

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Yrd.Doç. Dr. Tefvik GÜLYAŞAR

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA SİKLİN D1
(CCND1) GEN POLİMORFİZİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Suat ÇAKINA

EDİRNE – 2009

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA SİKLİN D1
(CCND1) GEN POLİMOFİZİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Suat ÇAKINA

Destekleyen Kurum : T.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından maddi olarak desteklenmiş ve T.Ü Tıp Fak. Biyofizik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez No :

EDİRNE – 2009

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd. Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Suat ÇAKINA tarafından tez başlığı “**Akciğer kanserli hastalarda siklin D1 (CCND1) gen polimorfiziminin araştırılması**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 20/08/2009 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza
Yrd.Doç.Dr Tevfik GÜLYAŞAR
JÜRİ BAŞKANI



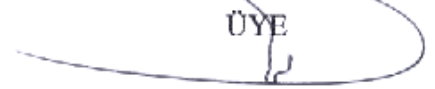
İmza
Doç. Dr. Zafer KOÇAK

ÜYE



İmza
Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

ÜYE



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÖR

Tezimin bütün aşamalarında bilgisini ve becerisini benden esirgemeyen sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Tefvik GÖLYAŐAR ve Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ' ye, tez materyallerinin elde edilmesinde yardımını esirgemeyen Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Zafer KOÇAK' a ve öğrenciliğim süresince bana her konuda destek veren sayın hocam Prof. Dr. Seralp ŐENER'e, tezimde benimle birlikte çalıŐan ve her zaman yardımcı olan AraŐ. Gör. Metin BUDAK, Uzm. Dr. Alattin ÖZEN ve AraŐ. Gör. Arzu AY BAŐAK' a teŐekkürü bir borç bilirim.

SİMGE VE KISALTMALAR

| | |
|--------|------------------------------------|
| CCND1 | Siklin D1 |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| PAH | Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar |
| CDK | Siklin Bağımlı Kinaz |
| CDI | Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri |
| SCF | Kök Hücre Faktörü |
| KHDAK | Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri |
| KHAK | Küçük Hücre akciğer Kanseri |
| M | Mitoz |
| S Fazı | DNA Sentez Fazı |
| Rb | Retinoblastom |
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| bç | Baz Çifti |
| rpm | Dakikada Dönüş Sayısı |
| EDTA | Etanol Diamin Tetra Asetik Asit |

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....1

GENEL BİLGİLER.....4

| | |
|--|----|
| İstatistiksel Bilgi..... | 4 |
| Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi..... | 5 |
| Akciğer Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması..... | 8 |
| Akciğer Kanserlerinde Evreleme..... | 10 |
| Hücre Siklusu..... | 13 |
| Siklinler-Siklin Bağımlı Kinazlar- Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri..... | 15 |
| Retinoblastom Proteini..... | 17 |
| Siklin D1..... | 20 |
| Siklin D1 Geni..... | 21 |

GEREÇ VE YÖNTEMLER.....22

| | |
|---|----|
| Gereçler..... | 22 |
| Kimyasal Malzemeler..... | 23 |
| Çalışmada Kullanılan Cihazlar..... | 23 |
| Çözeltiler..... | 23 |
| Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltisi..... | 23 |
| Yöntemler..... | 24 |
| DNA İzolasyonu..... | 24 |
| Hücre Parçalama Çözeltisi (Lizis Buffer)..... | 24 |
| Çekirdek Parçalama Çözeltisi (Nükleaz Buffer, pH; 8.2)..... | 24 |
| DNA İzolasyon Yöntemi..... | 25 |
| DNA İzolasyon Yöntemi (DNA İzolasyon Kiti)..... | 25 |
| PZR' de kullanılan Primer Dizileri..... | 26 |
| PZR (Polymerase Chain Reaction)..... | 26 |
| PZR için hazırlanan mix..... | 26 |
| PZR için gerekli koşullar..... | 27 |
| PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi..... | 27 |
| Enzim Kesimi İçin Hazırlanan Miks..... | 27 |

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Msp I Enziminin Mekanizması..... | 28 |
| İSTATİSTİKSEL ANALİZ..... | 29 |
| BULGULAR..... | 30 |
| TARTIŞMA..... | 36 |
| SONUÇ..... | 39 |
| ÖZET..... | 41 |
| SUMMARY..... | 42 |
| KAYNAKLAR..... | 43 |
| RESİMLEMELER LİSTESİ..... | 48 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 49 |

GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en sık görülen kanser türü haline gelmiştir. Tüm dünyada kanser olgularının %12,8'inden ve kanser ölümlerinin %17,8'inden akciğer kanseri sorumludur (1).

Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde prostat, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıklıkta görülür ve her iki cinsiyette de kansere bağlı ölümlerin başında yer alır. Tüm kanserlerin % 14.9' unu akciğer kanseri oluştururken, tüm kanser ölümlerinin % 29.3' ünden akciğer kanseri sorumludur . ABD'de Akciğer kanserli olgularda tanı sonrası beş yıllık sağkalım 1984-86 yılları arasında %13 iken, 1996-2003 yılları arasında çok az yükselmiş ve %16 oranına ulaşmıştır (2).

Ülkemizdeki akciğer kanseri istatistikleri ile ilgili güvenilir bilgi olmamakla birlikte, Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1994 yılında tüm kanserlerin %17.6'sını akciğer kanseri oluşturmaktadır. Olguların %90.4'ü erkek, %9.6'sı kadındı (3).

Akciğer kanseri gelişiminden % 94 oranında sigara sorumludur. Akciğer kanseri gelişiminde etkili olduğu belirtilen yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalığı, diyet, viral enfeksiyonlar, genetik ve immünolojik faktörlerin tümü % 6 oranında etkilidir (1).

Akciğer kanseri önlenebilir bir hastalıktır. Bindokuzyüzelli yılına kadar yapılan olgu-kontrol bazlı epidemiyolojik araştırmalar sigaranın akciğer kanseri ile kuvvetli ilişkisi olduğunu göstermiştir. Sigaranın akciğer kanseri nedeni olduğu yönünde ilk bulgular 1962 yılında yayınlanmıştır (1).

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel ve viral) etkisiyle oluşan genetik ve epigenetik hasarlanmalarla gerçekleşir. Kanselerde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom kayıpları) ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da multipl baz değişiklikleri ya da DNA promotor bölge metilasyonu) oluşabilir. Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon) sonucunda tümöral kitle oluşur (4).

Epidemiyolojik kanıtlar karsinogenlerin metabolizmasını kontrol eden genler ile akciğer kanseri riski arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Son yıllarda akciğer kanserinde hücre siklusunda G1-S fazına geçişteki düzensizliği inceleyen araştırmalar yapılmaktadır. G1-S fazını düzenleyen siklinler, siklin bağlı kinazlar ve onların inhibitörleridir. Siklin D1 (CCND1) hücre siklusunda G1-S fazına geçişte önemli bir rol oynar (5).

CCND1 geni 4. ekson, 242. kodon, 870. nükleotidinde tanımlanan G→A polimorfizmi ile alternatif ‘splicing’ (intron kırılması) frekansı artışı gözlemlenmiştir. G aleli ‘splice’ ‘ı transkript a iken A aleli ‘splice’ ‘ı transkript b’dir. Günümüzde yapılan çalışmalardan CCND1 gen polimorfizmi ile akciğer, meme, kolon, prostat ve diğer kanser türleri arasındaki ilişkiler araştırılmaktadır (6).

Çeşitli kanser tiplerinde ve akciğer kanserinde yapılan CCND1 çalışmalarında bir çok sonuç elde edilmesine rağmen, kanser duyarlılığından sorumlu aday genetik göstergeler incelendiğinde popülasyonlar arasında çoğunlukla frekanslarda farklılık olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, kanser risk değerlendirmelerinde, genetik göstergelerin önemini ortaya çıkarmakta birçok popülasyonda temel prevalansları bilmek önemlidir. Araştırılan popülasyonlar arasında oldukça değişken allel frekansların bulunması ışığı altında; artmış kanser riskinin göstergesi olarak CCND1 gen polimorfizminin uygulanabilirliğini saptamak amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Günümüze kadar farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda CCND1 gen polimorfizminin akciğer kanseri ile ilişkisi tartışmalı sonuçlar ortaya çıkarmıştır (5,6).

Biz bu çalışmada akciğer kanserinin, diğer popülasyonlardaki verileri de göz önünde bulundurarak CCND1 gen polimorfizmi ile ilişkisini saptamaya çalıştık. Çalışmamızda Temmuz/2007- Ağustos/2008 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi A.D’ na başvuran ve akciğer kanseri teşhisi konmuş hastalardan oluşturulan hasta grubu ile sağlıklı bireyler arasından oluşturulan kontrol grubunu karşılaştırarak CCND1 A870G gen polimorfizimini saptamayı amaçladık.

Özet olarak bu çalışma aşağıdaki hedeflere yönelik planlanmıştır:

- ❖ Akciğer kanserli hastalarda ve kontrol grubunda CCND1 A870G gen polimorfizminin genotip frekansları belirlenerek akciğer kanseri ve CCND1 gen polimorfizmi ilişkisinin istatistiksel olarak belirlenmesi,
- ❖ Akciğer kanseri etiyolojisinde rol oynayan faktörlerin değerlendirilmesi,
- ❖ CCND1'in akciğer kanseri gelişimine dolayısıyla hastalığın kliniksel açıdan erken teşhis ve tedavisi için katkısının belirlenmesi.

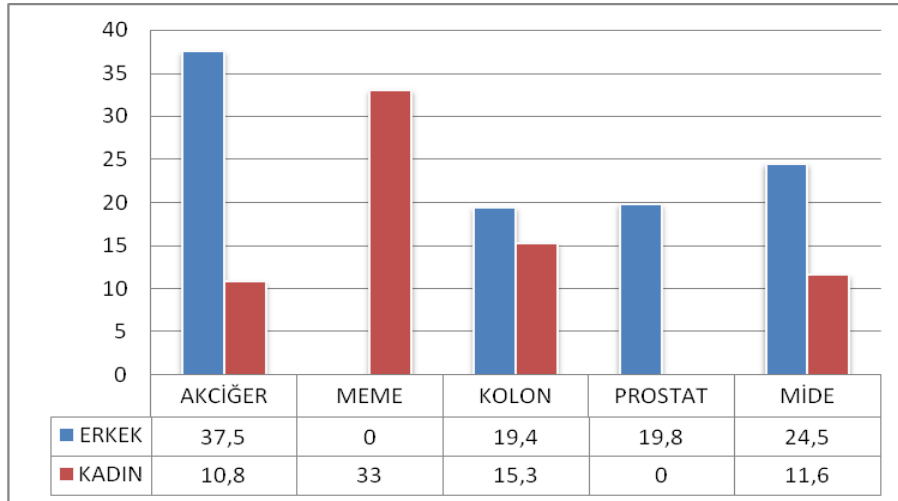
GENEL BİLGİLER

İSTATİKSEL BİLGİ

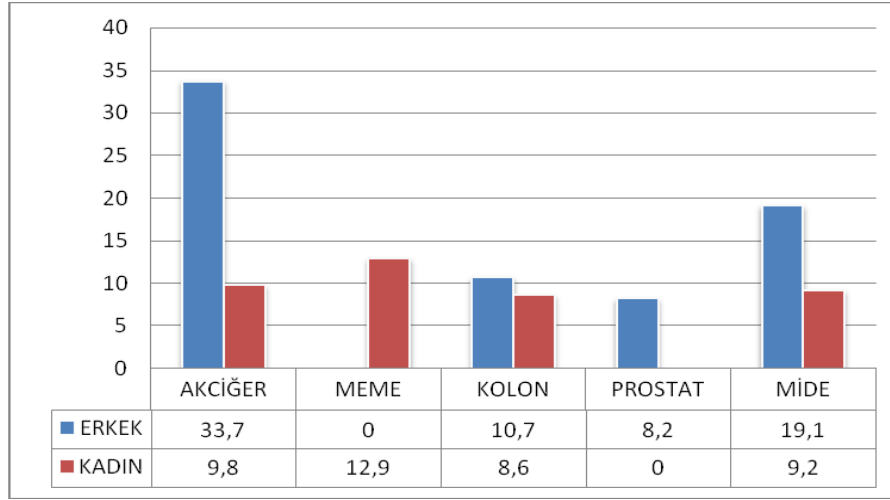
Akciğer kanseri, gelişmiş ülkelerde hem erkekler hemde kadınlar arasında kanserden ölümlerin başında yer almaktadır (7,8,9). Erkeklerde prostat, kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür.(10,11). Amerika’da 2000 yılında 164.100 kişini akciğer kanserine yakalandığı tahmin edilmektedir (12). 1989-1996 yılları arasında Amerika’da 5 yıllık sağ kalım oranı ise % 14’ dür (13). 1986-1993 yılları arasında bu oran gelişmiş ülkelerde %13, gelişmekte olan ülkelerde ise % 9’ dur (14). Danimarka’da 1943-1994 yılları arasında toplam 97.281 bireye akciğer kanseri teşhisi konulmuştur (15).

2008 verilerine göre Amerika’da 1.437.180 yeni kanser hastası bulunduğu ve 565.650 kişinin kanserden öldüğü tahmin edilmektedir. Akciğer kanseri yeni kanser vakalarının %14,9’ unu oluşturur. Tüm kanser ölümleri arasında % 28,6 ’lık oran ve 161.840 ölüm ile en basta gelen ölüm sebebidir (2,16).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde erkekler ve kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türlerinin insidans ve mortalitesi grafik 1 ve grafik 2’ de gösterilmektedir (14).



Grafik 1: Cinsiyete göre kanser türlerinin insidansı



Grafik 2: Cinsiyete göre kanser türlerinin mortalitesi

Kadınlarda insidans oranı her 100.000' de 10.8, erkeklerde ise her 100.000'de 37,5'dur. Bu iki oran karşılaştırıldığında kadınlar arasında insidans oranının düşük olduğu söylenebilir. Kadınlarda mortalite oranı her 100.000' de 9.8, erkeklerde ise her 100.000'de 33,7'dir (14).

Ülkemizde akciğer kanseri, yetmişli yıllarda nedeni bilinen ölümler arasında dördüncü sıradayken, günümüzde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi'nin (SBKSD) 1997 yılında yayımlanan raporunda, akciğer kanserleri 1994 yılında tüm kanserler içinde %17.6 oranıyla birinci sırada yer almaktadır (3,17) Türkiye'de 1994 yılında genel kanser insidansı SBKSD raporuna göre İzmir il sınırında yaşayan olgular baz alınarak hesaplanan yaşa-standardize insidans oranı erkeklerde 61.6/100 000, kadınlarda 5.1/100 000'dir (1,18). Türkiye'de 1985-1990 yılları arasında akciğer kanserli olgularda erkek/kadın oranı 10:1 iken; 1998 yılında da bu oran korunmuştur (19).

AKCİĞER KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ

Sigara: Akciğer kanseri gelişiminden %90 oranında sigara sorumludur. Sigara içenlerde akciğer kanseri riski içmeyenlerden 20 kat daha fazladır (20,21,22). Pasif sigara içiminde risk % 3,5'tur. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi (filtreli, filtresiz, puro, düşük tar ve nikotin içeriği vb.) akciğer kanseri gelişme riskini etkiler (1,20,23).

Gelişmiş ülkelerde sigara içimi prevalansı kadınlarda % 20-40, erkeklerde % 30-40 iken gelişmekte olan ülkelerde bu oranlar sırasıyla % 2-10 ve % 40-60'tır. Dünya genelinde

ise erkeklerde % 47-52, kadınlarda % 10-12 sıklıkta sigara kullanımı olduğu tahmin edilmektedir. Erkekler kadınlara göre sigara içmeye daha küçük yaşlarda başlamaktadırlar. Erkekler daha uzun süreli, yüksek katran içerikli ve derin inhalasyonlu sigara alışkanlığına sahiptirler. Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa'da kadınlarda sigara alışkanlığı ikinci dünya savaşı sonrası başlamıştır. Son zamanlarda yapılan olgu-kontrol çalışmaları, günlük sigara tüketimi ve yaş faktörü gözönünde bulundurulmadığında sigara içen kadınlarda akciğer kanseri gelişme riskinin erkeklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir . Türkiye'de ise sigara içme prevalansı kadınlarda % 24, erkeklerde % 63'tür (1).

Sigara dumanının karsinojenik etkisi, karsinojenlerin DNA'ya ulaşması, DNA'da hatalı kodlama ve mutasyon oluşmasına bağlıdır. sigara içme süresi, günlük sigara içme miktarı, sigaranın ağızda kalma süresi, izmaritin uzunluğu gibi faktörlerdir (24).

Sigara; karsinojenler, kokarsinojenler (kendileri karsinojen olmayan ancak diğer maddelere karsinojen özellik kazandıran) ve tümör promotörleri (karsinojenezisi reversibl olarak potansiyalize eden ve kendileri karsinojen olmayan maddeler) olmak üzere binlerce substrat içerir. Sigara dumanındaki major karsinojenler; polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozaminler, piridin alkaloidler ve radyoaktif bileşenlerdir (24,25,26).

Sigaradaki substratlar, DNA'da doğrudan hasar oluşturabilecekleri gibi, enzimler tarafından aktif metabolitlerine dönüşerek de etki gösterebilirler. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), dokuda ilk olarak fenol, dihidrodiol ve merkaptürik asitlere dönüşürler. Ara dioller ve fenol epoksitler, PAH'ın başlıca metabolitleri olup, hücrel makromoleküllerle kovalent bağlar yaparlar ve DNA-hidrokarbon addüktlerini oluştururlar. Addüktler oluşuktan sonra, DNA'da nokta mutasyonlarına ve asenkron DNA replikasyonlarına neden olurlar. Bu değişiklikler, gen amplifikasyonuna ve malign transformasyona yol açarlar (24,27).

Akciğer kanseri gelişiminde etkili olduğu belirtilen yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalığı sekeli, diyet, viral enfeksiyonlar, genetik ve immünolojik faktörlerin tümü % 6 oranında etkilidir (1).

Yaş Ve Cinsiyet: Hastaların çoğu 50-70 yaş grubundadır. Erkeklerde daha sık görülmektedir, ancak son yıllarda insidansı kadınlarda erkeklere göre daha hızlı artış göstermektedir. Histolojik tipler ve sağkalım açısından da cinsler arasında farklılıklar vardır (1).

İrk: Siyahlarda daha sık görülmektedir (25).

Asbest: Asbestin iki ana grubu vardır; serpantin ve amfibol. Serpantin grubu lifler kıvrımlıdır ve en sık bilinen örneği beyaz asbesttir (krizotil asbest) amfibol grubundaki lifler ise düzdür. Amfibol grubunda 5 tür asbest vardır; krokidolit(mavi asbest), amozit (kahverengi asbest), aktinolit, tremolit, antofilit. Amfibol grubu liflerin fiziksel özelliklerinin ve dokularda uzun süre değişmeden kalabilmesinin toksite artışında önemli olduğu kabul edilmektedir. Asbestin kanserojen etkisi, sigara ile birleştiğinde 91 kat artar (1,28).

Sosyoekonomik Durum: Mesleki gelir ve eğitime göre belirlenen düşük ve yüksek sosyal sınıflar arasında mortalitede 2 kat fark görülmüştür. Eğitim düzeyi düşük olanlarda sigara içme prevalansı ve zararı artmaktadır. Sosyoekonomik düzey sağlık hizmetlerine ulaşımı, kaliteyi ve kullanımı etkilemektedir (20,25).

Beslenme: Taze meyve, sebze ve karotenoid tüketiminin, tüm histolojik tipler için sigara içenlerde ve bırakanlarda kanser riskini düşürdüğü gösterilmiştir. Daha yüksek seviyedeki tüketimle daha düşük seviye karşılaştırıldığında, sigara içimi, yaş, cinsiyet ve akciğer kanseri için diğer risk faktörleriyle birlikte değerlendirildiğinde %40-50 arasında risk azalması söz konusudur. Özellikle β karoten olmak üzere en güçlü antioksidanlar karotenoidlerdir. (1,20,25).

Vitamin A ve beta karotenden fakir beslenmenin hayvan modellerinde akciğer kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. İnsanlardaki çalışmalarda da diyetinde betakaroten/retinol miktarı yüksek olanlarda akciğer kanseri riskinin %40 azaldığını tespit etmiştir. Beta karoten, A vitamininin öncülüdür ve turunçgiller, yeşil sebzeler ile balıkta bulunur. Ayrıca yüksek yağlı diyetle beslenen sigara içicilerde kanser riski daha yüksektir. Sarı-yeşil sebze ve meyvelerin yeterli alımı riski azaltır. Çayın (özellikle yeşil çay) koruyucu olduğuna dair de bazı bulgular mevcuttur (1,25).

Akciğer Hastalıkları: Akciğer kanser riskinin tüberküloz, pulmoner fibrozis (örn. silikozis), kronik bronşit ve amfizemi olan hastalarda arttığı bildirilmektedir. Yine fibrozisle giden skleroderma ve sarkoldozis gibi hastalıklarda da akciğer kanseri riskinin arttığı değişik çalışmalarda bildirilmiştir (25).

Genetik Faktörler: Ebeveynlerinden birinci derece akrabalarında kanser olanlarda akciğer kanseri riski 2.4 kat artmış bulunmuştur. Aril hidrokarbon hidroksilaz enzimi sigara dumanında yoğun bulunan polisiklik hidrokarbonları aktif karsinojenlere çeviren bir enzimdir. Yüksek enzim aktivitesi gösteren kişilerde risk artmış olabilir. Hücre büyümesi ile ilgili

işlevleri olan bazı genlerde dış etkenlerle (radyasyon, kimyasal maddeler, virüsler) değişiklik meydana gelerek “onkogen” haline gelmesi karsinogenezde önemlidir. Bu onkogenlerin en önemli grupları “myc” (C-myc, L-myc, N-myc) ve “ras” (K-ras, H-ras, N-ras) aileleridir. Buna karşılık bazı tümör supresör genlerinde de (retinoblaston ve p53 geni) kanser hastalarında mutasyon saptanmıştır (20,25,29)

AKCİĞER TÜMÖRLERİNİN HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRILMASI

Akciğer kanserleri; epidermoid kanser, adenokanser, büyük hücreli kanser ve küçük hücreli kanser olmak üzere dört gruba ayrılır. Ancak tedavi açısından klinikte histopatolojik sınıflama yerine, küçük hücreli olanlar ve olmayanlar şeklinde iki ana grupta incelenmektedir (30,31).

A. Preinvaziv lezyonlar

- 1- Skuamöz displazi/karsinoma insitu
- 2- Atipik adenomatöz hiperplazi
- 3- Diffüz idiyomatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi

B. İnvaziv/Malign

- 1- Skuamöz hücreli karsinom

Varyantları:

- Papiller
- Seffaf hücreli
- Küçük hücreli
- Bazoloid

- 2- Küçük hücreli karsinom

Varyant:

- Kombine küçük hücreli karsinom

3- Adenokarsinom

- Asiner
- Papiller
- Bronkoalveoler karsinom
- Nonmüsinöz(clara hücresi/Tip II pnömosit tipleri)
- Müsinöz (Goblet hücre tipi)
- Mikst müsinöz ve nonmüsinöz
- Müsin yapan solid adenokarsinom
- Mikst
- Varyantlar
 - İyi diferansiye fötal adenokarsinom
 - Müsinöz (kolloid)
 - Müsinöz kistadenokarsinom
 - Taşlı yüzük hücreli
 - Şeffaf hücreli

4- Büyük hücreli karsinom varyantları

- Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom
- Bazaloid karsinom
- Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
- Şeffaf hücreli karsinom
- Rabdoid fenotip içeren büyük hücreli karsinom

5- Adenoskuamöz karsinom

6- Pleomorfik, sarkomatoid veya sarkomatöz elemanlar içeren karsinomlar

- Spindle ve/veya dev hücre içeren karsinomlar
 - Pleomorfik karsinom
 - Spindle hücreli karsinom
 - Dev hücreli karsinom
- Karsinosarkom
- Blastom (pulmoner blastom)

7- Karsinoid tümör

- Tipik karsinoid
- Atipik karsinoid

8- Tükürük bezi karsinomları

- Mukoepidermoid karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Diğerleri

9- Klasifiye edilemeyen karsinom

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

AKCİĞER KANSERLERİNDE EVRELEME

Kanserli hastaları prognoz özelliklerine göre gruplayıp, tedavilerini planlama ihtiyacı bir evreleme sisteminin geliştirilmesine yol açmıştır (32). İlk kez 1946'da Denoix tarafından önerilen TNM sistemi 1966'da "International Union Against Cancer" (UICC) ve 1973'de "American Joint Committee on Cancer" (AJCC) tarafından akciğer kanserlerine de uyarlanmıştır. Bu iki farklı yaklaşım 1986'da AJCC ve UICC'nin yıllık toplantılarında yeniden gözden geçirilip "Uluslararası Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi" adı altında tek bir sistem haline getirilmiştir (32,33,34). On yıldan beri kullanılmakta olan bu evreleme sisteminde Evre I, II ve IIIA içindeki TNM alt gruplarının prognoz açısından oldukça heterojen olduğu gözlenmiştir. Evreleme sisteminin daha özgül hale getirilmesi amacıyla AJCC ve UICC'nin 1996 yıllık toplantılarında da onaylanan yeni bir düzenleme yapılmıştır (35,36,37). Evre I ve II, T'nin durumuna göre A ve B olarak ikiye bölünmüş, T3N0M0, T2N1M0 ile benzer prognoz özelliklerine sahip olması nedeniyle IIB'ye alınmıştır. T4 kavramı içine yeni bir tanımlama (tümörle aynı lobda satelit lezyon) sokulmuş, tümörden farklı lobdaki satelit lezyon ise M1 içine dahil edilmiştir (1).

Primer Tümör(T) (Şekil 1)

Tx: Primer tümörün belirlenememesi. Balgam veya bronş lavaj sıvısında malign hücreler görülmesine rağmen radyolojik veya bronkoskopi ile tümörün saptanamaması.

T0: Primer tümör belirtisi yok

Tis: İnsitu karsinom

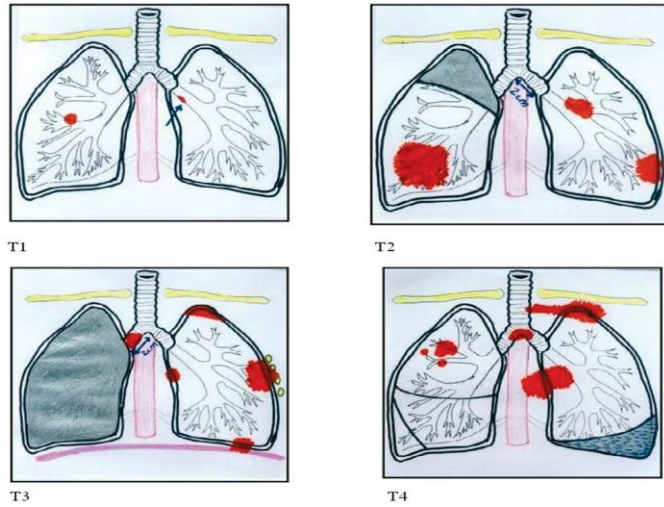
T1: En geniş çapı < 3 cm olan, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa*) invazyon yapmayan tümör.

T2: Aşağıdaki özelliklerden birini içeren tümör;

- en geniş çapı >3 cm
- ana bronşa invaze ancak ana karinadan 2 cm uzakta
- visseral plevraya invaze
- hiler bölgeye uzanan fakat bütün akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni

T3: Herhangi bir büyüklükte; göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, mediastinal plevra veya parietal perikarddan herhangi birine invaze veya karinaya <2 cm yakın fakat karinayı invaze etmeyen veya bütün bir akciğerde atelektazi ya da obstrüktif pnömoniyeye neden olan tümör. Nervus frenikus, nervus vagus invazyonları, mediastinal yağlı doku, ekstraperikardiyal pulmoner arter ve azigos ven invazyonları

T4: Herhangi bir büyüklükte; mediasten, kalp (myokard), büyük damarlar, perikard içi pulmoner arter ve ven tutulumu, trakea, özefagus, vertebra, trakeal karina'dan herhangi birine invaze veya malign plevral- perikardiyal effüzyon ya da aynı lobda satellit nodülleri olan tümör. Nervus laringeal rekürrens invazyonu



Şekil 1: T Faktörü

Bölgesel Lenf Nodları (N) (Şekil 2)

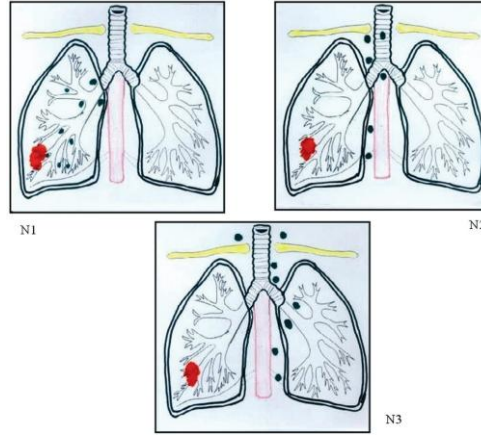
NX: Bölgesel lenf nodu değerlendirilememesi.

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Aynı taraf peribronşiyal ve/veya hiler lenf nodu metastazı, primer tümörün direkt invazyonu ile intrapulmoner lenf nodu tutulumu.

N2: Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nod(lar)una metastaz.

N3: Karşı taraf mediastinal- hiler, aynı veya karşı taraf skalen veya supraklavikuler lenf nodlarına metastaz.



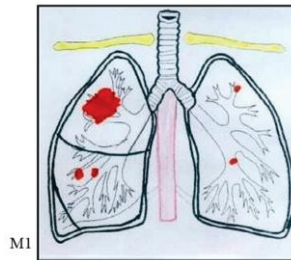
Şekil 2: N Faktörü

Uzak Metastaz (M)

MX:Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi.

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var (Şekil 3) (31).



Şekil 3: M Faktörü

AJCC ve UICC 1996 yılında TNM sisteminde yaptığı son düzenlemede, yeni evreleme sisteminin küçük hücreli dahil olmak üzere akciğer kanserinin 4 ana hücre tipine de uygulanmasını önermişlerdir. Ancak “Veterans Administration Lung Cancer Group” un (VALG) önerdiği sınırlı ve yaygın hastalıktan oluşan ikili sistem pratik hayatta daha çok kullanılmıştır. “International Association for the Study Lung Cancer” (IASLC) 1989’da bu sistemi tekrar düzenlemiştir. Kabaca Evre I, II, III’ü sınırlı, Evre IV’ü yaygın hastalık kabul edebileceğimiz bu sistem aşağıda gösterilmiştir.

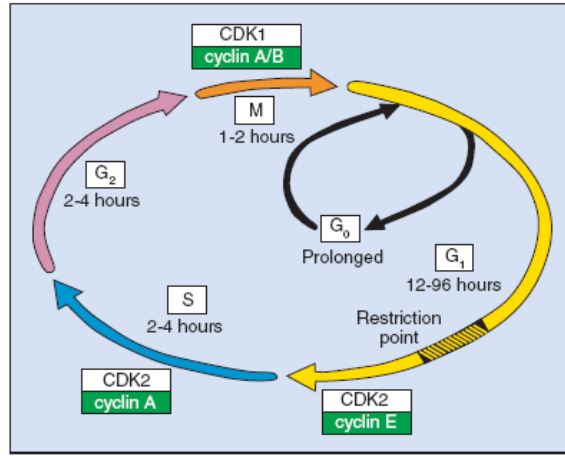
Sınırlı Hastalık: Bir hemitoraksa sınırlı tümör; aynı ya da karşı tarafa hiler, mediastinal ve supraklavikular lenf bezi metastazı; aynı taraf malign plevral effüzyon (TNM’ye göre Evre I, II, III)

Yaygın Hastalık: Sınırlı hastalık kapsamına girmeyen tümör (1).(TNM’ye göre Evre IV)

HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve sonuçta birbirine tıpa tıpa benzeyen iki yavru hücreye bölünmesiyle tamamlanan bir süreçtir (38,39). Bir çok yetişkin dokulardaki hücreler bölünmeyen (quiescent) durumdadır. Bu faz hücre döngüsünün Go fazı olarak adlandırılır (40). Hücreyi bölünmeye sevkeden sinyaller (örneğin, büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda sinyal ileti kaskadı “signal transduction cascade” adı verilen bir ileti mekanizması (örneğin, MAP kinaz, Protein Kinaz C veya JAK/STAT yolları) devreye girer. Bu ileti mekanizması ya transkripsiyonu, hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller yada nukleusa ulaşıp (STAT’da olduğu gibi) doğrudan transkripsiyonu modüle eder. Böylece, hücre siklusa sokularak bölünmeye (mitozise) sevk edilmiş olur (39,41,42).

Hücreler mitozise girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Örn. Siklin’ler) ve makromoleküller (Örn. Deoksiribonükleik asit’ler) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına da interfaz denir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt bölümlerden (fazlardan) oluşur. Mitozis ve interfaz beraberce hücre siklusu olarak bilinen bir süreci oluştururlar. Dolayısıyla, bir hücre siklusu, fazların işleyiş sırasına göre söylemek gerekirse; G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 ve G2 kısaltmaları “gap” (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S ise DNA sentezi (replikasyonu) fazını gösterir. M ise mitozis anlamına gelmektedir (Şekil 4) (38,39,40).



Şekil 4: Hücre siklusu

Hücre siklusuna giren bir hücre DNA sentezi yapar, böylece DNA'sını replike eder (ikiye katlar) ve ardından da DNA mitozisle iki yavru hücreye eşit olarak dağılır. Genel olarak, G1 fazı DNA sentezine (S fazına) ve G2 fazı ise mitozise (M fazına) hazırlık fazlarıdır. Bu fazlarda RNA ve protein sentezleri yapılır ve ayrıca hücre kendisini bölünme için yeniden organize eder (39,43,44).

G0 fazında (istirahat fazı) hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanır.

G1 fazında spesifik hücre fonksiyonları için gerekli proteinler ve RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gerekli birçok enzim üretilir.

S fazında (DNA sentez fazı) hücre içindeki DNA miktarı ikiye katlanır.

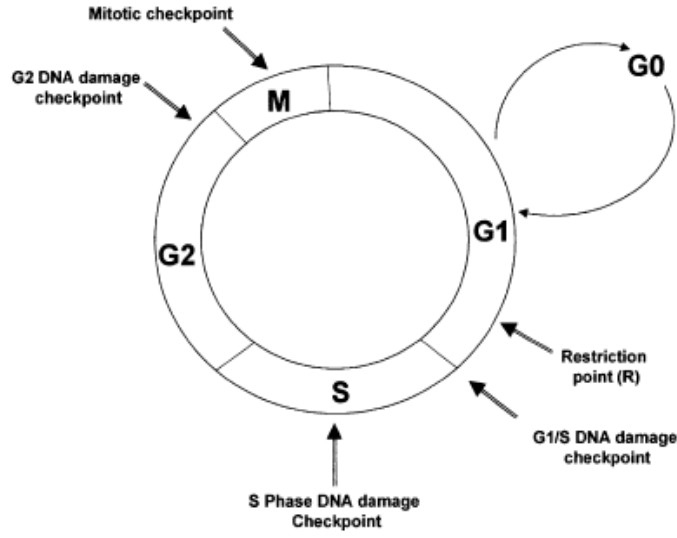
G2 fazında DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder.

M fazında (mitoz) protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağıtılır. Mitozu takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girer.

Tipik bir insan hücre kültüründe interfaz; 24 saatlik siklusun 23 saatini işgal eder. M fazı 1 saat sürer (38,39,43,45)

Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları ("check-points") tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre siklusunda oluşan bir hata kontrol noktaları tarafından düzenlenir; hatanın derecesine bağlı olarak, ya hata tamir edilecektir ya da mitoz durdurulacaktır. Ökaryotik hücre siklusunda üç adet kontrol noktası vardır:

- a) G1/S sınırı
- b) G2/M
- c) Metefaz/Anafaz sınırı (Şekil 5) (38,46,47,48).



Şekil 5: Hücre siklusu kontrol noktaları

SİKLİNLER- SİKLİN BAĞIMLI PROTEİN KİNAZLAR (CDK)- SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ (CDI)

Hücre siklusu siklusa özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir (38,39).

Siklinler (A, B1, D ve E) siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar. Bu yüzden de siklinler olarak isimlendirilmişlerdir.

Siklin A: CDK2 ve CDK1' e bağlanır. Oluşan kompleks, S fazında aktive olur. Ancak fosforilasyonunu sağladığı hedef proteinler tam olarak bilinmemektedir.

Siklin B : Hücre G2 fazına girdiğinde siklin B sentezlenir. CDK1'e bağlanarak SiklinB/CDK1 kompleksini oluşturur. Hücrenin M fazına geçebilmesi için fosforilasyon ile aktive olması gerekir. Aktive kinaz, mitozu da ilgilendiren çeşitli proteinlerin fosforilasyonunu sağlar. DNA replikasyonu, nükleer lamina depolimerizasyonu ve mitoz

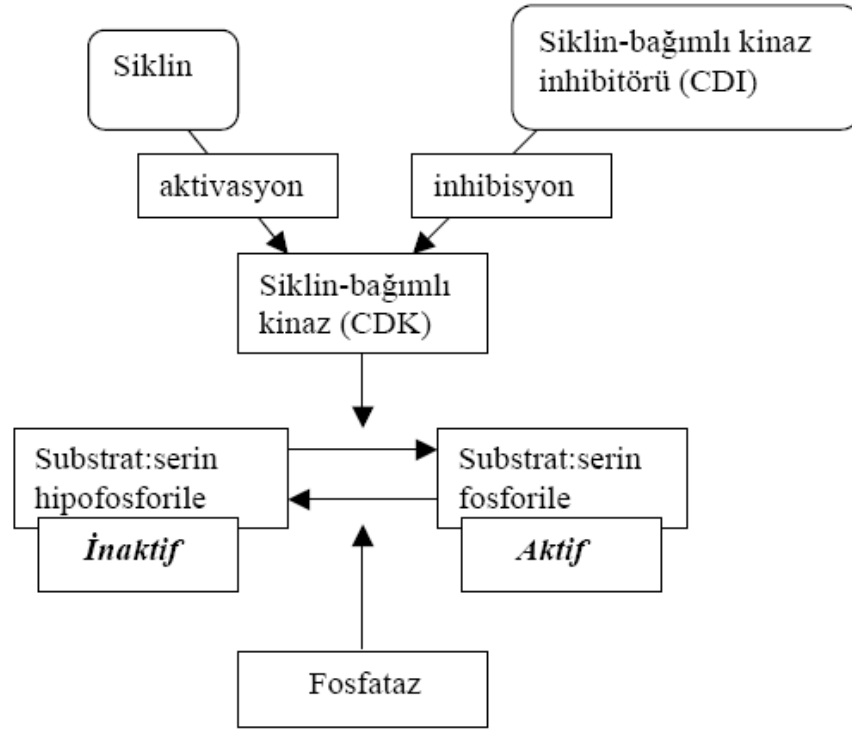
iplerinin oluşumu gerçekleşir. Hücre bölünmesinden sonra; yeni bir büyüme uyarısı gelerek siklinlerin sentezi tekrar başlayıncaya kadar geri kalan siklinler etkilerini yitirir ve hücreler mitozu giremez.

Siklin D1,2,3: CDK4 ve CDK6'ya bağlanır. Siklin D1-CDK2'nın esas rolü retinoblastomun (Rb) fosforilasyonudur. Böylece G1-S engeli aşılar ve hücre S fazına girer. Siklin D-CDK2,4 ve 5; G0 dan G1'e geçişte de etkilidir.

Siklin E: G1-S geçişinde etkilidir. CDK2'ye bağlanır. Oluşan kompleks Rb fosforilasyonunu sağlar (38,39,46,49).

Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların aktivitelerinin düzenlenmesini ve hücrenin bir fazdan diğer bir faza geçmesinde rol alırlar (6,39,50,51)

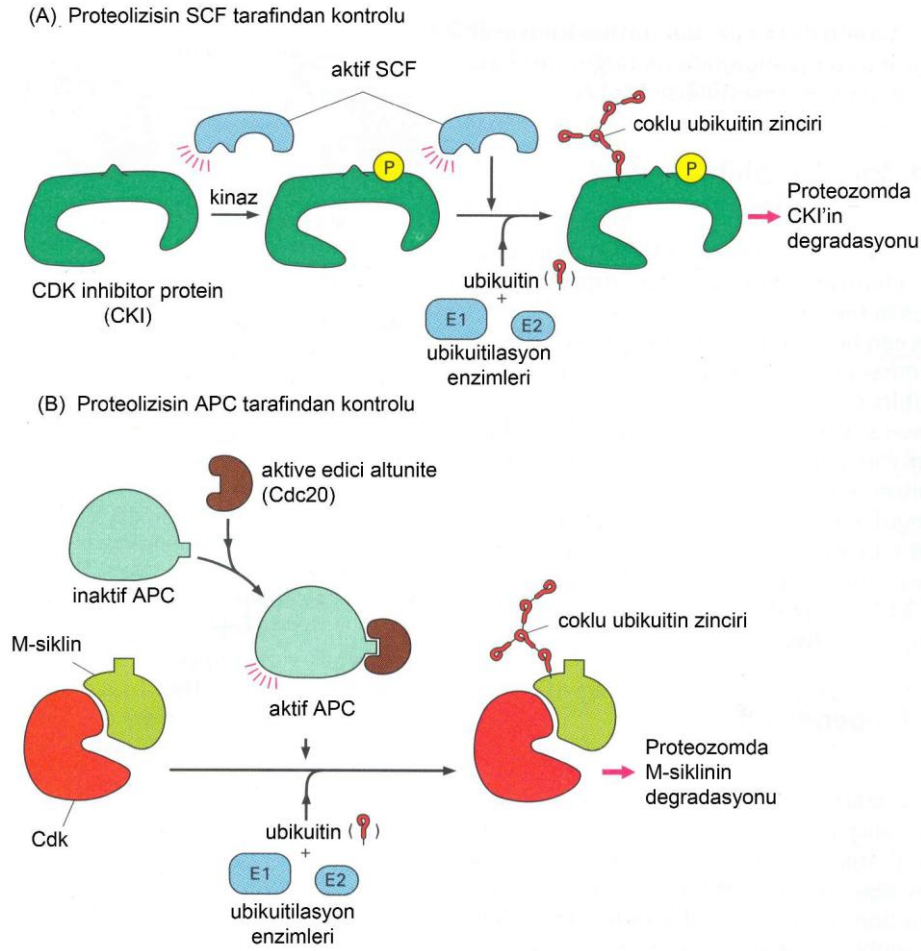
CDI'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK'ların kendisi yada siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilir. (Şekil 6)(38,39).



Şekil 6: Siklin bağımlı protein kinaz (CDK) sistemi

Yıkımları ise “ubiquitin” metabolik yoluyla sağlanır. Siklinlerin destrüksiyonunda 2 ubiquitin ligaz önemlidir: Birincisi G1 ve S fazında “SCF” adı verilen enzim kompleksidir. G1/ S siklinlerin ubiquitilasyonu ve destrüksiyonundan sorumludur. İkincisi M fazında

“anaphase-promoting complex”(APC) olup ubikutilasyon ve M-siklinlerin proteolizinden sorumludur. APCnin aktivasyonu için ise aktive edici subunit gereklidir. 2 aktive edici subunit vardır. Bunlardan biri Cdc20, diğeri Hct1dir. Cdc20 mitoz aşamasında, Hct1 ise G1 fazında APC yi aktive eder (52).



Şekil 7: Hücre siklusunda SCF ve APC aracılı proteolizisin kontrolü.

RETİNOBLASTOM PROTEİNİ

Retinoblastom proteini (RB) ilk bulunan tümör süpresör genidir. 13q14’ de lokalizedir. RB protein yokluğu KHAK’ lerinin hemen hepsinde görülürken, KHDAK’ lerinin sadece %10-30’ unda görülür (4).

Rb proteini G1’in düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. G1 de Rb; E2F’e gevşek bağlanır. G1 progresyonunda yer alan G1-CDK aktivitesinde en iyi anlaşılan, bir gen düzenleyici protein olan “E2F”dir. E2F; spesifik DNA zincirine bağlanır. E2F, S fazına giriş için gerekli proteinleri (G1/S Siklinleri ve S siklinleri) kodlar. G1 de Rb; E2F’e bağlanarak S faz genlerinin transkripsiyonunu bloke eder. Rb proteininin fosforilasyonu E2F’nin

serbestleşmesini dolayısıyla hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişini sağlar (38,52,53,54).

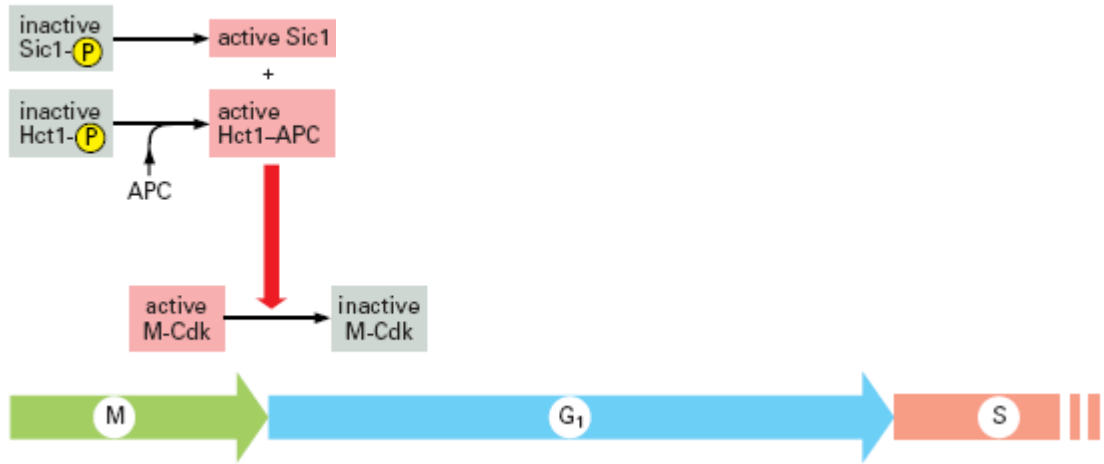
Kanser hücrelerinde sıklıkla G1 progresyonu ve S fazı başlangıcının kontrolü bozulur. Bunun sonucunda hücre siklusu girişinin önü alınmaz ve aşırı hücre proliferasyonu meydana gelir. Kanser gelişiminin kontrolünde ileri metodlar geliştirebilmek için bizlerin öncelikle memeli hücresinde G1 progresyonunun kontrolünde yer alan proteinleri daha iyi anlamamız gerekir.

Memelilerde G1 progresyonunda yer alan CDK'ın aktivitesi 3 mekanizma ile suprese edilir:

- a. Hct1-APC aktivasyonu,
- b. Cdk inhibitör protein (CKI) akümüasyonu,
- c. Siklin gen transkripsiyonunun inhibisyonu (52).

a) Hct1-APC Aktivasyonu:

Hct1-APC mitozisde (M fazı) aktif olan M-CDK kompleksinin G1 fazında inaktif duruma geçmesini sağlar. Sonuçta Hct1-APC aktivitesi artarsa M-CDK kompleksini aktive eden Cdc20-APC aktivitesi azalır (Şekil 8) (52).

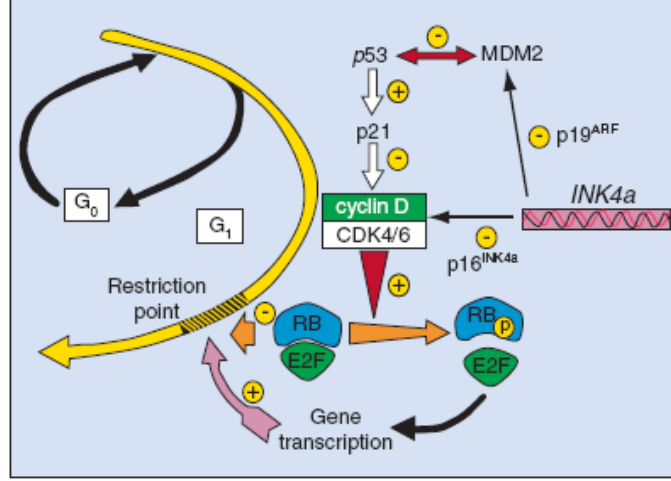


Şekil 8: Hct1-APC aktivasyonu

b) Cdk İnhibitör Protein (CKI) Akümüasyonu

CKI'lar, 2 aileden oluşur: Birincisi; tüm CDK'ları geniş çaplı olarak inhibe eden protein grubudur. Bunlar, p21, p27 ve p57dir. Diğer aile ise seçici olarak SiklinD/CDK4 ve SiklinD/CDK6 üzerinde etkilidir. Bunlar p15, p16, p18, p19 protein ailesi olup bazen INK4

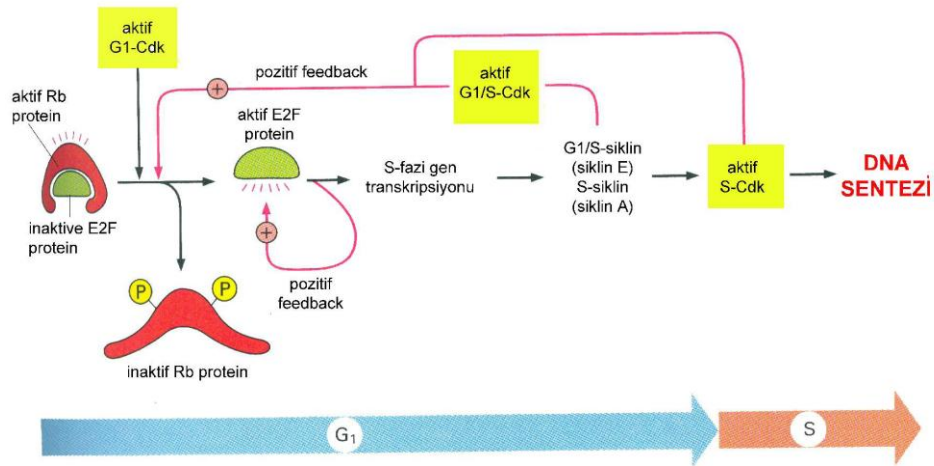
proteinleri olarak da adlandırılırlar. Çünkü CDK4 ve CDK6 inhibitörleridirler (Şekil 9) (38,52,55,56).



Şekil 9: Cdk İnhibitör Protein (CKI) Akümülyasyonu

c) Siklin Gen Transkripsiyonunun İnhibisyonu

G1 progresyonunda yer alan G1-CDK aktivitesinde en iyi anlaşılan, bir gen düzenleyici protein olan “E2F”dir. E2F; spesifik DNA zincirine bağlanır. S fazına giriş için gerekli proteinleri-G1/S Siklinleri ve S siklinleri-kodlar. E2F fonksiyonu primer olarak Rb (Retinoblastom) proteinle olan ilişkisiyle kontrol edilir. Rb proteini; hücre siklus progresyonunu inhibe eder. G1 de Rb; E2F’e bağlanır ve S faz genlerinin transkripsiyonunu bloke eder. Hücreler ekstraselüler sinyallerce bölünme için stimüle edilirse, aktive G1-CDK birikir ve Rb’u fosforile eder. Böylece Rb’un E2F’e afinitesi azalır. Rb; E2F’den ayrılır. Sonuçta E2F, S fazı gen ekspresyonunu aktive eder (Şekil 10) (38,52).



Şekil 10: S-fazı başlangıcının kontrol mekanizmaları.

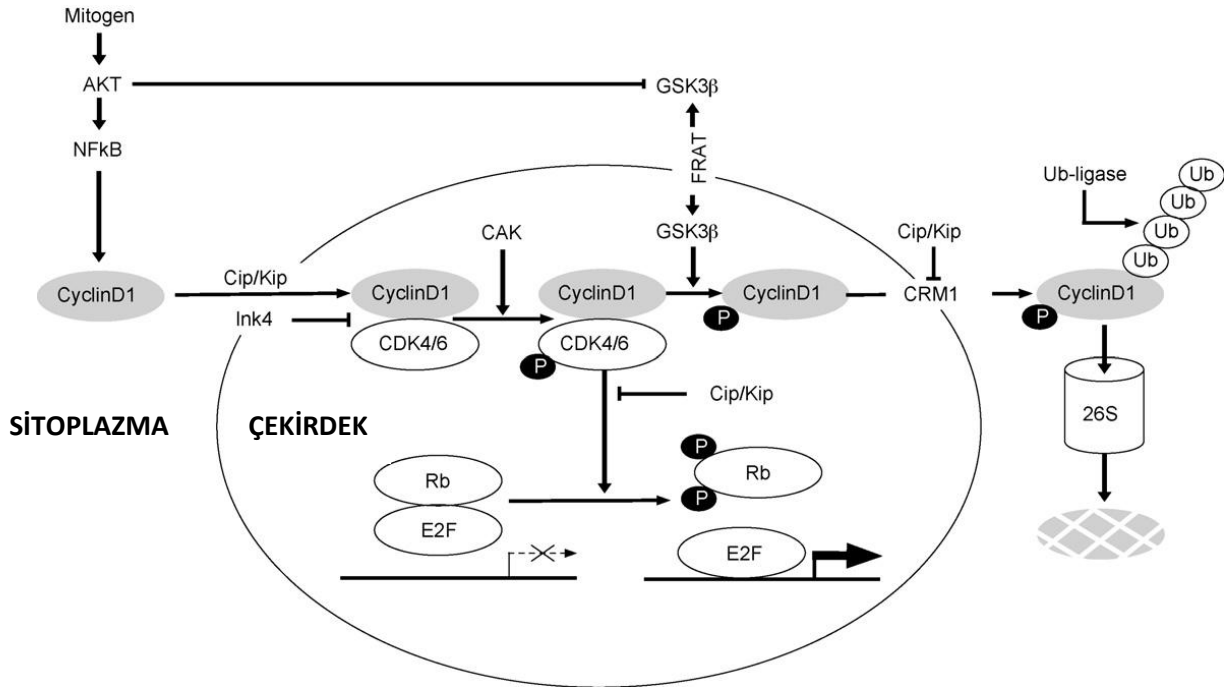
Bu transkripsiyonel kontrol sistemi; diğer tüm kontrol sistemlerinde olduğu gibi; hücre siklusunu düzenler, feedback halkalarını ve G1/S geçişini kuvvetlendirir.

- ❖ Serbestleşen E2F, kendi gen transkripsiyonunu artırır.
- ❖ G1/S siklin ve S siklin genlerinin E2F-bağımlı transkripsiyonu sayesinde G1/S-CDK ve S-CDK aktivitesi artar. Bu da Rb fosforilasyonu ve E2F açığa çıkmasını sağlar.
- ❖ G1/S CDK ve S-CDK aktivitesi Hct1-APC ve CKI proteinlerinin fosforilasyonunu arttırarak bunların inaktivasyon ve destrüksiyonunu sağlar.

Rb proteininin tamamen kaybı halinde hemen hücre proliferasyonunda artış oluşmaz. Çünkü Hct1 ve CKI proteinleri G1 kontrolünde yardımcı olur (52).

SİKLİN D1 (CCND1):

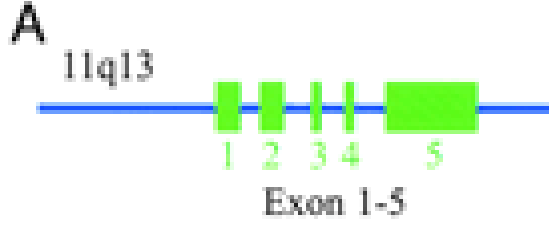
Siklin D1 hücre siklusunda G1 fazında CDK-4 (Siklin bağımlı kinaz) ile kompleks oluşturarak Rb1 (Retinoblastom tümör süpresör protein)' i fosforile ederek Rb1/E2F kompleksinden E2F'nin çözünmesine neden olur. Çözünen E2F, hücre siklusu S fazına girerken Siklin E ve diğer genlerin transkripsiyonunu sağlar. G1-S geçişi sırasında GSK-3 β çekirdekten içeri girer ve siklin d1'i fosforiller. Fosforillenen Siklin D1 crm ile sitoplazmaya taşınır ve 26 S proteozom tarafından ubiquitin ligazlar aracılığıyla yıkılır (Şekil 11) (6,57,58,59).



Şekil 11: Siklin D1 Fonksiyonu

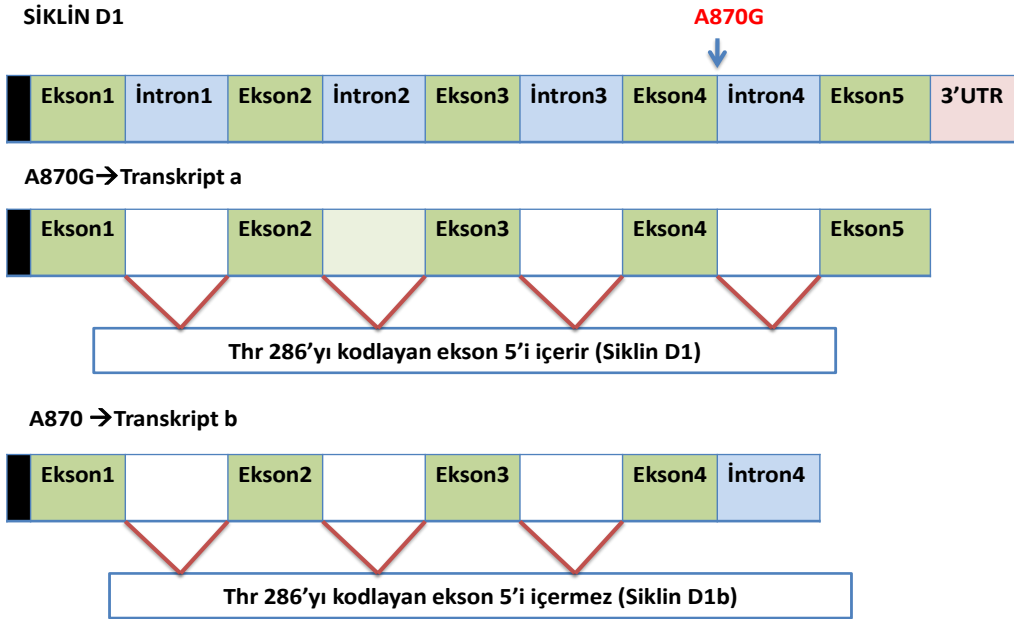
SİKLİN D1 GENİ:

Siklin D1 geni 11q13'te lokalize olmuştur (Şekil 12) (60,61).



Şekil 12: Siklin D1 geni lokalizasyonu

Siklin D1 geninin 4 ekson 242 kodon 870 nükleotidinde G→A polimorfizimi tanımlanmıştır. G870'in bulunması (transkript a) Thr 286 'yı içeren ekson 5'in ekson 4'e bağlanmasını sağlar. Thr286 (Threonine286), Crm1 ile Siklin D1'in hücre çekirdeği dışına taşınması için gereklidir. A870 alelinin bulunması durumunda (transkript b) Thr 286'yı kodlayan ekson 5 eksik olduğu tespit edilmiştir (Siklin D1b). Bu durumda Siklin D1 b'nin çekirdek içinde biriktiği ve normal hücrelerin malignat değişimini uyardığı gösterilmiştir (Şekil 13) (6,62).



Şekil 13: Siklin D1 gen transkripsiyonu

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereçler

CCND1 genetik polimorfizmi ile akciğer kanseri oluşumu arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla “Trakya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul” izini alındı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Kliniği’nde akciğer kanseri teşhisi konulmuş; radyoterapi ve kemoterapi tedavisi görmemiş 75 (72 erkek, 3 kadın) hastadan kan örnekleri alındı. Kontrol grubunda ise hasta grubu ile yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu olacak şekilde 58 (55 erkek, 3 kadın) sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri kullanıldı.

Hastaların yaş, cinsiyet, sigara, patolojik tetkikleri, klinik ve cerrahi yöntemlerle yapılan evrelendirilme değerlendirildi. Kontrol grubu; herhangi bir akciğer kanserine yönelik bulgusu olmayan, akciğer grafisi normal sınırlarda olan ve ailede bilinen bir kanser hastalığı olmayan bireylerden oluşturuldu.

Kontrol ve hasta gruplarının belirlenmesinin ardından 2 ml EDTA’ lı vakumlu tüplere kanları alındı. Hasta grubunun kan örneklerinden DNA izolasyon kiti (Vivantis) kullanılarak DNA izole edildi. Kontrol grubunun kan örneklerinden tuz – çöktürme yöntemi ile DNA izole edildi. İzole edilen DNA’ ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çalışmamızda kullanacağımız CCND1 genin 870. nükleotidi içeren bölgesi çoğaltıldı. PCR sonunda oluşan ürünler 5 µg/mL etidyum bromid ile hazırlanmış %2,5’ luk agoroz jellere yüklenerek U.V ışık altında gözlemlendi.

Kimyasal Malzemeler

Agaroz (Sigma)

Borik Asit (Sigma)

dNTP (deoksi Nükleotid Tri Fosfat; dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (MBI)

Etanol %100 (Promega)

Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (Sigma)

Magnezyumklorur (Sigma)

Proteinaz K (BioBasic)

Sodyum Dodesil Sülfat SDS (Sigma)

Taq Polimeraz Seti (BioBasic)

Trisma Base (Sigma)

Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Agaroz Elektroforez Tankı (Bio-Metra)

Derin Dondurucu (AEG)

Distile Su Cihazı (Nüve)

Dijital Fotoğraf makinesi (Canon Powershot A75)

Güç Kaynağı (Bio-Metra)

Manyetik Karıştırıcı (Nüve)

Otoklav (Nüve)

Otomatik Mikro Pipetler (Socorex)

pH metre (Schott)

Santrifüj (Hettich)

Spektrofotometre (Biotech)

Terazi (Scaltec)

ThermalCycler (Techne)

Vorteks (Velp)

Çözeltiler

Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltisi

10X Yükleme Çözeltisi

4 gr Sukroz

25 mg BPB (Bromofenolmavisi) → dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır.

10X TEB (Tris Borat Elektroforez Çözeltisi) (1 litre için) pH 7.4

54 gr Tris bazı

3.32 gr EDTA

27.5 gr Borik Asit

Yöntemler

DNA İzolasyonu (Tuz –çöktürme yöntemi)

DNA saflaştırılmasında DNA'sı izole edilecek hücreler çeşitli tamponlarla muamele edilerek parçalanır. Elde edilen özüt santrifüj ile çok hızlı döndürülerek DNA içeren bölümü ayrılır. Bu bölüm bir deterjan ve protein parçalayıcı enzimlerle birlikte 37 °C de tutulur. Bu işlem sırasında DNA'ya bağlı proteinler parçalanır. Bu şekilde DNA protein ve diğer moleküllerden ayrılır ve saf olarak elde edilir. Son olarak DNA, etil alkol içerisinde çöktürülür. DNA, yapısını koruyacak bir tampon çözelti içerisinde alınarak -20 °C' de saklanır.

Hücre Parçalama Çözeltisi (Lizis Buffer)

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0.1 mM EDTA

Çekirdek Parçalama Çözeltisi (Nükleaz Buffer, pH; 8.2)

10 mM Tris-HCl

400 mM NaCl

2 mM EDTA

DNA İzolasyon Yöntemi

- DNA' sını izole edilecek kan örneğinden 1 ml ayrı bir tübe alınır ve üzerine 5 ml lizis buffer (hücre parçalama çözeltisi) eklenir. Bu şekilde 15 dakika boyunca 0 °C' de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda 5000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda üst sıvı atılır ve kalan çökelti üzerine tekrar 5 ml lizis buffer (hücre parçalama çözeltisi) eklenir. Bu şekilde tekrar 5000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda yine üst sıvı atılır. Kalan çökelti üzerine 700 µl nükleaz buffer (çekirdek parçalama çözeltisi), 100 µl derişik H₂O, 25 µl %10' luk SDS ve 20 µl proteinaz K(20 mg/ml) ilave edilerek 37 °C' de gece boyu bekletilir.

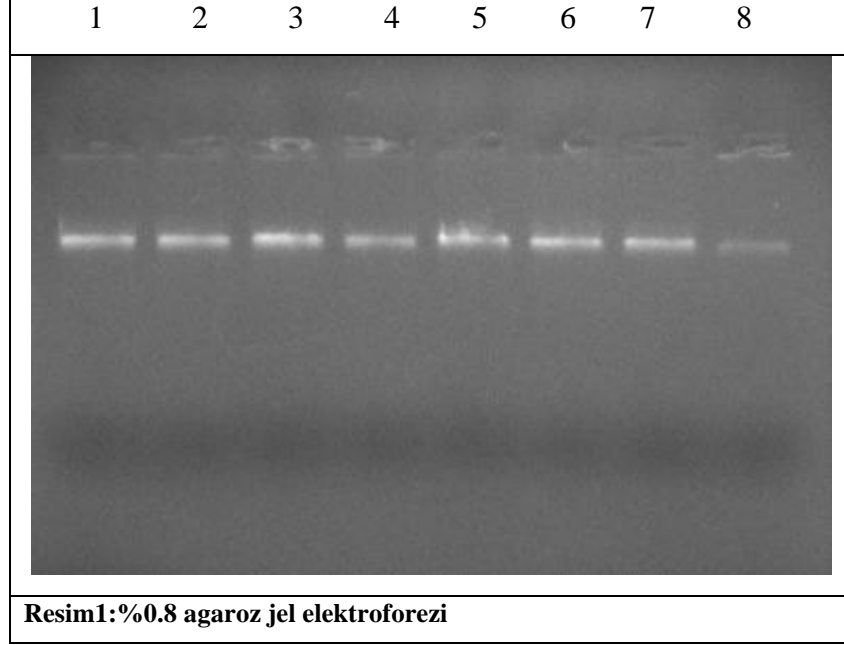
- 37 °C’ de gece boyu beklettiğimiz karışımın üzerine 800 µl derişik H₂O ve 800 µl 5M NaCl ilave edilir. Daha sonra 11.000 rpm’ de 25 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda üst sıvı ayrı bir tüpe alınır ve çökelti atılır.
- Kalan sıvı üzerine mevcut sıvının 3 – 4 katı hacimde etanol ilave edilerek sıvı içerisinde bulunan DNA’ nın çökmesi sağlanır.
- Etanol ile çöken DNA ependorf tüplerine alınarak 400 µl derişik H₂O içinde çözülür ve bu şekilde kullanılıncaya kadar -20 °C’ de derin dondurucuda saklanır.

DNA İzolasyonu (İzolasyon Kiti)

- 1) Protokole başlamadan önce lyophilized Proteinase K’ya 5,5 ml dH₂O ilave edilir.
- 2) 2.200 µl kanın üzerine 20 µl proteinaz K ve 200 µl Solution B1 ilave edilir.15 sn vortekslenir. 65 °C 10 dak inkübasyon edilir. Kısa bir santrifüj yapılır.
- 3) 200 µl Solution B2 ilave edilir ve 15 sn vortekslenir. Kısa bir santrifüj yapılır.
- 4) Bütün karışım Spin filtreye transfer edilir. 1 dak, 13000*g santrifüj edilir. Spin filtre yeni tüpe transfer edilir. 500 µl Solution B3 spin filtreye ilave edilir. 30 sn 13000*g santrifüj edilir.
- 5) Spin filtre kaldırılır,tüp içindeki boşaltılıp,spin filtre tekrar yerine konur. 500 µl Solution B4 spin filtreye ilave edilir. 30 sn 13000*g santrifüj edilir.
- 6) Spin filtre kaldırılır,tüp içindeki boşaltılıp,spin filtre tekrar yerine konur. 30 sn 13000*g santrifüj edilir. Spin filtre dikkatlice kaldırılır yeni bir tübe yerleştirilir.
- 7) 200 µl Solution B5 spin filtreye ilave edilir. 5 dak 65°C de inkübe edilir 1 dak 13000*g santrifüj edilir Filtre çıkartılır ve tüp kapatılır.

| Kit içindeki solusyonların içerikleri: | |
|--|-------------------------------|
| Solusyon B1 | Guanidine HCl/Tween solüsyon |
| Solusyon B2 | 100% Ethanol |
| Solusyon B3 | Etanol/Guanidine HCl solüsyon |
| Solusyon B4 | Etanol, Tris, NaCl |
| Solusyon B5 | 10 mM Tris-HCl. |

Elde edilen DNA örnekleri +4°C'de saklandı. DNA'nın kalitesini ve miktarını belirlemek için spektrofotometre cihazında 260 nm ve 280 nm'deki dalga boylarında ölçüm yapıldı. Aynı zamanda %0.8 agaroz jel elektroforezi yapılarak DNA gözlendi (Resim 1).



CCND1 geninde A870G polimorfizmin gözlendiği 4. ekzon bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler

F:5' -AGT TCA TTT CCA ATC CGC CC-3'

R:5' -TTT CCG TGG CAC TAG GTG TC-3'

PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 'ın Hazırlanışı:

1 örnek için hazırlanan karışım:

0,2 µg genomik DNA,

0,5 µmol/L primer F

0,5 µmol/L primer R

0,2 mmol/L dNTP,

2,5 mmol/L MgCl₂

1X Taq Buffer

1,5 U Taq DNA

Toplam: 50 µl

PZR Programı:

Ön denatürasyon : 94 °C 5 dakika

Denatürasyon : 94 °C 1 dakika

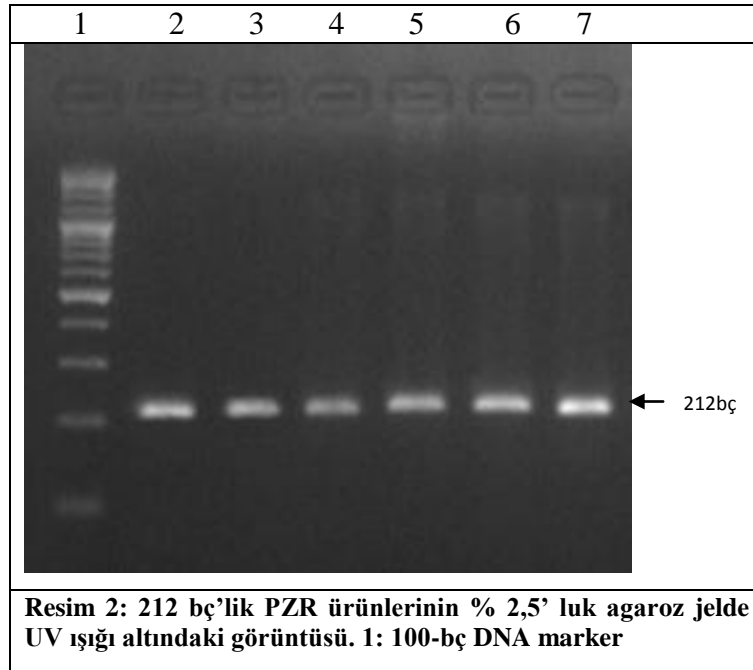
Son sentez : 60 °C 1 dakika

Bağlanma : 72 °C 1 dakika

Sentez : 72 °C 7 dakika

} 35 döngü

PZR ürünü 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde yürütüldü (Resim 2).

**Dördüncü Ekzon Bölgesinin PZR Ürünlerinin Msp I Enzim Kesimi:**

Msp I enzimi 10 X Buffer R (Vivantis) ve Buffer Tango tamponuyla (Vivantis) birlikte kullanıldı.

1 örnek için kullanılan miktarlar ;

8 µl derişik H₂O

1 µl Tampon

0,5 µl Msp I restriksiyon enzimi

Toplam Hacim : 9,5 µl

Hazırlanan bu mix üzerine 4 µl PZR ürünü ilave edilir ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon süresinin sonunda ürünler 5µg/mL etidyum bromid ile hazırlanan % 2,5' luk agaroz jelde yürütülerek U.V ışık altında oluşan bantlar gözlemlendi.

MspI restriksiyon enziminin çalışma mekanizması:

5'-C↓CGG....-3'

3'-....GGC↑C.....-5'

PZR ürünü, steril saf su, tampon, Msp I restriksiyon enzimi sırasıyla eklenerek toplam 15 µl karışım elde edildi. 0.2 ml'lik tüplerde olan karışım 37 °C de 24 saat süreyle kesim işlemi yapılmak üzere etüv cihazına yerleştirildi.

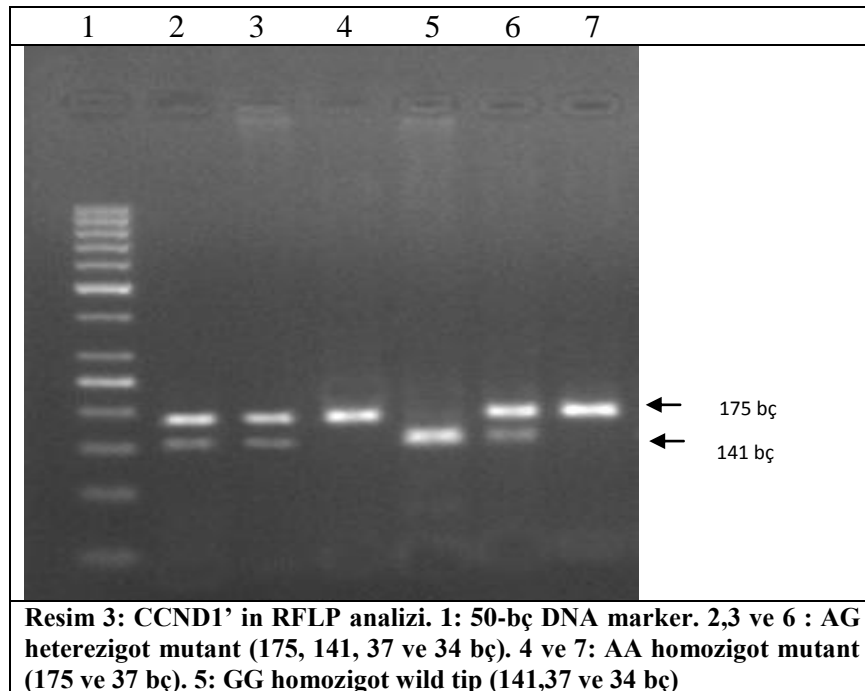
% 2,5'luk agaroz jel hazırlandı. Msp I enzimi ile kesilen PZR ürününden 9 µl ve yükleme tamponundan 1.8 µl karıştırılıp % 2'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, ultraviyole ışık altında incelendi.

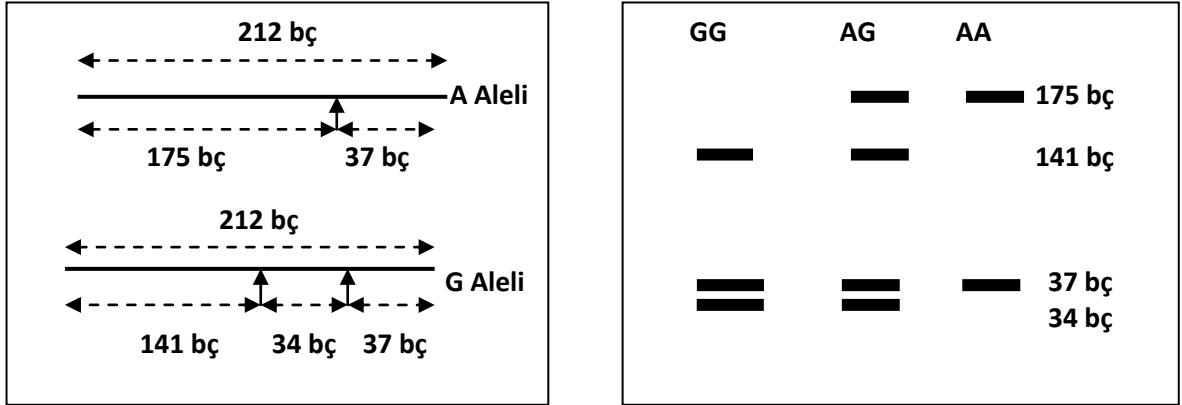
Restriksiyon işlemi sonucunda CCND1 genin 870. pozisyonundaki A→G polimorfizmin varlığında bant oluşumları aşağıdaki şekilde gözlenecektir (Şekil 14).

AA genotipinde 37 ve 175 bazlık bantlar (restriksiyon yok),

GG genotipinde 34, 37 ve 141 bazlık bantlar oluşur (restriksiyon tamamlanır),

Heterozigot AG genotipi 34,37,141 ve 175 bazlık bantlarla karakterize olur (34 ve 37 bazlık bantlar %2,5'luk agaroz jelde görülmemektedir.) (Resim 3).





Şekil 14: Msp I restriksiyon enzimi ile kesilen PZR ürünleri

İSTATİKSEL ANALİZ:

Verilerin analizi SPSS 15.01 paket programında yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde ki-kare, student t testi kullanıldı. $P < 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

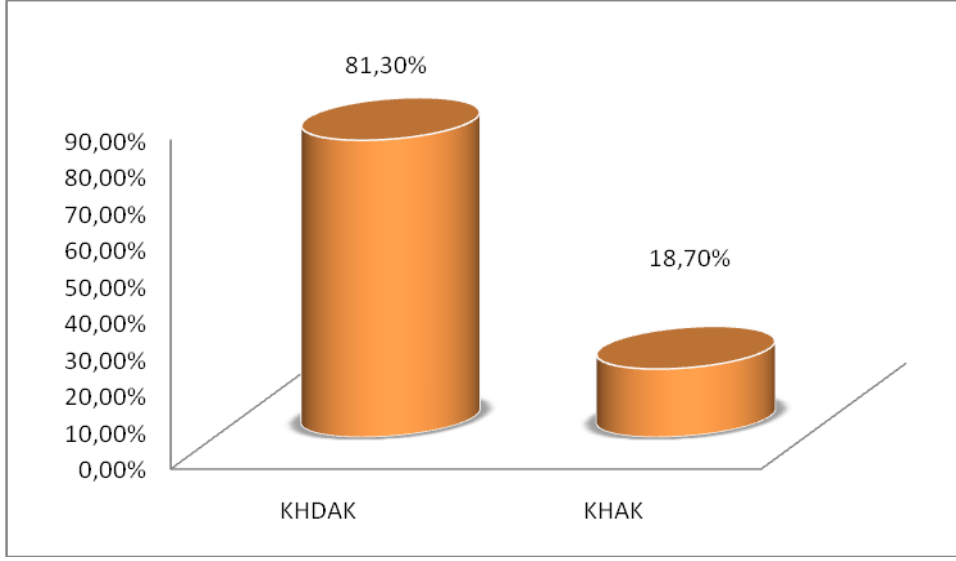
BULGULAR

Akciğer kanseri tanı 75 (72 erkek,3 kadın) olgunun ve kontrol grubu olarak seçilen 58 (55 erkek, 3 kadın) bireyin karakteristik özellikleri tablo 1’de görülmektedir.

| Tablo 1: Hasta ve Kontrol Grubunun Karakteristik Özellikleri | | |
|---|------------------------------|--------------------------------|
| | HASTA (%) (n=75,%100) | KONTROL (%) (n=58,%100) |
| CİNSİYET (E:K) | E: 72 (96); K: 3 (4) | E: 55 (94,8); K: 3(5,2) |
| ORTALAMA YAŞ ± SS | 62,00±9,77 | 57,78±15,74 |
| SS: standart sapma | (p= 0,06) | |

Hasta grubunun histolojik alt tipleri tablo 2 ve grafik 3’de verilmiştir.

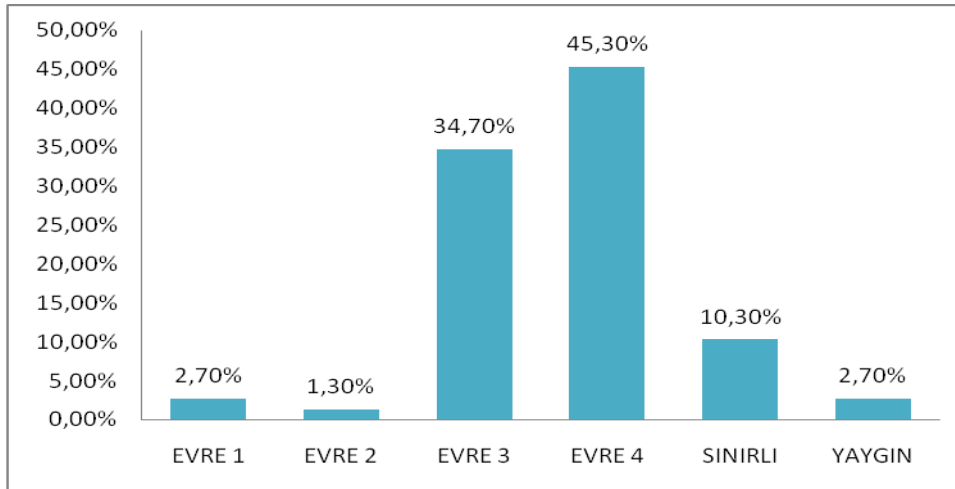
| Tablo 2: Hasta grubunun histolojik alt tipleri | |
|---|------------------|
| HÜCRE TİPİ | n=75, (%) |
| KHAK^a | 14 (18,7) |
| KHDAK^b | 61 (81,3) |
| ^a Küçük Hücreli Akciğer Kanseri | |
| ^b Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri | |



Grafik 3: Hasta grubunun histolojik alt tipleri

Hasta grubunun tümör evreleri tablo 3 ve grafik 4’de verilmiştir.

| Tablo 3: Hasta grubunun tümör evreleri | |
|---|------------------|
| EVRE | n=75, (%) |
| EVRE 1 | 2 (2,7) |
| EVRE 2 | 1 (1,3) |
| EVRE 3 | 26 (34,7) |
| EVRE 4 | 34 (45,3) |
| SINIRLI | 10 (13,3) |
| YAYGIN | 2 (2,7) |



Grafik 4: Hasta grubunun tümör evreleri

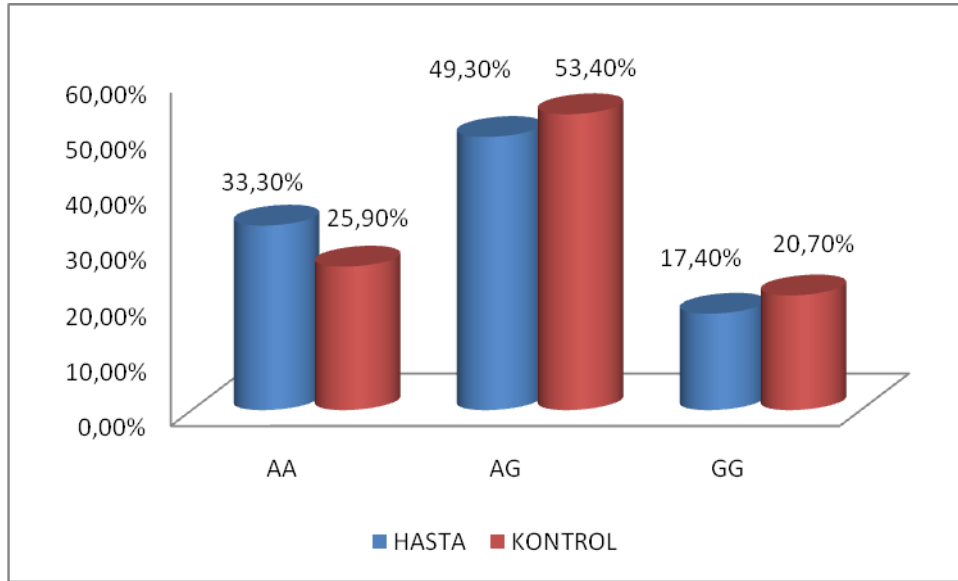
75 hasta ve 58 sağlıklı bireyden oluşan toplam 133 bireyde A870G alelinin akciğer kanseri ile ilişkili olup olmadığını istatistiksel olarak araştırdık. Genotiplerin hasta ve kontrol gruplardaki dağılımları Tablo 4’ de gösterilmiştir.

H₀: A870G gen polimorfizimi ile grup arasında bir ilişki yoktur.

H₁: A870G gen polimorfizimi ile grup arasında bir ilişki vardır.

| TABLO 4: GRUP-GENOTİP İLİŞKİSİ | | | |
|--|--------|------------|--------------|
| GENOTİP | TOPLAM | HASTA,n(%) | KONTROL,n(%) |
| AA | 40 | 25 (33,3) | 15 (25,9) |
| AG | 68 | 37 (49,3) | 31(53,4) |
| GG | 25 | 13 (17,4) | 12 (20,7) |
| P=0,634>0,05 olduğundan genotip ile grup arasında anlamlı bir ilişki yoktur. | | | |

Genotip ile grup arasındaki ilişki istatistiksel olarak χ^2 testi ile değerlendirildi. P değeri 0,050’ den büyük olduğundan (P=0,634) grup ile genotip arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Gruba göre genotip dağılımları Grafik 5’ de gösterilmiştir.



Grafik 5: Grup- Genotip ilişkisi

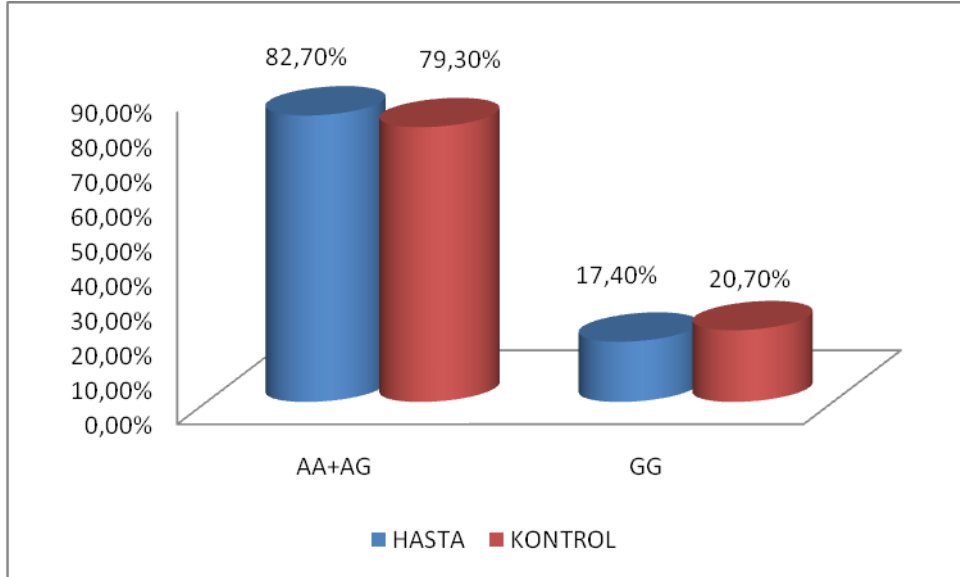
Hasta ve kontrol grubunda A870 aleli ile akciğer kanseri arasında ilişkili olup olmadığını istatistiksel olarak araştırdık. Genotiplerin hasta ve kontrol gruplardaki dağılımları Tablo 5’ de gösterilmiştir.

H₀: A870 aleli taşıyan bireyler ile 870G aleli taşıyan bireyler arasında akciğer kanseri görülme sıklığı bakımından anlamlı bir fark yoktur.

H₁: A870 aleli taşıyan bireyler ile 870G aleli taşıyan bireyler arasında akciğer kanseri görülme sıklığı bakımından anlamlı bir fark vardır.

| TABLO 5: GRUP-A870 ALELİ İLİŞKİSİ | | | |
|--|---------------|-------------------|---------------------|
| GENOTİP | TOPLAM | HASTA,n(%) | KONTROL,n(%) |
| AA+AG | 108 | 62 (82,7) | 46(79,3) |
| GG | 25 | 13 (17,3) | 12 (20,7) |
| P=0,65>0,05 olduğundan A870 aleli ile grup arasında anlamlı bir ilişki yoktur. | | | |

Hasta ve kontrol grubunda A870 aleli ile hastalık arasındaki ilişki istatistiksel olarak χ^2 testi ile değerlendirildi. P değeri 0,050' den büyük olduğundan (P=0,65) grup ile A870 aleli arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Gruba göre A870 aleli dağılımları Grafik 6' da gösterilmiştir.



Grafik 6:A870 aleli ile grup arasındaki ilişki

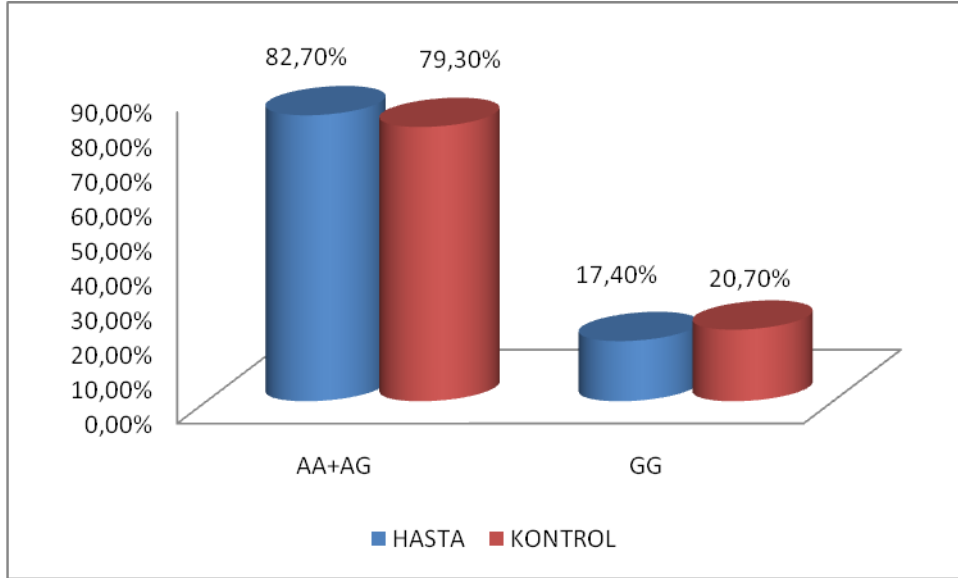
Hasta ve kontrol grubunda 870G aleli ile akciğer kanseri arasında ilişkili olup olmadığını istatistiksel olarak araştırdık. Genotiplerin hasta ve kontrol gruplardaki dağılımları Tablo 6' da gösterilmiştir.

H₀: A870 aleli taşıyan bireyler ile 870G aleli taşıyan bireyler arasında akciğer kanseri görülme sıklığı bakımından anlamlı bir fark yoktur.

H₁: A870 aleli taşıyan bireyler ile 870G aleli taşıyan bireyler arasında akciğer kanseri görülme sıklığı bakımından anlamlı bir fark vardır.

| TABLO 6: GRUP-870G ALELİ İLİŞKİSİ | | | |
|--|---------------|-------------------|---------------------|
| GENOTİP | TOPLAM | HASTA,n(%) | KONTROL,n(%) |
| AA | 40 | 25(33,3) | 15(25,9) |
| AG+ GG | 93 | 50(66,7) | 43(74,1) |
| P=0,35>0,05 olduğundan 870G aleli ile grup arasında anlamlı bir ilişki yoktur. | | | |

Hasta ve kontrol grubunda 870G aleli ile hastalık arasındaki ilişki istatistiksel olarak χ^2 testi ile değerlendirildi. P değeri 0,050' den büyük olduğundan (P=0,35) grup ile 870G aleli arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Gruba göre 870G aleli dağılımları Grafik 7' de gösterilmiştir.



Grafik 7:A870 aleli ile grup arasındaki ilişki

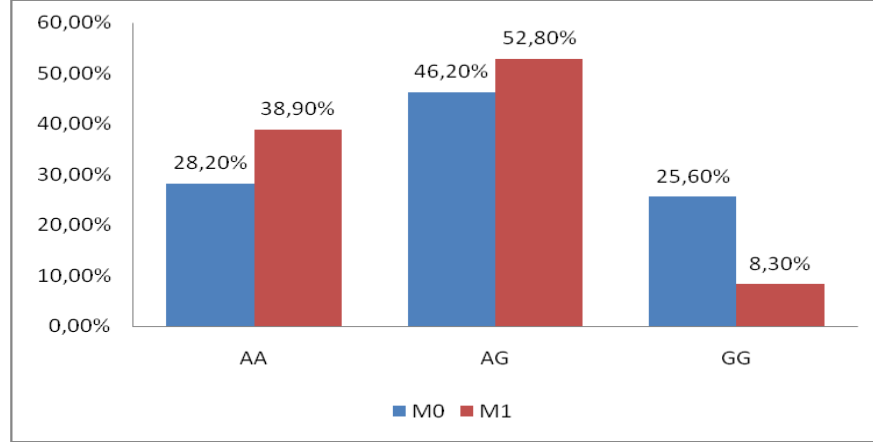
39 M0 ve 36 M1 bireyden oluşan hasta grubu ile CCND1 A870G gen polimorfizimi arasındaki ilişki olup olmadığını istatistiksel olarak araştırdık. Genotiplerin M0 ve M1 gruplardaki dağılımları Tablo 7' de gösterilmiştir.

H₀: CCND1 A870G gen polimorfizimi ile metastaz arasında bir ilişki yoktur.

H₁:CCND1 A870G gen polimorfizimi ile metastaz arasında bir ilişki vardır.

| TABLO 7: GENOTİP-METASTAZ (M) İLİŞKİSİ | | | |
|--|---------------|----------------|----------------|
| GENOTİP | TOPLAM | M0,n(%) | M1,n(%) |
| AA | 24 | 11 (28,2) | 14 (38,9) |
| AG | 39 | 18 (46,2) | 19 (52,8) |
| GG | 11 | 10 (25,6) | 3 (8,3) |
| P=0,132>0,05 olduğundan genotip ile metastaz arasında anlamlı bir ilişki yoktur. | | | |

Genotip ile metastaz arasındaki ilişki istatistiksel olarak χ^2 testi ile değerlendirildi. P değeri 0,05' den büyük olduğundan (P=0,132) metastaz ile genotip arasında anlamlı bir ilişki yoktur. Metastaza göre genotip dağılımları Grafik 8' de gösterilmiştir.



Grafik 8: Metastaz - Genotip ilişkisi

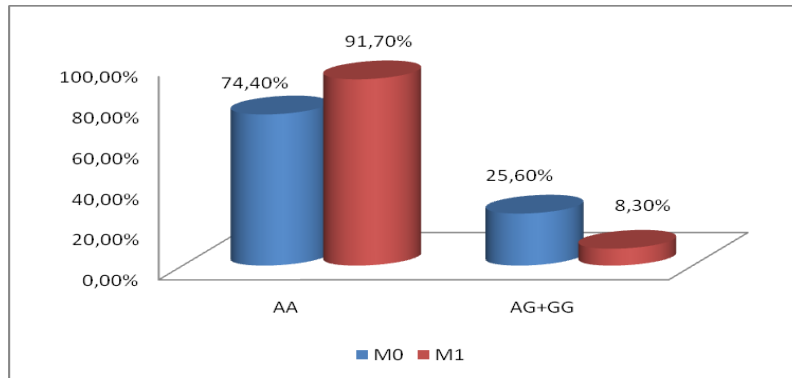
A aleli varlığında oluşan transkript b varlığında hücrenin malign değişimini uyardığından dolayı 870G alelini homozigot taşıyan bireyler ile 870A alelini hem homozigot hem de heterozigot taşıyan bireyler arasında metastaz durumuna göre istatistiksel olarak araştırdık. Oluşturulan dominant modelin genotip dağılımları Tablo 8’ de verilmiştir.

H₀: Dominant modele göre 870G genotipi ile metastaz arasında bir ilişki yoktur.

H₁: Dominant modele göre 870G genotipi ile metastaz arasında bir ilişki vardır.

| TABLO 8: DOMİNANT MODELE GÖRE GENOTİP-METASTAZ (M) İLİŞKİSİ | | | |
|--|--------|-----------|-----------|
| GENOTİP | TOPLAM | M0,n(%) | M1,n(%) |
| AA+AG | 48 | 29 (74,4) | 33 (91,7) |
| GG | 26 | 10 (25,6) | 3 (8,3) |
| P=0,048<0,05 olduğundan 870G genotipi ile metastaz arasında anlamlı bir ilişki vardır. | | | |

Genotip frekansları istatistiksel olarak χ^2 testi ile değerlendirildi. P değeri 0,050’ den küçük olduğundan (P=0,048) 870G alelini taşıyan bireyler ile 870A alelini taşıyan bireyler arasında metastaz bakımından anlamlı bir fark bulundu. Hasta grubunda 870G aleli ile 870A aleli taşıyan bireylerin genotip dağılımları grafik 9’ da gösterilmiştir.



Grafik 9: Metastaz - Genotip ilişkisi

TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünyada kanser nedeniyle ölümlerin başında yer almaktadır. %80-90 oranında sigara sorumludur (63). Son yıllarda yapılan çalışmalar karsinogen metabolizmasını kontrol eden genlerle akciğer kanseri ile arasında ilişki olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar daha çok hücre siklusunda G1→S fazına geçişi sağlayan siklin, siklin bağımlı kinazlar ve onların inhibitörleri üzerinedir (5,64).

Çalışmamızda araştırdığımız Siklin D1 A870G gen polimorfizimi hücre siklusunda retinoblastom proteini fosforile ederek Rb/E2F kompleksinin ayrılıp hücrenin G1 fazından S fazına geçişini sağlar (29,65,66,67).

Siklin D1 geni 4. ekson, 242. kodon, 870. Nkleotidinge G→A polimorfizimi tanımlıdır. G alleli varlığında (transkript b) Thr286 kodlanır ve Siklin D1 hücre dışına crm1 ile taşınır. A alelinin varlığında (transkript a) ise Thr286 kodlanmaz ve hücre malgin değişime uğrar (68).

Yapılan çeşitli araştırmalarda Siklin D1 geni A870G gen polimorfiziminin kolon kanseri ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (69,70).

2005 yılında Kuzey Hindistan'da Sobti ve ark. yaptığı çalışmada akciğer kanseri ile CCND1 A870G gen polimorfizimi arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedeflemiş, 151 akciğer kanserli hastayı 151 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırmıştır. AA, AG, GG genotiplerinin dağılımında hasta ve kontrol grupları arasında fark olmadığını, AA+AG ile GG genotiplerinin sigara içenlerle kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

olduğunu göstermiştir (5). Genotip dağılımı bizim çalışmamızla uyumludur ancak bizim hasta ve kontrol grubundaki bazı bireylerin sigara içme alışkanlıklarını tespit edemediğimizden sigara alışkanlığı ile A870G gen polimorfizimini karşılaştıramadık.

2005 yılında Gaustchi ve ark. yaptığı çalışmada küçük hücre dışı akciğer kanseri ile CCND1 A870G gen polimorfizimi arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedeflemiş, 244 küçük hücre dışı akciğer kanserli hastayı 187 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırmıştır. AA, AG, GG genotiplerinin dağılımında hasta ve kontrol grupları arasında fark olmadığını, AA+AG ile GG genotiplerinin sigara içenlerle kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir. Yaş, cinsiyet, tümör evresi ile A870G arasında bir ilişki bulamamışlardır (63).

2006 yılında Adel K. Ayed'in yaptığı çalışmada evre 1-2 küçük hücre dışı akciğer kanseri ile CCND1 A870G gen polimorfizimi arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedeflemiş, 98 küçük hücre dışı akciğer kanserli hastayı immünohistokimyasal incelemiştir. Siklin D1 pozitif tümörlerin, siklin D1 negatif tümörlere göre daha kısa yaşadıklarını (5 yıllık sağ kalım incelendiğinde) belirtmişlerdir (64).

2003 yılında Çin polpulasyonunda Shi Quiling ve ark. yaptığı çalışmada akciğer kanseri ile CCND1 A870G gen polimorfizimi arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedeflemiş, 182 akciğer kanserli hastayı 185 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırmıştır. A alleli frekansı ile G aleli frekansını karşılaştırıp aralarında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir ($p < 0,05$) Ayrıca AA genotipini yaş, cinsiyet, sigara durumuna göre GG genotipi ile karşılaştırdıklarında yüksek bulmuşlardır (71).

2001 yılında Mulan Jin ve ark. yaptığı çalışmada evre 1-2 küçük hücre dışı akciğer kanseri ile CCND1 A870G gen polimorfizimi arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedeflemiş, 106 küçük hücre dışı akciğer kanserli hastayı immünohistokimyasal incelemiştir. CCND1+/p16- hastaların toplam sağkalım oranı ile CCND1-/p16+ hastalarla karşılaştırıldığında daha düşük bulmuşlardır (67).

1999 yılında Keum ve ark. yaptığı küçük hücre dışı akciğer kanseri ile CCND1 A870G gen polimorfizimi arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedeflemiş 69 küçük hücre dışı akciğer kanserli hastayı immünohistokimyasal incelemiştir. Evre 1 de Siklin D1+ ile evre 2-3 karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel bir ilişki bulmuşlardır ($p < 0,05$) (72).

CCND1 A870G gen polimorfiziminin akciğer kanseri oluşma riskiyle ilişkisini göstermeyi hedeflediğimiz çalışmamızda 75 akciğer kanserli hastada CCND1 870AA, 870AG, 870GG genotipleri sırasıyla, 25(%33,3), 37(%49,3), 13(%17,4); kontrol grubunda ise

15(%25,9), 31(%51,3), 12(%20,7) olarak tespit edilmiştir (tablo 7). CCND1 A870G gen polimorfizimi ile hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,634$). Bu sonuç 2005 yılında Kuzey Hindistan'da Sobti ve ark. yaptığı çalışma ile uyumludur.

AA+AG/GG genotipi hasta grubu (AA+AG:62(%82,7); GG:13(%17,3)) ile kontrol grubu (AA+AG:46(%79,3); GG:12(%20,7)) arasında karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel bir fark yoktur. Bu sonuç 2005 yılında Kuzey Hindistan'da Sobti ve ark. yaptığı çalışma ile uyumludur.

AA/AG+GG genotipi hasta grubu (AA:25(%33,3); AG+GG:50(%66,7)) ile kontrol grubu (AA:15(%25,9); AG+GG:43(%74,1)) arasında karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel bir fark yoktur. Bu sonuç 2005 yılında Kuzey Hindistan'da Sobti ve ark. yaptığı çalışma ile uyumludur.

Çalışmamızda hasta grubu içerisinde 870G alelini homozigot taşıyan bireyler ile 870A alelini hem homozigot hem de heterozigot taşıyan bireyler arasında metastaz durumuna göre karşılaştırıldığında (M0: (AA+AG:29(%74,4), GG:10(%25,6); M1: (AA+AG:33(%91,7), GG:3(%8,3)) istatistiksel olarak anlamlı istatistiksel bir ilişki bulundu ($p=0,048$). 2005 yılında Gaustchi ve ark. yaptığı 244 küçük hücre dışı akciğer kanseri hastada araştırdığı AA+AG/GG ile hastalığın evresi (1-3/4) arasında istatistiksel bir ilişki bulamamışlardır.

Genotip ve aleller bütün gruplarda Hardy – weinberg eşitliğindeydi. İstatistiksel analiz χ^2 kullanılarak yapıldı.

SONUÇ

Akciğer kanseri etyolojisinde yaş, cinsiyet, sigara, alkol, asbest maruziyeti, genetik yatkınlığın kombine olarak rol aldığı bilinmektedir. Akciğer kanseri gelişiminde siklin D1 genindeki A870G polimorfizminin etkisini araştırmayı hedeflediğimiz çalışmada, 75 akciğer kanseri tanısı almış hasta ile 58 sağlıklı kontrol grubunu oluşturan bireyler karşılaştırılmıştır. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve agaroz jel elektroforez teknikleri kullanılarak 133 örnekten elde edilen DNA'lardan A870G polimorfizmi araştırılmıştır.

Yaş, cinsiyet, gruplara göre karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Hasta grubu içerisinde metastaz durumda 870G aleli ile 870A aleli karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,048$).

Yaptığımız çalışma sonucunda;

1. Akciğer kanserinde metastaz durumunun oluşmasında A870 alelinin rol alabileceği
2. Klinik açıdan değerlendirildiğinde A alelinin varlığının hastalığın ileri safhasında metastaz riskini artırabileceği
3. Kanser gelişiminde etkili olan tümör supresör gen ve onkogenlerin yanı sıra CCND1 genlerindeki göz ardı edilmemesi gerektiği

4. Ayrıca geniş hasta gruplarını içeren ileri çalışmalarla CCND1 gen polimorfizmlerinin araştırılmasının uygun olacağı, böylelikle değerlendirmenin istatistiksel olarak daha anlamlı şekilde tespit edilebileceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA SİKLİN D1 (CCND1) GEN POLİMORFİZİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Suat ÇAKINA

Amaç: Bu çalışma akciğer kanseri teşhisi konmuş hastalarda Siklin D1(CCND1) gen polimorfizimini araştırmak ve bu polimorfizimin akciğer kanserinin gelişimindeki rolünü belirleyerek erken teşhis ve tedaviye kliniksel katkı sağlayabilmek amacıyla planlandı.

Gereç ve yöntem: Sağlıklı 58 bireyden oluşan kontrol grubundan ve Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji polikliniğine başvuran akciğer kanseri teşhisi konulan radyoterapi ve kemoterapi tedavisi görmemiş 75 hastadan alınan kan örneklerinden Vivantis DNA izolasyon kiti ile DNA'ları elde edildi. Elde edilen DNA' lardan CCND1 geninin 4. eksonundaki A870G gen polimorfizimini içeren bölge özgün primerlerle PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) metoduyla çoğaltıldı. Daha sonra PZR ürünleri MspI restriksiyon enzimi ile kesildi, %2,5' luk agaroz jel ile elektroforez cihazında yürütülüp ultraviyole (UV) ışığı altında incelendi.

Bulgular: Hasta grubundaki A870G genotip dağılımı (AA = 33.3%, AG = 49.3% ve GG = 17.4%) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (AA =25.9%, AG= 53.4% ve GG = 20.7%) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Hasta grubu içerisinde AA+AG/GG genotipi ile metastaz (M) durumuna göre incelendiğinde M0 (metastaz yok; AA+AG= 74.4%, GG= 25.6%) ve M1(metastaz var; AA+AG= 91.7%, GG=8,3%) arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki görüldü ($p<0.05$)

Sonuç: Çalışmamızdaki bulgular istatistiksel olarak (χ^2) değerlendirildiğinde metastazın gelişimine A alelinin G aleline karşılık daha fazla katkı yaptığı saptanmıştır ($p<0,05$). Bu durum hastalığın M0 ve M1 evrelerinde A alelinin artmasıyla paralellik gösterir.

Anahtar Kelimeler: akciğer kanseri, siklin d1, polimorfizm

SUMMARY
INVESTIGATION OF CYCLIN D1 (CCND1) GENE
POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH LUNG CANCERS

Suat ÇAKINA

Objectives: In this study, we aimed to investigate the CCND1 gene polymorphism in lung cancer patients, and this polymorphism that is determined a role of lung cancer develop may contributes to early diagnosis and treatment.

Material and methods:

Consisting of 58 healthy individuals from the control group and Trakya University Faculty of Medicine Oncology clinics applied to diagnose 75 lung cancer patients. None of the lung cancer patients had received radiation and or chemotherapy.

DNA was extracted from whole blood samples of study groups by Vivantis blood DNA kits. The CCND1 G/A polymorphism at nucleotide 870, codon242 in exon 4, was detected with the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). After PCR product were digested with the restriction enzyme MspI. The restriction digest products were analyzed through electrophoresis on 2.5% agarose gel by UV.

Results:

We did not find significant gene frequency of A870G between the patients (AA = 33.3%, AG = 49.3% ve GG = 17.4%) and the controls (AA =25.9%, AG= 53.4% ve GG = 20.7%) ($p>0.05$). In the patients groups, we find significant gene frequency of AA+AG/GG between M0 (metastas (-) ; AA+AG= 74.4%, GG= 25.6%) and M1 (metastas (+); AA+AG= 91.7%, GG=8,3%) ($p<0.05$).

Conclusion:

Working as our statistical findings (χ^2) is evaluating the development of metastases contribute to the A allele than G allele ($p<0.05$). Stages of the illness in this case, M0 and M1 indicates a parallel increase in A allele.

Key words: lung cancer, cyclin d1, polymorphism

KAYNAKLAR:

1. İtil O. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. In: Haydaroğlu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2000:15-34.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ,. Cancer Statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58:71–96.
3. Karlıkaya C, Erdoğan S, Akkoçlu A, Oktay G, Güner G, Uçan ES, Çımrın AH. Akciğer Kanserinde Çoklu Tümör Belirleyicisi Analizi. Toraks Dergisi, 2003;4(3):248-259
4. Köktürk N, Kırıçoğlu CE, Öztürk C. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. Solunum 2003;3:127-138.
5. Sobti RC, Kaur P, Kaur S, Singh J, Janmeja AK, Jindal SK, Kishan J, Raimondi S. Effects of cyclin D1 (CCND1) polymorphism on susceptibility to lung cancer in a North Indian population. Cancer Genetics and Cytogenetics 170 (2006) 108-114.
6. Gautschia O, Ratschiller D, Guggenberger M, Betticher DC, Heighway J. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation. Lung Cancer (2007) 55, 1-14.
7. Spiro SG, Porter JC: Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. Am J Respir Crit Care Med 2002;166:1166-96.
8. Radzikowska E, Roszkowski K, Glaz P. Lung cancer in patients under 50 years old. Lung Cancer 33 (2001) 203–211.
9. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun MJ. Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2002;52:23-47.
10. Alberts WM, Lung Cancer Guidelines: Introduction. Chest 2003;123;1-2.
11. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer Statistics, 2003. CA Cancer J Clin 2003;53;5-26.
12. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000;50:7-33.
13. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. CA Cancer J Clin 2001;51;15-36.
14. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49: 33-64.
15. Skuladottir H , Olsen HJ, Hirsch FR. Incidence of lung cancer in Denmark: historical and actual status. Lung Cancer 27 (2000) 107–118.

16. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57;43-66.
17. Kırkıl G, Deveci F, Turgut T, Muz MH, Kaçar C. Akciğer kanserinin epidemiyolojik özelliklerinin retrospektif olarak karşılaştırılmalı değerlendirilmesi. *F.Ü Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005; 19(3): 165-169.
18. Göksel T et al. Pattern of Lung Cancer in Turkey, 1994–1998. *Respiration* 2002;69:207–210.
19. Yurdakul AS, Çalışır HC, Demirağ F, Taci N, Öğretensoy M,. Akciğer Kanserinin Histolojik Tiplerinin Dağılımı. *Toraks Dergisi*, 2002;3(1):59-65.
20. Alberg AJ, Samet JM,. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* 2003;123;21-49.
21. Kırkıl G, Deveci F, Turgut T, Muz MH, Kaçar C. Akciğer kanserinin epidemiyolojik özelliklerinin retrospektif olarak karşılaştırılmalı değerlendirilmesi. *F.Ü Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005; 19(3): 165-169.
22. Ratschiller D, Heighway J, Gugger M, Kappeler A, Pirnia F, Schmid RA, Borner MM, Betticher DC,. Cyclin D1 Overexpression in Bronchial Epithelia of Patients With Lung Cancer Is Associated With Smoking and Predicts Survival. 2003; *J Clin Oncol* 21:2085-2093.
23. Özlü T, Bülbül Y. Smoking and lung cancer. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2005; 53(2): 200-209.
24. Köktürk N, Öztürk C, Kırıçoğlu CE,. Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum* 2003;5:139-145.
25. Müsellim B. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Semponyum Dizisi No:58*, 2007; 113-118.
26. Shields PG., Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* (2002) 21, 6870 – 6876.
27. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. 2007; *Carcinogenesis* vol.28 no.3 pp.507–518.
28. Nelson HH, Kelsey KT, The molecular epidemiology of asbestos and tobacco in lung cancer. *Oncogene* (2002) 21, 7284 – 7288.
29. Even GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. 2001; *Nature*, Vol 411: 342-348.
30. Aydın A, Topuz E,. Akciğer kanseri tanı-tedavi-takip. İstanbul konsensusu. 2006.

31. Memiş L. Akciğer Tümörlerinde Sınıflama ve Patoloji. *Türkiye Klinikleri J Thorax Dis* 2004, 2: 217-221.
32. Watanabe Y. TNM Classification for Lung Cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* ,2003, Vol. 9, No. 6:343-350.
33. Mountain CF. The International System for Staging Lung Cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 2000; 18:106–115.
34. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111;1710-1717.
35. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, Fifth Edition (1997), *Cancer*, 1997, Vol. 80, Number 9: 1803-1804.
36. Işıtmangil T, IASLC Akciğer Kanseri Evrelendirme Projesi: Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde TNM Sınıflandırmasının Yedinci Düzenlemesi için öneriler. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;16(1):58-64.
37. Goldstraw P, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *Journal of Thoracic Oncology*, 2007, Volume 2, Number 8:706-714.
38. Israels ED, Israels LG. The Cell Cycle. *Oncologist* 2000;5;510-513.
39. Engin K, Özyardımcı N, Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Bölüm 3.
40. Güneş H. Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri. 1999. *Tr. J. of Biology* 23:283–292 .
41. Doğan AL, Güç D,. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, 2004; *Hacettepe Tıp Dergisi*; 35:34-42.
42. Katu J, Matsuoka M, Strom DK, Sheer CJ,. Regulation of Cyclin D-Dependent Kinase 4 (cdk4) by cdk4-Activating Kinase. 1994; *Molecular and Cellular Biology*, Vol 14; No 4:2713-2721.
43. Reynold RJ, Scheker AJ. Radiation, Cell Cycle, and Cancer. 1995, *Los Alamos Science* Number 23:51-89.
44. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell Cycle and Apoptosis. 2000; *Neoplasia*, Vol 2, No 4: 291-299.
45. Kramer M, Moerman DG,. Cell-cycle regulation. 2005, *Worm Book*: 1-16.

46. Novak B, Sible JC, Toyson JJ, Checkpoints in the Cell Cycle. Encyclopedia of Life Sciences. 2002, Nature:1-8.
47. Garret M, Cell cycle control and cancer. 2001. Current Science, Vol. 81, NO. 5:515-522.
48. Blagosklonny MV, Pardee AB, The Restriction Point of the Cell Cycle. 2002; Cell Cycle 1:2, 103-110.
49. Weinberg RA. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. 1995. Cell, Vol. 81,323-330.
50. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. 1998; Clin Pathol:Mol Pathol ;51:1-7.
51. Ikehera M, et al. Expression of cyclin D1 but not of cyclin E is an indicator of poor prognosis in small adenocarcinomas of the lung. 2003; Oncology Reports 10: 137-139.
52. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors The cell cycle and programmed cell death. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Taylor and Francis Group; 2002.p.983-1026.
53. Harbour JW, Dean DC, Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. 2000; Nature Cell Biology, Vol 2:65-67.
54. Barbara D, Wu L, Buckley S, Hall LF, Anderson KD, Warburton D. Cyclin D1 antisense RNA destabilizes PRB and retards lung cancer cell growth. 1999; Lung Cell. Mol. Physiol. 17: L941-L949.
55. Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Lantuejoul S, Veyrenc S, Brambilla C,. Alterations of Rb Pathway (Rb-p16INK4-Cyclin D1) in Preinvasive Bronchial Lesions1. 1999; Clinical Cancer Research, Vol. 5, 243-250.
56. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. 2006; Oncogene, 25: 1620-1628.
57. Israels ED, Israels LG. Apoptosis. Stem Cells 1999;17;306-313.
58. Caputi A, et al. Prognostic Role of Cyclin D1 in Lung Cancer. 1999; Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol. 20, pp. 746-750.
59. Kang YK, Kim WH, Jang JJ, Expression of G1-S Modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 2002; Human Pathology, Volume 33, No. 9:877-883.
60. Han SS, No JH, Jeon YT, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. Association of cyclin D1 G870A polymorphism with uterine leiomyoma in women whose body mass index values are above 25 kg/m². , 2008; Human Reproduction, Vol.23, No.3: 525-529.

61. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG, Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. 2004; *Endocrinology* 145(12):5439–5447.
62. Alao JP, The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. 2007; *Molecular Cancer* 2007, 6:24.
63. Gaustchi O, et al. Cyclin D1 (*CCND1*) A870G gene polymorphism modulates smoking-induced lung cancer risk and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. 2006; *Lung Cancer* 51: 303—311.
64. Ayed AK, Adesina A, Prognostic significance of cyclin D1 expression in resected stage I, II non-small cell lung cancer in Arabs. *Interact CardioVasc Thorac Surg*; 2006;5:47-51.
65. Alao JP, et al. The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. 2006; *Molecular Cancer*, 5:7.
66. Collins K, Jacks T, Pavletich PV. The cell cycle and cancer. 1997; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94: 2776–2778.
67. Jin M, et al, Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. 2001; *Lung Cancer* 34 :207–218.
68. Hinz M, et al. NF- κ B Function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 Expression and G0/G1-to-S-Phase Transition. 1999; *Molecular and Cellular Biology*, Vol 19; No 4:2690-2698.
69. Marchand LL, et al. Association of the Cyclin D1 A870G Polymorphism With Advanced Colorectal Cancer. 2003;*JAMA*.290(21):2843-2848.
70. Schernhammer ES, et al. Cyclin D1 A870G polymorphism and the risk of colorectal cancer and adenoma. 2006; *British Journal of Cancer* , 94: 928 – 934.
71. Quiling S, Yuxin Z, Suhua Z, Cheng X, Shuguang L, Fengsheng H, Cyclin D1 gene polymorphism and susceptibility to lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* ;2003; vol.24 no.9:1499-1503.
72. Keum JS, Kong G, Yang SC, Shin DH, Park SS, Lee JH, Lee JD. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. 1999; *British Journal of Cancer*, 81-1: 127–132.

RESİMLEMELER LİSTESİ

Şekiller;

| | |
|--|----|
| Şekil 1. T Faktörü (31)..... | 11 |
| Şekil 2. N Faktörü (31)..... | 12 |
| Şekil 3.M Faktörü (31)..... | 12 |
| Şekil 4.Hücre Siklusu (38)..... | 14 |
| Şekil 5. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları (44)..... | 15 |
| Şekil 6. Siklin Bağımlı Protein Kinaz (CDK) Sistemi (51)..... | 16 |
| Şekil 7. Hücre Siklusunda SCF ve APC Aracılı Proteolizisin Kontrolü(51)..... | 17 |
| Şekil 8. Hct1-APC Aktivasyonu (51)..... | 18 |
| Şekil 9. Cdk İnhibitör Protein (CKI) Akümüasyonu (51)..... | 19 |
| Şekil 10. S-fazı Başlangıcının Kontrol Mekanizmaları (38)..... | 19 |
| Şekil 11. Siklin D1 Fonksiyonu (6)..... | 20 |
| Şekil 12. Siklin D1 geni lokalizasyonu (55)..... | 21 |
| Şekil 13. Siklin D1 gen transkripsiyonu (6)..... | 21 |
| Şekil 14. Msp I restriksiyon enzimi ile kesilen PZR ürünleri..... | 29 |

Tablolar;

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Hasta ve Kontrol Grubunun Karakteristik Özellikleri..... | 30 |
| Tablo 2. Hasta grubunun histolojik alt tipleri..... | 30 |
| Tablo 3. Hasta grubunun tümör evreleri..... | 31 |
| Tablo 4. Genotip-Cinsiyet İlişkisi..... | 32 |
| Tablo 5. Grup-Genotip İlişkisi..... | 33 |
| Tablo 6. Grup 870G Aleli İlişkisi..... | 33 |
| Tablo 7. Genotip-Metastaz İlişkisi..... | 34 |
| Tablo 8. Dominat Modele Göre Genotip-Metastaz İlişkisi..... | 35 |

Resimler;

| | |
|--|----|
| Resim 1. :%0.8 agaroz jel elektroforezi..... | 26 |
| Resim 2. PCR sonucu oluşan 212 bp fragmentler..... | 27 |
| Resim 3. Restriksiyon sonucunda U.V ışık altında bantların görünümü..... | 28 |

Grafikler;

| | |
|--|----|
| Grafik 1. Cinsiyete göre kanser türlerinin insidansı..... | 4 |
| Grafik 2. Cinsiyete göre kanser türlerinin mortalitesi..... | 5 |
| Grafik 3. Hasta grubunun histolojik alt tipleri..... | 31 |
| Grafik 4. Hasta grubunun tümör evreleri..... | 31 |
| Grafik 5. Genotip-Cinsiyet İlişkisi..... | 32 |
| Grafik 6. Grup-Genotip İlişkisi..... | 33 |
| Grafik 7. Grup 870G Aleli İlişkisi..... | 34 |
| Grafik 7. Genotip-Metastaz İlişkisi..... | 35 |
| Grafik 8. Dominat Modele Göre Genotip-Metastaz İlişkisi..... | 35 |

ÖZGEÇMİŞ

Adım soyadım Suat ÇAKINA. 20.07.1980 tarihinde Karabük'te doğdum. İlköğretimimi Atatürk Merkez İlköğretim okulunda (Karabük), ortaokulu I. Murat Lisesi (Edirne), liseyi İlhami Ertem Lisesi (Edirne)' de tamamladım. Ön lisans eğitimimi Ege Üniversitesi Atatürk SHMYO Diş protez bölümünde 2000 yılında bitirdim. 2006 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Lisans programından mezun oldum.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO : 893
PRJ NİTELİĞİ : Yüksek Lisans

1- PROJE BAŞLIĞI

Akciğer Kanserli Hastalarda Siklin D1 (CCND1) Gen Polimorfiziminin Araştırılması

2- PROJE PERSONELİ

| Adı ve Soyadı | Unvanı | Telefon (İy) |
|-----------------------------------|----------------|-------------------|
| Proje Yöneticisi : Tefik GÜLYAŞAR | Yrd. Doç. Dr | Tel: 2357641-1554 |
| Araştırmacılar : Suat ÇAKINA | Yük. Lis. Öğr. | Fax: |

3- PROJE BÜTÇESİ

| Tecihizatın Tanımı : Detay listesi ektedir. | Fiyatı (YTL) |
|---|--------------|
| 03.2 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımları | 3.095 |
| 03.3 Yolluklar | |
| 03.5 Hizmet Alımları | |
| 03.7 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım, Bakım ve Onarım Giderleri | 3.900 |
| 06.1 Mamul Mal Alımları | 6.995 |
| TOPLAM ÖDENEK | |

4- PROJENİN GELİŞİMİ :

| | | |
|---|------------------------------------|-------------------|
| 1. Projenin Kabul Tarihi: 13.11.2007 | 4. I. Rapor Tarihi : 26/05/2008 | Sonuç : (- / -) |
| 2. Projenin Başlama Tarihi : 26.11.2007 | 5. II. Rapor Tarihi : | Sonuç : (- / -) |
| 3. Projenin Bitiş Tarihi: 26.11.2008 | 6. III. Rapor Tarihi : | Sonuç : (- / -) |
| 4. Projenin Süresi: 12 Ay | 7. IV. Rapor Tarihi : | Sonuç : (+ / -) |
| | 8. Sonuç Raporu Tarihi: 26/11/2008 | Sonuç : (+ / -) |

5- İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE : Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

6- PROJENİN UYGULANMASI :

| |
|--|
| 1. Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58. maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yürürlükte ve İnceleme Fazlilerinde Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılmaz. |
| 2. Proje süresinde ve harcama fazlilerinde Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılmaz. |
| 3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüne Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Tıbbiye Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe sunmakla yükümlüdür. |
| 4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır. |
| 5. Bir ay geçliği halinde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmuş projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, RAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır. |

Adı ve Soyadı : Yrd. Doç. Dr. Tefik GÜLYAŞAR
İmza : *Tefik Gülyaşar*
Tarih : 26. Kasım - 2007

Komisyon Başkanı
..... / / 2007
Prof. Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU
Rektör Yardımcısı



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı:15

Karar Tarihi:26.07.2007

2-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 26.07.2007 tarihinde; "Akciğer kanserli hastalarda siklin D1 (CCND1) gen polimorfizminin araştırılması" adlı TÜTFEK 2007/122 protokol no.lu Yüksek Lisans Öğrencisi Suat ÇAKINA'nın tez çalışmasını incelemek üzere toplandı. Doç. Dr. Gürçan ALTUN ve Av. Mustafa POLAT izni olmasa nedeniyle katılmadı ve çalışmanın incelenmesine geçildi.

Yapılan inceleme sonunda çalışmanın Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapılacağı Yrd. Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'ın yürüttüğü olduğu araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Helsinki Deklarasyonu Kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliğine ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve araştırma bütçesinin Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından desteklenmesi koşuluyla yapılmasının UYGUN olduğuna mevcudun oybirliği ile karar verildi.

| Önvanı/Adı/Soyadı EK Üyelği | Uzmanlık Dalı | Kurumu | Cinsiyeti | İlişki (*) | Katılım (**) | İmza |
|---|-----------------------|---|-----------|---|---|-----------|
| Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ Başkan | Farmakoloji | T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Yrd. Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN Başkan Yardımcısı | Çocuk Cerrahisi | T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Prof. Dr. Betül Biner ORHANER Üye | Çocuk Sağ. Ve Hst. | T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hst. A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Doç. Dr. Dilek MEMİŞ Üye | Anesteziyoloji | T.Ü.T.F. Anesteziyoloji A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Doç. Dr. Betül Uğur ALTUN Üye | Endokrinoloji | T.Ü.T.F. İç Hat. A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Doç. Dr. Gürçan ALTUN Üye | Adli Tıp | T.Ü.T.F. Adli Tıp A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | Katılmadı |
| Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ Üye | Biyokimya | T.Ü.T.F. Biyokimya A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA Üye | Patoloji | T.Ü.T.F. Patoloji A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Ecz. Emine SAKMAN Üye | Eczacı | T.Ü.T.F. Beşhekimliği | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Avukat Mustafa POLAT Üye | Ceza Hukuku | T.Ü. Rektörlüğü | E | <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | Katılmadı |

* Araştırma ile ilişki

** Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Filiz AKATA
Dekan

Posta Adresi:
T.Ü. Tıp Fakültesi Dekanlığı
Güllapoğlu Yerleşkesi
22030 EDİRNE

Tel: (0284) 235 76 53 – 235 73 73
Faks: (0284) 235 76 52
E-posta: dekanlik@trakya.edu.tr
Elektronik Ağ: http://tipfak.trakya.edu.tr