



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA KANDA DOLAŞAN
TÜMÖR HÜCRELERİNİN AKİM SİTOMETRİSİ İLE TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba Kevser ARKAN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2016

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA
KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN
AKIM SİTOMETRİSİ İLE TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba Kevser ARKAN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2016

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Akciğer Kanserli Hastalarda Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin
Akım Sitometrisi ile Tespiti

Tuğba Kevser ARKAN

Yüksek Lisans Tezi

27/07/2016

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER
Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN
Doç. Dr. Nuriye ÖZDEMİR
Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK
Yrd. Doç. Dr. Mustafa Emre ERCİN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, yabancı kaynaklardan alınan tüm bilgilerin tarafımdan çevrildiğini, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

27-07-2016



Tuğba Kevser ARKAN

*En büyük desteğim olan aileme, kanser nedeniyle hayatını kaybeden biricik dedeme,
babaanneme ve yaşamlarının bir bölümünde “kanser” ile tanışmış olan tüm
insanlara ithaf ediyorum.*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince engin bilgisi, önerileri ve eleştirileri ile daima yoluma ışık tutan, mesleğim ve hayatım için kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e, tez konumun belirlenmesi, çalışmamın planlanması ve yürütülmesi süresince deneyim kazanmamı sağlayan, her zaman ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm hocam Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e ve her türlü imkanı sağlamaya çalışarak desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı hocamız Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN'a teşekkürlerimi sunarım. Bu süre boyunca birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım Sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Elif ERCAN'a ve Arş. Gör. Beyza Ecem ÖZ'e, tez çalışmamın ilerlemesinde katkısı olan Arş. Gör. Emine TERZİ ve Mol. Bio. Yeter DİLEK'e gösterdikleri sabır, özen ve verdikleri destek için teşekkür ederim. Tez çalışmamda büyük emeği geçen değerli arkadaşım Bio. Bilgesu ERSAN'a paylaştığımız her güzel ve birikim dolu gün için sonsuz teşekkür ederim. Çalışmamda kullandığım yöntemin standardizasyonu ve deneysel aşamalarda değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım Uzm. Dr. Ferda ALPARSLAN PINARLI'ya, Uz. Bio. Meral TİRYAKI'ye ve Bio. Emrullah ÇALIŞIR'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsü değerli personeli ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim. Çalışmam için klinik destek ve kan numunelerinin elde edilmesi aşamasında her türlü yardımı sağlayan, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniği doktorları ve hastane personeline, ayrıca gönüllü olarak çalışmama katkıda bulunan akciğer kanserli hastalar ile tüm sağlıklı katılımcılara minnettarlığımı belirtmek isterim.

Hayatım boyunca benim için en iyiyi ve en güzeli isteyen, bütün sıkıntılara benimle birlikte göğüs geren, günlere gelmemde en büyük emeğin sahibi ve başarılarımın esin kaynağı sevgili AİLEM'e destek, güven ve en önemlisi sevgileri için minnet dolu sonsuz teşekkür ederim. Özellikle tüm ruh hallerime uyum sağlayıp sevgiyle karşılayan, hayatımın tadı tuzu canım kardeşlerime yürekte teşekkür ederim. Verdiği destek ve yönlendirmesi sayesinde yüksek lisans eğitimime başlayabildiğim, bu zorlu süreçte tüm sıkıntı ve heyecanlarıma ortak olarak hep yanımda olan ve sevgisinden güç aldığım müstakbel eşime sabrı, desteği ve umudundan dolayı sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Karsinogenez	6
2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser	7
2.1.3. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri.....	8
2.2. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (Circulating Tumor Cells, CTCs)	16
2.2.1. CTC Teknolojisi	17
2.2.1.1. Zenginleştirme Basamağı	17
2.2.1.2. Saptama Basamağı.....	21
2.3. Akciğer Kanseri.....	23
2.3.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	23
2.3.2. Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması.....	26
2.3.3. Akciğer Kanserinin Evrelendirilmesi	28
2.3.4. Akciğer Kanserinin Klinik Bulguları	30
2.3.5. Akciğer Kanserinin Tanı Yöntemleri	31
2.3.6. Akciğer Kanserinde Metastaz.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. Materyal	34

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Antikorlar.....	34
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	35
3.1.3. Çalışmada Hazırlanan Solüsyonlar	36
3.1.4. Bir Birey için Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması	37
3.2.2. CTC Zenginleştirme Basamağı.....	38
3.2.2.1. Mononükleer Hücrelerin Ayrılması.....	38
3.2.2.2. Negatif Seçilim ile Lökositlerin İmmunomanyetik Ayrımı	39
3.2.3. CTC Saptama Basamağı	41
3.3. Akım Sitometrisi.....	44
3.4. İstatistiksel Analiz.....	48
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER.....	91
EK-1. Akciğer Kanseri Evrelemesi Tablosu	91
EK-2. Etik Kurul Raporu	92
EK-3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	95
EK-4. Tez Çalışmasında Kullanılan Yöntem Makalesi	98
EK-5. Uluslararası Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Poster Bildirisi	99
EK-6. Özgeçmiş	100

ÖZET

Akciğer Kanserli Hastalarda Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Akım Sitometrisi ile Tespiti

Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) karsinomların metastatik yayılımında önemli role sahiptir. Bu nedenle, son yıllarda birçok kanser türünde hastalığın seyri ve tedavi etkinliğini anlaşılmasında yardımcı olabileceği düşünülen CTC'ler üzerine yoğunlaşmıştır. Teknik yaklaşımlardaki gelişmeler ile özellikle akciğer kanseri gibi dokularına ulaşılması zor olan tümörlerde sıvı biyopsi olarak tüm kandan CTC tespitinin değeri her geçen gün artmaktadır. Tanı anında sıklıkla metastaz yaptıkları teşhis edilen akciğer kanseri, hem kadınlarda hem de erkeklerde kanser ölüm nedenlerinin birincil sebebidir.

Çalışmamızın amacı modifiye ettiğimiz metot ile akciğer kanserli hastaların periferik kan örneklerinde (7.5 mL) CTC tespitidir. CTC sayısının tespit edilmesi için 9 akciğer kanserli birey ve 9 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Uyguladığımız metotta CTC zenginleştirilmesi için ficol yoğunluk gradiyent ayrımı ve manyetik mikro-boncuklar yardımı ile CD45 negatif seçim gerçekleştirilmiştir. Son olarak, CTC'ler epitelyal adezyon molekülü (EpCAM) ve sitokeratin (CK 7,8,14,15,16,19) ekspresyonlarının hedef alınması ile çoklu parametrelilik olarak akım sitometrisi ile analiz edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda akciğer kanserli hastaların tümünde CTC gözlenirken, sağlıklı bireylerde gözlenmemiştir ($Z=3.823$; $p<0.001$). Böylece, modifiye ettiğimiz metodun akciğer kanserinde CTC tespitinde kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, akım sitometrisi, dolaşımdaki tümör hücreleri

ABSTRACT

Determination of Circulating Tumor Cells by Flow Cytometry in the Lung Cancer Patients

Circulating tumor cells (CTCs) play a crucial role in the metastatic spread of carcinoma. Therefore, CTC has been interest of a subject in the past few decades in terms of prognosis and response to the therapy in several cancer diseases. Recent improvements in technical approaches maintain to identify CTCs from whole blood have demonstrated the potential value of CTC detection as a liquid biopsy especially in those tumors where tissue accessibility is often challenging as in lung cancer. Lung cancer is the most common cause of death from cancer worldwide in both men and women which is commonly metastasize before it is diagnosed.

The aim of this study is to determine of CTCs in peripheral blood sample (7.5 mL) of lung cancer patients by the modified method. This method enrolled on 9 patients with lung cancer and 9 healthy volunteers which consists of a ficoll density gradient centrifugation and a magnetic microbead separation technique by CD45 negative selection method enrichment step. Finally, we determined CTCs through the expression of anti-epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and cytokeratins (CK7,8,14,15,16,19) by multi-parameter flow cytometry.

Consequently, we can indicate that, CTCs were detected in all of patients but no CTCs were evaluated on healthy volunteers ($Z=3.823$; $p<0.001$). Thus, CTCs were detectable in peripheral blood sample of lung cancer patients using with our method.

Keywords: Circulating tumor cells, flow cytometry, lung cancer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
°C	: Santrigrat Derece
g	: Relatif Santrifüj Kuvvetinin (RCF)
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na	: Sodyum
pH	: Potansiyel Hidrojen
µL	: Mikrolitre
ADH	: Antidiüretik Hormon
APC-H7	: Allophycocyanin-Hilite-7
BSA	: Sığır Serum Albümini
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CD	: Cluster of Differentiation
CDI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CDK	: Siklin Bağımlı Protein Kinaz
CK	: Sitokeratin
CTC	: Circulating Tumor Cell
CTCs	: Circulating Tumor Cells
DAPI	: 4,2-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroklorür
DEP	: Dielektroforez
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EKG	: Elektrokardiyografi

EMT	: Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
EpCAM	: Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü
ESM	: Ekstraselüler Matriks
FACS	: Floresan Aktif Hücre Sıralama
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FC	: Flow Cytometry (Akım Sitometrisi)
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
FSC	: Forward Scatter Chanel (İleri Saçma Grafiği)
HER2	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
hTERT	: İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz
IARC	: Uluslararası Kanser Ajansı
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LCA	: Ortak Lökosit Antijeni
LDH	: Laktat Dehidrojenaz
MACs	: Manyetik Aktif Hücre Sıralama
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MUC1	: Musin 1
PA	: Plazminojen Aktivatör
PBMC	: Mononükleer Hücreler
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PE	: Phycoerythrin
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi

PMT	: Photo Multiple Tubes
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
RB	: Retinoblastoma
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	: Ters Transkriptaz Kantitatif PCR
SSC	: Side Scatter Chanel (Yana Saçılma Grafiği)
TNM	: Primer Tümör Durumu, Bölgesel Lenf Bezlerine Tutulum, Uzak Metastaz Varlığı
TP53	: p53 Proteinini
TTF-1	: Tiroid Transtripsiyon Faktörü 1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VKSS	: Vena Kava Superior Sendromu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser gelişimi	4
Şekil 2.2. Çok aşamalı bir süreç olarak karsinogenez	6
Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri	9
Şekil 2.4. Bir tümörün kan yoluyla yayılımı sırasında meydana gelen metastaz süreci	14
Şekil 2.5. Metastaz sürecinde meydana gelen ESM invazyonu olaylar dizisi.....	15
Şekil 2.6. CTC tespiti için gerçekleştirilen zenginleştirme basamağında yaygın olarak kullanılan yöntemlerin gösterimi.....	18
Şekil 2.7. Pozitif ve negatif seçim yöntemleri.....	18
Şekil 2.8. CTC saptanmasında yaygın olarak kullanılan tekniklerin gösterimi.....	21
Şekil 2.9. Akciğer kanserinde evreleme şeması.....	28
Şekil 2.10. Akciğer Kanseri Evrelerinin Yüzde Dağılımları	33
Şekil 3.1. Fikol gradiyent ayrımı	39
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan MACs sistemi	41
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan FC cihazı	42
Şekil 3.4. FC cihazının ana sistemleri.....	45
Şekil 3.5. Lize edilmiş periferik kan örneğinin FS/SS histogramı	47
Şekil 4.1. İzotip tüpünün FC analizi	51
Şekil 4.2. H1 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	52
Şekil 4.3. H2 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	53
Şekil 4.4. H3 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	53
Şekil 4.5. H4 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	54

Şekil 4.6.	H5 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	54
Şekil 4.7.	H6 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	54
Şekil 4.8.	H7 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	55
Şekil 4.9.	H8 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.....	55
Şekil 4.10.	H9 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi...	55
Şekil 4.11.	K1 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	56
Şekil 4.12.	K2 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	57
Şekil 4.13.	K3 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	57
Şekil 4.14.	K4 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	57
Şekil 4.15.	K5 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	58
Şekil 4.16.	K6 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	58
Şekil 4.17.	K7 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	58
Şekil 4.18.	K8 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	59
Şekil 4.19.	K9 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi	59

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre en sık görülen ilk beş kanser türünün erkeklerde ve kadınlarda dağılımı	24
Tablo 2.2. Malign epitelyal akciğer tümörlerinin histolojik sınıflandırılması	26
Tablo 2.3. Akciğer kanseri evrelemesi	91
Tablo 2.4. Akciğer kanserinde TNM evrelemesi	29
Tablo 2.5. Akciğer kanserli hastaların tanı anındaki evrelerinin dağılımı ve 5 yıllık sağkalım oranları.....	29
Tablo 2.6. Akciğer kanserinde semptom ve bulguların görülme sıklığı ile nedenleri	31
Tablo 2.7. Akciğer kanserinin neden olduğu uzak metastazlar ve sıklığı.....	33
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi	34
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antikorların listesi	35
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.....	35
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletlerin listesi	36
Tablo 3.5. Bir bireyde CTC tespiti için kullanılan malzemelerin miktarları	37
Tablo 4.1. Hastalık ile ilgili özellikler.....	50
Tablo 4.2. CTC sayılarının hasta ve kontrol grubunda dağılımı	60

1. GİRİŞ

Kanser, vücudun herhangi bir yerindeki bir hücre grubunun kontrolsüz olarak normal hücrelerden daha hızlı çoğalması, bu hücrelerin farklılaşmasının bozulması, genellikle ileri aşamalarında çevre dokulara infiltrasyonu ve dolaşıma geçerek vücudun farklı bölgelerine metastazı ile karakterize edilen bir hastalıktır (1). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kapsamlı bir projesi olan Globocan verilerine göre 2012 yılında dünya genelinde 14.1 milyon yeni kanser hastası ve 8.2 milyon kansere bağlı ölüm olduğu belirtilmiştir (2). Türkiye'de ise 2013 yılı kanser istatistiklerine göre 103.070 erkek ve 71.233 kadın kansere yakalanmıştır (3).

Kanser insidansı genetik, fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik, beslenme ve fiziksel aktivite gibi faktörler ile değişmektedir (4). Kanser, genetik mutasyonların birikmesi sonucunda ya da genetik yatkınlık olarak bilinen germline mutasyonlar sonucunda gelişebilmektedir (5). Radyasyon, UV ışınlar ve asbest en iyi bilinen karsinojen ajanlar arasında sayılabilmekte, ayrıca sigara, alkol, beslenme şekli ve kısıtlı fiziksel aktivite dolayısıyla obezite, enfeksiyöz ajanlar özellikle virüsler ve çevresel kanserojenlere maruziyet gibi önemli çevresel faktörler karsinogenezde rol oynamaktadır (4). Yaş da kanser gelişiminde önemli bir kriter olup özellikle 70 yaş üzeri bireylerde yaygın olarak kanser görülmesine rağmen her yaştaki yetişkinlerde, çocuklarda hatta bebeklerde dahi kanser teşhisi konulabilmektedir (6). Farklı çevresel etkilere maruz kalınması nedeniyle coğrafi yerleşimin de kanser gelişimi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (7). Özetle, çevresel ve genetik faktörler arasındaki etkileşimlerin kanser riskinin önemli belirleyicileri olduklarını söylemek mümkündür (4, 7).

Sigara içimi ve pasif sigara maruziyeti, hava kirliliği, genetik faktörler, mesleki nedenler, cinsiyet, diyet, kronik akciğer hastalıkları gibi risk faktörleri akciğer kanseri gelişiminde rol oynamaktadır. Sigara kullanım alışkanlığının ve içilen sigara miktarının artışı, sanayileşme ile artan çevre kirliliği, göçler ve

kentleşme, akciğer kanserinin insidansı ve mortalitesini artırarak akciğer kanserinin günümüzün önemli bir sağlık problemi haline gelmesine neden olmaktadır (8). Akciğer kanseri dünya genelinde erkeklerde en sık görülen birinci, kadınlarda ise dördüncü sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinin teşhisi genellikle geç olmaktadır, bu nedenle de sağkalımları diğer kanserlere göre oldukça düşüktür (9). Akciğer kanserinin tanıdan itibaren beş yıllık mortalitesi %85-90 arasındadır (10).

Birçok kanser hastasının hayatını yitirmesinden metastaz sorumludur (11). Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır (12). Akciğer kanserinde beyin, karaciğer, iskelet, sürrenal bezler, perikardiyum da dahil olmak üzere birçok uzak organa metastaz olabilir (13). Ülkemizde akciğer kanserinin %57.9'unun uzak metastaz yaptığı bildirilmiştir (9).

Kanserden ölümlerin azalması açısından erken teşhis ve tedavinin seyrinin gözlenmesi önem taşımaktadır. Günümüzde rutin uygulamalarda, kanser hücreleri ve bu hücrelerin ürünleri veya kansere karşı vücudun verdiği yanıtı saptamada kullanılan tümör belirteçleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metotlar benign ve malign tümörlerin ayırımına yardımcı olur, fakat kesin tanı sağlayamazlar (14, 15).

Metastaz sırasında dolaşımda bulunan ve yeni tümör oluşumuna neden olabilen tümör hücreleri, dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs; circulating tumor cells) olarak adlandırılmaktadır (16). Özellikle son yıllarda CTC'ler kanser tanısı için en uygun moleküler belirteçler olarak önerilmektedir (17, 18). CTC'lerin, metastazın belirlenmesi, tümör yinleme riskinin hesaplanması, hastaların kemoterapiye yönlendirilmesi, yeni terapötik hedeflerin tanımlanması ve sistemik kanser tedavilerinin izlenmesinde kullanılabilirliği araştırılmaktadır (19).

CTC'lerin klinik kullanımı hakkında yapılan çalışmalarda çoğunlukla CTC sayımı üzerine yoğunlaşmıştır. Genellikle bu sayım süreci zenginleştirme ve saptama gibi iki önemli basamağı içermektedir (20, 21) Bu basamaklarda çok çeşitli yöntemler ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır (22).

Çalışmamızda modifiye ettiğimiz metot (166) ile akciğer kanserli hastalarda CTC sayımı gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metotta CTC zenginleştirme basamağı

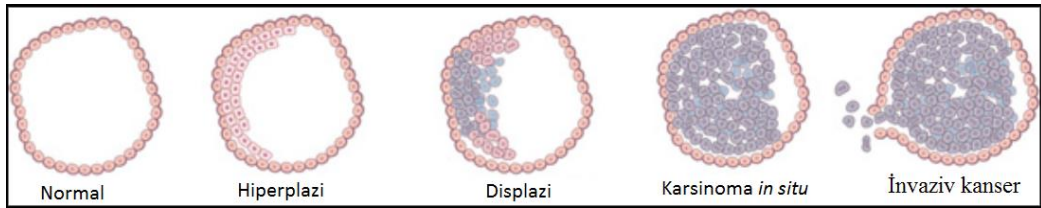
olarak iki ayrı yöntemin kombinasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunlar; yoğunluk tabanlı fikor gradiyent santrifüj ve immunomanyetik ayırma (CD45 negatif seçim) yöntemleridir. CTC saptama basamağında ise spesifik monoklonal antikorların yardımı ile akım sitometrisi (flow cytometry (FC)) cihazında CTC'ler saptanmıştır. Sonuçta, CK 14, 15, 16, 19 pozitif, CK 7, 8 pozitif ve EpCAM pozitif, CD45 negatif hücreler CTC kabul edilerek sayımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın amacı bu tekniğin CTC tespitinde uygulanabilirliğinin ve spesifikliğinin incelenmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalar üzerindeki kontrolün kaybolması nedeniyle değişime uğramış hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmaları, immün sistemin gözetiminden kaçmaları ve uzak dokuları dahi istila ederek metastaz gelişimine yol açmaları sonucunda meydana gelen çok basamaklı bir süreçtir (23). Mutasyonların meydana gelmesi ile başlayan bu süreçte hücreler zamanla malignite kazanmakta ve seri mutasyonlar ile normal hücreler, invaziv kanserli hücre popülasyonlarına dönüşebilmektedir. Bu süreçte ilk olarak hücrelerin kontrolsüz bölünmesi sonucunda hücre sayısındaki artış olarak tanımlanan hiperplazi görülmektedir. Ardından tekrarlayan mutasyonlar sonucunda hücrelerde gözlenen morfolojik farklılıklar evresi olan displazi meydana gelmektedir. Zaman geçtikçe bu evrede yer alan hücreler epitelyal tabaka ile sınırlı fakat hücreler arası bağlantılarını kaybetmiş hal olan karsinoma *in situ* gelişimi göstermektedirler. Son olarak kanser sürecinde hücrelerin invazyon yeteneği kazanmasına neden olabilecek değişimler ile invaziv kanser meydana gelebilmektedir (Şekil 2.1) (24-26).



Şekil 2.1. Kanser gelişimi (26).

Neoplastik hücreler normal hücre büyümesini denetleyen düzenleyici etkilerin altında kalmaksızın replikasyona devam etmeleri nedeniyle değişime uğramış hücrelerdir (27). Neoplaziler bu nedenle, belirli bir derecede otonomiye sahiptir ve lokal çevrelerine bakmaksızın boyutlarını artırma eğilimi taşımaktadırlar. Bir neoplazi yani tümör, benign (iyi huylu-selim) tümör ve malign (kötü huylu-habis) tümör olmak üzere iki temel kategoriye ayrılmaktadır. Bu ayrım yapılırken bir

lezyonun klinik davranışı temel alınarak o lezyonun hangi gruba dahil olduğu belirlenmektedir (27).

Mikroskopik ve makroskopik özelliklerinin nispeten masum olduğu kabul edilen neoplaziler, kendi özgün bölgelerinde lokalize olarak kalacaklarını, genel olarak vücudun diğer bölgelerine yayılmayacaklarını ima eden benign sıfatıyla tanımlanmaktadır. Benign tümörler genellikle lokal cerrahi ile tedavi edilmeye elverişli oldukları için hastalar yaşamını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmektedirler. Malign tümörler ise kötü huylu olarak tanımlanır ve tüm malign tümörler kanser olarak adlandırılmaktadır. Bu tür tümörler, çevre dokuları invaze ve tahrip edebilirler, uzak bölgelere kan ve lenf yolu ile yayılabilir yani metastaz geliştirebilirler (27).

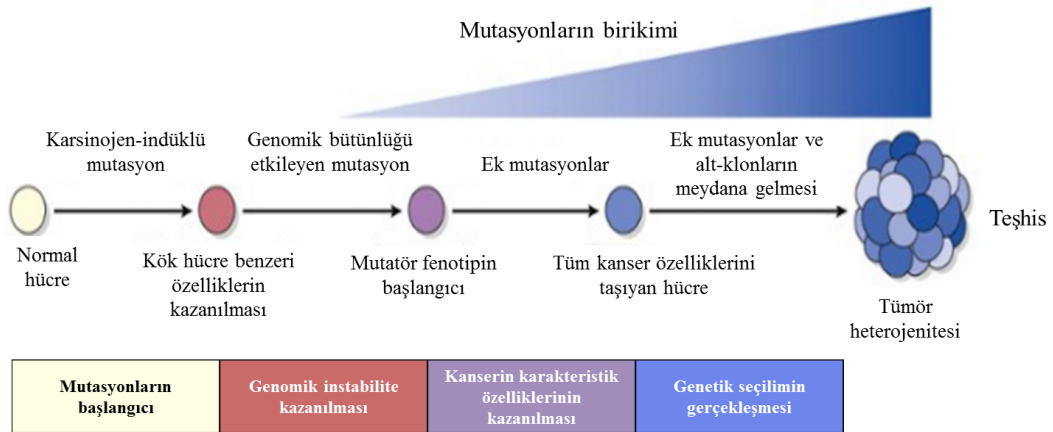
Benign ve Malign Tümörlerin Genel Özellikleri: Benign tümörler genellikle genetik olarak basit ve kararlı, kanserlere oranla daha az sayıda mutasyon içererek pek az genotip değişikliği gösteren tümörlerdir. Benign ve malign tümörler diferansiyasyon (farklılaşma) ve anaplazi, büyüme hızı, lokal invazyon ve metastaz yetenekleri ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar (27).

Diferansiyasyon, tümör hücrelerinin kaynaklandıkları normal hücrelere morfolojik ve fonksiyonel olarak benzemeleri anlamı taşımaktadır. Anaplastik hücreler ise çekirdeklerinin boyutları ve biçimleri değişken özellik göstermekte ve bu hücreler normal hücrelere göre oldukça farklı morfoloji sergilemektedirler (27). Benign tümörler; iyi diferansiye hücrelerden meydana gelen, türedikleri dokunun normal hücrelerine benzer özellikte, anaplazi içermeyen veya az miktarda içerebilen hücrelerden oluşmaktadır. İndiferansiye hücrelerden meydana gelen malign tümörler ise dokunun normal hücrelerine benzerlik göstermeyen, özelleşmemiş hücrelerden oluşmakta ve değişen oranlarda anaplazi barındırmaktadırlar. Benign tümörlerin çoğu yavaş büyürken, kanserlerin çoğu daha hızlı büyür ve sonunda lokal olarak ya da metastaz yaparak hastanın ölümüne yol açabilmektedirler. Benign tümörler bir doku içerisinde iyi sınırlı olarak yerleşmektedirler. Malign tümörler ise kötü sınırlıdır ve ilerleyici bir şekilde çevrelerindeki normal dokuları infiltre, invaze ve tahrip ederek ilerlemektedir (28). Benign tümörler genellikle başladıkları bölgelerde lokalize olarak kaldıkları yani metastaz oluşturmadıkları halde malign bir tümörlerde

sıklıkla metastaz gerçekleşmektedir. Bu nedenle metastaz temel malignite kriteri olarak tanımlanabilmektedir (25, 27).

2.1.1. Karsinogenez

Karsinogenezin temelinde; kimyasallar, radyasyon veya virüsler gibi çevre faktörlerinin etkisiyle meydana gelebilen ya da germline nakledilebilen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır (Şekil 2.2) (7, 29). Hücre ölümüne neden olmayarak, maligniteye katkıda bulunan bu genetik hasarların başlıca hedefi; hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden protoonkogenler ve inhibe eden tümör baskılayıcı genler ile apoptozu düzenleyen ve DNA onarımında rol oynayan genlerdir. Bu mutasyonlar dengeli translokasyonlar, delesyonlar ve gen amplifikasyonunun sitogenetik belirtilerini içermektedir. Ayrıca kanserde epigenetik değişiklikleri düzenleyen genlerde de mutasyonlar meydana gelebildiği ve tümör baskılayıcı genler ile DNA tamir genlerinin epigenetik değişiklikler tarafından susturulabildiği saptanmıştır (30). Bu epigenetik değişiklikler, gen ekspresyonunda mutasyon olmaksızın gerçekleşen, kalıtsal ve geri dönüşümlü, histonlarda ve DNA metilasyonunda meydana gelen modifikasyonlardır (27).



Şekil 2.2. Çok aşamalı bir süreç olarak karsinogenez: Mutasyonların birikmesi sonucunda tümör ilerleyişi ve heterojenitesinin meydana gelmesi (29).

Neoplastik olmayan öncü lezyonlardan gelişen kanser, meydana gelen genetik ve epigenetik hasarlar sonucunda hücrelerinde seçici bir avantaj sağlayarak aşırı

büyüme, lokal invazyon yeteneği ve uzak metastazlar oluşturma gibi çeşitli fenotipik özelliklere sahip malign neoplazi haline dönüşmektedir (31). Tümör ilerleyişi olarak adlandırılan bu süreçte tümör hücresi daha yüksek malignite potansiyeline sahip olmaktadır. İlerlemenin ardından mutasyonların birikmesiyle tümör kitlesi malignite özellikleri açısından farklı özelliklere sahip tümör hücresi alt-klonları barındırmaktadır. Tümör heterojenitesi olarak adlandırılan bu özellik nedeniyle kanser, tedavisi zor bir hastalık halini almaktadır (27, 32, 33).

2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser

Birçoğu edinsel olarak kendiliğinden gelişen ya da çevresel kaynaklı olarak meydana gelen DNA mutasyonlarının kanser gelişiminde rol oynamasından dolayı, kanser genetik bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır (27, 34). Ayrıca kansere yol açan modifikasyonlar arasında epigenetik değişiklikler de bulunmaktadır. Önemli bir epigenetik faktör olan DNA metilasyonu, gen ekspresyonu ile genomik instabilitenin düzenlenmesinde rol oynamakta ve DNA metilasyonundaki değişiklikler nedeniyle tümör oluşumu ile ilişkili olan birçok gende mutasyon meydana gelmektedir (35). Genetik ve epigenetik değişiklikler hücrelerdeki; büyüme, hayatta kalma ve yaşlanma gibi temel süreçleri düzenleyen önemli genlerin ekspresyonunda veya fonksiyonunda değişikliklere neden olmaktadır (35). Dolayısıyla hücre bu değişiklikler doğrultusunda yeniden programlanmakta ve hücre döngüsündeki kontrolün kaybı neticesinde kontrolsüz olarak bölünmektedir. Bu nedenle hücre döngüsü değişiklikleri kanser gelişiminde kilit rol oynamaktadır (27, 36, 37).

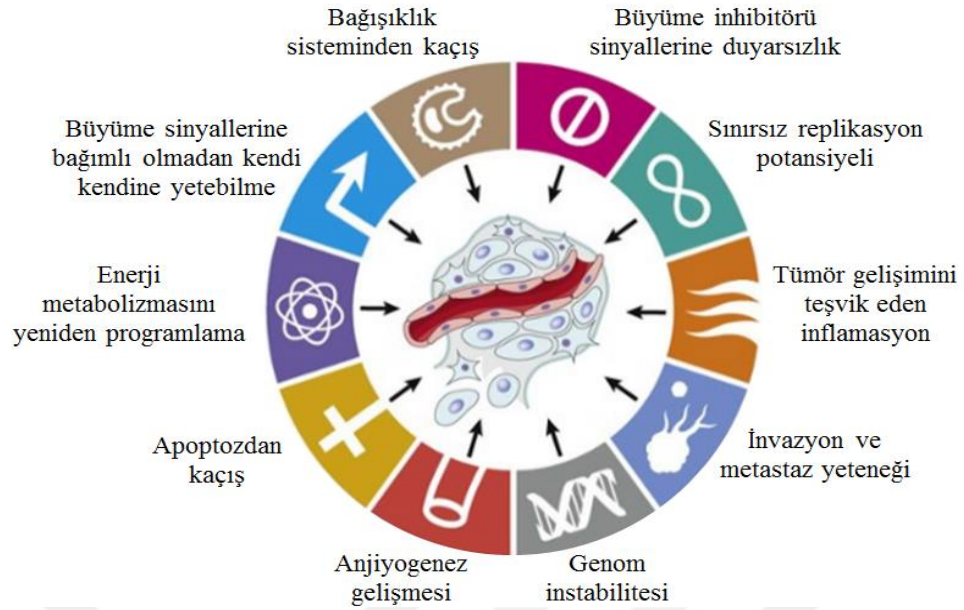
Normal hücre döngüsü, eksternal bir uyarı ile aktif hale gelerek internal ve eksternal büyüme kontrolleri ile denetlenmektedir. Normal hücre döngüsünde beş faz bulunmaktadır. Hücreler büyüme sinyali almadıkları sürece istirahat fazı olan G0 fazında durmaktadırlar (38). Döngü temelde DNA sentez fazı olan S ile mitoz fazı olan M fazlarından ve bu fazlar arasında hazırlık ve geçici duraklama evreleri olan G1, G2 fazlarından oluşmaktadır. Hücre döngüsü G1-S ve G2-M geçişleri ile metafaz-anafaz geçişinde genetik materyalin tam ve doğru bir şekilde kopyalanması adına kontrol edilmektedir. Eğer DNA'da hasarlar meydana gelirse, bu kontrol noktalarında ya hücre hasarı onarılmakta ya da bölünme durdurularak hücre apoptoza

yönlendirilmektedir. Hücre döngüsü kontrol mekanizmalarında, hücre döngüsüne özgü proteinler olan siklinler, siklin bağımlı protein kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) görev almaktadır. CDK'lar, kendisine özgü bir siklin ile kompleks oluşturarak hücre siklusunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu komplekslerin birleşmesini ve etkinliğini düzenleyen CDI'ların da hücre döngüsünde önemli görevleri bulunmaktadır (39).

Kanser hücrelerinde hücre bölünmesi birçok noktada farklılık göstermektedir (40). Normal hücrelerde genellikle eksternal sinyallere yanıt vererek sinyal iletim yolları vasıtasıyla hücre bölünmesi uyarılmaktadır. Ancak kanser hücreleri büyüme faktörlerine bağımlı olmadan kendi kendilerine yetebilme yeteneği kazanarak kontrolsüz bölünmektedirler. Kanser hücrelerinde hücre döngüsünde önemli rollere sahip olan protoonkogenler ve tümör supressör genler ile hücre döngüsü kontrol elemanlarında meydana gelen mutasyonlar sonucunda da hücre döngüsü değişime uğramaktadır. Ayrıca hücre döngüsü bağlantılı apoptotik yolların da inaktivasyonu kanser hücrelerinde gözlenen bir diğer özelliktir (41).

2.1.3. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Tüm kanserlerde sekiz köklü değişim gözlenmektedir (42). Kanser karakteristlik özellikleri adını alan bu değişiklikler, tümörlerin çok aşamalı gelişimi sürecinde kazandıkları biyolojik yetenekleri içermektedir. Bu özellikler; büyüme sinyallerine bağımlı olmadan kendi kendine yetebilme, büyüme inhibitörü sinyallerine duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, enerji metabolizmasını yeniden programlama, bağışıklık sisteminden kaçış, anjiyogenez gelişmesi ile invazyon ve metastaz yeteneği olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.3) (42). Ayrıca genom instabilitesi (43) ve tümör gelişimini teşvik eden inflamasyon (44) olayları karakteristlik özellikleri kazandıran genetik ve epigenetik değişikliklerin gerçekleşmesini desteklemektedir. Hücresel transformasyonu ve ardından da tümör ilerlemesini teşvik etmelerinden dolayı bu iki özellik, karakteristlik özellikler arasındadır (42).



Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri (42).

Büyüme Sinyallerine Bağımlı Olmadan Kendi Kendine Yetebilme: Kanser hücreleri otonom bir şekilde ve fizyolojik koşullara uymaksızın proliferasyonlarını yönlendirmek amacıyla çok sayıda yeni özellik geliştirebilmektedirler ve bu yeteneklerini özellikle onkogen aktivasyonunun bir sonucu olarak kazanmaktadır (27).

Protoonkogenler, ürünleri normal hücre proliferasyonunu uyaran normal hücrel genler olarak tanımlanmakta ve kanser hücrelerinde onkogenlere dönüşmektedirler (24). Onkogenler, inaktive olmayarak sürekli ve otonom bir şekilde hücre bölünmesini teşvik eden, onkoproteinleri kodlamaktadırlar. Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü sonucunda büyüme faktörlerinin üretimi artmakta, hücre bölünmesi üzerindeki kontrolleri kaybolmakta, hücre membranında büyüme faktörü uyarısıyla başlayıp çekirdeğe ulaşan sinyal ileti sistemi kontrolsüz uyarılmakta, çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin sentezi artmakta, hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir (27). Tüm bu olaylara neden olan mekanizmalar; salınan büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin uyarılardan bağımsız ekspresyonu, büyüme faktörlerinin reseptörlerindeki mutasyonlar, sinyalizasyon moleküllerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, transkripsiyon faktörlerinin aşırı veya düzensiz ekspresyonu ve hücre siklusunun ilerlemesinde görevli olan siklinleri aktive ve CDK'ları inaktive eden mutasyonlardır (27).

Hücrelerde onkogenler aracılığıyla büyümeye karşı koyan, apoptoz ve hücrelerin yaşlanması üzere iki adet doğal fren mekanizmaları bulunmaktadır. Kanser hücrelerinin sürekli proliferasyonu için hücrelerde onkogen aktivasyonuna ek olarak bu mekanizmaların da aşılması gerekmektedir (27).

Büyüme İnhibitörü Sinyallerine Duyarsızlık: Tümör baskılayıcı genler, hücre proliferasyonunu inhibe eden proteinleri kodlayarak hücre siklusunu kontrol altında tutmaktadır. Baskılayıcı genlerde meydana gelen inaktivasyonlar sonucunda, hücreler büyüme inhibisyonuna yanıt vermeyerek daimi proliferasyona yönelmektedir. Bu genler ancak her iki kopyalarında da fonksiyon kaybı meydana geldiğinde inaktif hale gelerek tümör gelişimine katkıda bulunabilirler (7).

Düzensiz hücre bölünmesine bu şekilde katkıda bulunan tümör baskılayıcı genlerin en önemlileri; retinoblastoma (RB) geni ve p53 proteinini (TP53) kodlayan genlerdir. Hücre siklusunun yöneticisi olarak tanımlanabilen RB geni, siklusun G1-S geçişini denetleyerek antiproliferatif etki göstermektedir. Malign transformasyonun temelinde hücre siklusu denetiminin ortadan kalkmış olması bulunmaktadır. Kanserlerin neredeyse tümünde G1 denetim noktası, RB geni ilişkili mutasyonlar nedeniyle etkisiz hale gelmektedir (45). Kanserlerde en sık mutasyona uğrayan bir diğer tümör baskılayıcı gen olan TP53 ise p53 proteinini kodlar ve bu protein DNA hasarı tarafından aktive olup üç ayrı yolla hücre proliferasyonunu denetim altında tutmaktadır; hücre siklusunun geçici olarak durdurulmasını aktive ederek, hücre siklusunun kalıcı olarak durdurulmasını yani hücre yaşlanmasını başlatarak ve programlanmış apoptozu tetikleyerek. TP53 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda bu üç mekanizmaya yönlendirilemeyen hücreler sürekli bölünmektedirler (27, 46).

Apoptozdan Kaçış: Apoptoz, DNA hasarı onarılamayan hücrelerde intrinsik veya ekstrinsik yollarla başlatılabilen ve kaspaz adı verilen hücreyi tahrip eden proteolitik enzimlerin görev aldığı, hücrelerin sonrasında tüketilecek ve ortadan kaldırılacak bileşen parçalarına ayrılmasını sağlayan mekanizmadır (47).

Kanser hücreleri, apoptoz başlatan koşullar altında olmalarına rağmen, apoptotik sinyallere karşı direnç geliştirerek yaşamlarını sürdürebilmektedirler.

Apoptoz mekanizmasını düzenleyen yollardaki moleküllerde meydana gelen mutasyonlar, kanser hücrelerini apoptotik sinyallere karşı duyarsız hale getirir ve bunun sonucunda, kanser hücreleri hücre ölümüne direnç kazanırlar (27).

Sınırsız Replikasyon Potansiyeli (Ölümsüzlük): İnsan hücreleri genellikle 60-70 kez bölünüp çoğalma kapasitesine sahiptir. Bu hücreler zamanla bölünme kapasitesini kaybederek yaşlanmakta ve sonuç olarak da ölmektedir (27). Bunun nedeni kromozomun ucunda yer alan küçük DNA dizilimi tekrarlarından oluşan telomer adı verilen özel yapıların, tekrarlanan hücre bölünmeleri sonucu kısılmasıdır. Bu durum hücre siklusu denetim noktalarını harekete geçirerek hücre yaşlanmasına yol açmakta ve bir hücrenin geçirebileceği bölünme sayısının sınırlanmasına neden olmaktadır (48). Kanser hücreleri telomer kısalmalarını, telomeraz olarak adlandırılan bir enzimin aktivasyonu sonucunda kromozomların uçlarına yeni tekrarlar ekleyerek önlemektedir (27, 48). Böylece, kanser hücreleri programlanmış olan sınırlı sayının ötesinde sınırsız sayıda bölünebilmekte ve adeta ölümsüzlük kazanmaktadır.

Enerji Metabolizmasını Yeniden Programlama (Warburg etkisi): Kanser hücreleri glikoliz metabolizmalarını değişime uğratmaktadır (49). Oksidatif fosforilasyondan çok daha az sayıda ATP üreten Warburg etkisi olarak adlandırılan ve aerob glikoliz olarak bilinen mekanizma kanser hücreleri tarafından tercih edilmektedir. Warburg etkisinde ortamda bol miktarda oksijen bulunması halinde bile glukozun laktata dönüşümü gözlenmektedir (49). ATP eldesi açısından avantajlı görünmeyen bu mekanizmanın kanser hücreleri tarafından tercih edilmesinin asıl nedeni, kanser hücrelerinin hızlı bölünmeleri sonucunda glukoz ve aminoasit miktarlarını artırma gereksinimleridir. Bu sayede kanser hücreleri, tümör büyümesi açısından önemli avantajlar kazanmakta ve proliferasyon için gerekli olan makromolekülleri hızlı bir şekilde elde edebilmektedir (27, 50).

Bağışıklık Sisteminden Kaçış: Kanser bu ayırıcı özelliği, tümör antijenlerin özellikleri ile yakından ilişkilidir. Tümör hücreleri konağın bağışıklık sistemi tarafından tanınıp imha edilmemek için değişimler geçirmektedir. Konağın bağışıklık sistemini, kendilerini tanımayacak şekilde aldatmaları ya da konakta bulunan

bağışıklık sistemi hücrelerinin etkilerini ortadan kaldırmaları açısından avantajlar sağlamaktadırlar (27).

Anjiyogenez Gelişmesi: Kanser hücrelerinin çapları 1-2 milimetreyi aştığında, artan oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla yeni damar oluşumunu yani anjiyogenezi uyarmaları gerekmektedir. Ancak tümörlerdeki damarların, normal olmayan, geniş porları nedeniyle sızdıran, bağlantıları rastgele görünen özellikleri bulunmaktadır (51).

Tümörlerin büyüebilmesi için yeni damarların oluşumu tümör ve stroma hücreleri tarafından üretilen anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin denetimindedir (27). Anjiyogenez sürecinde ilk olarak anjiyogenik faktörlerin salınımı sonucunda vazodilatasyon gerçekleşmektedir. Bu aşamada vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) önemli roller üstlenmektedir (52). Ayrıca anjiyogenik faktörlerin matris metalloproteinazlar (MMP) ve plazminojen aktivatör (PA) enzimlerini aktive etmesi ile bazal membran ve ekstraselüler matris (ESM) yıkılmaktadır (52). Bu aşamanın ardından endotel hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonunun önü açılmış olur. İntegrinler ve diğer membran proteinleri endotel hücrelerinin birleşmesini ve ESM'ye tutunmalarını sağlayarak lümen oluşumunu sağlamaktadır (52). Yeni oluşan kapillerin matürasyonu ve son olarak da anjiyogenezin inhibisyonu doğrultusunda anjiyogenez süreci tamamlanmış olmaktadır. Anjiyogenez, yalnızca tümörün sürekli olarak büyümesi için değil aynı zamanda tümörün yayılması ve kanser hücrelerinin kan dolaşımına karışarak metastaz oluşturabilmeleri için de gerekmektedir (27, 53, 54).

İnvazyon ve Metastaz Yeteneği: Metastaz, malign bir tümörün uzak dokularda lokalize, primer tümörden ayrı, sekonder oluşumları olarak adlandırılmaktadır (55).

Kanserler lenf yoluyla, kan yoluyla ve vücut boşluklarına ekilerek olmak üzere üç yolla yayılım göstermektedirler (7).

Lenf yoluyla yayılımda, lenf kanallarına giren tümör hücreleri bölgesel lenf düğümlerine ulaşır burada tutunarak, bir süre için kanserin yayılmasına engel

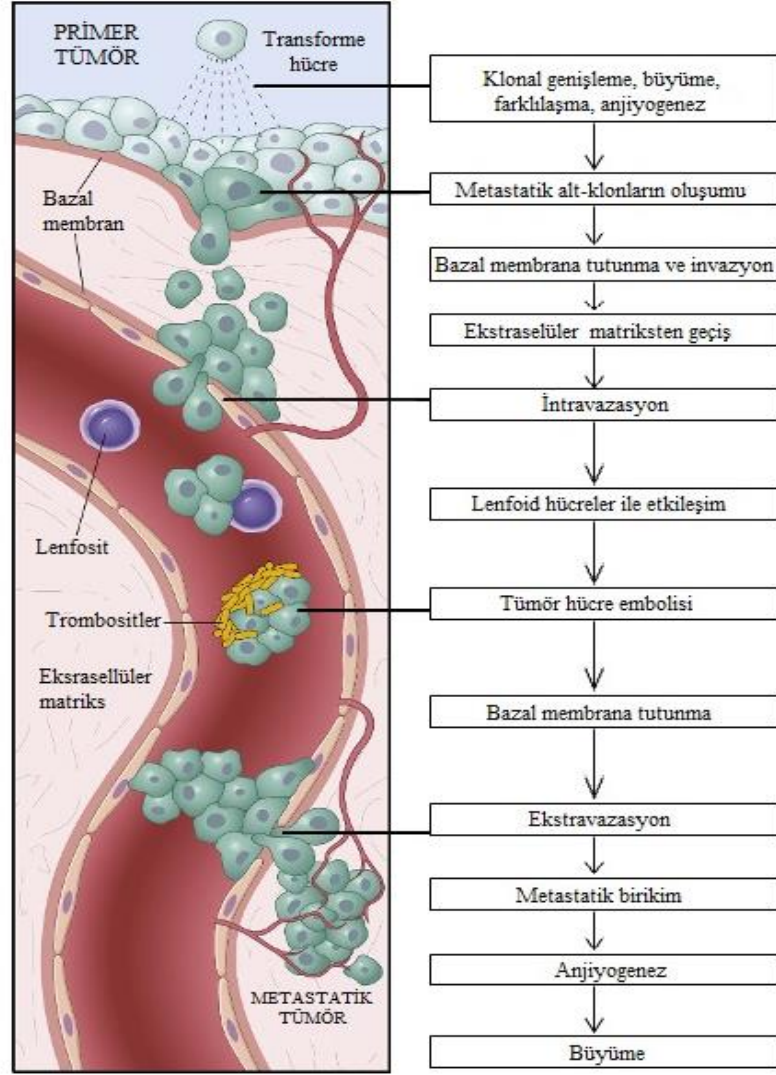
olmaktadır. Ancak lenf düğümü kanser hücresi ile dolduğunda diğer lenf düğümlerine yayılma gerçekleşerek yayılımlar artmaktadır (7).

Kan yoluyla yayılımda, venöz duvarların hem tümör invazyonuna karşı duyarlılığının yüksek olması, hem de lenf akımının venöz dolaşıma katılması nedeniyle metastaz venöz yolla gerçekleşmektedir (7).

Vücut boşluklarına ekilerek yayılım şeklinde ise, tümörün vücuttaki doğal bir boşluğu invaze ettiği gözlenmektedir ve bu yayılım türü özellikle çoğu zaman periton yüzeylerini kaplayan over kanserlerinde gözlenmektedir (7, 27).

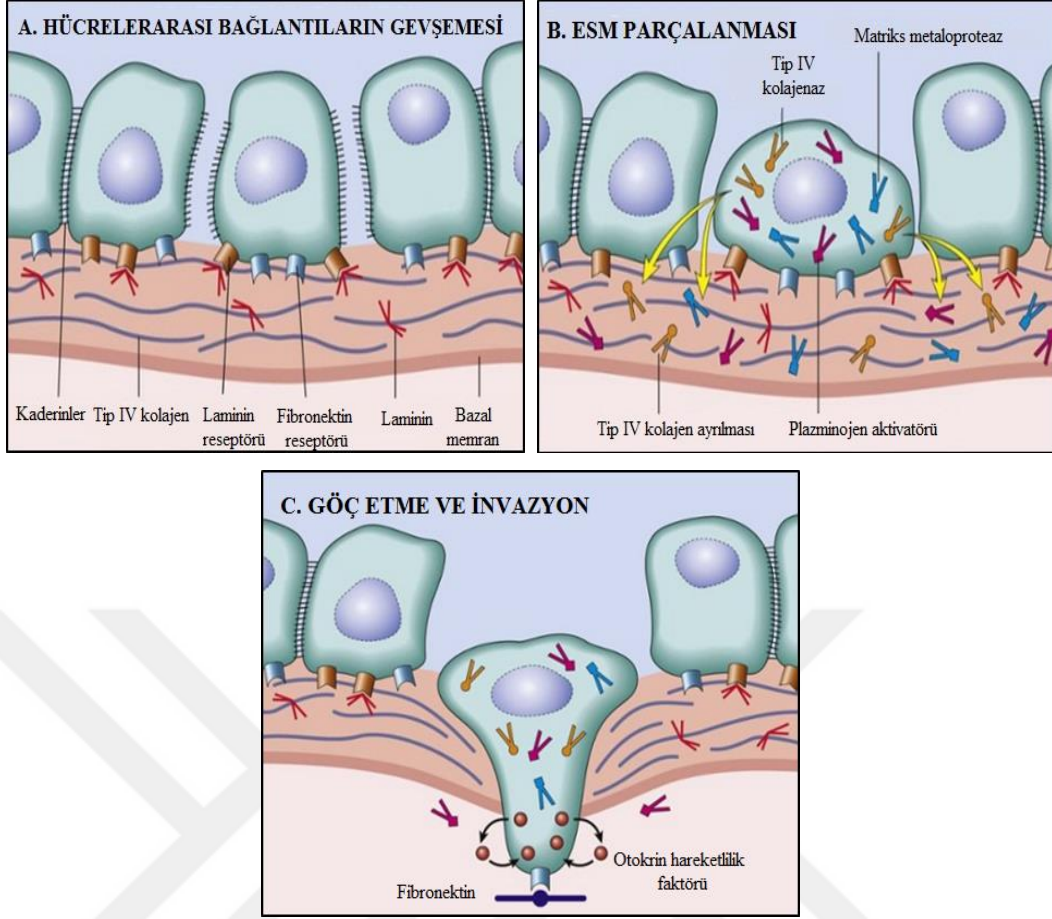
Ekstraselüler matriksin bozunması, epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT), tümör anjiogenezi, inflamatuvar tümör mikroçevresinin gelişmesi ve programlanmış hücre ölümü mekanizmalarında oluşan bozukluklar gibi çok sayıda hücrel süreç ile bağlantılı olarak gelişen metastaz, kanserin ilerleyişinde en önemli karakteristik özelliktir (56).

Kanser hücrelerinin yayılması olarak tanımlanan invazyon-metastaz olaylar dizisi, birbirini izleyen aşamalarla gerçekleşen, karmaşık bir süreçtir (Şekil 2.4.) (7, 29). Tümörün büyüme ve anjiogenezini takiben metastaz sürecinde ilk olarak, lokal invazyon ile kan ve lenf damarlarına giriş (intravazasyon) meydana gelmektedir. Damarlara giren hücreler, burada göç etmelerinin ardından tutunma için damarlardan çıkış (ekstravazasyon) yapmaları gerekmektedir. Ekstravazasyona uğrayan hücreler, mikrometastazları meydana getirmekte ve son olarak mikrometastazlar makroskopik tümörleri oluşturarak metastaz gelişimini uyarılmaktadır (27). Meydana gelen bu metastatik olaylar dizisini iki aşamaya ayırmak mümkündür. Bunlar, ESM invazyonu ve tümör hücrelerinin damarlar yoluyla yayılarak uzak dokulara ya da organlara yerleşmesidir (7, 27).



Şekil 2.4. Bir tümörün kan yoluyla yayılımı sırasında meydana gelen metastaz süreci (29).

Ekstraselüler matriks (ESM) İnvazyonu: Metastatik süreçte tümör hücreleri ESM ile çeşitli aşamalarda etkileşime girmektedir (Şekil 2.4) (29). Metastaz sırasında tümör hücrelerinin metastaz yapabilmesi için özellikle intravazyon ve ekstravazasyon aşamalarında çok sayıda farklı bazal membrandan geçmesi gerekmektedir. ESM invazyonu birbirini izleyen olaylar dizisiyle sonuçlanmaktadır (Şekil 2.5) (29). İlk olarak tümör hücreleri adezyon yeteneklerinin azalmasından dolayı hücreler arası bağlantılarını gevşeterek birbirlerinden ayrılırlar ve ekstraselüler matriks proteinlerini yıkmak için proteazlar salgılamaktadırlar (57) Ardından tümör hücrelerinin ESM proteinlerine bağlanmasında değişiklik meydana gelir ve hücreler farklı noktalara tutunur. Sonuç olarak malign hücreler göç etme ve invazyon yeteneği kazanmış olurlar (7, 27, 58).



Şekil 2.5. Metastaz sürecinde meydana gelen ESM invazyonu olaylar dizisi (29).

Tümör hücrelerinin vasküler yayılımı ve yerleşmesi: Tümör hücreleri dolaşım sistemine ulaştıklarında, konağın bağışıklık hücreleri tarafından tahrip edilmeye yatkındır. Hücrelerin metastaz yapabilmeleri için; daha önce bahsedildiği gibi bağışıklık sisteminin denetiminden kaçmaları gerekmektedir. Bütün bu engelleri aşabilen tümör hücreleri yayılım yapabilecekleri kapiller ağda tutunmaktadır. Kan dolaşımındaki tümör hücrelerinin bazıları, kümelenerek ve dolaşımdaki lökositlere, özellikle trombositlere yapışarak emboli oluşturmakta ve böylelikle de dolaşımdaki anti-tümör etkilere karşı bir dereceye kadar korunmaktadır. Ancak tümör hücrelerinin çok büyük bir bölümü dolaşımda tek başlarına dolaşmaktadır. Serbest tümör hücrelerinin damar dışına çıkmasında veya tümör embolisi oluşmasında söz konusu hücreler önce damar endoteline yapışır, ardından invazyon sürecindeki benzer mekanizmalarla bazal membrandan geçerek organların parankim dokusuna giriş yapar. Sonuç olarak metastaz süreci tamamlanmış olur (Şekil 2.4) (7, 27, 29).

Kanserler genelde metastaz odakları olarak farklı yerleri tercih etmektedir. Karaciğer, akciğer ve kemik, mikropiller sistemleriyle metastaz için genellikle seçilen organlardır (17). Ancak belirli tümörlerin belirli organlara yerleşme eğilimi bulunmaktadır. Örneğin akciğer kanserleri adrenallere sık metastaz yaparken, iskelet kasına hemen hemen hiç yayılmamaktadır. Bu metastazların saptanması son derece zordur. Çünkü olası organların tümünü yeterince ayrıntılı araştırmak mümkün değildir (59). Güncel araştırmalar, lenfatik damarlarda ya da kan damarlarında yayılan hücrelerin saptanması ile primer tümörlerin metastaz oluşturma eğilimleri hakkında tahminde bulunmayı hedeflemektedir (60).

2.2. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (Circulating Tumor Cells, CTCs)

Metastaz sırasında dolaşımda bulunan ve yeni tümör oluşumuna neden olabilen tümör hücreleri, dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs; circulating tumor cells) olarak adlandırılmaktadır (61). İlk defa Thomas Ashworth, 19. yüzyılın sonlarında dolaşımdaki tümör hücrelerinin varlığını ileri sürmüştür (62). CTC'lerin metastazdaki rolleri, onları kanser araştırmaları için önemli bir aday haline getirmiştir (63-65). Dolaşımdaki tümör hücrelerinin, kanser gelişiminin erken evrelerinden itibaren, kanserli hastaların dolaşım kanında bulunduğu, ancak benign hastalığı olan bireyler ve sağlıklı bireylerde bulunmadığının gösterilmesiyle CTC'ler, tümör belirteci çalışmalarının odağı haline gelmiştir (66). Günümüzde CTC'ler kanser tanısında kullanılabilecek en uygun tümör belirteçleri olarak kabul edilmektedir (18). Son yıllarda farklı kanser türleri için, kan örneklerinde CTC'lerin tespit edilmesi üzerine çok sayıda araştırma yürütülmektedir (67-70). Ayrıca CTC'lerin genotipi ve fenotipi üzerine yapılan çalışmalarla tümör hücresinin malign doğası aydınlatılabileceği, metastazların erken dönemde tespiti ve tedavide başarıyı yakalama şansının artabileceği ileri sürülmektedir (71).

CTC'ler, elde edilebilir ve sadece non-invaziv bir şekilde damardan kan alınarak tekrarlı olarak karakterize edilebilir. Bu özelliklerinden dolayı "sıvı biyopsi" olarak da adlandırılmaktadır (72).

Sıvı biyopsi, kanserli hastalarda:

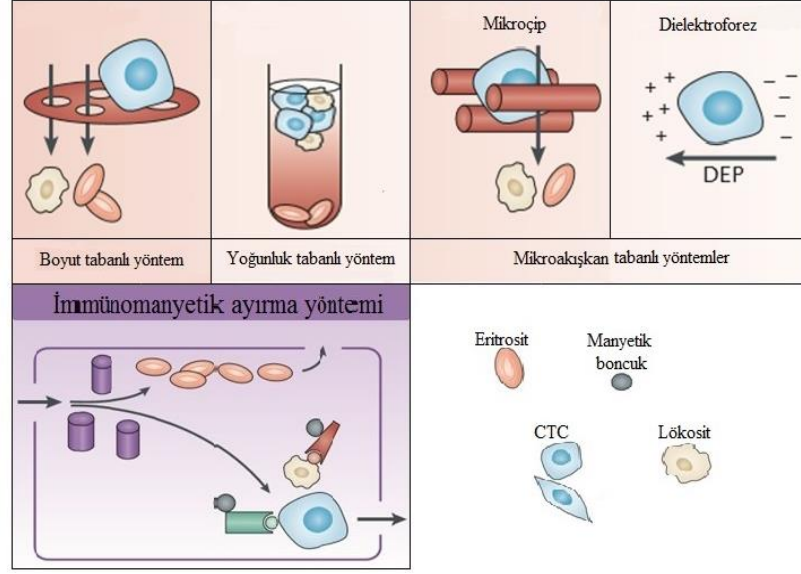
- a) Erken tanı
- b) Metastatik nüks veya prognostik bilgi için risk tahmini
- c) Tedavilerin eş zamanlı izlenmesi ve kademelendirilmesi
- d) Terapötik hedeflerin ve direnç mekanizmalarının tanımlanması
- e) Metastaz gelişiminin anlaşılması gibi durumlarda kullanılabilir (73).

2.2.1. CTC Teknolojisi

CTC teknolojisinde, CTC tespit basamakları olarak; zenginleştirme basamağı ve saptama basamağı uygulanmaktadır (22). Çünkü 10^5 - 10^8 lökosit başına yaklaşık 1 CTC oranları ile CTC'ler dolaşım kanında nadir bulunan hücrelerdir (20, 64, 74). CTC'lerin çok az ancak lökositlerin bol miktarlarda bulunmaları nedeniyle CTC tespit yöntemlerinin son derece hassas ve spesifik olmaları gerekmektedir (75). CTC sayım sürecinde duyarlılığı arttırmak adına ilk olarak zenginleştirme basamağı gerekmektedir. Bu basamağın ardından saptama basamağı gerçekleştirilerek CTC sayısı tespit edilmektedir (61).

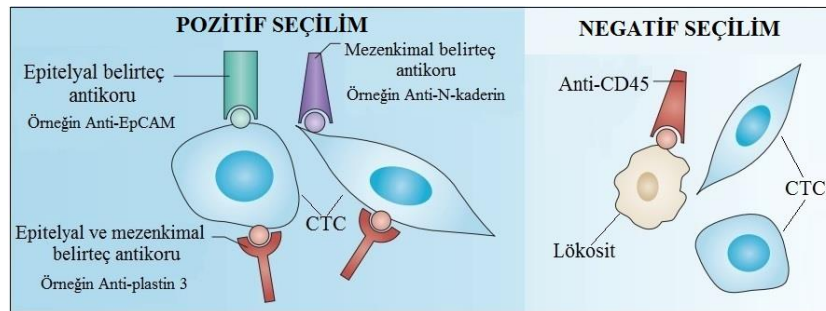
2.2.1.1. Zenginleştirme Basamağı

CTC'ler, protein belirteçlerinin ekspresyonu gibi biyolojik özellikleri ile boyut, yoğunluk, şekil değişikliği ve elektrik yükleri gibi fiziksel özellikleri doğrultusunda diğer hücrelerden ayrılmaktadır (76). Bu nedenle CTC zenginleştirme yöntemleri; immünomanyetik, boyut, yoğunluk ve mikroakışkan tabanlı olarak gruplandırılabilir (Şekil 2.6) (76, 77).



Şekil 2.6. CTC tespiti için gerçekleştirilen zenginleştirme basamağında yaygın olarak kullanılan yöntemlerin gösterimi (76).

İmmünomanyetik ayırma yöntemleri: İmmünomanyetik ayırma yöntemleri manyetik boncuk tabanlı ayırma teknolojileridir. Bu yöntemde ilk olarak protein belirteç ekspresyonları doğrultusunda hücreler spesifik demir boncuk bağlı antikorlar ile hedeflenmektedir. Sonrasında, manyetik bir alandan geçirilen hücreler ayrılarak CTC'ler zenginleştirilmektedir. Bu zenginleştirme işleminde pozitif ve negatif seçim gerçekleştirilir. Pozitif seçimde epitelyal ve/veya mezenkimal belirteçler, negatif seçimde lökositler tarafından eksprese edilen belirteçler hedeflenmektedir (Şekil 2.7) (21, 76).



Şekil 2.7. Pozitif ve negatif seçim yöntemleri (76).

1. Pozitif seçim; tümör-spesifik belirteçler ile hücrelerin hedeflenerek seçilmesine dayanmaktadır. Epitelyal hücre adezyon molekülü (EpCAM, cluster of

differentiation 326 (CD326)) bu amaçla kullanılan en önemli tümör-spesifik belirteçdir (78). Monoklonal antikolar yardımıyla seçilen hücreler demir boncuklar ile işaretlenmekte ve manyetik alana maruz bırakılarak diğer hücrelerden ayrımı immünomanyetik olarak gerçekleştirilmektedir (79).

EpCAM: Epitelyal hücre belirteci olan EpCAM molekülü, kalsiyum bağımsız homofilik hücre-hücre adezyonunda rol oynayan bir transmembran glikoproteindir (80). Ayrıca hücre sinyalizasyonu (81), migrasyonu (82), proliferasyonu ve diferansiyasyonunda (83) da etkili olmaktadır. Ek olarak karsinogenez ve metastaz sürecinde de önemli roller üstlendiği ileri sürülen EpCAM molekülü, prognostik bir belirteç olarak görülerek immünoterapötik stratejiler için hedef olabilmektedir (84). Ayrıca en yüksek düzeyde aşırı ekspresyon gösteren tümör ilişkili antijen olarak bilinen EpCAM günümüzde kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (85). Kolon, rektum, prostat, karaciğer, ösofagus, akciğer, baş boyun, pankreas ve meme gibi farklı organlardan köken alan birçok karsinomda EpCAM molekülünün güçlü ekspresyonu gözlenmiştir (86). Tüm bu özellikleri nedeniyle CTC çalışmalarında da EpCAM hedeflenmesi tercih edilmektedir. Tümör hücrelerinde ekspresyonlarından dolayı pozitif seçim yöntemi ile CTC'ler yakalanmakta ve istenmeyen diğer hücreler uzaklaştırılmaktadır (87).

2. Negatif seçim; CD45 molekülünü ekspresyon eden hematopoetik hücrelerin yakalanarak uzaklaştırılması yöntemidir (87). Böylece, CTC'ler negatif seçim sonucunda CD45 pozitif hücrelerinden ayrılmış olarak zenginleştirilmektedir (88).

CD45: Ortak lökosit antijeni (LCA) olarak da bilinen CD45, transmembran reseptör benzeri protein tirozin fosfatazdır ve eritrosit ile plazma hücreleri dışında tüm farklılaşmış hematopoetik hücrelerde bulunmaktadır (89, 90).

Boyut tabanlı yöntemler: CTC'ler ile kan hücrelerinin boyut farkından yararlanılarak filtrasyon ile ayırma prensibine dayanan bir yöntemdir (91). CTC'lerin lökositlerden daha büyük boyutlara sahip olduğuna inanılmaktadır (92,93) ve 8 µm por çapına sahip filtrelerin CTC'leri yakalamada işlemi için uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu filtrelerin kullanımı ile daha küçük çaplardaki lökositler (genellikle <8 µm) filtreden akarken daha büyük çaplara sahip olan tümör hücreleri

(genellikle $>8 \mu\text{m}$) toplanabilmektedir (94). Ancak aynı hastada dahi yakalanan tümör hücrelerinin boyutlarının geniş bir aralıkta değişiklik göstermesi (4-30 μm) (95) nedeniyle bu yöntem spesifik ve hassas bir zenginleştirme metodu olarak kabul edilmemektedir (96).

Yoğunluk tabanlı yöntemler: Fikol, Lymphoprep ve OncoQuick gibi yoğunluk gradiyent santrifüj yöntemleri kullanılarak CTC'ler zenginleştirilmektedir (97-99). Bu yöntem ile hücreler arasındaki yoğunluk farkı sayesinde tabakalı olarak ayırım gözlenmektedir (100, 101). Fikol gradiyent santrifüj yöntemi ile CTC'lerin boyut farkı sayesinde zenginleştirilmesi sağlanmaktadır. Çünkü CTC'lerin ve mononükleer hücrelerin yoğunlukları 1.077g/mL'den küçük olmasına rağmen, eritrositler ve granülositlerin yoğunlukları bu değerden büyüktür (101).

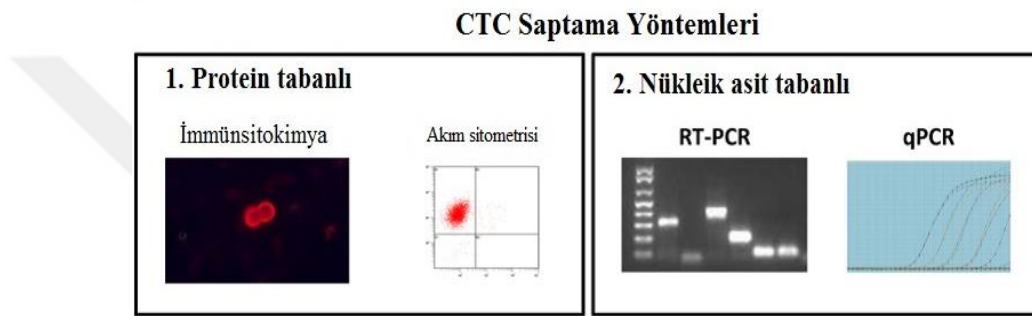
Mikroakışkan tabanlı yöntemler: Mikroakışkan tabanlı metotlar arasında hücrelerin şekil değişikliğini esas alan mikroçip ve elektrik yükleri ile ayırımı sağlayan dielektroforez (DEP) yöntemleri bulunmaktadır (22, 76).

“CTC-çip” olarak adlandırılan mikroçip yönteminde, EpCAM antikoruna ile kaplı mikropostlar kullanılmaktadır (102). Bu antikor kaplı mikropostlar sayesinde EpCAM eksprese eden hücreler yakalanarak CTC'ler pozitif seçim ile tespit edilmektedirler (102). Ancak, bu yöntemde, sadece EpCAM pozitif hücrelerin yakalanıyor olması ve çipin ticari olarak kullanılabilirliğinin henüz mevcut olmaması gibi olumsuzluklar bulunmaktadır (96).

CTC zenginleştirme basamağı için kullanılan diğer bir yöntem olan DEP, elektrik alan gradiyentleri ile oluşturularak nötr polarize parçacıkların hareketine olanak sağlayıp CTC'lerin ayırımını gerçekleştirir (103). Ancak, elektrot tasarımı ve DEP fiziğinin kısıtlamaları da bu yöntemin dezavantajları arasında yer almaktadır (104).

2.2.1.2. Saptama Basamağı

CTC saptama basamağında kullanılan çok sayıda farklı yöntem bulunmasına rağmen bu yöntemler protein tabanlı ya da nükleik asit tabanlı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.8) (22). Protein tabanlı olarak akım sitometrisi (flow cytometry (FC)) (105-107), immünsitokimya (108, 109), mikroakışkan çipler (93, 102) kullanılırken; nükleik asit tabanlı olarak ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), ters transkriptaz kantitatif PCR (RT-qPCR) (110-113) yöntemleri kullanılmaktadır.



Şekil 2.8. CTC saptanmasında yaygın olarak kullanılan tekniklerin gösterimi (22).

İmmünsitokimya yöntemi ile insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2), epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), androjen, prostat spesifik antijen (PSA), östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü gibi birçok tümör belirteci hedeflenerek bunların ekspresyonları ile CTC'lerin karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir (22). Ancak CTC tespitinde bu yöntemin birincil kısıtlılığı; bu yaklaşım kullanılarak elde edilen verilerin büyük ölçüde kalitatif olmasıdır (22).

Sıkça kullanılan sitometrik yöntemler, immünsitokimya yöntemlerinde uygulandığı gibi nadir hücrelerin antikorlar yardımı ile yakalanması esasına dayanmaktadır. Spesifik antijenlere karşı monoklonal antikorların kullanımı ile CTC'ler tespit edilmektedir (96). Monoklonal antikorlar, tümör hücrelerini etiketleyerek floresan ya da kolorimetrik olarak bu hücrelerin görüntülenmelerini sağlarlar (114). CTC'lerin bu şekilde tespiti için yaygın olarak kullanılan moleküller; sitokeratinler (CK) ve EpCAM'dir (96). Bir FC cihazı olan floresan aktif hücre sıralama (FACS) spesifik hücrelerin ayırımı için tercih edilen bir tekniktir (115).

CK'lar: Epitelyal hücrelerin iskeletlerini oluşturan intermedier filamentlerdir ve molekül ağırlıklarına göre farklı alt tiplere ayrılmaktadır (116). Benign hücrelerdeki CK profilinin karsinogenez esnasında değiştiği ve yeni CK'ların sentezlenmeye başladığı ya da mevcut CK'ların daha yoğun olarak eksprese edildiği görülmektedir. Bu durum gelişen neoplazinin tipine ve malignite derecesine bağlı olarak değişmektedir (117).

RT-PCR yöntemi, CTC'lerdeki hedef mRNA'ları amplifiye etmek için tercih edilmektedir (118-120). Bu yöntemde hücreler için spesifik olan belirteçler hedef alınmaktadır. Örneğin; akciğer kanserinde survivin, insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT), CK7, tiroid transtripsiyon faktörü 1 (TTF-1) (121-123), meme kanserinde musin 1 (MUC1) (124), kolorektal kanserde CK 19 ve CK20 (125). Ancak bu yöntemin birçok dezavantajı bulunmaktadır: RNA degradasyonu, spesifik olmayan amplifikasyon, kontaminasyon ve pseudogenler nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar, canlı ve cansız hücre ayırımının olmaması, düşük ekspresyon seviyeleri nedeniyle yanlış negatif sonuçların gözlenmesidir (113).

CTC'lerin zenginleştirme ve saptama basamaklarının bir arada uygulanarak CTC'lerin sayımını gerçekleştiren bazı yöntemler de bulunmaktadır. Bu prensip ile yarı-otomatik olarak çalışan CellSearch sistemi periferik kandan CTC tespitinde Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tek tekniktir (126-128). Bu sistem; meme, kolorektal ve prostat kanserinde tedavi etkinliği ve prognozu anlamada yardımcı olabilmektedir. Prensip olarak sistemde, manyetik boncuk bağlı anti-EpCAM antikoları ile EpCAM eksprese eden hücreler zenginleştirilmektedir. Algılanan EpCAM (+) hücreler, floresan nükleik asit boyası olan 4,2-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür (DAPI) ile etiketlenmektedirler (126). Ayrıca florokromlar ile konjüge antikolar (lökositler için CD45 ve epitelyal hücreler için CK8,18,19) kullanılarak epitel hücrelerin lökositlerden ayırımı sağlanmaktadır. Ardından bir floresan tabanlı mikroskop sayesinde CK(+), DAPI ile nükleer boyanmış ve CD45(-) olarak CTC tespiti ve sayımı gerçekleştirilmektedir (126, 129-131).

2.3. Akciğer Kanseri

Akciğerler, ekstratorasik organ kanserlerinin en sık metastaz yaptıkları yani sekonder tümörlerin sıklıkla gözlenebildiği organlardır (132). Ayrıca primer akciğer kanseri görülme sıklığı da her geçen gün artmaktadır (133, 134). Primer akciğer tümörlerinin yaklaşık %95'i karsinomlardan; kalan %5'i ise karsinoidler, mezenkimal maligniteler, lenfomalar ve bazı benign lezyonlardan oluşmaktadır (133).

Akciğer karsinomları tipik olarak sert, gri-beyaz renkli küçük mukozal lezyonlar halinde intraluminal kitle olarak ortaya çıkabilmekte, bronşiyal mukozaya yayılabilmekte veya komşu akciğer parankimine doğru büyüyen büyük kitle şeklinde gelişebilmektedir (133). Tümör gelişiminin devam etmesi neticesinde bu tümörler plevraya uzanarak, plevral boşluğu ve göğüs duvarını infiltre ederek komşu intratorasik organlara invaze olabilmektedirler. Sonuç olarak lenf ya da kan yolu ile daha uzak organlara yayılarak metastazlar meydana getirebilmektedirler (133).

2.3.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir gözlenen bir hastalık iken sigara tüketimindeki artış ve sanayileşme nedeniyle günümüzde tüm dünyada en çok ölüme neden olan kanser türüdür (135, 136). Dünya genelinde kanserden ölümlerin en sık nedeni akciğer kanseridir (134). 2016 yılında 224.390 yeni akciğer kanseri olgusu ve buna bağlı 158.080 ölüm meydana geleceği tahmin edilmektedir (137,138).

Hem erkeklerde hem de kadınlarda akciğer kanseri önemli bir sağlık problemi olup kansere bağlı ölümlerin %17.6'sından sorumludur (139). Tüm Dünya genelinde akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanserler arasında birinci, kadınlarda ise dördüncü sırada yer almaktadır (Tablo 2.1) (3).

Akciğer kanseri giderek artan insidansı ve mortalite oranları nedeniyle, ülkemizde de önemli sağlık problemlerinden birisi haline gelmektedir (9, 140). 2013 Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, ülkemizde 163/100 000 oranında akciğer

kanseri görülmekte ve ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (141). Erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri iken, kadınlarda meme, tiroid, kolorektal kanserlerinden sonra akciğer kanseri dördüncü sırada yer almaktadır (3). Özellikle erkeklerde 25-49 yaş grubundan itibaren tüm yaş gruplarında ilk sırada görülmesi, Türkiye’de akciğer kanserlerinin gelecekte de önemli bir halk sağlığı sorunu olacağını göstermektedir (9). Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türünün dağılımının dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki ile benzer olduğu Tablo 2.1’de gösterilmektedir (3).

Tablo 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre en sık görülen ilk beş kanser türünün erkeklerde ve kadınlarda dağılımı (3).

Erkeklerde En sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı					
	Türkiye*	Dünya	IARC’a üye 24 ülke	AB (28 ülke)	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Prostat	Prostat	Prostat
2	Prostat	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
3	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Mesane	Mide	Mide	Mesane	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Mesane	Böbrek	Böbrek
Kadınlarda En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı					
	Türkiye*	Dünya	IARC’a üye 24 ülke	AB (28 ülke)	ABD
1	Meme	Meme	Meme	Meme	Meme
2	Tiroid	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Akciğer
3	Kolorektal	Uterus serviksi	Akciğer	Akciğer	Kolorektal
4	Akciğer	Akciğer	Uterus serviksi	Uterus korpusu	Tiroid
5	Uterus korpusu	Uterus korpusu	Uterus korpusu	Uterus serviksi	Uterus

*Türkiye Bileşik Veri Tabanı, 2013

Akciğer kanseri etiolojisinde en önemli faktör hiç kuşkusuz sigaraya maruziyettir (142). Sigaraya başlama yaşı, kullanım süresi, günlük içilen sigara sayısı ve içeriğindeki katran miktarı ile ölüm riski orantılı olarak artmaktadır. Akciğer kanseri riski ve buna bağlı ölüm riski gençlerde daha fazla olmak üzere sigaranın bırakılmasından 5 yıl sonra başlayarak belirgin olarak azalmaktadır. 15 yıllık süre

içinde bu azalma yaklaşık % 80'leri bulmaktadır (143). Bunun yanında pasif sigara içiciliğinin de akciğer kanseri gelişiminde önemli katkısı bulunduğu gösterilmiştir. Pasif içicilerde de akciğer kanseri %20 oranında daha sık görülmektedir (141).

Sigara içimi ile birlikte mesleki ve çevresel faktörlere sahip kişilerde de kanser riski belirgin olarak artmaktadır. Mesleki ve çevresel faktörler arasında endüstriyel iş yerlerinde bulunan asbest, kömür veya katran dumanı, nikel, krom, arsenik (maden eritme ve pestisit işçileri), bis-klorometil eter, kadmiyum, terpenler, vinil klorür ve radyoaktif maddeler gibi ajanlar da akciğer kanseri gelişiminde rol oynamaktadır. Yaşadıkları çevre ya da meslekleri gereği asbeste maruz kalan kişilerde hem akciğer kanseri riski, hem de mezotelyoma riski artmaktadır (141, 143).

Son on yılda akciğer kanseri insidansı, kadınlar arasında büyük artış göstermektedir. 1985 yılından bu yana akciğer kanserli hastaların sayısı erkeklerde %44 artış göstermişken kadınlarda %76 oranında artış meydana gelmiştir (144). Kadınlarda ve erkekler arasındaki hormonal farklılıklar akciğer karsinogenezinde önemli roller üstlenmektedir (144). Örneğin; kadınlarda gerek sigara içiminin daha az oranda olması, gerekse hormonal faktörler nedeni ile adenokarsinom sıklıkla görülmektedir. Özellikle, östrojen replasman tedavisi alan kadınlarda adenokarsinom gelişme riskinin artması, karsinogenezde akciğer dokusunda östrojen reseptörünün varlığını vurgulamaktadır (145).

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) öyküsü olan kişilerde 10 yılda akciğer kanseri gelişme riski % 8.8'dir. Bunların çoğu skar dokusundan gelişen adenokarsinomlardır. Ek olarak tüberküloz, pnömoni, skleroderma, pnömokonyoz gibi kronik parankimatöz akciğer hastalıkları, akciğer kanserine neden olabilecek diğer hastalıklardandır (141).

Özetle akciğer kanseri gelişiminden %94 oranında sigara sorumludur (136). Ayrıca yaş, ırk, cinsiyet, mesleki faktörler, hava kirliliği, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalığı, diyet, viral enfeksiyonlar, genetik ve immünolojik faktörlerin tümü de akciğer kanseri oluşumunda etkili olmaktadır (136).

2.3.2. Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

Akciğer kanserlerinin histolojik sınıflaması, klinik yaklaşım ve hastalığın ilerlemesi açısından oldukça önemli olup Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) önerdiği sınıflama sistemine dayanmaktadır (146). Günümüzde kullanılan malign epitelyal akciğer tümörlerinin histolojik sınıflandırılması Tablo 2.2'de gösterilmektedir (147). Akciğer kanserinin çok çeşitli histolojik türleri tanımlanmış olmasına rağmen, temel olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana alt grubu bulunmaktadır. Hastaların %85'i KHDAK olup bu grup adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom alt tiplerini içermektedir (141, 148, 149).

Tablo 2.2. Malign epitelyal akciğer tümörlerinin histolojik sınıflandırılması (147, 150).

Tümörlerin Sınıflandırılması
Skvamöz hücreli karsinom
Papiller, berrak hücreli, küçük hücreli, bazaloid
Adenokarsinom
Asiner, papiller, mikropapiller, solid, lepidik baskın, müsinöz alt tipler
Büyük hücreli karsinom
Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Küçük hücreli karsinom
Kombine küçük hücreli karsinom
Adenoskuamöz karsinom
Pleomorfik, sarkomatoid ya da sarkomatöz hücreler içeren karsinomlar
İğsi hücreli karsinom
Dev hücreli karsinom
Karsinoid tümör
Tipik, atipik
Tükrük bezi tipinde karsinomlar
Sınıflandırılmayan karsinom

Skuamöz hücreli karsinom: Bu alt tipe ait tümörler genellikle ana bronşlarda santral yerleşimli kitle olarak meydana gelmektedirler. Periferik lokalizasyonlu lezyonlar genellikle skar dokusu ile birlikte görülmektedir. Parankim içine doğru ve mediastinal yayılarak lenf bezlerine invaze olabilmektedir. Skuamöz hücreli karsinomlar erkeklerde daha sık görülmekte ve sigara öyküsü ile yakından ilişki göstermektedir. Akciğer kanserinin diğer histolojik alt tipleri ile kıyaslandıklarında bu tür daha geç metastaz yapmaktadır (136, 147).

Adenokarsinom: Genellikle periferik yerleşimlidir nadiren santralde bulunan heterojen kitleler olarak gözlenmektedirler. Histolojik incelemede asiner, papiller, müsinöz ve solid olarak sınıflandırılan farklı alt tipleri bulunmaktadır. Adenokarsinomlar özellikle kadınlarda ve sigara içmeyen bireylerde daha sık görülen tümörlerdir. Ayrıca altta yatan bir akciğer hastalığına bağlı olarak adenokarsinom gelişimi de gözlenebilmektedir. Genel olarak akciğer kanserinin diğer alt tiplerine göre adenokarsinomlar daha yavaş büyüyerek daha küçük kitleler oluşturmaktadırlar. Ancak adenokarsinomların erken metastaz yapma eğilimlerinden dolayı prognozları daha kötü olarak seyretmektedir (136, 147).

Büyük hücreli karsinom: Küçük hücreli karsinomların sitolojik özelliklerini taşımayan, grandüler veya berrak hücreli karsinomlar olarak alttipleri tanımlanmaktadır (146). Akciğer epitel hücrelerinden köken alan KHDAK grubuna dahil edilen büyük hücreli karsinomun prognozu adenokarsinom ile benzerdir. Genellikle periferik, bazen santral yerleşimlidir (10, 136, 147). Büyük hücreli nöroendokrin karsinom olarak adlandırılan alttipinin nöroendokrin hücre kökenli olduğu ileri sürülmektedir. Morfolojik ve immünohistokimyasal olarak nöroendokrin tümörler ile benzer özellik göstermekte ve ayrıca morfolojik olarak da büyük hücreli karsinom yapısında olduğu için alttip olarak sınıflandırılmaktadır. Bu tür nadir görülmektedir ancak kötü prognoza sahiptir (151).

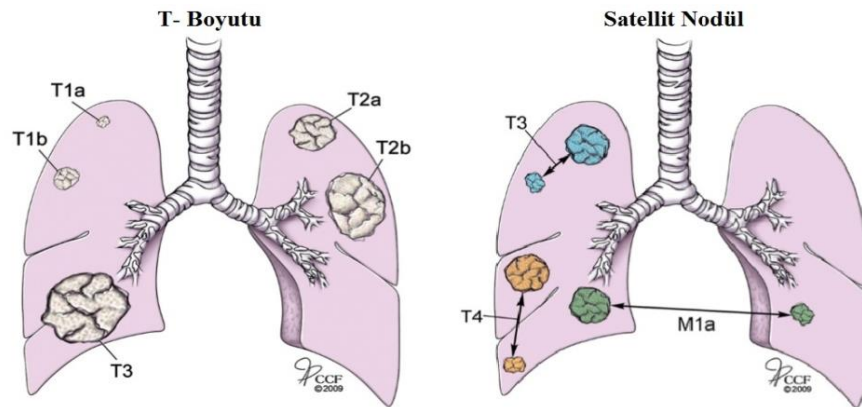
Küçük hücreli karsinom: Genellikle santral yerleşimli kitle şeklinde görülmektedirler. Tüm akciğer parankimine ilerleyerek hava yolu, hiler ve mediastinal lenf bezlerinde erken dönemde yayılma eğilimi göstermektedirler. Özellikle ileri evrede teşhis edilebildiklerinden ve oldukça agresif olmalarından dolayı, kemoterapiye cevap vermelerine rağmen hastaların prognozu kötü

seyretmektedir. Erken dönemde kan yoluyla yayılım göstererek metastaz oluşturmaktadırlar, tanı anında hastaların 2/3'ünden fazlasında metastaz görülmektedir. Erken evre hastalıkta sağkalım yaklaşık 17 ay iken, ileri evrede bu oran 8-9 aya kadar düşmektedir. Neredeyse KHAK hastalarının tamamında sigara öyküsü bulunmaktadır. Bu tümörler paraneoplastik sendromlara yol açan çeşitli polipeptid hormon salgılayabilme ve nöroendokrin belirteçleri eksprese edebilmektedirler (136, 141, 147).

Ülkemizde en sık skuamöz hücreli kanserler (yaklaşık %45) görülmekte olup, bunu küçük hücreli kanserler ve adenokanserler (yaklaşık %20) izlemektedir. Büyük hücreli kanserler ise %2 oranıyla en az görülen akciğer kanseri alt tipidir (152).

2.3.3. Akciğer Kanserin Evrelendirilmesi

Kanserli hastaları prognoz özelliklerine göre gruplayıp, tedavilerini planlama ihtiyacı bir evreleme sisteminin geliştirilmesine yol açmıştır. Evrelemede kullanılan TNM (T: primer tümör durumu, N: bölgesel lenf bezlerine tutulum, M: uzak metastaz varlığı) evreleme sistemi, tanı esnasında hastalığın yaygınlığını göstermede en önemli kılavuzdur. Bu şekilde oluşan standardizasyon, tedavi yaklaşımına, sonuçların değerlendirilmesine, prognoza ve veri transferine yararlı olmaktadır (153, 154). Akciğer kanserinde de TNM evrelemesi kullanılmaktadır (EK-1 Tablo 2.3) (Şekil 2.9) (150, 155, 156) ve evreleme sonucunda oluşturulan sınıflandırma Tablo 2.4'de gösterilmektedir (150, 157).



Şekil 2.9. Akciğer kanserinde evreleme şeması (156).

Tablo 2.4. Akciğer kanserinde TNM evrelemesi (150, 157).

EVRE	T	N	M
Gizli Karsinom*	TX	N0	M0
EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE IA	T1a, T1b	N0	M0
EVRE IB	T2a	N0	M0
EVRE IIA	T1a, T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
EVRE IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
EVRE IIIB**	T4	N2	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
EVRE IV***	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a, M1b

* Gizli karsinom için evreleme yapılmaz, TXN0M0 olarak tarif edilir.
** T4 içine tümörle aynı lob içindeki satelit tümör nodülü dahil edilmiştir.
*** Tümör lobu dışındaki nodüller M1 olarak sınıflandırılır.

Akciğer kanserli olgular büyük oranda ileri (Evre IV) ya da lokal ileri evrede (Evre IIIA ve IIIB) saptanmaktadır. Olguların % 70'i tanı anında radikal tedavi yöntemi olan cerrahi şansına sahip olamamaktadır (158). Ülkemizde bu oran daha yüksektir. Toraks Derneği Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu tarafından gerçekleştirilen çalışmada olguların % 86.7'nin ileri evrede olduğu gösterilmiştir (159). Olguların evrelere göre dağılımı ve 5 yıllık sağkalım oranları Tablo 2.5'de belirtilmiştir (150, 159).

Tablo 2.5. Akciğer kanserli hastaların tanı anındaki evrelerinin dağılımı (159) ve 5 yıllık sağkalım oranları (150).

Evre	Dağılım (%)	5 Yıllık Sağkalım (%)
Evre I	5.6	>60
Evre II	7.7	30-50
Evre IIIA	14.2	15-30
Evre IIIB	32.1	3-6
Evre IV	40.4	<1

2.3.4. Akciğer Kanserinin Klinik Bulguları

Akciğerlerin ağrı duyusundan yoksun organlar olmaları ve genellikle akciğer kanserinin ilk semptomu olan öksürüğün sigara içen bireylerde bir rahatsızlık olarak görülmemesi nedeniyle, akciğer kanseri tanısı genellikle ileri evrelerde mümkün olabilmektedir (136). Ancak genel olarak akciğer kanseri olgularının çoğu, uzun süren veya karakteri değişen öksürük, kanlı balgam, nefes darlığı, göğüs ve sırt ağrısı, ses kısıklığı, tekrarlayan pnömoniler, vena kava superior sendromu (VKSS), horner sendromu, plevral perikardiyal effüzyon ve/veya sistemik yayılımı düşündürülen kilo kaybı, kemik veya baş ağrısı, kişilik değişiklikleri, serum alkalin fosfataz, serbest kalsiyum, ve LDH (laktat dehidrojenaz) yüksekliği gibi belirti ve bulgular ve/veya hipertrofik pulmoner osteoartropati ve diğer paraneoplastik sendromlar ile kliniklere başvurumaktadırlar (160, 161).

Kanserin invazyon ve metastazı ile akciğer kanserinde gözlenen semptomların artışı doğrultusunda ileri evrede hastalık kendini belli etmektedir. Ayrıca akciğer kanserinde klinik bulgular, tümörün yerleşimi ve paraneoplastik sendromlar ile ilişkilendirilmektedir. Santral tümörler, öksürük, kanlı balgam, dispne, postobstrüktif pnömoni ile başvururken, periferik tümörler, plevra veya göğüs duvarı invazyonu sebebiyle göğüs ağrısı, öksürük ve restriktif nefes darlığı ile kendini göstermektedirler (136, 141). Ayrıca metastaz ile bağlantılı semptomlar da görülebilmektedir. Örneğin beyin metastazında mental veya nörolojik değişiklikler, karaciğer metastazında hepatomegali ve kemik metastazlarında ağrı gibi semptomlar oluşabilmektedir. En sık görülen paraneoplastik sendrom tümör kaşeksisi olup, etiolojisinde tümörden salgılanan sitokinler rol oynamaktadır. Bununla beraber klinik olarak hiperkalsemi, hipertrofik osteoartropati, uygunsuz ADH (antidiüretik hormon) sendromu, lökositoz, trombositoz, derin ven trombozu da görülmektedir. Tablo 2.6'da akciğer kanserinde meydana gelen klinik bulgular ve görülme sıklıkları ile nedenleri özetlenmektedir (136, 141).

Tablo 2.6. Akciğer kanserinde semptom ve bulguların görülme sıklığı ile nedenleri (136,141).

Semptom ve bulgular	Sıklık (%)	Neden
Öksürük	75	Hava yolu obstrüksiyonu, enfeksiyon, akciğer kompresyonu
Kilo kaybı	68	İlerlemiş kanser, karaciğer metastazı
Dispne	58-60	Büyük hava yolu obstrüksiyonu, plevral efüzyon, diyafragma paralizisi
Göğüs ağrısı	45-50	Toraks duvarı invazyonu, brakial pleksus tutulumu
Kanlı balgam	29-35	Hava yolunun tümör ile invazyonu
Kemik ağrısı	25	Kemik metastazı
Çomak parmak	20	Tırnak kökü ve uzun kemiklerde, periost reaksiyonu, hipertrofik pulmoner osteoartropati, yeni kemik oluşumu
Ses kısıklığı	5-18	Rekürren larengeal sinir tutuluşu
VKSS	4	Vena Kava Süperior'a bası veya invazyon
Disfaji	2	Özefagus basısı
Stridor	2	Trakea obstrüksiyonu

2.3.5. Akciğer Kanserinin Tanı Yöntemleri

Akciğer kanseri genellikle erken evrelerde asemptomatiktir ve başka hastalıklar nedeniyle gerçekleştirilen tetkikler sonucunda tesadüfi olarak saptanabilmektedir. Akciğer kanseri tanısında tercih edilecek olan tanı yöntemi primer tümörün çeşidi, lokalizasyonu, çapı, metastazların varlığı ve hastanın genel durumu göz önüne alınarak seçilmektedir (162). Ancak genel olarak akciğer kanserinde tanı, tümörün görüntülenmesi metotlarına dayanmaktadır (136). İlk olarak klinik değerlendirmede semptom ve bulgular göz önüne alınarak fizik muayane ve postero-anterior ve lateral akciğer grafisi ile ön değerlendirme gerçekleştirilmektedir (160, 161). Akciğer grafisinde; kitle gözlenmesi, hiler-mediastinal genişleme, atelektazi-konsolidasyon, plevral efüzyon, diyafragm yüksekliği gibi bulgular akciğer kanseri ön tanısını kuvvetlendirmektedir (160, 161, 163). Bu tetkiklerin ardından akciğer kanseri teşhisi kesinleşen ve ileri evre akciğer kanseri olduğu tespit edilen hastalara balgam sitolojisi, gerekli ise plevral efüzyon incelemesi ya da metastatik cilt lezyonlarından, lenf nodlarından biyopsi uygulanarak

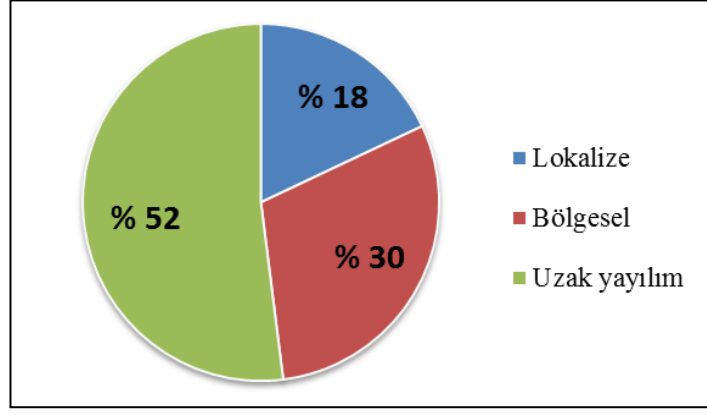
tanı gerçekleştirilmektedir. Ayrıca diğer tanı yöntemlerinin tercihi ve evreleme yapılabilmesi adına üst abdomen, karaciğer ve adrenalleri de görüntüleyen toraks bilgisayarlı tomografi (BT) çekilmektedir (160, 161, 163). Ayrıca toraks manyetik rezonans görüntüleme (MRI) de tercih edilmekte ancak bu yöntem sadece superior sulkus tümörü düşünülen hastalarda rutin tanı ve evreleme yöntemi olarak uygulanmaktadır (136). Ayrıca metastaz düşünülen hastalarda kemik taraması da istenmektedir. Teşhisi tamamlanan hastalarda tedavi planı oluşturulabilmesi ve prognozun değerlendirilebilmesi için tam kan sayımı ve rutin biyokimya testleri ile elektrokardiyografi (EKG) rutin olarak yapılması gereken tetkiklerdir. Hiler ve mediastinal lenf nodlarının ilk değerlendirmesine yardımcı olarak kullanılan toraks BT yöntemi, lenf nodu tutulumunun derecesini değerlendirmede sınırlı kalmakta ve bu amaç için daha duyarlı ve tümör fizyolojisinin saptanmasına yardımcı olan pozitron emisyon tomografisi (PET) yöntemi tercih edilmektedir (160, 161, 164).

Özet olarak akciğer grafisi ve balgam sitoloji, bilgisayarlı tomografi tarama testleri olarak kullanılmaktadır. BT, MRI, PET, endoskopik biyopsi teknikleri ise kanser evrelendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmektedir. Metastazların tespitinde ise BT'ye ek olarak beyin BT ya da MRI, tüm kemik taraması ve PET yöntemi kullanılabilir (158).

2.3.5. Akciğer Kanseri Metastaz

Akciğer kanserinin teşhisi genellikle ileri evrelerde mümkün olmaktadır. Bu nedenle sağkalımları diğer kanserlere göre oldukça düşüktür (9). Akciğer kanserinin tanıdan itibaren beş yıllık mortalitesi %85-90 arasındadır (10). Erken teşhislerde karşılaşılan zorluklar ve etkili tedavi yöntemlerinin eksikliği de küçümsenmeyecek ölçüde akciğer kanseri ölüm oranını arttırmaktadır (165).

Ülkemizde sağkalım süreleri ele alındığında kanserler arasında en kötü seyreden akciğer kanseridir (9). Akciğer kanserinin evreleri incelendiğinde %52'sinin uzak metastaz yaptığı görülmektedir (Şekil 2.10) (3). Akciğer kanserinde en sık metastaz gerçekleşen bölgeler kemik, santral sinir sistemi, karaciğer ve adrenal bezlerdir (Tablo 2.7) (150).



Şekil 2.10. Akciğer Kanseri Evrelerinin Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (3).

Tablo 2.7. Akciğer kanserinin neden olduğu uzak metastazlar ve sıklığı (150).

Tutulum bölgesi	Sıklık (%)
Adrenal bezler	2-22
Böbrek	10-15
Deri, yumuşak doku	1-3
Gastrointestinal sistem	12
Kalp, perikard	20
Karaciğer	1-35
Kemik	25
Plevra	8-15
Santral sinir sistemi	0-20

3. MATERYAL VE YÖNTEM

“Akciğer kanserli hastalarda kanda dolaşan tümör hücrelerinin akım sitometrisi ile tespiti” çalışması için Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sosyal ve Beşeri Bilimler Etik Kurulu’ndan 03.02.2015-12 no’lu karar ile izin alınmıştır (EK-2). Çalışmaya dahil edilen akciğer kanserli hastalardan alınan kan örnekleri Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Kliniği’nden temin edilmiştir. Akciğer kanseri teşhisi konmuş, evrelendirilmesi ile tür tespiti yapılmış ve hiç tedavi almamış 9 birey deney grubu olarak; hiçbir kanser şüphesi taşımayan 9 sağlıklı birey ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Gönüllü deney ve kontrol grubu bireyelerine çalışma ile ilgili bilgi verilerek onayları alınmıştır (EK-3).

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Antikorlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve antikorlar Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.

Adı	Üretici Firma
PBS	Gibco, Life Tech, ABD
Fikol (Biocoll Ayırma Solüsyonu)	Merck Millipore, Darmstadt, Almanya
EDTA	Genaxxon, Ulm, Almanya
BSA	Biowest, Nuaille, Fransa
CellWASH Solüsyonu	BD Biosciences, San Jose, ABD
Cytofix Fiksasyon Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD
FC Boyama Tamponu (FBS İçeren)	BD Biosciences, San Jose, ABD
Perm/Wash Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD
Phosflow Perm III Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antikorların listesi.

Adı	Konjuge Florokromu	İzotipi	Üretici Firma
Mouse Anti-Human CD45 (Monoklonal antikor)	APC-H7	APC-H7 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Anti-EpCAM (Monoklonal antikor)	PE	PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Mouse Anti-Human Cytokeratin 14,15,16 and 19 (Poliklonal antikor)	Alexa Fluor 647	Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Anti-Cytokeratin (CK 7, 8) (Poliklonal antikor)	FITC	FITC Mouse IgG2a Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
CD45 Mikro-boncuklar			Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Almanya

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Adı	Üretici Firma
Falkon tüpler (15 mL, 50 mL’lik)	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Serolojik Cam Pipetler (10 mL, 25 mL’lik)	Corning, New York, ABD
Pastör Pipet (3 mL’lik)	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Otomatik Pipet Uçları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Lamel	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Tartım Kapları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Spatüller	ISOLAB, Wertheim, Almanya
FC tüpü	BD Biosciences, San Jose, ABD
EDTA’lı kan tüpü	LP ITALIANA SPA, Milano, İtalya

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletlerin listesi.

Adı	Markası ve Modeli
Distile Su Cihazı	ELGA / LA621
Soğutmalı santrifüj	Hettich / Universal 320 R
Otomatik pipetler (10, 100, 1000 µL'lik)	Eppendorf, ABT
Şarjlı otomatik pipet pompası	Eppendorf / Easypet 3
Işık mikroskobu	Nikon / Eclipse E100
Hassas terazi	MRC / ASB-220-C2
Vorteks	Isolab / 622.01.001
MACs Başlangıç Kiti (LD kolon, mıknatıs ve standı)	Miltenyi Biotec
+4 ⁰ C Buzdolabı	Klimasan / S 900 SC DD
FC cihazı	BD FACSAria™ III Cell Sorter
Kronometre	ISOLAB
Thoma lamı	ISOLAB

3.1.3. Çalışmada Hazırlanan Solüsyonlar

MACs Tampon Çözeltisi: PBS (pH 7.2), %0.5'lik BSA ve 2mM Na₂EDTA içerecek şekilde hücre sayısına göre orantılanarak MACs tampon çözeltisi hazırlanmıştır (Tablo 3.5). Hazırlanan tampon çözeltisi taze olarak kullanılmış ve 2-8°C'de saklanmıştır.

Perm/Wash Tampon Çözeltisi: 10X olarak hazır temin edilen perm/Wash tampon çözeltisi 1X olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır.

3.1.4. Bir Birey için Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmada bir bireyin CTC tespiti için kullanılan kimyasal malzemelerin miktarları Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Bir bireyde CTC tespiti için kullanılan malzemelerin miktarları.

Adı	Miktarı
PBS	[Hücre sayısı (10^7) x 2080 μ L] + 4500 μ L
Fikol	22.5 mL
EDTA	(PBS miktarı x 0.015)/20 g
BSA	(PBS miktarı x 0.1)/20 g
CellWASH Solüsyonu	10^6 hücreye karşılık 100 μ L
Cytofix Fiksasyon Tampon Çözeltilisi	1 mL
FC Boyama Tamponu	3.1 mL
Perm/Wash Tampon Çözeltilisi (1X)	8 mL
Phosflow Perm III Tampon Çözeltilisi	100 μ L
CD45 Mikro-boncuklar	10^7 hücreye karşılık 20 μ L
Mouse Anti-Human CD45	10^6 hücreye karşılık 5 μ L
APC-H7 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 5 μ L
Anti-EpCAM	10^6 hücreye karşılık 20 μ L
PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 20 μ L
Mouse Anti-Human Cytokeratin 14,15,16 and 19	10^6 hücreye karşılık 5 μ L
Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 5 μ L
Anti-Cytokeratin (CK 7, 8)	10^6 hücreye karşılık 20 μ L
FITC Mouse IgG2a Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 20 μ L

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması

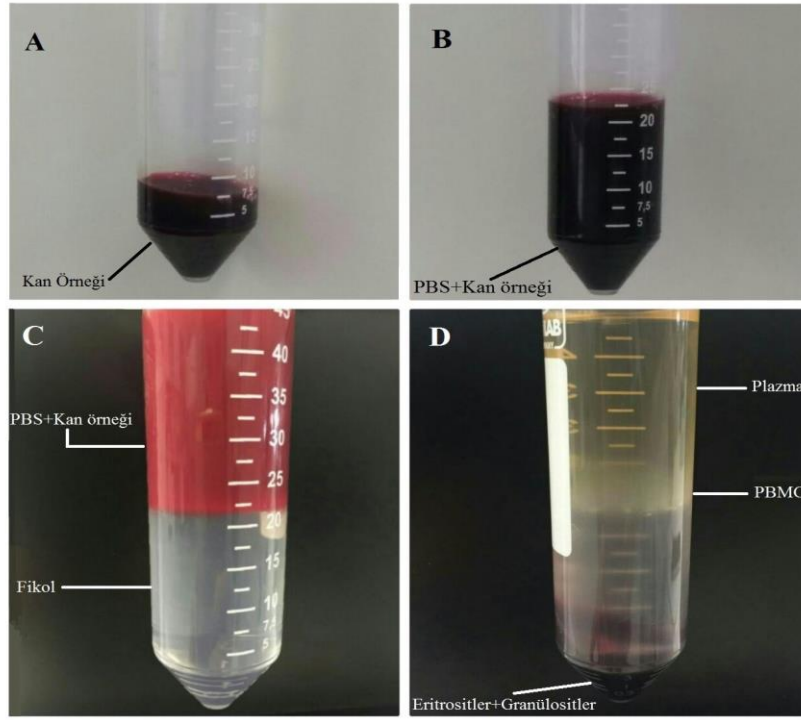
Akciğer kanserli hastaların ve sağlıklı bireylerin kan örnekleri EDTA içeren 7.5 mL tüplere alınmış CTC tespit protokolü uygulanmıştır. Bir birey için kullanılan malzemelerin miktarları Tablo 3.5’de gösterilmiştir.

3.2.2. CTC Zenginleştirme Basamağı

CTC sayım sürecinde duyarlılığı arttırmak için ilk olarak zenginleştirme basamağı uygulanmaktadır (16). Çalışmamızda CTC zenginleştirme basamağı olarak yoğunluk tabanlı fikol gradiyent santrifüj yöntemi ve sonrasında immunomanyetik ayırma yöntemi olan CD45 negatif seçim gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Mononükleer Hücrelerin Ayrılması

Toplanan kan örnekleri 1:2 oranında PBS ile karıştırılmasının ardından, 1:1 oranında fikol üzerine yavaşça eklenmiştir. Yoğunluk tabanlı ayırım gerçekleştirmek için hazırlanan örnek 20⁰C, 300 g'de, 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Fikol gradiyent santrifüj yöntemi ile hücreler arasındaki yoğunluk farkından dolayı tabakalı olarak ayırım gözlenmektedir. Santrifüj sonrasında, eritrositler tüpün en alt bölümünde, mononükleer hücreler (PBMC) bulutumsu tabaka olarak plazma ve fikol arasında yer almaktadır. PBMC tabakası lenfositler, monositler ve trombositleri içermektedir. (100, 166). Ayrıca CTC ve PBMC'lerin yoğunlukları 1.077g/mL'den küçük iken, eritrositler ve granülositlerin yoğunlukları bu değerden büyüktür (101). Bu sayede çalışmamızda santrifüj edilen örneklerde CTC'ler de içeren PBMC tabakası toplanarak yeni bir falkon tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Fikol gradiyent ayrımı.

- A. Kan örneği. B. PBS ve kan örneği. C. Fikol gradiyent ayrımı öncesi kan örneği.
D. Santrifüj sonrası PBMC tabakasının oluşması.

Toplanan PBMC tabakası, 10 mL PBS ile sulandırılıp 20⁰C 300 g'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Bu yıkama işlemi bir kez daha tekrar edilmiştir. Kalan pellet kırılarak 10 mL PBS eklenmiş ve hücre sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplam hücre sayısı thoma lamı yardımı ile hesaplanmıştır (166). Thoma lamında sayım sonucu toplam hücre sayısı $A \times SF \times 10000$ formülü ile hesaplanır. Burada $A=16$ büyük karede sayılan hücre adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. 10000 ise 0,1 mm³'deki sayım sonucunu 1 ml 'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (167).

3.2.2.2. Negatif Seçim ile Lökositlerin İmmunomanyetik Ayrımı

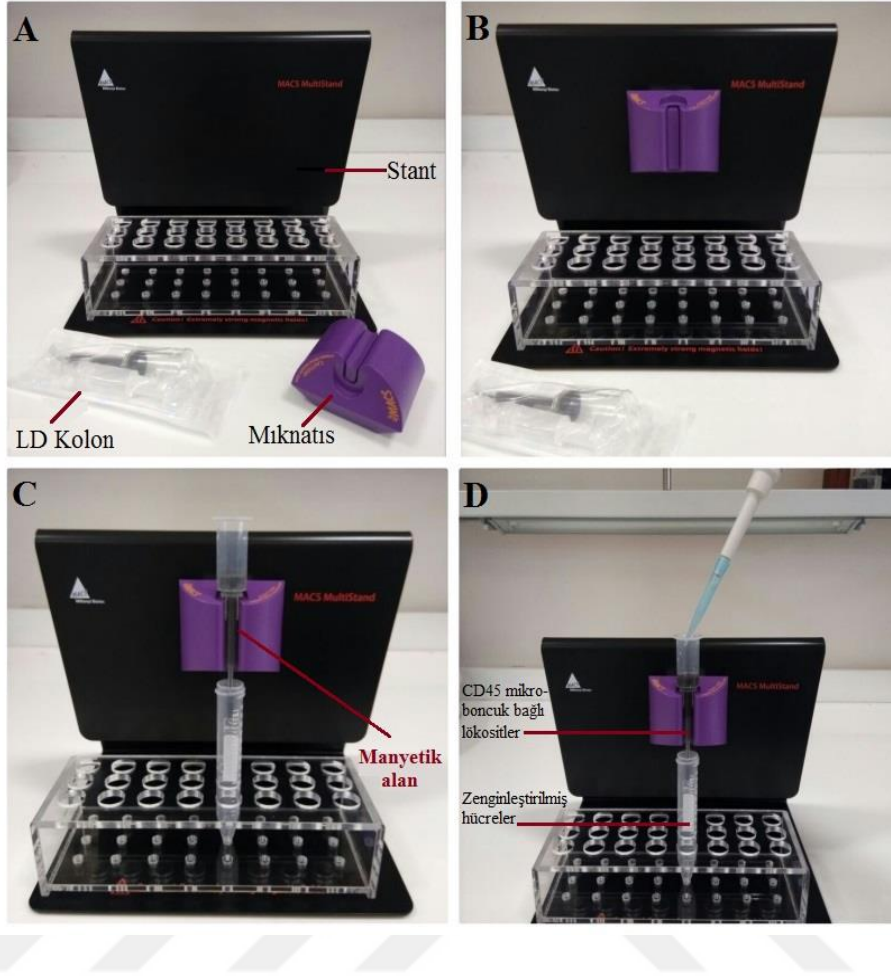
Kan örneklerinde lökosit hücrelerinin oranının fazla olması nedeniyle CTC tespitinde ilk olarak lökositlerin uzaklaştırılması gerekmektedir (74, 75). Çalışmamızda, lökositlerin PBMC'lerden uzaklaştırılması için bir immunomanyetik ayırma yöntemi olan MACs sistemi kullanılmıştır. MACs sistemi ile CD45 hedefli

negatif seçim gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde manyetik olarak hedeflenen CD45(+) hücreler MACs sisteminden geçirilirken kolonda tutunmakta ve diğer hücreler kolondan akarak toplanmaktadır. Sonuç olarak, toplanan bu hücre süspansiyonu CD45(-) hücrelerden oluşmaktadır. Böylelikle CTC'ler zenginleştirilmektedir. (168, 169).

Çalışmamızda, negatif seçimde hücre sayısı bilinen süspansiyon ilk olarak 20°C 300 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pellet kırılarak 10⁷ hücreye karşılık 80 µL taze hazırlanan MACs tampon çözeltisi ve 10⁷ hücreye karşılık 20 µL CD45 mikro-boncuk eklenerek 4-8°C'de 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. (166).

İnkübasyon sonrası, örnek üzerine 10⁷ hücreye karşılık 1 mL MACs tampon çözeltisi eklenmiş ve 4°C 300 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pellet kırılarak 1.25x10⁸ hücreye karşılık 500 µL MACs tampon çözeltisi eklenerek örnek MACs sistemi için hazır hale getirilmiştir (166).

Lökosit ayrımı için LD kolon kullanılmış ve MACs standına yerleştirilen kolon 2 mL MACs tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Sonrasında, bu kolondan örnek geçirilmiş ve akan hücreler yeni bir falkon tüpünde toplanmıştır. Sonrasında kolon 2 kez 1 mL MACs tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. (Şekil 3.2). Sonuçta, lökositlerinden ayrılmış CTC'lerin de dahil olduğu mononükleer hücreler elde edilmiş ve bu süspansiyonun thoma lamı yardımı ile hücre sayısı hesaplanmıştır. (167).



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan MACs sistemi.

A. MACs başlangıç kiti B. Mıknatıs standa yerleştirilmesi. C. LD kolonun miktarına yerleştirilerek manyetik alanın oluşturulması. D. MACs sistemi ile lökositlerin immunomanyetik ayrımı.

3.2.3. CTC Saptama Basamağı

CTC sayısının tespit edilebilmesi için zenginleştirme basamağından sonra CTC saptama basamağı gerçekleştirilmektedir (16). CTC Saptama basamağında sıkça kullanılan sitometrik yöntemler, nadir hücrelerin antikorlar yardımı ile yakalanması esasına dayanmaktadır (96). Bu doğrultuda spesifik antijenlere karşı monoklonal antikorların kullanımı ile CTC'ler tespit edilmektedir (96).

Çalışmamızda, birden fazla antikorun kullanımına olanak sağlayan işaretli hücrelerin floresan temelli sayımını gerçekleştiren FC cihazı tercih edilmiştir. Bu amaç ile MACs sonrası elde edilen hücre süspansiyonunda, FC cihazı (BD

FACSAria™ III Cell Sorter) ile immunfenotipleme yapılmıştır (Şekil 3.3). Bu basamakta tümör hücrelerinin yüzeylerinde eksprese olan antijen moleküllerine karşı florokrom bağlı spesifik antikorlar kullanılmıştır. Florokromların ışığı absorbe ederek farklı dalga boylarında ışın saçmaları sayesinde antijenler algılanmış ve CTC'ler tespit edilmiştir. CTC tespiti için kullanılan primer antikorlar ve konjuge florokromları tablo 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan FC cihazı (BD FACSAria™ III Cell Sorter).

Çalışmada MACs ayrımı sonrası elde ettiğimiz hücre süspansiyonu üç ayrı tüpe aktararak FC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu tüpler; kontrol, deney ve izotip kontrol tüpleri olarak oluşturulmuştur. Negatif kontrol kullanmanın amacı hücrelerde otofloresan ya da özgün olmayan bağlanmadan kaynaklanan zemin boyanmasının tespit edilebilmesidir (170). Bu amaçla en çok tercih edilen reaktif; incelenecek antikor ile aynı Ig alt tipine sahip olan fare kaynaklı antikorlardır (izotip kontrol) (170). Ayrıca çalışmamızda doğru kapılamaların alınabilmesi adına aynı örneği içeren kontrol tüpleri de oluşturularak deney tüpü öncesi bu tüpler FC cihazında okunmuştur (166).

Kontrol Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Kontrol tüpüne aktarılan hücre süspansiyonu üzerine 100 µL CellWASH solüsyonu eklenerek 4°C 350 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan pellet kırılarak 500 µL Cytofix fiksasyon tampon çözeltisi eklenmiş ve 4-8°C'de karanlıkta gece boyu inkübe edilmiştir (166).

İnkübasyon sonrasında, 4°C 350 g'de 5 dakika santrifüj edilen kontrol tüpünün süpernatantı atılarak pelleti kırılmıştır. Pellet üzerine 500 µL FC boyama tamponu eklenmiş ve bu tüp FC cihazında okunma aşamasına kadar 4-8°C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (166).

Deney Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Deney tüpüne aktarılan hücre süspansiyonu 4°C 350 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 100 µL CellWASH solüsyonu içerisinde 10^6 hücre olacak şekilde orantılanarak pellet üzerine CellWASH solüsyonu eklenmiştir. Sonrasında, hücre yüzey antikorları olan Anti-CD45 ve Anti-EpCAM antikorları eklenmiş ve 4-8°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir (166).

İnkübasyon sonrasında deney tüpüne 2 mL FC boyama tamponu eklenmiş ve 4°C 350 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 500 µL Cytofix fiksasyon tampon çözeltisi eklenmiş ve 4-8°C'de karanlıkta gece boyu inkübe edilmiştir (166).

Ertesi gün 4°C 350 g'de 5 dakika santrifüj edilen deney tüpünde süpernatant atılarak pellet kırılmıştır. Pellet üzerine 1X olarak dilüe edilen Perm/Wash tampon çözeltisinden 2 mL eklenerek 4°C 350 g'de 5 dakika santrifüj edilir ve bu işlem tekrarlanmıştır. Pellet üzerine 100 µL Phosflow Perm III tampon çözeltisi eklenmiş ve 4-8°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir (166).

İnkübasyon sonrasında deney tüpüne 2 mL Perm/Wash tampon çözeltisi eklenmiş ve 4°C 350 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 100 µL FC boyama tamponu eklenmiştir. Bu şekilde permablize olan hücrelerin işaretlenmesi için, hücre içi antikorları olan Anti-CK 14, 15, 16, 19 ve

Anti-CK (CK 7, 8) antikoları eklenerek 4-8⁰C’de 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (166).

İnkübasyon sonrasında 2 mL Perm/Wash tampon çözeltisi eklenmiş ve 4⁰C 350 g’de 5 dakika santrifüj edilen deney tüpünün süpernatantı atılarak pelleti kırılmıştır. Pellet üzerine 500 µL FC boyama tamponu eklenmiş ve deney tüpü FC analizi için hazır hale getirilmiştir (166).

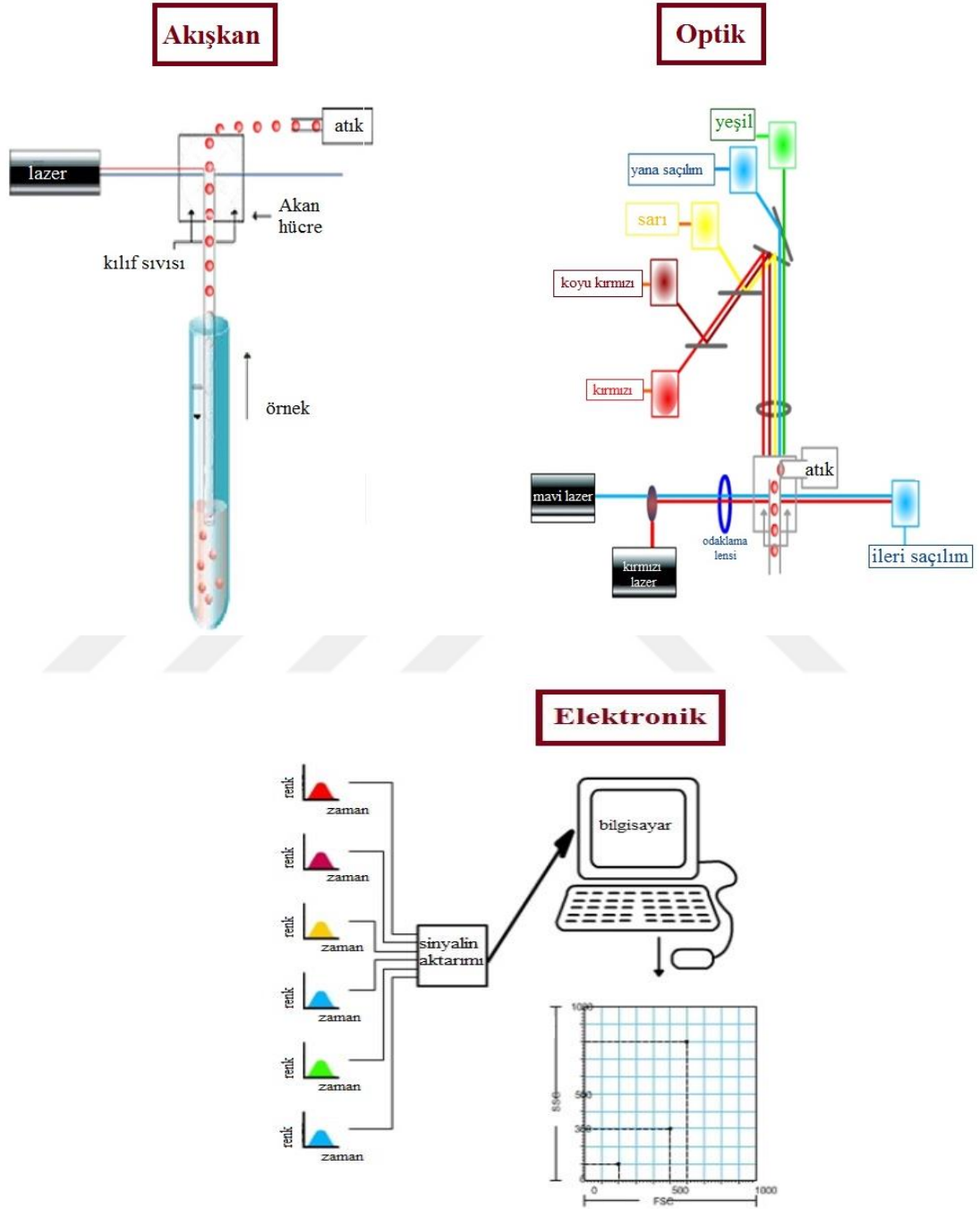
İzotip Kontrol Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Deney tüpü örneğinin hazırlanması için kullanılan protokol aynı şekilde izotip kontrol tüpü örneğinde uygulanmıştır. Ancak deney tüpünde kullanılan hücre yüzey ve hücre içi antikolarının yerine bu tüpte izotip kontrol antikoları ile çalışılmıştır (Tablo 3.2) (166).

Hazırlanan Örneklerin FC Cihazında Okunması: CTC’lerin tespiti için önce kontrol tüpü ve izotip kontrol tüpü, ardından deney tüpü okunmuştur. Kontrol tüpü ve izotip kontrol tüpü kullanılarak FC cihazında gerçekleştirilen kapılama işlemleri doğru bir şekilde uygulanmıştır. FC cihazında CTC tespitinde sırası ile Anti-CK 14, 15, 16, 19, Anti-CK (CK 7, 8), Anti-EpCAM ve Anti-CD45 kapılamaları yapılmıştır. CK 14, 15, 16, 19 pozitif, CK 7, 8 pozitif ve EpCAM pozitif, CD45 negatif hücreler CTC kabul edilerek sayımı gerçekleştirilmiştir (166).

3.3. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi (flow cytometry (FC)), floresan yoğunluğuna dayalı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin esas olarak büyüklüğüne ve granülaritesine göre tek hücre düzeyinde ölçüm yapan bir sistemdir (171). Bu cihazın temel prensibi, süspansiyon halinde bulunan hücre ya da partiküllerin lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölmeden geçerken hücrelerin belirli özellikleri doğrultusunda meydana gelen sinyallerin algılanmasıdır (172). Bu sinyallerin kaynağı hücrelerin büyüklüğü (0,2-150µm), granülaritesi gibi fiziksel özellikleri ya da hücrelere bağlanan çeşitli florokromlar olabilmektedir (172).

FC cihazında; hidrolik, optik ve elektronik olmak üzere üç temel sistem bulunmaktadır (Şekil 3.4) (171, 173).



Şekil 3.4. FC cihazının ana sistemleri (173).

Hidrolik sistem, akış sistemi olarak da tanımlanmaktadır. Taşıyıcı sistem olarak görev yapan bu sistemde, partiküllerin lazer önünden tek tek geçişi sağlanmaktadır (171).

Optik sistem, lazer önünden akan hücrelerden açığa çıkan floresan saçılımının çarpaz ve silindirik filtreler ile toplanarak fotodedektöre aktarılmasında görev almaktadır (171).

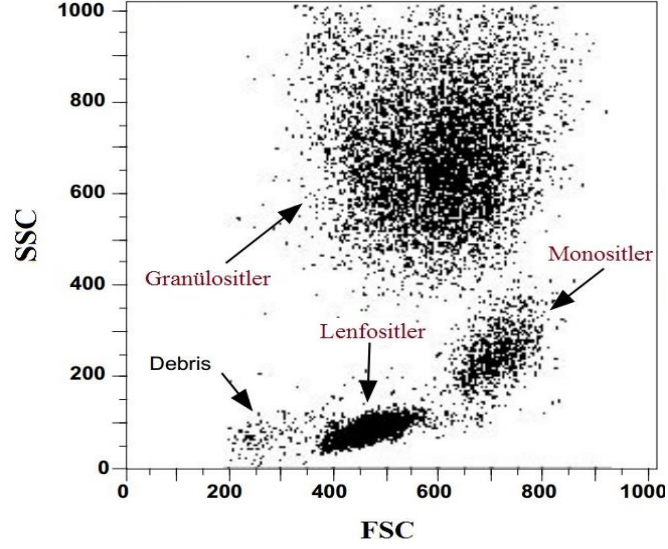
Elektronik sistem ise elde edilen optik sinyalin photo multiplier tubes (PMT) ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur (171).

Akış sistem bir merkezi kanaldan oluşur ve örnek buradan cihaza verilir. Merkezdeki örneği içeren sıvı (laminar akıntı) ve çevreleyen sıvı (sheath fluid) birbirine karışmadan ilerlemektedir. Bu etkiyle partiküller tek bir sıra şeklinde dizilirler ve bu hidrodinamik odaklanma olarak isimlendirilir. Böylece lazer ışını aynı anda tek hücreye düşer ve tek hücrenin analiz yapılır (171).

Işın öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ile aynı yönde 20° etrafa yayılan ışınlar ileri saçma grafiği (forward scatter chanel (FSC)) denilen bir lens yardımıyla toplanırlar. FSC detektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. Eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışının ölçülmesi ise yana saçılma grafiği (side scatter chanel (SSC)) olarak adlandırılır. SSC partiküllerin granüler içerikleri ve iç yapısı hakkında bilgi verir (171).

Temel olarak bir FC cihazı kullanılarak partiküllerin FSC ile büyüklüğü, SSC ile granülaritesi ve floresan grafiği (belli dalga boyuna özgü sinyal eldesi) ile floresans miktarı hakkında bilgiler elde edilmektedir (171). Bu bilgilerin elde edilebilmesi için cihaz içerisinde FS, SS ve floresan (FL-1 FL-2 FL-3 FL-4 vs) dedektörleri bulunmaktadır (172). FS/SS histogramı, hücre süspansiyonu içerisindeki hücre büyüklüğü ve hücre yoğunluğuna dayalı analiz yapmaktadır. Örneğin, periferik kanda lenfosit, monosit ve granülositler farklı büyüklük ve yoğunluğa sahiptir. Bu

nedenle lize edilmiş periferik kan örneğinin FS/SS histogramında bu hücreler farklı bölgelerde dağılım göstermektedirler (Şekil 3.5) (174).



Şekil 3.5. Lize edilmiş periferik kan örneğinin FS/SS histogramı (174).

Floresan grafiğinin oluşturulabilmesi için ise florokrom olarak adlandırılan renk maddeleri bağlı antikörlerin ilgilenilen antijeni hedeflemesi ile mümkün olmaktadır (175). Aynı dalga boyunda ışığı farklı şekilde absorbe eden florokromlar, farklı dalga boylarında ışık saçılımı göstermektedirler (175). Farklı florokrom boyalar kullanılarak istenilen antijenin belirlenmesinde direkt veya indirekt işaretleme tercih edilebilir. Direkt işaretleme, FITC, PE gibi işaretli antikörler seçilerek hücreler işaretlenerek FC cihazında analiz edilir. İndirekt işaretlemede ise, primer ve sekonder olmak üzere iki antikor kullanır. Primer antikor aranılan epitopa, sekonder antikor ise primer antikordaki epitopa spesifiktir (175).

Süspansiyon hücre popülasyonları büyüklük ve granularite özelliklerine göre ayrıldıktan sonra bu farklı hücre popülasyonları içinden bilgi edinilmek istenen hücre/hücre gruplarının grafik bir çerçeve ile belirlenmesi işlemine gatig (kapılama) işlemi denilmektedir. Bu işlemden sonra, sistem verilen komutlara uygun olarak sadece kapı içerisindeki hücreler hakkında bilgi vermektedir (172).

Veri analizi kapılanan hücrelerin floresan yoğunluklarının önce optik sinyale daha sonra PMTs ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevrilerek bilgisayara kaydedilmesi ve bu kayıtlı veriler üzerinde ölçümlerin yapılması işlemidir (172).

FC cihazı kullanılarak hücre süspansiyonları, organeller ya da benzer ölçüdeki partiküllerin immunfenotipi, DNA miktarı, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri kantitatif olarak araştırılabilmektedir (172, 176).

FC cihazı ileri analizlerin gerçekleştirilmesine olanak sağlayarak hücreleri fiziksel özelliklerine göre ayırabilen son derece hızlı bir tekniktir. Bu cihaz ile çok kısa bir sürede binlerce hücreyi analiz edilerek detaylı sonuç raporları elde edilebilmektedir. Ayrıca heterojen bir örnek popülasyonunda, hücrelerin ve bileşenlerinin çok parametrelili kantitatif özellikleri incelenebilmektedir (171).

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmada; yaş ve CTC sayılarının dağılımı Shapiro-wilk testi ile incelenmiştir. Yaş, normal dağılım gösterdiği için ortalama \pm standart sapma ile; CTC sayıları ortanca (min-maks: minimum-maksimum) değeri ile ve cinsiyet gibi kategorik değişkenler sayı (%) ile ifade edilmiştir.

Bireylerin CTC sayılarının hastalık durumuna ve hastalar içinde kanser türü-evreye göre karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Evresi 3A ve 3B olan hastalar, örneklem sayısına bağlı olarak birleştirilmiş ve üçüncü evre hastaları olarak ele alınmıştır. Analiz sonucunda test istatistiği ve p değeri verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Özellikleri

Akciğer kanseri teşhisi konmuş, evrelendirilmesi ile tür tespiti yapılmış ve hiç tedavi almamış 9 birey deney grubu olarak; hiçbir kanser şüphesi taşımayan 9 sağlıklı birey ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı bireylerin kan örneklerinde CTC tespiti gerçekleştirilmiştir.

Cinsiyet farkı gözetmeksizin çalışmaya dahil edilen akciğer kanserli hastalar ile sağlıklı bireylerin yaş ortalamaları sırasıyla 63.78 ± 8.01 ve 61.67 ± 11.38 olarak hesaplanmıştır. Genel yaş ortalaması ise 62.72 ± 9.61 'dir. Hasta ve kontrol grubunda birer kadın bulunmaktadır.

Akciğer kanseri bireyelerinin 2'si (%22.2) Evre 3A, 2'si (%22.2) Evre 3B ve geri kalanları Evre 4 olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1). Evre 3A hastalarının TNM sınıflaması; T2N2M0 ve T4N0M0'dır. Evre 3B hastalarının TNM sınıflaması; T4N3M0'dır. Evre 4 hastalarının TNM sınıflamaları ise; TxNxM1 olarak tanımlanmıştır. Hastaların %22.2'sinde (n= 2) KHAK teşhisi konulmuş iken, %77.8'i (n= 7) KHDAK'dir. KHDAK olgularının ise %71.4'ü (n= 5) adenokarsinom, %28.6'sı (n= 2) skuamöz hücreli karsinom türündedir. Ayrıca metastaz gözlenen 5 hastanın 3'ünde (%60.0) metastaz bölgesi beyindir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hastalıkla ilgili özellikler.

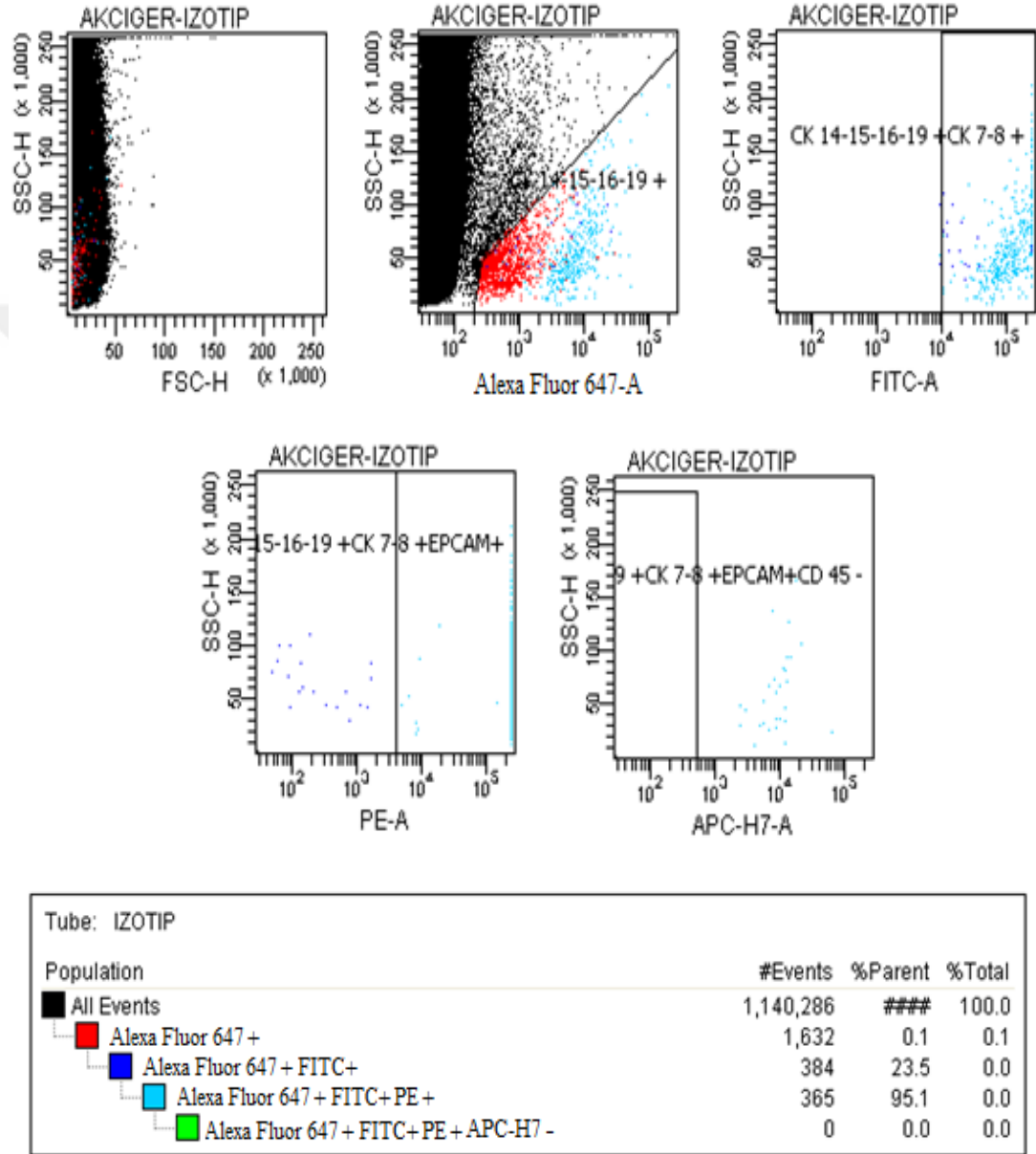
Özellikler	Birey sayıları ve yüzde dağılımları
Evre	
3A	2 (%22.2)
3B	2 (%22.2)
4	5 (%55.6)
Histolojik Türü	
KHAK	2 (%22.2)
KHDAK	7 (%77.8)
KHDAK Alt Tipleri	
Adenokarsinom	5 (%71.4)
Skvamöz hücreli karsinom	2 (%28.6)
Metastaz Bölgesi	
Beyin	3 (%60.0)
Kemik	2 (%40.0)

4.2. CTC Sayılarına İlişkin Bulgular

Çalışmada toplanan kan örneklerinde ilk olarak fikol gradiyent santrifüj ve immunomanyetik ayırma yöntemi olan CD45 negatif seçilim yöntemleri kullanılarak CTC zenginleştirme basamağı gerçekleştirilmiştir. Ardından FC cihazı ile CTC saptama basamağı uygulanmıştır. Sonuç olarak FC cihazında CK 14, 15, 16, 19 ile CK 7, 8 ve EpCAM pozitif ile CD 45 negatif hücreler CTC olarak kabul edilerek sayımı gerçekleştirilmiştir.

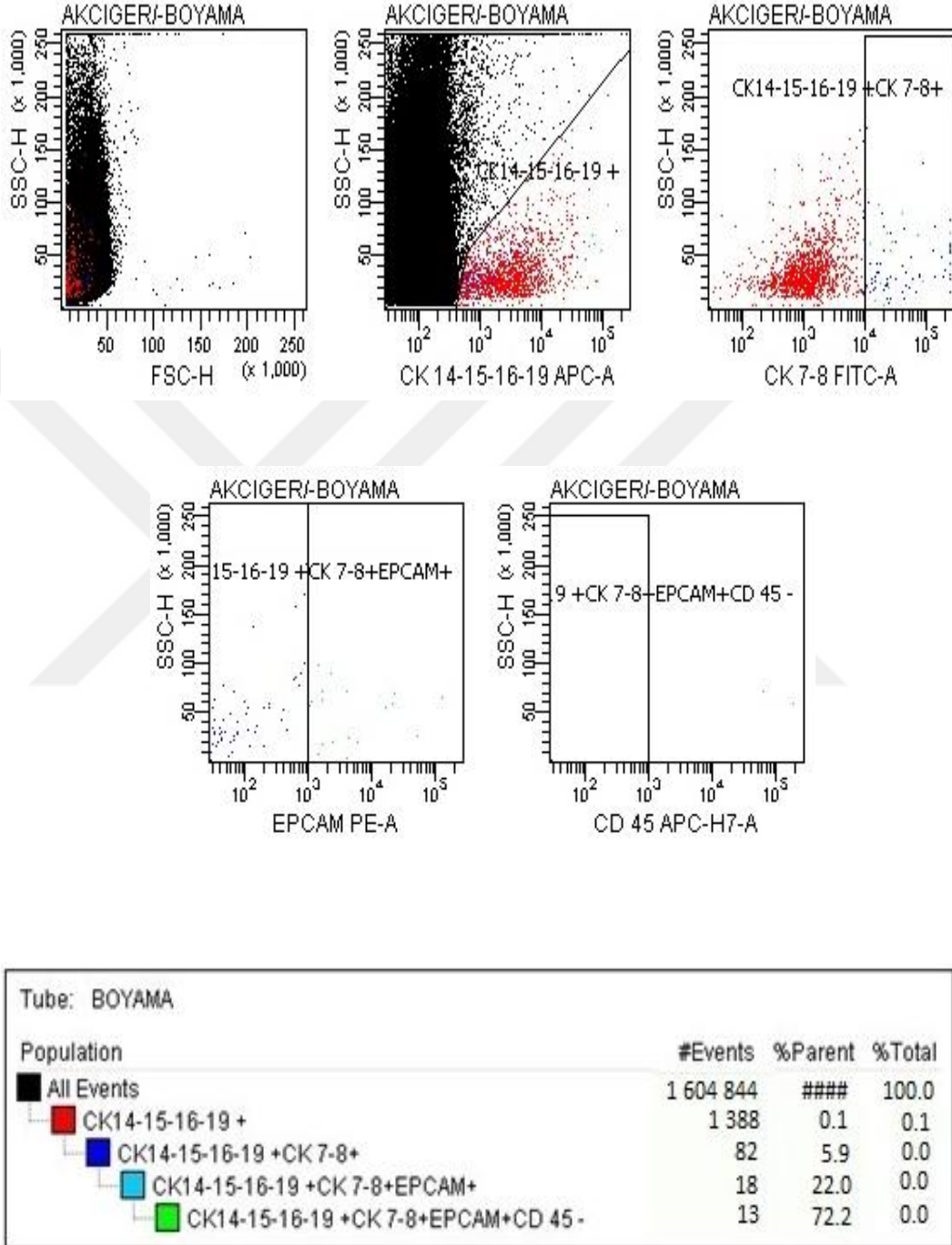
Çalışmada hasta grubu H1'den H9'a kadar, kontrol grubu ise K1'den K9'a kadar numaralandırılarak adlandırılmıştır.

Çalışmamızda öncelikli olarak izotip tüpü analiz edilmiştir. Oluşturulan izotip tüpünün FC analizi sonucunda hücrelerde özgün olmayan bağlanmadan kaynaklanan zemin boyanmasının tespit edilerek deney tüplerinin analizlerinde bu bilgiler göz önüne alınmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İzotip tüpünün FC analizi.

H1 KHAK hastasının TNM evresi, TxNxM1 olarak tanımlanmış olup hasta Evre 4 olarak evrelendirilmiştir. Ayrıca kemik metastazı görülen hastanın CTC sayısı 13'tür ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. H1 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H2 KHDAK hastasının alt türü adenokarsinom olarak belirlenmiştir. Hastanın evresi, TxNxM1 şeklinde tanımlanmıştır ve evresi Evre 4'tür. Ayrıca kemik metastazı görülen hastanın CTC sayısı 6 olup Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,287,504	###	100.0
CK 14-15-16-19 +	1,674	0.1	0.1
CK 14-15-16-19 +CK 7-8 +	53	3.2	0.0
CK 14-15-16-19 +CK 7-8 +EPCAM+	29	54.7	0.0
CK 14-15-16-19 +CK 7-8 +EPCAM+CD 45-	6	20.7	0.0

Şekil 4.3. H2 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H3 KHDAK hastasının alt türü adenokarsinom olarak belirlenmiştir. Hastanın evresi, T2N2M0 şeklinde tanımlanmıştır ve evresi Evre 3A'dır. Hastanın CTC sayısı 4 olup Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	250 570	###	100.0
CK14-15-16-19 +	11 830	4.7	4.7
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	3 487	29.5	1.4
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	2 067	59.3	0.8
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	4	0.2	0.0

Şekil 4.4. H3 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H4 KHDAK hastasının alt türü adenokarsinom olarak belirlenmiştir. Hastanın evresi, TxNxM1 şeklinde tanımlanmıştır ve evresi Evre 4'tür. Ayrıca beyin metastazı görülen hastanın CTC sayısı 15 olup Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3 152 170	###	100.0
CK14-15-16-19 +	11 784	0.4	0.4
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	1 881	16.0	0.1
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	241	12.8	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	15	6.2	0.0

Şekil 4.5. H4 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H5 KHDAK hastasının alt türü skuamöz hücreli karsinom olarak belirlenmiştir. Hastanın evresi, T4N0M0 şeklinde tanımlanmıştır ve evresi Evre 3A'dır. Hastanın CTC sayısı 10 olup Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	4 342 889	###	100.0
CK14-15-16-19 +	16 382	0.4	0.4
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	239	1.5	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	117	49.0	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	10	8.5	0.0

Şekil 4.6. H5 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H6 KHAK hastasının TNM evresi, TxNxM1 olarak tanımlanmış olup hasta Evre 4 olarak evrelendirilmiştir. Ayrıca beyin metastazı görülen hastanın CTC sayısı 9'dur ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1 400 630	###	100.0
CK14-15-16-19 +	496	0.0	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	147	29.6	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	135	91.8	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	9	6.7	0.0

Şekil 4.7. H6 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H7 KHDAK hastasının alt türü adenokarsinom olarak belirlenmiştir. Hastanın evresi, TxNxM1 şeklinde tanımlanmıştır ve evresi Evre 4'tür. Ayrıca beyin metastazı görülen hastanın CTC sayısı 8 olup Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	2 069 518	####	100.0
CK14-15-16-19 +	161 009	7.8	7.8
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	134	0.1	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	111	82.8	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	8	7.2	0.0

Şekil 4.8. H7 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H8 KHDAK hastasının alt türü skuamöz hücreli karsinom olarak belirlenmiştir. Hastanın T4N3M0 olarak tanımlanmış olup hasta Evre 3B olarak evrelendirilmiştir. Hastanın CTC sayısı 5'tir ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	735 465	####	100.0
CK14-15-16-19 +	13 105	1.8	1.8
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	3 543	27.0	0.5
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	2 023	57.1	0.3
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	5	0.2	0.0

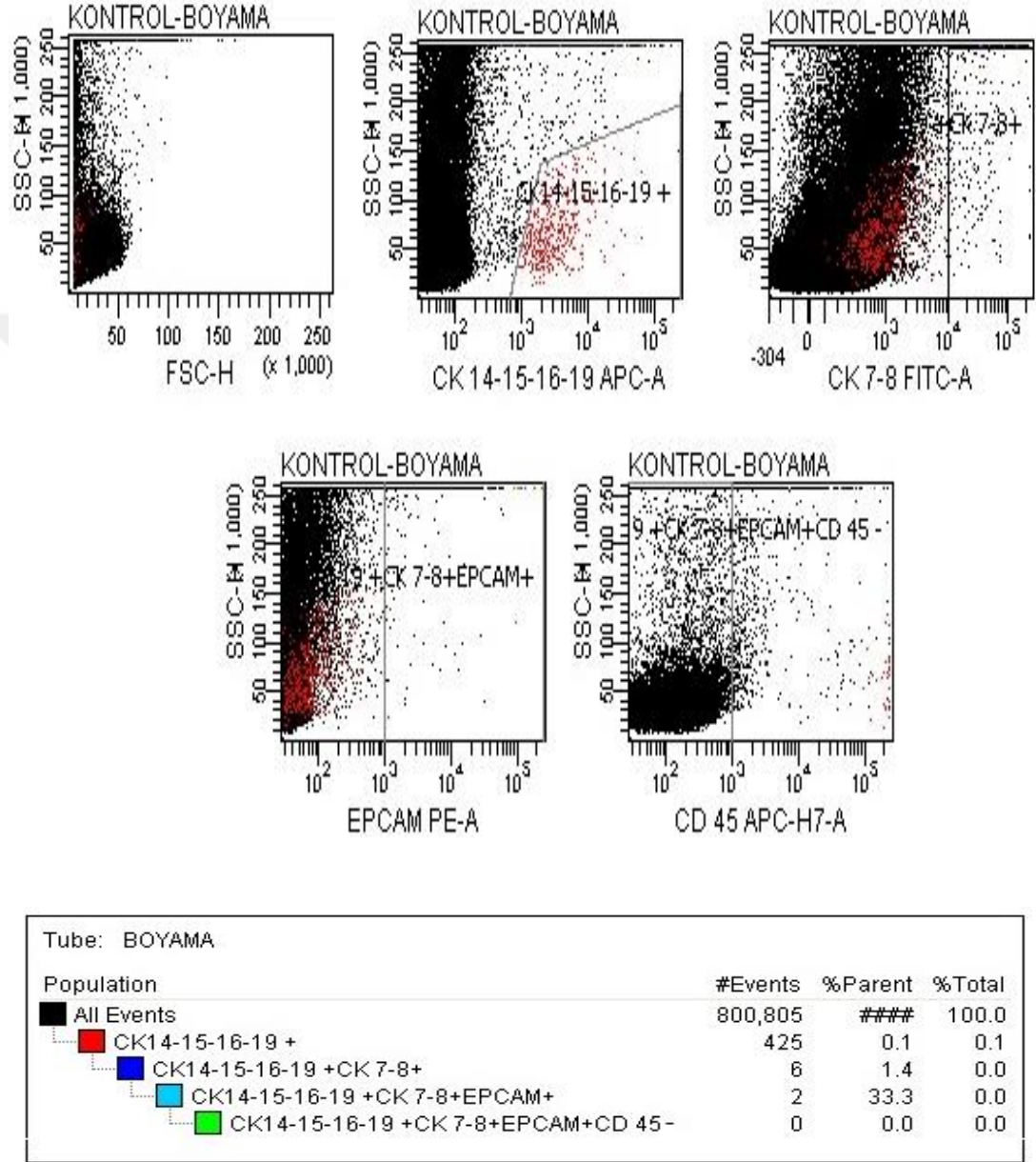
Şekil 4.9. H8 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

H9 KHDAK hastasının alt türü adenokarsinom olarak belirlenmiştir. Hastanın T4N3M0 olarak tanımlanmış olup hasta Evre 3B olarak evrelendirilmiştir. Hastanın CTC sayısı 5'tir ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3 449 317	####	100.0
CK14-15-16-19 +	34 746	1.0	0.1
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	27	0.1	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	10	37.0	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	5	50.0	0.0

Şekil 4.10. H9 hastasında CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Akciğer kanseri hastalarında CTC tespit edilmesine rağmen sağlıklı bireylerde CTC tespit edilmemiştir. Kontrol grubunda yer alan sağlıklı bireylerin tümünde beklendiği gibi CTC sayısı 0 bulunmuştur ve bu bireylerin FC analizleri Şekil 4.11-Şekil 4.19’da gösterilmiştir.



Şekil 4.11. K1 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	386 525	####	100.0
CK14-15-16-19 +	664	0.2	0.1
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	2	0.3	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	2	100.0	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.12. K2 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	344 446	####	100.0
CK14-15-16-19 +	443	0.1	0.1
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	14	92.9	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	13	0.0	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.13. K3 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	312 373	####	100.0
CK14-15-16-19 +	95 558	30.6	30.6
CK14-15-16-19 +CK 7-8+	24	0.0	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	24	0.0	0.0
CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.14. K4 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	301 546	####	100.0
■ CK14-15-16-19 +	54	0.0	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+	3	5.6	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	0	0.0	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.15. K5 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	62 815	####	100.0
■ CK14-15-16-19 +	728	1.2	1.2
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+	47	6.5	0.1
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	35	74.5	0.1
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.16. K6 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	10 332	####	100.0
■ CK14-15-16-19 +	175	1.7	1.7
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+	2	1.1	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	1	50.0	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.17. K7 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	226 125	###	100.0
■ CK14-15-16-19 +	1 389	0.6	0.6
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+	17	1.2	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	2	11.8	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	0	0.0	0.0

Şekil 4.18. K8 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	24 574	###	100.0
■ CK14-15-16-19 +	86	0.3	0.3
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+	2	2.3	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+	2	100.0	0.0
■ CK14-15-16-19 +CK 7-8+EPCAM+CD 45-	0	0.0	0.0

Şekil 4.19. K9 bireyinde CTC tespiti için oluşturulan deney tüpünün FC analizi.

Sonuç olarak, çalışmada hasta grubunda tespit edilen CTC sayısı ortancası 8.0 (min-maks: 4.0-15.0) şeklinde hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Kontrol grubunda ise CTC'ye rastlanmamıştır. Hasta grubunun CTC sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu istatistiksel analizler sonucunda belirlenmiştir ($Z=3.823$; $p<0.001$). Ancak hastalar içinde kanser türü ve evreye göre CTC sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.2. CTC sayılarının hasta ve kontrol grubunda dağılımı.

Grup değişkeni	CTC Sayısı ¹	Test istatistiği	p
Grup		3,823	<0,001
Hasta	8,0 (4,0-15,0)		
Kontrol	0,0 (0,0-0,0)		
Histolojik Türü		1,176	0,333
KHAK	11,0 (9,0-13,0)		
KHDAK	6,0 (4,0-15,0)		
Evre		1,722	0,111
Evre 3	5,0 (4,0-10,0)		
Evre 4	9,0 (6,0-15,0)		

¹ ortanca (min-maks)

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri ilk beş kanser türü dağılımında erkeklerde ilk sırada, kadınlarda ise dördüncü sırada yer almakta ve önemli bir sağlık problemi olarak tüm kanser türleri arasında kanser ölüm nedenlerinin birincil sebebi olmaktadır (3, 134).

Akciğer kanserinin teşhisi genellikle ileri evrelerde mümkün olmaktadır. Bu nedenle sağlıklıları diğer kanserlere göre oldukça düşüktür (9). Özellikle erken teşhis edilememesi ve etkili tedavi yöntemlerinin eksikliği, akciğer kanserinin ölüm oranını arttırmaktadır (165). Akciğer kanserli hastaların, tanıdan itibaren beş yıllık mortalitesinin %85-90 arasında olduğu ve %52'sinin uzak metastaz yaptığı bildirilmiştir (3, 10).

Birçok kanser hastasının hayatını yitirmesinden sorumlu olan metastaz, kanser ilerleyişinde önemli karakteristik bir özelliktir (11, 56). Bütün kanser türlerinde metastazların saptanması son derece zordur, çünkü tüm organların tutulumunu ayrıntılı olarak araştırmak mümkün değildir (59). Ayrıca tekrarlayan metastatik biyopsilerin invaziv ve ağrılı olması, bunların klinikte kullanımını sınırlamaktadır (72, 177, 178). Metastatik yayılım sırasında dolaşıma karışan CTC'ler, bu problem için oldukça umut veren çözümler sağlamaktadır. Çünkü CTC'ler, tekrarlanılabilir, basit ve non-invaziv bir şekilde damardan kan alınması ile analiz edilebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı "sıvı biyopsi" olarak adlandırılan CTC tespitinin, kanserli hastalarda erken tanı, tedavilerin eş zamanlı izlenmesi, nüks ve prognoz tahmini gibi durumlarda da yararlı olabileceği belirtilmektedir (72, 178). Teknik yaklaşımlardaki gelişmeler ile sıvı biyopsi CTC tespitinin değeri, özellikle akciğer kanseri gibi dokularına ulaşılması zor olan tümörlerde kullanışlı olmaktadır (179, 180).

CTC'nin klinik kullanımını hakkında yapılan çalışmalarda çoğunlukla CTC sayımı üzerine yoğunlaşmıştır (16). Genellikle bu sayım süreci zenginleştirme ve saptama gibi iki önemli basamağı içermektedir (16). Bu basamaklarda çok çeşitli yöntemler ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır (22).

Çalışmamızda, CTC zenginleştirme basamağı iki ayrı yöntemin kombinasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bunlar; yoğunluk tabanlı ficol gradiyent santrifüj ve immunomanyetik ayırma (CD45 negatif seçim) yöntemleridir. Sonraki basamak olan saptama basamağında ise FC cihazı ile CTC sayımı yapılmıştır. Çalışmamızın amacı, bu tekniğin CTC tespiti açısından akciğer kanserli hastalarda uygulanabilirliğini ve spesifikliğini incelemektir.

İlk olarak ficol gradiyent santrifüj yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, hücreler arasındaki yoğunluk farkı ile tabakalı olarak ayırım gerçekleştirerek, eritrositler ve granülositlerin çöktürülüp CTC'leri de içeren PMBC tabakasının ayırımını sağlamaktadır (100, 101). PBMC'ler elde edildikten sonra, CTC zenginleştirme basamağında, negatif seçim ile lökositlerin immunomanyetik ayırımı için MACs sistemi kullanılmıştır. Negatif seçim yöntemini tercih etmemizin nedeni, CTC'lerin kan örneklerinde lökositlere kıyasla daha nadir bulunmalarıdır (10^5 - 10^8 lökosit başına ~1 CTC) (22, 181). Ayrıca, Liu ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları CTC metot çalışmasında da tercihimizi destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, EpCAM, ve CK'ları pozitif olduğu bilinen hücre hattında üç farklı zenginleştirme yöntemi (CD45 negatif seçim, EpCAM pozitif seçim ve bu ikisinin kombinasyonu) CTC tespiti için uygulanmış ve bu yöntemlerin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, CD45 negatif seçim yönteminin tek başına uygulanması ile en yüksek verimle zenginleştirme sağlandığı vurgulanmıştır (182).

Zenginleştirme basamağı sonrasında uygulanan saptama basamağında çok çeşitli yöntemler tercih edilmesine rağmen söz konusu çalışmamızda monoklonal antikoların kullanımı ile FC cihazında CTC'ler tespit edilmiştir. Monoklonal antikolar, tümör hücrelerini etiketleyerek floresan olarak bu hücrelerin görüntülenmelerini sağlamaktadır (114). Çalışmamızda FC analizi için tercih ettiğimiz antikolar; CD45, CK 14, 15, 16, 19, EpCAM ve CK 7, 8 antikolarıdır.

EpCAM antikorumun kullanımının amacı, akciğer kanseri de dahil çeşitli kanserlerde aşırı ekspresyonunun gözlenmesi ve CTC'lerin teşhisinde genellikle kullanılan ideal antijen olmasıdır (86, 183, 184). Çalışmamızda EpCAM antikorumuna ek olarak CTC tespitinde CK'lar da tercih edilen belirteçlerdir. Çünkü, benign

hücrelerdeki CK profilinin karsinogenez esnasında değiştiği ve yeni CK'ların sentezlenmeye başlandığı ya da mevcut CK'ların daha yoğun olarak eksprese edildiği görülmektedir (117). Bu durum gelişen neoplazinin tipine ve malignite derecesine bağlı olarak değişmektedir (117). CK 7 ve CK 8'lerin, CK 18 ekspresyonu ile ilişkili olduğu ve CK 19 ile birlikte karsinomlarda aşırı ekspresyonlarının gözlendiği yapılan çalışmalar ile vurgulanmıştır (185). Çalışmamızda, çoklu belirteç kullanarak gerçekleştirdiğimiz CTC tespit yönteminin, sağlıklı bireylerdeki yanlış pozitifliği ortadan kaldırdığı görülmektedir.

CTC sayımında uygulanan birçok farklı teknik olmasına rağmen, genellikle çalışmalarda hem zenginleştirme hem de saptama basamaklarını kendi içinde gerçekleştiren bir teknik olan CellSearch sistemi tercih edilmektedir (186). CellSearch sistemi, periferik kandan CTC tespitinde FDA tarafından onaylanmış tek tekniktir. Bu sistemin; meme (126), kolorektal (127) ve prostat (128) kanserlerinde tedavi etkinliği ve prognozu belirlemede onaylanmış eşik değerleri bulunmaktadır. Ancak, CellSearch sistemi akciğer kanserinde henüz onaylanmamıştır ve kabul görmüş bir eşik değeri bulunmamaktadır. Bunlara rağmen, akciğer kanserinde CTC'nin rolü hakkında CellSearch sistemi ile birçok çalışma yapılmış ve önemli veriler rapor edilmiştir (131).

Cellsearch sistemi ile akciğer kanserli hastalarda yapılan ilk çalışma, 2009 yılında Bevilacqua ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada KHAK hastalarının dörtte üçünde CTC tespit edilmiş ve CTC'lerin KHAK teşhisinde yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (187). Tanaka ve ark. tarafından yapılan bir diğer CellSearch çalışmasında ise akciğer kanserli hastaların %30.6'sında CTC tespit edilmesinin yanında benign hastaların da %12'sinde CTC tespit edilmiştir (188). KHDAK hastalarında CellSearch sistemi ile CTC tespitinin prognostik önemini araştırmak amacıyla yapılan ilk çalışma olan Krebs ve arkadaşlarının çalışmasında ise, metastatik evre (evre IV) KHDAK hastalarında bu sistem ile CTC tespitinin mümkün olduğu ve bu doğrultuda prognostik belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (189).

CellSearch sisteminde CTC'ler; EpCAM tabanlı olarak zenginleştirilerek DAPI ile nükleer boyanıp, CK pozitif ve CD45 negatif olarak tespit edilmektedir

(131) Ancak Cellsearch sisteminde EpCAM tabanlı pozitif seçim gerçekleştirilmesi, bu yöntemin en büyük dezavantajı olarak görülmektedir (190, 191). Çünkü, CTC'ler EpCAM pozitif olmalarının yanında, EMT dönüşümü sonucunda değişikliğe uğrayarak EpCAM negatif olan alt tipler de içerebilmektedirler (191, 192).

Bu dezavantajından dolayı farklı yöntemlerin CTC tespitindeki uygunluğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. KHDAK hastaları ile yapılan bir çalışmada, iki farklı yöntem ile epitelyal tümör hücrelerinin tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada uygulanan filtrasyon ile boyut dayalı ayırım yöntemi (ISET) ve CellSearch sistemi kıyaslandığında, ISET yönteminin iki kat daha etkili CTC sayımı yaptığı sonucu elde edilmiştir (190). Ancak filtrasyon sistemi ile yapılan diğer çalışmalar sonucunda bu yöntemin spesifik ve hassas olmadığı sonucuna varılmıştır (96). Çünkü, aynı hastada dahi yakalanan tümör hücrelerinin boyutlarının geniş bir aralıkta değişiklik göstermesinden dolayı boyut tabanlı ayırım etkili olmamaktadır (95).

Heterojen özelliklerinden dolayı CTC'lerin kantitatif analizi avantaj sağlamaktadır. Bu doğrultuda floresan tabanlı olarak çalışan ve kantitatif sonuç veren FC cihazının CTC tespitinde kullanımı cazip alternatif bir yöntem olmaktadır. Ayrıca, FC cihazının güçlü bir teknoloji olduğu klinikte hematoloji ve onkolojiye de içine alan çok sayıda disiplinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (22, 193, 194).

Tüm bunlara ek olarak, FC cihazının bazı özellikleri CTC tespitinde de avantajlar sağlamaktadır (22). Bu özellikler;

1. Sadece belirteç ekspresyonunun varlığı ya da yokluğu değil aynı zamanda ölçülebilir ve miktarı belirlenebilir bir şekilde ekspresyon seviyelerini inceleme yeteneği,
2. Kolayca tek bir numune üzerinde sadece lazer ve floresan filtre seti kullanılabilirliği ile çoklu belirteç analizlerini gerçekleştirme yeteneği,
3. Diğer yaklaşımlar kullanılarak alt karakterizasyon yapabilme ve tespit edilen hücreleri tek tek elde etme kolaylığıdır (22).

Bu avantajları da göz önünde tutularak çalışmamızda CTC saptama basamağında FC cihazının kullanımı tercih edilmiştir. Bu sayede daha fazla belirteç

kullanılması ile CTC tespitinin spesifikliği arttırılarak yanlış pozitif ve negatif sonuçların en aza indirilmesi çalışmamızda amaçlanmıştır.

Literatürde akciğer kanserli hastaların CTC sayılarının belirlenmesinde FC cihazını kullanan çalışmalar bulunmaktadır. KHDAK hastalarının cerrahi yaklaşımlar sonucunda değişen CTC sayılarını kıyaslamak amacı ile yapılan bir çalışmada, FC cihazı ile CTC tespiti yapılmıştır. Bu alışmada EpCAM tabanlı immunomanyetik zenginleştirme yöntemi sonrasında bazı CK ve CD45 antikorumları ile FC cihazı kullanımı tercih edilmiştir (195). Bizim alışmamızda ise, özellikle negatif seçilimin daha avantajlı olması nedeniyle, CTC zenginleştirilmesi için negatif seçilim yöntemi tercih edilmiştir.

CTC'lerin CD45 negatif seçilim ile zenginleştirilerek FC cihazı ile analiz edildiği Liu ve arkadaşlarının çalışmasında ise toplam 84 kanser hastası ile çalışılmıştır. Bu hastalardan 3'ü KHDAK'dir ve uygulanan metot ile KHDAK hastalarının %100'ünde CTC tespit edilmiştir (182). Ayrıca 2015 yılında Yin ve ark. yaptığı çalışmada kullanılan metot da çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Bu alışmada CTC'ler manyetik boncuklar (CD45 ve CD53) ile lökositlerden uzaklaştırılarak zenginleştirildikten sonra EpCAM, CK 7 ve 8 antikorumları ile FC cihazında tespit edilmiştir. Hem EpCAM pozitif hem de negatif CTC'ler sayılarak, KHDAK hastalarının (n=46) CTC sayıları ve evreleri arasındaki kolerasyonlar araştırılmıştır. Çalışma sonucunda kullandıkları yöntem ile CTC tespitinin KHDAK hastalarında, tümörün ilerleyişinin öngörülmesinde, tedavi etkinliğinin izlenmesinde ve CTC'lerin biyolojisinin ayrıntılı analizinde kullanılabilirliğini öngörmüşlerdir (192). Çalışmamızda, akciğer kanserli 9 birey ve sağlıklı 9 birey ile çalışılmış ve daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızdaki hastaların tümünde CTC tespit edilirken, sağlıklı bireylerde CTC tespit edilmemiştir.

Akciğer kanserinde CTC'lerin sadece kanser tanısında yararlı olmadığı ayrıca evreler arası da farklılıklar gösterdiği yapılan çalışmalarda ileri sürölmektedir (196). 150 KHDAK ve KHAK hastasının dahil edildiği CTC tespit çalışmasında, CTC sayılarının evre I ve evre IV arasında büyük farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (196). Benzer sonuçlar elde edilen Krebs ve arkadaşlarının 101 KHDAK hastasında

gerçekleştirdiği çalışmada, CTC sayılarının evre IV hastalarda evre III hastalarla karşılaştırıldığında büyük oranda arttığı görülmektedir (189). Çalışmamızda ise, CTC sayıları ve akciğer kanserli hastaların evresi ve alt türü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile, modifiye ettiğimiz metodun akciğer kanserinde CTC tespitinde kullanılabilirliği gösterilmiştir. Bu doğrultuda CTC varlığının akciğer kanserli hastalarda teşhis amaçlı kullanılabileceği ön görülmektedir. Ayrıca, CTC'lerin akciğer kanserli hastalarda tespit edilmesi ile hastalığın teşhisinin yanında seyri ve tedavi izlenmesi açısından klinikte önemli bir belirteç olabileceği yapılan çalışmalarda da belirtilmektedir (131). Bu sayede, CTC sayılarındaki değişimler takip edilerek tedaviye yanıt ve erken kemoterapi direnci gibi tedavi kararını etkileyen durumlar saptanabilir (131).

Çalışmamızda birey sayısının az olması ve heterojen hasta grupları nedeniyle sonuçların yeterli olmamasından dolayı, akciğer kanseri evresi ve alt türü ile CTC sayıları arasında fark bulunamamıştır. Ancak akciğer kanserli hastaların periferik kanlarında CTC tespiti başarı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmada kullandığımız ileri FC cihazı olan floresan aktif hücre sıralama (FACS) cihazı ile daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir. FACS teknolojisi kullanılarak hücreler kolayca sıralanarak tek tek elde edilebilir ve CTC karakterizasyonu sağlanabilir (197, 198). CTC'lerin izole edilerek moleküler karakterizasyonunun yapılabilmesi ile hastalığın biyolojisi ve seyri hakkında bilgi sahibi olunup kişiye özgü tedavi yöntemleri uygulanarak daha verimli ve başarılı tedavi sağlanabilir (69, 72, 199).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda modifiye ettiğimiz metot ile CTC tespiti için akciğer kanserindeki kullanılabilirliği araştırılmıştır.
- Akciğer kanseri, kansere bağlı ölümler açısından son derece önemlidir ve hastaların sağkalımlarının artırılması için daha etkili tedavi ve teşhis yöntemleri gerekmektedir.
- Son yıllarda CTC'ler hem teşhis hem de tedavi etkinliğinin belirlenmesinde konusunda uygun belirteçler olarak kanser çalışmalarında önem kazanmıştır.
- CTC'lerin nadir hücreler olmalarından dolayı tespitleri için hassas ve spesifik yöntemlere ihtiyaç vardır.
- Çalışmamızda hasta grubunun CTC sayıları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.
- Kullandığımız metot ile akciğer kanserli hastalarda CTC gözlenirken sağlıklı bireylerde CTC tespit edilmemiş olması bu metodun akciğer kanserli hastalarda CTC tespiti için kullanılabilirliğini doğrulamıştır.
- CTC zenginleştirme basamağında ficol gradiyent santrifüj ve immunomanyetik ayırma yöntemlerinin kombinasyonunun akciğer kanserli hastalarda CTC tespiti için uygun olduğu belirlenmiştir.
- CTC saptama basamağında çoklu belirteçler kullanılarak gerçekleştirilen FC analizi akciğer kanserli hastalarda CTC tespiti için uygun olduğu belirlenmiştir.
- Ancak çalışmada kullandığımız FACS cihazının hücreleri tek tek elde edebilme özelliğinin de kullanılarak CTC tespiti yanında CTC'lerin biyolojik

öneminin daha ayrıntılı anlaşılabilmesi için, bu hücrelerin moleküler karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

- CTC tespit metodunda sadece EpCAM pozitif CTC'ler hedef alınmamalı, EpCAM negatif CTC'leri de hedef alan belirteçler seçilerek daha kapsamlı CTC tespiti gerçekleştirilmelidir.
- Çalışmamızda akciğer kanseri histolojik türleri (KHAK ve KHDAK) ve KHDAK alttürleri (adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom) gibi hastaların diğer histolojik özellikleri ile CTC sayıları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.
- Çalışmamıza dahil edilen hastalar evre 3A, evre 3B ve evre 4 akciğer kanserli bireylerdir. Çalışmamızda akciğer kanseri evresi ile CTC sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- Çalışmamızda evre 4 hastaların metastaz bölgeleri (beyin ve kemik) ile CTC sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- Akciğer kanseri evresi, alt türü ve metastaz bölgesi ile CTC sayıları arasında fark bulunamamasının nedeni birey sayısının az olması ve heterojen hasta grupları nedeniyle sonuçların yeterli olmamasıdır. Bu kriterler ile CTC sayıları arasında korelasyonun belirlenebilmesi için heterojen olmayan, hem erken evre hem de ileri evre hastalar seçilmesi ve hasta sayısı artırılarak ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.
- Sonuç olarak çalışmamızda, modifiye ettiğimiz yöntem ile akciğer kanserli hastalarda CTC tespitinin mümkün olduğu saptanmıştır.
- Ülkemizde CTC çalışmaları oldukça kısıtlı olup, modifiye ettiğimiz yöntem ile CTC tespitinin daha önce yapılmamış olması çalışmamızı değerli kılmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Holland JF, Frei E, Hong WK, Kufe DW, Bast RC, Hait WN, Pollock RE, Weichselbaum RR. Cardinal manifestations of cancer. In: Hong WK, Bast RC, Hait WN, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E (eds). *Holland Frei Cancer Medicine*, 8th ed. New York, People's Medical Publishing House, 2010:1-5.
2. WHO International Agency for Research on Cancer. Globacon 2012:Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. 19 Haziran 2016.
3. Şencan İ, İnce GN. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Türkiye Kanser İstatistikleri. http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/ANA_rapor_2013v01_2.pdf. 19 Haziran 2016.
4. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC, AICR, 2007:30-48.
5. Hodgson S. Mechanisms of inherited cancer susceptibility, *J Zhejiang Univ Sci B.*, 2008, 9(1):1-4.
6. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ. Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship, *Am J Prev Med.*, 2014, 46:7-15.
7. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC (eds.) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 9th ed. Philadelphia, Elsevier, 2015: 265-340.
8. Yıldızhan A, Candaş FH. Akciğer Kanseri. <http://www.jcam.com.tr/files/KATD-1324.pdf>. 19 Haziran 2016.

9. Gültekin M, Boztaş G. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Türkiye Kanser İstatistikleri. http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf. 19 Haziran 2016.
10. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes, *Chest.*, 2003, 123:97-104.
11. Chambers AF. The metastatic process: basic research and clinical implications, *Oncol Res.*, 1999, 11(4):161-168.
12. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis, *Nature*, 1980, 283(5743):139-146.
13. Shields TW, Locicero J, Ponn RB, Rudch Vw. General Thoracic Surgery, 6th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2015, 1471-1472.
14. De Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ. The emerging role of the molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine, *Am J Pathol.*, 2013, 183(4):1075-1083.
15. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases, *Clinical Cancer Res.*, 2004, 10(20):6897-6904.
16. Hong B, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends, *Theranostics.*, 2013, 3(6):377-394.
17. Elshimali YI, Grody WW. The clinical significance of circulating tumor cells in the peripheral blood, *Diagn Mol Pathol.*, 2006, 15(4):187-194.
18. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ, Meropol NJ, Weiner LM, Cohen SJ, Moreno JG, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM. Global gene expression profiling of circulating tumor cells, *Cancer Res.*, 2005, 65(12):4993-4997.

19. Lurje G, Schiesser M, Claudius A, Schneider PM. Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies: current techniques and clinical implications, *J Oncol.*, 2010, 392652.
20. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques, *Blood.*, 1993, 82(9):2605-2610.
21. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges, *Clin Chem.*, 2011, 57(9):1242-1255.
22. Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells, *Cancers (Basel).*, 2014, 6(1):595-624.
23. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process, *Nat Rev Cancer.*, 2006, 6(12):924-935.
24. Şen F. Karsinogenez. İçinde: Mandel NM (editör). *Onkoloji el kitabı*. 1. Baskı. Adana, Çukurova Nobel Tıp Kitabevi, 2015:2-31.
25. Arslan Ç. Kanserde tanı: patoloji ve laboratuvar. İçinde: Mandel NM (editör). *Onkoloji el kitabı*. 1. Baskı. Adana, Çukurova Nobel Tıp Kitabevi, 2015:32-41.
26. Scitable by nature education. Essentials of Cell Biology Unit 5: How Do Cells Know When to Divide?. <http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122997842> 19 Haziran 2016.
27. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC (eds). *Robbins Basic Pathology*, 9th ed. Philadelphia, Elsevier, 2013:161-214.
28. Schulz WA. *Molecular Biology of Human Cancers An Advanced Student's Textbook*, 1st ed. Dordrecht, Springer, 2007:1-25.

29. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 9th ed. Philadelphia, Elsevier, 2015: 281.
30. Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer, *J Mol Cell Biol.*, 2011, 3(1):51-58.
31. Macaluso M, Paggi MG, Giordano A. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer, *Oncogene.*, 2003, 22(42):6472-6478.
32. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing, *N Engl J Med.*, 2012, 366(10):883-892.
33. Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village, *Nat Rev Cancer.*, 2015, 15(8):473-483.
34. Wishart DS. Is Cancer a Genetic Disease or a Metabolic Disease?, *EBioMedicine.*, 2015, 2(6):478-479.
35. Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer, *Curr Genomics.*, 2008, 9(6):394-408.
36. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome, *Nature*, 2009, 458:719-724.
37. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications, *Nature Reviews Cancer*, 11:726-734.
38. Does A, Johnson NA, Thiel T. Rediscovering biology Molecular to Global perspectives. http://www.learner.org/courses/biology/support/textbook_full.pdf. 20 Haziran 2016.

39. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008, 9(3):51-61.
40. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer, *Nature.*, 2004, 432(7015):316-323.
41. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer, *Nat Rev Cancer.*, 2001, 1(3):222-231.
42. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011, 144(5):646-674.
43. Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction, *J Mol Cell Biol.*, 2011, 3(1):1-3.
44. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer, *Cell*, 2010, 140(6):883-899.
45. Amity L, Manning AL, Dyson NJ. RB: mitotic implications of a tumor suppressor, *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(3):220-226.
46. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer, *J Pathol.*, 2011, 223(2):116-126.
47. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol.*, 2007, 35(4):495-516.
48. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer, *Carcinogenesis*, 2010, 31(1):9-18.
49. Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells, *Radiother Oncol.*, 2009, 92(3):329-333.
50. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even warburg did not anticipate, *Cancer Cell*, 2012, 21(3):297-308.

51. Siemann DW. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents, *Cancer Treat Rev.*, 2011,37(1):63-74.
52. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation, *Pharmacol Rev.*, 2000, 52(2):237-268.
53. Konukoğlu D, Turhan SM. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis, *Cerrahpaşa J Med.*, 2005, 36(1):42-48.
54. Kılıç T, Yıldırım Ö, şahin S, Pamir MN. Glial tümörlerin anjiogenezi, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2005, 15(1):1-9.
55. Coghlin C, Murray GI. Current and emerging concepts in tumour metastasis, *J Pathol.*, 2010, 222(1):1-15.
56. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis, *Mol Cancer.*, 2015,14:48.
57. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/> 20 Haziran 2016.
58. Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis, *Nat Rev Cancer.*, 2013, 13(12):858-870.
59. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients, *Int J Cancer.*, 2008, 123(9):1991-2006.
60. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA, *Annu Rev Med.*, 2012, 63:199-215.
61. Hong B, Zu Y. Detecting Circulating Tumor Cells: Current Challenges and New Trends, *Theranostics*, 2013, 3(6):377-394.

62. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death, *Australian Med. J.*, 1869, 14:146-47.
63. Hayes DF, Smerage JR. Is There a Role for Circulating Tumor Cells in the Management of Breast Cancer?, *Clin Cancer Res.*, 2008, 14(12):3646-3650.
64. Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM, Kraan J, Martens JW, Foekens JA. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation?, *Eur J Cancer.*, 2007, 43(18):2645-2650.
65. Pantel K, Riethdorf S. Pathology: are circulating tumor cells predictive of overall survival?, *Nat Rev Clin Oncol.*, 2009, 6(4):190-191.) (Panteleakou Z, Lembessis P, Sourla A, Pissimissis N, Polyzos A, Deliveliotis C, Koutsilieris M. Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance, *Mol Med.*, 2009, 15(3-4):101-114.
66. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases, *Clin Cancer Res.*, 2004,10(20):6897-6904.
67. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer, *Clin Cancer Res.*, 2012,18(20):5701-5710.
68. Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, Heller G. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data, *Lancet Oncol.*, 2009, 10(3):233-239.
69. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, Priest LJ, Greystoke A, Zhou C, Morris K, Ward T, Blackhall FH, Dive C. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer, *J Clin Oncol.*, 2012, 30(5):525-532.

70. Denève E, Riethdorf S, Ramos J, Nocca D, Coffy A, Daurès JP, Maudelonde T, Fabre JM, Pantel K, Alix-Panabières C. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients, *Clin Chem.*, 2013, 59(9):1384-1392.
71. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells, *Nat Rev Cancer.*, 2008, 8(5):329-340.
72. Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G, Zwaenepoel K, Gil-Bazo I, Passiglia F, Carreca AP, Taverna S, Vento R, Santini D, Peeters M, Russo A, Pauwels P. Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers, *Biochim Biophys Acta.*, 2014, 1846(2):539-546.
73. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer, *Clin Chem.*, 2013, 59(1):110-118.
74. Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells, *Cytometry A*, 2007, 71(3):154-162.
75. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR, *Breast Cancer Res Treat.*, 2009, 118(3):455-468.
76. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research, *Nat Rev Cancer.*, 2014, 14(9):623-631.
77. Allan AL, Chambers AF. Circulating Tumor Cells and Tumor Dormancy. http://www.lhsc.on.ca/Research_Training/LRCP/Research_Scientists/CirculatingTuCirculating.pdf. 20 Haziran 2016.
78. Grover PK, Cummins AG, Price TJ, Roberts-Thomson IC, Hardingham JE. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research, *Ann Oncol.*, 2014, 25(8):1506-1516.

79. Safarík I, Safaríková M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 1999, 722(1-2):33-53.
80. Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule, *J Cell Biol.*, 1994,125(2):437-446.
81. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM, *Nat Cell Biol.*, 2009, 11(2):162-171.
82. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy, *Cancer Res.*, 2004, 64(16):5818-5824.
83. Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation, *Am J Pathol.*, 1996, 148(3):865-875.
84. Armstrong A, Eck SL. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen, *Cancer Biol Ther.*, 2003, 2(4):320-326.
85. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer, *Br J Cancer.*, 2007, 96(3):417-423.
86. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas, *Hum Pathol.*, 2004, 35(1):122-128.
87. Lustberg M, Jatana KR, Zborowski M, Chalmers JJ. Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells, *Recent Results Cancer Res.*, 2012, 195:97-110.

88. Chalmers JJ, Lustberg MB, Deighan C, Park KJ, Wu Y, Amaya P. Depletion of Normal Cells for CTC Enrichment. In: Fan ZH (eds). *Circulating Tumor Cells: Isolation and Analysis*, 1st ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2016:301-312.
89. Okumura M, Thomas ML. Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases, *Curr Opin Immunol.*, 1995, 7(3):312-319.
90. Nam HJ, Poy F, Saito H, Frederick CA. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J Exp Med.*, 2005, 201(3):441-452.
91. Allan AL, Chambers AF. Circulating Tumor Cells and Tumor Dormancy. In: Cote RJ, Datar RH (eds). *Circulating Tumor Cells, Current Cancer Research*, 1st. ed. New York, Springer, 2016:101-120.
92. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Isolation by size of epithelial tumor cells:a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulatingtumor cells. *Am J Pathol.*, 2000, 156(1):57-63.
93. Lin HK, Zheng S, Williams AJ, Balic M, Groshen S, Scher HI, Fleisher M, Stadler W, Datar RH, Tai YC, Cote RJ. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res.*, 2010, 16(20):5011-5018.
94. Zabaglo L, Ormerod MG, Parton M, Ring A, Smith IE, Dowsett M. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells. *Cytometry A*, 2003, 55(2):102-108.
95. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res.*, 2004, 10(20):6897-6904.

96. Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods*, 2010, 50(4):289-297.
97. Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res.*, 2003, 162:149-155.
98. Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, van der Kooi A, Tibbe AG, Doyle GV, Terstappen LW, Bauernhofer T. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom.*, 2005, 68(1):25-30.
99. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry*, 2002, 49(4):150-158.
100. Bøyum A, Løvhaug D, Tresland L, Nordlie EM. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand J Immunol.*, 1991, 34(6):697-712.
101. Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4(6):741-756.
102. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, 450(7173):1235-1239.
103. Alshareef M, Metrakos N, Juarez Perez E, Azer F, Yang F, Yang X, Wang G. Separation of tumor cells with dielectrophoresis-based microfluidic chip. *Biomicrofluidics*, 2013, 7(1):11803.
104. Pratt ED, Huang C, Hawkins BG, Gleghorn JP, Kirby BJ. Rare Cell Capture in Microfluidic Devices. *Chemical Engineering Science*, 2011, 66(7):1508–1522.

105. Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology*, 2005, 65(4):713-718.
106. Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Höffken K. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med.*, 2005, 43(6):617-627.
107. Scholtens TM, Schreuder F, Ligthart ST, Swennenhuis JF, Tibbe AG, Greve J, Terstappen LW. CellTracks TDI: an image cytometer for cell characterization. *Cytometry A*, 2011, 79(3):203-213.
108. Lambrechts AC, Bosma AJ, Klaver SG, Top B, Perebolte L, van' t Veer LJ, Rodenhuis S. Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.*, 1999, 56(3):219-231.
109. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Lüchtenborg M, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol.*, 2000, 18(7):1432-1439.
110. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Bozionelou V, Agelaki S, Kanellou P, Kotsakis A, Politaki E, Kalbakis K, Kalykaki A, Vamvakas L, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol.*, 2007, 18(5):851-858.
111. Koyanagi K, Bilchik AJ, Saha S, Turner RR, Wiese D, McCarter M, Shen P, Deacon L, Elashoff D, Hoon DS. Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial. *Clin Cancer Res.*, 2008, 14(22):7391-7396.

112. Sabbatini R, Federico M, Morselli M, Depenni R, Cagossi K, Luppi M, Torelli G, Silingardi V. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin in patients with breast cancer undergoing conventional-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.*, 2000, 18(9):1914-1920.
113. Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Prunel R, Hart AA, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res.*, 2002, 8(6):1871-1877.
114. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, Gusterson B, Neville AM. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet*, 1999, 354(9182):896-900.
115. Basu S, Campbell HM, Dittel BN, Ray A. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J Vis Exp.*, 2010, (41):1546.
116. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest.*, 1985, 52(3):243-256.
117. Lam KY, Loke SL, Shen XC, Ma LT. Cytokeratin expression in non-neoplastic oesophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Virchows Arch.*, 1995, 426(4):345-349.
118. Bossolasco P, Ricci C, Farina G, Soligo D, Pedretti D, Scanni A, Deliliers GL. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-pCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detect Prev.*, 2002, 26(1):60-63.
119. Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NC, Done SJ. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat.*, 2008, 107(1):145-154.

120. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Pallis T, Christophylakis C, Argyraki K, Lianidou ES, Stathopoulos S, Georgoulas V, Mavroudis D. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.*, 2006, 24(23):3756-3762.
121. Yu Y, Xu G, Cao J, Jin S, Man Y, Shang L. Combination of four gene markers to detect circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with advanced lung adenocarcinoma using real-time PCR. *Oncol Lett.*, 2013, 5(4):1400-1406.
122. Yoon SO, Kim YT, Jung KC, Jeon YK, Kim BH, Kim CW. TTF-1 mRNA-positive circulating tumor cells in the peripheral blood predict poor prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2011, 71(2):209-216.
123. Devriese LA, Bosma AJ, van de Heuvel MM, Heemsbergen W, Voest EE, Schellens JH. Circulating tumor cell detection in advanced non-small cell lung cancer patients by multi-marker QPCR analysis. *Lung Cancer*, 2012, 75(2):242-247.
124. de Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Bourstyn E, Nos C, Clough KB, Boudou E, Martin EC, Müller A, Pouillart P, Magdelénat H. Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res.*, 2000, 6(8):3117-3122.
125. Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dobrovic A. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer*, 2000, 89(1):8-13.
126. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells,

- disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.*, 2004, 351(8):781-791.
127. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, Allard WJ, Bilbee M, Cheng JD, Hoffman JP, Lewis NL, Pellegrino A, Rogatko A, Sigurdson E, Wang H, Watson JC, Weiner LM, Meropol NJ. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.*, 2006, 6(2):125-132.
128. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. *J Urol.*, 2009, 181(3):1091-1097.
129. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LWMM, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1998, 95(8):4589-4594.
130. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.*, 2007,13(3):920-928.
131. Truini A, Alama A, Dal Bello MG, Coco S, Vanni I, Rijavec E, Genova C1, Barletta G, Biello F, Grossi F. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System. *Front Oncol.*, 2014, 4:242.
132. Sørensen JB. Endobronchial metastases from extrapulmonary solid tumors. *Acta Oncol.*, 2004, 43(1):73-79.
133. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. Çeviri: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U. *Robbins Temel Patoloji*, 9. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2013:505-506.

134. WHO International Agency for Research on Cancer. Globacon 2012:Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lung cancer. <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/lung-new.asp>. 24 Haziran 2016.
135. 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(9):1166-1196.
136. Alar T, Şahin EM. Akciğer kanseri: birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma, *Smyrna Tıp Dergisi*, 2012, 68-74.
137. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>. 24 Haziran 2016.
138. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. SEER Stat Fact Sheets: Lung and Bronchus Cancer. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>. 24 Haziran 2016.
139. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*, 2005, 55(2):74-108.
140. Ece T. Akciğer Kanseri Genel Bakış. İçinde: Aydın A, Can G (editörler). *Akciğer Kanseri Tedavi ve Bakım*, 1. Baskı. İstanbul, İpomet Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti., 2010:1-6.
141. Aliustaoğlu BÖ. Akciğer kanseri. İçinde: Mandel NM (editör). *Onkoloji el kitabı*. 1. Baskı. Adana, Çukurova Nobel Tıp Kitabevi, 2015:247-254.
142. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 2004, 45(2):3-9.
143. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.*, 2003, 123(1):21-49.
144. Chakraborty S, Ganti AK, Marr A, Batra SK. Lung cancer in women: role of estrogens. *Expert Rev Respir Med.*, 2010, 4(4):509-518.

145. Taioli E, Wynder EL. Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J Natl Cancer Inst.*, 1994, 86(11):869-870.
146. World Health Organization. The World Health Organization histological typing of lung tumours. Second edition. *Am J Clin Pathol.*, 1982;77(2):123-136.
147. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 9th ed. Philadelphia, Elsevier, 2015:712-721.
148. Beckett WS. Epidemiology and etiology of lung cancer. *Clin Chest Med.*, 1993,14(1):1-15.
149. William D, Travis MD. Pathology of Lung Cancer. *Clin Chest Med.*, 32(2011):669–692.
150. Türk Toraks Dergisi. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Rehberi. http://www.turkishthoracicjournal.com/upload/documents/pdf_Toraksder_494.pdf. 19 Haziran 2016.
151. Fernandez FG, Battafarano RJ. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Cancer Control.*, 2006, 13(4):270-275.
152. Goksel T, Akkoclu A, Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey, 1994-1998. *Respiration*, 2002, 69(3):207-210.
153. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura H, Nakayama H. Implications of staging in lung cancer, *Chest.*, 1997, 112(4):242-248.
154. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.*, 1997, 111(6):1710-1717.
155. Mandel NM. Onkoloji el kitabı. 1. Baskı. Adana, Çukurova Nobel Tıp Kitabevi, 2015: 249.
156. Rice TW, Murthy SC, Mason DP, Blackstone EH. A cancer staging primer: lung, *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 2010, 139(4):826-829.

157. Mandel NM (editör). *Onkoloji el kitabı*. 1. Baskı. Adana, Çukurova Nobel Tıp Kitabevi, 2015:250.
158. 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(9):1166-1196.
159. Goksel T, Akkoclu A; Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey, 1994-1998, *Respiration*, 2002, 69(3):207-210.
160. Aydın A, Topuz E. *Akciğer Kanseri Tanı-Tedavi-Takip İstanbul Konsensusu 2006*, 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2007: 5-8.
161. Aydın A, Topuz E. *Akciğer Kanseri Tanı-Tedavi-Takip İstanbul Konsensusu 2006*, 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2007:50-52.
162. Müsellim B. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar II. <http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/58/5809.pdf>. 20 Haziran 2016.
163. McLoud TC. Imaging techniques for diagnosis and staging of lung cancer, *Clin Chest Med.*, 2002, 23(1):123-136.
164. Schimmer C, Neukam K, Elert O. Staging of non-small cell lung cancer: clinical value of positron emission tomography and mediastinoscopy, *Interact Cardiovasc Thorac Surg.*, 2006, 5(4):418-423.
165. Wong BS, Hsiao YC, Lin TW, Chen KS, Chen PN, Kuo WH, Chu SC, Hsieh YS. The in vitro and in vivo apoptotic effects of *Mahonia oiwakensis* on human lung cancer cells, *Chem Biol Interact.*, 2009, 180(2):165-174.
166. Simsek E, Guler OO, Carhan A, Ersan B, Arkan TK, Dilek Y, Ercan E, Oz BE, Terzi E, Calisir E, Tiryaki M, Alparslan FP, Korkmaz MH. The determination of circulating tumor cells in peripheral blood by flow cytometry. *Niche*, 2015, doi:10.5152/niche.2015.246.

167. Halkman AK, Ayhan K. Mikroorganizma Sayımı. İçinde: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 2. Baskı. Ankara, Sim Matbaası, 2000: 522.
168. Meye A, Bilkenroth U, Schmidt U, Füssel S, Robel K, Melchior AM, Blümke K, Pinkert D, Bartel F, Linne C, Taubert H, Wirth MP. Isolation and enrichment of urologic tumor cells in blood samples by a semi-automated CD45 depletion autoMACS protocol. *Int J Oncol.*, 2002, 21(3):521-530.
169. Bluemke K, Bilkenroth U, Meye A, Fuessel S, Lautenschlaeger C, Goebel S, Melchior A, Heynemann H, Fornara P, Taubert H. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2009, 18(8):2190-2194.
170. Dalva K, Gülbaş Z. Akım Sitometri Uygulamaları. http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/molhem_14.pdf. 24 Haziran 2016
171. Kanev MO, Muranlı FDG. Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bil Der.*, 2016, 20(1):33-38.
172. Gazioğlu SB. Genel Bilgiler. İçinde: Deniz G, Demirel GY (editörler). *Akan hücre ölçer*, 1. Baskı. İstanbul, Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık, 2014:9-14.
173. <http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/09/Picture11.png> 24 Haziran 2016.
174. Riley RS, Idowu M. Principles and Applications of Flow Cytometry. http://www.flowlab-childrens-harvard.com/yahoo_site_admin/assets/docs/PRINCIPLESANDAPPLICATION.29462946.pdf. 24 Haziran 2016.
175. Deniz G. Florokrom Boyama Teknikleri. İçinde: Deniz G, Demirel GY (editörler). *Akan hücre ölçer*, 1. Baskı. İstanbul, Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık, 2014:15-22.

176. Dalva K. Kullanım Alanları. İçinde: Deniz G, Demirel GY (editörler). *Akan hücre ölçer*, 1. Baskı. İstanbul, Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık, 2014:23-30.
177. Chi KR. The tumour trail left in blood. *Nature*. 2016, 532(7598):269-271.
178. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.*, 2013, 59(1):110-118.
179. Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol.*, 2011, 178(3):989-996.
180. O'Flaherty JD, Gray S, Richard D, Fennell D, O'Leary JJ, Blackhall FH, O'Byrne KJ. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer*, 2012, 76(1):19-25.
181. Adamczyk LA, Williams H, Frankow A, Ellis HP, Haynes HR, Perks C, Holly JM, Kurian KM. Current Understanding of Circulating Tumor Cells - Potential Value in Malignancies of the Central Nervous System, *Front Neurol.*, 2015, 6:174.
182. Liu Z, Fusi A, Klopocki E, Schmittel A, Tinhofer I, Nonnenmacher A, Keilholz U. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med.*, 2011, 9:70.
183. Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer.*, 2006, 94(1):128-135.
184. Piyathilake CJ, Frost AR, Weiss H, Manne U, Heimbürger DC, Grizzle WE. The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung. *Hum Pathol.*, 2000, 31(4):482-487.

185. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.*, 2008, 129(6):705-733.
186. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.*, 2014, 7(1):1-11.
187. Bevilacqua S, Gallo M, Franco R, Rossi A, De Luca A, Rocco G, Botti G, Gridelli C, Normanno N. A "live" biopsy in a small-cell lung cancer patient by detection of circulating tumor cells. *Lung Cancer*, 2009, 65(1):123-125.
188. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Rahman S, Tsubota N, Tsujimura T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T, Hasegawa S. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res.*, 2009, 15(22):6980-6986.
189. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, Blackhall FH. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.*, 2011, 29(12):1556-1563.
190. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, Ward TH, Backen A, Clack G, Hughes A, Ranson M, Blackhall FH, Dive C. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol.*, 2012, 7(2):306-315.
191. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Zoli W, Rigaud M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Ann Transl Med.*, 2014, 2(11):109.
192. Yin J, Wang Y, Yin H, Chen W, Jin G, Ma H, Dai J, Chen J, Jiang Y, Wang H, Liu Z, Hu Z, Shen H. Circulating Tumor Cells Enriched by the Depletion of Leukocytes with Bi-Antibodies in Non-Small Cell Lung Cancer: Potential Clinical Application. *PLoS One.*, 2015, 10(8):e0137076.

193. Mittag A, Tarnok A. Recent advances in cytometry applications: preclinical, clinical, and cell biology. *Methods Cell Biol.*, 2011, 103:1-20.
194. Jaye DL, Bray RA, Gebel HM, Harris WA, Waller EK. Translational applications of flow cytometry in clinical practice. *J Immunol.*, 2012, 188(10):4715-4719.
195. Huang HB, Ge MJ. The Effects of Different Surgical Approaches on the Perioperative Level of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Cardiovasc Surg.*, 2015, doi:10.1055/s-0035-1552925.
196. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Rahman S, Tsubota N, Tsujimura T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T, Hasegawa S. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res.*, 2009, 15(22):6980-6986.
197. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bäuerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Höfner T, Sprick M, Scharpf M, Marmé F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.*, 2013, 31(6):539-544.
198. Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, Ngo J, Yin W, Kumar D, Goodman JC, Groves MD, Marchetti D. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med.*, 2013, 5(180):180ra48.
199. Swennenhuis JF, Reumers J, Thys K, Aerssens J, Terstappen LW. Efficiency of whole genome amplification of single circulating tumor cells enriched by CellSearch and sorted by FACS. *Genome Med.*, 2013, 5(11):106.

8. EKLER

EK-1. Akciğer Kanseri Evrelemesi Tablosu

Tablo 2.3. Akciğer kanseri evrelemesi (150, 155).

PRİMER TÜMÖR (T)
Tx: Primer tümörün belirlenememesi veya balgam ya da bronş lavajında malign hücreler saptanmış fakat görüntüleme teknikleri ya da bronkoskopi ile tümörün gösterilememesi.
Tis: Karsinoma in situ.
T0: Primer tümör belirtisi yok.
T1: En geniş çapı ≤ 3 cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon göstermeyen tümör (örneğin: ana bronşda olmayan). T1a: Tümör ≤ 2 cm T1b: $3 \text{ cm} \geq \text{tümör} > 2 \text{ cm}$
T2: $7 \text{ cm} \geq \text{tümör} > 3 \text{ cm}$ ve ayrıca tümörün aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması: - En geniş çapı > 3 cm, - Ana bronş invaze ancak ana karinaya uzaklık ≥ 2 cm, - Visseral plevra invazyonu, - Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni T2a: $5 \text{ cm} \geq \text{tümör} > 3 \text{ cm}$ T2b: $7 \text{ cm} \geq \text{tümör} > 5 \text{ cm}$
T3: Tümör > 7 cm ve ayrıca tümörün aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması: -Tümörün herhangi bir büyüklükte olup göğüs duvarı, diyafragma, mediastinal plevra, paryetal perikard gibi yapılardan herhangi birine direkt invazyon göstermesi, - Karinaya 2 cm'den daha yakın ancak karinayı tutmayan ana bronştaki tümör olması - Bütün bir akciğeri kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni - Tümörle aynı lobda satellit nodül
T4: Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özofagus, ver tebral kolon, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi; veya malign plevral veya primer tümörle aynı tarafta farklı lobda nodül gözlenmesi.
BÖLGESEL LENF NODU (N)
Nx: Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi.
N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1: Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner lenf nodu metastazı.
N2: Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodu metastazı.
N3: Karşı taraf mediastinal, hiler, aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen nodu metastazı.
UZAK METASTAZ (M)
Mx: Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi.
M0: Uzak metastaz yok.
M1: Uzak metastaz var. M1a: Karşı akciğer metastatik nodül, malign plevral veya perikardiyal efüzyon veya tümör nodülleri M1b: Uzak organ metastazı.

EK-2. Etik Kurul Raporu

FORM-1

YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ ETİK KURULU BAŞVURU FORMU

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi öğrenci ve çalışanları tarafından yürütülen ve insan katılımcılardan klinik dışı bilgi toplamayı gerektiren araştırmalar için bu başvuru formunun yanı sıra diğer gerekli belgelerle "Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurul"una başvurulur. "Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurul"u başvuruyu "Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı Etik Kurul Yönergesi" genel kapsamında değerlendirir.

BAŞVURU KAYIT FORMU (Etik Kurul tarafından doldurulacak)

Araştırma kodu (Yıl – Araştırma sıra no)	2014-29
Başvuru formunun Etik Kurula ulaştığı tarih	18.12.2014
Etik Kurul Karar toplantı tarihi ve karar no	03.02.2015 -12

ARAŞTIRMANIN BAŞLIĞI

AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN AKIM SİTOMETRİSİ İLE TESPİTİ

ARAŞTIRMACI/ARAŞTIRMACILAR*

	Unvan	Adı Soyadı	Görev yeri	Telefon	e-posta
1	Prof. Dr.	Mehmet Hakan KORKMAZ	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		
2	Doç. Dr.	Özen ÖZENSOY GÜLER	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		
3	Yrd. Doç. Dr.	Ender ŞİMŞEK	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		
4	Yrd. Doç. Dr.	Mehmet Ali Nahit ŞENDUR	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		

EK-2 Devamı

FORM-1

5	Yrd. Doç. Dr.	Muhammed Bülent AKINCI	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		
6	Uzm. Dr.	Ferda PINARLI	Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etlik Semt Polikliniği Genetik Tanı Merkezi Laboratuvarı		
7	Uzm. Dr.	Ömer BAYIR	Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği		
8	Yüksek Lisans Öğrencisi	Tuğba Kevser ARKAN	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü		
9	Yüksek Lisans Öğrencisi	Bilgesu ERSAN	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü		
10	Yüksek Lisans Öğrencisi	Yeter DİLEK	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü		

EK-2 Devamı

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Özen ÖZENSOY GÜLER'in "AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN AKIM SİTOMETRİSİ İLE TESPİTİ" adlı araştırması değerlendirilmiştir.

Proje etik açısından uygun bulunmuştur. (X)

Proje etik açısından geliştirilmesi gerekmektedir. ()

Proje etik açısından uygun bulunmamıştır. ()

İmzalar:

Prof. Dr. S. Yavuz SANİSOĞLU

Koordinatör

Prof. Dr. Arif ERSOY

Koordinatör Yardımcısı

Prof. Dr. Mehmet BARCA

Üye

Prof. Dr. Mehmet AKKUŞ

Üye

Prof. Dr. M. Fatih UŞAN

Üye

Prof. Dr. Fatih Vehbi ÇELEBİ

Üye

Prof. Dr. Erdal Tanas KARAGÖL

Üye

Prof. Dr. Mustafa Sıtkı BİLGİN

Üye

Prof. Dr. Ahmet KANKAL

Üye

Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Üye

Yard. Doç. Dr. Arif DEMİR

Üye

Gülcan SERTÇELİK

Raportör

EK-3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN AKIM SİTOMETRİSİ İLE TESPİTİ”dir.

Bu araştırmanın amacı, sağlıklı bireylerin ve akciğer kanseri hastaların kanlarında dolaşan tümör hücrelerinin olup olmadığını tespit etmektir. Bu araştırmada sizden sadece **1 (bir) kez bir tüp** kan alınacaktır.

Bu araştırma ile ilgili olarak doktorunuzun önerilerine uymak sizin sorumluluklarınızdır. Bu araştırmada kan alımı sırasında veya kan alındıktan sonra görülebilecek riskler ve rahatsızlıklar söz konusu olabilir. Bunlar, bu bölgede kanın dokulara sızması sonucu şişme (hematom oluşumu) sonrasında ağrı, bazı durumlarda enfeksiyon, uyuşma, seyirme, bulantı, kusma, bayılma gibi durumlardır; ancak bu sonuçlarla çok nadir olarak karşılaşılır. Sizin için beklenen yararları, akciğer kanseri erken tanısının konulabilecek olması ve kanserin sıçrama (metastaz) yapıp yapmadığının belirlenmesidir.

Bu araştırmanın olası yararları, sizden alınan kanlarda dolaşan tümör hücrelerinin varlığı araştırılacak ve akciğer kanserli hasta kanlarında bu hücreler sayılacaktır. Dolaşan tümör hücresi tespit edilen hastalarda başka bölgeye sıçrama (metastaz) olup olmayacağı hakkında yorum yapılabilecektir. Riskleri ise akciğer kanseri hastalarında, bu tümör hücrelerinin tespit edilememesi (yanlış negatif sonuç) ya da sağlıklı bireylerde tümör hücresi tespiti (yanlış pozitif sonuç) olabilir. Ancak bu iki durumun gerçekleşme ihtimali çok düşüktür.

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırmacı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar bireyin kendi sağlık güvencesi olan sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanacaktır. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya

yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0312 324 15 55 no.lu telefondan Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali Nahit ŞENDUR'a başvurabilirsiniz.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu araştırmada yer almak tamamen **sizin isteğinize bağlıdır**. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol amayacaktır. Araştırıcı bilginiz dâhilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan gerekleri yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız nedeni ile sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz (tedavinin gizli olması durumunda, gönüllüye kendine ait tıbbi bilgilere ancak verilerin analizinden sonra ulaşabileceği bildirilmelidir).

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma

yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

EK-4. Tez Çalışmasında Kullanılan Yöntem Makalesi

	Niche, 2014, 3: 0-0 · DOI: 10.5152/niche.2015.246
	<h1>Determination of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood By Flow Cytometry</h1>
	Ender Simsek ^{1*} , Ozen Ozensoy Guler ¹ , Ahmet Carhan ¹ , Bilgesu Ersan ¹ , Tugba Kevser Arkan ¹ , Yeter Dilek ¹ , Elif Ercan ¹ , Beyza Ecem Oz ¹ , Emine Terzi ¹ , Emrullah Calisir ² , Meral Tiryaki ² , Ferda Alparslan Pinarli ² , Mehmet Hakan Korkmaz ³
Niche	
Original Article	Abstract
	<p>Objective: Circulating tumor cells (CTCs) have been interest of subject in the past few decades in terms of prognosis and response to the therapy in several cancers and have potential as a "liquid biopsy" in the diagnosis and treatment of cancer. The aim of our study was to improve a convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection.</p> <p>Methods: In this modified method, 7,5 mL peripheral blood samples were firstly collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the fresh blood samples by ficoll gradient separation. Next, the leukocytes in PBMCs were removed by magnetic microbeads conjugated with CD45 for a negative selection. Finally, the retained cells were labeled with anti-epithelial cell adhesion molecule (anti-EpCAM), anti-cytokeratins (anti-CKs) and the leukocyte-specific marker as anti-CD45. All samples were analyzed by a flow cytometry.</p> <p>Results: CTCs were detected in blood samples of cancer patients such as breast cancer, lung cancer, colorectal cancer, bladder cancer, and laryngeal cancer using with our modified convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection. For instance, our results showed that CTCs were not detected in the volunteer sample while 9 CTCs were detected with the use of EpCAM-based gating strategy but the number of detected CTCs was 7 when gated on CK 14,15,16,19 in the breast cancer sample.</p> <p>Conclusion: CTCs can be detected with our modified method including highly sensitive assays that provide us monitoring the process of cancer treatment and knowing some important information about cancer prognosis.</p> <p>Keywords: Cancer, circulating tumor cells (CTCs), flow cytometry</p>

EK-5. Uluslararası Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Poster Bildirisi



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

10th ISMRC International Symposium on Minimal Residual Cancer:
Liquid Biopsy in Cancer Diagnostics and Treatment

March 19-21 2016 in Hamburg, Germany

P32 Gene expression profiling in circulating tumour cells (CTCs) from patients with metastatic breast cancer.....	24
P33 Single cell gene expression profiling of circulating tumor cells from ovarian cancer patients using multi-marker gene panel analysis	25
P34 EpCAM-independent enrichment of circulating tumor cells in metastatic breast cancer	26
P37 Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of Circulating Tumor Cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients	27
P38 Detection and molecular characterization of EpCAM positive and EpCAM negative circulating tumour cells isolated from SCLC patients using an epitope independent platform	29
P39 The importance of the circulating tumor cells in cancer	30
P40 Which cells are resistant to the cancer treatment? Circulating Tumor Cells (CTCs) or Cancer Stem Cells (CSCs).....	31
P41 A novel strategy for determining circulating tumour cells in lung cancer.....	33
P42 Does circulating tumor cell used as a liquid biopsy detector?	34
P43 A noninvasive method for bladder cancer: CTC detection with flow cytometry	35
P44 Unbiased enrichment of circulating tumour cells directly from whole blood.....	37
P45 The combination of Parsortix® system and CellCelector™ micromanipulator enables the characterization of EpCAM ^{neg} circulating tumor cells in breast cancer	38
P46 A FISH-based method for assessment of HER-2 amplification status in breast cancer circulating tumor cells following CellSearch isolation	39
P49 Adding more information to circulating tumor cells - in situ detection and visualisation of androgen receptor splice variants in prostate cancer cells	40
P50 CellCelector isolation of circulating tumor cells enables additional marker staining following panel sequencing.....	41

P41

A novel strategy for determining circulating tumour cells in lung cancer

Arkan T.K.¹, Oz B.E.¹, Ersan B.¹, Ercan E.¹, Sendur M.A.N.², Alparslan Pinarli F.³, Simsek E.¹, Carhan A.¹, Ozensoy Guler O.¹

¹Yildirim Beyazit University, Department of Medical Biology, Ankara, Turkey, ²Ankara Atatürk Training and Research Hospital, Department of Medical Oncology, Ankara, Turkey, ³Diskapi Yildirim Beyazit Training and Research Hospital, Department of Genetics, Ankara, Turkey

Circulating tumor cells (CTCs) play a crucial role in the metastatic spread of carcinoma. Therefore, CTC has been interest of subject in the past few decades in terms of prognosis and response to the therapy in several cancer. Since lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide, with poor prognosis that commonly metastasis before disease diagnosis. In this preliminary study, our goal is to detect CTC enumeration in lung cancer with an alternative method. This method consists of a ficoll density gradient centrifugation and a magnetic bead separation technique by CD45 negative depletion method. After having the final solution, we determined CTCs with the expression of anti-epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and cytokeratins (CK7,8,14,15,16,19) by multi-parameter flow cytometry. According to these results, we defined CTCs in lung cancer patients by this novel strategy, and it may lead us for using this method as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in cancer treatment process as alternatively.

Keywords: Lung Cancer, Circulating Tumor Cells, Flow Cytometry

EK-6. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Tuğba Kevser ARKAN
Doğum tarihi	: 06/09/1990
Doğum yeri	: Ankara
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
E-mail	: tugbakevser_arkan@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Ankara Batıkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
Lisans	: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 66,25 (YDS)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
EARC-European Association for Cancer Research Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği Biochemical Society Viral Hepatitle Savaşım Derneği Hepyaşam Derneği	

