup olgunun reaksiyona girdikleri döngüler)

## 4.2. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları

Çalışmamızda söz konusu parametreler ve hedef genlerin amplifikasyon durumları için SPSS 13.0 istatistik programında,  $\chi^2$  istatistik testi kullanılarak Fisher ve Pearson'a göre p değerleri hesaplanmıştır. Tüm bu parametrelere göre elde edilen istatistiksel sonuçlar, HER-2/neu ve EGFR genlerinin kopya sayılarındaki artışla bu parametreler arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermiştir.

Hem HER-2/neu hem EGFR genlerinin gen kopya sayılarındaki artışları ya da amplifikasyonları açısından incelenen olgulara ilişkin kantitatif Real-Time PCR verileri farklı parametrelere göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İncelenen 100 olgunun %18' inde HER-2/neu geni için amplifikasyon, %26'sında ise EGFR geni için amplifikasyon saptanmıştır. Bu sonuçların cinsiyet, grade, sigara kullanımı, aile öyküsü ve histopatolojik dağılımlarına göre istatistiksel verileri elde edilmiştir. Bu verilere ilişkin hesaplanan değerler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2' de belirtilmiştir.

**Tablo 4.3.** Çalışma olgularında Real-Time PCR yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları

Real-Time PCR	Cinsiyet (P=0,489)		Sigara (p=0,201)		Aile öyküsü (p=0,234)	
	Kadın (%)	Erkek (%)	Evet (%)	Hayır (%)	Var (%)	Yok (%)
HER2						
Pozitif	7 (7)	11 (11)	18 (18)	0	8 (8)	10 (10)
Negatif	25 (25)	57 (57)	72 (72)	10 (10)	18 (18)	64 (64)
Toplam (n=100)	32 (32)	68 (68)	90 (90)	10 (10)	26 (26)	74 (74)
	Cinsiyet (p=0,740)		Sigara (p=0,281)		Aile öyküsü (p=0,519)	
EGFR	Kadın (%)	Erkek (%)	Evet (%)	Hayır (%)	Var (%)	Yok (%)
Pozitif	9 (9)	17 (17)	22 (22)	4 (4)	8 (8)	18 (18)
Negatif	23 (23)	51 (51)	68 (68)	6 (6)	18 (18)	56 (56)
Toplam (n=100)	32 (32)	68 (68)	90 (90)	10 (10)	26 (26)	74 (74)

\* Pozitif: Kopya sayısı artışı var

Negatif: Kopya sayısı artışı yok, normal

**Tablo 4.4.** Çalışma olgularında Real-Time PCR yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların grade ve histopatoloji bilgilerine göre dağılımları

Real-Time PCR	Grade			Histopatoloji (p=0,884)	
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Squamöz (%)	Adenokarsinom (%)
HER2					
Pozitif	0 (0)	2 (2)	16 (16)	12 (12)	6 (6)
Negatif	2 (2)	10 (10)	70 (70)	40 (40)	42 (42)
Toplam(n=100)	2 (2)	12 (12)	86 (86)	52 (52)	48 (48)
	Grade			Histopatoloji (p=0,661)	
EGFR	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Squamöz (%)	Adenokarsinom (%)
Pozitif	1 (1)	3 (3)	22 (22)	11 (11)	15 (15)
Negatif	1 (1)	9 (9)	64 (64)	35 (35)	39 (39)
Toplam(n=100)	2 (2)	12 (12)	86 (86)	46 (46)	54 (54)

\* Pozitif: Kopya sayısı artışı var

Negatif: Kopya sayısı artışı yok, normal



## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Parafine Gömülü Dokulardan DNA Elde Etme Protokollerinin Karşılaştırılması

Yapılan bu çalışmada en zor ve zaman alan basamak parafine gömülü dokulardan DNA elde etme basamağı olmuştur. DNA ekstraksiyonu için kullanılan ilk protokol hazır DNA ekstraksiyon kitinde tavsiye edilen protokol olup, bu protokolün ilk denemelerinde gerekli kalite ve miktarda DNA elde edilememiştir. Parafin bloklara gömülü bulunan dokuların, parafinden yeterince uzaklaştırılmadığı düşünülerek farklı protokol arayışına gidilmiştir. Literatür taramalarında, parafine gömülü dokulardan DNA elde etme aşamasında benzer problemlerle karşılaşıldığı görülmüştür. Fakat bu çalışmalarda, parafine gömülü dokulardan DNA elde etme protokollerinde karşılaşılan problemlerin, çözümüne ilişkin ayrıntılı bilgi verilmemiş olup, yayınların birçoğunda kullanılan protokol ve kimyasallar dahi belirtilmemiştir. Foster ve arkadaşları(15) 2005 yılında yayınlanan çalışmalarında parafine gömülü akciğer dokularından DNA elde etmişlerdir. DNA eldesinin deparafinizasyon basamağında uyguladıkları protokolde, parafin kesitlerini 50 µl proteinaz K parçalama tamponunda 55°C' de 24 saat inkübasyona bırakmışlardır. Bu protokolde zor olan kısım, kullanılan proteinaz K parçalama tamponunun içeriğinin hazırlanması ve süresinin uzun olmasıdır. Buna rağmen çalışmamızda bu protokol denenmiş ve yine gereken miktarda DNA elde edilememiştir. Dacic S.(11) ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, dokular sadece proteinaz K solüsyonunda bekletilerek DNA elde edilmiştir. Tanımlanan protokol oldukça basit ve kısa görünmektedir. Ancak çalışmamızda bu protokol takip edildiğinde hiç DNA bandı görülemedi. Tanaka ve arkadaşları(60), yayınlanan çalışmalarında deparafinizasyon için ksilol kullanmışlar, ardından proteinaz K solüsyonunda bekletmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan protokol, bizim çalışmamız için de en iyi DNA elde edilen protokol olmuştur. Çalışmamızda en

önemli modifikasyonlar bu yayında izlenen protokoller üzerinde yapılmıştır. Burada ana problemin parafinin dokulardan uzaklaştırılmasında olduğu düşünüldüğünden başlangıçta takip ettiğimiz kit protokolünde, doku kesitleri ksilol içerisinde bekletilmeden sadece ksilol ile vortekslenip uzaklaştırılmıştır. Bu işlemlerin sonucunda parafini yeterince uzaklaştırılmayan dokularda yeterince homojenizasyon sağlanamaması ve dokuların parçalanamaması sebebiyle yeterli miktarda DNA elde edilemedi.

Parafin bloğa gömülü dokudan elde edilen DNA miktarının kullanılan doku tipine göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Akciğer dokusu, diğer organlara göre farklılık gösteren hücresel kuruluşundan dolayı, diğer dokulara oranla daha az DNA elde edilen dokulardandır. Akciğerin geniş hava boşluklarından oluşan histolojisi hücre sayısında azlığa, bu boşluklara parafinin dolması nedeniyle parafinin diğer doku kesitlerine oranla daha zor uzaklaştırılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bizim çalışmamızda kit protokollerinde tavsiye edilen kesit sayısından fazla kesit kullanarak bu güçlüğün üstesinden gelinmiştir. Literatürde tavsiye edilen yöntemlerden bazılarında dokuları 65°C’ de 1 saat etüvde bekletilmesi önerilmiştir. Çalışmamızda bu protokoller biraz daha genişletilip, modifiye edilerek, dokular ksilol içerisinde 65°C’ deki su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Bu aşamada, su banyosu içinde ısı iletkenliğinin biraz daha iyi olacağı düşünüldüğünden bu yol takip edilmiştir. Bu basamak en az 3 kere tekrar edilmiş, daha sonra ksilol, alkol yardımıyla dokulardan uzaklaştırılmıştır. Verilen protokollerden farklı olarak yaptığımız diğer bir işlem dokuların homojenizasyonunu sağlamak için proteinaz K (QIAGEN) ve doku parçalayıcı tampon (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer-Roche-Lot: 13562000) ile 56°C’ deki su banyosunda gecelik bırakılması olmuştur. Bu işlem süreyi uzatsa da dokuların oldukça iyi parçalanarak homojenize olmasını sağlamıştır. Bu işlemler sonucunda, kullanılacak yöntem için gerekli miktarda ve kalitede DNA elde edilebilmiştir. DNA’ nın kalitesine ve miktarına, agaroz jeldeki görüntüler ve planlanan çalışmanın birkaç deneme sonuçlarıyla karar verilmiştir. Agaroz jel elektroforezindeki DNA görüntülerinde bazı örneklerde smear görüntüsü alınmıştır.

Literatürlerde, bu görüntünün formalin fikse dokularda görülebildiğini, sebebinin de formalinin DNA’ da kırıklar oluşturabilmesi olarak öne sürülmüştür(10,15,60).

## **5.2. HER-2/neu Onkogeni İçin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri İle Karşılaştırılması (Çizelge 5.1)**

HER-2/neu, insanda 17. kromozomun 17q11-q21 bölgesinde lokalizedir. 27 ekzon içerir ve 185 kDA’luk bir transmembran glikoproteini kodlar. HER-2/neu tirozin kinaz reseptörü olan bir transmembran proteindir. Epidermal kökenli hücrelerin büyümesinin düzenlenmesinde önemli yere sahiptir(7). Yapılan çalışmada KHOAK’li 100 olguya ait parafin bloklara gömülü 5 mikron kalınlığındaki dokulardan elde edilen DNA örnekleri Real-Time PCR yöntemi için kullanılmıştır. Bu DNA örneklerinde kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle HER-2/neu onkogenindeki amplifikasyonlar incelenerek, HER-2/neu onkogen amplifikasyonu % 18 oranında bulunmuştur. Bugüne kadar HER-2/neu onkogeninin amplifikasyon düzeyine, mRNA düzeyine ve protein ekspresyon düzeyine ilişkin farklı yöntemler kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmış ve çoğunlukla bu parametre sonuçları karşılaştırılarak aralarında ilişkilendirme yapılması hedeflenmiştir. Bu çalışmalarda başta meme kanserleri olmak üzere akciğer, prostat, mesane gibi çeşitli kanser tipleri yer almakta olup, genin kopya sayısındaki artışlarla birlikte artışın belirlenmesine yönelik “altın standart” olarak kabul görmüş FISH (fluorescent in situ hybridization) tekniği ile kantitatif PCR tekniklerinin kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur. Bu iki teknik yanında, HER-2/neu gen ürünü olan HER-2/neu protein düzeyinin tespit edildiği, patolojide kullanılan bir yöntem olan IHK (immunohistokimyasal) yöntemi sonuçları, aynı hastalardan diğer iki yöntemle elde edilen amplifikasyon sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca çalışmaların bir kısmında HER-2/neu onkogenin artışı belirlenen hastalarda tirozin kinaz inhibitörlerine karşı hassasiyet durumu incelenmiştir.

HER-2/neu geni ve onun protein ürünü olan HER-2/neu reseptörü meme karsinogenezinde anahtar rol oynamaktadır. HER-2/neu gen amplifikasyonunun meme kanserlerinde zayıf prognoz ile ilişkili olduğu önceden beri tanımlanmış olup bugüne kadar bir çok çalışmaya konu olmuştur. Bunun yanında aynı onkogenin ve aynı yöntemin meme kanseri için çeşitli laboratuvarlarda rutin olarak kullanılması bizim çalışmamızda incelenmiş olan akciğer kanseri hastaları için de güvenilir bir bilgi sağlayacağını düşündürmektedir.

Bugüne kadar HER-2/neu onkogen amplifikasyonlarının incelenmesi amacıyla pek çok çalışmada meme kanseri hastalarında FISH yöntemiyle birlikte, FISH yöntemine alternatif olarak gösterilen Real-Time PCR yöntemi kullanılmış, her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Fakat Real-Time PCR yönteminin küçük hücreli olmayan akciğer kanserli olgularda HER-2/neu onkogen amplifikasyonunun araştırılmış olduğu herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bundan dolayı çalışmamızda elde edilen bulgular, özellikle meme kanserli olgularda Real-Time PCR yönteminin hassasiyetine ilişkin elde edilen bulguları yansıtan literatürlerle karşılaştırılarak tartışılmaya çalışılmıştır.

Janina ve arkadaşlarının(26) 2006 yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri tanısı almış hastaların parafin bloklara gömülü dokularından DNA elde edilerek, HER-2/neu amplifikasyon düzeyi, kantitatif Real-Time PCR ve FISH yöntemleri ile incelenmiş ve karşılaştırma yapılmıştır. Bu yöntemler ile elde edilen sonuçlar, ayrıca IHK yöntemi ile elde edilen protein ekspresyon düzeyleriyle de karşılaştırılmıştır. Çalışmada Real-Time PCR ile elde edilen HER-2/neu gen amplifikasyon oranı % 19,5'tir(210 hastada 41 amplifikasyon). Aynı çalışmada diğer yöntemlerle yapılan karşılaştırma sonuçları da dikkate değerdir. IHK yöntemi ile protein ekspresyon artışı saptanan 70 hasta bulunmuş olup, bu hastalarda kantitatif Real-Time PCR' a göre 41 hastada amplifikasyon belirlenmiştir. Yani yöntemin amplifikasyon saptadığı tüm hastalarda IHK' ye göre de overekspresyon saptanmıştır. Protein ekspresyonunda artış saptanan ve FISH çalışması yapılabilen 67 hastadan ise 44' ünde amplifikasyon belirlenmiştir. Sonuçlara göre FISH ve

kantitatif Real-Time PCR yöntemleri arasındaki uyum %80' dir. Bu sonuç da göstermektedir ki; çalışmamızda kullandığımız kantitatif Real-Time PCR tekniği 'altın standart' metot olan FISH ile oldukça yakın sonuçlar vermektedir. Bu sebeple, literatürde meme kanseri hastalarıyla yapılmış çalışmaların sonuçlarına dayanarak Real-Time PCR yönteminin KHOAK hastalarında da HER-2/neu amplifikasyonlarının belirlenmesi için FISH' e alternatif olacağını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca göre KHOAK tanısı alan hastalarda HER-2/neu amplifikasyonlarına ilişkin % 18 gibi azımsanmayacak düzeyde bir oran elde edilmiştir. Bu ön tanıyla gelen hastaların bu gen bölgesine ait amplifikasyon düzeyleri, klinisyene ayırcı tanı ve izlenecek tedavi konusunda, önemli bir yardımcı veri olacaktır.

Schlemmer ve arkadaşlarının(54) 2004 yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri tanısı almış hastaların parafin bloklara gömülü dokularından elde ettikleri DNA örnekleri ile HER-2/neu amplifikasyon düzeyi kantitatif Real-Time PCR ve FISH yöntemleri ile birlikte incelenmiştir. Bu yöntemler ile elde edilen sonuçlar ayrıca IHK yöntemi ile elde edilen protein düzeyleriyle karşılaştırılmıştır. Çalışmada Real-Time PCR yöntemi ile HER-2/neu gen amplifikasyonu % 19 (112 hastada 21 amplifikasyon) olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada diğer yöntemlerle elde edilen uyum oranları incelenmiştir. Kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle FISH ve IHK yöntemleri sonuçları karşılaştırıldığında, uyum, sırasıyla %92 ve %91 olarak belirlenmiştir. Yöntem sonuçları arasında özellikle de kantitatif Real-Time PCR ve FISH yöntemleri arasında önemli ölçüde uyum bulunması, çalışmamızdaki yöntemin kullanılabilirliği açısından önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda KHOAK hastalarında da kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle % 18 oranında amplifikasyon saptanmış olması, Schlemmer ve arkadaşlarının(54) sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, bu hastaların tedavisi açısından bu yöntemle elde edilecek sonuçların hem güvenilir olacağını, hem de fayda sağlayacağını göstermektedir.

Gjerdrum ve arkadaşlarının(18) 2004 yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri tanısı almış hastaların parafin bloklara gömülü dokularından elde ettikleri DNA örnekleri kullanılmıştır. HER-2/neu gen amplifikasyonlarının belirlenmesinde FISH ve IHK yöntemlerine alternatif bir yöntem olarak kantitatif Real-Time PCR yöntemi gösterilmiştir. Çalışmada kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle % 47 oranında (30 hastada 14 amplifikasyon) amplifikasyon saptanmıştır. Aynı çalışmada FISH yöntemiyle % 30 oranında amplifikasyon saptanırken, IHK yöntemiyle % 80 oranında HER-2/neu protein overekspresyonu saptanmıştır. PCR amplifikasyonu bulunan tüm hastalar IHK yöntemine göre pozitifdir. Bu çalışmada elde edilen %47'lik bu sonuç, diğer çalışmalarda elde edilen sonucun çok üzerinde bir orandır. Aynı çalışmada, PCR sonuçları FISH sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, IHK yöntemi PCR sonuçlarıyla daha uyumlu bulunması bizim çalışmamızda kullandığımız yöntemi değerlendirmek açısından değer taşımakta ve yöntemin kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Maria ve arkadaşlarının(36) 2006 yılında yaptıkları çalışmada yine meme kanseri tanısı almış hastaların parafin bloklara gömülü dokularından elde ettikleri DNA örnekleri kullanılmıştır. Diğer çalışmalara benzer şekilde HER-2/neu gen amplifikasyonlarının kantitatif Real-Time PCR yöntemi sonuçları ile FISH yöntemine benzer bir yöntem olan CISH (chromogenic *in situ* hibridization) yöntemi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Aynı hasta grubunda IHK yöntemiyle de protein ekspresyon düzeyleri belirlenerek diğer iki yöntemle gösterdiği uyumluluğa bakılmıştır. Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile % 22,4 (85 hastada 19 amplifikasyon) oranında amplifikasyon saptanmıştır. Aynı çalışmada CISH yöntemi sonuçlarıyla uyum % 90,6, IHK yöntemi sonuçları ile uyum % 92,7'dir. Bu çalışmada, PCR sonuçları FISH yöntemi sonuçlarına göre IHK yöntemi sonuçlarına daha yakın bulunmuştur. Merkelbach-Bruse ve arkadaşlarının(38) 2003, Hoang ve arkadaşlarının(25) 2000 yıllarında yaptıkları çalışmalarda da meme kanseri tanısı almış hastaların parafin bloklara gömülü dokularından FISH yöntemiyle HER-2/neu amplifikasyonları, IHK yöntemiyle de HER-2/neu protein ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre de iki

yöntem sonuçları arasındaki uyum yine % 90-% 96 gibi yüksek oranlarda bulunmuştur. Meme kanserlerinde yapılan bu çalışmaların tamamında HER-2/neu protein ekspresyon düzeyleri, gerek FISH gerekse kantitatif Real-Time PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir. Tüm bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak kullanılan bu yöntem, bu benzerliklere dayanarak hem araştırma hem rutin çalışmalarda kullanılabilir bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Bizim KHOAK tanısı almış hastalarda HER-2/neu geninin artışına ilişkin elde ettiğimiz % 18' lik sonucun, literatürde meme kanserli hastalarda bulunmuş olan oranların bazı çalışmalarda çok farklı bulunmasına rağmen, bazılarında nispeten benzer bulunması iki kanser türünde bu gende benzer değişimler olabileceği ihtimalini akla getirebilir. Bu onkogen her tip karsinogenez sürecinde aynı rolleri üstlendiğine göre böyle bir ihtimal olabileceğini düşünebiliriz.

Caterina ve arkadaşlarının(7) 2003 yılında yaptıkları çalışmada “Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” (KHOAK) tanısı almış hastaların parafin bloklara gömülü dokuları kullanılıp, HER-2/neu durumları IHK, FISH ve Real-Time PCR Revers Transcription yöntemleriyle araştırılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. IHK yöntemiyle HER-2/neu protein ekspresyonu incelenmiş, hastaların % 23' ünde overekspresyon saptanmıştır. Real-Time PCR Revers Transcription yöntemi ile HER-2/neu mRNA düzeyleri belirlenmiştir. Hasta grubunun bir kısmı için de FISH yöntemi ile gen amplifikasyonları incelenmiş, % 22 oranında (41 hastada 9 amplifikasyon) amplifikasyon tespit edilmiştir. mRNA ve protein overekspresyonu, HER-2/neu gen amplifikasyonunun sonuçlarıyla desteklenebilecek kadar uyumlu bulunmuştur. Tan ve arkadaşlarının(61) 2003 yılında 131 KHOAK tanısı almış hasta ile yaptıkları çalışmada FISH yöntemiyle %5.3 oranında HER-2/neu amplifikasyonu saptamışlardır. Bununla birlikte adenokarsinom ile gen amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşmışlar, gen amplifikasyonunun daha çok adenokarsinomda gözlendiğini ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda HER-2/neu gen amplifikasyonu daha çok squamöz tipi tümöre sahip hastalarda (%8) gözlenmiş, histopatoloji ile gen amplifikasyonu arasında anlamlı bir istatistik ilişki kurulamamıştır. Bu farklılık çalışmamızdaki tümör

heterojenitesi ve populasyon farklılıkları ile yorumlanabilir. Nakamura ve arkadaşları(43) 2003 yılında 50 KHOAK'li hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %44 HER-2/neu gen amplifikasyonu tespit etmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada meme kanserinden farklı olarak KHOAK'lerinde HER-2/neu gen amplifikasyonunun düşük gradelerde daha sık görüldüğü belirtilmiştir.

Hirsh ve arkadaşlarının(24) 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada ise; KHOAK tanısı almış hastalardan parafin bloğa gömülü dokuların FISH yöntemi ile HER-2/neu gen amplifikasyonları belirlenmiştir. İncelenen hastalarda % 21,5 oranında amplifikasyon (238 hastada 51 amplifikasyon) saptanmıştır. Bu çalışmada aynı hastaların IHK yöntemiyle HER-2/neu protein ekspresyonları incelenmiş, % 16,4 oranında overekspresyon bulunmuştur. Çalışmada bu iki parametrenin sonuçları uyumludur. Fakat protein ekspresyonu ve gen amplifikasyonu belirlenen akciğer kanseri hastalarının inhibitör tedavisine beklenen yanıtı vermemelerinden dolayı klinik olarak yeni tedavi yollarının araştırılması gerektiği üzerinde durulmuştur. Literatürde, KHOAK tanısı almış hastalarda onkogen artışlarıyla birlikte daha çok bu artışın tirozin kinaz inhibitörlerine verilen yanıtla ilişkisi kurulan daha çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Oldukça yakın amplifikasyon yüzdelerinin bildirildiği bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonucun üzerindedir. Bu durumun, bu çalışmalarda incelenen hasta gruplarının özeliğinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca protein ekspresyonu artışına ya da kanser oluşumuna yol açan nokta mutasyonları, delesyon gibi başka moleküler mekanizmalar da düşünülecek olursa bizim sonuçlarımızın düşük oranda olması, bizim hasta grubumuzda diğer mekanizmaların hastalığa sebep olmuş olabileceği ile açıklanabilir.

Capuzzo ve arkadaşlarının(6) çalışmamızda amplifikasyonlarını incelediğimiz onkogenlere ilişkin pek çok çalışması bulunmaktadır. 2005 yılında yayınladıkları bir çalışmada KHOAK tanısı almış toplam 102 hastada FISH yöntemi ile hem HER-2/neu hem EGFR genlerindeki amplifikasyon artışları



incelenmiştir. HER-2/neu gen amplifikasyonu hastaların % 22,8' inde tespit edilmiştir.

Literatüre göre bu onkogenin amplifikasyonu ve protein ekspresyon düzeylerinin bilinmesi prognoz ve tedavide kullanılacak tirozin kinaz inhibitörlerine karşı hasta yanıtının tahmin edilebilirliği, kısaca tedavinin planlanması açısından meme kanserleri için önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda, Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri hastalarda da HER-2/neu onkogen amplifikasyonları ucuz, hızlı ve güvenilir bir yöntemle belirlenmiştir. Bu yöntemle klinisyene tedavinin planlanmasında ve ayırıcı tanının konmasında yararlı olunabileceği düşünülmektedir.

**Tablo 5.1.** HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyon sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması

Araştırmacı ismi	KHOAK n	FISH		Real-Time PCR (n=100)	
		HER-2/neu	EGFR	HER-2/neu	EGFR
Tan ve arkadaşları 2003	131	%5.3	–	–	–
Nakamura ve arkadaşları 2003	50	%44	–	–	–
Caterina ve arkadaşları 2003	41	%22	–	–	–
Capuzzo ve arkadaşları 2005	102	% 22,8	%31	–	–
Suzuki ve arkadaşları 2005	181	–	%23	–	–
Cappuzzo ve arkadaşları 2005	102	–	%33	–	–
Tsao ve arkadaşları 2005	125	–	%47	–	–
Dacic ve arkadaşları 2006	196	–	%8.6	–	–
Ruiz ve arkadaşları 2006	44	–	%13.6	–	–
Jeon ve arkadaşları 2006	262	–	%30.2	–	–
Bozetti ve arkadaşları 2007	28	–	%36	–	–
Savic ve arkadaşları 2007	67	–	%32	–	–
Hirsh ve arkadaşları 2007	81	–	%32	–	–
Dziadziuszko ve arkadaşları 2007	102	–	%33	–	–
Sholl ve arkadaşları 2007	57	–	%12	–	–
Cappuzzo ve arkadaşları 2007	190	%28.8	%25	–	–
Bizim Çalışmamız	100	–	–	%18	%26

### **5.3. EGFR Onkogeni İçin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri İle Karşılaştırılması (Çizelge 5.1)**

EGFR onkogen amplifikasyonunun küçük hücreli olmayan akciğer kanserli olgularda Real-Time PCR yöntemi ile araştırılmış olduğu herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak EGFR onkogen amplifikasyonlarının FISH yöntemiyle çalışıldığı pek çok çalışma mevcut olup, çalışmamızda elde ettiğimiz EGFR onkogen amplifikasyonları bu çalışma sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Sanja ve arkadaşlarının 2006(53) yılında yaptıkları çalışmada KHOAK tanısı almış hastalarda FISH yöntemi ile EGFR gen amplifikasyonları, IHC yöntemi ile protein ekspresyon düzeylerinin önemi araştırılmıştır. Gen amplifikasyonları bu hastalarda % 9,5 oranında (179 hastada 17 amplifikasyon) bulunmuştur. Aynı hastalarda protein ekspresyon düzeyleri ise %11,2 oranında (186 hastada 21 artmış ekspresyon) tespit edilmiştir. EGFR protein ekspresyonu skuamoz hücreli karsinomlarda adenokarsinomlara göre daha fazla saptanmıştır. Ayrıca EGFR gen kopya sayısının ortalama olarak daha yüksek bulunması az diferensiyasyonla ilişkilendirilebilmiştir. Erken evre KHOAK' lerinde gen amplifikasyonu ve protein ekspresyonu arasında kesin bir ilişki saptanamamışsa da birçok vakada özellikle skuamoz hücreli karsinomlarda iki parametre arasında iyi bir bağlantı kurulabilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada amplifikasyon oranı %26 olarak belirlenmiş ve bu çalışmada belirtildiğinin aksine, bulunan amplifikasyonlarla hastaların klinikopatolojik bulguları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum bizim hasta grubumuzun sınırlı sayıda olmasıyla açıklanabilir.

Hirsch ve arkadaşlarının(23) 2003 yılında FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada EGFR gen amplifikasyonu % 10 oranında bulunmuştur. Fakat amplifikasyon düzeyleri ile hastaların klinikopatolojik verileri arasında bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamış ve daha büyük bir hasta grubuyla çalışıldığında anlamlı bir fark yakalanabileceği

belirtilmiştir. Bu çalışmada EGFR gen amplifikasyonu saptanan her hastada EGFR proteininde de overekspresyon saptanmıştır. Gen amplifikasyonu bulunmadığı halde protein overekspresyonu bulunması gen üzerindeki somatik mutasyonlar, transkripsiyonel veya postranskripsiyonel faktörler gibi diğer etkilerin rollerinin olabileceğinin düşünülmüştür. Kantitatif Real-Time PCR yönteminin kullanıldığı çalışmamızda elde edilen amplifikasyon oranı bu çalışmaya göre oldukça yüksektir. Kanser yol açan diğer moleküler mekanizmalar düşünüldüğünde bizim çalıştığımız hasta grubunda kansere yol açan en etkili mekanizma, bu literatürdeki aksine, gen amplifikasyonları olmuş olabilir. Bu durum, hem EGFR hem HER-2/neu onkogenlerine yönelik KHOAK hastalarında daha sonra planlanacak çalışmalarda gen amplifikasyonlarıyla birlikte diğer moleküler mekanizmaların da araştırılması gerekliliğini düşündürmüştür. Tüm bunların yanında Real-Time PCR yönteminin, amplifikasyon belirleme noktasında bu çalışmada kullanılan FISH yöntemine göre daha hassas bir yöntem olabileceği ihtimali de düşünülmelidir.

Jeon ve arkadaşlarının(27) 2006 yılında yaptıkları çalışmada KHOAK tanısı almış 262 hasta FISH yöntemi ile EGFR gen amplifikasyonları, IHK yöntemi ile de EGFR protein ekspresyon düzeyleri klinikopatolojik bulgularıyla birlikte incelenmiştir. Çalışmada % 30,2 oranında EGFR gen amplifikasyonu belirlenmiş ve sigara kullanan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Protein overekspresyonu ise özellikle skuamoz hücreli karsinomlarda amplifikasyon düzeyleri ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuş olup bu ilişki adenokarsinomlarda saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz % 26'lık oran bu çalışmada çıkan % 30,2'lik orana çalışmaya dahil edilen hasta grubu da göz önünde tutulduğunda yakın bulunmaktadır. Çalışmamızda daha az sayıda hasta incelenmiş olmasının, gerek bulunan oran gerekse bu çalışmanın aksine klinikopatolojik verilerle anlamlı bir ilişki bulunamaması üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür.

Suzuki ve arkadaşlarının(58) 2005 yılında yaptıkları çalışmada öncekiler gibi KHOAK tanısı almış hastalarda EGFR gen amplifikasyonları ve protein ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. FISH yöntemiyle yapılan çalışmada % 23

oranında (181 hastada 40 amplifikasyon) amplifikasyon saptanırken, IHK yöntemiyle % 34 oranında (181 hastada 61 artmış ekspresyon) overekspresyon saptanmıştır. Amplifikasyon ve ekspresyon düzeyleri arasında dikkate değer bir uyum gösterildiği bu çalışmada amplifikasyon bulunan hastaların % 74' ünde protein ekspresyon artışı belirlenmiştir. Fakat her iki parametre sonuçları ile hastaların klinikopatolojik bulguları arasında bizim çalışmamızda da olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Sholl ve arkadaşlarının(56) 2007 yılında yaptıkları çalışmada FISH ve CISH yöntemlerinin her ikisiyle EGFR gen amplifikasyonlarını incelenmiş ve her iki metotla da %12 oranında gen amplifikasyonu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi elde edilen sonuçlar ile klinikopatolojik veriler arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Bu sonucun, çalışmamızda elde ettiğimiz oranın oldukça altında olması, diğer moleküler mekanizmaların etkili olabileceğini akla getirmiştir. Yapılacak çalışmalarda, aynı hasta grupları üzerinde ayırıcı tanı ve tedaviye ilişkin daha sağlıklı sonuçlar elde etmek amacıyla birkaç moleküler mekanizmanın birlikte incelenmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Dziadziusko ve arkadaşlarının(12) 2007 yılında yaptıkları çalışmada EGFR gen amplifikasyonlarının ve protein ekspresyonlarının, EGFR tirozin kinaz inhibitörleriyle kemoterapi almış KHOAK hastalarında tedaviye yanıt ve yaşam süresi ile ilgisi araştırılmıştır. Çalışmada FISH yöntemiyle % 33 oranında gen amplifikasyonu, IHK yöntemiyle de %71 oranında artmış protein ekspresyonu bulunmuş olup bu iki yöntem sonuçlarının önemli ölçüde uyumlu olduğu belirlenmiştir.

KHOAK hastalarına ilişkin tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz % 26'lık amplifikasyon oranından farklı sonuçlara rastlanmışsa da, söz konusu parametrelerde artış bulunması açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yani çalışmamızın sonuçları literatürle uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan kantitatif Real-Time PCR metodunun zaman

kazancı ve doğruluk açısından avantaj oluşturacağı ve özellikle büyük hasta grupları çalışıldığında araştırmacıya kazandıracığı kolaylık yanında daha düşük maliyet sağladığı görülmüştür.

#### **5.4. Kantitatif Real-Time PCR Yönteminin Avantajları ve Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması**

Literatürde amplifikasyon belirlemede sıklıkla kullanılan yöntemlerinin karşılaştırılması üzerinde durulmaktadır. Tanı ve tedavi açısından kullanılan yöntemin hassasiyeti, güvenilirliği, sonuç alma süresi ve tüm bu nitelikleri yanında maliyeti büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple çeşitli yöntemlerin avantajları ve dezavantajları araştırmacı tarafından göz önünde bulundurulmalıdır.

Genlerin ürünü olan proteinlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi kanser tanı ve araştırmaları açısından bilinmesi gereken majör bilgidir. Bu sebeple IHK yöntemi için çok sayıda patoloji laboratuvarı gerekli ekipmana sahip olup, yöntemi rutin olarak kullanmaktadır. Özellikle meme kanserlerine ilişkin yapılmış olan çok sayıda çalışma gen amplifikasyon düzeylerinin ve protein ekspresyon düzeylerinin yüksek oranlarda uyumlu bulunduğu bildirmektedir. IHK yöntemi, protein ekspresyon düzeyini belirleyen kesin bir yöntem olarak kabul görmektedir. Fakat bu yöntem ile çeşitli sebeplerden dolayı farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Yöntem açısından fiksasyon zamanı ve süresi, boyama prosedürü ve tekniği, uygun antijenin elde edilmesi, incelenen doku örneklerinden elde edilen kesitlerin bazı durumlarda standardizasyonunun yapılamaması ortaya çıkacak dezavantajlar arasında yer almaktadır(18). Meme kanseri başta olmak üzere KHOAK tanısı alan hastaların HER-2/neu ya da EGFR protein ekspresyon düzeyleri ile birlikte gen amplifikasyon düzeylerinin de bilinmesinin fayda sağladığı, bu bilginin tanı ve tedavi seyri açısından önem taşıdığı yaptığımız çalışma ve literatür taraması ile elde ettiğimiz sonuçlara göre aşikardır.

FISH yöntemi, her hücrenin analizine olanak sağlayan, gen amplifikasyonları ve kromozom dublikasyonlarını belirleyebilen bir yöntemdir. FISH yöntemi ile invaziv tümör hücreleri ile duktal karsinom in situ hücrelerinin de analizini yapabilmek mümkündür. Örneğin invaziv kanserlerde HER-2/neu negatif olsa bile duktal karsinom in situ hücrelerinin HER-2/neu ekspresyonu yüksek olabilmektedir. Bunlara rağmen FISH yöntemi, uzun hibridizasyon ve yıkama sürelerine ihtiyaç duymasından, flörsan mikroskopta her hücre için tek tek sinyal sayımı gerektirmesinden ötürü zaman alıcıdır. Yöntemin analiz aşamasındaki karmaşıklığı da araştırmacıyı bir takım zorluklarla karşılaştırmaktadır. Bu yöntem amplifikasyon tespiti açısından “altın standart” olarak kabul görüyor olsa da bir takım dezavantajlara sahiptir.

Bazı kanserlerde protein ekspresyonu düzeylerinin belirlenmesi yanında gen amplifikasyonlarının da bilinmesine duyulan gereksinim, artışı belirleyebilen alternatif metotlar arayışını doğurmuştur. Çalışmamızda da kullanılan kantitatif Real-Time PCR yöntemi gen kopya sayısını kantitatif olarak ölçebilen bir yöntem olup FISH yöntemine göre bazı avantajlara sahiptir. Kantitatif PCR yöntemi uygulanabilirliğinin kolay olması ve aynı anda çok sayıda örneği birlikte değerlendirebilmesi açısından hızlı bir tekniktir. PCR amplifikasyonu ve kantifikasyonu için gerekli reaksiyon karışımı manuel manipulasyonu engellemek bakımından reaksiyon karışımı tek bir tüp içerisinde hazırlanır. Bu, ürün kontaminasyonu dolayısıyla da örnek kaybedilmesine engel olur. Sonucun görüntülenmesi için jele ve mutajenik DNA boylarına gereksinim duymaz. Sistemin tamamen otomatik olması, çalışmanın standardizasyonunu kolaylaştırmıştır. Ayrıca planlanan her çalışma için primer ve prob dizaynının yapılabilmesi, yeni PCR şartlarının oluşturulabilmesi ve yöntemin validasyonunun yapılabilmesi sistemin en önemli avantajlarından biridir. Sonuçların değerlendirilmesi de bilgisayar tabanlı analiz programları tarafından otomatik olarak yapılmaktadır. Tüm bunların yanında kantitatif Real-Time PCR yöntemi FISH yöntemine göre daha düşük maliyetlidir.

Kantitatif Real-Time PCR yöntemi, hassasiyeti, spesifitesi, kolay uygulanabilmesi, düşük maliyetli olması, hızlı sonuç verebilmesi ve kantitatif sonuç vermesi açısından amplifikasyon belirleme noktasında uygulanmakta olan diğer metotlar için alternatif olarak kabul edilebilir bir yöntemdir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Başarılı bir kantitatif Real-Time PCR çalışması için kullanılacak DNA miktarının ve kalitesinin önemli olduğu çalışmamızda da gösterilmiştir. Parafine gömülü dokulardan DNA elde ederken karşılaşılan problemler değerlendirilmiş ve mevcut protokoller üzerinde modifikasyonlar uygulanarak bu problemler çözülmüştür. Çalışmamız için düzenlediğimiz, bu son parafine gömülü dokulardan DNA elde etme protokolü ile çalışmamızda kullanılacak bütün dokulardan kantitatif Real-Time PCR yöntemi için uygun kalitede ve miktarda DNA elde edilmiştir.

Bizim çalışmamızda KHOAK tanısı almış 100 olgunun, parafin bloklara gömülü dokularından DNA elde edilmiş ve kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyonları incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre 100 hastanın 18' inde (% 18 oranında amplifikasyon) HER-2/neu gen amplifikasyonu, aynı 100 hastanın 26' sında da EGFR gen amplifikasyonu saptanmıştır. Bu amplifikasyonların her iki onkogen için de hiçbir klinikopatolojik veriyle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi kurulamamıştır. Çalışmada, akciğer kanserlerinde bu iki onkogenin artışına ilişkin hızlı ve güvenilir bir metotla veri elde edilmiş olup, KHOAK tanısı alan hastaların ayırıcı tanısına katkıda bulunmak ve klinik olarak tedavide klinisyene ışık tutulabilmesi hedeflenmiştir.

Literatüre göre HER-2/neu gen amplifikasyonu ve protein ekspresyon düzeylerinin bilinmesi prognoz ve tedavide kullanılacak tirozin kinaz inhibitörlerine karşı hasta yanıtının tahmin edilebilirliği kısaca tedavinin planlanması açısından meme kanserleri için kesin suretle önem taşımaktadır(24). Tanısı meme kanseri olarak belirlenen hastalarda IHK sonuçlarına göre özellikle 2+ olarak skorlanan hastaların ayırıcı tanısına katkı sağlaması ve klinik tedavi açısından HER-2/neu gen amplifikasyonlarının bilinmesine önemle ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir(26). Öyle ki meme karsinomlarının da içinde bulunduğu pek çok kanser türünde HER-2/neu onkogenin sinyal yolları içerisindeki yeri, proliferasyon, invazyon ve mitoz

baskılanmasındaki önemi ile yer alması hiç de şaşırtıcı değildir. Literatürde akciğer kanserinin bu onkogen açısından amplifikasyonun araştırıldığı az sayıda çalışmaya rastlanmasına rağmen aynı onkogenin KHOAK hastalarında da benzer sebeplerden dolayı amplifikasyon düzeylerinin bilinmesine klinik olarak ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonuçlarına göre EGFR gen amplifikasyonuna ilişkin elde ettiğimiz veriler amplifikasyon belirleme noktasında, literatürde yoğunluk kazanmış FISH yöntemi sonuçlarıyla genellikle benzerlik göstermektedir. Literatürde, amplifikasyon sonuçları aynı zamanda IHK yöntemiyle elde edilen protein ekspresyon düzeyleriyle de karşılaştırılmıştır. Gen amplifikasyon düzeyleri, protein ekspresyon düzeyleriyle karşılaştırıldığında genel olarak uyum olduğu görülmüşse de bu uyumun IHK yöntemine göre 2+ olarak skorlanan hastalardaki sıklığı açıktır. KHOAK tanısı alan hastalarda, EGFR' ye yönelik çok sayıda parametrenin (nokta mutasyonları, delesyonlar, mRNA düzeyi, protein ekspresyon düzeyi gibi) geniş hasta gruplarında bir arada incelenmesinin kesin bilgiye ulaşmak açısından daha faydalı olacağını düşünmekteyiz. Bu amaca ulaşmak için hızlı ve güvenilir yöntemlerin seçilmesi kaçınılmaz olup, çalışmamızda kullandığımız bu yöntemin bu konuda araştırmacıya büyük ölçüde kolaylık sağlayacağı kanısındayız.

Son yıllarda hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesiyle EGFR onkogeni klinik açıdan çok önem kazanmıştır. Bu sebeple EGFR onkogenin artışına ya da protein overekspresyonunu gösterilmesine yönelik çalışmalar artmıştır. Daha çok EGFR onkogeninin amplifikasyon düzeyine, mRNA düzeyine ve protein ekspresyon düzeyine ilişkin farklı yöntemler kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmış ve çoğunlukla bu parametre sonuçları karşılaştırılarak aralarında ilişkilendirme yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca KHOAK hastalarının EGFR tirozin kinaz domaini üzerinde belli mutasyonlar saptanmış olup bu mutasyonlar gen amplifikasyon ve protein ekspresyon düzeyleriyle birlikte incelenmiştir. Literatüre göre çoğunlukla amplifikasyon artışı olan hastalarda inhibitör (gefitinib) hassasiyetinin yüksek olduğu bildirilmekle birlikte EGFR onkogeni üzerinde mutasyon belirlenen

hastalarda daha hassas olduğunu açıklayan literatürlere de rastlanmıştır. Bu konuda açık bir sonucun elde edilememesi inhibitör hassasiyetine yönelik çalışmaların artırılması gerektiğini düşündürmüştür. Çünkü bu bilgi ilaca başlama ve doz kararı açısından klinisyene fayda sağlayacaktır (45, 57).

Literatürde gerek HER-2/neu gerek EGFR onkogenlerinin amplifikasyonlarının bizim seçtiğimiz KHOAK tanısı alan hasta gruplarında, çalışmamızda kullandığımız kantitatif Real-Time PCR yönteminin kullanıldığı herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Bu sebeple, meme kanseri hastalarının incelendiği fakat Real-Time PCR ve FISH yöntemlerinin hassasiyetlerinin incelendiği ya da KHOAK' li hasta gruplarında FISH yöntemiyle söz konusu onkogenlerin incelendiği çalışma sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak, çalışmamızda gerek HER-2/neu onkogeni, gerekse EGFR onkogeni açısından elde edilen amplifikasyon sonuçları, hemen hemen farklı yöntemlerle değerlendirmiş olunmasıyla birlikte, tüm literatür sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bu sebeple HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyon düzeylerinin belirlenmesinde kantitatif Real-Time PCR yönteminin avantajlarıyla birlikte değerlendirildiğinde daha kullanılabilir bir yöntem olduğu açıktır.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, Walter, Peter; 2002, Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition.
2. Bozetti, C., Tiseo, M., Lagrasta, C., Nizzolli, R., Guazzi, A., et al, 2008, Comparison between epidermal growth factor receptor gene expression in primary non small cell lung cancer and in fine-needle aspirate from distant metastatic sites, Journal of Thoracic Oncology, 3, 18-22p.
3. Cappuzzo, F., Varella-Garcia, M., Shigematsu, H., Domenichini, I., Bartolini, S., Ceresoli, GL., Rossi, E., Ludovini, V., Gregorc, V., Toschi, L., Franklin, WA., Crino, L. Gazdar, AD., Bunn Jr, PA., Hirsch, FR., 2005, Increased *HER2* Gene Copy Number Is Associated With Response to Gefitinib Therapy in Epidermal Growth Factor Receptor-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Patients, Journal Of Clinical Oncology, 23:5007-5018, 11 p.
4. Cappuzzo, F., Ligorio, C., Toschi, L., Rossi, E., Trisolini, R., Paioli, D., Magrini, E., Finocchiaro, G., Bartolini, S., Cancellieri, A., Hirsch, F. Crino, L., Varella-Garcia, M., 2007, EGFR and HER2 Gene Copy Number and Response to First-Line Chemotherapy in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC), Journal of Thoracic Oncology, 2:423-429, 6 p.
5. Cappuzzo, F., Magrini, E., Luca, Ceresoli, G., Bartolini, S., Rossi, E., Ludovini, V., Gregorc, V., Ligorio, C., Cancellieri, A., Damiani, S., Spreafico, A., Terenzio Paties, C., Lombardo, L., Calandri, C., Bellezza, G., Tonato, M., Crino, L., 2004, AKT phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced Non-Small Cell Lung Cancer, J Natl Cancer Inst, 6:1133-1141, 8 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

6. Cappuzzo, F., Hirsch, FR., Rossi, E., et al., 2005, Epidermal growth factor receptor gene copy number, gene mutations and protein level predict outcome to gefitinib therapy in advanced non-small cell lung cancer, J Natl Cancer Inst, 97:643-655, 12 p.
7. Caterina, P., Monica, F., Antonio, M., Barbara, C., Monica, M., Fiamma, B., Massimo, R., Guido, C., Silvano, B., 2003, HER2/neu alterations in non-small cell lung cancer: A Comprehensive Evaluation by Real-Time Revers Transcription-PCR, fluorescence *in situ* hibridization, and Immunohistochemichemistry, Clinical Cancer Research, 9: 3645-3652, 7p.
8. Ciardiello, F., De Vita, F., Orditura, M., Tortora, G., 2004, The role of inhibitors in nonsmall cell lung cancer, Lippincott Williams&Wilkins, 16: 130-135, 5 p.
9. Cooper, Geoffrey M., 2006, Hücre, Moleküler Yaklaşım.
10. Dacic, S., Finkelstein, S.D., Yousem, A., 2005, Clonal selection of adenocarcinoma of the lung as determined by loss of heterozygosity, Experimental and Molecular Pathology, 78, 135-139 p.
11. Davies, H., Bignell, GR., Cox, C., 2002, Mutations of the BRAF gene in human cancer, Nature, 417:949-954; 5 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

12. Dziadziuszko, R., Holm, B., Skov, BG., Osterlind, K., Sellers, MV., Franklin, WA., P. A. Bunn, PA., Varella-Garcia, M., Hirsch, FR., 2007, Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy, *Annals of Oncology*, 1:447-452, 5 p.
13. Endo, K., Sasaki, H., Yano, M., Kobayashi, Y., Yukiue, H., Haneda, H., Suzuki, E., Kawano, O., Fujii, Y., 2006, Evaluation of the epidermal growth factor receptor gene mutation and copy number in non-small cell lung cancer with gefitinib therapy, *Oncol Rep.*, 16: 533-541, 8 p.
14. Eva, F., Sabine, Z.M., Edit, O., John, D.M., 2001, Molecular Genetic Abnormalities in the Pathogenesis of Human Lung Cancer, *Pathology Oncology Research*,7:6-13, 7 p.
15. Foster, N.A., Banerjee, A.K., Xian, J., Roberts, I., Pezzella, F., Coleman, N., Nicholson, A.G., Goldstraw, P., George, J.P., Rabbitts, P.H., 2005, Somatic genetic changes accompanying lung tumor development.,*Genes Chromosomes Cancer.*, 44, 1, 65-75 p.
16. Franks, L.M., Teich, N.M., 1998, *Cellular and molecular biology of cancer*, Third Edition, Oxford Uni. Press.
17. Gabriella, S., Silvana, T., Elda, T., Laura S. et all, 1997, Absence of Fhit Protein in Primary Lung Tumors and Cell Lines with FHIT Gene Abnormalities, *Cancer Research*, 57: 5207-5212, 5 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

18. Gjerdrum, L., M., Sorensen, B., S., Kjeldsen, E., Sorensen, F., B., Nexø, E., Hamilton-Dutoit, S., 2004, Real-Time Quantitative PCR of Microdissected Paraffin-Embedded Breast Carcinoma An Alternative Method for HER-2/neu Analysis, *Journal of Molecular Diagnostics*, 6: 42-51, 9 p.
19. Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G. D., Moses, H. K., 1986, Growth Factors and Cancer, *Cancer Research*, 46: 4015-1029, 14 p.
20. Grenle, R.T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A., 2000, Cancer statistics 2000.CA, *Cancer J.Clin.*, 50, 7-33 p.
21. Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A., 2004, The discovery of receptor tyrosine kinaes: targets for cancer therapy, *Nature*, 4: 361-370, 9 p.
22. Hirsch, FR.,Varella-Garcia, M., McCoy, J., et al., 2005, Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest oncology group study, *J Clin Oncol*, 23:6838–6845, 7 p.
23. Hirsch, FR., Varella-Garcia, M., Bunn, JR., Di Maria, MV., Veve, R., Bremnes, RM., Baro'n, AE., Zeng, C., Franklin, WB., 2003, Epidermal Growth Factor Receptor in Non–Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis, *Journal of Clinical Oncology*, 21: 3798-3807, 9 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

24. Hirsch, FR., Varella-Garcia, M., Franklin, WA., Veve, R., Chen, L., Helfrich, B., Zeng, C., Baron, A., Bunn, PA Jr., 2002, Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas, Br. J. Cancer, 86: 1449-1456, 7 p.
25. Hoang, MP., Sahin, AA., Ordóñez, NG., Sneige, N., 2000, HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma, Am J Clin Pathol, 113: 852-859, 7 p.
26. Janina, K., Anna-Maria, T., Pal, K., Nora, U., Aniko, K., Gaor, L., Zsuzsa, S., 2006, Detection of HER-2/neu Gene Amplification in Breast Carcinomas Using Quantitative Real-Time PCR- A Comparison with Immunohistochemical and FISH results, Pathology Oncology Research, 12:197-204, 7 p.
27. Jeon, YK., Sung, SW., Chung, JH., Park, WS., Seo, JW., Kim, CW., Chung, DH., 2006, Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer, Lung Cancer, 54: 387-398, 11 p.
28. Kirişoğlu, C.E., Öztürk, C., Köktürk, N., 2003, Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde epidermal büyüme faktör reseptörü ve inhibitörlerinin yeri, Solunum, 5:146-152, 6 s.
29. Köktürk, N., Kirişoğlu, C.E., Öztürk, C., 2003, Akciğer kanseri moleküler biyolojisi, Solunum, 5:127-138, 11 s.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

30. Krause, D.S., Van Etten, R.A., 2005, Tyrosine Kinases as Target for Cancer Therapy, The New England Journal of Medicine, 353: 172-87, 15 p.
31. Kubista, M., Andrade, J. M., et all, 2006, The real-time polymerase chain reaction, 27: 95-125, 20 p.
32. Kufe, Pollock, Weichselbaum, Bast, Gansler, Holland, Frei, 2003, Cancer Medicine 6.
33. Kumar,V., Cotran,R.S., Robbins, S.L., 2000, Temel Patoloji, 6'ıncı baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
34. Lale, A., Dicle, G., 2004, Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser, Hacettepe Tıp Dergisi, 35:34-42, 8 s.
35. Lodish, Harvey, Berk, Arnold, Zipursky, S. Lawrence, Matsudaira, Paul, Baltimore, David, Darnell, James E., 2000, Molecular Cell Biology, Fourth Edition.
36. Maria, N., Loukas, K., Christos, V., Maria, K., Efstathios, S., Petroula, A., Dimitris, M., Vassilis, G., Evi, S., L., 2006, HER-2 DNA quantificatin of paraffin-embedded breast carsinomas with LihgtCycler real-time PCR in comprasion to immunohistochemichemistry and choromegenic *in situ* hibridization, Clinical Biochemistry, 39: 942-946, 4 p.
37. Martin, P., Kelly, C.M.A., Carney, D., 2006, Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents for Lung Cancer, Cancer Control, 13(2): 129-140, 11 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

38. Merkelbach-Bruse, S., Wardelmann, E., Behrens, P., Losen, I., Buettner, R., Friedrichs, N., 2003, Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to real-time PCR, *Am J Surg Pathol*, 27: 1565-1570, 5 p.
39. Mitelman, 1994, Chromosomes, genes and cancer, *Cancer* , 44: 133.
40. Mitsuo, S., David, S., Adif, G., Jhon, D.M., 2007, A Translational View of the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer, *J Thorac Oncol.*, 2: 327-343, 16 p.
41. Mocellin, S., Rossi, C. R., et all., 2003, Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research, *TRENDS in Molecular Medicine*, 9: 189-195, 6 p.
42. Nair, P., 2005, Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression, *Current Science*, 88: 890-898, 8 p.
43. Nakamura, H., Saaji, H., Ogata, A., Hosaka, M., Hagiwara, M., Kawasaki, N., Kato, H., 2003, Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer, *Journal Cancer*, 103: 61-66
44. Noaki K, Chen, TH., Richards, WG., Sugarbaker, DJ., Meyerson, M., 2002, Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma, *Cancer Research*, 62:7001-7003, 2 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

45. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., 2006, Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi.
46. Peter, Turnpenny, Sian Ellard, 2005, Emery's Elements of Medical Genetics, Twelfth Edition.
47. Prudkin, L., Wistuba, I. I., 2006, Epidermal growth factor receptor abnormalities in lung cancer. Pathogenetic and clinical implications, Elsevier, 10: 306-315, 9 p.
48. Richardson, GE., Johnson, BE., 1993, The biology of lung cancer, Semin Oncology, 20:105-127, 22 p.
49. Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 10/update 2003.
50. Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 18/2004.
51. Ruiz, M., I., G., Floor, K., Vos, W., Grünberg, K., Meijer, G., A., Rodriguez, J., A.& Giatcone, G., 2007, EGFR gene copy number detection in non-small cell lung cancer; a comparison of florasan in situ hybridization and cromogenic in situhybridization, Histopatology, 51: 631-637
52. Savic, S. Tapia, C. Grili, B. Ruffle, A. Bihl, M. P. et all, 2008, Comprehensive Epidermal Growht Factor Receptor Gene Analysis from Cytological Specimens of Non-Small Cell Lung Cancers, British Journal of Cancer 98: 154-160

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

53. Sanja, D., Melina, F., Kathleen C., Suresh R., James, L., Chandra, B., Samuel A. Y., 2006, Significance of EGFR Protein Expression and Gene Amplification in Non-Small Cell Lung Carcinoma, American Society for Clinical Pathology, 125(6):860-865, 5 p.
54. Schlemmer, B. S., Sorensen, B. S., Overgaard, J., Olsen, K. E., Gjerdrum, L. M., Nex, E., 2004, Quantitative PCR- new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu gene DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization, Scand J Clin Lab Invest, 64: 511-522, 11 p.
55. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., Haber, D. A., 2007, Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, Nature, 7: 169-181, 12 p.
56. Sholl, LM., John Iafrate, A., Chou, YP., Wu, MT., Goan, YG., Su, L., Huang, YT., Christiani, DC, Chirieac, LR., 2007, Validation of chromogenic *in situ* hybridization for detection of EGFR copy number amplification in nonsmall cell lung carcinoma, Modern Pathology, 20: 1028-1035, 7 p.
57. Strachan, Tom, Read, Andrew, P., 1999, Human Molecular Genetics 2, Garland Science.
58. Suzuki, S., Dobashi, Y., Sakurai, H., Nishikawa, K., Hanawa, M., Ooi, A., 2005, Protein Overexpression and Gene Amplification of Epidermal Growth Factor Receptor in Nonsmall Cell Lung Carcinomas, American Cancer Society, 103:1265-1273, 8 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

59. Tanaka, R., Wang, D., Morishita, Y., Inadome, Y., Minami, Y., Lijima, T., Fukai, S., Goya, T., Noguchi, M., 2005, Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma, American Cancer Society, 103 ,3 , 608-615 p.
60. Takano, T., Ohe, Y., Sakamoto, H., et al., 2005, Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 23:6829–6837, 8 p.
61. Tan, D. Deeb, G. Wang, J. Slocum, HK. Winston J. Wiseman, S. Beck, A. Sait, S. Anderson, T. Nwogu, C. Ramnath, N. Loewen, G., 2003, Her-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non small cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization, Mol Path, 12: 201-211p.
62. Tokumo, M., Toyooka, S., Ichihara, S., et al., 2006, Double mutation and gene copy number of EGFR in gefitinib refractory non-small cell lung cancer, Elsevier, 53: 117-121, 4 p.
63. Toschi, L., Capuzzo, F., 2007, Understanding the New Genetics of Responsiveness to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, The Oncologist, 12: 211-220, 9 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

64. Tsao, M.S. Sakurada, A. Cutz, J.C. et all, 2005, Erlotinib in Lung Cancer Molecular and Clinical Predictors of Outcome, The New England Journal of Medicine 353, 133 144p.
65. Tsou, JA., Hagen, JA., Carpenter, CL., Laird-Offringa, IA., 2002, DNA methylation anlysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis, Oncogene, 21:5450-5461, 11 p.
66. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, D., Perrone, G., Di Marino, M., Angeletti, S., Baldi, A., Tonini, G., 2006, Cell cycle alterations and lung cancer, Histol Histopathol, 21: 423-435, 12 p.
67. Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003, Real-Time Polymerase Chain Reaction, ChemBioChem, 4: 1120-1128, 8 p.
68. William, S., Klug, Michael, R., Cummings, 2003, Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık.
69. [www.toraks.org.tr/kisokulu/index.htm-23k](http://www.toraks.org.tr/kisokulu/index.htm-23k).
70. [www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/kansergenetikaekmekci.htm](http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/kansergenetikaekmekci.htm)
71. [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)
72. [www.cancerquest.org](http://www.cancerquest.org)
73. [www.medscape.com](http://www.medscape.com)
74. [www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser\\_epidemiyojisi.htm](http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser_epidemiyojisi.htm)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

75. [www.patoloji.gen.tr](http://www.patoloji.gen.tr)
76. [www.celalkarlikaya.trakya.edu.tr/accaders.htm](http://www.celalkarlikaya.trakya.edu.tr/accaders.htm)
77. WHO “ World Cancer Report”, 2003, Genova (<http://www.who.int/cancer/en/>)
78. [www.saglik.gov.tr](http://www.saglik.gov.tr).
79. Vert, V., Kenneth, W. K., 2004, Cancer genes and the pathways they control, Nature Medicine, 10:789-799, 10p.
80. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, D., Perrone, G., Di Marino, M., Angeletti, S., Baldi, A., Tonini, G., 2006, Cell cycle alterations and lung cancer, Histol Histopathol, 21: 423-435, 12 p.
81. Yalçın, A., Oral, N., Arpacı, F., Günhan, Ö., Hasde, M., Beyan C., 2003, GATA hastanesi 2001 yılı malignite olgularının incelenmesi, Gülhane Tıp Dergisi 45 : 196-200, 4 s.
82. Yeler, H., Yücetaş, Ş., Yılmaz, D., Öztürk, M., Arıcı, S., 1999, Epidermal Büyüme Faktörü (Egf)'nün Diş Çekim Yarası İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi, Cilt 2, Sayı 1, 4 s.

## DERYA UZUN

**Doğum Tarihi** : 14.05.1981  
**Doğum Yeri** : Almanya  
**Uyruğu** : T.C.  
**Medeni Hali** : Bekar  
**İletişim adresleri** : Kurtuluş Mh. Sehergöl Sk. No: 11/5 Eskişehir  
E-mail: deryauzun35@gmail.com  
Tel: 0506 449 02 67

### **Eğitim Durumu** :

2005 – 2008 **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (Eskişehir)**  
Sağlık Bil. Enst. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans  
2000 – 2005 **Ege Üniversitesi (İzmir)**  
Biyoloji Bölümü  
Lisans  
1995 – 1998 **Eskişehir Atatürk Lisesi**  
Lise

### **Yabancı Diller** :

**İngilizce**  
(Orta seviyede)

### **Ulusal Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler:**

Tepeli E, Demir S, Müslümanoğlu MH, Atlı E, Uzun D, Turgut M, Türk Populasyonunda MTHFR Geni A1298C ve C677T Polimorfizmlerinin Prostat Kanseri İle İlişkisinin İncelenmesi, VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2006, Kayseri



**Müslümanoğlu MH, Tepeli E, Uludağ A, Uzun D, Atlı E, Artan S,** Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Hastalarda, C677T ve A1298C Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi, *VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2006, Kayseri*

**Çilingir O, Müslümanoğlu MH, Özdemir M, Korkmaz C, Kaşifoğlu T, Çimen İ, Uzun D, Basmacı T, Kutlay Ö, Artan S,** Ailesel Akdeniz Ateşi Tanısı Konmuş Hastalarda Mutasyon Analizi, *VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2006, Kayseri*

#### **Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

**E. Tepeli, M.H. Müslümanoğlu, A. Uludağ, E. Atlı, D. Uzun, S. Artan,** Eskişehir İlinde İdiyopatik Tekrarlayan Gebelik Kayıpları İle Metilentetrahidofolat Reduktaz -MTHFR- C677T ve A1298C Polimorfizmleri Arasındaki İlişki, *Osmangazi Tıp Dergisi, Ocak, 2007*

#### **Katıldığı Ulusal Bilimsel Toplantılar**

1. Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler, EBİLTEM, İzmir, 2005.
2. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Kayseri Hilton Oteli, Kayseri, 2006.
3. Ulusal Ege Sempozyumu, İkbal Otel, Afyonkarahisar, 2006.
4. DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2007.
5. II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, Grand Yazıcı Otel, Uludağ, 2008.
6. VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Kolin Otel, Çanakkale, 2008.