T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA GÖZLENEN KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLER İLE HÜCRE ÖLÜM RESEPTÖRÜ-4 GENİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN İNCELENMESİ

Deniz TAŞTEMİR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Osman DEMİRHAN

ADANA, 17.11.2008

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA GÖZLENEN KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLER İLE HÜCRE ÖLÜM RESEPTÖRÜ-4 GENİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN İNCELENMESİ

Deniz TAŞTEMİR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Osman DEMİRHAN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF2005D1 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: ……..

ADANA, 17.11.2008

KABUL VE ONAY SAYFASI

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Deniz TAŞTEMİR tarafından Doktora programı çerçevesinde yürütülmüş olan "**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA GÖZLENEN KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLER İLE HÜCRE ÖLÜM RESEPTÖRÜ-4 GENİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN İNCELENMESİ"** adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17 Kasım 2008

Prof. Dr. Osman DEMİRHAN
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkası

Prof. Dr. Mülkiye KASAP
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Serap HASTÜRK
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hasan ACAR
Selçuk Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Halil KASAP
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun …… tarih ve …… sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR VE DESTEKLEYEN KURULUŞLAR

Lisans üstü eğitimim boyunca bana yol gösteren ve her konuda yardımını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Osman DEMİRHAN' a başta olmak üzere, yine tez dönemi süresince "Tez İzleme Komitesi" nde görev alarak yapıcı eleştirileri ve katkıları ile bana yardımcı olan ve güler yüzlerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Mülkiye KASAP ve Prof. Dr. Serap HASTÜRK'e, ayrıca ilgi ve desteklerinden dolayı sayın Yard. Doç. Dr. Sedat KULECİ ile Yard. Doç. Dr. İsmail HANTA'ya, örnek almam da bana her türlü desteği sağlayan Çukurova Üniversitesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Çalışanlarından başta Hemşire Aysel SALİM olmak üzere tüm asistan arkadaşlara ve çalışanlarına, laboratuvar çalışmalarımda benden desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR'a, Öğr. Gör. Ali İrfan GÜZEL'e, Uzm. Bio. Evrim GÜRTUNÇ'a, Bio. Zeynep KARAKAN'a, Bio. Onur ÖZER'e ve tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve Çalışanlarına desteklerinden dolayı, ve akademik hayatım boyunca bana manevi desteğini esirgemeyen sevgili annem Münevver TAŞTEMİR'e ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, tez çalışmamı TF2005D1 nolu proje olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR ve DESTEKLEYEN KURULUŞLAR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi	4
2.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması	6
2.3. Akciğer Kanserinde Tanı Yöntemleri	7
2.3.1. Bilgisayarlı Tomografi (BT)	9
2.3.2. Magnetik Rezonans Görüntüleme (MR)	9
2.3.3. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET)	10
2.3.4. Bronkoskopi	10
2.4. Akciğer Kanserinde Gözlenen Genetik Bozukluklar	11
2.5. Tümör Nekroz Faktör ile İlişkili Apoptozisi Uyaran Ligand (TRAIL) ve Hücre Ölüm Reseptörleri	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER	17
3.1.1. Cihazlar	17
3.1.2. Kimyasal Maddeler	18
3.2. ÖRNEKLERİN SAĞLANMASI VE KULLANILAN YÖNTEMLER	19
3.2.1. Sitogenetik Çalışmalar	20
3.2.2. Moleküler Genetik Çalışmalar	24
3.2.2.1. DNA Eldesi	24
3.2.2.2. Hücre Ölüm Reseptörü-4 (DR4) Genindeki Polimorfizmlerin İncelenmesi	26
3.2.2.2.1. Primer Seçimi	26
3.2.2.2.2. DR4 Geni 3., 4. ve 5. Ekzonların PCR ile Amplifikasyonu	28
3.2.2.2.3. RFLP Tekniği ile DR4 Geni 3., 4. ve 5. Ekzon PCR Ürünlerinin Kesimi	29
3.2.2.2.4. DR4 Geni 10. Ekzonun ARMS Yöntemi ile Amplifikasyonu	30
3.2.2.2.4.1. DNA Dizi Analizi	32
3.2.2.2.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	34
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	36
4. BULGULAR	37
4.1. Sitogenetik Bulgular	39

Sayfa No.

4.1.1. Doku Kültürlerinden Elde Edilen Sitogenetik Bulgular 39
4.1.2. Kan Kültürlerinden Elde Edilen Sitogenetik Bulgular 45
4.1.2.1. Normal Besiyerinde Kültüre Edilen Kan Dokularında Saptanan Sitogenetik Bulgular 45
4.1.2.2. Folik Asitten Yoksun Besiyerinde (M199) Kültüre Edilen Kan Dokularında Saptanan Sitogenetik Bulgular 52
4.2. Moleküler Genetik Bulgular 67
4.2.1. DR4 Geni Ekzon 3, 4 ve 5'deki Polimorfizmlerin PCR-RFLP Tekniği ile Değerlendirilmesi 68
4.2.2. DR4 Geni Ekzon 10'daki A1322G Polimorfizmin ARMS Tekniği ile Değerlendirilmesi 72
4.2.3. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 75
5. TARTIŞMA 78
5.1. Sitogenetik 79
5.2. Moleküler Genetik 86
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 90
7. KAYNAKLAR 91
EKLER 98
EK-1 98
EK-2 99
EK-3 100
EK-4 103
EK-5 106
ÖZGEÇMİŞ 107

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa No.
Şekil 2.1.	2007 yılında ABD'inde beklenen kanser ölüm oranları	3
Şekil 2.2.	1975-2003 yılları arasında erkek ve kadınlarda gözlenen kanser ölüm oranları ile kadınlarda akciğer ve bronş kanserlerindeki artışı gösteren şematize şekil.	4
Şekil 2.3.	Akciğer kanserli bir olguya ait akciğer radyografisi	8
Şekil 2.4.	Akciğer dokusunun MR ile görüntülenmesi	9
Şekil 2.5.	Bronkoskopi çeşitleri a) Rigid bronkoskopi, b) Fiberoptik bronkoskopi	10
Şekil 2.6.	TRAIL ve hücre ölüm reseptörleri	14
Şekil 2.7.	TRAIL ve hücre ölüm reseptörleri aracılığı ile hücrenin apoptoza gitmesini sağlayan hücre içi yolak	15
Şekil 4.1.	Hasta grubunda gözlenen kromozom anomalilerinden bazılarının kısmi metafaz görüntüleri	43
Şekil 4.2.	Hasta grubunda saptanan gonozomal ve otozomal sayısal kromozom anomalilerinden bazıları	47
Şekil 4.3.	Yaş gruplarına göre hücre başına düşen frajilite sayılarının dağılımı	55
Şekil 4.4.	Hasta-kontrol gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği	59
Şekil 4.5.	Hasta grubunda saptanan frajil bölgelerin bazılarının kısmi metafaz görüntüleri	60
Şekil 4.6.	NSCLC-kontrol gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği	61
Şekil 4.7.	SCLC-kontrol gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği	63
Şekil 4.8.	NSCLC ve SCLC gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği	65
Şekil 4.9.	Hasta ve kontrol gruplarında kan ve serum DNA konsantrasyonlarının dağılımı	67
Şekil 4.10.	PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen DR4 geni ekzon 3,4, ve 5 polimorfizmlerini gösteren %10'luk poliakrilamid jel görüntüsü, a) DR4 geni ekzon 3 için, normal: 230 bç, heterozigot: 230-160-70 bç, homozigot: 160-70 bç; b) ekzon 4 için, normal: 164-56 bç, heterozigot: 220-164-56 bç, homozigot: 220 bç; c) ekzon 5 için, normal:110-91 bç; heterozigot: 201-110-91 bç, homozigot: 201 bç.	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

		Sayfa No.
Şekil 4.11.	ARMS yöntemi ile belirlenen DR4 geni ekzon 10 polimorfizmini gösteren %10'luk poliakrilamid jel görüntüsü (internal kontrol 427 bç; AA genotipinde sadece A allelinde 254 bç'lik bir bant; AC genotipinde her iki allelde 254 bç'lik bant; 24 ve 38. vakalarda her iki allelde de amplifikasyon yok)	74
Şekil 4.12.	H24 ve H38'in dizi analizi sonucunda elde edilen ekzon 10 dizisinin kısmi elektroforegram görüntüsü	76
Şekil 4.13.	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) veri tabanına göre elde edilen görüntüler (a) 24 no'lu hastaya ait görüntü, (b) 38 no'lu hastaya ait görüntü	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa No.
Çizelge 2.1.	Akciğer kanserinde risk faktörleri	5
Çizelge 3.1.	DR4 gen bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan primerler	26
Çizelge 3.2.	DR4 genindeki 3., 4., 5. ve 10. ekzonlar ile internal kontrol için seçilen amplifikasyon bölgeleri, primerleri gösteren nükleotid dizileri, polimorfizmlerin gözlendiği nükleotid bölgeleri ve enzim kesim bölgeleri	27
Çizelge 3.3.	DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzonlar için optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu	28
Çizelge 3.4.	DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzonlar için optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR programındaki ısı döngüleri; (a) 3. ve 4. ekzonlar, (b) 5. ekzon için	29
Çizelge 3.5.	DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzonları için hazırlanan kesim reaksiyonu karışımları	30
Çizelge 3.6.	DR4 geni 10. ekzon için optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu	31
Çizelge 3.7.	DR4 geni 10. ekzon için optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR programındaki ısı döngüleri	32
Çizelge 3.8.	Dizi analizi için kullanılan 4.primer, amplifiye edilen 299 bç'lik bölge ve 1322. nükleotid bölgesi	32
Çizelge 3.9.	DR4 geni 10. ekzon'daki 299 bç'lik bölgenin çoğaltılmasında hazırlanan reaksiyon karışımı (a) ile optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR programındaki ısı döngüleri (b)	33
Çizelge 3.10.	(a) Dizi analizinde kullanılan reaksiyon karışımı, (b) Thermal cycler programı	33
Çizelge 4.1.	Hasta ve kontrol gruplarının yaş dağılımı	37
Çizelge 4.2.	Akciğer kanserli hasta-kontrol gruplarına ait demografik özellikler	37
Çizelge 4.3.	Hastaların patoloji sonuçlarına göre sınıflandırılması	38
Çizelge 4.4.	Akciğer kanser tipine göre hasta grubunun demografik özellikleri	39
Çizelge 4.5.	Akciğer kanserli hastaların malign ve normal akciğer dokularında gözlenen yapısal ve sayısal kromozom düzensizlikleri	40
Çizelge 4.6.	Akciğer kanserli hasta grubu ile kontrol grubunun lenfosit hücrelerinde gözlenen yapısal ve sayısal kromozom düzensizlikleri	48

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

		Sayfa No.
Çizelge 4.7.	Hasta ve kontrol gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, hücre başına düşen frajil bölge sayısı, nisbi oranı ve önemlilik sırası	57
Çizelge 4.8.	NSCLC ile kontrol gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, populasyondaki sıklığı, nisbi oranı ve önemlilik sırası	62
Çizelge 4.9.	SCLC ile kontrol gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, populasyondaki sıklığı, nisbi oranı ve önemlilik sırası	64
Çizelge 4.10.	NSCLC ve SCLC gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, populasyondaki sıklığı, nisbi oranı ve önemlilik sırası	66
Çizelge 4.11.	Hasta-kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 3, G422A polimorfizmlerinin dağılımı	70
Çizelge 4.12.	Hasta-kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 4, C626G polimorfizmlerinin dağılımı	70
Çizelge 4.13.	Hasta-kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 5, A683C polimorfizmlerinin dağılımı	71
Çizelge 4.14.	Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 3, G422A polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi	71
Çizelge 4.15.	Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 4, C626G polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi	72
Çizelge 4.16.	Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 5, A683C polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi	72
Çizelge 4.17.	Hasta-Kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 10, A1322G polimorfizmlerinin dağılımı	73
Çizelge 4.18.	Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 10, A1322G polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi	74
Çizelge 4.19.	H24 ve H38'in dizi analizi sonucunda elde edilen ekzon 10 dizisi	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ABCC5	ATP-Bağlama Bölgesi, Alt Ailesi C (CFTR/MRP), üye 5 [ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5]
ace	Asentrik Kromozom
AK	Akciğer Kanseri
APS	Amonyum Per Sülfat
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ASNS	Asparajin Sentaz Geni
BAC	Bronkoalveolar Adenokarsinom
BCL6	B-cell CLL/Lymphoma 6 Geni
BCL10	B-cell CLL/Lymphoma 10 Geni
bç	Baz Çifti
BP2	Kan Basıncı QTL 2 Geni (Blood Pressure QTL 2 Gene)
BRCA3	BRCA3 Geni
BSA	Sığır Serum Albumin
BT	Bilgisayarlı Tomografi
C	Sitozin
°C	Derece
CD9	CD9 Molekülü
CDC7L1	CDC7-İlişkili Protein Kinaz
CGH	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (Comparative Genomic Hybridization)
chtb	Tek Kromatid Kırığı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

cm^2	Santimetrekare
CO_2	Karbondioksit
ctb	Kromozom Kırığı
CYP19	İnsan Aromataz Sitokrom P450 Geni (Human Aromatase Cytochrome P450 Gene)
CYP2D6	Sitokrom P450, Aile 2, Alt Aile D, Polipeptid 6 Geni (Cytochrome P450, Family 2, Subfamily D, Polypeptide 6 Gene)
DBM	Dopamin Beta-Hidroksilaz Geni (Dopamine Beta-Hydroxylase Gene)
DcR1	Tuzak Reseptör 1 (Decoy Reseptor 1)
DcR2	Tuzak Reseptör 2 (Decoy Receptor 2)
del	Delesyon
DISC	Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi (Death-inducing Signaling Complex)
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
DOC-2	Farklı Şekilde Eksprese Olmuş Protein 2 Geni (Differentially-Expressed Protein 2 Gene)
DR4	Ölüm Reseptörü 4 (Death Receptor 4)
DR5	Ölüm Reseptörü 5 (Death Receptor 5)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	Ethidiyum Bromür
F	Forward Primer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

FADD	Ölüm Domainli, Fas ile İlişkili Protein (Fas-Associated protein with Death Domain)
FB	Frajil Bölge
FHIT	Fragile Histidin Triad
FISH	Floresan *In Situ* Hibridizasyon (Fluorescence *In Situ* Hybridization)
G	Guanin
GPI	Glikofosfatidil İnozitol
GTG	Giemsa ve Tripsinle G Bantlama (G-bands by Trypsin using Giemsa)
H	Hasta
h	Heterokromatin
HCl	Hidroklorik Asit
hMLH1	İnsan mutL Homolog 1 Geni (Human mutL Homolog 1 Gene)
HNSCC	Baş ve Boyun Skuamöz Hücre Karsinomu (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma)
i	İzokromozom
K	Kontrol
KCl	Potasyum Klorid
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LOH	Heterozigosite Kayıbı (Loss of Heterozygosity)
M	Molar
mar	Marker Kromozom
MAX	Faktör X ile İlişkili MYC Geni (MYC Associated Factor X)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

M-FISH	Multicolor Floresan *In Situ* Hibridizasyon (Multicolor Flourescence *In Situ* Hybridization)
mg	Miligram
$MgCl_2$	Magnezyum Klorid
MKK	Multi Kromozom Kırıkları
ml	Mililitre
MLL	Miyeloid/Lenfoid Lösemi (Myeloid/Lymphoid Leukemia)
mM	Milimolar
MR	Magnetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MYCL1	V-myc MyelositomatozViral Onkogen Homoloğu 1 Geni (V-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog 1 Gene)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NaCl	Sodyum Klorid
NF-Kb	Nuklear Faktör-Kappa B
ng	Nanogram
NSCLC	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (Non-Small-Cell Lung Cancer)
OPG	Osteoprotegerin
p	Kromozomun Kısa Kolu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
pH	Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

pmol	Pikomol
PMS2L	Mayotik Bölünme Sonrası Artan Segregasyon 2-Benzeri 1 Geni (Postmeiotic Segregation Increased 2-like 1 Gene)
PPP2R1B	Protein Fosfataz 2, Regüle Edici Alt Ünite A, Beta İzoform (Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit A, Beta Isoform)
Ps	Akrosentrik Kromozomun Kısa Kolunda Bulunan Satellit
PTEN/MM AC1	Fosfataz ve Tensin Homoloğu (Birçok İlerlemiş Kanser Tipinde Mutasyona Uğramış) [Phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers)]
Q	Kromozomun Uzun Kolu
Qh	Kromozomun Uzun Kolundaki Heterokromatin Bölgesi
R	Reverse Primer
RASSF1	Ras ile İlişkili (RalGDS/AF-6) Domain Ailesinin Birinci Üyesi [Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 1]
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RB1	İnsan Retinoblastoma Duyarlılık Geni (Human Retinoblastoma Suspectibility Geni)
RBM1	RNA Bağlı Motif Protein 1 Geni
SCLC	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (Small-Cell Lung Cancer)
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
SKP2	S-Faz Kinaz ile İlişkili Protein 2 (p45) [S-Phase Kinase-Associated Protein 2 (p45)]
Sn	Saniye
t	Translokasyon
T	Timin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TE-9	Tris EDTA pH:9
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilen-Diamin
ter	Kromozomun Terminal Kısmı
TKG	Tanısı Konulamayan Grup
TNF	Tümör Nekroz Faktör (Tumor Necrosis Factor)
TP53	Tümör Protein p53
TP73	Tümör Protein p73
TPHO	Thrombopoietinden Sorumlu Gen (Gene for Thrombopoietin)
TRAIL	TNF ile İlişkili Apoptozisi Uyaran Ligand (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand; Apo2L/TRAIL)
TSG11	Kromozom 11 Üzerindeki Tümör Süpressör Gen (Tumor Suppressor Gene on Chromosome 11)
U	Ünite
VHL	von Hippel-Lindau tümör supressör geni
Zn	Çinko

ÖZET

AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA GÖZLENEN KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLER İLE HÜCRE ÖLÜM RESEPTÖRÜ-4 GENİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN İNCELENMESİ

Akciğer Kanseri (AK), genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra gelen ve kanser ölümlerinin %28'ini oluşturan multifaktoriyal bir hastalıktır. Hastalık, yaşla artmakla beraber, en sık 50-70'li yaşlarda kendini göstermektedir. Temel neden sigara kullanımı olup, sigara dumanına maruziyet, radon, mesleki nedenler, diyet, kronik akciğer hastalıkları, hava kirliliği, cinsiyet ve genetik faktörler de hastalığın gelişiminde etkendir. Bugüne kadar, AK'nden sorumlu herhangi bir gen veya kromozom bölgesi tanımlanmamıştır. Ancak, tümör oluşumlarında sayısız kromozom düzensizliklerinin meydana geldiği bilinmektedir.

Canlılarda hücre ölüm reseptörü-4 (DR4) olarak isimlendirilen transmembran bir reseptör aracılığı ile hücresel ölümün gerçekleştiği bilinmektedir. Sekizinci kromozomun p21-22 bölgesinde yerleşik olup çeşitli kanser türlerinde bu bölgenin allelik kayıplarının olduğu bildirilmiştir. Bu reseptörü kodlayan gende meydana gelen herhangi bir anomali, hücre sinyalizasyonunu etkileyerek hücre ölümünün gerçekleşememesi ve dolayısıyla kanserleşme ile sonuçlanır. Bu gendeki dört ayrı polimorfizimin (G422A, C626G, A683C ve A1322G) AK ve diğer kanserlerin gelişiminde etkili olduğu gibi kemoterapötik ilaçlarla birlikte hastalığın tedavi şeklinin belirlenmesinde de etkilidir.

Çalışmamızda; Ç.Ü. Göğüs Hastalıkları Polikliniğinde AK ön tanısı ile gelen 60 hasta birey ile sigara kullanan ancak herhangi bir akciğer rahatsızlığı geçirmemiş 30 sağlıklı birey hem sitogenetik hem de DR4 gen polimorfizmleri açısından tarandı. Sitogenetik çalışmalarda standart prosedürler uygulanmış olup, DR4 gen polimorfizmlerin belirlenmesinde PCR-RFLP ve PCR-ARMS tekniklerinden faydalanıldı. Gerektiği yerde dizi analizine başvuruldu.

Çalışmamızda; doku ve kan sitogenetiğinde 1p36, 1q23, 1p33, 1q11, 1q31, 3p, 7p, 7q22, 9p, 9q, 10p, 10q22, 10q24, 11p12-13, 11q21, 11q23, 12q13, 12q15, 12q24 ve Xq26 kromozomal bölgeleri AK'nde önemli kritik bölgeler olarak kaydedildi. Bunun yanı sıra hem cinsiyet hem de otozomal kromozom anöploidileri de sık rastalanan anomaliler şeklinde bulundu. Bu nedenle, AK'nden sorumlu genleri araştırırken bu kromozomal bölgeler ile cinsiyet kromozomlarının araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Hasta ve kontrol grubunun DR4 gen polimorfizmlerine baktığımızda, her iki grubun G422A ve C626G değişimlerini büyük oranda heterozigot olarak taşıdığı belirlendi (Sırasıyla her iki bölge için %56,7 ve %40). A683C ve A1322G açısından ise her iki grubun, her iki bölge için yüksek oranda AA genotipini

taşıdığı saptandı (sırasıyla A683C için %68,3 ve %70; A1322G için %88,3 ve %80). Her dört bölge için hasta-kontrol karşılaştırılması yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi (p>0,05). Ancak ekzon 5'in A683C bölgesinde CC genotipinin ve ekzon 10'un A1322G bölgesinde GG genotipinin önemli olabileceği, normal TRAIL sinyalizasyonu oluşturarak TRAIL dirençliliği oluşturmadığı ve AK tedavisinde kemoterapötik ilaçlarla birlikte TRAIL'in tedavideki etkisini arttırdığı söylenebilir. Bu nedenle daha fazla hasta ve diğer ekzon bölgelerin çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Kromozom, Gen, Frajil Bölge, Kromozom Düzensizlikleri, Hücre Ölüm Reseptörü-4.

ABSTRACT

INVESTIGATION of CHROMOSOMAL ABERRATIONS and CELL DEATH RECEPTOR-4 POLYMORPHISMS IN LUNG CANCER PATIENTS

Lung cancer (LC) is the most common cause of death after hearth diseases and constitute 28% of cancer deaths and is a multifactorial disease. It increases with aging and most frequently occurs at 50-70 years. The most common cause of LC is smoking but also exposed to smoke, radon, working causes, diet, chronic lung diseases, air pollution and sex. Genetic factors are also effective in development of LC. So far, it was not identified any gene of chromosomal region responsible from LC. It is known that innumerable chromosomal aberration occurs in tumor progression.

In organisms, it was known that cellular death occurs through a transmembrane protein called cell death receptor-4 (DR4). It is located at 8p21-22 region and allellic losses of this region was reported previously in various cancer type. Some abnormalities in gene coded this protein effect cell signalization and result with not cell death and cancer development. Four different polymorphisms (G422A, C626G, A683C ve A1322G) occured in this gene are effective in development of LC and other cancers, and determination the therapy form with chemotherapeutic drugs.

In our study, 60 patients refered to University of Çukurova, Faculty of Medicine, Chest Diseases Polyclinic for LC pre-diagnosis and 30 controls who are smoker, healthy and not having any lung diseases were scanned cytogenetically and DR4 gene polymorphisms were also analysed. In cytogenetic studies, standard cytogenetic procedures were applicated. For determination of DR4 gene polymorphisms, PCR-RFLP and PCR-ARMS technics were used. Sequence analysis was applied if necessary.

In our study, hot spots at 1p36, 1q23, 1p33, 1q11, 1q31, 3p, 7p, 7q22, 9p, 9q, 10p, 10q22, 10q24, 11p12-13, 11q21, 11q23, 12q13, 12q15, 12q24 and Xq26 regions were reported after tissue and blood cytogenetic analysises. Also, sex and autosomal chromosome aneuploidies were found frequently. Thus, it was thought that this chromosomes and regions should be investigated first for identifing genes responsible from LC.

When we looked the DR4 gene polymorphisms in patient and control groups, it was found that they have carried the G422A and C626G heterozygote frequently (56,7% ve 40% for the two region, respectively). For A683C and A1322G, it was seen that the both groups carried AA genotype at these regions in high proportion (for A683C, 68,3% and 70%; for A1322G, 88,3% and 80%,

respectively). There is not any significant differences for the four regions (p>0,05). But CC genotype in exon 5, for A683C region, and GG genotype in exon 10, for A1322G region may be important, and can be said that these genotypes may do normal TRAIL signalization rather than TRAIL resistance; thus, these genotypes may increase the TRAIL efficiency with chemotherapeutic drugs in LC treatment. Because of these reasons, it was thought that most of patients and other exons should be analyzed.

Key words: Chromosome, Gene, Fragile Sites, Chromosomal Abnormalities, Cell Death Receptor-4

1. GİRİŞ

Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin yerel ve/veya uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümeleri sonucu oluşan habis hastalıklar grubudur. Normalde hücreler, belli bir kontrol altında ihtiyaca göre bölünerek büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalırlar, diğer taraftan programlı hücre ölümü ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurlar. Büyüme faktörleri normalde, DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler, mutasyona uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlar ise kanser durumu ortaya çıkar.

Kanser, önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu olup, ölüm nedeni olarak kalp ve damar hastalıklarından hemen sonra gelmektedir. Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere tutulmaktadır. Ülkemizde, kesin istatistikler bulunmamakla birlikte insidansın bunun yarısı kadar olduğu tahmin edilmektedir. Yurdumuzda; en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas, kadınlarda ise meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir. Deri kanseri sıklığı, her iki cinste de yüksek olmakla birlikte, habis melanom dışındaki deri kanserleri tedaviye iyi cevap verdiklerinden ölüm oranı çok düşüktür[1].

Akciğer kanseri (AK), akciğer dokusunun malignant transformasyonu (habis - kötücül- değişime uğraması) ve yayılması (metastazı) nedeniyle oluşan kanser türüdür. Tüm kanser türleri arasında en ölümcül kanser türü olan AK'nden dünya çapında her yıl yaklaşık olarak üç milyon insan yaşamını yitirmektedir. Tüm kanser ölümlerinin %28'i (erkeklerde %35, kadınlarda %26) AK nedeniyle oluşmaktadır[2].

AK gelişiminden %94 oranında sigara sorumludur. Sigara içenlerde AK riski içmeyenlerden 24-36 kat daha fazladır. Pasif sigara içiminde risk %3.5'tir. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi (filtreli, filtresiz, puro, düflük tar ve nikotin içeriği, vb.) AK gelişme riskini etkiler. AK gelişiminde etkili olduğu belirtilen yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalığı, diyet, viral infeksiyonlar, genetik ve immünolojik faktörlerin tümü %6 oranında etkilidir[3]. AK insidansı yaşla artmakta, altıncı-yedinci dekadlarda pik yapmaktadır. Genç erişkinlerde (50 yaş altında %5-10 dolayında) sıklığı daha azdır, genellikle aile öyküsü vardır ve adenokarsinom en sık izlenen kanser tipidir. Ancak, ülkemizde gençlerde adenokarsinom yaşlılara göre daha fazla izlenmekle

birlikte en sık izlenen kanser tipi skuamöz hücreli kanserdir. Kadınlarda, sigara alışkanlığındaki artışa paralel olarak AK sıklığı da artış göstermektedir[3].

AK, multifaktoriyel kalıtım gösteren bir hastalıktır. Çevre faktörlerinin yanı sıra genetik faktörler de AK gelişimde etkilidir. Bugüne kadar, AK'nde birçok genetik bozukluk tanımlanmış olmakla beraber, spesifik bir kromozomal bulgu henüz bildirilmemiştir[4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14].

Apoptoz, çok hücreli organizmaların gelişimi ve normal hücresel farklılaşması sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölüm şeklidir. Tümör nekroz faktör (TNF) ailesindeki TNF ile Fas ligandlarını da içeren ve reseptörlerindeki ölüm domainleri vasıtası ile etkilerini gösteren belirli sitokinler tarafından uyarılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; TNF ailesinin yeni bir üyesi tanımlanmış ve TNF ile ilişkili apoptozisi uyaran ligand (TRAIL) olarak adlandırılmıştır[15]. Bu liganda özgü olan DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 reseptörleri hücrenin ölüme gitmesi veya canlılığının devam ettirilmesi açısından önemlidir[16,17,18,19].

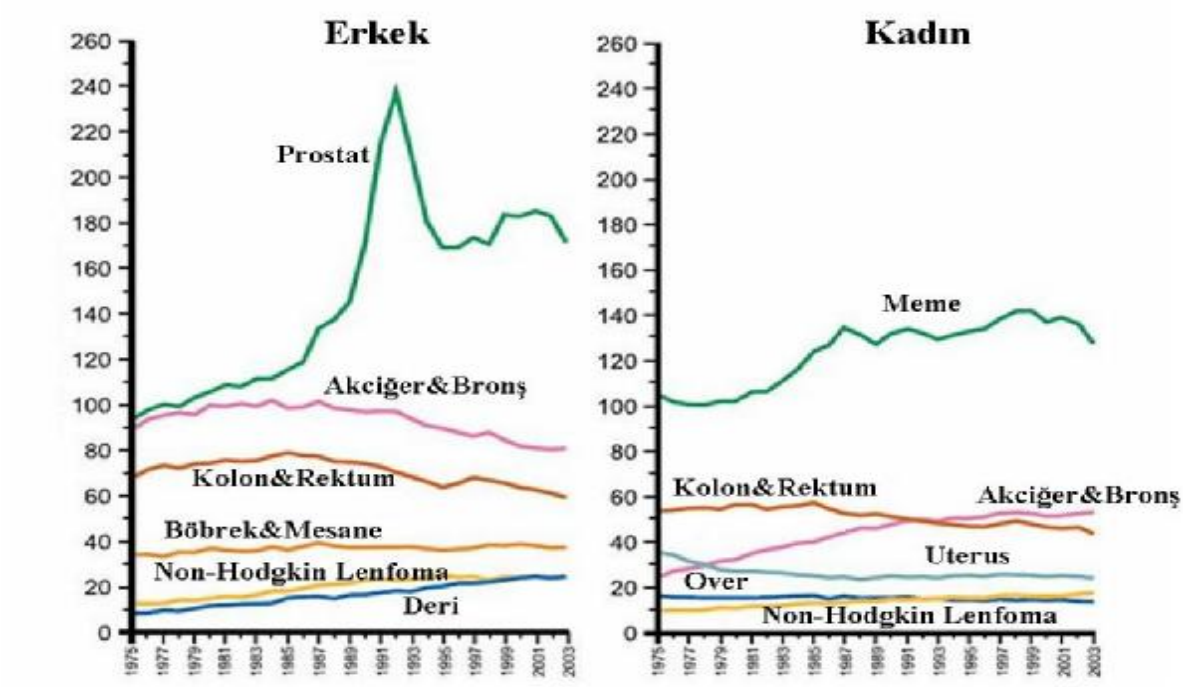
Bu çalışmada, AK'li vakalarda sayısal ve yapısal kromozom bozuklukları ile frajil bölgelerin belirlenmesi, bulguların bugüne kadar yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması ve önemli sıcak noktaların belirlenmesi ile patolojik tanı öncesinde yardımcı parametrelerin sağlanması amaçlandı. Bunun yanı sıra, hücre ölüm reseptörü-4 gen polimorfizmleri ile AK arasındaki ilişkinin belirlenmesi, apoptoz ile ilişkilendirilmesi ve buna bağlı olarak hem tedavinin şeklinde hem de farmakoloji sektöründe tedaviye yönelik çeşitli ilaçların üretimi ve tedavide bu ilaçların gelecekte kullanılabilir hale getirilmesine yardımcı olmak amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Akciğer kanseri (AK), 1900'lü yılların başında nadir gözlenen bir hastalık iken, günümüzde sıklığı artan önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Sigara tüketiminin arttığı son yıllarda AK'lerinde ciddi bir artış gözlenmiştir. Genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan AK, kanser ölümlerinin %28'ini oluşturmaktadır. 2007 yılında ABD'nde tahmini kanser vaka sayısı 1.444.920 ve bunun %14.76'sının (213.380 kişi) yeni AK vakası olduğu bildirilmiştir. AK nedeniyle toplam 160.390'dan fazla ölüm beklendiği de rapor edilmiştir[2] (Şekil 2.1). AK'nin 5 yıllık sağ kalım oranı %14'dür. Erken evre (evre 0 veya evre 1A) küçük hücreli olmayan AK'li hastaların 5 yıllık sağkalım oranı ise %80'dir. Geçtiğimiz son iki dekatta kullanıma giren fotodinamik terapi, elektrokoter ve lazer terapi gibi bir çok endobronşiyal tedavi yöntemleri merkezi hava yollarındaki küçük preinvazif AK'ni yok edebilmektedir. Oysa, hastaların çoğunun semptomatik olduğu ve doktora başvurduğu dönemde hastalık ilerlemiş ve ameliyat edilemez duruma gelmiş olmaktadır. Bu dönemde bu tip tedavi yöntemleri hastaya fayda sağlayamaz. Bu nedenle preinvazif AK'ni erken dönemde belirleyip lokalize edebilen yöntemlere ihtiyaç vardır[20].



Şekil 2.1. 2007 yılında ABD'inde beklenen kanser ölüm oranları



Şekil 2.2. 1975-2003 yılları arasında erkek ve kadınlarda gözlenen kanser ölüm oranları ile kadınlarda akciğer ve bronş kanserlerindeki artışı gösteren şematize şekil.

AK insidansı, yaşla artan bir hastalık olup en sık 50-70 yaşlarında görülmektedir. AK gelişmiş ülkelerde erkek kanser ölümlerinde önde gelen nedenlerdendir. Kadınlar için insidansı da sigara içiminin artışına bağlı olarak hızlı bir şekilde artmaktadır[21,22] (Şekil 2.2). Türkiye'de 2003 yılında, genel kanser insidansı Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi'nin raporuna göre 70.32/100 000'dir. AK insidansı, Türkiye genelinde 11.04/100 000'dir[23]. Dünya geneline bakıldığında, AK erkekler arasında en yüksek olarak Türkiye'de görülmektedir. Olguların çoğunda sigara öyküsü olması ve sigara içme oranlarında artış nedeni ile ülkemizde AK epidemisi yaşandığını söylemek gerçekçi bir yaklaşım olacaktır.

2.1. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi

AK'nin nedeni birçok faktöre bağlı olmakla beraber hastaların %85-90'ında sigara içiminin varlığı, sigaranın önemini göstermektedir. Ülkemiz verilerine göre; AK saptanan hastaların %91.5'inin sigara içtiği saptanmıştır[24]. Sigara dumanı partikül ve gaz fazından oluşmakla beraber 4000'den fazla kanserojen madde içermektedir. Sigara

sayısı ve içim süresi arttıkça risk artmakta, bırakıldıktan sonra 5. yıldan itibaren risk azalmaktadır. Sigaranın içinde bulunan karsinojenlerin miktarı ve inhalasyon derinliği de riski arttırmaktadır. Bununla beraber AK riski sadece aktif içicilerde değil, pasif olarak sigaraya maruz kalanlarda da yüksek olarak bulunmuştur[25].

Sigara içimi dışında diğer bazı risk faktörleri de söz konusudur (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Akciğer kanserinde risk faktörleri

Risk Faktörleri
Sigara içimi
Pasif sigara maruziyeti
Radon
Genetik faktörler
Mesleki nedenler
Cinsiyet
Diyet
Kronik akciğer hastalıkları
Hava kirliliği

Son yıllarda, radon etkin bir neden olarak karışımıza çıkmaktadır. Bunun dışında arsenik, asbest, kromatlar, klorometil eter, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve doğadaki yanıklar sonucunda açığa çıkan maddelerin inhalasyonu AK etiyolojisinde düşünülmektedir. Ailesinde AK olan ve sigara içmeyenlerde riskin 2-6 kez arttığı bildirilmiştir[24]. Bu durumda en riskli grup ailesinde kanser, özellikle AK hikayesi olup sigara içen kişilerdir. Son yıllarda, gelişmiş ülkelerde kadınlarda artan AK oranları kadınların AK'ne daha duyarlı olduklarını düşündürmektedir. Yapılan hesaplamalara göre; 2030 yılında AK sıklığı kadınlarda erkeklere göre daha fazla olacaktır. Bu durum artan sigara alışkanlığı ve kadınların daha duyarlı olmaları ile açıklanmaktadır[24].

Geçirilmiş akciğer hastalıkları; tüberküloz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), silikozis ve fibrozis alanları bir başka risk faktörünü oluşturur. Daha önce geçirilmiş AK hikayesi ve radyasyon da etiyolojide önemlidir. Bunun yanı sıra, sanayileşmiş toplumlarda fabrika bacalarından, otomobil egzoslarından çıkan ve havada bulunan gazlar tek başına karsinojenik olmamakla beraber sigaranın karsinojenik etkisini arttırmaktadır[20].

Diyet çalışmalarında, diyette sebze ve meyva miktarı arttıkça AK riskinde azalma gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda yüksek beta karoten düzeyinin AK riskini azalttığı belirtilmiştir[24,25].

2.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

AK, **küçük hücreli olmayan AK (non-small-cell lung cancer, NSCLC)** (%75-85) ve **küçük hücreli AK (small-cell lung cancer, SCLC)** (%15-25) olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadır. Küçük hücreli olmayan AK ise skuamöz hücre karsinomu, adenokarsinom ve büyük hücre karsinomu olmak üzere 3 alt grupta incelenmektedir[26].

A) Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

1. **Skuamöz Hücre Karsinomu:** Epidermoid karsinom olarak da adlandırılır. ABD'de tanı konulan AK'lerinin %30-35'ini oluşturur. En sık erkeklerde ve yaşlı bireylerde görülür. Genellikle, ana bronşlardan birinde başlar ve yavaş büyüme eğilimi sergiler. Diğer AK tiplerine göre göğüste daha uzun süreli lokalize olur. Erken dönemde metastaz eğilimi göstermez. Sigara kullanımıyla yüksek oranda ilişkilidir.
2. **Adenokarsinom:** ABD'deki AK olgularının %40'ını oluşturur. Kadınlarda görülen en yaygın AK olup yeni olgu sayısı giderek artmaktadır. Genellikle akciğerin dış kısımlarında başlar. Vücudun diğer kısımlarına yayılabilir. Bronkoalveolar adenokarsinom (BAC) gibi alt tipi vardır.
3. **Büyük Hücre Karsiomu:** ABD'de tanı konulan AK'lerinin %5 ila %15'ini oluştururlar. Genellikle küçük bronşlarda başlar. Akciğerin herhangi bir kısmında ortaya çıkabilirler. Tanı konulduğunda genellikle büyüktür. Göğüs kemiğinin arkasına ve merkezi sinir sistemine yayılma eğilimi gösterirler. Diğer AK tiplerine göre daha büyük hücrelere sahip olduğu için büyük hücreli olarak adlandırılmıştır.

B) Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

AK'lerinin en kötü prognozlu olanıdır. Normal lenfositlerin yaklaşık iki katı büyüklüğünde olan hücrelerden oluşur. Hemen yalnızca çekirdekten oluşmuş gibi duran bu hücreler, kolayca zedelenebilir bir yapı gösterirler ve biyopsi işlemi sırasında

kolayca ezilerek tanınmaz duruma gelebilirler. Nükleolus genellikle belirsizdir. Balgam örneklerinde tanınmaları daha kolay olabilir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde sitoplazmalarında nörosekretuar granüller saptanan bu hücrelerin bir başka morfolojik özelliği de komşu hücrelerin birbirleri üzerinde iz bırakmasıdır. Küçük hücreli karsinoma neredeyse yalnızca sigara tiryakilerinde görülen bir tümördür. Bu olgularda, aşırı kilo kaybı, hiponatremi ve Cushing sendromu gibi paraneoplastik sendromların sıklığı da diğer tiplere göre daha yüksektir. Mediyastinal yapıların tutulumu çok sıktır. Karın organları, kemikler ve beyinde tanı anında metastaz bulunması şaşırtıcı değildir. Tanı konduğu sırada metastazı olan ve tedavi edilemeyen veya tedaviyi kabul etmeyen hastalar birkaç hafta içerisinde kaybedilirler[27].

2.3. Akciğer Kanserinde Tanı Yöntemleri

AK'nde tanı genel anlamda 4 aşamada gerçekleşir:

a) Anamnez ve fizik muayene

b) Biyokimyasal tetkikler

c) Radyolojik incelemeler

-Postero-anterior, lateral akciğer grafileri, floroskopi

-Ultrasonografi

-Bilgisayarlı tomografi (BT) (Spiral, konvansiyonel, yüksek rezolüsyonlu)

-Nükleer tıp yöntemleri [Talyum 201, Galyum 67, Teknesyum 99 sintigrafileri, Pozitron emisyon tomografisi (PET)]

-Manyetik rezonans görüntüleme (MR)

d) Sitolojik ve histolojik inceleme

-Balgam sitolojisi

-**Bronkoskopi** (Bronş biyopsisi, endobronşiyal iğne aspirasyonu, transbronşiyal iğne aspirasyonu, bronş lavajı, fırçalama, transbronşiyal biyopsi)

-Transtorasik ince iğne aspirasyonu ve biyopsisi

-Plevra sıvı aspirasyonu ve plevra biyopsisi

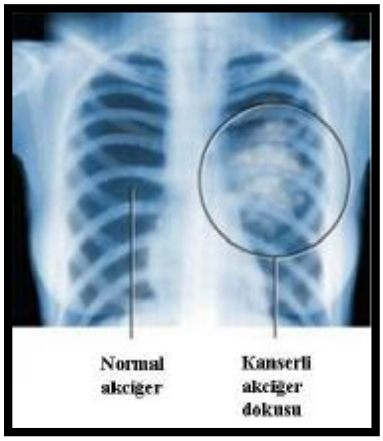
-Mediastinoskopi, mediastinotomi

-Torakoskopi, torakotomi

-Lenf nodu biyopsisi

Hastaların başvurularındaki semptom ve bulgular genellikle AK yönünden dikkat çekicidir. Öksürük ve balgam kronik sigara içicilerinde sık görülen bir semptom olmakla beraber, hastalarda son zamanlardaki öksürük ve balgam karakterindeki değişikliğin üzerinde durulması gerekmektedir. Hastalarda ayrıca balgamda kan, göğüste şüpheli ağrılar ve nefes darlığı şikayetleri olabilir. İştahsızlık, yorgunluk, kilo kaybı gibi sistemik semptomlar gözlenebilir. Fizik muayenede herhangi bir bulgu bulunmayabilir. Hastalarda omuz ve kol ağrısı olabilir. Vena kava süperior sendromu diğer önemli bir klinik görünüm olup, yüzde ve göz kapaklarında ödem, boyunda iki taraflı şişlik ve göğüs duvarında yüzeysel venlerin belirginleşmesi şeklinde karşımıza çıkar. Toraks muayenesinde var olan patolojiye göre bulgular ortaya çıkar. Atelektazi varlığında trake deviasyonu, supraklavikuler lenfadenopati, plevral sıvı varlığında sinüs kapalılığı, matite ve solunum seslerinde azalma ve endobronşiyal obstrüksiyon varlığında lokalize ronkus gibi bulgular bulunabilir. Uzak metastazlarla ilgili olarak metastazın olduğu bölgeye yönelik hepatomegali, kraniyal metastaz varsa başağrısı, baş dönmesi, kafa siniri çifti felçleri, kemik metastazında lokal kemik ağrıları ve deri metastazlarına ait görünümler ortaya çıkabilir.

AK'li hastaların sistemik veya lokal birçok semptomları olmasına rağmen çekilen akciğer radyografisi şüphe uyandırır (Şekil 2.3). Radyolojik bulgular gerçekten çok renkli olabilir. Soliter pulmoner nodül, pnömonik infiltrasyon, atelektazi, hiler dolgunluk, mediastinal genişleme, plevral sıvı varlığı, lokalize saydamlık artışı gibi değişik radyolojik görünümler görülebilir[24].



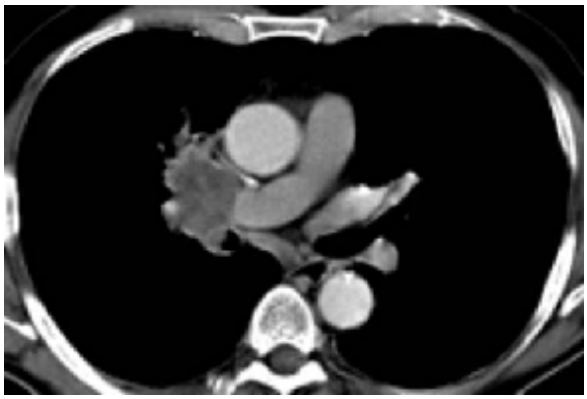
Şekil 2.3. AK'li bir olguya ait akciğer radyografisi

2.3.1. Bilgisayarlı Tomografi (BT)

Son yıllarda büyük gelişmelerin görüldüğü bilgisayarlı toraks tomografisi, AK ile uğraşan hekimlerin en önemli yardımcılarından biridir. Nodüler görünüm oluşturan arteriyövenöz malformasyon, yuvarlak atelektazi, mantar topu görünümü, mukus tıkaç ve infarktüs gibi lezyonların ayırt edilmesinde oldukça yararlı bir yöntemdir. Spiral tomografiyle 5 mm'ye kadar olan lezyonların görüntülenme olanağı ortaya çıkmıştır. BT, tümörün genel yapısı ve dağılımı hakkında fikir vermek dışında, hilus, mediasten lenf bezleri hakkında ve göğüs duvarıyla ilgili tutulum yönünden anlamlı sonuçlar sağlamaktadır. BT incelemesinin karaciğer ve sürrenal bezlere kadar genişletilmesi bu bölgelerdeki gizli metastazların gösterilmesini sağlar.

2.3.2. Magnetik Rezonans Görüntüleme (MR)

MR, son zamanlarda BT kadar kullanımı sıklaşan ve seçilmiş bazı durumlarda BT'ye üstünlüğü olan bir görüntüleme yöntemidir (Şekil 2.4). Yumuşak dokularda daha iyi görüntü özelliği sağlaması, birçok planda kesit özelliği olması, bundan dolayı süperior sulkus tümörlerinde, aortopulmoner pencerenin değerlendirilmesinde, kalp, büyük damarların daha ayrıntılı sınır özelliklerinin seçilebilmesi ve kalbin pulsasyon defektlerini ortadan kaldırması gibi nedenlerden dolayı tercih edilir. Mediasten, göğüs duvarı invasyonlarını, diyafragma ve spinal kanalı daha iyi görüntülemektedir. BT ile karşılaştırıldığında; akciğer parankimi hakkında daha az bilgi vermesi, daha pahalı olması dezavantajlarıdır[24].



Şekil 2.4. Akciğer dokusunun MR ile görüntülenmesi.

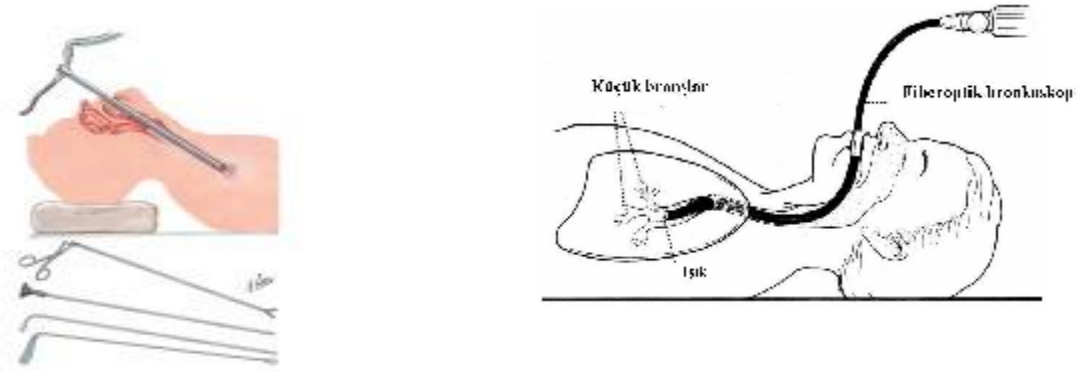
2.3.3. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET)

PET, uzun yıllardır bilinen bir yöntem olmasına rağmen, AK'lerinde 1990'lı yıllardan sonra kullanılmaya başlanmıştır. Halen çok yaygın kullanılan bir yöntem olmamakla beraber önümüzdeki yıllarda sık kullanım olanağı bulunacak bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Fluoro 18-2-deoxyglucose kulanılarak yapılan bir işlemdir. Önceden, radyografik görüntüleme sadece anatomik oluşumlarla sınırlıydı. PET'in gelişmesiyle hipermetabolik aktivite gösteren malign lezyonların metabolik aktiviteleri de değerlendirilmeye başlanmıştır. Son çalışmalar, bronş kanserinin evrelendirilmesinde PET'in BT'ye üstünlüğü olduğu gösterilmiştir. En iyi sonuç BT ve PET kombine edilerek elde edilmiştir. PET'in en önemli kısıtlılığı çok yaygın olmaması ve pahalı olmasıdır[24].

2.3.4. Bronkoskopi

Bronkoskopi, göğüs hastalıkları ve yoğun bakım klinikleri için vazgeçilmez bir tanı ve tedavi aracıdır. AK'nden şüphe edilen olgularda patoloğa incelenmek üzere materyal sağlanması, işlem sırasında trakeobronşiyal ağacın görülmesine olanak sağlaması, tanı ve tedavi kararı vermede çok fayda sağlamaktadır. Rigit ve fiberoptik olmak üzere 2 çeşit bronkoskopi vardır (Şekil 2.5). Rigit bronkoskop ile larinksten itibaren trakea ana bronş, lob bronşlarını görmek mümkün iken, fiberoptik bronkoskopi ile daha periferik segment ve subsegment bronşlarını incelemek ve materyal almak imkanı doğmaktadır[20].

a) b)



Şekil 2.5. Bronkoskopi çeşitleri a) Rigid bronkoskopi, b) Fiberoptik bronkoskopi

2.4. Akciğer Kanserinde Gözlenen Genetik Bozukluklar

Çoğu malignansilerin kromozomal anomaliler ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Lösemili ve bazı solid tümörlere sahip olan hastalarda, sitogenetik bulguların tanı markırları olarak kullanılması nedeniyle, araştırmacılar sitogenetik bulguları sınırlı olan birçok kanser tipine yönelmişlerdir. AK'nde de kromozomal bozukluklar elde edilmiş, özellikle SCLC'lerde belirli kromozomal anomaliler saptanmıştır. Ancak diğer akciğer tümörlerinde spesifik bir kromozomal bulgu henüz bildirilmemiştir.

Testa ve Graziano[4], inceledikleri her SCLC hastasında 3. kromozomun kısa kolunda (özellikle 3p21-25) kayıplara rastlamışlardır. Bu bölge, içerdiği tümör süpressör gen/genleri nedeniyle SCLC'in patogenezinde önemlidir. Araştırmacılar ayrıca SCLC hastalarında 5q21, 13q14 ve 17p13 bölgelerinde (sırasıyla APC, RBI ve TP53 süpessör genleri içermektedir) sitogenetik kayıplar kaydetmişlerdir.

Dave ve ark.[5]'ları, 96 tedavi görmemiş AK'li vaka ve 74 sağlıklı kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada; hastaların %15'inden fazlasında 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14 ve 21. kromozomlarda sayısal ve yapısal düzensizlikler saptamışlardır. Özellikle 7, 9 ve 21. kromozomlarda belirlenen anomalilerin kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, AK'li hastalar arasında bu kromozomların spesifik bölgelerinde kırık noktalarını göstermiş, bunları 1p13-q21, 3q21-q13, 7p12-q12, 7q12, 7q22, 7q32, 9p13-q13, 12p13, 14q11 ve 14q32 şeklinde tanımlamışlardır[5].

Bepler ve Koehler[6]'in insan akciğer kanseri hücre hatları ile yaptıkları sitogenetik çalışmada, muhtemelen potansiyel tümör süpressör genleri taşıyan 2p, 2q, 3p, 3q, 6q, 9p, 11p ve 13q kromozomal bölgelerinde delesyonlar saptamışlardır.

Karaüzüm ve ark.[7], kromozom 1p11, 1q11, 2p10, 6p10, 7q11, 7q22, 7q32, 8q22, 9q22, 11q11, 21q10 ve Xq24 bölgelerinde yapısal anomaliler saptamışlardır. Bununla birlikte, özellikle i(2)(p10), i(9)(p10), i(21)(q10), t(11;12), t(14;15), del(X)(q24) ve Y kromozom kaybının ikincil değişiklikler olarak AK gelişmesinde rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler[7].

Sanchez-Cespedes ve ark.[8], sigara kullanan adenokarsinomlu hastalarda kullanmayanlara göre 3p, 6q, 9p, 16p, 17p ve 19p kromozom kollarında allelik kazanç veya kayıp olduğunu göstermişlerdir.

AK'nde 3p'nin allelik kaybının, %49-86 sıklıkla erken dönemde meydana geldiği, bu oranın skuamöz hücre karsinomlarında %50-83 ve adenokarsinomlarda %36-61 arasında olduğu bildirilmiştir[10]. Hirao ve ark.[9], bu oranı NSCLC'lerde %33.6, skuamöz hücre karsinomlarında %44.2 ve adenokarsinomlarda %30.2 olarak bulmuşlardır. Üçüncü kromozomun p21 bölgesinde mismatch DNA tamir geni hMLH1, p25 bölgesinde von Hipple-Lindau tümör süpresör geni ve p14 bölgesinde FHIT tümör süpresör geni bulunmaktadır[9]. Bu genlerden dolayı 3. kromozomun kısa kolunun tümör oluşumunda merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, Ashman ve ark.[11] floresan in situ hibridizasyon tekniği ile yaptıkları çalışmada; 3p, 5q, 10, 16q ve 17p bölgelerinde DNA kopya sayısının azaldığını, 3q, 1p, 1q ve 14q bölgelerinde ise arttığını ve 5. kromozomun en sık yeniden düzenlenen bir kromozom, 2., 10. ve 16. kromozomların da yüksek sıklıkta translokasyona uğradıklarını rapor etmişlerdir.

Dhillion ve ark.[12]'ları, NSCLC hastalarında 1p34, 1q42, 3p14, 3q27, 5q13, 13q14 ve 18q21 bölgelerinde frajiliteye kontrol gruplarına göre daha sık rastladıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca 1p22, 2q33, 11q23, 12p13, 14q23 ve 22q12 bölgelerinin de kontrol grubundan farklı olarak indüklendiklerini gözlemlemişlerdir. Bu bölgelerde bulunan ilgili genlerin tümör süpressör genleri, onkogenler, mismatch tamir genleri ve proto-onkogenler olduğu bilinmektedir. 1p22 bölgesinde BCL10, CDC7L1, D1S155E; 1p34 bölgesinde MYCL1; 1q42 bölgesinde TP53, BP2; 3p14 bölgesinde FHIT, 3q27 bölgesinde BCL6, TPHO, ABCC5; 5p13 bölgesinde SKP2, DOC-2; 11q23 bölgesinde MLL, TSG11, BRCA3; 12p13 bölgesinde CD9; 13q14 bölgesinde DBM, RBM1, RB1; 14q23 bölgesinde MAX ve 22q12 bölgesinde CYP2D6 genlerinin bulunduğunu belirtmişlerdir[12].

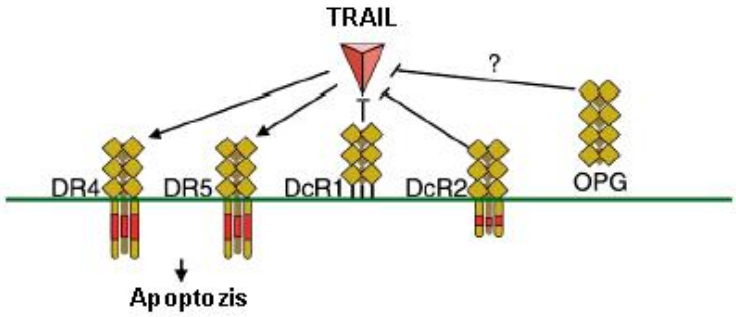
Diğer bir çalışmada; M-FISH tekniği ile NSCLC hastalarında t(5;14), t(5;11) ve t(1;6) bulunduğu, ayrıca Y kromozom kayıpları ile 20. kromozom ile 5p anöploidilerine rastlanılmış olup, 4, 5, 8, 11, 12 ve 19. kromozomlarının sık olarak işe karıştığı kromozomlar arası translokasyonların da olduğu rapor edilmiştir[13]. Ayrıca, Schenk ve ark. (1997)[14]'larının 3, 8, 11, 12, 17 ve 18. kromozomlara özgü DNA probları ile yaptıkları FISH çalışmalarında bu kromozomlara özgü yüksek oranda anöploidilerin olduğunu göstermişlerdir.

2.5. Tümör Nekroz Faktör ile İlişkili Apoptozisi Uyaran Ligand (TRAIL) ve Hücre Ölüm Reseptörleri

Apoptoz, yani programlanmış hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişimi ve normal hücresel farklılaşması sırasında meydana gelmektedir. Apoptoz, tümör nekroz faktör (TNF) ailesindeki TNF ile Fas ligandlarını da içeren ve reseptörlerindeki ölüm domainleri vasıtası ile etkilerini gösteren belirli sitokinler tarafından uyarılmaktadır. Son yıllarda, TNF ailesinin yeni bir üyesi tanımlanmış ve TNF ile ilişkili apoptozisi uyaran ligand (TRAIL) olarak adlandırılmıştır[15,28]. TRAIL geni, yaklaşık 20 kb'lık bir alana yayılmıştır ve 5 ekzon içermektedir. Translasyon başlama kodonunun başlangıç kısmında 1.2 kb'lık promotör bölgesi klonlanmış ve transkripsiyon başlama bölgesi tanımlanmıştır. Belirli bir TATA box kutusundan yoksundur. Ancak, birkaç varsayılan transkripsiyon faktörü bağlama bölgesini içermektedir. TRAIL, tip II membran proteinlerinin bir tipi olup, çeşitli dokularda eksprese olmaktadır. Diğer TNF ligandları gibi, trimerler olarak sentezlenirler ve membrandan sistein proteazları ile serbest formdaki ligandı oluşturmak için kesilebilirler. Optimum biyolojik aktivitesi için de bir Zn atomunun yapıda olması gereklidir. TRAIL'in esas fonksiyonu apoptozisi uyarmak ve transkripsiyon faktörü olan NF-$_k$B'yi aktive etmektir[16].

TRAIL, kanser hücrelerinin yok olmasında etkilidir, fakat normal hücreler üzerine herhangi bir etkisi yoktur[16,17]. TRAIL'i bağlayan TNF reseptör (TNFR) gen süperailesinin sinyalizasyonda görev yapan iki reseptörünün tanımlanması, bu ligand tarafından indüklenen apoptoz mekanizmasını daha iyi bir şekilde açıklamaktadır. DR4 (ölüm reseptörü 4 veya TRAIL-R1) ve DR5 (TRAIL-R2) olarak adlandırılan bu reseptörler, korunmuş bir ölüm domain motifi içermektedirler. Bu iki ölüm reseptörlerine ek olarak, TRAIL'i bağlayan üç reseptör daha tanımlanmıştır. Decoy reseptörleri olarak adlandırılan DcR1 (TRAIL-R3) ve DcR2 (TRAIL-R4), DR4 ve DR5'in ekstraselüler domainlerine yakın homoloji gösterirler. DcR2, fonksiyonel olmayan ve ucu kesik bir ölüm domainine sahip iken, DcR1 transmembran ve ölüm domainlerinden yoksundur. Ayrıca, glikofosfatidil inozitol (GPI) bir kuyruk ile membrana bağlı olarak bulunurlar. Bu nedenle, bu her iki reseptör bir apoptozis sinyali iletme yeteneğine sahip değildirler. Beşinci bir bağlanma (binding) proteini olan çözünür TNFR aile üyesi ise, osteoprotegerin (OPG)' dir. OPG; dimerik, çözünür ve

salgı formlarında bulunmaktadır. Aynı zamanda, TRAIL' e bağlanma özelliğindedir ancak fizyolojik sıcaklıkta düşük affiniteye sahiptir (Şekil 2.6)[16,17,18,19.]

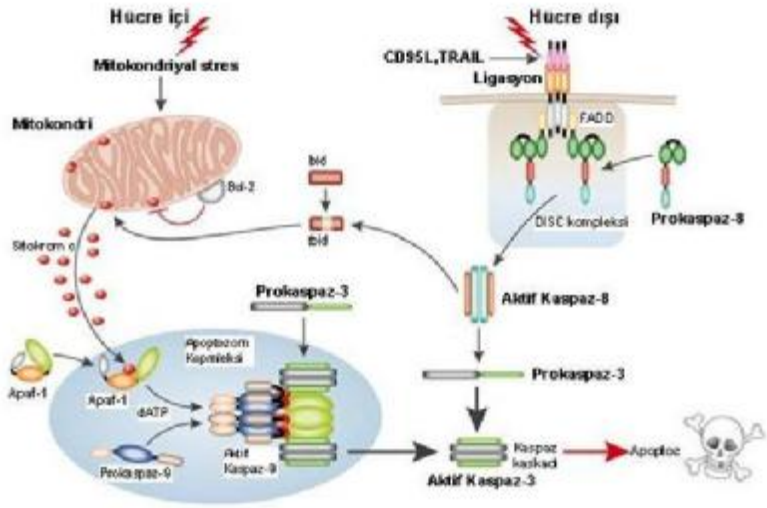


Şekil 2.6. TRAIL ve hücre ölüm reseptörleri.

TRAIL, malignant melanoma, lenfoma, kolon karsinomu, akciğer karsinomu, meme karsinomu ve malignant gliomalardan elde edilen çeşitli tümör hücre hatlarında apoptozisi uyaran agonistik DR4 ve DR5 reseptörleri ile etkileşime girmektedir. DR4, dalak ve periferal kan lökositlerini de içeren birçok normal insan hücre ve dokularında salgılanırken beyin hücrelerinde salgılanmaz[29]. TRAIL, çeşitli tümör hücrelerinde apoptozisi uyarırken, transforme olmamış normal hücreleri uyarmaz. Bu durum, TRAIL'in normal dokularda salgılanan fakat kanser hücrelerinde salgılanmayan antagonistik tuzak reseptörleri DcR1 ve DcR2 ile de etkileşime girdiğini açıklamaktadır. DcR1 ve DcR2 apoptozisi uyarmaz, ancak hücreleri apoptozisden (TRAIL ile uyarılan apoptozis) korumaktadırlar[29,30].

DR4 ve DR5 reseptörleri, kromozom 8p21-22 bölgesinde yerleşiktir. Sisteince zengin ekstraselüler ligand bağlama domaini ile karakterize TNF reseptör ailesinin diğer üyeleri ile önemli homolojiye sahiptirler. DR4 ve DR5 boyunca sinyal iletimi, bu reseptörlerdeki sitoplazmik ölüm domainlerinin varlığına bağlıdır. TRAIL'in DR4 ve DR5'e bağlanması ile bir seri kaspaz tetiklenir ve apoptozis gerçekleşir (Şekil 2.7).

8p21-22 bölgesinin allelik kaybı akciğer, meme, kolon, prostat, baş ve boyun kanserleri ile hepatoselüler karsinomlarda sık rastlanılan bir durumdur. Bu veriler, 8p21-22 bölgesinde önemli bir veya daha fazla tümör süpressör genlerin bulunduğunu, DR4 ve DR5/KILLER genlerinin bu bölgedeki aday tümör süpressör genlerden olabileceğini göstermektedir[30].



Şekil 2.7. TRAIL ve hücre ölüm reseptörleri aracılığı ile hücrenin apoptoza gitmesini sağlayan hücre içi yolak.

8p21'de tanımlanmış olan ilk ölüm reseptörü, DR4, 486 aminoasitten oluşan bir tip 1 membran proteinidir. İki adet hücre dışı-sisteince zengin yalancı tekrar içermektedir. 50- ve 90-s'lik bu iki reseptör parçaları, çoğu ligand-reseptör etkileşimlerine aracılık etmektedir. DR4 ligand bağlama ilmeklerinin ana elementleri ekzon 3 ve 4 tarafından kodlanmaktadır[31]. Son zamanlarda, DR4 geninin 3., 4., 5. ve 10. ekzonlarında tek nükleotidlik polimorfizmlere rastlanıldığı bildirilmiştir[32]. Fischer ve ark.[33], bu genin 3. ekzonunun 422. nükleotidinde ve 4. ekzonun 626. nükleotidinde birer polimorfizm tanımlamışlardır. 422. nükleotidde guanin adenine dönüşmekte (G422A) ve bunun sonucunda meydana gelecek olan aminoasit arjinin yerine histidin olmaktadır. 626. nükleotidde ise sitozinin, guanine dönüştüğü (C626G) tek nükleotidlik bir polimorfizm gözlenmektedir. Bunun sonucunda, threonin yerine arjinin gelmektedir. Otuz bir akciğer kanseri hücre hatlarında DR4 ekzon 4'ün dizi analizi sonucunda bunların %68'inde 626. nükleotidde C→G yer değişiminin gözlendiği bildirilmiştir[31,33]. Dechant ve ark.[32], osteosarkoma tümör örnekleri ile hücre hatları üzerinde yaptıkları mutasyon analizlerinde bu polimorfizmlere ek olarak ekzon 5 ve ekzon 10'da da bazı değişikliklerin olduğunu rapor etmişlerdir. Ekzon 5'de 683. nükleotidde A→C (A683C), ekzon 10'da ise 1322. nükleotidde A→G (A1322G) polimorfizmlerinin olduğu gözlenmiştir. Ekzon 5'deki polimorfizm sonucunda glutamin yerine alanin,

ekzon 10'da ise lizin yerine arjinin gelmektedir[32]. Sonuç olarak, bu nükleotid değişiklikleri, DR4 geninin ligand bağlama domaininde veya yakın bir bölgesinde aminoasit değişikliklerine yol açmaktadır. Bu da, TRAIL'in DR4 reseptörüne bağlanmasını etkilemekte ve çeşitli malignansilerin oluşmasına katkıda bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar

- Santrifüjler (Soğutmalı, Universal 16R ve Soğutmasız Nuve CN180)
- Etüvler (Dedeoğlu, Heraeus)
- CO_2 İnkübatörü (Sanyo MCO-17AI)
- Steril Kabin (Kojair KR-125 Safety)
- Derin Dondurucular (Siemens, Bosch)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Pastör Fırını (Nüve FN500)
- İnvert Mikroskop (Olympus CK40)
- Sitogenetik İncelemede Kullanılan Mikroskoplar (Olympus BX51 ve Olympus CH20)
- Cytovision Görüntüleme Sistemi (Applied Imaging)
- Fotoğraf Ataçmanı (Applied Imaging)
- Steril Kültür Tüpü (Greiner)
- Hassas Terazi (Sartorius)
- pH Metre (İnolab)
- Steril Plastik Pipet
- Steril Flask, 25 cm^2 (Nunc)
- Steril Petri Kabı (Nunc)
- Steril disposable farklı büyüklükte enjektörler (2 ml' lik, 5 ml' lik, 10 ml' lik, 20 ml' lik)
- Bistüri
- Thermal Cycler (Bioer XP Cycler)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-160)
- Jel Görüntüleme Cihazı (Unitec)
- Dikey Elektroforez Tankı (Biolab)
- ABI 3130 Genetic Analyzer
- Vorteks (Nüve NM 110)

- Otoklav (Trans)
- Otomatik pipetler (Gilson, Biohit ve Socorex)
- Mezür
- Şale
- Lam (Rodajlı)
- Lamel (24X32)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- RPMI 1640 Besiyeri (Biological Industries)
- M199 Besiyeri (Biological Industries)
- BioAMF Besiyeri (Biological Industries)
- Ham's F10 Besiyeri (Biological Industries)
- Tripsin-EDTA (Biological Industries)
- Heparin (Panpharma)
- Kolşisin (Seromed)
- Penisilin-Streptomisin (Sigma)
- Gentamisin (Biological Industries)
- Fetal Calf Serum (Gibco)
- L-Glutamin (Biochrom)
- Phytohemmaglutinin (Biological Industries)
- Sodyum Klorid (NaCl) (Merck)
- Potasyum Klorid (KCl) (Sigma)
- Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2$) (Merck)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (Merck)
- Tripsin (Difco Bacto)
- Glasiyel Asetik Asit (Merck)
- Metanol (Merck)
- Etanol (Merck)
- Ksilol (Merck)
- Aseton (Merck)
- Fenol (Merck)
- Kloroform (Amresco)

- İzoamil Alkol (Amresco)
- Giemsa (Merck)
- İmmersiyon Yağı (Merck)
- Entellan (Merck)
- Taq Polimeraz (Fermantas ve Vivantis)
- Magnezyum Klorür ($MgCl_2$) (Fermantas)
- PCR Tamponu (Fermantas)
- Restriksiyon Enzimleri (Fermantas)
- HaeIII ile kesilmiş pUC18 markerı (Sigma)
- Primerler (MWG)
- Deoksinükleosit Trifosfat Seti (dNTP) (Fermantas)
- Akrilamid (Sigma)
- N,N'-Metilen-bis-Akrilamit (Sigma)
- Amonyum Persülfat (Sigma)
- N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamin (TEMED) (Sigma)
- DNA izolasyonu, PCR ve Elektroforezde Kullanılan Diğer Kimyasal Malzemeler (Merck ve Sigma)
- ABI'nın dizi analiz kiti
- Purifikasyon kiti (Roche)

3.2. ÖRNEKLERİN SAĞLANMASI VE KULLANILAN YÖNTEMLER

Göğüs Hastalıkları Kliniği'ne akciğer kanseri ön tanısı ile başvuran ve bronkoskopi yapılması uygun görülen 60 hasta ile bu hastalara yaş ve cinsiyet açısından uygun olan sağlıklı, sigara kullanan ve ailesinde kanser öyküsü olmayan 30 kişiden (kontrol grubu) etik onay alındıktan sonra, çalışmamızın amacı doğrultusunda her iki gruptan 12 ml kan alındı ve bu kan; DNA izolasyonu için 3 ml EDTA'lı tüpe, serum eldesi için 2 ayrı normal tüpe 4'er ml ve kan kültürü için heparinize enjektöre 1 ml şeklinde paylaştırıldı. Kan kültüründe ve kromozom eldesinde standart sitogenetik tekniklerden yararlanıldı. Bronkoskopi sırasında endobronşiyal yapı veya mukozal lezyon gösteren 45 hastadan, patolojiye gönderilmek üzere alınan parçalardan 2-3 adet akciğer doku parçası, doku kültürü yapmak amacı ile antibiyotikli yıkama besiyeri içerisinde steril şartlarda Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi.

Hastalardan ayrıca malign olan bölgeler dışında malignite şüphesi olmayan bölgelerden de kontrol amaçlı parçalar alındı. Alınan dokuların kültürü, laboratuvarda laminar flow kabini içerisinde aseptik çalışma koşullarına uygun olarak yapıldı. Doku kültürünün yapılması ve metafaz plaklarının eldesinde standart sitogenetik teknikler kullanıldı.

3.2.1. Sitogenetik Çalışmalar

Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'ne akciğer kanseri ön tanısı ile başvuran ve bronkoskopi yapılan hastalardan (45 hasta) alınan doku örnekleri yıkama besiyeri (EK-1) içerisinde taşınarak steril şartlarda doku kültürü yapıldı. Alınan örneklerin doku kültürü, laboratuvarda laminar flow kabini içerisinde aseptik çalışma koşullarına uygun olarak yapıldı. Ayrıca hasta (60) ve kontrol gruplarından (30) alınan kan dokularına 72 saatlik kısa süreli kültür yöntemi uygulandı. Hem doku hem de kan dokusu kültürlerinin yapılması ve metafaz plaklarının eldesinde standart sitogenetik teknikler kullanıldı[34,35].

A. Doku Kültürünün Yapılması

1. Yıkama besiyerinde gelen doku, laminar flow kabini içinde steril petri kabına alındı.
2. Doku, üç kez yıkama medyumu ile yıkandıktan sonra steril bistüri yardımı ile çok küçük parçalara ayrıldı.
3. Daha sonra üzerine 1 ml kadar Tripsin-EDTA (EK-2) solüsyonu eklendi ve 1 saat 37 °C'de bekletilerek dokunun parçalanması sağlandı.
4. Diğer taraftan hücre ekiminde kullanılacak flasklara 2 ml Bio-AMF besiyeri (EK-1) konarak flasklar ekime hazır hale getirildi.
5. Küçük parçalara bölünmüş ve enzimatik olarak parçalanmış olan doku üzerine 2 ml yıkama besiyeri (EK-1) eklenerek Tripsin-EDTA'nın etkisi ortadan kaldırıldı.
6. Sonra, bir pipet yardımı ile alınan örnekler steril tüplere konuldu ve 1000 devirde 8 dk santrifüj edildi.
7. Santrifüjden sonra üstteki süpernatan kısım pelletin üzerinde 0.5-0.75 ml sıvı kalacak şekilde atıldı. Pellet pipetaj ile homojen bir şekilde karıştırıldı ve 2 ml Bio-AMF besiyeri içeren doku kültür flasklarına ekim yapıldı.

8. Flaskların kapağı gevşek kapatılarak dokunun 37 °C' de, %5 oranında CO_2 içeren inkübatörde açık sistemle kültürü yapıldı.
9. 7. günde, invert mikroskobunda inceleme yapılarak hücre yapışmasının olup olmadığı kontrol edildi.
10. Yapışmanın olması durumunda, kültür flasklarının besiyerleri değiştirildi.
11. 10. günde, üreme tekrardan kontrol edilerek yeterli mitoza sahip olan flasklar kromozom eldesi için hasata alındı.

Metafaz Alanlarının Eldesi (Hasat)

1. Yeterli miktarda mitotik hücre yoğunluğu saptanan flaskların besiyerleri hasattan 1 gün önce değiştirildi.
2. Ertesi gün, flasklara 10 damla kolşisin (EK-2) damlatılarak 4 saat bekletildi.
3. Kolşisin ile inkübasyondan sonra flask içeriği santrifüj tüplerine aktarıldı.
4. Daha sonra, flasklara 1'er ml Tripsin-EDTA (EK-2) eklendi ve kısa bir yıkamadan sonra içeriği pipet yardımı ile aynı santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Flasklara tekrardan 1 ml Tripsin-EDTA (EK-2) eklenerek kapakları sıkıca kapatıldı ve 37 °C'de 5 dk inkübe edildi.
6. 5 dk sonra flasklara hafif olarak mekanik kuvvet uygulandı ve hücrelerin flasktan tam olarak sökülmesi sağlandı.
7. Sonra invert mikroskopta hücrelerin flasktan tam olarak sökülüp sökülmediği kontrol edildi.
8. Yeterince hücre söküldüğü zaman flaska 2 ml yıkama besiyeri (EK-1) eklenerek tripsin aktivitesi durduruldu.
9. Flaskın içeriği santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000 devirde 8 dk santrifüj edildi.
10. Santrifüjden sonra üstteki süpernatan kısım pelletin üzerinde 0.5-0.75 ml sıvı kalacak şekilde atıldı. Pellet pipetaj ile homojen bir şekilde karıştırıldı.
11. Üzerine 6 ml 0.075 M KCl (hipotonik çözelti) (EK-2) eklendi ve 37 °C'lik inkübatörde 25 dk bekletildi.
12. Süre sonunda üzerine taze olarak hazırlanmış 3:1 oranındaki metanol-asetik asitten (fiksatif) (EK-2) 13 damla damlatılarak hücrelerin bir sonraki fiksatif aşamasına alışması sağlandı.

13. Tüp santrifüj edildi ve pelletin üzerine 0.5 ml sıvı kalacak şekilde üstteki süpernatan atıldı.

14. Hücre pelleti, hücre zarlarının zayıflatılması amacı ile 3 kez 6 ml fiksatifle yıkandı. Her bir yıkamada fiksatif tüpe pipet ile yavaş yavaş eklenerek pipetajlandı ve santrifüj edildi.

15. Üçüncü yıkamadan sonra hücre pelletinin üzerinde 0.5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatan atıldı.

16. Hücre pelleti pipetajlama ile homojenize edildi ve preparat hazırlamak üzere pipete çekildi.

17. Dezenfektan ile yıkandıktan sonra en az 2 saat asetonda bekletilen ve daha sonra saf suya alınan soğuk lamlar üzerine hücre süspansiyonu 30°'lik bir eğimle damlatılarak kromozom preparatları hazırlandı.

18. Preparatlar 37 °C'de 2 gün yaşlandırıldıktan sonra yapısal ve sayısal kromozom anomalilerini saptamak amacıyla GTG-bandlama yöntemi ile boyandı.

B. Kan Kültürünün Yapılması

Kromozom analizi için, hasta ve kontrollerden steril şartlarda heparinle yıkanmış enjektöre 1 ml kan alındı. Her birey için, içerisinde 3' er ml normal (RPMI-1640, R0883) ve M199 besiyerlerinin (EK-1) bulunduğu steril kültür tüplerine her olgu kanından 3' er damla ilave edilerek ekim yapıldı. İsim karışıklığını önlemek amacıyla, tüplerin üzerine daha önceden bireyin ismi yazıldı. Ekim işlemi yapılan kültür tüpleri hafifçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 72 saat süreyle inkübatörde tutuldu. Kültüre 70 saat sonra her tüpe final konsantrasyonu 10 μg/ml olacak şekilde 30 μl kolşisin (EK-2) eklendi ve iki saat daha kültüre devam edildi. Süre sonunda, tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra 1200 devirde 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üstünde kalan süpernatan pastör pipeti ile atıldı. Dipte kalan çökelti, tüpün alt kısmına parmakla hafifçe vurarak karıştırıldı. Tüplere 6'şar ml hipotonik solusyonu (0.075 M KCl) (EK-2) ilave edildi ve 13 dk etüvde bekletildi. Süre sonunda her tüpe 6 damla soğuk fiksatif solüsyonu (EK-2) eklenerek karıştırıldı. Tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatan atıldıktan sonra çökelti tekrar hafifçe karıştırıldı ve üzerine taze hazırlanmış 6 ml fiksatif solusyonu ilave edildikten sonra 1200 devirde 10 dk santrifüj edildi.

Üçüncü kez fiksatif ile yıkamadan sonra, çökeltinin miktarına göre çok az fiksatif bırakılıp pipetajlanarak hücre süspansiyonu elde edildi. Daha önceden temizlendikten sonra asetonda bekletilen ve yaymadan en az 24 saat önce saf sudan geçirilerek buzdolabında soğutulmuş olan lamlar üzerine 30°'lik bir eğimle 1-2 damla hücre süspansiyonu damlatılarak yayma yapıldı. Lamlara hastanın ismi ve kullanılan mediumun çeşidi yazılarak havada kurutuldu. Yayılan preparatlar yaşlandırmak amacıyla 2 gün 37°C'de inkübatörde bekletildi. Preparatlar, yapısal ve sayısal kromozom anomalileri ile kromozomal frajil bölgeleri saptamak amacı ile GTG-bandlama yöntemi ile boyandı.

C. Preparatların GTG (G-bands by Trypsin using Giemsa) Bantlama Yöntemiyle Boyanması

Analiz için; 2 gün 37°C'de yaşlandırılmak üzere bekletilen preparatlar GTG bantlama tekniği ile boyanarak incelemeye hazır hale getirildi[36].

Bunun için sırasıyla şu işlemler yapıldı:

- 1,5 ml' lik tripsin stok solüsyonu (EK-2) eritilerek bir şale içerisindeki 75 ml % 0.9' luk NaCl içerisine eklendi ve pH' sı 7.5-7.8' e ayarlandı.
- İkinci bir şaleye de 75 ml fosfat tamponu (EK-2) ilave edildi.
- Üçüncü bir şalede ise fosfat tamponu içerisinde % 7-10' luk olacak şekilde giemsa boya çözeltisi (EK-2) hazırlandı.
- Metafaz kalitesine göre sıralanan preparatlar, mikroskop altında metafazların açık ve koyuluğuna göre değişik saniyelerde tripsinle muamele edildi (genellikle 35-40 saniye).
- Preparatlar daha sonra fosfat tamponundan geçirildi. Hafifçe çalkalanarak yıkandı.
- Daha sonra Giemsa boya solüsyonu ile 3-5 dk boyandı.
- Akan musluk suyundan geçirilen preparatlar havada kurutuldu.
- Bantları boyanmış metafaz kromozomları mikroskop altında sayısal ve yapısal olarak incelendi.
- Hazırlanan preparatlar 100X objektifte incelendi.
- Her hasta için normal kan kültürlerinde 25, M199 kan kültürlerinde 50, doku kültür preparasyonlarında 25 metafaz plağı incelenmeye çalışıldı. Ancak mitotik indeksi düşük olan hasta preparatlarında ise mevcut olan metafaz plakları incelendi.

- Preparatlar inceleme sonrası Ksilol' den geçirilerek immersiyon yağından temizlendikten sonra entellan ve lamel ile kapatılarak devamlı hale getirildi ve fotoğraf çekimi için saklandı.

3.2.2. Moleküler Genetik Çalışmalar

3.2.2.1. DNA Eldesi

Hasta ve kontrol grubundan alınan kanın 8 ml'si serum elde etmek amacı ile kırmızı kapaklı iki tüpe, 3 ml'si DNA elde etmek amacıyla EDTA'lı tüpe aktarıldı. Kırmızı kapaklı tüplere alınan kanlar 5000 devirde 8 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Steril ependorf tüplere aktarılarak -20 °C'de DNA elde etmek amacı ile saklanılan örneklerden Fenol-Kloroform-İzoamil yöntemi[37], EDTA'lı tüplere alınan kanlardan ise doymuş tuz çözeltisi ile çöktürme yöntemi[38] kullanılarak genomik DNA izole edildi.

a) Fenol-Kloroform-İzoamil Yöntemi ile Serum Örneklerinden DNA İzolasyonu

1. Her olguya ait 100'er µl serum örneği ependorf tüplere konuldu.
2. Üzerine 300 µl lizis tamponu ve 0.5 µl proteinaz K (100 mg/µl) ilave edildi (EK-3).
3. 55 °C' de 4 saat inkübe edildi.
4. Süre sonunda üzerine 600 µl Fenol-Kloroform-İzoamil (25:24:1) eklendi ve 2-3 saat 0 °C'de bekletildi.
5. Örnekler ara ara vortekslendi.
6. Daha sonra 13.000 devirde 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
7. Üst faz başka bir ependorf tüpe alındı ve iki katı kadar tekrardan Fenol-Kloroform-İzoamil (25:24:1) eklendi.
8. Vortekslenen örnekler tekrardan 30-45 dk 0 °C'de bekletildi.
9. 13.000 devirde 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrasında üst faz başka bir ependorf tüpe alındı, üzerine 2 katı kadar kloroform eklendi ve karıştırıldı.
11. 13.000 devirde 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
12. Üst faz başka bir tüpe alındı ve %100'lük saf etanol eklendi.
13. -20 °C'de 1-3 gece bekletildi.

14. 13.000 devirde +4 °C'de 15 dk santrifüj edildi.

15. Üstteki sıvı atıldı. Pellet kurutuldu ve yaklaşık 20-30 µl saf suda çözündü.

16. DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede ölçüldü (EK-4).

17. Daha sonra -20 °C'de PCR yapmak üzere saklandı.

b) Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi ile Kandan DNA İzolasyonu

1. Hasta ve kontrollerden alınan ve EDTA'lı tüplere aktarılan 3 ml kandan 750 µl steril ependorf tüplere alındı.

2. Her bir ependorf tüpün üzerine 750 µl eritrosit lizis tamponu (EK-3) eklendi ve 3 dk soğuk buz üzerinde bekletildi.

3. Süre sonunda 4500 devirde 5 dk santrifüj edildi.

4. Üstte kalan süpernatan kısım dökülerek pellet üzerine 1 ml eritrosit lizis ilave edildi ve pellet çözelti içerisinde homojen olana kadar çalkalandı.

5. Daha sonra 4500 devirde 5 dk santrifüj edildi ve süpernatan kısım döküldü.

6. Altta kalan pelletin üzerine bu defa 1 ml fizyolojik tampon (EK-3) ilave edildi ve yine pellet homojen bir şekilde karışana kadar çalkalama işlemine tutuldu.

7. Yine 4500 devirde 5 dk santrifüj edilerek üsteki sıvı atıldı.

8. Fizyolojik tampon aşaması bir kez daha tekrarlandı.

9. Sonra pelletin üzerine 300 µl TE-9 (pH:9), 100 µl %10'luk SDS ve 20 µl 10 mg/ml proteinaz K ilave edilerek 2 saat 65 °C'deki benmaride bekletildi (EK-3).

10. Süre sonunda pelletin parçalanıp parçalanmadığı kontrol edildi ve parçalanma durumunda üzerine 200 µl doymuş (6M) tuz çözeltisi (EK-3) ilave edildi ve bulutsu, süt görünümü elde edilene kadar hafifçe karıştırıldı.

11. 13000 devirde 10 dk santrifüj edilerek proteinlerin presipite olması sağlandı.

12. Üstteki berrak kısım temiz ependorf tüplere aktarıldı.

13. Üzerine yaklaşık 1 ml saf etanol eklendi ve DNA oluşumu gözlendi.

14. 13000 devirde 10 dk santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı.

15. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra alttaki pellet iki kez %70'lik alkol (EK-3) ile yıkandı ve sonradan kurumaya bırakıldı.

16. Kuruma tamamlandıktan sonra pelletin üzerine 100 µl distile su ilave edilerek DNA'nın yeniden çözülmesi sağlandı.

17. DNAse inhibisyonu için DNA örnekleri 65-70 °C'de 15 dk bekletildi.

18. DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede ölçüldü (EK-4).

19. Daha sonra -20 °C'de PCR yapmak üzere saklandı.

3.2.2.2. Hücre Ölüm Reseptörü-4 (DR4) Genindeki Polimorfizmlerin İncelenmesi

3.2.2.2.1. Primer Seçimi

DR4 geninin üç ekzonundaki (ekzon 3,4,5) sırasıyla G422A, C626G ve A683C polimorfizmlerin belirlenmesinde primerler literatürlerden seçilerek alındı[32,33]. Genin 10. ekzonundaki A1322G polimorfizimin belirlenmesi için kullanılacak olan primerler tarafımızdan dizayn edilirken, internal kontrol olarak da CYP19 geninin 427 bç'lik ortak bölgesinin amplifikasyonunu sağlayan primerler seçildi[39] (Çizelge 3.1.).

Primer seçimi tamamlandıktan sonra primerlerin gen üzerindeki yerleri belirlendi. Çalışmamızda PCR'a dayalı RFLP tekniği (PCR=Polymerase Chain Reaction; RFLP= Restriction Fragment Lenght Polymorphism) uygulanacağı için kullanılacak olan enzimlerin kesim bölgeleri tespit edildi (Çizelge 3.2.). Ekzon 10'daki polimorfizmin belirlenmesinde ARMS (Amplification Refractory Mutation System) tekniği uygulandığı için herhangi bir enzim kesim bölgesi gösterilmemiştir. Ekzon 10 için ise kullanılacak olan internal kontrol bölgesi, CYP19 geninin 2. ekzonundaki 39. kodonu içeren 427 bç'lik ortak bölgesi, çizelge 3.2.'de gösterildi.

Çizelge 3.1. DR4 gen bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan primerler

Gen Bölgesi	**Kullanılan Primerler**
Ekzon 3 (G422A)	**Forward primer:** 5'-atcctctgggaactctgtgg-3' **Reverse primer:** 5'-taccactcccacctcactgc-3'
Ekzon 4 (C626G)	**Forward primer:** 5'- aaggtcaagggacacgtcagg-3' **Reverse primer:** 5'- gcttctgtgggttctttgagg-3'
Ekzon 5 (A683C)	**Forward primer:** 5'- atcccacctggccagctttcca-3' **Reverse primer:** 5'- agacaggagtctcgggctgct-3'
Ekzon 10 (A1322G)	**Forward primer:** 5'- ctctgatgctgttctttgac-3' **Reverse primer (C):** 5'- gaggtcctgaatcttctcac-3' **Reverse primer (T):** 5'- gaggtcctgaatcttctcat- 3'
İnternal Kontrol (CYP 19 geni ortak bölgesi)	**Forward primer:** 5′-atctgtactgtacagcacc-3′ **Reverse primer:** 5′-ctccaagtcctcatttgct-3′

Çizelge 3.2. DR4 genindeki 3., 4., 5. ve 10. ekzonlar ile internal kontrol için seçilen amplifikasyon bölgeleri, primerleri gösteren nükleotid dizileri, polimorfizmlerin gözlendiği nükleotid bölgeleri ve enzim kesim bölgeleri

Ekzon 3 (G422A)

GAAGAGTTTCCTAGCCACCGCCACGATCCTCTGGGAACTCTGTGGCAATTCATTCATTGGCTTTTCTCTC
CCTTCCCAGGATCTCATAGATCAGA^ACGTCCTGGAGCCTGTAACCGGTGCACAGAGGGTGTGGGTTAC
ACCAATGCTTCCAACAATTTGTTTGCTTGCCTCCCATGTACAGCTTGTAAATCAGGTACAGAATGTGTGG
ACCTCTTGTCCAGAGGTGGAGTGAGGGGCAGTGAGGTGGGAGTGGTAGCCAATGTGAGTCAGGGAACC
A

Ekzon 4 (C626G)

GAGGGAGTTGGGGTGGTGAGGAAAGGTCAAGGGACACGTCAGGGAAACACATTCCCAAAACCTTGTAC
TCTGTCATCAGATGAAGAAGAGAGAAGTCCCTGCACCACGACCAGGAACACAGCATGTCAGTGCAAAC
CAGGAACTTTCCGGAATGACAATTCTGCTGAGATGTGCCGGAAGTGCAG**CACAGG**^**GTG**AGACAACA
GCCAAGGGGCTCCCAGCAGCCTCAAAGAACCCACAGAAGCAAGGAACCCTAAAAA

Ekzon 5 (A683C)

AGGGACATTGGGCAGGGAGAGTGGCTCCTCTTTCATCCCACCTGGCCAGCTTTCCATCAAGAGTCCCCC
CCCTCCCTCCCTGTGTGTACCCAGGTGCCCCAGAGGGATGGTCAAGGTCAAGGATTGTACGCCCTGGAG
TGACA**T**^**CGA**GTGTGTCCACAAAGAATCAGGTACAAAGCCCACTGGGGAAGCCCCAGCTGCAGAGGAG
ACAGGGACCAGCAGCCCGAGACTCCTGTCTTTTCCTGTCTTTTCTCAGGCAATGGACATAATATATGGG
TGATTTTGGTTGTGAC

Ekzon 10 (A1322G)

CACCCAGCTCTGATGCTGTTCTTTGACAAGTTTGCAAACATCGTGCCCTTTGACTCCTGGGACCAGCTCA
TGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAAATGAGATCGATGTGGTCAGAGCTGGTACAGCAGGCCCAGGGGAT
GCCTTGTATGCAATGCTGATGAAATGGGTCAACAAAACTGGACGGAACGCCTCGATCCACACCCTGCTG
GATGCCTTGGAGAGGATGGAAGAGAGACATGCAAGAGAGAAGATTCAGGACCTCTTGGTGGA

İnternal Kontrol (CYP19)

CCTAAATGTCTGATCACATTATAAAACAGTAAGTGAATCTGTACTGTACAGCACCCTCTGAAGCAACAG
GAGCTATAGATGAACCTTTTAGGGGATTCTGTAATTTTTCTGTCCCTTTGATTTCCACAGGACTCTAAAT
TGCCCCCTCTGAGGTCAAGGAACACAAGATGGTTTTGGAAATGCTGAACCCGATACATTATAACATCAC
CAGCATCGTGCCTGAAGCCATGCCTGCTGCCACCATGCCAGTCCTGCTCCTCACTGGCCTTTTTCTCTTG
GTGTGGAATTATGAGGGCACATCCTCAATACCAGGTAAGTCAGTCATTTATTTCTGTATCTAAGGAGAT
TATTTACTTGGGATTTTGGTCCATCATGGTAAAGAAAAATTTTGCAAAAAGGACAAAAAGCAAACCTGG
AAAGATCTCTGAAGACTATGTCTGTGTTAGCAAATGAGGACTTGGAGAAATTTCAGACCAATTA

3.2.2.2.2. DR4 Geni 3., 4. ve 5. Ekzonların PCR ile Amplifikasyonu

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşulları ilk denemede elde edilmiş olup çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzonlar için optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Bileşeni	Final Konsantrasyon	25 µl reaksiyon karışımında miktar
Primer 1 (5 pmol/µl)	5 pmol	1 µl
Primer 2 (5 pmol/µl)	5 pmol	1 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.25 mM	1.25 µl
dNTP mix (25 mM)	0.2 mM	0.2 µl
Taq polimeraz (Fermantas)	5 U	1 µl
Genomik DNA	50 ng	1 µl
10xPCR tamponu	1X	2.5 µl
Su		17.05 µl

PCR reaksiyonun hazırlanmasında sırasıyla şu işlemler uygulandı:

- Reaksiyonda kullanılacak olan DNA'lar ve diğer çözeltiler -20 °C'den alınıp çözdürüldü.
- Laminar flow kabin içerisinde 200 µl'lik PCR tüpleri hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ile çözeltiler vortekslendi ve daha sonra kısa süreliğine santrifüj edilerek tüpün kenarındaki tüm damlaların tüpün dip kısmında toplanması sağlandı.
- İlk önce, 200 µl'lik PCR tüpüne hesap edilen miktarlarda 10X PCR tampon, $MgCl_2$, primerler ve dNTP mix eklenerek PCR mix hazırlandı.
- Daha sonra, her bir PCR tüpüne hesap edilen miktarlarda su ve hasta DNA'ları eklendi.
- PCR mix de eşit oranlarda tüplere paylaştırıldı.
- Son olarak, taq polimeraz eklendi ve her bir tüp vortekslenerek karışımı sağlandı.
- Tüpler kısa süreliğine santrifüj edildikten sonra daha önceden programlanmış thermal cycler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı (Çizelge 3.4a ve 3.4b).

Çizelge 3.4. DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzonlar için optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR programındaki ısı döngüleri; (a) 3. ve 4. ekzonlar, (b) 5. ekzon için.

(a)

1. Ön denatürasyon	94 °C'de 5 dk	1 döngü
2. Denatürasyon	94 °C'de 30 sn	35 döngü
Bağlanma (annealing)	62 °C'de 30 sn	
Uzama (extention)	72 °C'de 30 sn	
3. Final Uzama	72 °C'de 5 dk	1 döngü
4. 4 °C'de muhafaza		

(b)

1. Ön denatürasyon	94 °C'de 5 dk	1 döngü
2. Denatürasyon	94 °C'de 30 sn	35 döngü
Bağlanma (annealing)	58 °C'de 30 sn	
Uzama (extention)	72 °C'de 30 sn	
3. Final Uzama	72 °C'de 5 dk	1 döngü
4. 4 °C'de muhafaza		

Cihaz durduktan sonra, PCR amplifikasyon ürününün elde edilip edilmediğini görmek için ürünler %10'luk poliakrilamid jelde (EK-5) yürütüldüler. Ürünlerin büyüklüklerini belirlemek için ürünlerle birlikte HaeIII ile kesilmiş pUC18 markırı kullanıldı.

3.2.2.2.3. RFLP Tekniği ile DR4 Geni 3., 4. ve 5. Ekzonların PCR Ürünlerinin Kesimi

DR4 gen bölgelerindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde ekzon 3 için FokI, ekzon 4 için DraIII ve ekzon 5 için TaqI restriksiyon enzimleri kullanıldı. Bu enzimlerin optimum aktivasyon gösterdikleri tamponlar ise sırasıyla FokI için 1X Buffer Tango [33mM Tris-asetat (pH 7.9), 10mM magnezyum asetat, 66mM potasyum asetat, 0.1 mg/ml BSA], DraIII için 1X Buffer G [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM $MgCl_2$, 50mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA] ve TaqI için 1X Buffer TaqI [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM $MgCl_2$, 100mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA] tamponlarıdır. Kesim reaksiyonu çizelge 3.5'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzonları için hazırlanan kesim reaksiyonu karşımları

Reaksiyon Karışımı	**Miktar (µl)**
Amplifiye ürün (PCR ürünü)	10
Steril bidistile su	12
1X Tampon	2.5
Restriksiyon enzimi (10U/µl)	0.5
Toplam Hacim	25

Ekzon 3 ve 5 için ayrı ayrı hazırlanan kesim reaksiyonu karışımı 65 °C'de, ekzon 4 için hazırlanan kesim reaksiyonu karışımı ise 37 °C bir gece inkübe edildi. Ertesi gün kesim reaksiyon karışımları üzerine 5 µl krezol kırmızısı yükleme boyası eklendi (EK-3) ve hazırlanan %10'luk poliakrilamid jelde (EK-5) yürütülerek polimofizmler belirlenmeye çalışıldı.

3.2.2.2.4. DR4 Geni 10. Ekzonun ARMS Yöntemi ile Amplifikasyonu

10. ekzonun A1322G bölgesinin amplifikasyonu için primerler tarafımızca dizayn edilirken bu bölgedeki amplifikasyonu kontrol etmek amacıyla CYP19 geni, ekzon 2, 39. kodonu içeren 427 bç'lik ortak bölgesi de internal kontrol olarak kullanıldı (Çizelge 3.2.). Bu bölgelerin optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu çizelge 7'da, optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR programındaki ısı döngüleri ise çizelge 3.6.'da gösterildi.

Çizelge 3.6. DR4 geni 10. ekzon için optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Bileşeni	Final Konsantrasyon	50 µl reaksiyon karışımında miktar
Primer 1 (5 pmol/µl)	5 pmol	2 µl
Primer 2 [(C) veya (T)](5 pmol/µl)	5 pmol	2 µl
İnternal kontrol primer 1 (5 pmol/µl)	5 pmol	2 µl
İnternal kontrol primer 2 (5 pmol/µl)	5 pmol	2 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	2 mM	2 µl
dNTP mix (25 mM)	0.2 mM	0.4 µl
Taq polimeraz (Vivantis)	2 U	2 µl
Genomik DNA	50 ng	2 µl
10xPCR tamponu (Buffer A)	1X	5 µl
Su		30.6 µl

PCR reaksiyonun hazırlanmasında sırasıyla şu işlemler uygulandı:

- Reaksiyonda kullanılacak olan DNA'lar ve diğer çözeltiler -20 °C'den alınıp çözdürüldü.
- Laminar flow kabin içerisinde 200 µl'lik PCR tüpleri hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ile çözeltiler vortekslendi ve daha sonra kısa süreliğine santrifüj edilerek tüpün kenarındaki tüm damlaların tüpün dip kısmında toplanması sağlandı.
- İlk önce, her bir örnek için 2 ayrı 200 µl'lik PCR tüpüne hesap edilen miktarlarda 10X PCR tampon, $MgCl_2$, primerler (primer 1, primer 2 [bir tüpe (C), diğerine (T)], internal kontrol primer 1 ve primer 2) ve dNTP mix eklenerek PCR mix hazırlandı.
- Daha sonra, her bir hasta için ikişer PCR tüpü hazırlandı ve birine C diğerine de T etiketlenmesi yapıldı. Hesap edilen miktarlarda su ve hasta DNA'ları eklendi.
- Her iki tüpteki PCR mixler de eşit oranlarda tüplere paylaştırıldı.
- Son olarak, taq polimeraz eklendi ve her bir tüp vortekslenerek karışımı sağlandı.
- Tüpler kısa süreliğine santrifüj edildikten sonra daha önceden programlanmış thermal cycler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. DR4 geni 10. ekzon için optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR programındaki ısı döngüleri

1. Ön denatürasyon	95 °C'de 10 dk	1 döngü
2. Denatürasyon	95 °C'de 1 dk	34 döngü
Bağlanma (annealing)	56 °C'de 1 dk	
Uzama (extention)	72 °C'de 1 dk	
3. Final Uzama	72 °C'de 10 dk	1 döngü
4. 4 °C'de muhafaza		

Cihaz durduktan sonra, PCR amplifikasyon ürünlerini görmek ve polimorfizmi belirlemek amacı ile ürünler %10'luk poliakrilamid jelde (EK-5) yürütüldüler. Ürünlerin büyüklüklerini belirlemek için ürünlerle birlikte HaeIII ile kesilmiş pUC18 markırı kullanıldı.

3.2.2.2.4.1. DNA Dizi Analizi

ARMS yöntemi ile DR4 geni ekzon 10'daki A1322G polimorfizmi tespit edilemeyen hastalarda (H24 ve H38) 4. bir primer daha seçilerekten uygun bölgenin dizi analizi yapıldı (Çizelge 3.8) [32]. Daha önceden kullanılan forward primer ile 4. primer arasındaki 299 bç'lik bölge, çizelge 3.9'daki reaksiyon karışımı ve thermal cycler programı ile çoğaltıldı.

Çizelge 3.8. Dizi analizi için kullanılan 4.primer, amplifiye edilen 299 bç'lik bölge ve 1322. nükleotid bölgesi

Dizi Analizinde Kullanılan 4. Primer
5'- gcctgtgccatcttctaagta- 3'
Amplifiye Edilen Bölge
5'–CTCTGATGCTGTTCTTTGACAAGTTTGCAAACATCGTGCCCTTTGACTCCTGGGACCA GCTCATGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAAATGAGATCGATGTGGTCAGAGCTGGTACAGCA GGCCCAGGGGATGCCTTGTATGCAATGCTGATGAAATGGGTCAACAAAACTGGACGGAACG CCTCGATCCACACCCTGCTGGATGCCTTGGAGAGGATGGAAGAGAGACATGCAA**G**AGAGAA GATTCAGGACCTCTTGGTGGACTCTGGAAAGTTCATCTACTTAGAAGATGGCACAGGC-3'

Çizelge 3.9. DR4 geni 10. ekzon'daki 299 bç'lik bölgenin çoğaltılmasında hazırlanan reaksiyon karışımı (a) ile optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR programındaki ısı döngüleri (b)

(a)

PCR Bileşeni	Final Konsantrasyon	50 µl reaksiyon karışımında miktar
Primer 1 (5 pmol/µl)	5 pmol	2 µl
Primer 2 [(C) veya (T)](5 pmol/µl)	5 pmol	2 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	2 mM	2 µl
dNTP mix (25 mM)	0.2 mM	0.4 µl
Taq polimeraz (Vivantis)	2 U	2 µl
Genomik DNA	50 ng	2 µl
10xPCR tamponu (Buffer A)	1X	5 µl
Su		34.6 µl

(b)

1. Ön denatürasyon	95 °C'de 10 dk	1 döngü
2. Denatürasyon	95 °C'de 1 dk	34 döngü
Bağlanma (annealing)	62 °C'de 1 dk	
Uzama (extention)	72 °C'de 1 dk	
3. Final Uzama	72 °C'de 10 dk	1 döngü
4. 4 °C'de muhafaza		

Uygun bölge çoğaltıldıktan sonra dizi analizi için ABI'nın dizi analiz kitindeki reaksiyonu karışımı ve thermal cycler programı kullanılarak bölgenin amplifikasyonu sağlandı (Çizelge 3.10)

Çizelge 3.10. (a) Dizi analizinde kullanılan reaksiyon karışımı, (b) Thermal cycler programı

(a)

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
BigDye	2
Tampon	2
Primer (3.2 pmol)	1
PCR Ürünü	2
Distile Su	3
Toplam	10

Çizelge 3.10. (Devamı)
(b)

1. Ön denatürasyon	96 °C'de 1 dk	1 döngü
2. Denatürasyon	96 °C'de 10 sn	25 döngü
Bağlanma (annealing)	62 °C'de 5 sn	
Uzama (extention)	60 °C'de 4 dk	
3. 4 °C'de muhafaza		

Çoğaltılan ürünler daha sonra purifikasyon kiti (Roche) ile saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi şu şekilde yapıldı:

- 1 g sefadeks tartılıp 12 ml distile suda çözdüldü.
- Filtreli tüplere (spin kolon) 600 µl aktarıldı.
- 5400 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve spin kolonlar yeni toplama tüplerine kondu.
- Ürünler, jel haline gelen sefadekse değmeden pipetle tamamen spin kolona aktarıldı.
- Spin kolonlar 5400 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve böylece purifiye ürün elde edilmiş oldu.

Saflaştırma işleminden sonra ürünlerin üzerine 5'er µl distile su ilave edilerek hacim 15 µl'ye çıkarıldı. Sonra ürünler sequece plate üzerindeki kuyulara yüklendi ve 95 °C'de 5 dk denatüre edildi. Denatürasyon sonrasında plate hemen buz üzerine alınıp en az 3 dk buzda bekletildi. Süre sonunda plate sequencing cihazına (ABI 3130) yerleştirildi ve başlama komutu alınarak dizi analizinin gerçekleşmesi sağlandı.

3.2.2.2.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Çalışmamızda 3., 4., 5. ve 10. ekzonlardaki polimorfizmlerin belirlenmesi ve yorumlanmasında %10'luk poliakrilamid jeli kullanıldı. Jel aşağıdaki şekilde kullanıma hazır hale getirildi:

- Dikey elekroforez cihazı temizlenip saf sudan geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

- Elektroforez camları su ile temizlendikten sonra %70'lik alkol ile silinerek kurutuldu.
- Camların arasına sızdırmayı önlemek amacı ile vazelinlenmiş spacerlar yerleştirildi.
- Arasına aralayıcı çubuk (spacer) konmuş olan camlar dikey elektroforez aparatına yerleştirildi ve vidaları sıkıştırıldı.
- Daha sonra 12 kuyuluk tarak %70'lik alkolle silinerek camların arasına yerleştirildi.
- %10'luk poliakrilamid jeli oluşturmak üzere; cam bir kavanoz içerisinde 5.20 ml distile su, 800 µl 10XTBE, 2 ml %40'lık akrilamid, 50 µl APS ve 5 µl TEMED bileşenleri eklenerek jel hazırlandı (EK-5).
- Polimerizasyon başlatıcı katalizör bir bileşen olan TEMED eklendikten sonra poliakrilamid karışımı mümkün olduğunca hızlı bir şekilde enjektöre çekilip, iki cam arasına hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde enjekte edildi.
- Polimerizasyonun gerçekleşmesi için yaklaşık 10-15 dk beklendi. Süre sonunda aparat tanka yerleştirildi, jelin alt ve üst sınırlarına temas edecek şekilde tanka 1XTBE tamponu eklendi (EK-5).
- Tampon eklendikten sonra tarak düzgün bir şekilde çekildi.
- Oluşan her bir kuyuya yükleme tamponu eklenmiş PCR ve kesim ürünleri ile örnek büyüklüklerini tespit etmek amacıyla HaeIII ile kesilmiş pUC18 markerı aplike edildi.
- Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağı çalıştırıldı ve 1,5 saat süre ile akım uygulandı.
- Süre sonunda jel camlar arasından alınarak 1XTBE'de 0.5 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış olan EtBr çözeltisinde 10 dk boyandı (EK-5).
- Boya artıkları uzaklaştırmak amacı ile jel, saf su içerisine alındı ve bir süre sonra Uvitec görüntüleme cihazının içerisine yerleştirilerek ekranda izlemeye alındı.
- Fokus ayarı yapılarak istenilen görüntü elde edildikten sonra görüntü diskete aktarıldı.
- Jel görüntülerinin yorumlanması HaeIII ile kesilmiş pUC18 marker bantları ile kıyaslama yoluyla yapıldı. Böylece DR4 geni ekzonlarındaki polimorfizmler belirlenmeye çalışıldı.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 13.0 paket programı kullanıldı. Kesikli değişkenler (grup, AK tipi, klinik bulgular, ailede kanser öyküsü, frajil bölgeler, gibi) sayı ve yüzde olarak, sürekli değişkenlerse (yaş, sigara tüketim miktarları, gibi) ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kesikli değişkenlerin karşılaştırılmasında χ^2 test istatistiği kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda; 5'i kadın, 55'i erkek olmak üzere toplam 60 hastanın ve sağlıklı, sigara içen ve ailesinde kanser öyküsü olmayan 1'i kadın, 29'u erkek olmak üzere toplam 30 kişiden oluşan kontrol grubunun analizi yapıldı. Hastaların yaş aralığı 33-77 arasında olup, genel yaş ortalaması 57,97±9,45, kontrol grubunun yaş aralığı ise 37-71 arasında olup, genel yaş ortalaması 53,37±10,39 olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak sınırda bulundu (p=0,046) (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaş dağılımı

	Hasta		**Kontrol**	
Yaş grupları	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
≤40	3	5	3	10
41-50	9	15	10	33,33
51-60	**24**	**40**	**11**	**36,67**
61-70	17	28,33	4	13,33
71≥	7	11,67	2	6,67
Toplam	**60**	100	**30**	100

Çizelge 4.2. Akciğer kanserli hasta-kontrol gruplarına ait demografik özellikler

Özellikler	**Hasta Grubu (n=60)**	**Kontrol Grubu (n=30)**	**p değeri**
Yaş (yıl) (Ortalama±SD)	57,97±9,45	53,37±10,39	0,046
Sigara Tüketimi (Paket*yıl)	40,18±25,91	36,13±19,22	0,406
Ailede Akciğer Kanseri Öyküsü	%16,7 (10/60)	%0 (0/30)	
Ailede Genel Kanser Öyküsü	%35 (21/60)	%0 (0/30)	

Yirmi bir hastanın (%35) ailesinde genel kanser öyküsü (akciğer kanseri, lenfoma, hepatoselüler karsinoma, mide karsinomu, meme kanseri, kolon karsinomu, vs) mevcut iken, 10'unun (%16,7) ailesinde ailesel akciğer kanseri öyküsünün olduğu kaydedildi. Bununla birlikte, kontrol grubunu seçerken sağlıklı bireylerin ailelerinde herhangi bir kanser öyküsünün olmamasına dikkat edildi (Çizelge 4.2).

Hastaların sigara kullanımlarına ilişkin bilgilere bakıldığında, 6 hasta (vaka 17, 32, 34, 39, 47, 56) (%10) dışında diğer hastaların sigara öyküsüne sahip olduğu, hastaların 43'ünün (%71,67) hala kullandığı ve 11'inin (%18,33) sigarayı bıraktığı [ortalama 6,64±7,23 yıl, min. 1 yıl- max. 25 yıl] kaydedildi. Ortalama sigara kullanım miktarları ise 40,18±25,91 paket∗yıl olarak tespit edildi. Kontrol grubunda ise ortama sigara kullanım miktarı 36,13±19,22 paket∗yıl olarak belirlendi. Aradaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (p=0,406).

Hastaların klinik tablosuna baktığımızda sıklık sırasına göre; öksürük (%70), nefes darlığı (%55), balgam çıkarma (%51,6), göğüs ağrısı (%21,7), kilo kaybı (%20), sırt ağrısı (%20), hırıltı (%15) ve hemoptizi (%11,7) gibi şikayetlerinin olduğu belirlendi. Hastaların patolojik tanılarına bakıldığında ise; hastalarımınızın 51'inin (%85) NSCLC ve 9'unun (%15) SCLC hastalarından oluştuğu belirlendi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Hastaların patoloji sonuçlarına göre sınıflandırılması

Akciğer kanseri tipi	**Sayı**	**%**
NSCLC	51	85
SCLC	9	15
Toplam	60	100

NSCLC hastalarının yaş ortalaması 58,78±9,48, SCLC hastalarının ise 53,33±8,32 olduğu tespit edildi. Her iki grup arasındaki yaş farkının anlamlı olmadığı belirlendi (p=0,111) (Çizelge 4.4). NSCLC hastalarında ortalama sigara tüketim miktarı 38,67±25,41 paket∗yıl bulunurken, SCLC hastalarında 48,78±28,58 paket∗yıl olarak kaydedildi. Bununla birlikte, NSCLC hastalarının %13,7'sinde (7/51) ve SCLC hastalarının %33,3'ünde (3/9) ailesel akciğer kanser öyküsü rapor edildi. Genel olarak ailesel kanser öykülerine baktığımızda NSCLC hastalarının %31,4'nün (16/51), SCLC hastalarının ise %55.6'sının (5/9) böyle bir öyküye sahip olduğu kaydedildi (Çizelge 4.4). Hem ailesel akciğer kanser öyküsü hem de genel kanser öyküsü açısından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla p=0,243 ve p=0,358).

Çizelge 4.4. Akciğer kanser tipine göre hasta grubunun demografik özellikleri

Özellikler	NSCLC (n=51)	SCLC (n=9)	p değeri
Yaş (yıl) (Ortalama±SD)	58,78±9,48	53,33±8,32	0,111
Sigara Tüketimi (Paket*yıl)	38,67±25,41	48,78±28,58	0,284
Ailede Akciğer Kanseri Öyküsü	%13,7(7/51)	%33,3 (3/9)	0,243
Ailede Genel Kanser Öyküsü	%31,4(16/51)	%55,6(5/9)	0,358

4.1. Sitogenetik Bulgular

4.1.1. Doku Kültürlerinden Elde Edilen Sitogenetik Bulgular

Çalışmamızda; 3'ü kadın ve 42'si erkek olmak toplam 45 hastanın hem malign hem de normal akciğer doku kültürleri yapıldı. Sonuç olarak, 45 hastanın 12'sinin (%26,67) hem malign hem de normal kültürlerinde normal üreme gerçekleşmezken, 7 (%15,55) hastanın ise her iki kültüründe mantar üremesi gözlendi. Geri kalan 26 hastanın 5'inin (%19,2) malign kültürlerinde üreme gözlenirken normal kültüründe üreme saptanmadı. On bir hastanın da (%42,3) doku kültürlerinde tam tersi bir durum belirdi. Hem malign hem de normal kültürlerinden sonuç alınanların sayısı 10 (%38,46) olarak saptandı. Üreme başarısızlıklarının, dokunun alındığı bölgenin enfeksiyonlara maruz kalması, alım esnasında kontaminasyonun gerçekleşmesi ve alınan bölgede nekrotik dokunun bulunması gibi nedenlere bağlı olduğu sonucuna varıldı.

Gerek malign, gerekse normal akciğer dokusunda veya her ikisinde üreme gerçekleşen ve kromozom analizi için hasata alınarak preparatları oluşturulan örneklerin karyotip analiz sonuçları Çizelge 4.5'de verildi.

Çizelge 4.5. Akciğer kanserli hastaların malign ve normal akciğer dokularında gözlenen yapısal ve sayısal kromozom düzensizlikleri

	Yapısal ve Sayısal Kromozom Düzensizlikleri (Anomali Saptanan Hücre Sayısı/Total Hücre Sayısı)	
Hasta No.	**Malign Akciğer Dokusu**	**Normal Akciğer Dokusu**
H1	Üreme Gözlenmedi	46,XY,22p+ (2/20) 48,XY,+18,+mar (2/20) 47,XY,+18 (1/20) 46,XY,4p+,del(13)(q21 **à** qter) (1/20) 46,XY,del(13)(q21 **à** qter) (1/20) 46,XY,del(10)(q24 **à** qter) (1/20) 44,XY,-21,-D,4p+ (1/20) 46,XY,5p+ (1/20)
H2	45,XY,-18 (1/20) 45,X,-Y (8/20) 45,X,-Y,13p- (1/20) 42,X,-Y,-19,-20x2 (1/20)	Üreme Gözlenmedi
H5	Hipoploidi ve hiperploidi tipte sayısal kromozom anomalileri (3/12)	46,XY, endoreduplikasyon (3/32) Tetraploidi (1/32)
H6	Hipoploidi ve hiperploidi tipte sayısal kromozom anomalileri (3/15)	Üreme Gözlenmedi
H11	46,XY,inv(9)(p11;q13) (25/25)	46,XY,inv(9)(p11;q13) (25/25)
H12	88,XXYY,-3,-8,-14,-20 (1/11) 41,XY,-1,-13,-16,-17 (1/11) 47,XYY (4/11) 56,X,+1,+2,+Dx2, +19x2,+20x2, +16x2, -22, -Y, +?, -11,+12 (1/11) 40,-X,-Y,-2,-4,-5,-8, +11, +17,+18,-19,-20,-21 (1/11) 52,XYY,+2,+4x2,+5,-17, +19,+20 (1/11)	45,X,-Y (1/2)
H13	46,XY (25/25)	37,X,-4,-7,-10,-13,-15,-17,-18,-21,-Y (1/6) 44,XY,-14,-15 (1/6) 45,XY,-17 (1/6)
H14	45,XY,-20 (1/19) 45,XY,-11 (1/19) 45,XY,-21,del(1)(p36 **à** ter) (1/19) 42,XY,-1,-9,-15,-17 (1/19) 44,XY,-6,-8 (1/19) 45,XY,-9 (1/19) 44,XY,-4,-21 (1/19)	Üreme Gözlenmedi
H15	Üreme Gözlenmedi	44,XY,-8,-18 (1/12) 44,XY,-5,-18 (1/12)
H17	43,XX,-13,-20,-22 (1/17) 45,XX,-22 (1/17) 41,X,-10,-20,-21,-22,-X (1/17) 45,XX,-16 (2/17) 45,XX,-22 (1/17) 43,XX,-8,-17,-22 (1/17)	45,XX,-16 (1/21) 46,XX,13q+ (1/21)
H20	46,XY (18/18)	Üreme Gözlenmedi
H21	Üreme Gözlenmedi	46,XY (25/25)
H22	45,XY,-9 (1/25) 44,XY,-4,-7 (1/25)	Üreme Gözlenmedi
H24	Üreme Gözlenmedi	44,X,-17,-Y (1/25)

Çizelge 4. 5. (Devamı)

	Yapısal ve Sayısal Kromozom Düzensizlikleri (Anomali Saptanan Hücre Sayısı /Total Hücre Sayısı)	
Hasta No.	**Malign Akciğer Dokusu**	**Normal Akciğer Dokusu**
H29	46,XY,9qh+ (25/25)	46,XY,9qh+, del(14)(p **à** q11) (1/25) 46,XY,9qh+, dup(5q) (1/25) 46,XY,9qh+ (23/25)
H30	46,XY,Yqh+ (25/25)	46,XY,Yqh+ (25/25)
H32	47,XY,+20 (1/25) 46,XY,del(6q) (1/25) 46,XY,del(22)(q11 **à** qter) (1/25) 22ps+ (25/25)	47,XY,+C (1/25) 22ps+ (25/25)
H33	Üreme Gözlenmedi	46,XY (25/25)
H36	45,XY,-19 (1/25) 46,X,-Y,+2 (7/25) 45,XY,-10 (1/25) Hipoploidi (3/25)	46,XY (25/25)
H38	46,XY,del(9)(q11 **à** qter) (1/25) 47,XY,+mar (1/25)	48,XY,+marX2,del(3)(q25 **à** qter) (1/25)
H39	Üreme Gözlenmedi	45,X (20/25)
H40	Üreme Gözlenmedi	46,XY (25/25)
H42	Üreme Gözlenmedi	46,XY,endoreduplikasyon (1/25) 9qh+ (25/25)
H43	Üreme Gözlenmedi	45,XY,-1 (1/25) 46,XY,del(9)(q22 **à** qter) (1/25) 46,XY,endoreduplikasyon (1/25) 9qh+ (25/25)
H44	Üreme Gözlenmedi	47,XY,+18 (4/25) 46,XY,del(22)(q11 **à** qter) (1/25) 46,XY,t(12;X)(q24;p22) (1/25) 46,XY,del(13p) (1/25)
H46	Üreme Gözlenmedi	46,XY,del(8)(q24 **à** qter) (1/25) 45,XY,-18 (1/25) 9qh+ (25/25)

Malign akciğer doku kültüründe üremesi gerçekleşen ve kromozom analizi yapılan 15 hastanın 13'ünde (%86,7) sayısal ve yapısal kromozom düzensizlikleri saptandı. Karyotipi normal olan (46,XY) iki hastanın olduğu kaydedildi (H13 ve H20) (Çizelge 4.5).

Üç kişide (%20) (H2, H12, H36) cinsiyet kromozom anöploidileri saptandı. H2'de 10/20, H12'de 2/11 ve H36'da 7/25 oranlarında Y kromozom kayıplarına, bunun yanı sıra H12'de ayrıca 5/11 oranında XYY kromozom kuruluşuna rastlandı. Cinsiyet kromozom anöploidilerinin yanı sıra hastalarımızda farklı otozomal kromozomların artışı ya da azalışı şeklinde olan otozomal kromozom anöploidileri gözlendi (H2,H5,H6,H12,H14,H17,H22,H32,H36,H38) (Çizelge 4.5).

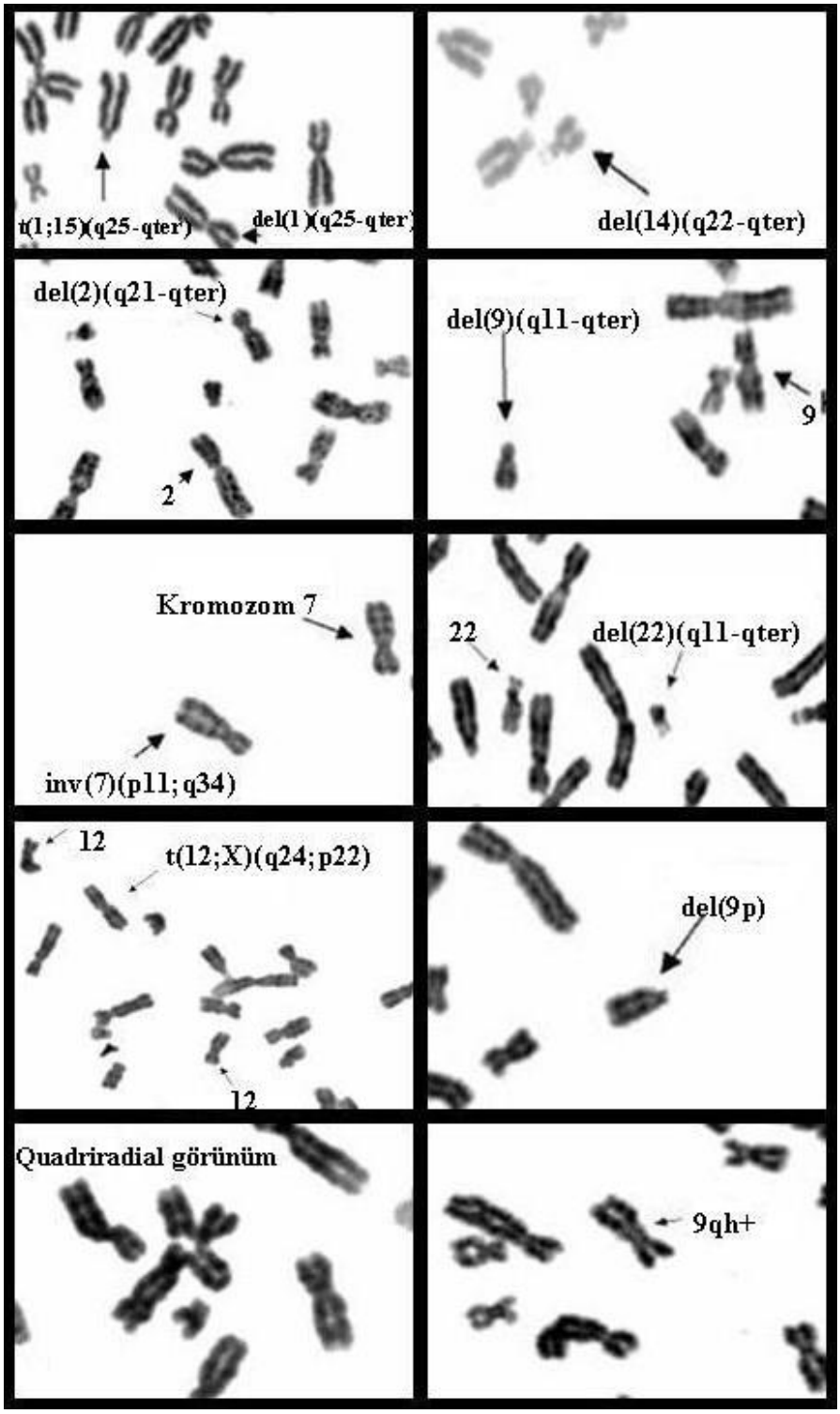
Sayısal kromozom düzensizlikleri dışında 5 hastada (H2,H11,H14,H32,H38) (%33,3) yapısal kromozom anomalileri de saptandı. H2'de 13p- (1/20), H11'de

inv(9)(p11;q13) (25/25), H14'de del(1)(p36 **à** pter) (1/19), H32'de del(6q) (1/25) ve del(22)(q11 **à** qter) (1/25), H38'de ise del(9)(q11 **à** qter) (1/25) yapısal kromozom anomalileri kaydedildi. Ayrıca, 9qh+ (H29), Yqh+ (H30) ve 22ps+ (H32) gibi heteromorfizmlere tüm metafaz alanlarında rastlandı (Çizelge 4.5).

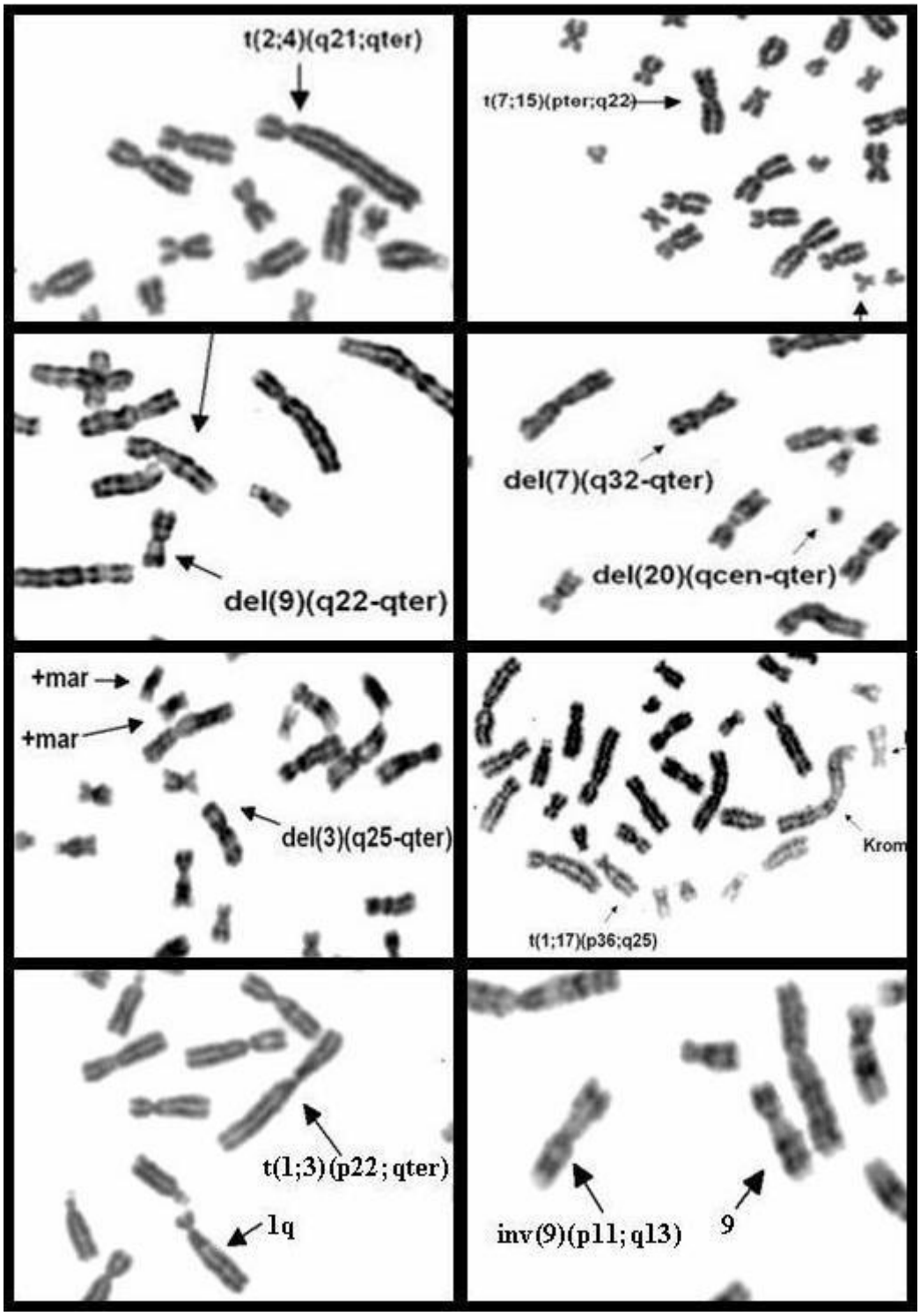
Normal akciğer doku kültürlerinde üreme başarısı sağlanan 21 kişinin 18'inde (%85,7) yapısal ve sayısal kromozom anomalileri belirlendi. Üç hastada (H21,H33,H36) tüm metafaz alanları normal bulundu (46,XY). Hastaların 3'ünde (%14,3) (H12,H13,H24) Y kromozom kayıpları saptanmış olup, tek bir hastada da (H39) 45,X kromozom kuruluşuna rastlandı (20/25 oranında). On bir hastada ise (H1,H5,H13,H15,H17,H24,H32,H38,H43,H44,H46) (%52,4) farklı sayısal kromozom anöploidileri kaydedildi (Çizelge 4.5). Bu sayısal anöploidiler içerisinde özellikle 18. kromozomun artışları veya azalışları dikkat çekti (H1,13,15,44,46). Bunun yanı sıra H1 ve H38'de 2/20 ve 1/25 oranlarında marker kromozom kuruluşları tespit edildi (Çizelge 4.5).

Normal akciğer dokusunda sayısal kromozom düzensizliklerinin yanı sıra hastalarımızın 6'sında (%28,6) (H1,H5,H11,H17,H29,H38,H43,H44,H46) yapısal kromozom düzensizlikleri de saptandı. Bunlar; H1'de del(13)(q21 **à** qter) (2/20), del(10)(q24 **à** qter) (1/20), 22p+ (2/20), 4p+ (2/20), 5p+ (1/20); H29'da del(14)(p **à** q11) (1/25), dup(5q) (1/25); H38'de del(3)(q25 **à** qter) (1/25); H43'de del(9)(q22 **à** qter) (1/25); H44'de del(22)(q11 **à** qter) (1/25), t(12;X)(q24;p22) (1/25), del(13p) (1/25); ve H46'da del(8)(q24 **à** qter) (1/25) olarak kaydedildi. Ayrıca, H11'in tüm metafazlarında inv(9)(p11;q13) saptandı. Bunun yanı sıra, H17'de tek bir metafazda 13q+, H5'de üç metafazda ve H43'de tek metefazda endoreduplikasyona uğramış hücrelere rastlandı. Ayrıca, 4 hastada (H29,42,43,46) 9qh+, bir hastada (H30) Yqh+ ve yine tek bir hastada (H32) 22ps+ gibi heteromorfizmlere tüm metafaz alanlarında rastlanıldı (Çizelge 4.5, Şekil 4.1).

Malign akciğer dokusu için kontrol amacı ile çalışılan normal akciğer dokusu tıpkı malign doku gibi çeşitli sayısal ve yapısal kromozom düzensizlikleri içermektedir. Bu sonuçlar, normal akciğer dokusunun kontrol amacı ile kullanılamayacağını, malignitenin tüm akciğer dokusuna yayılmış veya dokuyu etkilemiş olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.1. Hasta grubunda gözlenen kromozom anomalilerinden bazılarının kısmi metafaz görüntüleri



Şekil 4.1. (Devamı)

4.1.2. Kan Kültürlerinden Elde Edilen Sitogenetik Bulgular

Hasta grubunda yer alan 60 hastanın 56'sının (%93,3) ve kontrol grubunda yer alan sağlıklı ve sigara kullanan 30 (%100) bireyin kan kültürlerinden sitogenetik sonuçlar elde edildi. Hasta grubunda 4 kişi yetersiz ve kalitesiz mitoz nedeniyle değerlendirmeye alınamadı. Her iki grup için kan kültürleri iki farklı besiyerinde yapıldı. Normal besiyerinde (RPMI-1640) 25, folik asitten yoksun besiyerinde (M199) ise 50 metafaz plağı incelenerek sonuçlar değerlendirildi.

4.1.2.1. Normal Besiyerinde Kültüre Edilen Kan Dokularında Saptanan Sitogenetik Bulgular

Çalışmamızda normal besiyerinin kullanılmasındaki amaç, bireyin kalıtsal ya da sonradan kazandığı sayısal ya da yapısal kromozomal bir düzensizliğe sahip olup olmadığını tespit etmekti. Bu nedenle normal besiyerinden her birey için 25 metafaz plağı incelenerek önceden ve sonradan kazanılmış kromozomal bozukluklar belirlendi (Çizelge 4.6). Hasta grubu için toplam 1400 hücre incelendi ve bunların 121'nin (%8,6) sayısal ve/veya yapısal kromozom düzensizlikleri taşıdıkları gözlendi. Kontrol grubunda ise toplam 750 hücre incelendi ve 30 hücrede (%4) düzensizlik tespit edildi. Hasta ve kontrol grupları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,000). Mevcut olan kromozom anomalileri Çizelge 4.6' da gösterildi.

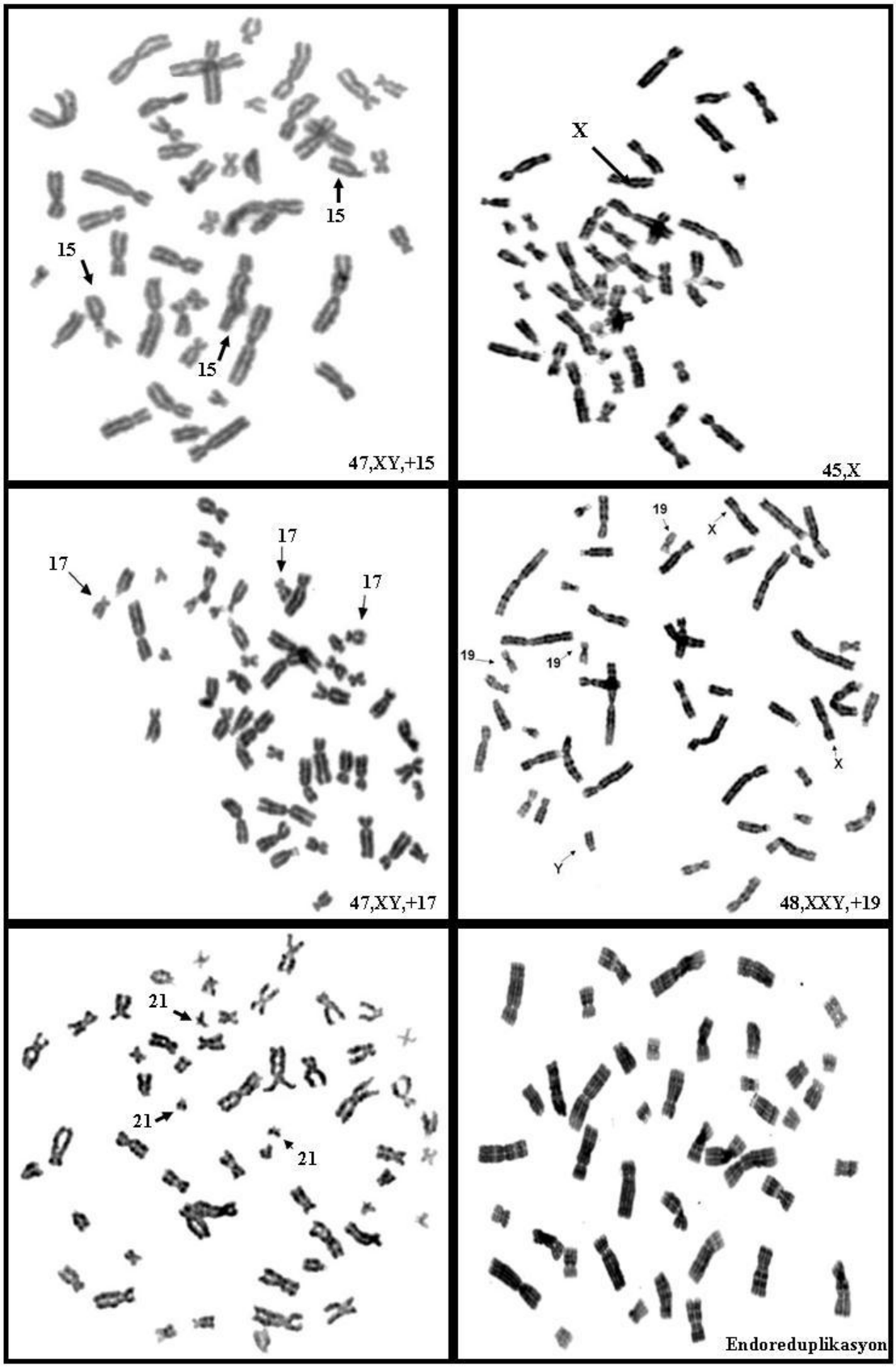
Hasta grubunda toplam 44 kişinin (%73,3) değişik sayısal ve/veya yapısal kromozom düzensizlikleri taşıdığı saptandı (Çizelge 4.6). Bu düzensizliklerin bazıları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Hastalarımızın 15'inde (%26,8), 1,2,3,4,6,7,10,11,16,18 ve Y kromozomlarının belirli bölgelerini içeren delesyonlar yüksek oranda tespit edildi. H3'de 1/25 oranında del(18)(p11.2 **à** pter) ve 1/25 oranında del(18)(q21 **à** qter) saptanırken, aynı metafazda del(Y)(p12 **à** pter) de birlikte eşlik etmekteydi. Bununla birlikte H5'de del(6)(p21 **à** pter), H6'da del(11)(p12 **à** pter), H9'da del(1)(q23 **à** qter), H10'da del(4)(q21 **à** qter), H17'de del(2)(p21 **à** pter), H19'da del(1)(p33 **à** pter), H22'de del(4)(q12 **à** qter), H27'de del(18)(p11 **à** pter) ve del(Y)(q12 **à** qter), H37'de del(16q), H50'de del(11)(p13 **à** pter) ve del(7)(p14 **à** pter), H53'de del(7)(p11 **à** pter) ve del(18)(q12 **à** pter), H57'de del(10)(q22.3 **à** qter) düzensizlikleri de 1/25 oranlarında metafaz hücrelerinde tespit edildi. Ayrıca, H8 ve H56 hastalarında del(3)(p14 **à** pter) (1/25 oranında) kromozom anomalisine de rastlandı.

Yine, H56 hastasında del(10)(q24 **à** qter) (1/25) delesyonu da aynı hücrede saptanan diğer bir anomali olarak kaydedildi (Çizelge 4.6).

Delesyonların yanı sıra translokasyonlar ve inversiyonlar da sıklıkla gözlendi. Dokuz hastada (%16,1); 1,4,5,6,7,8,9,11,12,15,17,21 ve X kromozomlarını içeren translokasyonların olduğu kaydedildi (Çizelge 4.6). Bu translokasyonlar, H10'da t(4;12)(q25;pter) (1/25), H15'de t(1;9)(q23;p12) (1/25), H17'de t(1;11)(p22;q25) (1/25) ve t(8;9)(q22;p24) (1/25), H31'de t(1;15)(q25;qter) (1/25), H35'de t(7;15)(pter;q22) (1/25), H46'da t(1;17)(p36;qter) (1/25), H47'de t(11;21)(pter;pter) (1/25), H49'da t(5;6)(q14;q25) (1/25), ve H58'de t(1;X)(p36;qter) (1/25) olarak belirlendi (Çizelge 4.6). Kromozom 7 ve 9'da perisentrik inversiyonlar tespit edildi. H11 hastasının tüm metafazlarında (25/25) inv(9)(p11;q13) saptanırken, H42 hastasının tek bir metafazında inv(7)(p11;q34), H47 hastasının tek bir metafazında da inv(9)(p11;q12) saptandı (Şekil 4.1).

Ayrıca, normal besiyerinde yapısal kromozom düzensizliklerinin yanı sıra otozomal ve gonozomal kromozom anöploidileri gözlendi. Altı hastada (%10,7) X kromozomu anöploidileri (X, XXY, XXX, XXXX) gözlendi. Bu hastaların beşinde (%8,9) (H10,H12,H37,H44,H46) 1/25 oranında 47,XXY kromozom kuruluşuna rastlandı. H46'da ayrıca tek bir metafazda 48,XXXX kromozom kuruluşu gözlendi. H54'de ise 2/25 oranında 45,X, 1/25 oranında 47,XXX karyotipi gösteren metafaz alanları elde edildi. Hasta grubumuzda yine yüksek oranda bulduğumuz diğer bir bulgu ise Y kromozomu kayıplarıdır. On bir hastada (%19,6) (H3,H4,H6,H8,H12,H24,H30,H38,H44,H46,H55) 1-3 arasında değişen oranlarda bu kromozomun olmadığı kaydedildi. Ayrıca, hastalarımızın 25'inde (%44,6), gerek azalış ve gerekse artışlar şeklinde sayısal otozomal kromozom anöploidilerine de rastlandı (Çizelge 4.6). Özellikle 4,6,8,9,10,12,13,14,17,18,19,20,21,22 kromozomlarında azalış, 5,8,14 ve 19. kromozomlarda artış şeklinde anöploidiler gözlendi. 19. kromozomun artışının H44 ve H48 için ortak bir bulgu olduğu belirlendi. Ayrıca asentrik (H41 ve H53) ve marker kromozomlar (H1) da gözlenen diğer anormal kromozomal bulgulardır (Şekil 4.2).

Sayısal ve yapısal kromozom düzensizlikleri dışında küçük Y kromozomu (H9), 9qh+ (H12,42,43,46,60), Yqh+ (H30,34,47,48,53), 16qh+ (H37), 22p+ (H47) ve 22ps+ (H57) gibi kromozomal polimorfik yapılar gözlendi (Çizelge 4.6).



Şekil 4.2. Hasta grubunda saptanan gonozomal ve otozomal sayısal kromozom anomalilerinden bazıları

Çizelge 4.6. Akciğer kanserli hasta grubu ile kontrol grubunun lenfosit hücrelerinde gözlenen yapısal ve sayısal kromozom düzensizlikleri

		Yapısal ve Sayısal Kromozom Düzensizlikleri (Anomali Saptanan Hücre Sayısı /Total Hücre Sayısı)	
	No.	Normal Besiyeri (RPMI-1640)	Folik Asitten Yoksun Besiyeri (M199)
Akciğer Kanserli Hasta Grubu	H1	47,XY,+mar (1/25) 45,XY,-17 (1/25)	46,XY,dup(4q) (1/50) 46,XY,-12,+9 (1/50)
	H3	46,XY,del(18)(q21 **à** qter), del(Y)(p1.2 **à** pter) (1/25) 46,XY,del(18)(p11.2 **à** pter) (1/25) 45,X,-Y (1/25)	46,XY
	H4	45,X,-Y (2/25) 45,XY,-21 (1/25)	46,XY,del(12)(q24 **à** qter) (1/50) 45,XY,-18 (2/50) 46,XY,del(11)(q21 **à** qter) (1/50) 46,XY,del(11)(q23 **à** qter) (1/50)
	H5	44,XY,-4,-5,del(6)(p21 **à** ter) (1/25)	45,XY,-18 (1/50) 45,XY,-20 (1/50) 44,X,-9,-Y (1/50) 46,XY,del(6)(q26 **à** ter) (1/50) 45,XY,-17 (1/50) 42,XY,-12,-15,-19,-20 (1/50) 45,XY,-8 (1/50) 45,XY,-15 (1/50) 48,XXXX (1/50) 45,XY,-19 (1/50) 46,XY,t(2;Y)(q31 **à** p11) (1/50)
	H6	45,XY,-18 (1/25) 45,X,-Y (1/25) 45,X,del(11)(p12 **à** ter),-Y (1/25)	41,XY,-????? (1/50) 44,XY,-14,-18 (1/50) 45,XY,-15 (1/50) 45,XY,-19 (1/50) 45,X,-Y (1/50)
	H7	46,XY	45,XY,-19 (1/50) 45,X,-Y (1/50) 45,XY,-15 (1/50) 47,XXY (1/50)
	H8	45,XY,-10 (1/25) 45,X,-Y (1/25) 45,XY,-17,del(3)(p14 **à** pter) (1/25) 45,XY,-12 (1/25)	46,XY,4p+ (1/50) 46,XY,9qh+ (2/50)
	H9	46,XY, del(1)(q23 **à** qter) (1/25) Küçük Y (25/25)	45,X,-Y (2/50) 45,XY,-22 (1/50) 45,XY,-9 (1/50) Küçük Y (50/50)
	H10	45,XY,-2,t(4;12)(q25;pter) (1/25) 46,XY,del(4)(q21 **à** qter) (1/25) 49,XXY,-12,-19, +22,+ace,+?x2 (1/25)	46,XY
	H11	46,XY,inv(9)(p11;q13) (25/25)	46,XY,inv(9)(p11;q13) (50/50)
	H12	43,XY,-4,-9,-14 (1/25) 45,X,-Y (1/25) 47,XXY (1/25) 45,XY,-9 (1/25) 9qh+ (25/25)	45,XY,-22 (1/50) 46,XY,t(13;14)(q34;q12) (1/50) 45,XY,-17 (1/50) 45,XY,-8 (1/50) 9qh+ (50/50)
	H13	45,XY,-8 (1/25) 45,XY,-18 (1/25) 45,XY,-20 (1/25) 45,XY,-4 (2/25)	44,XY,-3,-8 (1/50) 44,XY,-16,-18 (1/50) 46,XY,del(10p) (1/50)

Çizelge 4.6. (Devamı)

		Yapısal ve Sayısal Kromozom Düzensizlikleri (Anomali Saptanan Hücre Sayısı /Total Hücre Sayısı)	
	No.	**Normal Besiyeri (RPMI-1640)**	**Folik Asitten Yoksun Besiyeri (M199)**
Akciğer Kanserli Hasta Grubu	H14	46,XY	45,XY,-22 (1/50) 46,XY,t(9;11) ? (1/50) 47,XY,+21 (1/50) 44,XY,-6,-11 (1/50) 44,XY,-3,-18 (1/50) 45,XY,-20 (1/50)
	H15	45,XY,-21 (1/25) 43,XY,-4,-6,-13 (1/25) 46,XY,t(1;9)(q23;p12) (1/25) 44,XY,-17,-20 (1/25) 44,XY,-4,-8 (1/25) 45,XY,-14 (1/25)	46,XY,t(6;X)(p21;qter) (1/50) 45,XY,-7,der(8)t(8;?)(pter;?) (1/50)
	H17	46,XX,t(1;11)(p22;q25) (1/25) 46,XX,t(8;9)(q22;p24),del(2)(p21 **à** pter) (1/25)	44,XX,-3,-13 (1/50)
	H18	47,XY,+14 (1/25)	46,XY,del(3p),5q+ (1/50)
	H19	47,XX,+?, del(1)(p33 **à** pter) (1/25) 45,XX,-22 (1/25)	46,XY
	H22	46,XY,del(4)(q12 **à** qter) (1/25) 47,XY,+D,-(6p-6q15) (1/25)	44,XY,-19,-21 (1/50) 45,XY,-19 (1/50) 45,XY,-22 (1/50)
	H24	45,X,-Y (1/25)	46,XY
	H27	46,XY,del(18)(p11 **à** pter) (1/25) 46,XY,del(Y)(q12 **à** qter) (1/25) 45,XY,-19 (1/25)	46,XY,del(9q) (1/50) 47,XX,+1X2,+2X2,-3,+7X2, -9X2, +10, +11X2,+12,-13X2,+15,+16,-18,-20X2,-21X2, -22,-Y,+X (1/50) 46,XY,endoreduplikasyon (1/50)
	H28	45,XY,-21 (1/25) 45,XY,-22 (1/25)	46,XY
	H29	46,XY	46,XY,del(4)(q13 **à** qter) (1/50)
	H30	45,X,-Y (1/25) Yqh+ (24/25)	Yqh+ (50/50)
	H31	46,XY,t(1;15)(q25;qter) (1/25)	46,XY,del(14)(q22 **à** qter) (1/50) 46,XY,endoreduplikasyon (1/50)
	H32	44,XY,-14,-17 (1/25) 45,XY,-18 (1/25)	45,XY,-18 (1/50) 45,XY,-20 (1/50)
	H33	45,XY,-19 (1/25)	47,XY,+21 (1/50) Quadriradial görünüm (3;9) (1/50)
	H34	Yqh+ (25/25)	47,XYY (1/50) 48,XXY,+?,t(2;6)(q31;q21) (1/50) 47,XY,+15 (1/50) Yqh+ (50/50)
	H35	46,XY,t(7;15)(pter;q22) (1/25)	47,XY,+17 (1/50)
	H36	46,XY	45,Y,-X (1/50) 45,XY,-18 (1/50) 47,XXY (1/50) 46,XY,t(2;4)(q21;qter) (1/50)

Çizelge 4.6. (Devamı)

		Yapısal ve Sayısal Kromozom Düzensizlikleri (Anomali Saptanan Hücre Sayısı /Total Hücre Sayısı)	
	No.	**Normal Besiyeri (RPMI-1640)**	**Folik Asitten Yoksun Besiyeri (M199)**
Akciğer Kanserli Hasta Grubu	H37	46,XY,del(16q) (1/25) 47,XXY (1/25) 16qh+ (25/25)	45,XY,-19 (1/50) 50,XY,del(4)(p14 **à** pter),+aceX 4 (1/50) 45,XY,-22 (1/50) 45,X,-Y,del(3)(p23 **à** pter) (1/50) 47,XY,+22 (1/50) 16qh+ (50/50)
	H38	45,X,-Y (3/25) 45,XY,-4 (1/25) 45,XY,-20 (1/25)	45,XY,-5 (1/50) 46,XY,der(1;4)t(1)(qter;q25) (1/50) 46,XY,del(2)(q21-qter) (1/50) 47,XY,+mar (1/50) 47,XXY (1/50)
	H39	46,XX (25/25)	45,X (3/50) 46,XX,2p+ (1/50)
	H40	46,XY (25/25)	45,X,-Y (1/50) 46,XY,del(7)(q32 **à** qter) (1/50) 46,XY,del(20)(qcen **à** qter) (1/50)
	H41	47,XY,+ace (1/25)	45,XY,-14 (1/50)
	H42	46,XY,inv(7)(p11;q34) (1/25) 9qh+ (25/25)	45,XY,-16 (1/50) 45,XY,-19 (1/50) 45,XY,-3 (1/50) 9qh+ (50/50)
	H43	46,XY,9qh+ (25/25)	46,XY,9qh+ (50/50)
	H44	45,X,-Y (1/25) 45,XY,-20 (1/25) 48,XXY,+19 (1/25) Hiperploidi (1/25)	46,XY,del(9p) (1/50)
	H45	45,XY,-18 (1/25)	45,XY,-20 (1/50)
	H46	45,X,-Y (1/25) 47,XXY (1/25) 48,XXXX (1/25) 46,XY,t(1;17)(p36;qter) (1/25) 9qh+ (25/25)	45,XY,-14 (1/50) 9qh+ (50/50)
	H47	46,XY,t(11;21)(pter;pter) (1/25) 46,XY,inv(9)(p11;q12) (1/25) Yqh+ (25/25) 22p+ (25/25)	Yqh+ (50/50) 22p+ (50/50)
	H48	45,XY,-17 (1/25) 47,XY,+19 (1/25) Yqh+ (25/25)	47,XY,+mar (1/50) 46,XY,endoreduplikasyon (1/50) 45,X,Y (1/50) Yqh+ (49/50)
	H49	46,XY,t(5;6)(q14;q25) (1/25) 45,XY,-4 (1/25)	45,XY,-20 (1/50) 45,X,-Y (1/50) 45,XY,-4 (1/50)
	H50	45,XY,-22, del(11)(p13 **à** pter), del(7)(p14 **à** pter) (1/25)	47,XY,+6 (1/50) 45,XY,-13 (1/50) 45,XY,-16 (1/50) 46,XY,del(1)(q11 **à** qter) (1/50) 45,XY,-18 (1/50) 46,XY,t(8;12)(qter;q15) (1/50) 45,X,-Y (1/50) 47,XY,+21 (1/50)

Çizelge 4.6. (Devamı)

		Yapısal ve Sayısal Kromozom Düzensizlikleri (Anomali Saptanan Hücre Sayısı /Total Hücre Sayısı)	
	No.	**Normal Besiyeri (RPMI-1640)**	**Folik Asitten Yoksun Besiyeri (M199)**
Akciğer Kanserli Hasta Grubu	H51	46,XY (25/25)	46,XY,i(9q) (1/50) 55,XY,+2X2, +3, +14, +15, +16X2, -17, +19 (1/50) 45,XY,-19 (1/50) 45,X,-Y (2/50) 57,XXYY,+1,+3,+4,+5,+12,+14, +17, +19,+21 (1/50) 46,XY,inv(7)(p12;q32) (1/50) 46,XY,t(10;13)(q22;qter) (1/50)
	H52	46,XY (25/25)	45,X,-Y (3/50) 45,X,-Y,del(20)(q11 **à** qter) (1/50) 45,XY,-7 (1/50) 45,XY,-15 (1/50) 47,XY,+21 (1/50)
	H53	47,XY,+8 (1/25) 47,XY,+ace (1/25) 46,XY,del(7)(p11 **à** pter) (1/25) 46,XY,del(18)(q12 **à** pter) (1/25) Yqh+ (25/25)	45,X,-Y (3/50) 46,XY,del(7)(q11 **à** qter) (1/50) 48,XY,+13X2 (1/50) 46,XY,del(9)(q32 **à** qter) (1/50) 47,XY,+4 (1/50) Yqh+ (49/50)
	H54	45,X (2/25) 45,XX,-14 (1/25) 47,XX,+5 (1/25) 47,XXX (1/25) 45,XY,-10 (1/25)	45,XX,-6 (1/50) 45,X (3/50) 46,X,-X,+21 (1/50) 47,XX,+2 (1/50) 45,XX,-18 (1/50)
	H55	45,X,-Y (2/25)	46,XY,del(15)(q22 **à** qter) (1/50) 46,XY,del(1)(q31 **à** qter) (1/50) 47,XXY (1/50) 45,XO,-Y (1/50) 46,XY,t(1;3)(p13;qter) (1/50) 46,XY,endoreduplikasyon (2/50)
	H56	46,XY,del(10)(q24 **à** qter) (1/25) 46,XY,del(3)(p14 **à** pter) (1/25)	45,X,-Y (3/50) 47,XY,+? (1/50)
	H57	46,XY,del(10)(q22.3 **à** qter) (2/25) 46,XY,22ps+ (25/25)	46,XY,del(10)(q22.3 **à** qter) (3/50) 46,XY,trizomi(10q24 **à** qter) (1/50) 47,XY,+ace (1/50) 47,XYY (1/50) 45,XY,-17 (1/50) 45,XY,-18 (1/50) 46,XY,22ps+ (50/50)
	H58	46,XY,t(1;X)(p36;qter) (1/25)	46,XY (50/50)
	H59	46,XY (25/25)	47,XY,+ace (1/50) 47,XXY (1/50) 45,XY,-6 (1/50) 46,XY,del(12)(q13 **à** qter) (1/50)
	H60	46,XY,9qh+ (25/25)	46,XY,t(4;5)(q31;pter) (1/50) 46,XY,del(3)(p14 **à** pter) (1/50) 45,X,-Y (1/50) 45,XY,-11 (1/50) 9qh+ (50/50)

Çizelge 4.6. (Devamı)

		Yapısal ve Sayısal Kromozom Düzensizlikleri (Anomali Saptanan Hücre Sayısı /Total Hücre Sayısı)	
	No.	**Normal Besiyeri (RPMI-1640)**	**Folik Asitten Yoksun Besiyeri (M199)**
Kontrol Grubu	K1	46,XY,küçük Y,9qh+ (25/25)	46,XY, küçükY,9qh+ (50/50)
	K2	46,XY (25/25)	47,XY,+19 (1/50) 46,XY,t(5;20)(q15;qter)
	K3	46,XY,Yqh+ (25/25)	49,XY,+2,+6,+8 (1/50) 45,XY,-8 (1/50) 47,XXY (1/50) Yqh+ (50/50)
	K5	46,XY,inv(9)(p11;q13) (25/25)	46,XY,inv(9)(p11;q13) (50/50)
	K6	46,XY,del(4)(q12 **à** qter) (1/25)	46,XY,inv(7)(p13;q32) (1/50)
	K7	47,XY,+? (1/25) 46,XY,trizomi 14q24 **à** qter (1/25)	46,XY,t(9;22)(q11;q11) (1/50) 45,X,-Y (1/50)
	K8	46,XY,del(14p) (1/25)	46,XY (50/50)
	K16	46,XY (25/25)	47,XXY (1/50)
	K17	46,XY (25/25)	48,XY,+aceX2 (1/50)
	K19	46,XY (25/25)	46,XY,del(1)(q32 **à** qter) (1/50) 45,XY,-18 (1/50)
	K23	46,XY (25/25)	46,XY,del(6)(q15 **à** qter) (1/50)
	K27	46,XY,del(9)(q32 **à** qter) (1/25)	46,XY (50/50)
	K28	46,XY (25/25)	46,XY,t(3;16)(p14;qter) (1/50)

Kontrol grubunda, normal besiyeri içerisinde 23 kişinin (%76,7) normal karyotipe sahip olduğu gözlendi (46,XX/46,XY). Bir kişinin (K5) tüm metafaz hücrelerinde inv(9)(p11;q13) kromozomal düzensizliğinin olduğu, üç kişinin (K6,8,17) (%10) sırasıyla del(4)(q12 **à** qter), del(14p) ve del(9)(q32 **à** qter) kromozom kayıplarına sahip olduğu (1/25 oranlarında), ve K7 kişisinin 47,XY,+? (1/25) ve 46,XY,trizomi 14q24 **à** qter (1/25) kromozom kuruluşlarını taşıdığı saptandı. Ayrıca, K1 kişisinde küçük Y ve 9qh+, K3 kişisinde de Yqh+ heteromorfizmlerine tüm metafaz alanlarında rastlandı (Çizelge 4.6).

4.1.2.2. Folik Asitten Yoksun Besiyerinde (M199) Kültüre Edilen Kan Dokularında Saptanan Sitogenetik Bulgular

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarının her ikisi için normal besiyerinin yanı sıra folik asitten yoksun besiyeri kullanaraktan da hücre kültürü yapıldı. Bu medyum, frajil bölgeleri indüklemek ve hastalığın oluşumunda önemli olabilecek sıcak noktaları belirlemek için kullanıldı. Her birey için 50 metafaz alanı incelendi. Saptanan sayısal ve yapısal kromozom bozuklukları ile frajil bölgeler kaydedildi.

Hasta grubunda 47 kişinin (%83,9), kontrol grubunda ise 12 kişinin (%40) en az bir sayısal ve/veya yapısal kromozom düzensizliğine sahip olduğu kaydedildi. On sekiz hastada (%32,1), 1,2,3,4,6,7,9,10,11,12,14,15 ve 20. kromozomları içeren delesyonlar tespit edildi (Çizelge 4.6). H50 ve H55'de 1. kromozomda 1/50 oranlarında iki tip delesyon [del(1)(q11 **à** qter) ve del(1)(q31 **à** qter)] saptandı. H55'de bu delesyonla birlikte 15. kromozomun uzun kolunda bir delesyon tespit edildi [del(15)(q22 **à** qter)] (1/50). H38'de 1/50 oranında del(2)(q21 **à** qter) saptanırken, H18, H37 ve H60'da 3. kromozomun kısa kolunu içeren delesyonlar [del(3p), del(3)(p23 **à** pter) ve del(3)(p14 **à** pter)] (1/50) saptandı. H37'de ayrıca del(4)(p14 **à** pter) (1/50) gözlenirken 4. kromozomda bir başka delesyon da [del(4)(q13 **à** qter)] H29'da kaydedildi (1/50). 6. kromozomda ise tek bir delesyon, del(6)(q26 **à** qter), 1/50 oranında H5'de bulundu. İki hastada (H40 ve H53) 7. kromozomu içeren 2 farklı tipte delesyon [del(7)(q32 **à** qter) ve del(7)(q11 **à** qter)] (1/50 oranlarında) saptanırken, aynı hastalarda 9. ve 20. kromozomları ilgilendiren farklı iki tipte delesyon daha saptandı [del(9)(q32 **à** qter) (H53) ve del(20)(qcen **à** qter) (H40)] (1/50) (Şekil 4.1). 9. kromozomun uzun ve kısa kolunun delesyonları iki hastada (H27 ve H44) gözlenen diğer bulgular arasında yer almaktadır. Diğer bir delesyona uğrayan kromozom da 10. kromozomdur. H13'de 10. kromozomun kısa kolunun (10p) delesyonu 1/50 oranında saptanırken, H57'de 3/50 oranında del(10)(q22.3 **à** qter) saptandı. On birinci ve 12. kromozomlardaki delesyonlar da [del(11)(q21 **à** qter), del(11)(q23 **à** qter), del(12)(q24 **à** qter) (H4), del(12)(q13 **à** qter) (H59) (1/50)] hasta grubunda saptanan diğer yapısal kromozom düzensizlikleri arasında yer almaktadır (Çizelge 4.6).

Hasta grubunda delesyonlar dışında ayrıca translokasyon, derivatif kromozom oluşumu, inversiyon, duplikasyon, quadriradial görünüm, izokromozom oluşum ve endoreduplikasyon gibi yapısal kromozom düzensizlikleri de saptandı. Translokasyonların özellikle, 1,2,3,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14,X ve Y kromozomları arasında oluştuğu gözlendi. Bu translokasyonlar; t(2;Y)(q31;p11) (H5), t(13;14)(q34;q12) (H12); t(9;11)(?;?) (H14), t(6;X)(p21;qter) (H15), t(2;6)(q31;q21) (H34), t(2;4)(q21;qter) (H36), t(8;12)(qter;q15) (H50), t(10;13)(q22;qter) (H51), t(1;3)(p13;qter) (H55) ve t(4;5)(q31;pter) (H60) şeklinde rapor edildi (1/50). On beş no'lu hastada, translokasyon dışında bir hücrede tanımlanamayan derivatif 8 kromozomuna rastlandı [der(8)t(8;?)(pter;?)] (1/50). Ayrıca dup(4q) (H1), i(9q) (H51),

quadriradial görünüm (H33), inv(7)(p12;q32) (H51) ve trizomi (10)(q24 **à** qter) (H57) gibi kromozom yeniden düzenlenmeleri de 1/50 oranında saptanan diğer bulgulardır. inv(9)(p11;q13) kromozom yeniden düzenlenmesi ise 11 no'lu hastanın tüm metafazlarında saptandı (Çizelge 4.1). Bunun yanı sıra, 4 hastada (H27,H31,H48,H55) endoreduplikasyon oluşumları da tek metafazlarda gözlendi (Şekil 4.2).

Hasta grubumuzda yapısal kromozom düzensizlikleri dışında sayısal kromozom düzensizliklere de rastlandı. Özellikle, cinsiyet kromozom anöploidileri 22 kişide (%39,3) belirlendi. Y kromozom kayıpları 15 hastada (%26,8) 1-3/50 oranlarında saptanırken, XXY kromozom kuruluşu 6 hastada (H7,H34,H36,H38,H55,H59) 1/50 oranlarında, XYY ise 2 hastada (H34 ve H57) 1/50 oranında saptandı. Beş no'lu erkek bir hastada tek bir metafazda 48,XXXX kromozom kuruluşu, 39 ve 54 no'lu hastalarda ise sırasıyla %6 ve %8 oranlarında 45,X kromozom kuruluşu gözlendi (Çizelge 4.6) (Şekil 4.2).

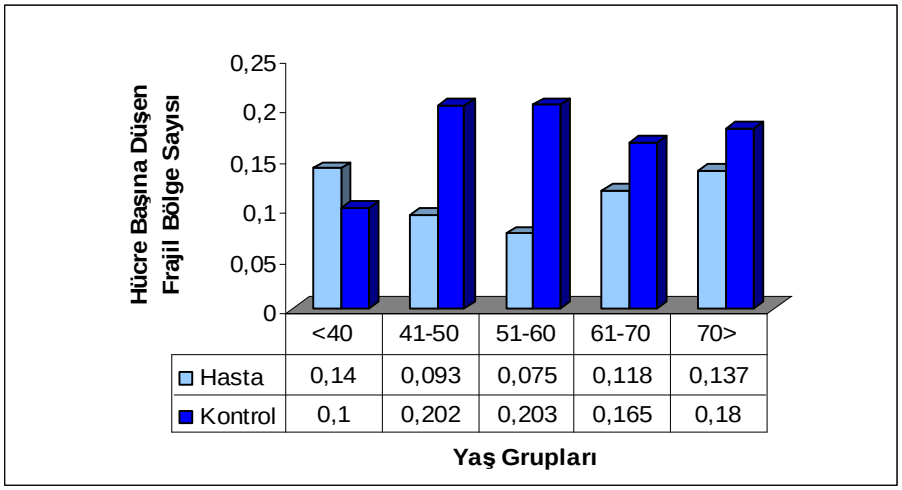
Cinsiyet kromozom anöploidileri dışında hastalarımızın 34'ünde (%60,7) otozomal kromozom anöploidileri de gözlendi. Bunlar; 3,4,5,6,7,8,9,11,12, 13,14,15, 16,17,18,19,20,21 ve 22. kromozomların azalışı, 2,4,6,9,13,15,17,21 ve 22. kromozomların artışı şeklinde gözlendi (Çizelge 4.6). Ayrıca, iki hastada (H38 ve H48) 47,XY,+mar ve diğer iki hastada (H57 ve H59) 47,XY,+ace kromozom kuruluşlarına rastlanıldı (1/50). Üç hastada da (H8,H18,H39) sırasıyla 4p (1/50), 5q (1/50) ve 2p (1/50) kromozom kollarında artışlar tespit edildi (Çizelge 4.6). Heteromorfizm gösteren kromozomlar ise hastaların normal besiyerlerinde tespit edildiği gibi bulundu.

Kontrol grubunda ise 10 (%33,3) kişide sayısal ve/veya yapısal kromozom düzensizlikleri tespit edildi. Üç kişide (K2,7,28) üç farklı tipte translokasyon saptandı. Bunlar; K2'de t(5;20)(q15;qter) (1/50), K7'de t(9;22)(q11;q11) (1/50) ve K28'de t(3;16)(p14;qter) (1/50) şeklindeydi. Translokasyonların yanı sıra K5 ve K6'da sırasıyla inv(9)(p11;q13) (50/50) ve inv(7)(p13;q32) (1/50), K19 ve K23'de del(1)(q32 **à** qter) (1/50) ve del(6)(q15;qter) (1/50) yapısal kromozom düzensizlikleri de belirlendi. Ayrıca, kontrol grubunda sayısal kromozom anomalileri de tespit edildi. İki kişide (K3 ve K16) 47,XXY kromozom kuruluşu 1/50 oranında saptanırken, K7'de Y kromozom kaybına (45,X,-Y) (1/50) ve K17'de 48,XY,+aceX2 (1/50) düzensizliğine rastlandı. Bunların yanı sıra normal otozomal kromozom sayısından sapmalar da gözlendi. Özellikle, 2, 6, 8, ve 19. kromozomlarda artış, 8 ve 18. kromozomlarda azalışlar

gözlendi. Heteromorfizm gösteren kromozomlar ise kontrol grubunu oluşturan kişilerin normal besiyerlerinde tespit edildiği gibi bulundu (Çizelge 4.6).

Folik asitten yoksun besiyerinde elde edilen metafaz plaklarında yapısal ve sayısal kromozom düzensizlikleri dışında frajil bölgeler de tespit edildi. Kromozomal frajil bölgeler, uygun *in vitro* koşullar altında kromozomun bir ya da her iki kromatidinde ortaya çıkan çoğunlukla boyanmamış gap, daha az sıklıkta kırık ve çok nadir gözlenen delesyonlar, multiradiyal oluşumlar ve asentrik fragmentler şeklinde tanımlanmaktadır[40,41,42]. Folik asitten yoksun besiyeri frajil bölgeleri indüklemek için uygun bir ortam oluşturmaktadır.

Hasta grubunda folik asitten yoksun besiyerinde incelenen 2800 hücrenin toplam 304 frajilite taşıdığı, hücre başına %10,85 frajilite düştüğü, kontrol grubunda ise 1500 hücrenin toplam 279 frajilite taşıdığı ve hücre başına %18,60 frajilitenin düştüğü tespit edildi (Çizelge 4.7). Yaş gruplarına göre hücre başına düşen frajilite miktarlarına bakıldığında; hasta grubunda 50 yaş üzerinde, kontrol grubunda ise 40 yaş üzerinde frajilite sayısında artışın gözlendiği kaydedildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Yaş gruplarına göre hücre başına düşen frajilite sayılarının dağılımı

Hasta ve kontrol gruplarında saptanan frajil bölgelerin sayısı, kromozom bölgelerine göre dağılımı, populasyondaki sıklığı (hücre başına düşen frajilite sayısı=saptanan frajilite sayısı/incelenen hücre sayısı), nisbi oranı (saptanan frajilite sayısı/toplam frajilite sayısı) ve önemlilik derecesi çizelge 4.7.'de gösterildi. Buna göre;

hasta grubunda frajilitenin en yoğun olduğu kromozom bölgeleri önemlilik sırasına göre; 3p14, 9q13, 1q21, 7q22, 1q12, 10q24, 16q24, 10q22, 7q32, 14q24, 1q32, 2q21, 5q31, 6p21, 3p25, 19q13 ve Xq26 şeklinde sıralandığı görülmektedir (Çizelge 4.7). Kontrol grubunda ise; 3p14, 14q24, 16q22, 10q22, 19p13, 2q31, 7q32, 8q22, 7q22, 9q32, 9q34, 2p23, 5q31, 1p36, 1q12, 2q21, 3p25, 3p21, 3q27, 9q13, 11p14, 12q15, 14q22, 15q21, 16q24, 17q21, 19q13 ve Xq22 şeklindedir (Çizelge 4.7). Hücre başına düşen frajilite sayısı açısından hasta grubunu kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda, sadece 1q21 kromozom bölgesinin kontrol grubuna göre çok daha yüksek oranda eksprese olduğunu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (p=0,015). 2p23, 2q31, 3p14, 3q27, 6q25, 8q22, 9q32, 9q34, 11p14, 14q24, 16q22 ve 19p13 kromozom bölgeleri hasta grubundan daha çok kontrol grubunda daha fazla eksprese olup istatistiksel olarak kontrol grubuna yönelik anlamlılık ifade etti (p= 0,000-0,046) (Çizelge 4.7) (Şekil 4.4). Hasta grubunda saptanan frajil bölgelerden bazıları Şekil 4.5'da gösterildi.

Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, hücre başına düşen frajil bölge sayısı, nisbi oranı ve önemlilik sırası

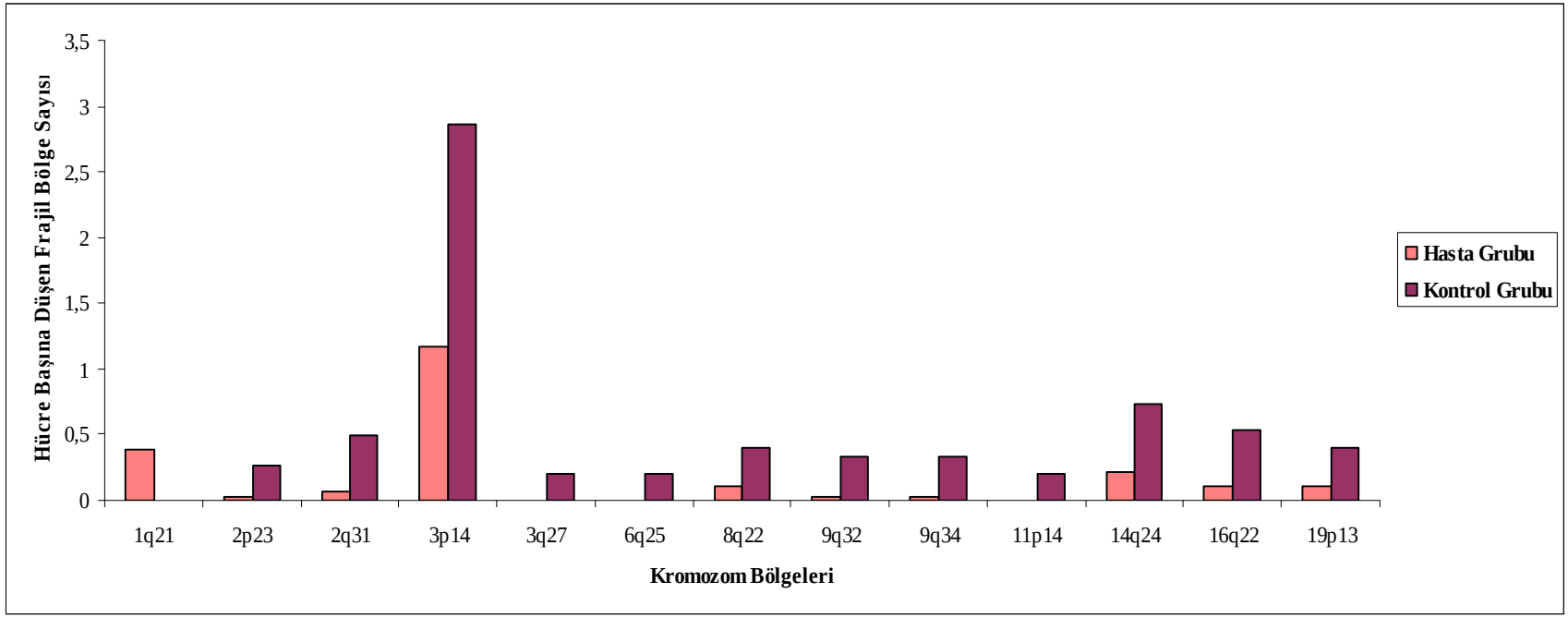
Kromozom Bölgeleri	Hasta Grubu (56)				Kontrol Grubu (30)				c^2 Testi (p değeri)
	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	
1p36	1	0,03	0,32		3	0,20	1,07	**8**	0,093
1p22	4	0,14	1,31		2	0,13	0,71		0,937
1p13	2	0,07	0,65		1	0,06	0,35		0,955
1q12	9	0,32	2,96	**5**	3	0,20	1,07	**8**	0,473
1q21	**11**	**0,39**	**3,61**	**3**	**0**	**-**	**-**		**0,015**
1q25	3	0,10	0,98		2	0,13	0,71		0,810
1q32	5	0,17	1,64	**8**	2	0,13	0,71		0,726
2p23	**1**	**0,03**	**0,32**		**4**	**0,26**	**1,43**	**7**	**0,034**
2q21	5	0,17	1,64	**8**	3	0,20	1,07	**8**	0,877
2q23	3	0,10	0,98		0	-	-		0,205
2q31	**2**	**0,07**	**0,65**		**6**	**0,40**	**2,15**	**5**	**0,017**
3p25	4	0,14	1,31	**9**	3	0,20	1,07	**8**	0,658
3p21	2	0,07	0,65		3	0,20	1,07	**8**	0,239
3p14	**33**	**1,17**	**10,85**	**1**	**43**	**2,86**	**15,41**	**1**	**0,000**
3q27	**0**	**-**	**-**		**3**	**0,20**	**1,07**	**8**	**0,018**
4q31	2	0,07	0,65		2	0,13	0,71		0,526
4q33	3	0,10	0,98		1	0,06	0,35		0,678
5q13	3	0,10	0,98		1	0,06	0,35		0,678
5q31	5	0,17	1,64	**8**	4	0,26	1,43	**7**	0,548
6p25	3	0,10	0,98		0	-	-		0,205
6p21	5	0,17	1,64	**8**	1	0,06	0,35		0,349
6q21	10	0,35	3,28		3	0,20	1,07		0,372
6q25	**0**	**-**	**-**		**3**	**0,20**	**1,07**		**0,018**
6q26	3	0,10	0,98		0	-	-		0,205
7q22	10	0,35	3,28	**4**	5	0,33	1,79	**6**	0,900
7q32	6	0,21	1,97	**7**	6	0,40	2,15	**5**	0,273
8q13	2	0,07	0,65		2	0,13	0,71		0,526
8q22	**3**	**0,10**	**0,98**		**6**	**0,40**	**2,15**	**5**	**0,046**
8q24	2	0,07	0,65		4	0,26	1,43	**7**	0,103
9p22	3	0,10	0,98		1	0,06	0,35		0,678
9p13	3	0,10	0,98		0	-	-		0,205
9q13	12	0,42	3,94	**2**	3	0,20	1,07	**8**	0,227
9q22	3	0,10	0,98		1	0,06	0,35		0,678
9q32	**1**	**0,03**	**0,32**		**5**	**0,33**	**1,79**	**6**	**0,013**
9q34	**1**	**0,03**	**0,32**		**5**	**0,33**	**1,79**	**6**	**0,013**
10q22	6	0,21	1,97	**7**	7	0,46	2,50	**4**	0,152
10q24	8	0,28	2,63	**6**	2	0,13	0,71		0,324
11p14	**0**	**-**	**-**		**3**	**0,20**	**1,07**	**8**	**0,018**
11q23	3	0,10	0,98		2	0,13	0,71		0,810
12q13	3	0,10	0,98		2	0,13	0,71		0,810
12q15	1	0,03	0,32		3	0,20	1,07	**8**	0,093
14q22	3	0,10	0,98		3	0,20	1,07	**8**	0,438

*** Nisbi oran= Saptanan frajil bölge sayısı/toplam frajil bölge sayısı; MKK=Multi kromozom kırıkları, FB=Frajil Bölge**

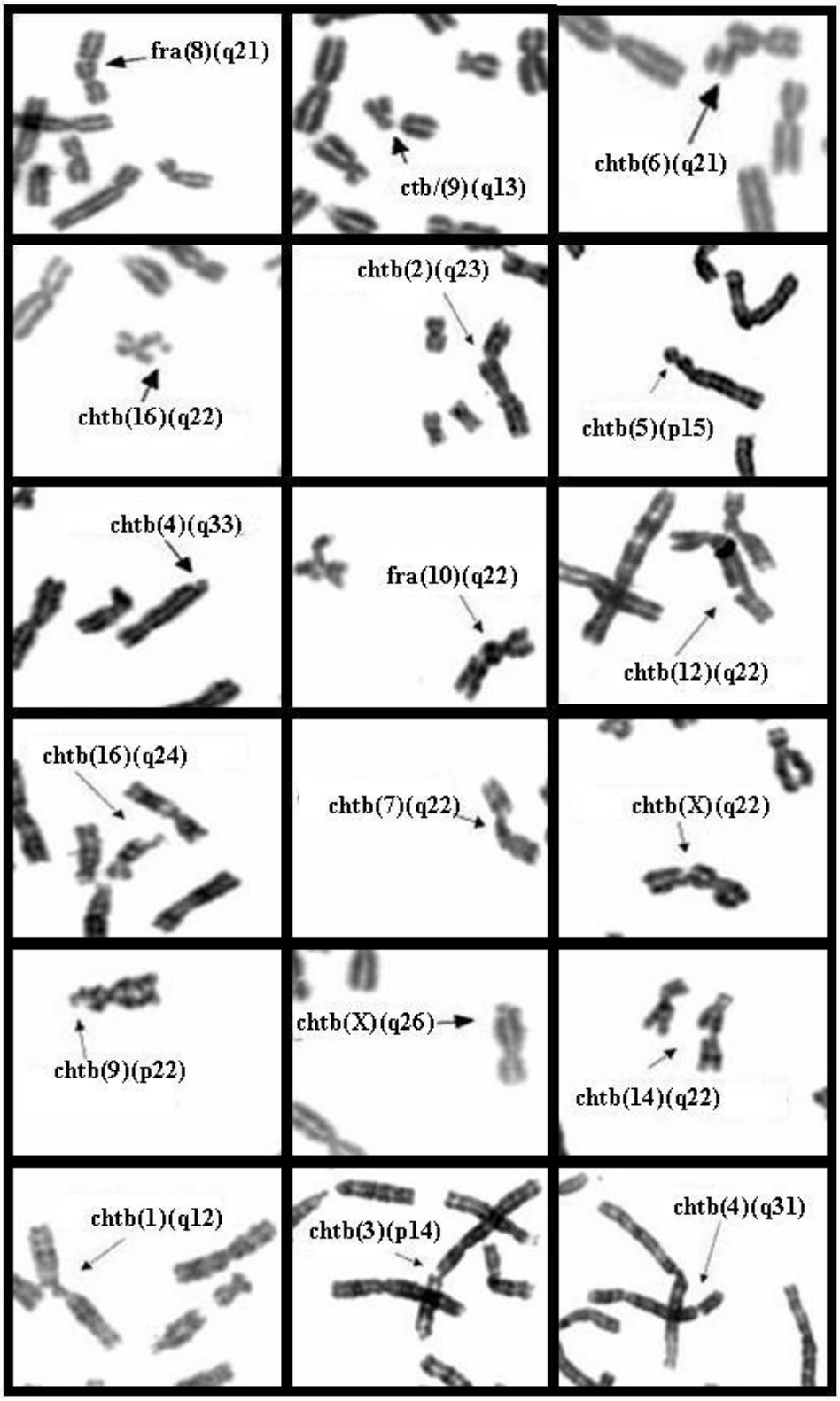
Çizelge 4.7. (Devamı)

Kromozom Bölgeleri	Hasta Grubu (56)				Kontrol Grubu (30)				c^2 Testi (p değeri)
	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	
14q24	**6**	**0,21**	**1,97**	**7**	**11**	**0,73**	**3,94**	**2**	**0,010**
15q21	1	0,03	0,32		3	0,20	1,07	**8**	0,093
16q22	**3**	**0,10**	**0,98**		**8**	**0,53**	**2,86**	**3**	**0,009**
16q24	8	0,28	2,63	**6**	3	0,20	1,07	**8**	0,597
17q21	4	0,14	1,31		3	0,20	1,07	**8**	0,658
18q21	3	0,10	0,98		1	0,06	0,35		0,678
19p13	**3**	**0,10**	**0,98**		**6**	**0,40**	**2,15**	**5**	**0,046**
19q13	4	0,14	1,31	**9**	3	0,20	1,07	**8**	0,658
Xq22	1	0,03	0,32		3	0,20	1,07	**8**	0,093
Xq26	4	0,14	1,31	**9**	0	-	-		0,143
MKK	**2**	**0,07**	**0,65**		**5**	**0,33**	**1,79**	**6**	**0,043**
Diğerler	76				80				
Toplam	**304**	**10,85**			**279**	**18,60**			**0,000**

*** Nisbi oran= Saptanan frajil bölge sayısı/toplam frajil bölge sayısı; MKK=Multi kromozom kırıkları, FB=Frajil Bölge**

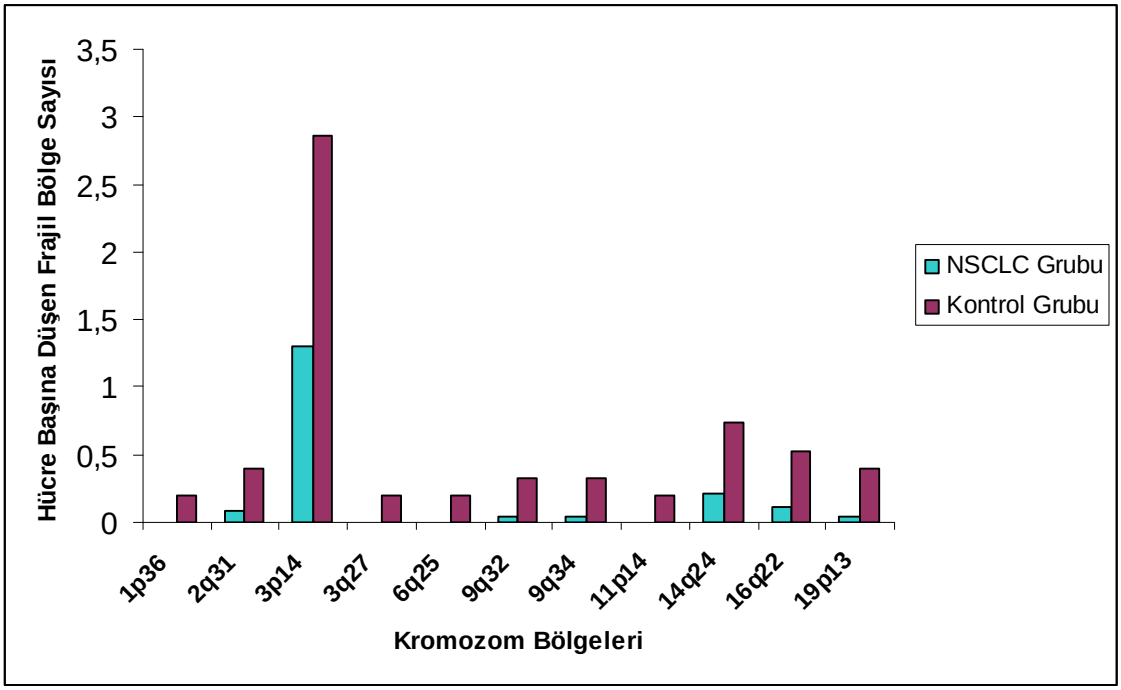


Şekil 4.4. Hasta-kontrol gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği



Şekil 4.5. Hasta grubunda saptanan frajil bölgelerin bazılarının kısmi metafaz görüntüleri

Hasta grubunun %85'ini oluşturan NSCLC grubunda (n=51), 2350 hücre incelendi, 101 farklı bölgede toplam 248 frajilite tespit edildi ve hücre başına %10,55 frajilitenin düştüğü kaydedildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki farkın kontrol grubu yönünde anlamlı olduğu bulundu (p=0,000). NSCLC ve kontrol gruplarında saptanan frajil bölgelerin sayısı, kromozom bölgelerine göre dağılımı, populasyondaki sıklığı (hücre başına düşen frajilite sayısı=saptanan frajilite sayısı/incelenen hücre sayısı), nisbi oranı (saptanan frajilite sayısı/toplam frajilite sayısı) ve önemlilik derecesi çizelge 4.8'de gösterildi. Buna göre; NSCLC grubunda frajilitenin en yoğun olduğu kromozom bölgeleri önemlilik sırasına göre; 3p14, 9q13, 6q21, 7q22, 10q24, 16q24, 1q12, 10q22, 1q21, 6p21, 14q24, 1p22, 2q21, 3p25, 7q32 ve Xq26 şeklindedir. Kontrol grubu ile hücre başına düşen frajilite açısından karşılaştırıldığında 1p36, 2q31, 3p14, 3q27, 6q25, 9q32, 9q34, 11p14, 14q24, 16q22 ve 19p13 kromozom bölgelerinin kontrollerde daha fazla eksprese olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p=0,001-0,037) (Çizelge 4.8.) (Şekil 4.6).



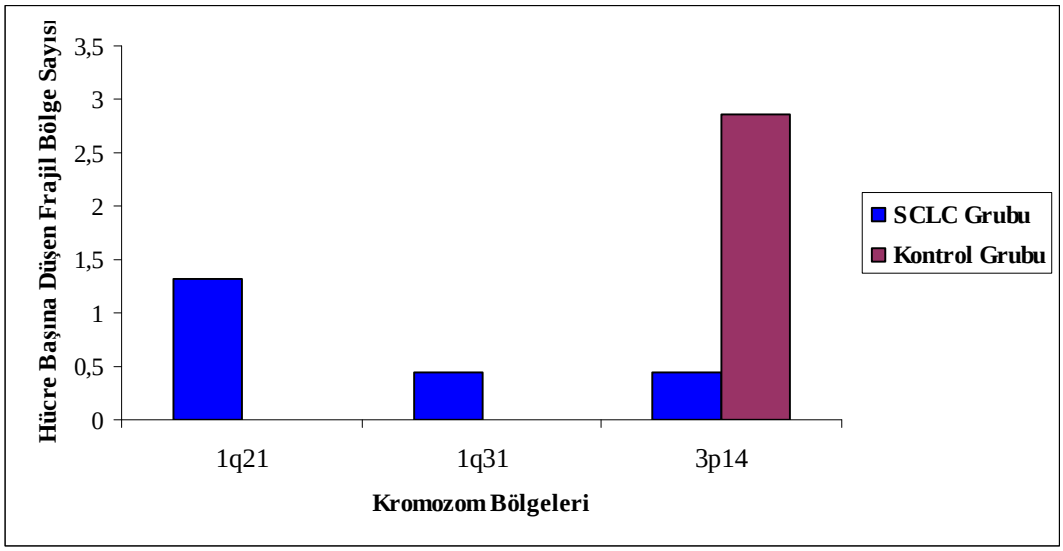
Şekil 4.6. NSCLC-kontrol gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği

Çizelge 4.8. NSCLC ile kontrol gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, populasyondaki sıklığı, nisbi oranı ve önemlilik sırası

Kromozom Bölgeleri	NSCLC (47)				Kontrol (30)				c^2 Testi (p değeri)
	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	
1p36	**0**	**-**	**-**		**3**	**0,20**	**1,07**	**8**	**0,030**
1p22	4	0,17	1,61	**8**	2	0,13	0,71		0,778
1q12	6	0,25	2,41	**6**	3	0,20	1,07	**8**	0,729
1q21	5	0,21	2,01	**7**	0	-	-		0,074
1q32	3	0,12	1,20		2	0,13	0,71		0,962
2p23	1	0,04	0,40		4	0,26	1,43	**7**	0,060
2q21	4	0,17	1,61	**8**	3	0,20	1,07	**8**	0,833
2q31	**2**	**0,08**	**0,80**		**6**	**0,40**	**2,15**	**5**	**0,037**
3p25	4	0,17	1,61	**8**	3	0,20	1,07	**8**	0,833
3p14	**31**	**1,31**	**12,50**	**1**	**43**	**2,86**	**15,41**	**1**	**0,001**
3q27	**0**	**-**	**-**		**3**	**0,20**	**1,07**	**8**	**0,030**
5q31	3	0,12	1,20		4	0,26	1,43	**7**	0,324
6p21	5	0,21	2,01	**7**	1	0,06	0,35		0,263
6q21	9	0,38	3,62	**3**	3	0,20	1,07	**8**	0,322
6q25	**0**	**-**	**-**		**3**	**0,20**	**1,07**	**8**	**0,030**
7q22	8	0,34	3,22	**4**	5	0,33	1,79	**6**	0,971
7q32	4	0,17	1,61	**8**	6	0,40	2,15	**5**	0,173
8q22	3	0,12	1,20		6	0,40	2,15	**5**	0,089
8q24	2	0,08	0,80		4	0,26	1,43	**7**	0,164
9q13	10	0,42	4,03	**2**	3	0,20	1,07	**8**	0,241
9q32	**1**	**0,04**	**0,40**		**5**	**0,33**	**1,79**	**6**	**0,026**
9q34	**1**	**0,04**	**0,40**		**5**	**0,33**	**1,79**	**6**	**0,026**
10q22	6	0,25	2,41	**6**	7	0,46	2,50	**4**	0,273
10q24	8	0,34	3,22	**4**	2	0,13	0,71		0,219
11p14	**0**	**-**	**-**		**3**	**0,20**	**1,07**	**8**	**0,030**
14q24	**5**	**0,21**	**2,01**	**7**	**11**	**0,73**	**3,94**	**2**	**0,015**
16q22	**3**	**0,12**	**1,20**		**8**	**0,53**	**2,86**	**3**	**0,022**
16q24	7	0,29	2,82	**5**	3	0,20	1,07	**8**	0,562
19p13	**1**	**0,04**	**0,40**		**6**	**0,40**	**2,15**	**5**	**0,011**
19q13	3	0,12	1,20		3	0,20	1,07	**8**	0,580
Xq26	4	0,17	1,61	**8**	0	-	-		0,110
Diğer	105				119				
Toplam	248	10,55			279	18,60			**0,000**

*** Nisbi oran= Saptanan frajil bölge sayısı/toplam frajil bölge sayısı; MKK=Multi kromozom kırıkları, FB=Frajil Bölge**

SCLC grubunda (n=9) 450 hücre incelendi, 37 farklı bölgede toplam 56 tane frajilite saptandı. Hücre başına düşen frajilite oranına bakıldığında bu oran %12,44 olarak bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki farkın kontrol grubu yönünde anlamlı olduğu bulundu (p=0,010) (Çizelge 4.9).



Şekil 4.7. SCLC-kontrol gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği

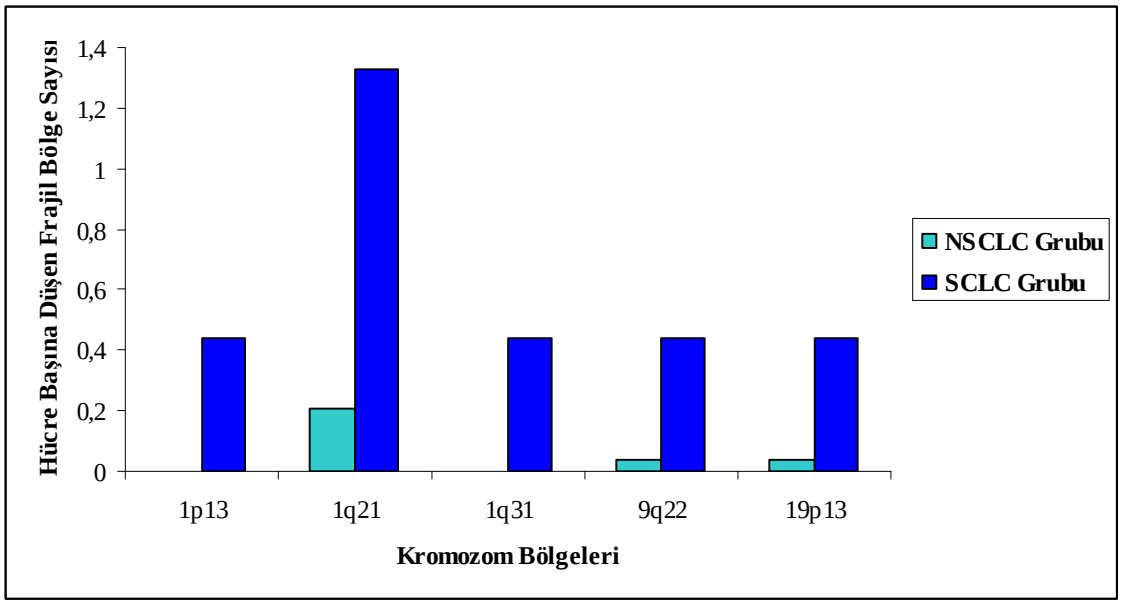
SCLC ve kontrol gruplarında saptanan frajil bölgelerin sayısı, kromozom bölgelerine göre dağılımı, populasyondaki sıklığı (hücre başına düşen frajilite sayısı=saptanan frajilite sayısı/incelenen hücre sayısı), nisbi oranı (saptanan frajilite sayısı/toplam frajilite sayısı) ve önemlilik derecesi çizelge 4.9'da gösterildi. Buna göre; SCLC grubunda frajilitenin en yoğun olduğu kromozom bölgeleri önemlilik sırasına göre; 1q21, 1q12, 1q31, 1p13, 1q32, 3p14, 5q31, 7q22, 7q32, 9q13, 9q22, 11q23, 17q21, 19p13, 1p36, 2q21, 6q21, 14q24, 15q21, 16q24 ve 19q13 şeklindedir. Bu grup, kontrol grubu ile hücre başına düşen frajilite açısından karşılaştırıldığında 1q21 ve 1q31 bölgelerinin kontrol grubuna göre daha fazla eksprese olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla p=0,000 ve p=0,010). Ancak 3p14 bölgesinin, kontrol grubunda daha fazla eksprese olduğu ve istatistiksel olarak bu farkın anlamlı olduğu bulundu (p=0,003) (Çizelge 4.9) (Şekil 4.7).

Çizelge 4.9. SCLC ile kontrol gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, populasyondaki sıklığı, nisbi oranı ve önemlilik sırası

Kromozom Bölgeleri	SCLC (9)				Kontrol (30)				c^2 Testi (p değeri)
	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	
1p36	1	0,22	1,78	**4**	3	0,20	1,07	**8**	0,927
1q12	3	0,66	5,35	**2**	3	0,20	1,07	**8**	0,119
1q21	**6**	**1,33**	**10,71**	**1**	**0**	**-**	**-**		**0,000**
1q31	**2**	**0,44**	**3,57**	**3**	**0**	**-**	**-**		**0,010**
2p23	0	-	-		4	0,26	1,43	**7**	0,273
2q21	1	0,22	1,78	**4**	3	0,20	1,07	**8**	0,927
2q31	0	-	-		6	0,40	2,15	**5**	0,180
3p25	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
3p21	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
3p14	**2**	**0,44**	**3,57**	**3**	**43**	**2,86**	**15,41**	**1**	**0,003**
3q27	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
5q31	2	0,44	3,57	**3**	4	0,26	1,43	**7**	0,552
6q21	1	0,22	1,78	**4**	3	0,20	1,07	**8**	0,927
6q25	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
7q22	2	0,44	3,57	**3**	5	0,33	1,79	**6**	0,731
7q32	2	0,44	3,57	**3**	6	0,40	2,15	5	0,898
8q22	0	-	-		6	0,40	2,15	**5**	0,180
8q24	0	-	-		4	0,26	1,43	**7**	0,273
9q13	2	0,44	3,57	**3**	3	0,20	1,07	**8**	0,370
9q22	2	0,44	3,57	**3**	1	0,06	0,35		0,074
9q32	0	-	-		5	0,33	1,79	**6**	0,221
9q34	0	-	-		5	0,33	1,79	**6**	0,221
10q22	0	-	-		7	0,46	2,50	**4**	0,148
11p14	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
12q15	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
14q22	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
14q24	1	0,22	1,78	**4**	11	0,73	3,94	**2**	0,226
15q21	1	0,22	1,78	**4**	3	0,20	1,07	**8**	0,927
16q22	0	-	-		8	0,53	2,86	**3**	0,122
16q24	1	0,22	1,78	**4**	3	0,20	1,07	**8**	0,927
17q21	2	0,44	3,57	**3**	3	0,20	1,07	**8**	0,370
19p13	2	0,44	3,57	**3**	6	0,40	2,15	**5**	0,898
19q13	1	0,22	1,78	**4**	3	0,20	1,07	**8**	0,927
Xq22	0	-	-		3	0,20	1,07	**8**	0,343
MKK	0	-	-		5	0,33	1,79	**6**	0,221
Diğer	22				102				0,504
Toplam	56	12,44			279	18,60			**0,010**

*** Nisbi oran= Saptanan frajil bölge sayısı/toplam frajil bölge sayısı; MKK=Multi kromozom kırıkları, FB=Frajil Bölge**

Hasta grubu kendini oluşturan alt gruplar (NSCLC ve SCLC) açısından değerlendirildiğinde bazı kromozom bölgeleri açısından farklı anlamlılıklar ortaya çıktı. NSCLC grubu, SCLC grubu ile eksprese olunan frajil bölgeler açısından değerlendirildiğinde 1p13, 1q21, 1q31, 9q22 ve 19p13 bölgeleri açısından bir farklılık gözlendi. Bu farklılık SCLC grubu yönünde anlamlılık ifade etti (p=0,001-0,017). Toplam frajilite açısından ise herhangi bir farklılık bulunmadı (p=0,292) (Çizelge 4.10) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. NSCLC ve SCLC gruplarında hücre başına düşen frajilite sayısının belirli kromozomal bölgelerdeki dağılımını gösteren sütun grafiği

Çizelge 4.10. NSCLC ile SCLC gruplarında ifade olunan frajil bölgelerin sayısı, populasyondaki sıklığı, nisbi oranı ve önemlilik sırası

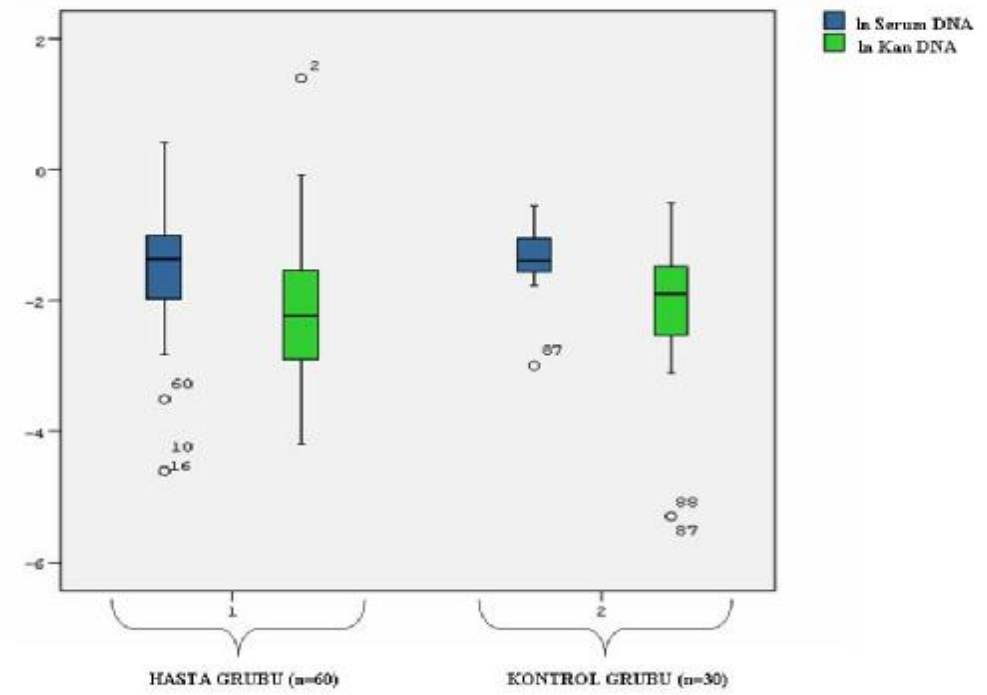
Kromozom Bölgeleri	NSCLC (47)				SCLC (9)				c^2 Testi (p değeri)
	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	FB Sayısı	Hücre Başına Düşen FB Sıklığı (%)	Nisbi Oran*	Sıra	
1p22	4	0,17	1,61	**8**	0	-	-		0,382
1p13	**0**	**-**	**-**		**2**	**0,44**	**3,57**	**3**	**0,001**
1q12	6	0,25	2,41	**6**	3	0,66	5,35	**2**	0,160
1q21	**5**	**0,21**	**2,01**	**7**	**6**	**1,33**	**10,71**	**1**	**0,001**
1q31	**0**	**-**	**-**		**2**	**0,44**	**3,57**	**3**	**0,001**
1q32	3	0,12	1,20		2	0,44	3,57	**3**	0,146
2q21	4	0,17	1,61	**8**	1	0,22	1,78		0,811
3p25	4	0,17	1,61	**8**	0	-	-		0,382
3p14	31	1,31	12,50	**1**	2	0,44	3,57	**3**	0,118
5q31	3	0,12	1,20		2	0,44	3,57	**3**	0,146
6p21	5	0,21	2,01	**7**	0	-	-		0,328
6q21	9	0,38	3,62	**3**	1	0,22	1,78		0,602
7q22	8	0,34	3,22	**4**	2	0,44	3,57	**3**	0,736
7q32	4	0,17	1,61	**8**	2	0,44	3,57	**3**	0,251
9q13	10	0,42	4,03	**2**	2	0,44	3,57	**3**	0,955
9q22	**1**	**0,04**	**0,40**		**2**	**0,44**	**3,57**	**3**	**0,017**
10q22	6	0,25	2,41	**6**	0	-	-		0,284
10q24	8	0,34	3,22	**4**	0	-	-		0,216
14q24	5	0,21	2,01	**7**	1	0,22	1,78		0,968
16q24	7	0,29	2,82	**5**	1	0,22	1,78		0,784
17q21	2	0,08	0,80		2	0,44	3,57	**3**	0,065
19p13	**1**	**0,04**	**0,40**		**2**	**0,44**	**3,57**	**3**	**0,017**
19q13	3	0,12	1,20		1	0,22	1,78		0,627
Xq26	4	0,17	1,61	**8**	0	-	-		0,382
Diğer	115				20				
Toplam	248	10,55			56	12,44			0,292

*** Nisbi oran= Saptanan frajil bölge sayısı/toplam frajil bölge sayısı; MKK=Multi kromozom kırıkları, FB=Frajil Bölge**

4.2. Moleküler Genetik Bulgular

Çalışmamızın moleküler genetik kısmı 60 hasta ile 30 kontrol grubu üzerinde yapıldı. Her iki gruptan hem kan hem serum DNA'ları elde edildi ve miktarları ile saflıkları spektrofotometrede ölçüldü (EK-4). Ayrca, konsantrasyonları da istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ancak, elde edilen DNA konsantrasyonları normal bir dağılım göstermediği için verilerin ln'leri alınarak normal bir dağılım göstermesi sağlandı ve sonrasında istatistiksel analiz uygulandı. Her iki grup arasında gerek kan DNA ve gerekse serum DNA konsantrasyonları açısından anlamlı bir sonuç elde edilemedi (sırasıyla p=0,887 ve p=0,375) (Şekil 4.9).

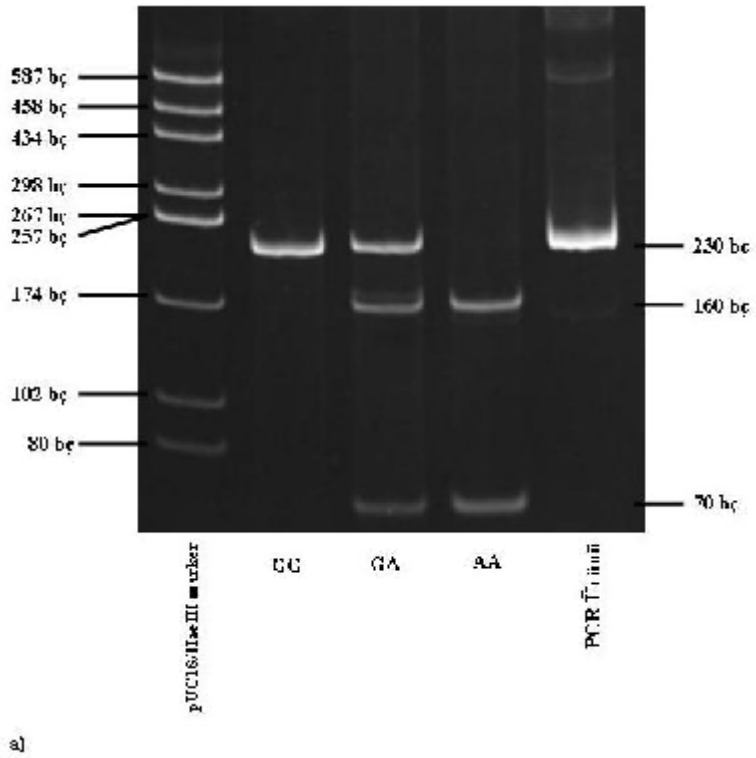
Kan ve serum DNA'ları elde edildikten sonra DR4 geni ekzon 3, 4 ve 5 için PCR-RFLP tekniği, DR4 geni ekzon 10 için de ARMS tekniği uygulandı.



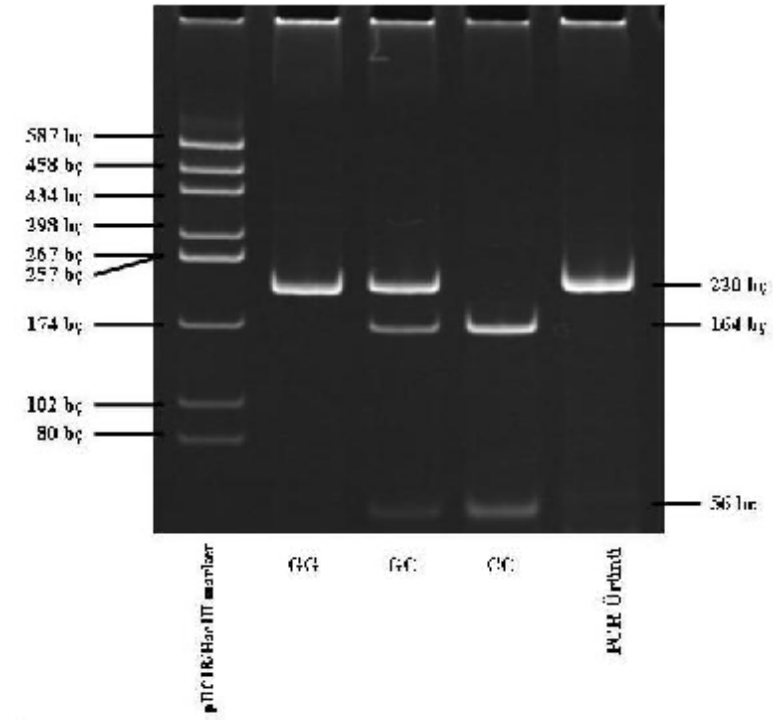
Şekil 4.9. Hasta ve kontrol gruplarında kan ve serum DNA konsantrasyonlarının dağılımı

4.2.1. DR4 Geni Ekzon 3, 4 ve 5'deki Polimorfizmlerin PCR-RFLP Tekniği ile Değerlendirilmesi

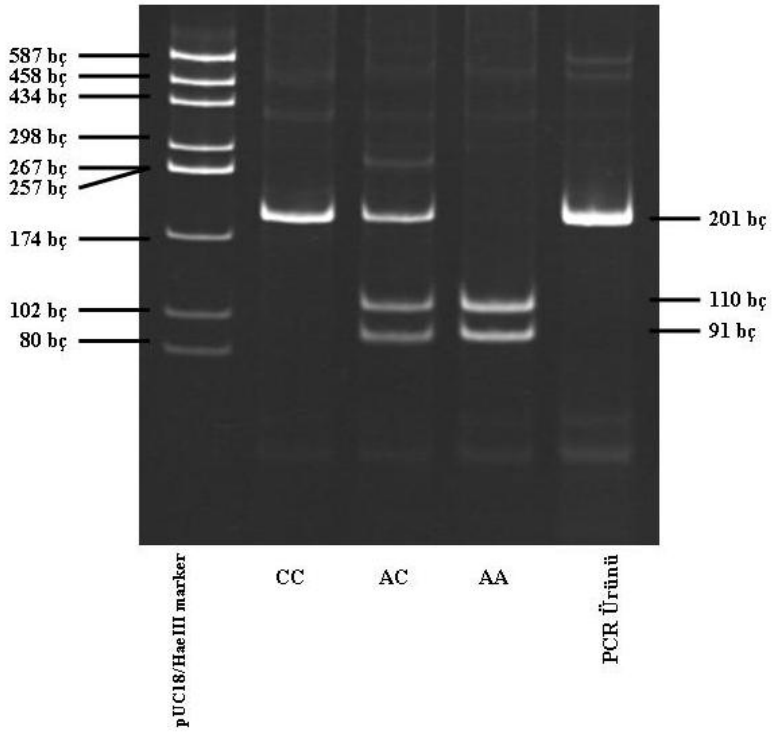
Her bir örnek için DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzonlarının PCR ile amplifikasyonu yapılarak PCR ürünleri elde edildi. %10'luk poliakrilamid jelde yürütülerek ürün büyükleri belirlendi (sırasıyla 230 bç, 220 bç ve 201 bç'lik ürünler) (Şekil 4.10). Daha sonra bu ürünler FokI (ekzon 3), DraIII (ekzon 4) ve TaqI (ekzon 5) restriksiyon enzimlerine maruz bırakıldı. Sonra, %10'luk poliakrilamid jelde yürütülerek kesim ürünlerinin büyükleri belirlendi. Ekzon 3'de 230 bç'lik tek bir bant normal (GG), 230-160-70 bç'lik üç bant heterozigot (GA), 160-70 bç'lik iki bant ise homozigot (AA) olarak belirlendi (Şekil 4.10a). Ekzon 4'de, 220 bç'lik tek bir bant homozigot (GG), 220-164-56 bç'lik üç bant heterozigot (GC) ve 164-56 bç'lik iki bant normal varyant (CC) (Şekil 4.10b), ekzon 5'de ise 201 bç'lik tek bir bant homozigot (CC), 201-110-91 bç'lik üç bant heterozigot (AC) ve 110-91 bç'lik iki bant normal (AA) olarak kaydedildi (Şekil 4.10c).



Şekil 4.10. PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen DR4 geni ekzon 3,4, ve 5 polimorfizmlerini gösteren %10'luk poliakrilamid jel görüntüsü, a) DR4 geni ekzon 3 için, normal: 230 bç, heterozigot: 230-160-70 bç, homozigot: 160-70 bç; b) ekzon 4 için, normal: 164-56 bç, heterozigot: 220-164-56 bç, homozigot: 220 bç; c) ekzon 5 için, normal:110-91 bç, heterozigot: 201-110-91 bç, homozigot: 201 bç.



b)



c)

Şekil 4.10. (Devamı)

Ekzon 3 açısından hasta ve kontrol grupları değerlendirildiğinde; hastaların ve kontrollerin büyük bir oranı [hastaların 34'ü (%56,7) ve kontrollerin 12'si (%40)] GA genotipine sahip olarak bulundu. Bunun yanı sıra, hastaların 15'inin (%25) ve kontrollerin 10'unun (%33,3) GG genotipini ve yine hastaların 11'inin (%18,3) ve kontrollerin 8'inin (%26,7) AA genotipini taşıdığı belirlendi (Çizelge 4.11). Hasta ve kontrol grubu arasında DR4 geni, ekzon 3 genotipleri açısından herhangi bir anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,324).

Çizelge 4.11. Hasta-kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 3, G422A polimorfizmlerinin dağılımı.

	Hasta Grubu (n=60)		**Kontrol Grubu (n=30)**	
G422A	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
GG	15	25	10	33,3
GA	34	56,7	12	40
AA	11	18,3	8	26,7
P değeri	0,324			

DR4 geni, ekzon 4'deki polimorfizmlerin dağılımı Çizelge 4.12'de verildi. Buna göre; hastaların %56,7'si ve kontrollerin %40'ı CG genotipine (heterozigot) sahip bulundu. Hastaların %20'si CC bulunurken, %23,3'ü GG olarak belirlendi. Kontrol grubunda ise CC genotipi %33,3 ve GG genotipi %26,7 oranında kaydedildi. Sonuç olarak; hasta ve kontrol grubu arasında DR4 geni, ekzon 4 genotipleri açısından herhangi bir anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,271).

Çizelge 4.12. Hasta-kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 4, C626G polimorfizmlerinin dağılımı.

	Hasta Grubu (n=60)		**Kontrol Grubu (n=30)**	
C626G	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
CC	12	20	10	33,3
CG	34	56,7	12	40
GG	14	23,3	8	26,7
P değeri	0,271			

Ekzon 5'deki durumu incelediğimizde; hastaların %68,3'ü normal iken (AA), %31,7'si heterozigot (AC) olarak bulundu. Homozigot (CC) olan herhangi bir hastaya rastlanmadı. Kontrol grubunda ise, bireylerin %70'inde AA genotipi yani normal genotip saptanırken, %23,3'ünü bu ekzon için heterozigot olan bireyler oluşturdu. Kontrol grubunda hasta grubundan farklı olarak homozigot (CC) olan bireyler de belirlendi (%6,7). Her iki grubu bu ekzon açısından istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda herhangi bir anlamlılık bulunmadı (p=0,086). Ancak CC

genotipinin sadece kontrol grubunda saptanması ve p değerinin 0,086 olması, bu genotipin belki de akciğer kanserini önlemede önemli olabileceğini göstermektedir (Çizelge 4.13).

Tüm bu polimorfizm çalışmaları hem kan hem de serum DNA'larında çalışıldı ve sonuçlar birbiri ile uyumluluk gösterdi.

Çizelge 4.13. Hasta-kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 5, A683C polimorfizmlerinin dağılımı.

	Hasta Grubu (n=60)		**Kontrol Grubu (n=30)**	
A683C	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
AA	41	68,3	21	70
AC	19	31,7	7	23,3
CC	0	-	2	6,7
P değeri	0,086			

DR4 geni 3., 4. ve 5. ekzon polimorfizmlerini hasta alt gruplarında (NSCLC ve SCLC) da ayrıca değerlendirildi.

NSCLC hastalarını (n=51) ekzon 3'deki polimorfizmler açısından değerlendirdiğimizde, grubun %54,90'ı GA, %23,53'ü GG ve %11'i AA genotipine sahip olduğu bulundu. SCLC hastalarında bu oran %66,67 GA ve %33,33 GG genotipi şeklindedir. AA genotipine sahip herhangi bir hastaya rastlanmadı. NSCLC hastalarını kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda aradaki farkın anlamlı olmadığı görüldü (p=0,758). NSCLC hastalarını SCLC hastaları ile ekzon 3 polimorfizmi açısından karşılaştırdığımızda ise aradaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlendi (p=0,198) (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 3, G422A polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi

		NSCLC (51)	**SCLC (9)**	**Kontrol (30)**
Ekzon 3	**GG**	12 (%23,53)	3 (%33,33)	10 (%33,33)
	GA	28 (%54,90)	6 (%66,67)	12 (%40)
	AA	11 (%21,57)	-	8 (%26,67)
Toplam		51	9	30
p değeri			0,198	0,758
p değeri		0,198		0,387

SCLC hastalarını ekzon 3, G422A, polimorfizmi açısından kontrol grubu ve NSCLC hasta grubu ile karşılaştırdığımızda aradaki farkın anlamsız olduğu bulundu (sırasıyla p=0,387 ve p=0,198) (Çizelge 4.14).

Ekzon 4, C626G polimorfizmi yönünden hasta alt grupları birbirleri ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NSCLC-Kontrol, NSCLC-SCLC ve SCLC-Kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (sırasıyla p=0,451, p=0,472 ve p=0,914) (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 4, C626G polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi

		NSCLC (51)	**SCLC (9)**	**Kontrol (30)**
Ekzon 4	**CC**	10 (%19,60)	2 (%22,22)	10 (%33,33)
	CG	28 (%54,90)	6 (%66,67)	12 (%40)
	GG	13 (%25,50)	1 (%11,11)	8 (%26,67)
Toplam		51	9	30
p değeri			0,472	0,451
p değeri		0,472		0,914

Ekzon 5, A683C polimorfizmi yönünden hasta alt grupları birbirleri ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NSCLC-Kontrol, NSCLC-SCLC ve SCLC-Kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (sırasıyla p=0,190, p=0,698, p=0,322, p=0,518, p=0,295 ve p=0,230) (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 5, A683C polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi

		NSCLC (51)	**SCLC (9)**	**Kontrol (30)**
Ekzon 5	**AA**	35 (%68,63)	6 (%66,67)	21 (%70)
	AC	16 (%31,37)	3 (%33,33)	7 (%23,33)
	CC	-	-	2 (%6,67)
Toplam		51	9	30
p değeri			0,908	0,947
p değeri		0,908		0,951

4.2.2. DR4 Geni Ekzon 10'daki A1322G Polimorfizmin ARMS Tekniği ile Değerlendirilmesi

DR4 geni ekzon 10, A1322G polimorfizmin saptanması için her bir örneğin ARMS tekniği çerçevesinde ve internal kontrol varlığında iki ayrı tüpte reaksiyonu hazırlanarak (bir tüpte A, diğerinde G primeri konuldu) PCR amplifikasyonu sağlandı.

Elde edilen ürünler %10'luk poliakrilamid jelde yürütüldü ve ürün büyüklükleri tespit edildi (internal kontrol 427 bç, istenilen ürün 254 bç) (Şekil 4.11). Jelde her iki tüpe konulan internal kontrol 427 bç büyüklüğünde bant verdi. Birinci tüpte eğer ekstradan 254 bç'lik bir amplifikasyon varsa bu durumda 1322. nükleotidde A allelinin olduğu, ikinci tüpte şayet amplifikasyon varsa o bölgede G allelinin olduğu kabul edildi.

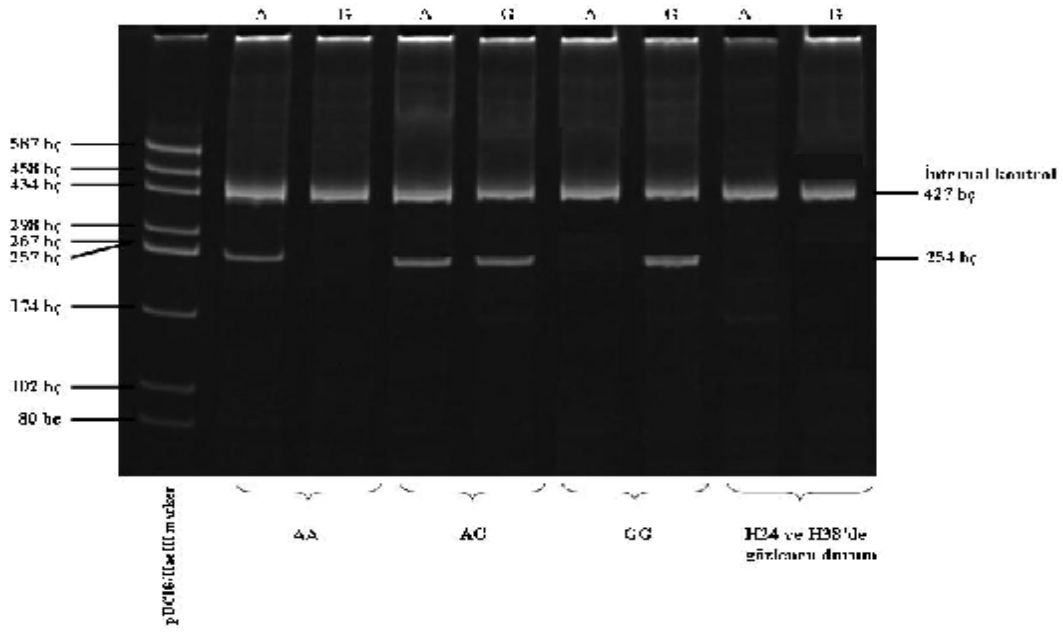
Hastalarımızın %85'inde AA genotipi saptanırken, %10'unda AG ve %1,7'sinde GG genotipi tespit edildi. İki hastada (H24 ve H38) (%3,33) bu bölge için internal kontrol dışında herhangi bir amplifikasyon gözlenmedi. Kontrol grubunda ise AA genotipi %80 iken AG ve GG genotipleri %10'ar oranlarda kendini gösterdi. Hasta ve kontrol grupları arasında mevcut olan farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi (p=0,230) (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Hasta-Kontrol grupları arasında DR4 geni, ekzon 10, A1322G polimorfizmlerinin dağılımı.

A1322G	**Hasta Grubu (n=60)**	**%**	**Kontrol Grubu (n=30)**	**%**
AA	51	85	24	80
AG	6	10	3	10
GG	1	1,7	3	10
Belirlenemeyen	2	3,3	0	-
P değeri	0,230			

DR4 geni, ekzon 10, A1322G polimorfizmi yönünden hasta alt gruplarına baktığımızda;

- NSCLC grubunda %86,3 oranında AA, %7,8 oranında GA genotipine ve %2 oranında GG genotipine rastlandı. İki hastada (H24 ve H38) (%3,9) her iki allelin de olmadığı gözlenerekten dizi analizine gidildi.
- SCLC grubunda %77,8 oranında AA ve %22,2 oranında GA genotipleri gözlendi (Çizelge 4.18).



Şekil 4.11. ARMS yöntemi ile belirlenen DR4 geni ekzon 10 polimorfizmini gösteren %10'luk poliakrilamid jel görüntüsü (internal kontrol 427 bç; AA genotipinde sadece A allelinde 254 bç'lik bir bant; AC genotipinde her iki allelde 254 bç'lik bant; 24 ve 38. vakalarda her iki allelde de amplifikasyon yok).

Çizelge 4.18. Hasta alt gruplarının birbirleri ve kontrol grubu ile DR4 geni, ekzon 10, A1322G polimorfizmleri açısından ilişkisi, dağılımı ve istatistiksel önemi

		NSCLC (51)	**SCLC (9)**	**Kontrol (30)**
Ekzon 10	**AA**	44 (%86,3)	7 (%77,8)	24 (%80)
	GA	4 (%7,8)	2 (%22,2)	3 (%10)
	GG	1 (%2)	-	3 (%10)
	Belirlenemeyen	2 (%3,9)	-	-
Toplam		51	9	30
P değeri			0,332	0,199
P değeri		0,332		1,000

Ekzon 10, A1322G polimorfizmi yönünden hasta alt grupları birbirleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılırsa NSCLC-Kontrol, NSCLC-SCLC ve SCLC-Kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (sırasıyla p=0,199, p=0,332 ve p=1,000) (Çizelge 4.18).

4.2.3. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

H24 ve H38'in yapılan dizi analizleri sonucunda elde edilen ekzon 10 dizisi çizelge 4.19'de verildi. Aynı dizinin kısmi elektroforegram görüntüsü de şekil 4.12'de gösterildi. National Center for Biotechnology Information (NCBI)/Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) web sayfasında gen dizilerindeki benzer ve farklı bölgeler belirlendi. Analiz sonucunda 24 no'lu hastada %98, 38 no'lu hastada %99 uyum saptandı (Şekil 4.13). Her iki hastanın ekzon 10, 1322. nükleotidin adenin bazı olduğu belirlendi. Bu durumda hasta grubumuzda ekzon 10'da, 1322. nükelotidde AA genotipli kişi sayısı 46'ya (%90,2) yükseldi.

Çizelge 4.19. H24 ve H38'in dizi analizi sonucunda elde edilen ekzon 10 dizisi

Hasta No		Ekzon 10 Dizisi
H24	**F**	GKCTASGGGGCCTTTGACTCCTGGGACAGCTCATGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAAA TGAGATCGATGTGGTCAGAGCTGGTACAGCAGGCCCAGGGGATGCCTTGTATGCAAT GCTGATGAAATGGGTCAACAAAACTGGACGGAACGCCTCGATCCACACCCTGCTGGA TGCCTTGGAGAGGATGGAAGAGAGACATGCAA**A**AKAGAAGATTCAGGACCTCTTGGT GGACTCTGGAAAGTTCATCTACTTARAAGATGGCACAGGC
	R	GTTCGRRTCCTAKAGTCTGATCTTCTCTTTTGCTGTCTCTCTTCCTCCTCTCAAGGCATC CAGCASGGAGTGGATCGAGGCGTTCCGKCCAGTTTTGTTGACCCATTTCATCAGCATT GCATACAAGGMATCCCCTGGRCCTGCTGTACCASCTCTGACCACATCSATCTCATTTTT CGKGAGGKCCASCTGCCTCATGARCTGGTCCCAAGAGTCAAAGGGAACSATGTTTGCA AACTTGTCAAARAACAGCATCAGAG
H38	**F**	GCCTSSTKACCTTTGMTCTGGGACAGCTCATGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAATGAG ATCGATGTGGTCAGAGCTGGTACAGCAGGCCCAGGGGATGCCTTGTATGCAATGCTGA TGAAATGGGTCAACAAAACTGGACGGAACGCCTCGATCCACACCCTGCTGGATGCCTT GGAGAGGATGGAAGAGAGACATGCAA**A**AGAGAAGATTCAGGACCTCTTGGTGGACT CTGGAAAGTTCATCTACTTAGAAGTGGCACAGGCA
	R	GATCRRTCAGAGAGGTCCTGATCTTCTCTTTTGCATGTCTCTCTTCCATCCTCTCCAAG GCATCCAGCAGGGTGTGGATCGAGGCGTTCCGTCCAGTTTTGTTGACCCATTTCATCA GCATTGCATACAAGGCATCCCCTGGGCCTGCTGTACCAGCTCTGACCACATCGATCTC ATTTTTCGTGAGGTCCAGCTGCCTCATGAGCTGGTCCCAGGAGTCAAAGGGCACGATG TTTGCAAACTTGTCAAARAACAGCATCAGAGA

F: Forward primer, R: Reverse primer



Şekil 4.12. H24 ve H38'in dizi analizi sonucunda elde edilen ekzon 10 dizisinin kısmi elektroforegram görüntüsü



```
 Score =  437 bits (227),  Expect = 2e-119
 Identities = 236/239 (98%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  20   CCTTTGACTCCTGGGACCAGCTCATGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAAATGAGATCGATG  79
            |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  11   CCTTTGACTCCTGGGAC-AGCTCATGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAAATGAGATCGATG  69

Query  80   TGGTCAGAGCTGGTACAGCAGGCCCAGGGGATGCCTTGTATGCAATGCTGATGAAATGGG  139
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  70   TGGTCAGAGCTGGTACAGCAGGCCCAGGGGATGCCTTGTATGCAATGCTGATGAAATGGG  129

Query  140  TCAACAAAACTGGACGGAACGCCTCGATCCACACCCTGCTGGATGCCTTGGAGAGGATGG  199
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  130  TCAACAAAACTGGACGGAACGCCTCGATCCACACCCTGCTGGATGCCTTGGAGAGGATGG  189

Query  200  AAGAGAGACATGCAAGAGAGAAGATTCAGGACCTCTTGGTGGACTCTGGAAAGTTCATC  258
            ||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  190  AAGAGAGACATGCAAAAKAGAAGATTCAGGACCTCTTGGTGGACTCTGGAAAGTTCATC  248
```

(a)

Şekil 4.13. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) veri tabanına göre elde edilen görüntüler (a) 24 no'lu hastaya ait görüntü, (b) 38 no'lu hastaya ait görüntü

```
 Score =  406 bits (211),  Expect = 3e-110
 Identities = 220/222 (99%), Gaps = 1/222 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  37   CAGCTCATGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAAATGAGATCGATGTGGTCAGAGCTGGTACA  96
            |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  24   CAGCTCATGAGGCAGCTGGACCTCACGAAAA-TGAGATCGATGTGGTCAGAGCTGGTACA  82

Query  97   GCAGGCCCAGGGGATGCCTTGTATGCAATGCTGATGAAATGGGTCAACAAAACTGGACGG  156
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  83   GCAGGCCCAGGGGATGCCTTGTATGCAATGCTGATGAAATGGGTCAACAAAACTGGACGG  142

Query  157  AACGCCTCGATCCACACCCTGCTGGATGCCTTGGAGAGGATGGAAGAGAGACATGCAAGA  216
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  143  AACGCCTCGATCCACACCCTGCTGGATGCCTTGGAGAGGATGGAAGAGAGACATGCAAAA  202

Query  217  GAGAAGATTCAGGACCTCTTGGTGGACTCTGGAAAGTTCATC  258
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  203  GAGAAGATTCAGGACCTCTTGGTGGACTCTGGAAAGTTCATC  244



CPU time:     0.03 user secs.       0.02 sys. secs          0.05 total secs.
```

(b)

Şekil 4.13. (Devamı)

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri (AK), sigara tüketiminin arttığı son yıllarda ciddi olarak artış gösteren ve genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan önemli bir hastalıktır. Kanser ölümlerinin %28'ini oluşturan AK, oldukça sessiz büyüyen ve yayılan bir kanser çeşididir.

AK gelişiminden %90'ın üzerinde sigara sorumludur[24,43,44,45]. Ancak, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar AK gelişiminde birçok genetik düzensizliğin meydana geldiğini göstermektedir. Bu hasarlar kromozom düzensizlikleri, baskın onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpressör genlerin inaktivasyonu şeklindedir. Ancak, kanser oluşumu sırasında bu lezyonların oluşum sırası henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır[46].

AK, yaşla artan bir hastalık olup daha çok 50-70'li yaşlarda kendini göstermektedir. Hastalık büyük oranda sigara kullanım sıklığının erkeklerde daha yüksek olması nedeni ile daha çok erkekleri etkilemektedir. Son yıllarda, kadınların da sigara kullanımının artması nedeni ile kadınlardaki insidansın da arttığı rapor edilmiştir[21,22,43]. Nitekim, çalışma grubumuzdaki hastaların %50'si 51-70 yaş aralığında yer almakta olup (Çizelge 4.1), %92'sini erkekler oluşturmaktadır. Böylece bu sonuçların daha önceden elde edilen bulgular ile uyumluluk içerisinde olduğunu söylemek yerinde olacaktır.

Daha önce belirtildiği gibi, sigara tüketimi AK gelişimini tetiklemektedir. Ancak, her sigara içen kişide AK gelişeceği söylenemez. Çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörler de kansere duyarlılıkta önemli rol oynamaktadır. AK'ne yatkınlığın ailesel bir geçişi olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Ailesinde AK olan ve sigara içmeyenlerde riskin 2-6 kez arttığı bildirilmiştir. Bu durumda en riskli grup ailesinde kanser, özellikle AK hikayesi olup sigara içen kişilerdir[24]. Çalışma grubumuzda; hastalarımızın %35'inde ailesel kanser öyküsü olmakla beraber, bunların da %47'sini ailesel AK öyküsü oluşturmaktadır. Kontrol grubumuzda; sigara tüketimi hasta grubu ile hemen hemen aynı olmakla birlikte ($p>0.05$), bu grubu oluşturan kişilerde ailesel herhangi bir kanser öyküsünün bulunmaması AK'nde genetik yatkınlığın önemli olabileceğini göstermektedir.

Çalışma grubumuzu oluşturan AK ön tanısı ile gelen 60 hastanın %85'ine NSCLC ve %15'ine SCLC tanısı konuldu. Bu dağılımın literatürlerde gösterilen %75-85 NSCLC ve %15-25 SCLC dağılımına uygun olduğu gözlenmektedir[26,27].

5.1. Sitogenetik

Bugüne kadar, AK üzerine yapılan çeşitli sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalarında AK'nden sorumlu olabilecek belirli bir kromozomal düzensizlik ya da gen/genler tam olarak belirlenememiştir. Bu tip hastalarda çeşitli kromozomal düzensizlikler saptanmış, ancak spesifik bir kromozomal bulgu elde edilememiştir. Bugüne kadar çalışmaların birçoğunda; malign dokunun bulunduğu bronş epitelyum örneği, kitle örneği veya doku bankalarından sağlanan AK hücre hatları kullanılmıştır[46,47,48,49]. Bazı çalışmalarda ise lenfosit hücre kültürleri kullanılmıştır[5,12]. Biz de çalışmamızda hem bronş epitelyumu (malign ve normal bölgelerden) hem de lenfosit hücrelerinden kültürler yaparak AK'ne neden olabilecek sıcak noktaları belirlemeye çalıştık. Bronş epitelyum kültürlerimizi değerlendirdiğimizde kimi hastaların hem malign hem normal bronş epitelyum kültürlerinde üreme başarısızlıkları saptanırken, kimilerinde ise ya malign ya da normal kültürlerinde bu başarısızlık elde edildi. Nitekim, Sozzi ve ark.[46]'larının yaptıkları çalışmada da bu tip başarısızlıklar elde edilmiş olup, bunun alınan dokudaki enfeksiyonlar, alım esnasındaki kontaminasyonlar veya nekrotik dokudan kaynaklandığı düşünülmektedir.

AK'nde, karyotipin oldukça kompleks ve heterojen kromozom düzensizlikleri gösterdiği bilinmektedir[48,50]. Çalışmamızda, incelenen farklı tümör örneklerinde oldukça kompleks ve heterojen kromozom düzensizlikleri (yapısal ve sayısal) saptandı. Malign doku kültürlerinde özellikle cinsiyet kromozom anöploidileri dikkat çekiciydi. Özellikle, Y kromozom kayıpları 3 hastada yüksek oranlarda saptanırken, bir hastada 47,XYY karyotipinin 5/11 oranında bulunması dikkate değer. Çünkü, aynı hastanın lenfosit kültür sonucuna bakıldığında hastanın XYY kromozom kuruluşunu mozaik formda dahi taşımadığı gözlendi. Normal bronş epitelyum kültürlerinden elde edilen sonuçlarda da cinsiyet kromozom bozuklukları belirlendi. Özellikle, Y kromozom kayıpları bu dokularda da mevcut iken bayan bir hastada da (H39) 20/25 oranında 45,X kromozom kuruluşu saptandı. Aynı hastanın lenfosit kültür sonucuna baktığımızda hastanın M199 kültüründe 3/50 oranında bu düzensizliği taşıdığı, ancak normal

besiyerinde (RPMI-1640) tamamiyle cinsiyet kromozomları açısından normal hücreler içerdiği gözlendi. Yine, hasta grubunun lenfosit kültürlerinden elde edilen sitogenetik sonuçlarına bakıldığında, iki hastanın (H3 ve H27) Y kromozomunun farklı bölgelerinde (Yp12 ve Yq12) delesyonlar taşıdığı belirlendi. Ayrıca, 58 no'lu hastada tek bir metafazda X kromozomunu içeren bir translokasyon mevcuttu [t(1;X)(p36;qter)]. Bununla birlikte, X kromozomu anöploidileri de (X,XXY,XXX,XXXX) rastlanan diğer cinsiyet kromozom bozuklukları arasında yer almaktaydı. Aynı hastaların folik asitten yoksun besiyerinde (M199) elde edilen lenfosit hücrelerinde X ve Y'yi içeren translokasyonlar [t(2;Y)(q31;p11) ve t(6;X)(p21;qter)] saptanan diğer bulgular arasında yer almaktadır. Bu besiyerinde diğer besiyerinde olduğu gibi Y kromozom kayıpları, XXY, XYY, XXXX ve X kromozom kuruluşları da belirlendi. X kromozomunun farklı tipteki insan tümörlerinin malignite oluşumunda ve karsinojenitede rolü olduğu ve bundan sorumlu çok fazla genin olduğu bilinmektedir[51]. Özellikle, %20-30 oranında gözlenen X kromozomu kayıplarının akciğer, ovaryum, testis, sinir sistemini de içeren geniş skaladaki tümörler ile melanomlarda sitogenetik olarak bulunduğu kaydedilmiştir[53,54]. Ayrıca meme, ovaryum, serviks ve papillar renal hücre karsinomlarında, X kromozomundaki kazanç ve delesyonların tümör progresyonunda ve metastaz oluşumunda etkili olduğu da kaydedilmiştir[54]. Y kromozomu delesyonlarının da prostat kanseri, erkek meme kanseri ve pankreatik adenokarsinomlarda rolleri olduğu bildirilmiştir[54]. Y kromozomu kayıplarının da AK'nde ve diğer bazı kanser tiplerinde sık gözlenen bir durum olduğu bildirilmiştir[55,56,57,58]. Tüm bu çalışmalar ve mevcut çalışmamızda X ve Y kromozomlarındaki bu tür yapısal ve sayısal bozuklukların AK ile ilişkili tutulması, özellikle bu kromozomları hemizigot olarak taşıyan erkeklerde, bu kromozomlar üzerinde tümör oluşumu ile ilişkili genlerin bulunabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda; cinsiyet kromozom anöploidileri dışında otozomal kromozomlarda da artış ve azalmalar gözlendi. Özellikle, doku kültürlerinde yüksek oranda 18,19 ve 20. kromozomlarda artış; 8,17,18,20,21 ve 22. kromozomlarda azalışlar tespit edildi. Grigorova ve ark.[48]'larının NCI-H olarak isimlendirilen AK hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, 7, 14, 19 ve 20. kromozomlarında artış, 4,5,6,8,10,18,21 ve 22. kromozomlarda azalışlar saptamışlardır. Nitekim, bizim bulgularımız ile karşılaştırdığımızda ortak olan kromozomların artış yönünde 19 ve 20. kromozomlar,

azalış yönünde ise 8,18,21 ve 22. kromozomlar olduğu görülmektedir. Hastalarımızın normal kan kültürlerinde 4,6,8,9,10,12,13,14,17,18,19,20,21 ve 22. kromozomlarda azalış, 5,8,14 ve 19. kromozomlarda artış; folik asitten yoksun besiyerinde ise 3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21 ve 22. kromozomlarda azalış, 2,4,6,9,13, 15,17,21 ve 22. kromozomlarda ise artışlar tespit edildi. Kontrol grubunda ise kromozom sayısındaki artış ve azalışların çok daha az oranlarda olduğu gözlendi. Bu tip otozomal kromozom artış ve azalışlarının hasta grubunda daha fazla gözlenmesi, AK gelişiminde bir veya daha fazla genin az ya da çok eksprese olması ile açıklanabilir. Çünkü bu kromozomlar üzerinde sayısız onkogen, tümör süpressör genleri, DNA tamir mekanizmasında görev yapan enzim genleri, apoptozdan sorumlu çeşitli genler veya aday genler, vs. bulunmaktadır.

Çalışmamızda; hastaların gerek doku kültürlerinde, gerekse lenfosit kültürlerinde 1. kromozomun işe karıştığı çeşitli kromozom yeniden düzenlenmeleri belirlendi. Özelikle 1p36, 1q23, 1p33, 1q11 ve 1q31 bölgelerinde delesyonların saptanmasının yanı sıra t(1;9)(q23;p12), t(1;11)(p22;q25), t(1;15)(q25;qter), t(1;17)(p36;qter), t(1;X)(p36;qter) ve t(1;3)(p13;qter) gibi translokasyonların olduğu kaydedildi. Bunun yanı sıra 1q21 kromozomal bölgesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek oranda eksprese olduğu kaydedildi (p=0,015). Birinci kromozomun kısa kolunun birçok tümör süpressör geni ihtiva ettiği ve solid tümörlerin %54'ünden fazlasında 1p bölgesinde özellikle 1p32-p36'da heterozigosite kayıplarının (LOH) olduğuna inanılmaktadır[59]. Servikal karsinomlu hastalar ile yapılan bir çalışmada hastaların %95'inde, 1. kromozomda yapısal düzensizliklerin özellikle p34, p32 ve p22 bölgelerinde delesyonların olduğu bildirilmiştir[60]. Yine, nöroblastomalıların %86'sında 1p'de LOH kayıplarının olduğu rapor edilmiştir[61]. Bununla beraber SCLC ve NSCLC hastalarında da 1. kromozomda kırık noktalarının olduğu kaydedilmiştir[50]. Bununla beraber, Dillon ve ark.[12]'larının yaptıkları çalışmada; NSCLC hastalarında 1p22, 1p34 ve 1q42 bögelerinde frajil bölgeler tespit edilmiştir. Bu bölgelerde sırasıyla 1p22'de BCL10, CDC7L1 ve D1S155E; 1p34'de MYCL1; 1q42'de TP53 ve BP2 genleri bulunmaktadır. Bu çalışmada; 1q21 yaygın olarak meme kanserinde eksprese olmakla beraber o bölgede bilinen herhangi bir gen bulunamamıştır[12]. Ayrıca, 1p36 bölgesinde TP73 tümör süpressör geni haritalanmıştır[62]. Bu genin inaktivasyonunun akut miyeloid lösemi ve diğer malignansilerde kısmen etkili olduğu bildirilmiştir[63].

Yine, tümör oluşumu sürecinde direk rol oynayan onkogenlerin 1q21-31 bölgesinde yerleşik olduğu Dehan ve ark.[47] tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda, 1. kromozomun tümör oluşum sürecinde önemli genleri ihtiva ettiği ve özellikle 1q21 ve 1p36 bölgelerinin AK gelişiminde kritik bölgeler olabileceği söylenebilir. Ayrıca, SCLC hastalarımızda 1q21 ve 1q31 bölgelerinin hem kontrol grubundan hem de NSCLC hastalarından daha fazla eksprese olması ve istatistiksel olarak anlamlı bulunması, bu bölgelerin SCLC oluşumunda önemli olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda; saptadığımız ve önemli olabilecek bir diğer kromozom da 3. kromozomdur. Hasta grubumuzda 3. kromozomun değişik bölgelerinde delesyonlar tespit edilirken aynı zamanda frajil bölgeler ve kırıklar da saptanan diğer bulgular arasında yer almaktadır. Delesyonlar; del(3p), del(3)(p14 **à** pter) ve del(3)(p23 **à** pter) şeklinde olup, kromozomun kısa kolunda kayıplar söz konusudur. Frajil bölgelere baktığımızda ise yine özellikle 3p14 bölgesinin frajiliteye uğradığı ve kırılmalar ile sonuçlandığı görülmektedir. Ancak, 3p14 bölgesindeki frajiliteler açısından kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında, kontrol grubundaki oranın daha yüksek olması dikkat çekiciydi. Kontrol grubunun da sigara içen kişilerden oluşması ve 3p14 bölgesinin hem yaygın gözlenen frajil bölgeler grubunda olması hem de sigara kullananlarda bu bölgenin tetiklenmesi söz konusu olması nedeniyle bu farkın çok önemli olmadığı düşünülmektedir. Nitekim, bu bölgenin sağlıklı bireylerde de yüksek sıklıkta eksprese edildiği rapor edilmiştir[64]. Sigara içen kontrol grubunda frajilitenin hasta grubuna oranla yüksek ve diğer düzensizliklerin düşük çıkması, kromozom düzensizliklerin kanser biyo-etiyolojisinde rolünün olduğunu göstermektedir. Kontrol grubunda sigara içimine bağlı genetik yapıda frajilitenin arttığı, ki bu primer değişikliklerin hastalarda diğer kromozom yapısal değişiklikleri tetikleyerek artmasını sağladığını göstermektedir. Hasta grubunda frajilitenin azaldığı, ancak kırık, delesyon, translokasyon ve sayısal düzensizliklerin arttığını, bu sekonder kromozom değişikliklerin de hastalığın başlaması ve prognozunda rol aldığı ortaya çıkmaktadır. Sekonder değişiklikler arttıkça hastalığın seyri ağırlaşmaktadır. Sonuç olarak; sigara önce kromozom frajilitesini arttırarak diğer yapısal düzensizliklerin artmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda, kromozomların sıcak noktaları olarak ifade edilen onkogen, protoonkogen ve tümör süpressör genlerin bulunduğu kritik lokuslarda yapısal

düzensizlikler sonucu bu genler uyarılmak ve/veya baskılanmak suretiyle kanserleşmeye neden olmaktadır.

Üçüncü kromozomun kısa kolunun rastgele olmayan kayıpları ilk kez Whang-Peng ve ark.[65] tarafından rapor edilmiştir. Bu kromozomun kısa kolunun parsiyal kayıplarına yol açan yapısal değişikliklerin daha çok terminal ya da interstitial tipi delesyonlar ile dengeli olmayan derivatif kromozom oluşumları, tüm 3p kayıplarına ise izokromozom oluşumlarının neden olduğu kaydedilmiştir[50]. LOH çalışmaları, SCLC tümörlerinin hemen hemen hepsinde 3p allelik kayıplarının olduğunu göstermiştir[67,68]. Üçüncü kromozomun kısa kolundaki bu allelik kayıp, SCLC'nin patogenezinde önemli olan bir veya birkaç tümör süpressör genin bu kromozomal bölgede yerleşik olduğu hipotezini desteklemektedir. Bu kromozom kolunun birkaç farklı bölgesindeki kayıplar, örneğin 3p25-26, 3p24, 3p21.3, 3p14.2 ve 3p12'deki kayıplar, yüksek dansiteli allotiplendirme tarafından tanımlanmış ve 3p'de birkaç farklı tümör süpressör genin olduğunu göstermektedir. Üçüncü kromozomun p21.3 bölgesi tümör süpressör genleri açısından incelenmiş ve birkaç AK hücre hattında bu bölgenin homozigot delesyonlara uğradığı bulunmuştur. Ayrıca homozigot delesyonlar, 3p'nin en az diğer üç farklı bölgesinde de rapor edilmiştir[68]. Üçüncü kromozomun kısa kolunun delesyona uğrayan bölgelerinde β-retinoik asit reseptör geni, protein-tirozin fosfataz-γ geni, semaforin IV ve A(V) genleri, von Hippel Lindau tümör süpressör geni, VHL ve frajil histidin triad (FHIT) geni gibi birkaç aday gen tanımlanmıştır[50]. Kısa kolun 21. bandında lokalize olan birkaç tümör süpressör genin tanımlanmasına rağmen, AK'nde hiçbirinin mutasyona uğradığı bildirilmemiştir. Ancak, son zamanlarda yapılan araştırmalar, 3p21.3'de lokalize olan RASSF1 olarak adlandırılan diğer bir genin tüm SCLC hücre hatlarında kayıp olduğu bildirilmiştir[69]. Yine, 3p14.2'de lokalize olan FHIT geni üzerinde yapılan araştırmalar, bu tip tümörlerin çoğunda FHIT alleli kayıplarının ve SCLC hastalarının yaklaşık %80'inde anormal FHIT mRNA transkriptlerinin olduğu rapor edilmiştir[70]. NSCLC hastalarının yaklaşık %75'inde ise 3p'nin tümünün ya da bir kısmının kayıp olduğu Baslara ve Testa[50] tarafından bildirilmiştir. SCLC hastalarında olduğu gibi NSCLC hastalarının %50'sinden fazlasında 3p allelik kayıplarının olduğu rapor edilmiş ve bu durumun hastalık gelişiminde erken bir genetik değişim olduğu düşünülmektedir[50]. Bunun yanı sıra, RASSF1 ve FHIT'deki değişimler SCLC hastalarında olduğu gibi NSCLC hastalarında da tanımlanmıştır. NSCLC hastalarının

%60'ından fazlasında RASSF1 promotorü hipermetilasyona uğramış görünmekte, anormal FHIT mRNA'ları ise NSCLC hastalarının %40'ında rapor edilmiştir[70]. Çalışmamızda her ne kadar, bu genlere bakılmamış olsa da en azından bu kromozomal bölgelerde yapısal kromozom bozuklukları ile frajil bölgelerin saptanması, bu hastalığın gelişiminde bu bölgelerdeki genlerin rol oynadıklarını göstermektedir.

Dokuzuncu kromozom da çalışmamızda sıklıkla düzensizliklerin tespit edildiği bir başka kromozomdur. Bu yapısal kromozom bozuklukları delesyon, translokasyon, inversiyon ve izokromozom şeklinde gözlendi. Bunlar; del(9p), del(9q), del(9)(q11 **à** qter), del(9)(q22 **à** qter), del(9)(q32 **à** qter), t(8;9)(q22;p24), t(9;11)(?;?), inv(9)(p11;q13) ve i(9q) olarak kaydedildi. Aynı zamanda, 5 hastada da 9qh+ heteromorfizmine rastlandı. Bunun yanı sıra hasta grubumuzda, 9q13 bölgesinde yüksek oranda frajilitelere rastlandı. Literatürde bugüne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında malignansi durumlarında 9p ve 9q delesyonlarının sık gözlendiği görülmektedir[71,72,73,74,75]. Dokuzuncu kromozom p kolu delesyonlarının melanoma, glioma, lösemi ve NSCLC vakalarında sık rastlanan bir durum olduğu rapor edilmiştir[71]. Simoneau ve ark.[72]'ları, mesane kanserli hastalarda 9p21, 9q33, 9q34, 9q22.3 ve 9q31 kromozom bölgelerinde tümör süpressör genlerinin bulunabileceğini belirtmişlerdir. Lukeis ve ark.[73]'larının NSCLC hastaları ile yaptıkları sitogenetik çalışmada ise 9p'nin %90 sıklığıyla delesyona uğradığı ve 9q13-9p22 bölgeleri arasında kırılmaların mevcut olduğu kaydedilmiştir. Yine, özofagus skuamöz hücre karsinomlu hastalarda 9p23-p22, 9q13-q22.3 ve 9q34 bölgelerinin sık delesyona uğradığı rapor edilmiştir[74]. Adenokarsinomlu hastalarda 9. kromozomun uzun kolunun birden fazla tümör süpressör gen ihtiva ettiği ileri sürülmüştür[75]. Bu çalışmalar ve çalışmamızın sonuçları doğrultusunda 9. kromozomun kanserleşmede önemli bir rolü olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, yapısal kromozom düzensizlikler ile frajil bölgelerin sık saptandığı diğer bir kromozom da 7. kromozomdur. Hasta grubunda özelikle kısa ve uzun kolda gözlenen delesyonlar dikkat çekiciydi [del(7)(p14 **à** pter), del(7)(p11 **à** pter), del(7)(q32 **à** qter), del(7)(q11 **à** qter)]. Bununla birlikte, 7. kromozoma ait iki tip inversiyon [inv(7)(p11;q34) ve inv(7)(p12;q32)] ve translokasyon [t(7;15)(pter;q22)] saptandı. Bunların yanı sıra, hasta grubunda saptanan frajil bölgelere bakıldığında 7q22 bölgesinin 4. sırada eksprese olduğu kaydedildi. Literatürlere göre bu bölge önemli bir kanser kırılma bölgesidir. Bu bölgede meydana gelen kırılmaların uterin leiomyoma,

endometriyal polipler, AK, gastrik ve özofagus adenokarsinomları ve hematolojik malignansilerde önemli rol oynadığı bildirilmiştir[76]. Ayrıca bu bölgede PMS2L mismatch tamir geni ile ASNS hücre döngüsü kontrol enzim geni de bulunmaktadır[77]. Bununla birlikte, Balachandar ve ark.[78], benign prostat hiperplazisi ve prostat kanserli hastaların 7. kromozomlarında delesyon, translokasyon ve inversiyonların olduğunu ve bu kromozomun uzun kolundaki delesyonların bu kanser tipinde tanımlanmış ilk kromozom hasarı olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda da 7.kromozomun bu denli yeniden düzenlenmesi ve eksprese olması, bu kromozomda AK'nde rol oynayan gen/genlerin olabileceği düşündürmektedir.

Hasta grubumuzda önemli olabilecek diğer üç kromozom 10, 11 ve 12'dir. Diğer kromozomlara göre daha yüksek oranda düzensizlik gösteren bu kromozomlardaki önemli noktalar 10p, 10q22, 10q24, 11p12-13, 11q21, 11q23, 12q13, 12q15 ve 12q24 olarak belirlendi. Barkan ve ark.[79]'larının Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ile erken evredeki NSCLC hastalarında yaptıkları çalışmada, hastaların %79'unda 10q22 bölgesinde delesyonlar tespit etmişlerdir. Bununla beraber, adenokarsinomlu hastalar ile yapılan CGH çalışmalarında; 10q kromozom bölgesinin bu grup hastalarda delesyona uğradığı bildirilmiştir[80]. Yine SCLC hastalarında 10q24-26 bölgesinin kayıp gösterdiği ve bu bölgede SCLC'nin patogenezinde rolü olduğu düşünülen bir tümör süpressör geninin olduğu bildirilmiştir[50]. Bu kromozomun q23.3 bölgesinde PTEN/MMAC1 geninin lokalize olduğu ve prostat, meme ve böbrek karsinomları gibi insan kanserlerinde bu genin delesyona ya da mutasyona uğradığı görülmüştür. PTEN'deki anormallikler SCLC hücre hatlarının %20'sinde rapor edilmiştir, ancak NSCLC hastalarında bu gende herhangi bir inaktivasyon saptanmamıştır[81]. On birinci kromozomun da AK'nde rolü olduğu düşünülmektedir. Bepler ve Koehler[6], sitogenetik ve moleküler genetik olarak inceledikleri 26 AK hücre hattında 11p delesyonlarının olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, 11p'de birkaç tümör süpressör genin bulunduğunu ve bu genlerin tümör gelişimi ve ilerleyişinin farklı basamaklarında inaktive olduğunu düşünmektedirler. Johannsson ve ark.[82]'larına göre 11. kromozom, özellikle 11p11 ve 11p15 bölgeleri, AK'nde yapısal yeniden düzenlenmelerinin sıklıkla olduğu kromozomlardan birisidir. Bununla birlikte, NSCLC hastalarında 11p11-p13 ve 11q13-q24 bölgelerinde tekrarlayan kırıkların olduğu da gösterilmiştir[83]. Ayrıca, 11q23 bölgesinde PPP2R1B olarak adlandırılan bir genin, akciğer ve kolon kanserlerinde

tanımlanmış aday bir tümör süpressör gen olabileceği de bildirilmiştir[84]. On ikinci kromozom, özellikle 12q13, 12q15 ve 12q24 bölgeleri çalışma grubumuzda önemlilik teşkil eden kromozom bölgeleridir. Grigorova ve ark.[48]'larının NSCLC grubu hastalar ile yaptıkları çalışmada; her hücre hattında en az 6 yapısal anormallik rapor edilmiştir. Bu anormalliklerin içerisinde 12. kromozomun oldukça yüksek sıklıkta yeniden düzenlenmelerde işe karıştığı gözlenmiştir. Sozzi ve ark.[46] da 12. kromozomun AK hastalarında sıklıkla yapısal düzensizliklere uğradığını bildirmişlerdir. Böylece, çalışmamızda 10, 11 ve 12. kromozomlardaki bu yapısal yeniden düzenlenmeler AK'ne neden olabilecek gen/genlerin bu kromozomlardaki sıcak noktalarda yerleşik olabileceğini göstermektedir.

5.2. Moleküler Genetik

Bilindiği gibi kanser hücrelerinde, apoptoz olarak isimlendirilen hücre ölümü gerçekleşemediği için normalden daha hızlı ve kontrolsüz olarak üreme söz konusudur. Apoptoz, mitokondriyal yol ve hücre ölüm reseptörleri yolu olmak üzere 2 şekilde gerçekleşir. Bu her iki yolun çeşitli basamaklarında görev yapan bileşenlerin görevini yapamaması sonucunda hücre apoptoza gidemez, hücre ölümü gerçekleşemez ve neticede kanser oluşur. Çalışmamızda sitogenetik çalışmalar dışında, apoptozda ilk basamak olan ölüm sinyalinin aktarıldığı ve apoptozun başlamasını sağlayan hücre ölüm reseptörü-4 (DR4)'ün yapısındaki herhangi bir bozukluğu saptamak amacı ile bu reseptörün oluşumunu sağlayan gendeki 4 ekzonun polimorfizmler açısından taranması yapıldı.

DR4 genindeki polimorfizmlerin belirlenmesinden önce hasta ve kontrol gruplarının kan ve serum DNA konsantrasyonları karşılaştırıldı. Ölçümlerimiz spektrofotometre ile yapıldığından dolayı herhangi bir anlamlı sonuç elde edilemedi. Sozzi ve ark.[85], AK'nde erken tanıyı sağlayacak olan serum DNA'sının yararlı bir marker olabileceğini bildirmişlerdir. Ancak, bu araştırmacılar serum DNA konsantrasyonunu saptamak amacı ile real-time kantitatif PCR yöntemi kullanmışlar ve AK vakalarında bu konsantrasyonun arttığını saptamışlardır. Benzer şekilde, Gal ve ark.[86] da real-time kantitatif PCR yöntemi ile meme kanserli hastalarda kontrollere oranla daha yüksek oranda serum DNA tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda

sonuçlarımızın gerçekten anlamlı mı yoksa anlamsız mı olduğunu söylemek mümkün olmayacaktır.

DR4 geni 8p22-21 bölgesinde yerleşik olup, gen proteini hücre yüzeyinde olan ve apoptozda görev yapan bir transmembran hücre proteinidir. Bazı kanserlerde bu bölgede heterozigosite kayıplarının (LOH) olduğu rapor edilmiştir[87,88]. Araştırmacılar, bu bölgede kanserlerin patogenezinde rol oynayan bir veya daha fazla sayıda tümör süpressör genin varlığının olabileceğini ileri sürmektedirler.

Ovaryum kanser hücrelerinin TRAIL ile uyarılan apoptoza duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ovaryum kanserlerinde kemoterapötik ilaçların, TRAIL ile uyarılan ve hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlayan apoptozisin etkisini arttırdığı bildirilmiştir[89,90]. TRAIL, ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'e bağlanarak apoptotik kaskadın kaspaz 8 ve FADD aracılığı ile aktivasyonunu sağlar ve DISC (ölümü uyaran sinyal kompleksi) kompleksinin oluşumu ile apoptozisi uyarmaktadır.

DR4 geninin 5' ucundaki missens mutasyonlar TRAIL'in ligand-reseptör etkileşimini engellerken, 3' terminal mutasyonlar DISC oluşumuna etki etmektedir[88]. DR4 geninin ektodomainindeki G422A ve C626G mutasyonları, farklı orijinli tümörlerde (SCLC, NSCLC, HNSCC, gastrik adenokarsinom gibi) yüksek sıklıkta bulunmuştur[33]. Bu değişimlerin germ line orijinli olduğu ve tümörogenezisi çevre etmenler ile birlikte (örneğin sigara kullanımı) tetiklediği söylenmektedir[31]. A1322G mutasyonunun ise bozuk TRAIL sinyalizasyonuna neden olduğu ve böylece kanser hücre hatlarında TRAIL dirençliliğinin olduğu bildirilmiştir[91].

Çalışmamızda DR4 geni G422A ve C626G polimorfizmleri hasta ve kontrol grubumuzun yaklaşık %70-80'inde gözlendi ve anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Hasta gruplarında sonuçlar değerlendirildiğinde SCLC hastalarında G422A polimorfizmi açısından hiç AA genotipine rastlanmaması dikkat çekiciydi. Gerek G422A, gerekse C626G polimorfizmleri açısından hasta alt grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık saptanmadı. Meme kanseri olgularında, C626G polimorfizmi açısından hasta ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir farkın olmadığı bildirilmiştir[92]. Yine, ovaryum kanserli vakalarda hem G422A hem de C626G polimorfizmleri açısından kontrol grubundan farklı bir sonuç elde edilmediği de bildirilmiştir[88]. Fisher ve ark.[33], akciğer ve baş ile boyun kanserlerinde DR4 geni G422A ve C626G polimorfizmlerini incelemiş ve kontrol grupları açısından anlamlı

sonuçlar elde etmişlerdir. Özellikle, homozigot olan varyantlar kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Kolorektal kanserli hastalarda da C626G ile ilişki bulunmuş olup, heterozigot bireylerde hastalık riskinin azaldığı tespit edilmiştir[93]. Mevcut çalışmada, A683C ve A1322G polimorfizmlerine bakacak olursak, A683C açısından hasta grubumuzda CC genotipine hiç rastlanmamışken, kontrol grubumuzda 2 bireyde gözlendi. A1322G polimorfizminde ise GG genotipi yine kontrol grubunda hasta grubuna nispeten daha yüksek oranda saptandı (%10). Meme kanserinin A683C polimorfizmi ile ilişkili olmadığı gösterilmiş[92], ancak kolorektal kanserli hastalarla bu polimorfizm arasında ilişki saptanmıştır[92,93]. A1322G polimorfizmi ise ovaryum kanserli olgularla yapılan bir çalışmada kontrol grubu ile farklı bulunmamıştır[88]. Dechant ve ark.[32]'larının osteosarkom hastalarında yaptıkları çalışmada da GG genotipi bizim çalışmamızda olduğu gibi kontrol grubunda yüksek oranda bulunmuştur. Nitekim, bu durumda bizim populasyonda GG genotipinin normal TRAIL sinyalizasyonu oluşturduğu ve TRAIL dirençliliği oluşturmadığı söylenebilir.

Sonuç olarak bu baz değişimleri, reseptör proteinlerinde konformasyonel değişiklikler oluşturarak reseptörün fonksiyonunu yerine getirmeyi engelleyerek ligand-reseptör etkileşimini bozmaktadır. Böylece TRAIL ligandının reseptöre bağlanma kapasitesini etkileyerek apoptotik sinyalin etkisini azaltmakta ve hücre ölümünün gerçekleşmesini engelleyerek kanserleşmenin oluşması sağlanmaktadır. Ancak kontrol grubunda da benzer sonuçların elde edilmesi, bu gendeki tek baz değişimlerinin tek başına değil, başka bozukluklar ile de ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda saptadığımız sitogenetik bulgular; AK'nde önemli olabilecek kromozom ve gen lokuslarının saptanmasına yardımcı olabilir. Özellikle SCLC hastalarında, NSCLC ve kontrol gruplarından farklı olarak 1q21 ve 1q31 bölgelerinin yüksek düzeyde eksprese olması, bu bölgelerde bu hastalık açısından önemli genlerin olabileceğini göstermektedir. DR4 gen polimorfizmlerinin her ne kadar kontrollerle uyumlu olmasına rağmen bu reseptörün apoptotik sinyal iletiminde etkili olduğu bilinmektedir. Sekizinci kromozomun p21-22 bandında yerleşik olan bu genin bulunduğu lokusta herhangi bir kromozomal düzeyde anomaliye rastlanmaması, o gende bir bozukluğun olmayacağı anlamına gelmemektedir. Çünkü, bu gendeki bozukluklar nükleotid düzeyinde gerçekleşmekte ve mikroskobik olarak kromozom düzeyinde saptanamamaktadır. Bu nedenle bu gendeki tüm ekzonların taranması ve

daha fazla sayıda hasta ve kontrolün çalışılması daha anlamlı bir sonuç verecektir. Bu durumda, hastaların kemoterapide TRAIL'e dirençlilik oluşturup oluşturmadığı veya tedavide etkin bir ilaç olup olmayacağı belirlenebilir. Buna bağlı olarak, TRAIL türevlerinin üretilmesi için farmakoloji sektörüne yardımcı olunabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Polikliniğinde AK ön tanısı konmuş hastalar ile yapmış olduğumuz sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalarında şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Akciğer bronş epitelyumu ile yapılan sitogenetik çalışmada, kitlenin bulunduğu malign bölge ile normal seyreden bölgede saptanan kromozom anormalliklerin birbirinden pek farklı olmadığı, her iki bölgede de yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin olduğu ve bunların ayırt edici bir kriter olmadığı belirlendi.
- Cinsiyet kromozomlarındaki sayısal düzensizliklerin, erkek hastalarda özellikle Y kromozom kayıplarının, AK'nde sık rastlanan durumlar olduğu görüldü.
- Yine, otozomal kromozomlardaki sayısal artış ve azalışların AK'nde sık rastlandığı belirlendi.
- Yapısal kromozom düzensizlikleri arasında; 1p36, 1q23, 1p33, 1q11, 1q31, 3p, 7p, 7q22, 9p, 9q, 10p, 10q22, 10q24, 11p12-13, 11q21, 11q23, 12q13, 12q15, 12q24 ve Xq26 bölgelerinin AK'nde en sık rastlanan sıcak noktalar olduğu ve AK'nden sorumlu genler ihtiva ettiği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca SCLC hastalarında 1q21 ve 1q31 bölgeleri oldukça önemli bulundu. Bu nedenle, kritik bölgelerdeki genlerin belirlenmesi için ve oluşan mutasyon ile füzyon genlerin moleküler genetik çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.
- Çalışmamızda hücre ölüm reseptörü 4 (DR4) genindeki polimorfik bölgelerin (G422A, C626G, A683C, A1322G) AK'li hastalar ile kontrol gruplarında benzer olduğu, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, ancak ekzon 5'in A683C bölgesinde CC genotipinin ve ekzon 10'un A1322G bölgesinde GG genotipinin önemli olabileceği, normal TRAIL sinyalizasyonu oluşturarak TRAIL dirençliliği oluşturmadığı ve AK tedavisinde kemoterapötik ilaçlarla birlikte TRAIL'in tedavideki etkisini arttırdığı söylenebilir. Ancak, bu hipotezin doğru olduğunun söylenebilmesi için daha fazla sayıda hasta ve kontrolün çalışılması ve hücre ölüm reseptörü-4 genindeki tüm ekzonların dizi analizi ile taranmasını önermekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. http://www.kanser.org/toplum/knedir.php. Erişim tarihi: 01.07.2008

2. **Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ.** Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* **2007**;57:43–66.

3. **Altın S.** Akciğer kanseri. *Türk Toraks Derneği Okulu* **2007**, 58-73.

4. **Testa JR, Graziano SL.** Molecular Implications of Recurrent Cytogenetic Alterations in Human Small Cell Lung Cancer. *Cancer Detection and Prevention* **1993**; 17(2): 267-277.

5. **Dave BJ, Hopwood VL, King TM, Jiang H, Spitz MR, Pathak S.** Genetic Susceptibility to Lung Cancer as Determined by Lymphocytic Chromosome Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1995**; 4(7): 743-749.

6. **Bepler G, Koehler A.** Multiple Chromosomal Abberations and 11p Allelotyping in Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Genet Cytogenet* **1995**; 84(1): 39-45.

7. **Karaüzüm SB, Lüleci G, Özbilim G, Erdoğan A, Kuzucu A, Demircan A.** Cytogenetic Findings in Thirty Lung Carcinoma Patients. *Cancer Genet Cytogenet* **1998**; 100: 114-123.

8. **Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, Wu L, Westra WH, Yang SC, Jen J, Sidransky D.** Chromosomal Alterations in Lung Adenocarcinoma from Smokers and Nonsmokers. *Cancer Res* **2001**; 61: 1309-1313.

9. **Hirao T, Nelson HH, Ashok TDS, Wain JC, Mark EJ, Christiani DC, Wiencke JK, Kelsey KT.** Tobacco Smoke-Induced DNA Damage and An Early Age of Smoking Initiation Induce Chromosome Loss at 3p21 in Lung Cancer. *Cancer Res* **2001**; 61: 612-615.

10. **Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K, Ogami A, Osaki T, Sugio K, Yasumoto K, Sugimachi K, Gazdar AF.** Loss of Heterozygosity at 3p in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Prognostic Implication. *Clin Genet* **1996**; 2: 1185-1189.

11. **Ashman JNE, Brigham J, Cowen ME, Bahia H, Greenman J, Lind M, Cawkwell L.** Chromosomal Alterations in Small Cell Lung Cancer Revealed by Multicolor Fluorescence I*n Situ* Hybridization. *Int J Cancer* **2002**; 102: 230-236.

12. **Dhillon VS, Husain SA, Ray GN.** Expression of Aphidicolin-induced Fragile Sites and Their Relationship Between Genetic Susceptibility in Breast Cancer, Ovarian Cancer, and Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Teratogenesis Carcinog Mutagen Suppl* **2003**; 1: 34-45.

13. **Berrieman HK, Ashman JNE, Cowen ME, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L.** Chromosomal Analysis of Non-Small-Cell Lung Cancer by Multicolour Fluorescent *In Situ* Hybridisation. *British J Cancer* **2004**; 90: 900-905.

14. **Schenk T, Ackermann J, Brunner C, Schenk P, Zojer N, Roka S, Drach J.** Detection of Chromosomal Aneuploidi by Interphase Fluorescence *In Situ* Hybridization in Bronchoscopically Gained Cells From Lung Cancer Patients. *Chest* **1997**; 111(6): 1691-1696.

15. **Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din VS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA.** Identification and Characterization of A New Member of The TNF Family That Induced Apoptosis. *Immunity* **1995**; 3: 673-682.

16. **Kimberley FC, Screaton GR.** Following a TRAIL: Update on A Ligand and Its Five Receptors. *Cell Res* **2004**; 14(5): 359-372.

17. **Sun S-Y, Yue P, Hong WK, Lotan R.** Augmentation of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Induced Apoptosis by The Synthetic Retinoid 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) Through Up-Regulation of TRAIL Receptors in Human Lung Cancer Cells. *Cancer Res* **2000**; 60: 7149-7155.

18. **Marini P, Schmid A, Jendrossek V, Faltin H, Daniel PT, Budach W, Belka C.** Irradiation Specifically Sensitises Solid Tumour Cell Lines to TRAIL Mediated Apoptosis. *BMC Cancer* **2005**; 5:5.

19. **Almasan A, Ashkenazi A.** Apo2L/TRAIL: Apoptosis Signaling, Biology, and Potential for Cancer Therapy. *Cytokine&Growth Factor Rev* **2003**; 14: 337-348.

20. **Kalkan N.** Primer Akciğer Karsinomu Nedeni ile Opere Olan Hastaların Takibinde Otofloresan Bronkoskopinin Yeri. Uzmanlık tezi, Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 7. Göğüs Hastalıkları Kliniği, İstanbul, **2005**.

21. **Bozkurt B, Selçuk ZT, Fırat P, Kalyoncu AF, Artvinli M.** 1972-2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirmesi. *Toraks Dergisi* **2004**; 5(3): 148-153.

22. **Russi EW.** Lung Cancer- a Common and Deadly Disease. *Respiration* **2002**; 69: 199-200.

23. **Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı.** Türkiye'de Sağlığa Bakış 2007. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhaa Merkezi Başkanlığı, Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü, Ankara, **2007**.

24. **Savaş İ.** Akciğer Kanserleri. In: Özlü T, Metintaş M, Ardıç S. Eds. Türk Toraks Derneği, Akciğer Hastalıkları Temel Bilgiler, Ankara: Poyraz Tıbbi Yayıncılık Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, **2008**: 195-201.

25. **Tanoue LT, Matthay RA.** Lung Cancer: Epidemiology and Carcinogenesis. In: Shields TW, LoCicero J, Ponn RB. Eds. *General Thoracic Surgery* (5th ed.), Phildelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, **2000**: 1215–1228.

26. http://www.healthandage.com/html/well-connected/pdf/doc72.pdf. **Erişim Tarihi:** 15.12.2003

27. http://www.patoloji.gen.tr/akciğer_tumor.htm. **Erişim Tarihi:** 07.09.2006

28. **Piti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A.** Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, A New Member of The Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *J Biol Chem* **1996**; 271: 12687-90.

29. **Fukuda M, Hamao A, Tanaka A, Kitada M, Suzuki S, Kusama K, Sakashita H.** Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL/APO2L) and Its Receptors Expression in Human Squamous Cell Carcinoma of The Oral Cavity. *Oncol Reports* **2003**; 10: 1113-1119.

30. **Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, Kim SY, Lee JH, Han SY, Park JY, Oh RR, Jang JJ, Han JY, Lee JY, Yoo NJ.** Alterations of The DR5/TRAIL Receptor 2 Gene in Non-Small Cell Lung Cancers. *Cancer Res* **1999**; 59: 5683-5686.

31. **Hazra A, Chamberlain RM, Grossman HB, Zhu Y, Spitz MR, Wu X.** Death Receptor 4 and Bladder Cancer Risk. *Cancer Res* **2003**; 63: 1157-1159.

32. **Dechant M, Fellenberg J, Scheuerpflug CG, Ewerbeck V, Debatin K-M.** Mutation Analysis of The Apoptotic "Death-Receptors" and The Adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in Osteosarcoma Tumor Samples and Osteosarcoma Cell Lines. *Int J Cancer* **2004**; 109: 661-667.

33. **Fisher MJ, Virmani AK, Wu L, Aplenc R, Harper JC, Powell SM, Rebbeck TR, Sidransky D, Gazdar AF, El-Deiry WS.** Nucleotide Substitution in The Ectodomain of TRAIL Receptor DR4 is Associated with Lung Cancer and Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* **2001**; 7: 1688-1697.

34. **Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR.** *Current Protocols in Human Genetics.* United States: Wiley&Sons, **1994**.

35. **Rooney DE, Czepulkowski BH.** Prenatal Diagnosis and Tissue Culture. In: *Human Cytogenetics*, **1993**; Volume I: 55-89.

36. **Köhler A.** Chromosome Staining. In: Wegner RD. Ed. *Diagnostic Cytogenetics*, Berlin: Springer-Verlag; **1999**: 56-60.

37. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manuel*, **1989**; 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Cold Spring Harbor, New York.

38. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF**. A Simple Salting Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res* **1988**; 16(3): 125.

39. **Gürtunç E.** Meme Kanserli Hastalarda CYP19 Geni Kodon 39 Trp/Arg Polimorfizminin ve Genotip Dağılımının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2007.**

40. **Rao PN, Heerema NA, Palmer CG.** Fragile Sites Induced by FUdR, Caffeine, and Aphidicolin. Their Frequency, Distribution, and Analysis. *Hum Genet* **1988**; 78(1): 21-6.

41. **Glover TW, Stein CK.** Chromosome Breakage and Recombination at Fragile Sites. *Am J Hum Genet* **1988**; 43(3): 265-73.

42. **Samadder P, Evans JA, Chudley AE.** Segregation Analysis of Rare Autosomal Folate Sensitive Fragile Sites. *Am J Med Genet* **1993**; 46(2): 165-71.

43. **Köktürk N, Öztürk C, Kırışoğlu CE.** Sigara ve Akciğer Kanseri. *Solunum* **2003**; 5(3): 139-145.

44. **International Agency for Research on Cancer (IARC)**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and Their Supplements: A complete list. *Tobacco Smoking and Tobacco Smoke* **2002**; 83. http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/volume83.pdf

45. **Alberg AJ, Samet JM.** Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* **2003**;123: 21–49.

46. **Sozzi G, Miozzo M, Tagliabue E, Calderone C, Lombardi L, Pilotti S, Pastorino U, Pierotti MA, Porta GD.** Cytogenetic Abnormalities and Overexpression of Receptors for Growth Factors in Normal Bronchial Epithelium and Tumor Samples of Lung Cancer Patients. *Cancer Res* **1991**; 51: 400-404.

47. **Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, Lipson D, Frimer H, Rienstein S, Simansky D, Krupsky M, Yaron P, Friedman E, Rechavi G, Periman M, Aviram-Goldring A, Izraeli S, Bittner M, Yakhini Z, Kaminski N.** Chromosomal Aberrations and Gene Expression Profiles in Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung Cancer* **2007**; 56(2): 175-184.

48. **Grigorova M, Lyman RC, Caldas C, Edwards PAW.** Chromosome Abnormalities in 10 Lung Cancer Cell Lines of The NCI-H Series Analyzed with Spectral Karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* **2005**; 162: 1-9.

49. **Morstyn G, Brown J, Novak U, Gardner J, Bishop J, Garson M.** Heteroeneous Cytogenetic Abnormalities in Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **1987**; 47: 3322-3327.

50. **Balsara BR, Testa JR.** Chromosomal Imbalances in Human Lung Cancer. *Oncogene* **2002**; 21: 6877-6883.

51. **Ross MT**, **Grafham DV**, **Coffey AJ**, **Scherer S**, **McLay K**, **Muzny D**, **Platzer M**, **Howell GR**, **Burrows C**, **Bird CP**, **Frankish A**, **Lovell FL**, **Howe KL**, **Ashurst JL**, **Fulton RS**, **Sudbrak R**, **Wen G**, **Jones MC**, **Hurles ME**, **Andrews TD**, **Scott CE**, **Searle S**, **Ramser J**, **Whittaker A**, **Deadman R**, **Carter NP**, **Hunt SE**, **Chen R**, **Cree A**, **Gunaratne P**, **Havlak P**, **Hodgson A**, **Metzker ML**, **Richards S**, **Scott G**, **Steffen D**, **Sodergren E**, **Wheeler DA**, **Worley KC**, **Ainscough R**, **Ambrose KD**, **Ansari-Lari MA**, **Aradhya S**, **Ashwell RI**, **Babbage AK**, **Bagguley CL**, **Ballabio A**, **Banerjee R**, **Barker GE**, **Barlow KF**, **Barrett IP**, **Bates KN**, **Beare DM**, **Beasley H**, **Beasley O**, **Beck A**, **Bethel G**, **Blechschmidt K**, **Brady N**, **Bray-Allen S**, **Bridgeman AM**, **Brown AJ**, **Brown MJ**, **Bonnin D**, **Bruford EA**, **Buhay C**, **Burch P**, **Burford D**, **Burgess J**, **Burrill W**, **Burton J**, **Bye JM**, **Carder C**, **Carrel L**, **Chako J**, **Chapman JC**, **Chavez D**, **Chen E**, **Chen G**, **Chen Y**, **Chen Z**, **Chinault C**, **Ciccodicola A**, **Clark SY**, **Clarke G**, **Clee CM**, **Clegg S**, **Clerc-Blankenburg K**, **Clifford K**, **Cobley V**, **Cole CG**, **Conquer JS**, **Corby N**, **Connor RE**, **David R**, **Davies J**, **Davis C**, **Davis J**, **Delgado O**, **Deshazo D**, **Dhami P**, **Ding Y**, **Dinh H**, **Dodsworth S**, **Draper H**, **Dugan-Rocha S**, **Dunham A**, **Dunn M**, **Durbin KJ**, **Dutta I**, **Eades T**, **Ellwood M**, **Emery-Cohen A**, **Errington H**, **Evans KL**, **Faulkner L**, **Francis F**, **Frankland J**, **Fraser AE**, **Galgoczy P**, **Gilbert J**, **Gill R**, **Glöckner G**, **Gregory SG**, **Gribble S**, **Griffiths C**, **Grocock R**, **Gu Y**, **Gwilliam R**, **Hamilton C**, **Hart EA**, **Hawes A**, **Heath PD**, **Heitmann K**, **Hennig S**, **Hernandez J**, **Hinzmann B**, **Ho S**, **Hoffs M**, **Howden PJ**, **Huckle EJ**, **Hume J**, **Hunt PJ**, **Hunt AR**, **Isherwood J**, **Jacob L**, **Johnson D**, **Jones S**, **de Jong PJ**, **Joseph SS**, **Keenan S**, **Kelly S**, **Kershaw JK**, **Khan Z**, **Kioschis P**, **Klages S**, **Knights AJ**, **Kosiura A**, **Kovar-Smith C**, **Laird GK**, **Langford C**, **Lawlor S**, **Leversha M**, **Lewis L**, **Liu W**, **Lloyd C**, **Lloyd DM**, **Loulseged H**, **Loveland JE**, **Lovell JD**, **Lozado R**, **Lu J**, **Lyne R**, **Ma J**, **Maheshwari M**, **Matthews LH**, **McDowall J**, **McLaren S**, **McMurray A**, **Meidl P**, **Meitinger T**, **Milne S**, **Miner G**, **Mistry SL**, **Morgan M**, **Morris S**, **Müller I**, **Mullikin JC**, **Nguyen N**, **Nordsiek G**, **Nyakatura G**, **O'Dell CN**, **Okwuonu G**, **Palmer S**, **Pandian R**, **Parker D**, **Parrish J**, **Pasternak S**, **Patel D**, **Pearce AV**, **Pearson DM**, **Pelan SE**, **Perez L**, **Porter KM**, **Ramsey Y**, **Reichwald K**, **Rhodes S**, **Ridler KA**, **Schlessinger D**, **Schueler MG**, **Sehra HK**, **Shaw-Smith C**, **Shen H**, **Sheridan EM**, **Shownkeen R**, **Skuce CD**, **Smith ML**, **Sotheran EC**, **Steingruber HE**, **Steward CA**, **Storey R**, **Swann RM**, **Swarbreck D**, **Tabor PE**, **Taudien S**, **Taylor T**, **Teague B**, **Thomas K**, **Thorpe A**, **Timms K**, **Tracey A**, **Trevanion S**, **Tromans AC**, **d'Urso M**, **Verduzco D**, **Villasana D**, **Waldron L**, **Wall M**, **Wang Q**, **Warren J**, **Warry GL**, **Wei X**, **West A**, **Whitehead SL**, **Whiteley MN**, **Wilkinson JE**, **Willey DL**, **Williams G**, **Williams L**, **Williamson A**, **Williamson H**, **Wilming L**, **Woodmansey RL**, **Wray PW**, **Yen J**, **Zhang J**, **Zhou J**, **Zoghbi H**, **Zorilla S**, **Buck D**, **Reinhardt R**, **Poustka A**, **Rosenthal A**, **Lehrach H**, **Meindl A**, **Minx PJ**, **Hillier LW**, **Willard HF**, **Wilson RK**, **Waterston RH**, **Rice CM**, **Vaudin M**, **Coulson A**, **Nelson DL**, **Weinstock G**, **Sulston JE**, **Durbin R**, **Hubbard T**, **Gibbs RA**, **Beck S**, **Rogers J**, **Bentley DR**. The DNA Sequence of The Human X Chromosome. *Nature* **2005**; 434(7031): 279-280.

52. **Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F.** Chromosomal Imbalance Maps of Malignant Solid Tumors: A Cytogenetic Survey of 3185 Neoplasms. *Cancer Res* **1997**; 57: 2765-2780.

53. **El-Naggar A, Dinh M, Tucker SL, Swanson D, Steck K, Vielh P.** Numerical Chromosomal Changes in DNA Hypodiploid Solid Tumors: Restricted Loss and Gain of Certain Chromosomes. *Cytometry* **1999**; 37: 107-112.

54. **Botarelli L, Azzoni C, Necchi F, Lagrasta C, Tamburini E, D'Adda T, Pizzi S, Sarli L, Rindi G, Bordi C.** Sex Chromosome Alterations Associate with Tumor Progression in Sporadic Colorectal Carsinomas. *Clin Cancer Res* **2007**; 13(15): 4365-4370.

55. **Wada M, Yokota J, Mizoguchi H, Terada M, Sugimura T.** Y Chromosome Abnormality in Human Stomach and Lung Cancer. *Jpn J Cancer Res* **1987**; 78(8): 780-783.

56. **Hunter S, Gramlich T, Abbott K, Varma V.** Y Chromosome Loss in Esophageal Carcinoma: An *In Situ* Hybridization Study. *Genes Chromosomes Cancer* **1993**; 8(3): 172-177.

57. **Dave BJ, Risin SA, Spitz MR, Pathak S.** Fluorescent *In Situ* Hybridization Analysis in Blood Lymphocytes of Lung Cancer Patients. *Anticancer Res* **1996**; 16(3A): 1187-1192.

58. **Yamaki H, Sasano H, Ohashi Y, Shizawa S, Shineha R, Satomi S, Nagura H.** Alteration of X and Y Chromosomes in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* **2001**; 21(2A): 985-990.

59. **Ragnarsson G, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT, Jonasson JG, Egilsson V, Ingvarsson S.** Loss of Heterozygosity at Chromosome 1p in Different Solid Tumours: Association with Survival. *Br J Cancer* **1999**; 79: 1467-1474.

60. **Sreekantaiah C, Bhargava MK, Shetty NJ.** Chromosome 1 Abnormalities in Cervical Carcinoma. *Cancer* **1988**; 62: 1317-1324.

61. **Caron H, Spieker N, Godfried M, Veenstra M, van Sluis P, de Kraker J, Voute P, Versteeg R.** Chromosome Bands 1p35-3 Contain Two Distinct Neuroblastoma Tumour Suppressor Loci, One of Which is Imprinted. *Genes Chromosomes Cancer* **2001**; 30: 18-174.

62. **Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D.** Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, A Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers. *Cell* **1997**; 90: 809-819.

63. **Han S, Semba S, Abe T, Makino N, Furukawa T, Fukushige S, Takahash H, Sakurada A, Sato M, Shiiba K, Matsuno S, Nimura Y, Nakagawara A, Horii A.** Infrequent Somatic Mutations in The p73 Gene in Various Human Cancers. *Eur J Surg Oncol* **1999**; 25: 194-198.

64. **Güven GS, Hacıhanefioğlu S, Cenani A.** Expression of Aphidicolin, FUdR and Caffeine-Induced Fragile Sites in Lymphocytes of Healthy Turkish Individuals. *Genetika* **1999**;105(1):109-16.

65. **Whang-Peng J, Kao-Shan CS, Lee EC, Bunn PA, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD.** Specific Chromosome Defect Associated with Human Small-Cell Lung Cancer; Deletion 3p (14-23). *Science* **1982**;215(4529):181-182.

66. **Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettengill OS, Graziano S, Sorenson GD, Poiesz BJ, Minna J, Linehan M, Zbar B.** Molecular Analysis of The Short Arm of Chromosome 3 in Small-Cell and Non-Small-Cell Carcinoma of The Lung. *N Engl J Med* **1987**; 317(18): 1109-13.

67. **Kok K, Osinga J, Carritt B, Davis MB, van der Hout AH, van der Veen AY, Landsvater RM, de Leij LF, Berendsen HH, Postmus PE, Poppema S, Buys CHCM.** Deletion of a DNA Sequence at The Chromosomal Region 3p21 in All Major Types of Lung Cancer. *Nature* **1987**; 330(6148): 578-581.

68. **Todd S, Franklin WA, Varella-Garcia M, Kennedy T, Hilliker CEJ, Hahner L, Anderson M, Wiest JS, Drabkin HA, Gemmill RM.** Homozygous Deletions of Human Chromosome 3p in Lung Tumors. *Cancer Res* **1997**; 57(7): 1344-1352.

69. **Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP.** Epigenetic Inactivation of a RAS Association Domain Family Protein from The Lung Tumour Suppressor Locus 3p21.3. *Nat Genet* **2000**; 25(3): 315-319.

70. **Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM.** The FHIT Gene 3p14.2 is Abnormal in Lung Cancer. *Cell* **1996**; 85(1): 17-26.

71. **Kakati S, Song SY, Sandberg AA.** Chromosomes and Causation of Human Cancer and Leukemia. *Cancer* **1977**; 40: 1173-1181.

72. **Simoneau M, Aboulkassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y.** Four Tumor Suppressor Loci on Chromosome 9q in Bladder Cancer: Evidence for Two Novel Candidate Regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* **1999**; 18(1): 157-163.

73. **Lukeis R, Irving L, Garson M, Hasthorpe S.** Cytogenetics of Non-Small Cell Lung Cancer: Analysis of Consistent Non-Random Abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* **1990**; 2(2): 116-124.

74. **Lichun Y, Ching Tang CM, Wai Lau K, Lung ML.** Frequent Loss of Heterozygosity on Chromosome 9 in Chinese Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Lett* **2004**; 203(1): 71-77.

75. **Takamochi K, Ogura T, Suzuki K, Kawasaki H, Kurashima Y, Yokose T, Ochiai A, Nagai K, Nishiwaki Y, Esumi H.** Loss of Heterozygosity on Chromosomes 9q and 16p in Atypical Adenomatous Hyperplasia Concomitant with Adenocarcinoma of The Lung. *Am J Pathol* **2001**; 159(5): 1941-1948.

76. **Pazarbaşı A.** Ovaryum ve Endometriyum Kanserlerinde Kromozom Düzensizlikleri ve Sık Rastlanan p53 Geni 7. Ekzon Mutasyonlarının Taranması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2004.**

77. **Forrest DL, Lee CL.** Constitutional Rearrangements of 7q22 in Hematologic Malignancies. A New Case Report. *Cancer Genet Cytogenet* **2002**; 139(1): 75-77.

78. **Balachandar V, Devi SM, Kumar BL, Sangeetha R, Manikantan P, Suresh K, Sasikala K.** Cytogenetic Analysis of Benign Prostate Hyperplasia (BPH) and Prostate Cancer (PC) Patients from Tamil Nadu, South India. *Scientific Research and Essay* **2008**;3(5): 212-214.

79. **Barkan GA, Caraway NP, Jiang F, Zaidi TM, Fernandez R, Vaporcyin A, Morice R, Zhou X Bekele BN, Katz RL.** Comparision of Molecular Abnormalities in Bronchial Brushings and Tumor Touch Preparations. *Cancer Cytopath* **2005**; 105(1): 35-43.

80. **Goeze A, Schlüns K, Wolf G, Thäsler Z, Petersen S, Petersen I.** Chromosomal Imbalances of Primary and Metastatic Lung Adenocarcinomas. *J Pathol* **2002**; 196(1): 8-16.

81. **Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H, Gemmill R, Franklin W, Yang P, Sugio K, Smith DI, Liu W.** PTEN/MMAC1 Mutations Identified in Small Cell, but not in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncogene* **1998**; 17(4): 475-479.

82. **Johannsson M, Karauzum B, Dietrich C, Mandahl N, Hambracus G, Johansson L.** Karyotypic Abnormalities in Adenocarsinomas of The Lung. *Lung Cancer* **1995**; 12(1): 126-126(1).

83. **Lukeis R, Ball D, Irving L, Garson OM, Hasthorpe S.** Chromosome Abnormalities in Non-Small Cell Lung Cancer Pleural Effusions: Cytogenetic Indicators of Disease Subgroups. *Genes, Chromosomes and Cancer* **2006**; 8(4): 262-269.

84. **Takagi Y, Futamura M, Yamaguchi K, Aoki S, Takahashi T, Saji S.** Alterations of The PPP2R1B Gene Located at 11q23 in Human Colorectal Cancers. *Gut* **2000**; 47(2): 268-271.

85. **Sozzi G, Conte D, Leon M, Cirincione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U.** Quantification of Free Circulating DNA as a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *J Clin Oncol* **2003**; 21(21): 3902-3908.

86. **Gal S, Fidler C, Lo YM, Taylor M, Han C, Moore J, Harris AL, Wainscoat JS.** Quantitation of Circulating DNA in The Serum of Breast Cancer Patients by Real-Time PCR. *Br J Cancer* **2004**; 90(6): 1211-1215.

87. **Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed S, Lam S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF.** Allelic Losses at Chromosome 8p21-23 are Early and Frequent Events in The Pathogenesis of Lung Cancer. *Cancer Res* **1999**; 59: 1973-1979.

88. **Horak P, Pils D, Roessler M, Tomek S, Elandt K, Zeillinger R, Zielinski C, Krainer M.** Common Death Receptor 4 (DR4) Polymorphisms do not Predispose to Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol* **2005**; 97: 514-518.

89. **Cuello M, Ettenberg SA, Nau MM, Lipkowitz S.** Synergistic Induction of Apoptosis by The Combination of TRAIL and Chemotherapy in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Gynecol Oncol* **2001**; 81: 380-390.

90. **Vignati S, Codegoni A, Polato F, Broggini M.** TRAIL Activity in Human Ovarian Cancer Cells: Potentiation of The Action of Cytotoxic Drugs. *Eur J Cancer* **2002**; 38: 177-183.

91. **Kim KH, Fisher MJ, Xu SQ, El Deiry WS.** Molecular Determinants of Response to TRAIL in Killing of Normal and Cancer Cells. *Clin Cancer Res* **2000**; 6: 335-346.

92. **Frank B, Hemminki K, Shanmugam KS, Meindl A, Klaes R, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Untch M, Bugert P, Bartram CR, Burwinkel B.** Association of Death Receptor 4 Haplotype 626C-683C with an Increased Breast Cancer Risk. *Carcinogenesis* **2005**; 26(11): 1975-1977.

93. **Frank B, Shanmugam KS, Beckmann L, Hemminki K, Brenner H, Hoffmeister M, Chang-Claude J, Burwinkel B.** Death Receptor 4 Variants and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**; 15(10): 2002-2005.

EKLER

EK-1. Sitogenetik Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri

-Yıkama Besiyeri

F-10 Ham's	100 ml
Penicilin/Streptomycin	1 ml
Gentamycin	0,3 ml
Amfoterisin B (1:20)	1,5 ml
Fetal Calf Serum	5 ml
Heparin	1 ml

-Bio-AMF Besiyeri

Bio-AMF Besiyeri	100 ml
Supplement	20 ml
Gentamycin	1 ml

-Normal Kan Kültür Besiyeri (RPMI 1640, cat no. 0883)

RPMI-1640 R0883	100 ml
Fetal calf serum	**25 ml**
Phytohemmaglutinin	1,5 ml
Penicillin/ Streptomycin	1,0 ml
L-Glutamin	1,5 ml

-M199 Kültür besiyeri

M199 (Folik asitten yoksun)	100 ml
Fetal calf serum	**5 ml**
Phytohemmaglutinin	1,5 ml
Penicillin/ Streptomycin	1,0 ml
L-Glutamin	1,5 ml

EK-2. Sitogenetik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

a)Tripsin-EDTA (Biological Industries)

b) Kolşisin (Seromed Cat. No. L 6210) 10 µl / ml

c)Hipotonik solüsyonu (0,075 M KCl)

5,592 g KCl tartılıp 1000 ml' ye distile su ile tamamlandı.

d) Fiksatif solüsyonu

3 birim metanol ile 1 birim glasiyel asetik asit karıştırılarak her uygulama öncesi taze olarak hazırlandı.

e) Tripsin solüsyonu (Stok solüsyon, 30 mg / ml)

3 g tripsin, 100 ml % 0.9' luk NaCl içerisinde çözüldü. 1,5 ml' lik kısımlara ayrılarak -20 °C' de saklandı.

f) % 0.9' luk NaCl (Sodyum klorid)

g) Fosfat tamponu

İki ayrı solüsyon halinde hazırlandı ve eşit oranda karıştırıldı.

Solüsyon 1. 9,073 g KH_2PO_4 tartılıp 1000 ml bidistile suda çözüldü.

Solüsyon 2. 11,87 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1000 ml bidistile suda çözüldü.

h) Giemsa boya solüsyonu

Fosfat tamponu içerisinde % 7-10 olacak şekilde hazırlandı.

EK-3. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

a)1 M $MgCl_2.6H_2O$

10.16 g $MgCl_2.6H_2O$, 40 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve daha sonra volüm 50 ml'ye bidistile su ile tamamlandı. Otoklavda steril edilerek oda ısısında saklandı.

b) 1 M Tris-HCl, pH 7.5

12.11 g Tris-base 80 ml bidistile su içerisinde çözüldü. pH, HCl ile 7.5'e ayarlandıktan sonra volüm 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildikten sonra oda ısısında saklandı.

c) 5 X Red Cell Lysis Buffer (Eritrosit Lizis Tamponu)

54.8 g sükroz (final konsantrasyon 1.6 M)

6 ml 1 M Tris HCl, pH:7.5 (final konsantrasyon 60 mM)

2.5 ml 1 M $MgCl_2.6H_2O$ (final konsantrasyon 25 mM)

5 ml Triton X-100 (final konsantrasyon %5 v/v)

Sükroz 50 ml bidistile su içerisinde çözüldükten sonra Triton X-100, $MgCl_2$ ve Tris-HCl ilave edildi. Volüm bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanarak buzdolabında saklandı.

d) Fizyolojik Tampon

0.438 g NaCl

0.93 g EDTA

Deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır ve pH 7.5'e ayarlanır.

e) TE-9 (pH:9)

500 mM Tris baz

20 mM EDTA pH:9.0

10 mM NaCl

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan Tris baz, EDTA ve NaCl hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

f) SDS Solüsyonu (%10'luk)

10 ml için 1 gr SDS tartılır ve bir şişeye aktarıldıktan sonra üzerine 10 ml steril saf su ilave edilir. İyice vortekslenerek çözülmesi sağlanır. Kullanıncaya kadar buzdolabında veya oda ısısında bekletilebilir.

g) Proteinaz K (10 mg/ml)

10 mg proteinaz K, 1000 µl steril saf su ile sulandırılır ve steril ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklanır.

h) 6 M NaCl

35.06 g NaCl 80 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Volüm bidistile su ile 100 ml'ye tamalandıktan sonra otoklavda steril edildi ve oda ısısında saklandı.

i) %70 Etil alkol

70.35 ml %99.5'lik etil alkolden alınır ve 100 ml'ye saf su ile tamamlanır.

j) Lizis Tamponu (pH:8.0)

0.209 g Tris-HCl, 0.249 g EDTA, 0.67 g SDS tartıldı ve son hacmi 100 ml olacak şekilde saf su ilave edildi. pH 8.0'a ayarlandı.

k) 0.5 M EDTA (Etilen daimin tetraasetik asit), pH 8.0

18.65 g disodyum EDTA, 80 ml bidistile su içinde çözüldü. İçerisine 2 g NaOH tableti atılarak eritildi. pH 8.0'e ayarlandı (2 g NaOH pH'yı 8.0 yapmaya yeterlidir). Volüm bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edilerek oda ısısında saklandı.

l) 10XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Çözeltisi

108 g Tris-base (0.9 M)

55 g Borik asit (0.9 M)

40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 (20 mM)

Tris-base ve borik asit 700 ml bidistile su içerisinde çözüldü. EDTA eklendikten sonra volüm bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında plastik bir şişe içerisinde muhafaza edildi.

m) 1XTBE (çalışma çözeltisi)

100 ml 10XTBE'ye 900 ml bidistile su eklendi. Elektroforez tankına konularak kullanıldı.

n) Krezol Kırmızısı (cresol red)

10 mg krezol kırmızısı 1 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve buzdolabında saklandı.

o) Krezol kırmızısı çalışma çözeltisi (elektroforez yükleme boyası)

400 µl bidistile su, 0.5 ml gliserol ve 10 mg/ml'lik krezol kırmızısından 100 µl bir ependorf tüp içerisine konuldu. İyice vortekslenerek homojen hale getirildi ve buzdolabında +4'de saklandı.

ö) Etidiyum bromid çözeltisi (10 mg/ml)

0.1 g etidiyum bromid 10 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Işık almayan bir cam şişe içerisinde buzdolabında muhafaza edildi.

EK-4. Hasta (60) ve kontrol (30) gruplarına ait serum ve kan DNA'larının konsantrasyonu ve saflığı

Kişi No	Serum		Kan	
	Konsantrasyon (µg/µl)	**Saflık**	**Konsantrasyon (µg/µl)**	**Saflık**
H1	0.19	1.4815	0.095	1.8571
H2	0.25	1.4444	4.055	4.5659
H3	0.12	1.7857	0.070	1.8125
H4	0.14	1.6667	0.225	3.2414
H5	0.13	1.2727	0.100	1.7917
H6	0.11	1.7143	0.110	1.6429
H7	0.16	1.1786	0.145	1.7143
H8	0.08	1.6364	0.315	1.8714
H9	0.14	1.7698	0.090	1.9000
H10	0.01	1.0000	0.110	1.8077
H11	0.14	1.1538	0.110	2.0435
H12	0.23	1.4545	0.405	1.8242
H13	0.13	1.1250	0.015	2.6298
H14	0.10	1.2353	0.100	2.1000
H15	0.08	1.3077	0.305	1.9091
H16	0.01	1.3452	0.205	1.9111
H17	0.26	1.2000	0.920	1.8301
H18	0.19	1.1111	0.185	1.9000
H19	0.57	1.2447	0.185	1.9000
H20	0.49	1.2625	0.885	1.7707
H21	0.66	1.2952	0.205	1.9111
H22	0.35	1.3585	0.310	1.8955
H23	0.23	1.3611	0.750	1.7701
H24	0.35	1.4118	0.105	2.0000
H25	0.28	1.3409	0.430	1.8936
H26	1.23	1.3057	0.510	1.8174
H27	1.52	1.3207	0.115	2.0000
H28	0.21	1.3636	0.055	2.3000
H29	0.33	1.3019	0.020	5.0000
H30	0.53	1.2386	0.025	3.0000
H31	0.12	1.6667	0.055	2.4000
H32	0.21	1.5172	0.175	1.8947
H33	0.48	1.2987	0.105	2.2000
H34	0.07	1.8750	0.150	2.0667
H35	0.29	1.4524	0.020	5.0000
H36	0.55	1.3294	0.050	2.4444
H37	0.35	1.3518	0.020	3.3333
H38	0.35	1.2000	0.080	2.0625
H39	0.39	1.3729	0.040	2.1250
H40	0.19	1.6250	0.030	2.8000
H41	0.36	1.1719	0.055	2.4000

EK-4. (Devamı)

Kişi No	Serum		Kan	
	Konsantrasyon (µg/µl)	**Saflık**	**Konsantrasyon (µg/µl)**	**Saflık**
H42	0.35	1.3333	0.295	1.8769
H43	0.06	1.5555	0.110	1.9583
H44	0.22	1.0454	0.160	2.0303
H45	0.22	1.1190	0.565	1.8640
H46	0.34	1.1452	0.405	1.8764
H47	0.34	1.1475	0.310	1.8676
H48	0.37	1.1343	0.075	2.0000
H49	0.43	1.0843	0.095	1.8571
H50	0.58	1.1009	0.020	1.8000
H51	0.31	1.0159	0.125	1.7333
H52	0.43	1.1688	0.050	2.2000
H53	0.37	1.2063	0.030	2.3333
H54	0.31	1.2075	0.035	2.0000
H55	0.14	1.2500	0.090	1.9474
H56	0.24	1.3158	0.040	1.8000
H57	0.21	1.3333	0.100	2.0500
H58	0.55	1.1752	0.065	2.5454
H59	0.69	1.0672	0.095	2.4375
H60	0.03	3.5000	0.125	2.3043
K1	0.24	1.3513	0.055	4.0000
K2	0.24	1.3158	0.275	2.0179
K3	0.23	1.2973	0.150	2.2500
K4	0.24	1.3784	0.205	2.1795
K5	0.17	1.2069	0.560	1.9412
K6	0.17	1.5000	0.175	2.2500
K7	0.29	1.2500	0.290	2.0339
K8	0.35	1.3273	0.595	1.9365
K9	0.21	1.3333	0.150	2.3333
K10	0.31	1.3265	0.275	2.0357
K11	0.36	1.2097	0.275	2.0545
K12	0.39	1.2903	0.145	2.4361
K13	0.31	1.1852	0.250	2.0600
K14	0.41	1.2686	0.230	2.0652
K15	0.18	1.1515	0.045	5.0000
K16	0.25	1.3590	0.080	3.0000
K17	0.19	1.4444	0.150	2.0667
K18	0.24	1.3513	0.065	3.1111
K19	0.58	1.2935	0.120	2.3810
K20	0.28	1.4390	0.045	3.8000
K21	0.25	1.2683	0.115	2.4000
K22	0.32	1.3958	0.115	2.3333

EK-4. (Devamı)

Kişi No	Serum		Kan	
	Konsantrasyon (µg/µl)	**Saflık**	**Konsantrasyon (µg/µl)**	**Saflık**
K23	0.28	1.2340	0.175	2.2813
K24	0.21	1.3750	0.120	2.4286
K25	0.36	1.1364	0.200	2.2778
K26	0.17	1.3846	0.125	2.5238
K27	0.05	1.7143	0.005	3.5000
K28	0.47	1.1011	0.005	3.4286
K29	0.19	1.2188	0.075	3.2000
K30	0.46	1.2800	0.210	2.1463

EK-5. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

a) %40'lık akrilamid:

30.18 gr akrilamid

1. gr N,N'-metilen bisakrilamid

100 ml %40'lık poliakrilamid solüsyonu hazırlamak için yukarıda verilen miktarlarda akrilamid ve N,N'-metilen bisakrilamid tartıldı ve toplam hacimden biraz az mktarda saf su ilave edildi. 1 saat kadar 37 °C'de bekletilerek maddelerin çözünmesi sağlandıktan sonra 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

b) %25'lik Amonyum Per Sülfat (APS)

2.5 g APS tartılarak steril bir tüp içerisinde 10 ml'ye saf su ile tamamlandı. Karışım vortekslendi ve tamamiyle çözülmesi için 37 °C'de bir süreliğine bekletildi. Karışımın olduğundan emin olduktan sonra ependorf tüplere dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

c) 10XTBE (EK-3)

d) TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamin) (Sigma T-8133)

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Almanya'nın Hannover şehrinin Ostercappeln kasabasında doğdu. İlköğretimini, ilk iki yılını Almanya'da olmak üzere Adana Şakirpaşa İlkokulu ve Adana Necdet Kahraman Ortaokulu'nda tamamladı. 1993 yılında Adana Erkek Lisesi'nden mezun olup 1994 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı ve buradan 1998 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programını kazandı. 2002 yılında Yüksek Lisansını tamamlayıp aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora programını kazandı ve Kasım 2002'de Enstitü kadrosunda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı.