

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

AKCİĞER KANSERİNDE ERKEN TANIDA PROTEOMİKLERİN YERİ

UZMANLIK TEZİ

İSMAİL AĞABABAOĞLU

İZMİR-2014

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

AKCİĞER KANSERİNDE ERKEN TANIDA PROTEOMİKLERİN YERİ

UZMANLIK TEZİ

İSMAİL AĞABABAOĞLU

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. AHMET ÖNEN

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	ii
GRAFİK LİSTESİ.....	iii
RESİM LİSTESİ	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	1
SUMMARY	2
GİRİŞ VE AMAÇ	3
GENEL BİLGİLER	6
GEREÇ VE YÖNTEM	29
BULGULAR	34
TARTIŞMA.....	57
SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR.....	64

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.** Akciğer kanserinde semptom ve bulgular
- Tablo 2.** Akciğer kanseri patolojik sınıflama
- Tablo 3.** Akciğer adenokarsinom yeni sınıflaması
- Tablo 4.** Akciğer kanseri bronkoalveolar patolojik tip yeni tanımlamaları
- Tablo 5.** Akciğer kanseri TNM evrelemesi 2009
- Tablo 6.** Akciğer kanseri evreleme 2009
- Tablo 7.** Akciğer kanserinde tanı anındaki evreler
- Tablo 8.** Yaş ve Cinsiyet Dağılımı
- Tablo 9.** Sigara Kullanımına İlişkin Dağılımlar
- Tablo 10.** Tanılara İlişkin Dağılımlar
- Tablo 11.** Malign Olgularda; Tanı, Evre, Erken/Geç Evre ve Evrelere Göre Tanıların Dağılımı
- Tablo 12.** Malign Olgularda; Maruziyet, KOAH ve Kansere Öyküsü Görülme Oranları Dağılımı
- Tablo 13.** Total, Malign ve Benign Olgularda Operasyon Türleri Dağılımı
- Tablo 14.** Gruplara Göre Yaş ve Cinsiyet Değerlendirilmeleri
- Tablo 15.** Gruplara Göre Kullanılan Sigara Sayılarına İlişkin Değerlendirilmeler
- Tablo 16.** Gruplara Göre Evrelerin Dağılımı
- Tablo 17.** Gruplara Göre Maruziyet, KOAH ve Kansere Öyküsü Görülme Oranlarının Değerlendirilmesi
- Tablo 18.** Gruplara Göre Operasyon Türlerinin Değerlendirilmesi

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Cinsiyet dağılımı

Grafik 2. Olguların sigara kullanım oranları dağılımı

Grafik 3. Tanılara ilişkin dağılım

Grafik 4. Malign olgularda tanıların dağılımı

Grafik 5. Tanılara İlişkin dağılımlar

Grafik 6. Malign olgularda evrelerin dağılımı

Grafik 7. Malign olguların evrelere göre tanıların dağılımı

Grafik 8. Malign olgularda; maruziyet, KOAH ve kanser öyküsü görülme oranları dağılımı

Grafik 9. Malign ve Benign olgularda operasyon türleri dağılımı

Grafik 10. Kullanılan sigara sayıları dağılımı

Grafik 11. Gruplara göre evrelerin dağılımı

Grafik 12. Gruplara göre operasyon türleri dağılımı

RESİM LİSTESİ

- Resim 1.** Akciğer kanseri Mountain-Dresler lenf nodu haritası
- Resim 2.** Adenokarsinom makroskopi
- Resim 3.** Adenokarsinom mikroskopi malign
- Resim 4.** Adenokarsinom mikroskopi benign
- Resim 5.** Skuamöz hücreli karsinom makroskopi
- Resim 6.** Skuamöz hücreli karsinom mikroskopi malign
- Resim 7.** Skuamöz hücreli karsinom mikroskopi benign
- Resim 8.** Adenokarsinom erken evre grup normal parankim 2D jel elektroforez
- Resim 9.** Adenokarsinom geç evre grup normal parankim 2D jel elektroforez
- Resim 10.** Adenokarsinom erken evre grup tümörlü parankim 2D jel elektroforez
- Resim 11.** Adenokarsinom geç evre grup tümörlü parankim 2D jel elektroforez
- Resim 12.** Skuamöz hücreli karsinom erken evre grup normal parankim 2D jel elektroforez
- Resim 13.** Skuamöz hücreli karsinom geç evre grup normal parankim 2D jel elektroforez
- Resim 14.** Skuamöz hücreli karsinom erken evre grup tümörlü parankim 2D jel elektroforez
- Resim 15.** Skuamöz hücreli karsinom geç evre grup tümörlü parankim 2D jel elektroforez

KISALTMALAR

PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
MALDI	: Matrix assisted laser desorption ionization
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
SHP	: Tirozin fosfataz
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFR	: Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
TIMP	: Metalloproteinazların doku inhibitörü
MVD	: Mikrodamar yoğunluğu
ALK	: Tirozin kinaz
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
ERBB	: Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinden tirozin kinaz
IGFR	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü
KIT	: v-kit Hardy-Zuckerman 4 felin sarkomu viral onkogen homoloğu
MET	: Mezenkimal-epitel geçişi proto-onkogeni
PDGFRA	: Platelet türevi büyüme faktörü reseptörü-A
WHO	: Dünya sağlık örgütü
IARC	: Uluslararası kanser araştırma ajansı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
BT	: Bilgisayarlı tomografi
NÖD	: Negatif öngörü değeri
PÖD	: Pozitif öngörü değeri
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme

RDOG	: Radyoloji Diyagnostik Onkoloji Grubu
IV	: İntravenöz
PET	: Pozitron emüsyon tomografisi
FDG	: 2 flourine-18 flouro- 2-deoxyglucose
EUS	: Endoskopik ultrasonografi
EBUS	: Endobronşial ultrasonografi
SSM	: Standart servikal mediastinoskopi
ESM	: Genişletilmiş servikal mediastinoskopi
ESTS	: Avrupa Göğüs Cerrahisi Derneği
VAMLA	: Video yardımcı mediastinal lenf adenektomi
TEMLA	: Trans-servikal mediastinal lenf adenektomi
VATS	: Video yardımcı torakoskopik cerrahi
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
IASLC	: Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Grubu
ATS	: Amerikan Toraks Derneği
ERS	: Avrupa Solunum Derneği
AIS	: Adenokarsinom in situ
MIA	: Minimal invaziv karsinom
UICC	: Uluslararası Kanser Kontrol Birliği
AJCC	: Amerikan Kanser Komitesi
RT	: Radyoterapi
KT	: Kemoterapi
NLST	: Ulusal Akciğer Kanseri Tarama Çalışmaları
VDT	: Hacmin İkilenme Zamanı
IPG	: İmmobilize pH gradienti

IEF	: İzoelektronik fokuslama
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
KOAH	: Kronik obstruktif akciğer hastalığı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince hem hekimlik mesleğine hem de hayata yaklaşımıyla bizlere örnek olan, bir ferdi olmaktan gurur duyduğum göğüs cerrahisi ailemizin başındaki saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nezih ÖZDEMİR'e;

Dostane yaklaşımı ve pozitif hayat enerjisiyle bize her zaman sahip çıkan Doç. Dr. Aydın ŞANLI hocama;

Üstün cerrahi ve insani özellikleriyle hayatta ve hekimlik hayatında yol göstericimiz tez hocam, ustam Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÖNEN'e;

Doğumumdan tıp fakültesinden mezun olana kadar milletime ve insanlığa faydalı bir birey olmam için gösterdikleri emekler için annem Hatice AĞABABAOĞLU 'na ve babam Ahmet AĞABABAOĞLU'na ;

Uzmanlık eğitimim son döneminde tanışma fırsatı bulduğum, iyi bir cerrah olarak yetişmemdeki katkılarından dolayı abim Uzm. Dr. Volkan KARAÇAM'a;

Beş yıllık uzmanlık eğitimim süresince karşılaştığım her zorlukta yanımda bulduğum kader ortağım, eş kıdemli arkadaşım, kardeşim Dr.Hasan ERSÖZ'e;

Göğüs cerrahisi kliniğimizde tanıştığım iyi günde kötü günde her zorluğu beraber çalışarak aştığımız değerli meslektaşlarım Dr.Ali KARAKILIÇ, Dr.Bahar ŞANLI'ya;

Tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan başta Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Atila AKKOÇLU hocam,Onkoloji Enstitüsü öğretim görevlileri Prof.Dr.Safiye AKTAŞ hocam, DOÇ.Dr.Zekiye ALTUN hocam olmak üzere tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ve Temel Onkoloji ekibine;

Asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm poliklinik, servis, yoğun bakım ve ameliyathane çalışanlarına;

Son olarak bana dünyanın en güzel iki evladı Selen Naz ve Efe'yi veren iyi günde kötü günde dimdik yanımda olan dostum, sevgilim, eşim, aşkım Selen AĞABABAOĞLU'na;

Minnet ve şükran duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. İsmail Ağababaoğlu

İzmir - 2014

ÖZET

AKCİĞER KANSERİNDE ERKEN TANIDA PROTEOMİKLERİN YERİ

Dr. İsmail Ağababaoğlu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı,

İzmir / Türkiye

ismail.agababaoğlu@deu.edu.tr

Akciğer kanseri dünyada ve Türkiye’de kansere bağlı ölümlerin en sık sebebidir. Metastatik hastalığa ve sistemik tutulumla bağlı geç semptom vermesi nedeniyle akciğer kanserinde tanı genellikle tedavi şansının çok daha az olduğu ileri evrelerde konabilmektedir. Bu açıdan akciğer kanserinin erken tanısı konarak cerrahi ile tam tedavisini sağlamak ana strateji olmalıdır. 153 olgunun örnekleri arasından seçilen, %83,3’ü (n=30) erkek, %16,7’si (n=6) kadın olmak üzere toplam 36 malign olgunun taze doku örnekleri; erken evre, geç evre akciğer kanseri örnekleri olarak 2 gruba ayrıldı ve her bir grup, 18 skuamöz hücreli karsinom ve 18 adenokarsinom alt gruplarından oluşturuldu. 36 olgudan 1 (%2,8) olgu kullanılmazken, 35 (%97,2) olgu sigara kullanmaktadır. Malign olguların %41,7’si (n=15) Evre 1 iken, %7,3’ü (n=3) Evre 2, %44,4’ü (n=16) Evre 3 ve %5,6’sı (n=2) Evre 4’tür. Olguların %50,0’si (n=18) geç, %50,0’si (n=18) erken evrededir. Cerrahi müdahale sonrası tümörlü ve eşlenik normal parankimden alınan dokular kullanılmıştır. Her olgudaki protein değişimleri, normal dokusuna göre karşılaştırılarak tümörlü dokudaki protein ifade farklılıkları belirlenmiştir. 2 D jel elektroforez ve MALDI TOF/TOF kütle spektrometresi analizi sonrası elde edilen sonuçlar Decodon 2d jel analiz sistemi ile alt gruplar içerisindeki protein dansite farklılıklarına göre tanımlandı. Adenokarsinom geç evre alt grubunda (HSP60) proteini ve skuamöz hücreli karsinom alt grubu için annexin-2 proteini ekspresyon düzeyinde anlamlı artış saptadık. Bu sonuçlar ışığında akciğer kanserinin erken tanısında adenokarsinom grubunda HSP60, skuamöz hücreli karsinom grubunda annexin 2 proteinin önemli bir biobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bu 2 proteinin prognozu, metastaz potansiyelini, tedaviye yanıtı değerlendirme açısından önemli katkılar yapabilecek potansiyele sahip moleküller olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Proteomik, Akciğer kanserinde erken tanı

SUMMARY

İMPÖRTANCE OF PROTEOMİCS İN EARLY DİAGNOSİS OF LUNG CANCER

Dr. İsmail Ağababaoğlu

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department Of Thoracic Surgery

Izmir / Turkey

ismail.agababaoglu@deu.edu.tr

Lung cancer is the most common reason of cancer-related deaths in the world and Turkey. Diagnosis in the lung cancer can be generally made in advances phases in which treatment chance is less because of the fact that the lung cancer shows late symptom depending on metastatic disease. In this respect, the main strategy should be to provide full treatment with surgery by diagnosing before the lung cancer becomes symptomatic. Fresh tissue samples of 36 malign cases in total, 83,3% (n=30) of them was male, 16,7% (n=6) of them was female, that were selected from among the samples which were taken from 153 cases were divided into 2 groups as early-phase and late-phase lung cancer and each group was formed from 18 squamous cells and 18 adenocarcinoma sub-groups. While 1 (2,8%) case from 36 case smokes, 35 (97,2%) cases don't smoke. While 41,7% (n=15) of the malign cases is in Phase 1, 7,3% (n=3) of the cases is in Phase 2, 44,4% (n=16) of them is in Phase 3 and 5,6% (n=2) of them is in Phase 4. 50,0% (n=18) of the cases is in late-phase and 50,0% (n=18) of them is in early-phase. For instance, tissues which were taken from malign tissue and conjugated normal tissues after surgical intervention were used. Protein expression differences in the malign tissue were determined by comparing protein changes in each patient according to normal tissue. The results, which were compared after 2 D gel electrophoresis and MALDI TOF/TOF mass spectrometer analysis, were determined via Decodon 2d gel analysis system according to protein density differences within sub-groups. We determined significant increase in expression level of (HSP60) protein in adenocarcinoma late-phase sub-group and annexin-2 protein for squamous cell sub-group. In the light of these results, we think that HSP60 in adenocarcinoma group and annexin-2 protein in squamous cell sub-group may be an important indicator for diagnosing the lung cancer. In addition, these 2 protein may be molecules which have potential to make important contributions for evaluating metastasis, prognosis, potential for responding to the treatment.

Keywords: Lung Cancer, Proteomics, Early Diagnosis in Lung Cancer

GİRİŞ VE AMAC

Akciğer kanseri, en sık karşılaşılan, yüksek ölüm hızına sahip kanser türüdür. Tüm yeni tanı almış kanser vakalarının %12.4'ünü, kansere bağlı mortalitenin %17.6'sını oluşturur ve bu nedenlerle en önemli toplum sağlığı problemlerinden biridir.(1-2) Akciğer kanserinin tedavisinde; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi tedavi seçeneklerinden biri yada birkaçı uygulanmaktadır. Hastanın genel durumu, eşlik eden hastalıkları, akciğer kanserinin evresi ve patolojik sınıflandırmasına göre kişiye özel yaklaşımlar söz konusu olabilmektedir. Akciğer kanserinde tüm gelişmiş tedavi seçeneklerine rağmen 5 yıllık sağkalım %15'dir.(3) Bu sağkalım evre 1 ve cerrahi ile tedavi edilmiş hastalarda % 66 olmaktadır.(4) Fakat tanısı konmuş tüm akciğer kanserleri içinde opere olabilecek evrede olan hastalar, tüm hastaların %15-20'si kadardır.(4) Akciğer kanseri hastalarında erken tanı koymak ve cerrahi tedavi şansına sahip olan hastaların, akciğer kanseri tanısı konan hasta popülasyonundaki oranını artırmak, sağkalım oranlarını artırmak adına çok önemlidir. Çünkü genel olarak operasyona uygun olan ve opere edilen erken evre hastaların sağkalım oranları evre 1 için %66 Evre II için ise %55'dir (4) ve kemoterapi ile radyoterapi (RT) tedavileri ile karşılaştırıldığında hastaların sağkalım oranlarına çok daha fazla katkı sağlamakta, tedavi maliyetleri daha düşük olmakta, hastalarda kemoterapi ile radyoterapi tedavilerinde karşılaşılan önemli komplikasyonlarla karşılaşmamaktadır.

Akciğer kanserinde hastaların erken evre tanı alabilmelerine yönelik, risk grubunda olduğu düşünülen hasta gruplarında tarama yapılabileceği düşüncesi Doll ve Hill tarafından 1950 yılında konvansiyonel x-ray kullanılarak uygulanmıştır. (5-7) Bu çalışmada, kansere bağlı mortalite açısından tarama yapılan grup ve tarama yapılmayan grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Daha sonra bu çalışmayı x-ray ve balgam sitolojisi gibi iki tanı yöntemini kombine eden çalışmalar takip etmiş(8-11) fakat bu çalışmalarda istenen sonucu vermemiştir.

Bilgisayarlı tomografi ile yapılan akciğer kanseri tarama programında ise risk grubunda olduğu düşünülen popülasyonda yapılan tarama uzun dönem sağkalıma bir katkı sağlamamış, aşırı tanı koyma ve gereksiz cerrahi oranını artırması gibi sorunlar ortaya çıkmıştır. (12-13)

Otoflorasan bronkoskopi ve bronkoskopik balgam materyalinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile genetik çalışmalar gibi tarama testleri geliştirilmeye çalışılmış fakat günümüzde uygulaması kolay, hastaya zarar vermeyen, tanısal değeri olan, uzun dönem sağkalımı artıran, gereksiz cerrahi işlemlere yol amayan, yeterli özgüllükte ve duyarlılıkta bir tarama testi saptanamamıştır.

Günümüzde tarama testleri açısından üzerinde çalışılan popüler konular; Moleküler genetik biyobelirteçler, Hücre faklılaşmasını ifade eden markırlar, Proliferasyon markırları, metastatik potansiyeli gösteren markırlardır. Bunların proteomikler şeklinde hazırlanan kombinasyonları ile tarama ve tanıda özgüllük ve duyarlılık artırılmaya çalışılmakta ve insan tümör belirteçlerinin belirlenmesinde proteomik çalışmalar önem kazanmaktadır.(14-15) Bugüne kadar yapılmış akciğer kanseri proteomik çalışmalarında bazı tümör belirteçleri bulunmasına karşın, bu belirteçlerin çoğu henüz klinik alanda uygulamaya konulamamıştır. Türk toplumunda akciğer kanseri biyobelirteci bulma konusunda geniş çaplı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, yapılacak olan bu alışma, Türk toplumuna özgü olacağı gibi tüm toplumlara da uyarlanabilme şansı olabilecek yeni akciğer kanseri tümör belirteçleri bulmayı ve klinik uygulamaya koyabilmeyi hedeflemektedir.

Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) spektrometre analizleri, biyolojik dokulardaki protein, peptid, lipid ve küçük moleküllerdeki farklı değişimleri değerlendirmek için son zamanlarda büyük önem kazanan tekniklerden biridir.(16-17) Bu nedenle bu çalışmadaki proteomik araştırmaların MALDI spektrometre ile yapılması planlanmıştır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) SHP2 ve VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ile microdamar yoğunluğu (MVD) ilişkisi klinikopatolojik parametreler göz önünde bulundurularak 80 doku mikroarrayi yapılmışdır. Bunun sonucunda SHP2 'nin KHDAK'inde yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olup, VEGFR-2 ve MVD ile beraber lenf nodu metastazı ile yakından ilişkili olduğu gsterilmişdir.(18) KHDAK hastalarından adjuvan kemoterapiden (KT) kimlerin daha iyi faydalanabileceğini n görmeyi sağlayacak fonksiyonel gen seti oluşturmak üzere 442 Evre-1-3 KHDAK hastasında genetik aberasyonlar mikroarray ile değerlendirilmiştir. Buna göre 18 gen arasında 12 gen seti tespit edilmiş olup, rezekte edilebilir KHDAK hastaların adjuvan kemoterapiden daha iyi sağkalım sağlayabileceği sonucuna ulaşılmışdır.(19) Pros E. ve arkadaşları, akciğer kanserinde büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu ile ilişkili gen amplifikasyonlarını inceleyip ALK, FGFR1, FGFR2, FGFR3,

ERBB2, IGF1R, KIT, MET ve PDGFRA panelini oluşturmuşlardır. Bunlar arasında ERBB2, MET, KIT ve PDGFRA amplifikasyonunun belirlenmesinin spesifik tedavi hedefi oluşturabileceğini göstermişlerdir.(20)

GENEL BİLGİLER

Akciğer Kanserlerinde Epidemioloji ve Karsinogenez

Akciğer kanseri yüzyıl başında nadir görülen bir hastalık olmasına rağmen tütün ürünleri kullanma alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı artmış ve dünyada en sık görülen kanser türü haline gelmiştir. (1) Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı Uluslar arası Kanser Araştırma Ajansı‘ International Agency for Research on Cancer ‘ (IARC) 2008 istatistiklerine göre akciğer kanserleri dünyada en sık görülen ve en sık öldüren kanser tipidir. Bu çalışmada 2008 yılında 1610000 yeni akciğer kanseri olgusu bildirilmiş ve akciğer kanserleri tüm yeni kanser olgularının %12,7 ‘lik kısmını oluşturmuştur. Bir yılda akciğer kanserine bağlı bildirilen ölümler 1380000 olgudur ve bu toplam kanser ölümlerinin %18.2’sini oluşturmaktadır. Sadece erkek populasyon göz önüne alındığında akciğer kanserlerinin insidansı ve mortalitesi ilk sıradadır.(21) Kadın populasyonunda ise akciğer kanserleri meme kanserleri, kolorektal kanserleri ve serviks kanserlerinden sonra 4. Sırada gelmektedir fakat bu kanserlerin görülme sıklığı birbirine çok yakındır ve kadınlar arasındaki sigara içme alışkanlığındaki artışa bağlı görülme sıklığı hızlı artış göstermektedir. (22)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) IARC 2008 kayıtlarına göre ülkemizde kanser insidansında ve mortalite oranlarında akciğer kanserleri ilk sırada saptanmıştır. 2008 yılı için erkek populasyonunda 14.667yeni tanı almış akciğer kanseri olgusu, 13.462 akciğer kanserine bağlı ölüm bildirilmiştir. Kadın populasyonda ise 1784 yeni tanı almış akciğer kanseri olgusu 1639 akciğer kanserine bağlı ölüm olgusu rapor edilmiştir.(21)

Akciğer kanseri gelişimi için en önemli risk faktörü tütün kullanma alışkanlığıdır. Akciğer kanseri gelişiminden %94 oranında tütün mamülleri sorumludur. Tütün kullananlarda akciğer kanseri riski kullanmayanlara oranla 24-36 kat daha fazladır. Pasif maruziyette bu oran %3.5’tur. Sigaraya başlama yaşı , sigara içme süresi, içilen sigara sayısı, içilen tütün mamülünün tipi akciğer kanseri gelişme riskini etkiler. Sigara dumanı gaz ve küçük parçacıklar şeklinde 4000’den fazla farklı madde içeren kompleks bir yapıdır. Bu yapının 400’u gaz yapısındaki maddedir ve bunların birçoğunun karsinojen olduğu gösterilmiştir. Tütün mamüllerinde bağımlılığa sebep olan asıl madde nikotindir. Sigara dumanından su ve nikotin ayrıştırıldıktan sonra kalan kısma katran denir ve kanser

gelişimindeki temel risk faktörü katran maruziyetidir. WHO IARC tarafından sigara dumanındaki katranda tanımlanmış 82 adet karsinojen vardır. Bu maddelerin başlıcaları polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitrozaminlerdir. Bu karsinojenler deoksiribonükleik asit (DNA) yapısına kovalen bağ ile bağlanabilmektedir. Karsinojenik maddelerin etki mekanizmaları temelde, maddelerin abzorbsiyonu, metabolize edilmeleri, hedef hücrede birikmeleri ve metabolik olarak aktive edilmeleri yoluyla olmaktadır. Burada mutajenlere kişilerin verdiği yanıtlardaki farklılığı sağlayan genetik alt yapı ve bunların ürünleri olan proteinler yani metabolitlerin aktivasyonunda rol alan enzimlerdir (sitokrom P-450, Glutasyon S-Transferaz, asetilleyici enzimler, lipoksijenazlar, sikloksijenazlar, myeloperoksidazlar). Bu karsinojen maddeler genellikle DNA üzerinde adenin yada guanin üzerine bağlanarak mutasyonlara sebep olur. Mutasyonlar normal onarım mekanizmalarıyla onarılır yada bu başırlamazsa hücrede apoptoz ile programlanmış hücre ölümü gerçekleşir. Ancak onarım mekanizmasındaki aksamalar DNA'da kalıcı mutasyonlara sebep olur. Bu kalıcı mutasyon DNA sarmalında onkogen yada tümör supresör gen loküsünde gerçekleşirse onkojenik süreci başlatabilir.

Tütün kullananlarda en sık görülen ve tanımlanmış mutasyon kras mutasyonudur. Ras genlerinde onkojenik mutasyonlar gerçekleştiğinde GTP-az aktivitesinde bozukluk meydana gelmektedir. GTP-az aktivitesi hücre büyümesi, hücre farklılaşması, programlı hücre ölümü ile ilgili düzenleyici görevler yapmaktadır. Tüm kanserlerin %30'unda ras mutasyonları saptanmıştır ve özellikle akciğer adenokarsinomlarında ras mutasyonları mevcuttur. Akciğer adenokarsinomu tanısı almış olgular sigara kullanımını bıraksalarda kras onkogen aktivasyonu onkojenik süreci devam ettirmektedir.

Sigara kullanımıyla ilişkilendirilmiş bir diğer mutasyon p53 tümör supresör genindeki inaktivasyondur. p53 geni hücre döngüsünde kilit basamağı kontrol etmekte ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde %70, küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde %50 oranında mutasyonu saptanmıştır. Ayrıca sigara dumanındaki oksijen radikalleri DNA hasarı yaparak, Arilhidrokarbon hidroksilaz enzimide polisiklik hidrokarbonları karsinojenik epoksitlere çevirerek karsinojenik etki göstermektedir.

Akciğer kanserleri için diğer önemli risk faktörleri yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalığı sekeli, diyet, viral enfeksiyonlar, immünolojik faktörlerdi. Akciğer kanserleri görülme sıklığı yaşla artmakta, 6.-7.

Dekadlarda pik yapmaktadır. Ülkemizdeki akciğer kanseri özelliklerini belirlemek amacıyla Toraks Derneği tarafından yapılan ulusal, hastane bazlı retrospektif çalışmada 11849 akciğer kanserli olgunun %90,4'ü erkek, %9.6'sı kadın cinsiyette olduğu saptanmıştır.(23) Asbest, kadmiyum, nikel, krom gibi bazı meslek gruplarında maruziyetin fazla olduğu maddeler ve radyasyon akciğer kanseri riskini artırdığı saptanmıştır. Asbest maruziyetinde bu risk 5 kat artış gösterirken, sigara ile birlikte olduğunda risk 50-100 kat artar. Maden işçilerinde görülen radon gazı maruziyetinde risk 20 kat artmaktadır. Tüberküloz, intersitisyel akciğer hastalıkları, bronşiektazi, pnömoni, abse, pulmoner emboli, idiopatik pulmoner fibrozis gibi akciğerde sekel değişiklikler yapan hastalıklarda skar zemininden akciğer kanseri gelişme riski yüksektir.

Akciğer kanserlerinde Tanı

Semptom ve Bulgular

Akciğer kanseri çoğunlukla akciğer radyografisinde anormal bir bulgu, yeni ortaya çıkan yada önceden var olupta karakter değiştiren klinik bulgu veya semptom ile kendini gösterir. Akciğer kanserli olguların %90'ından fazlası tanı döneminde tümörün lokal, bölgesel, metastatik veya sistemik etkilerinden dolayı semptomatiktir. Akciğer kanserinde tümörün yerleşim yerine, tümörün toraks ve uzak organ yayılımına bağlı ortaya çıkan semptom, bulgular değişik oranlarda karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu semptomlar aşağıdaki tabloda görülme sıklığına göre sıralanmıştır.(tablo-1) akciğer kanseri tanısında hastanın kliniği ve fizik muayene bulguları yanında, radyolojik görüntüleme ve invaziv tanı yöntemleri önemli bir yer tutmaktadır.

Tablo 1

Primer tümörün büyümesine bağlı semptom ve bulgular

Öksürük
Hemoptizi
Nefes darlığı
Atelektazi
Plevral-perikardial sıvı
Stridor
Lokalize ronküs
Segmental amfizem
Tekrarlayan veya rezolüsyonu gecikmiş pnömoni

Tümörün intratorasik yayılımına bağlı semptom ve bulgular

Omuz, kol ağrısı
Kol, el kaslarında atrofi
Kaslarda güçsüzlük
Tek taraflı enoftalmi
Pitozis
Miyozis
Aynı taraf yüz ve üst ekstremitede anhidrozis
Vena kava superior sendromu (yüz ve boyunda ödem, kollateral venöz genişlemeler)
Ses kısıklığı
Göğüste ağrı (göğüs duvarı invazyonuna bağlı)
Frenik sinir felcine bağlı hemidiafragma yüksekliği
Radyografik olarak kosta destrüksiyonu

Tümörün ekstratorasik yayılımına bağlı semptom ve bulgular

Lokalize kemik ağrısı
Serum kalsiyum, ALP yüksekliği
Sertleşmiş ve sıklıkla nodüler yüzeye sahip karaciğer büyümesi
Karaciğer enzimlerinde yükseklik
Ciltte ağrısız iyi sınırlı lezyonlar
Bulanık görme ve uçuşan lekeler görme
Epigastrik ağrı
İştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı, ateş
Anemi

Paraneoplastik sendromlar

Endokrinolojik sendromlar; Cushing sendromu Uygunsuz
ADH sendromu Jinekomasti Nonmetastatik hiperkalsemi
Nörolojik sendromlar; eaton Lambert, Subakut duyusal
nöropati Mononöritis multipleks
Parmaklarda çomaklaşma, hipertrofik osteoartropati, trousseau sendromu

Akciğer kanserinin tanısında görüntüleme yöntemleri

Akciğer kanseri tedavisinde en sık kullanılan ilk basamak görüntüleme yöntemi direk akciğer grafisidir. Genel yaklaşım olarak akciğer grafileri yorumlanırken hastanın eski grafileri ile karşılaştırma yapmak önemlidir. Uygulaması ucuz ve her merkezde bulunması nedeniyle sık başvurulmuş bir yöntem olmakla birlikte büyük çaplı nodül ve kitleler bile tanı anında atlanabilmektedir. Ayrıca anatomik olarak kör noktalar denen bölgelere yerleşen lezyonlarda da hata yapılabilmektedir. Bu açıdan direk grafileri doğru tekniklerle değerlendirmek ve şüpheli durumlarda hastadan toraks bt istemek önemlidir.

Toraks Bilgisayarlı tomografi (BT) akciğer kanserinin tanısında temel görüntüleme yöntemidir. Primer tümörün büyüklüğü, intratorasik yapılarla olan anatomik ilişkisi ve lokalizasyonunu değerlendirerek “T” faktörünü evrelemede, mediastinal lenf nodlarını morfolojik olarak değerlendirerek “N” faktörünü evrelemede kullanılmaktadır. Aynı zamanda diğer parankimal lezyonların ve plevra boşluğunun durumu hakkında bilgi sağlar. Kontrastlı Bilgisayarlı Tomografi, mediastinal lenf nodu büyüklüğünü değerlendirmede çok doğru sonuçlar vermesine rağmen, lenf nodu büyüklüğüne göre yapılan evreleme yeterli doğruluğa ulaşamamaktadır. Yapılan çalışmalarda küçük lenf nodlarında %20’ye ulaşan oranlarda metastaz görülebileceği ve büyümüş lenf nodlarının da benign olabileceği gösterilmiştir.(24) Lenf nodu kısa çapının 1 cm’ den büyük olmasının metastaz açısından şüpheli olarak değerlendirilmesi genel kabul edilen görüştür. Bu tanımlama toraks BT’nin yalancı negatiflik oranlarını azaltmaktadır. Toloza ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yayınlanan meta-analizde, toraks BT’ nin mediastinal lenf nodu evrelemesinde duyarlılığı %57, özgüllüğü %82, negatif öngörü değeri (NÖD) %83 ve pozitif öngörü değeri (PÖD) %56 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar mediastinal evreleme için toraks BT’nin günümüzde yeterli sonuçlar vermediğini göstermektedir.(25)

Toraks manyetik rezonans görüntüleme (MRG) akciğer kanserinin tanısında ve evrelemesinde kullanılan yöntemlerden bir diğeridir. Toraks MRG’de lenf nodu metastazı, BT’ de olduğu gibi lenf nodu çapının artması ile değerlendirilmektedir. Toraks MRG’nin toraks BT’ye göre bir avantajı, hızlı kan akımına sahip damarların lenf nodlarına göre daha farklı bir sinyal vermesidir. Bu özelliğinden dolayı hiler lenf nodunu hiler vasküler yapılardan ayırmada daha üstündür. Koronal ve sagittal kesitlerde aortikopulmoner ve subkarinal lenf nodlarının büyümesini daha iyi göstermektedir .(26) Radyolojik Onkoloji Tanı Grubu Radiology ‘Diagnostic Oncology Group’ (RDOG) tarafından yapılan

çalışmada akciğer kanseri evrelemesinde mediasten ve süperior sulkus tümörleri dışında BT ve MRG'nin doğruluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Akciğer kanserinin klinik evrelendirilmesinde MRG' nin yararlı olduğu özel durumlar; Süperior sulkus tümörleri, göğüs duvarı invazyonu, mediasten invazyonu, tümörün spinal kanala ve sinirlere yakınlığını (rekürren laringeal sinir, brakiyal pleksus) belirleme, vertebra korpuslarını değerlendirme, kalbe komşu tümörlerde perikard tutulumu (T3) ile miyokard tutulumunu (T4) belirleme, İV kontrast maddeye gerek olmadan süperior vene kava, aort, pulmoner arter ve komşu mediastinal yumuşak doku invazyonunu değerlendirme, aortikoopulmoner pencere, subkarinal ve hiler bölgeyi (özellikle koronal ve sagittal kesitlerde) değerlendirme ile kardiyofrenik açığa yerleşmiş ve alt lob medialde yer alan tümörleri değerlendirme şeklinde özetlenebilir.

Pozitron Emisyon Tomografisi (PET), invivo biyolojik, fizyolojik ve patolojik süreçlerin görüntülenmesine dayanan invazif olmayan bir görüntüleme yöntemidir. Onkolojik olarak akciğer kanserlerinde toraksın ve tüm vücudun tümör taramasının yapılmasına olanak sağlar. PET'de en sık kullanılan farmasötik ajan 2 flourine-18 flouro-2-deoxyglucose'dur(FDG). F-18 FDG, tümör hücrelerinde glükoz kullanımının görüntülenmesini sağlayan bir radyofarmasötiktir.(27-28) Akciğer kanserinde PET'in kullanım endikasyonları; soliter pulmoner nodüllerin benign-malign ayırıcı tanısı, evreleme, tedaviye yanıtın gösterilmesi, tekrarlayan kanser odağının gösterilmesi ve prognoz faktörlerin belirlenmesidir. PET görüntüleri, görsel olarak değerlendirilir. Bu değerlendirmede normal biyodağılım dışında geri plan ve çevre doku aktivitesine göre artmış FDG tutulumu gösteren odaklar, malignite şüpheli olarak yorumlanır. Ayrıca semi kantitatif değerlendirme için maksimum standart "uptake" value (SUV- max) adı verilen bir parametre kullanılır. Bu arada ilgili birim alandaki aktivite miktarı enjekte edilen doza ve hastanın vucut ağırlığına göre normalize edilerek, sayısal bir indeks oluşturulur. SUV-max değerinin 2.5 ve üzerinde olması akciğer ve mediasten lezyonlarında malignite olasılığını arttırır. (29)

Akciğer kanserinde invaziv tanı yöntemleri

Akciğer kanserlerinde doku tanısına ulaşmak için minimal invaziv yöntemlerden, açık cerrahi yaklaşımlara kadar bir çok yöntem kullanılmaktadır. Fiberoptik bronkoskopi, akciğer kanserinin tanısı ve evrelemesi için rutin olarak tüm olgulara yapılan minimal

invaziv bir yöntemdir. Fiber optik bronkoskopi sırasında endobronşiyal tümör, bronşiyal lümeni kısmen veya tamamen tıkayan egzofitik kitle lezyonu şeklinde olabileceği gibi submukozal veya peribronşiyal hastalık şeklinde de olabilir. Bu tip lezyonlardan patolojik tanı alma şansı daha yüksektir. Periferik yerleşimli akciğer kanserlerinde ise endoskopik olarak bir bulgu tespit edilemeyebilir.(30)

Akciğer kanserinin tanısında ve evrelemesinde kullanılan yöntemlerden bir diğeri transözofageal ultrason (EUS) ya da transbronşiyal ultrasondur (EBUS). Bu yöntem ultrasonografik görüş altında lenf nodlarını lokalize etmek suretiyle, iğne biyopsisi alınması esasına dayanır. Modifiye edilmiş bir endoskobun ucuna yerleştirilen transduser yardımı ile 3mm'ye kadar küçük olan lenf nodları bile değerlendirilebilir. EBUS-İA ile superior mediastinal lenf nodları ve 7 numaralı istasyondan, EUS-İA ile başlıca 4L, 5 ve 7 nolu mediastinal lenf nodları ile inferior mediastinal 8 ve 9 nolu istasyonlardan biyopsi alınabilmektedir.

Günümüzde akciğer kanserinde mediastinoskopi evreleme ve tanı amaçlı mediastinal lenf nodlarının değerlendirilmesinde, iyi bir eksplorasyon alanı sağlaması, minimal invaziv ve efektif olması, histopatolojik inceleme için çok sayıda ve yeterli büyüklükte doku biyopsisi alınmasına imkan sağlaması, morbidite ve mortalitesinin düşük olması, uygulamasının kolay ve maliyetinin düşük olması nedeni ile altın standart yöntemdir .(31) Carls ilk kez 1959 yılında standart servikal mediastinoskopiyi (SSM) tanımlamıştır.(32) Kirschner tarafından tanımlanan ekstended servikal mediastinoskopi (ESM), sol akciğer tümörlerinde, subaortik ve paraaortik lenf nodlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.(33) Mediastinoskopi insizyonundan aynı seansta uygulanabilen bu işlem Ginsberg tarafından popüler hale getirilmiştir.(34) SSM ile 1, 2R, 2L, 4R, 4L numaralı istasyonlardan biyopsi alınabilmektedir. ESM ise, 5 ve 6 numaralı aortik lenf nodu istasyonlarına ulaşmada kullanılmaktadır. SSM ile kaç lenf nodu istasyonundan örneklem yapılması gerektiğine dair uluslararası kabul edilmiş bir öneri bulunmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalar özetlendiğinde, ideal olarak 2R, 2L, 4R, 4L ve 7 nolu istasyonların explore edilmesi ve biyopsi alınması önerilmektedir. Avrupa Göğüs Cerrahisi Cemiyeti'nin (ESTS) çalışma grubunun önerisi, 4R, 4L ve 7 nolu istasyonların örneklenmesi, ek olarak mevcutsa üst paratrakeal lenf nodlarının örneklenmesi şeklindedir.(35) Mediastinoskopinin yalancı negatif sonuçlarını azaltmak için videomediastinoskopik yöntemler; VAMLA (Video assisted mediastinoskopik

lenfadenektomi) ve TEMPLA (Transservikal ekstended mediastinal lenfadenektomi) geliştirilmiştir. Her iki teknikte komplet bilateral lenfadenektomi amacı taşır. VAMLA ile 2, 4, 7 ve 8 nolu istasyonların, TEMPLA ile 1, 2, 3A, 3P, 4, 5, 6, 7 ve 8 nolu istasyonların eksizyonu yapılabilmektedir. Her iki tekniğin de potansiyel avantajı, mikrometastazların yol açabileceği yalancı negatif mediastinoskopi sonuçlarının önlenmesi ve daha doğru sonuçlar alınmasıdır. Mediastinoskopi tekniklerine ek olarak Mc Neill ve Chamberlain tarafından ilk defa tanımlanan sol parasternal mediastinotomi ya da Chamberlain yönteminde mediastende eksplorasyon ve biyopsi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca VATS ile tüm mediastinal lenf nodlarından ve periferik akciğer tümörlerinden örnekleme yapılabilmektedir. Genellikle SSM ile ulaşılamayan, aortik lenf nodları (5 ve 6) ile inferior mediastinal 8 ve 9 nolu lenf nodlarının değerlendirilmesinde alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Özellikle 8 ve 9 nolu lenf nodu pozitifliğinin mevcut invaziv cerrahi yöntemlerle tespit edilememesi VATS' in evrelemede en değerli olduğu alandır.

Patolojik Sınıflama

Günümüzde akciğer kanserlerinin patolojik sınıflandırması için Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2004'de tanımladığı sınıflama kullanılmaktadır. Sınıflamada tümörün morfolojik özellikleri, konvansiyonel ışık mikroskopundaki özellikleri, immünohistokimyasal, moleküler ve genetik özellikleri temel alınmaktadır. (36) Klinik açıdan tedavide belirgin farklılıklar olması nedeniyle akciğer karsinomları ilk olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak iki ana gruba ayrılmıştır. Fakat temelde 8 histopatolojik alt tip vardır. (Tablo-2) Bu histopatolojik alt tiplerden Amerika Birleşik Devletleri ve Japonyada en sık adenokarsinom saptanırken, Ülkemizde(%45) ve Avrupa Kıtasında en sık skuamöz hücreli karsinom görülmektedir.

Tablo 2

2004 WHO klasifikasyonuna gore akciğer malign epitelyal tümörleri
1.Skuamöz hücreli karsinom
2.Küçük hücreli karsinom
3.Adenokarsinom
4.Büyük hücreli karsinom
5.Adenoskuamöz karsinom
6.Sarkomatooid karsinom
7.Karsinoid tümör
8.Tükürük bezi tipi karsinomlar

Son dönemde akciğer kanseri tedavisinde hastaya özel yaklaşımların gündeme gelmesiyle patolojik alt tiplendirme ve moleküler çalışmalar çok daha önemli hale gelmiştir. Bu açıdan patolojik olarak akciğer kanserlerini küçük hücreli akciğer kanseri yada küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak tanımladıktan sonra mutlaka doğru histopatolojik alt tiplendirme yapılmalıdır. Bu amaçla histopatolojik alt tiplendirme sırasında konvansiyonel ışın mikroskopuna ek olarak kesin tanıya ulaşabilmek için immünohistokimyasal tanı yöntemleri standart hale getirilmiştir. skuamöz hücreli karsinom tanısı, hücrelerin p63 CK5-CK6 ekspresyonu göstermesi ile desteklenmektedir. tümör hücrelerinin TTF-1 ile immünohistokimyasal olarak pozitiflik göstermesi adenokarsinom lehinedir ve skuamöz hücreli karsinom ile ayırıcı tanısı açısından çok önemlidir. Küçük hücreli akciğer kanseri Ki-67 ekspresyonundaki yükseklik ile karsinoid tümörlerden, p16 antikor ekspresyonundaki yükseklik ile küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinden ayırıcı tanısı yapılmaktadır. Histopatolojik alt tiplendirme için kabuledilen en iyi panel ikili (p63/TTF-1) ve dördü (TTF-1, napsin A, p63, CK5/6) antikorlarıdır.

Doğru histopatolojik alt tiplendirme sonrası moleküler analizler ile belirli alt gruplar için tanımlanmış genetik mutasyonlar saptanarak, hedefe yönelik kemoterapi ajanının seçilmesinin, tedavi etkinliğini artıracakı düşünülmüştür. Bu amaçla skuamöz hücreli kanserlerde FGFR, DDR-2, IGF-2 vb. moleküller çalışılmış, adenokarsinomlarda

yada spesifiye edilmemiş KHDAK' lerinde EGFR ,EMLK4/ALK, K-ras vb. mutasyonlar üzerine çalışmalar yapılmıştır.

1999 ve 2004 yıllarında Dünya Sağlık Örgütü tarafından kabul edilen patolojik sınıflandırmaya ek olarak adenokarsinomların ayrıca sınıflandırılması için 2012 yılında Journal of Thoracic Oncology dergisinde yayımlanan bir makalede Uluslararası akciğer kanser araştırma birliği/ Amerikan Toraks Derneği ve Avrupa Solunum derneklerinden (IASLC/ATS/ERS) mültidisipliner bir uzman grubu tarafından yeni bir öneri getirilmiştir. (tablo-3) Yeniliklerden bir tanesi bronkoalveoler karsinom (BAK) teriminin oldukça geniş bir tümör grubunu kapsamı içine alması nedeniyle artık kullanılmamasıdır. Eski adıyla bronkoalveoler karsinom aşağıda tanımlanan beş gruba ayrılmıştır (tablo-4)

Tablo 3.

IASLC/ ATS/ ERS Rezeke edilen spesmenlerde akciğer adenokarsinoma sınıflaması
Preinvazive lezyonlar
Atipik adenomatöz hiperplazi
Adenokarsinom in situ
Minimal invaziv adenokarsinom (Nonmüsinöz, Müsinöz, Miks tip)
İnvaziv adenokarsinom
Lepidik predominant
Aciner predominant
Papiller predominant
Micropapiller predominant
Müsin üreten solid predominant
İnvaziv adenokarsinomun varyantı
İnvaziv müsinöz adenokarsinom
Kolloid
Fetal
Enterik

Histolojik paternlerin semikantitatif %5'lik dilimler halinde değerlendirilmesi ile tek bir predominant pattern seçilerek kapsamlı bir histolojik alt tiplendirme yapılması görüşü benimsenmiştir. İncelemeyi yapan kişinin tek bir histolojik pattern'e odaklanmak yerine mevcut olan bütün patternleri saptamasına olanak verilmiş, böylece her bir tümör hem baskın patternine göre sınıflandırılmış ve alt tipler de yüzdelere göre belirtilmiştir. Bu sınıflamadaki başlıca histolojik patternler: lepidik (alveol duvar yüzeyi boyunca tip II pnömositlerin ve Clara hücrelerinin proliferasyonu), asiner (fibroz stromayı invaze eden yuvarlak-oval şekilli) patternlerdir. (tablo-4)

Yeni tanımlanan IASLC/ATS/ERS histolojik sınıflandırmasında gruplar arasında prognoz açısından anlamlı farklar olduğu ($p=0.038$) çok değişkenli analizlerle kanıtlanmıştır. Bu amaca yönelik çalışmada Russel ve arkadaşları evre I, II, ve III akciğer adenokarsinomlu 210 Avusturalya'lı hastadan oluşan bir seride yeni sınıflandırma ve hasta sağkalımı arasındaki ilişkiyi retrospektif olarak araştırmıştır. Mikropapiller predominant ve müsin predominant solid adenokarsinomlarda sağkalım oranları belirgin bir şekilde kötüyken; AIS, MIA ve lepidik predominant adenokarsinomların %100'e varan 5 yıllık sağkalım oranlarına sahip olduğu doğrulanmıştır. Papiller predominant ve asiner predominant adenokarsinomlar prognozu orta derecede olan gruplardır. Evreler kontrol edildikten sonra sınıflandırmanın prognostik etkisi en son olarak Warth ve arkadaşlarının 500 hastalık geniş kohort çalışması ile doğrulanmıştır. Evre I'den IV'e rezeksiyon yapılan adenokarsinomlu hastaların yapısal patternleri retrospektif olarak incelenmiş ve pulmoner adenokarsinomların yeni IASLC/ATS/ERS şemasına uygun olarak evrelemenin hasta prognozu açısından hızlı, basit ve etkin bir ayırt edici faktör olduğu ve adjuvant kemoradyoterapi için hastaların sınıflandırılmasında katkısı olabileceğini gösterilmiştir. Bu sınıflama adenokarsinom tedavisinin daha da geliştirilmesi için bir bütünlük halinde çalışan klinik, morfolojik ve moleküler alt tiplendirmenin ayrılmaz bir parçası olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.

Adenokarsinom in situ
Minimal invaziv adenokarsinom
Lepidik predominant adenokarsinom (nonmüsinöz)
Adenokarsinom, predominant invaziv non müsinöz lepidik component ile birlikte
İnvaziv müsinöz adenokarsinom (eskiden müsinöz Bronkoalvelar karsinom olan)

Akciğer Kanserlerinde evreleme

Akciğer kanserinin tedavisinde ilk adım hastaların doğru bir şekilde evrelemesinin yapılmasıdır. Primer tümörün boyutu (T), bölgesel lenf nodları (N) ve uzak organ tutulumlarına (M) dayalı akciğer kanserinin sınıflandırıldığı ilk sistem Denoix tarafından 1946 yılında tanımlanmıştır.(37) 1966 yılında Uluslar Arası Kanseri Birliği ‘ International Union Against Cancer’ (UICC) adlı kuruluşun TNM Sınıflandırma Komitesi, akciğer kanserli olguların evrelendirilmesinde TNM sisteminin kullanılmasını önermiştir. Bu evreleme sistemine göre, akciğer kanseri sınıflaması, Evre 1, Evre 2 ve Evre 3 olmak üzere, 3 evreye ayrılmıştır.(38) Bu dönemdeki sınıflamada T4 ve N3 henüz tanımlanmamıştır. 1986 yılında akciğer kanseri evrelemesinde revizyon yapılmış ve evreleme sistemine T4, N3 ve “evre 4” ilave edilmiştir. Evre 3 ise, 3A ve 3B olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Önceki evrelendirmeye göre, evre 1 olarak kabul edilen T1N1M0 ise evre 2 olarak kabul edilmiştir. Primer tümör ile aynı lobda bulunan satellit nodülün T kriterini bir derece arttırmasına, aynı akciğerde olan ancak başka bir lobda bulunan satellit nodülün ise T4 olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir.(39) Amerikan Kanseri Birliği (AJCC) ve “Union Internationale Contre le Cancer “ tarafından, 1997 yılında akciğer kanseri evrelemesinde yeniden düzenleme yapılmış ve bu değişiklikler Mountain tarafından yayınlanmıştır. (40) Evre 1 evre 1A ve 2B olarak, evre 2 ise evre 2A ve evre 2B olarak ayrılmıştır. T3N0M0 evre2B’ye alınmış, aynı lobdaki satellit nodül T4 olarak, farklı lobdaki satellit nodül ise M1 olarak kabul edilmiştir. Son olarak Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü (IASCL) tarafından 2009 yılında, Uluslararası Kanseri Mücadele birliği (UICC) ve Amerikan Kanseri Birliği (AJCC) tarafından tanımlanan son evreleme sistemi kabul edilmiştir. (tablo-5) (tablo-6)

Tablo 5. Yeni akciğer kanseri evreleme sistemi

T: Primer tümör
Tx: Primer tümör değerlendirilemedi ya da balgam sitolojisinde veya bronşiyal lavajda malign hücreler tespit edildi ancak görüntüleme yöntemleriyle veya bronkoskopi ile gösterilemedi.
TO: Primer tümöre ait bir bulgu yok.
T1: Tümörün en büyük çapı 3cm veya daha küçük, akciğer veya visseral plevrayla çevrilmiş, bronkoskopide lobar bronştan dalıa proksimale ulaşmamış (ana bronшта tümör yok). T1a: Tümörün en büyük çapı 2cm veya daha küçük T1b: Tümörün en büyük çapı 2cm'den daha büyük fakat 3cm'e eşit veya daha küçük
T2: Tümörün en büyük çapı 3cm den büyük fakat 7cm den daha büyük değil; veya tümör aşağıdaki durumlardan birine sahip • Karinadan 2cm veya daha uzak noktada ana bronş tutulmuş • Visseral plevra invazyonu var • Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni T2a: Tümörün en büyük çap 3cm den daha büyük fakat 5cm e eşit veya daha küçük T2b: Tümörün en büyük çapı 5cm den daha büyük fakat 7cm e eşit veya daha küçük
T3: Tümörün çap 7cmden büyük veya aşağıdaki aşağıdaki durumlardan birine sahip • Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diyafragma. frenik sinir, mediastinal plevra. parietal perikard invazyonu • Tümör ana bronшта karinayı tutmadan 2cm den daha yakın mesafede • Akciğerin tamamın, kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni • Tümörle aynı lobta satellit nodül
T4: Aşağıdaki yapıları invaze eden herhangi bir büyüklükteki tümör • Mediasten, kalp, büyük damarlar trakea. rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra gövdesi karına • Primer tümörle aynı akciğerde fakat ayrı lobta satellit nodül.
N: Bölgesel lenf nodları
Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
NO: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1: İpsilateral peribronşial ve/veya ipsilateral hiler ve intrapulmoner lenf nodlarında metastaz
N2: ipsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarında metastaz
N3: Kontralateral mediastinal ve/veya hiler, ipsilateral ve/veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf nodlarında metastaz
M: Uzak metastaz
MO: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz var M1a: Kontralateral akciğerde metastatik nodül: malign plevral veya perikardial effüzyon veya plevrada tümör nodülleri M1b: Uzak organ metastazı

Tablo 6. Yeni evreleme sistemindeki TNM sistemi

Gizli karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a, b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Evre IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1a,b, T2a,b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Evre IIIB	T4	N2	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a, b

2009 yılı Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü (IASCL) akciğer kanseri TNM sınıflamasında bir önceki evrelemede göre yapılan değişiklikler başlıca şunlar olmuştur; tümör boyutuna göre T1 ve T2 tümörlerde eşik değer 2-5-7 cm olarak belirlenmiş, T1 tümörler 2cm altı ile üstü olmak üzere T1a ve T1b olarak ikiye ayrılmıştır. 3 cm üzerinde T2 olarak adlandırılan tümörler 5cm eşik değeri altı ve üstü T2a T2b sınıflandırılmıştır. 7 cm üzerindeki tümörler yeni sınıflamada T3 olarak belirlenmiştir. Satelit nodül varlığına göre , primer tümör ile aynı lobdaki nodül T3, aynı akciğer farklı lobdaki nodül T4 olarak kabul edilmiştir. Karşı akciğerde mevcut nodüller M1a olarak kabul edilmiştir. Plevral ve/veya perikardial effüzyon içeren olgular T4 yerine M1a olarak kabul edilmiştir. Uzak metastaz nedeniyle M1 olgular, M1a olarak sınıflanmıştır.

Resim-1: N2 lenf nodları

No:1 (En üst mediastinal)

Sol brakiosefalik venin üst kenarının, trakeanın orta hattını çaprazladığı noktadan geçen horizontal hattın üzerinde kalan lenf nodları

No:2 (Üst paratrakeal)

1 nolu lenf nodlarının alt sınırının altında ve aort kavsinin üst kenarından geçen horizontal hattın üzerinde kalan lenf nodları

No:3 (Prevasküler/retrotrakeal) Tümör ile aynı taraf olduğu kabul edilen orta hat lenf nodları

No:4 (Alt paratrakeal)

Sağda: Trakea orta hattının sağında; aort kavsinin üst kenarından geçen hattın altında, üst lob bronşunun en üst kenarı hizasına kadar ana bronşu da kapsayan alanda yer alan ve mediastinal plevra içerisinde kalan lenf nodlarıdır.

Solda: Trakea orta hattının solunda, aort kavsinin üst kenarından geçen hattın altında, üst lob bronşunun en üst kenarı hizasına kadar ana bronşu da kapsayan ligamentum arteriosumun solundaki alanda yer alan ve mediastinal plevra içerisinde yer alan lenf nodlarıdır.

No:5 (Subaortik) Ligamentum arteriosumun ya da aortanın ya da sol pulmoner arterin lateralinde, sol pulmoner arterin ilk dalının proksimalinde ve mediastinal plevra içerisinde yer alan lenf nodlarıdır.

No:6 (Para-aortik) Çıkan aortanın ve aort kavsinin ya da brakiosefalik arterin önünde ve yanında yer alan lenf nodlarıdır. Üst sınır aort kavsinin üst kenarı hizasındadır.

No:7 (Subkarinal) Karinanın alt seviyesinde yer alan lenf nodlarıdır.

No:8 (Paraözefagial) Özefagusa komşu lenf bezleridir, subkarinal nodlar hariç.

No:9 (Pulmoner ligament) Pulmoner ligamentin içerisindeki lenf nodlarıdır. Posterior duvarda ve inferior pulmoner venin alt bölümünde yer alır.

N1 lenf nodları

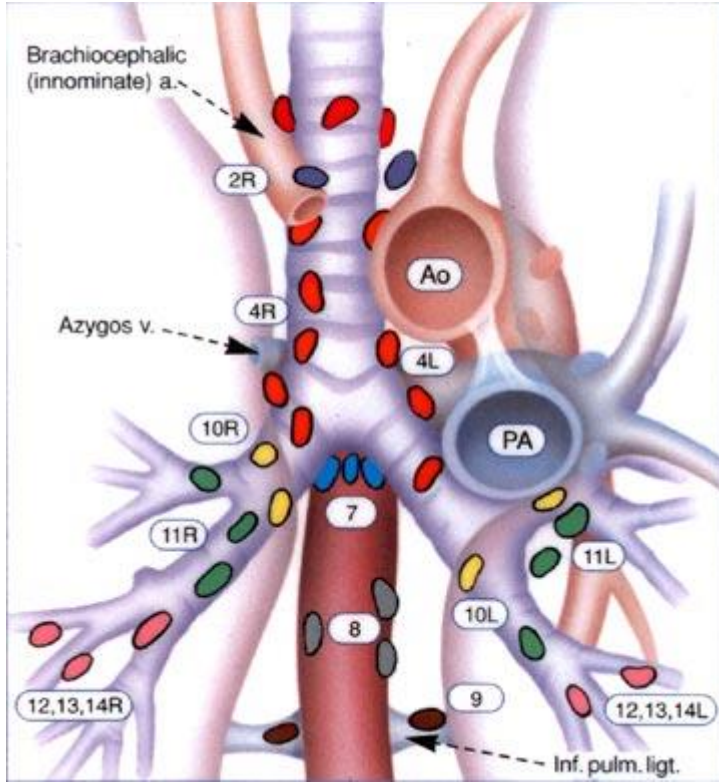
No:10 (Hiler) Mediastinal plevranın distalinde lob bronşları ayrılmadan önceki alanda yer alan, sağda intermedier bronşa kadar uzanan proksimal lobar lenf nodlarıdır.

No:11 (interlober) Lober bronşları arasında kalan lenf nodlarıdır.

No:12 (Lober) Lober bronşların distalindeki lenf nodlarıdır.

No:13 (Segmental) Segment bronşuna komşu lenf nodlarıdır.

No:14 (Subsegmental) Subsegment bronşu çevresindeki lenf nodlarıdır.(41)



Resim 1

Akciğer Kanserlerinin Tedavisi

Akciğer kanserlerinin tedavisi tümörün histopatolojik tipi (küçük hücreli veya küçük hücreli dışı olması), hastanın fizyolojik durumu (yaş, fizyolojik akciğer kapasitesi, komorbid hastalıklar) ve hastalığın evresine bağlıdır. Bu durumlara bağlı olarak akciğer kanserinin tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi yada bunların kombine edildiği tedavi yaklaşımları kullanılabilir. Hastaların optimal değerlendirilmeleri ve tedavileri multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Bu disiplinler göğüs hastalıkları, göğüs cerrahisi, medikal onkoloji, radyasyon onkolojisi, radyoloji ve patolojidir. Akciğer kanserleri klinik rutinde radyolojik ve invaziv yöntemlerle evrelendirilmekte ve tanı anında olguların evreleri değişiklik göstermektedir. (tablo-7) (42) Mediastinal lenf nodunda tutulum saptandığında, olgu evre 3 olarak sınıflandırılmaktadır. 2994 olgulu bir çalışmada

operasyon öncesi dönemde mediasten lenf nodu saptanmayan olguların operasyon sonrası patolojik incelemelerinde %47 oranında mediastinal lenf nodu tutulumu saptanmıştır. (43) Bu açıdan olguların operasyon öncesi doğru evrelendirilmesi, doğru tedavi yaklaşımı açısından kritik önem taşımaktadır.

Akciğer karsinomlarının evre 1, evre 2 tümörlerinin tedavisinde standart yaklaşım, cerrahi olarak tümörün ilgili akciğer dokusuyla beraber çıkartılması ve hiler, mediastinal lenf bezi diseksiyonu ile tam rezeksiyondur.(44) Tercih edilen rezeksiyon tipi lobektomidir, gerekirse daha geniş rezeksiyon yapılabilir.(45) Pulmoner rezervi sınırlı olgularda, segmentektomi, wedge rezeksiyon düşünülebilir. Mediastinal lenf nodu diseksiyonu rutin olarak uygulanmalıdır. Uygun olgularda sleeve rezeksiyonlar, pnömonektomiye tercih edilmelidir. (44) Tam olarak rezeke edilmiş evre 1 hastalıkta radyoterapi (RT) ve sistemik kemoterapi (KT) önerilmez. (46-47) Tam olarak rezeke edilemeyen olgularda, olgunun kontraendikasyonu yoksa tamamlayıcı cerrahi, olgu medikal açıdan inoperabil ise ve operasyonu kabul etmiyorsa torasik radyoterapi uygulanır. (48)

Evre 2 olgularda da hastanın medikal inoperabilitesi yoksa ilk tedavi yaklaşımı cerrahidir. Opere olan Evre 2 olgularda yeni platin kombinasyonları ile adjuvan KT uygulamasının yararı konusunda deliller bulunmaktadır. (49-50) Medikal inoperabl olan ya da operasyonu kabul etmeyen olgularda torasik RT uygulanabilir. (48) Göğüs duvarı tutulumu, mediastinal plevra, mediastinal yağ dokusu, perikard ve ana bronş tutulumu nedeniyle T3 olan olgularda tam rezeksiyon sağlandıysa lenf nodu tutulumu yoksa adjuvan radyoterapi tedavisine gerek yoktur. Bu olgularda 5 yıllık sağ kalım %40 oranındadır. (51) Cerrahi sınır pozitifliği mevcut olgularda radyoterapi endikasyonu vardır. (52) T3 olguların özel bir durumu olarak pancoast tümörlerin, uzak metastaz yada mediastinal lenf nodu tutulumu yoksa cerrahi açıdan değerlendirilmesi uygundur. Major vasküler tutulum, vertebra korpusu ile derin brakial pleksus invazyonu, mediastinal lenf nodu tutulumu ve horner sendromu negatif prognostik faktörlerdir ve bu durumlarda seçilmiş olgular hariç cerrahi düşünülmez. Pancoast tümörlerde invazyon değerlendirilmesi için manyetik rezonans görüntüleme (MRG) rutin olarak yapılmaktadır. Seçilmiş olgularda mediastinoskopi yapılmalıdır. Bu değerlendirmelerden sonra cerrahi düşünülen olgularda neoadjuvan eş zamanlı KT + RT ya da RT planlanmalıdır. Neoadjuvan KT ile eş zamanlı ya da sadece 40-45 Gy RT uygulamasından 3-4 hafta sonra en az lobektomi olacak şekilde

cerrahi önerilmektedir. Cerrahi sınır negatif olan ve operasyon sonrası mediastinal lenf bezi metastazı saptanmayan olgularda adjuvan tedaviye gerek yoktur. Cerrahi düşünülmeyen olgularda önerilen tedavi, hastaya göre eş zamanlı KT + RT, ardışık KT + RT ya da sadece RT'dir. Operasyon öncesi RT tedavisi alan olgularda operasyon sonrası RT ye gerek yoktur. Tam rezeke edilen olgularda 5 yıllık yaşam süresi % 40'dır. Sadece 50-60 Gy torasik RT uygulaması ile 5 yıllık yaşam süresi % 15-20'dir. (44-53)

Evre 3A da operasyon öncesi değerlendirmede mediastinal (N2) lenf nodlarında tutulum saptanmamış, cerrahi sırasında frozen çalışmasında saptanan tek istasyon lenf nodu tutulumunda tam rezeksiyon sağlanabilecekse operasyona devam edilir. Cerrahi sonrası bu olgularda, lokal nüks riskini azaltmak amacıyla RT planlanmalıdır. (54) Rezeksiyon tam olarak mümkün değilse veya ekstrakapsüler nodal hastalık , bulky veya çok istasyonlu lenf nodu tutulumu varsa planlanan rezeksiyona devam edilmemelidir (53-55) Operasyon öncesi değerlendirmede mediastinal lenf nodu saptanan olgularda, Cerrahi ancak neoadjuvant kemoterapi ile down stage olan olgularda sağkalımı uzatmıştır. Bu olgularda ayrıca pnömonektominin lobektomiye göre belirgin bir sağkalım dezavantajına neden olduğu gösterilmiştir. Neoadjuvant kemoterapiye yanıt alınmış ve opere olmuş olgularda aynı protokole adjuvant olarak 2-3 kür daha devam edilmelidir. (56-57) Rezeksiyon potansiyeli olan T4 süperior vena kava , sol atrium, vertebra cisimi, karina ve distal pulmoner arter tutulumu olan olgularda KT tedavisi sonrası regresyon varsa, cerrahi tedavi yönünden olgular değerlendirilebilir. Bunun dışında kalan evre 3b'de ve evre 4 olgularda KT ve RT tedavileri gündeme gelmelidir. (58)

Tablo 7. Akciğer kanserli hastaların tanı anındaki dağılımı

EVRE	%
Evre I	5,6
Evre II	7,7
Evre IIIA	14,2
Evre IIIB	32,1
Evre IV	40,4

Tarama ve Erken Tanı

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde evre 1 yada evre 4 anında tanı koyma açısından klinik sonuçlar arasında oldukça fazla fark bulunmaktadır. (tablo-9) Malesef akciğer kanserinde lokal ileri ve metastatik hastalığa bağlı semptomlarla %75 ileri evrede tanı konmaktadır. (59) Erken tanısı konarak cerrahiye yönlendirilen olgularda sağkalım oranlarında çok daha iyi sonuçlar elde edilmektedir. (60) Akciğer kanseri birçok özelliği nedeniyle erken tanı için tarama yapmanın çok efektif olacağını düşündürmüştür. Hastalığın mortalite ve morbidite oranlarının yüksek olması, görülme sıklığının yüksek olması, hedef grup belirlemek için risk faktörlerinin tanımlanmış olması, hastalığın tanı vermeden önceki gelişim döneminin uzun olması, erken evre olgularda tedavi sonuçlarının çok daha iyi olması tarama yapmayı anlamlı kılmaktadır.(61-62) Kanser tarama kavramı kanser gelişiminin önlenmesi hatta sağkalımı artırmak için asemptomatik olgularda maling, premaling lezyonların saptanması ve tedavi edilmesi temeline dayanmaktadır.

Akciğer kanserine yönelik yapılan tarama çalışmaları birçok parametreye bağlı değerlendirilmektedir. Bunlar kanser saptama oranı, tanı koyma anındaki evreler, yaşam süresi, hastalığa bağlı mortalite ve genel mortalite oranlarıdır. Özellikle akciğer kanseri gibi ölümcül, çoğu zaman tanısı ve tedavisi invaziv yöntemlerle yapılan hastalıklarda hastalığa bağlı yada genel mortalite oranlarını değerlendirmek önemlidir. Bu bağlamda akciğer kanseri taramasının faydaları olduğu gibi, potansiyel zararları vardır. Tarama protokollerinde saptanan benign nodüllere iğne biopsisi yada cerrahi ile yaklaşılması gereği mortalite ve morbiditeye sebep olabilmektedir.(63-64) Tarama protokollerinde kullanılan görüntüleme yöntemlerine bağlı radyasyon riskleri bulunmaktadır. (65) Görüntüleme yöntemleriyle saptanan nodüllerin uzun süre takibi sırasında olgularda saptanan anksiyete bağlı hayat kalitesinde olumsuzluklar olabilmektedir. (66) Son olarakta direkt grafi ile yapılan tarama çalışmalarında olduğu gibi tarama yapılan popülasyonda aşırı tanı konması olgusuyla karşılaşılabilir. (67)

Akciğer kanserinde tarama çalışmaları 1960'lı yıllarda direkt grafi temelli başlamıştır. Sadece direkt grafi ile yapılan çalışmada 6 ay arayla yapılan 3 yıllık takip sonucunda anlamlı sonuçlara ulaşamamıştır.(68-69) 5 ve 8 yıl arasında takip edilen 20000'nin üzerinde olguda yapılan Amerika merkezli 2 çalışmada direkt grafi ile direkt grafiye balgam sitolojik çalışması eklenen tarama protokolleri arasında akciğer kanseri saptama ve mortalite oranları olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (70-72)

Eski Çekoslovakya merkezli direkt grafi ve balgam sitoloji tetkiklerine dayalı yapılan tarama çalışmasında kanser saptama oranlarında artış saptanmakla birlikte erken evre saptanan olguların oranında ve genel mortalite oranlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.(73) Mayo Klinik'te yapılan benzer çalışmada 20 yıllık takip sonucundan düzenli direkt grafi ve balgam sitoloji ile rutin direkt grafi ile sağlık kontrolü yapılan kontrol grup arasında benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çalışmada genel mortalite oranlarında istenen azalmanın olmamasına aşırı tanı konma olgusunun sebep olduğu belirtilmiştir.(74) Bu çalışmaların hepsinde ortak eleştiri konusu olan durumlar, çalışmaların sadece erkek cinsiyet üzerinde yapılması ve kontrol grup oluşturulurken direkt grafi ile kontrolleri olan tamamen taranmayan bir grup oluşturulmamasıdır. Fakat bu çalışmalardan sonra yapılan uluslararası çalışmalarda bu hususlar dikkate alınarak çalışma modelleri oluşturulsa da elde edilen sonuçlar değişmemiştir.(75)

Direkt grafi bazlı taramalarda istenen sonuçların elde edilememesi nedeniyle, rutin klinik uygulamaya giren BT, tarama çalışmalarında gündeme gelmeye başlamıştır. (76) Amerika Birleşik Devletleri kaynaklı Ulusal Akciğer Kanseri Tarama Çalışmaları (NLST) çerçevesinde 53,454 adet 55-74 yaş arası kadın ve erkek cinsiyette, en az 30 paket yıl siğara içme öyküsü olan yüksek riskli olgunun düşük dozlu BT ile yapılan taramalarının, kontrol grubundaki direkt grafi ile yapılan tarama sonuçları ile karşılaştıran çalışma 2010 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada ortalama takip süresi 6.5 yıldır ve bu çalışma sonucuna göre BT ile yapılan tarama sonucunda genel mortalite oranlarında kontrol grupla karşılaştırıldığında %20 azalma saptanmıştır. Daha az oranda evre 4 olgu saptanırken, tarama grubundaki olgularda tanı konma anındaki evre %70 oranında evre 1 ve evre 2 olmuştur. Bu çalışmada karşılaşılan en önemli handikap yüksek oranlarda yanlış pozitiflik oranlarıyla karşılaşılmıştır. Ayrıca akciğer kanserine bağlı bir ölümü önlemek için düşük doz bilgisayarlı tomografi ile 320 kez görüntüleme yapma gerekliliği bu tarz bir taramanın maliyetli olabileceği ve bu açıdan ileri çalışmaların gerekli olduğunu düşündürmüştür. (77) 2010 yılı itibariyle BT bazlı NELSON, DANTE ve Mayo Klinik çalışmalarının da arasında bulunduğu 8 yeni çalışma yürütölmeye başlanmıştır ve devam etmektedir. (78) Direkt grafide olduğu gibi düşük doz BT ile yapılan tarama çalışmalarında da aşırı tanı konması olgusu devam eden bir sorun olmuştur.(79) Olguların yaşam süreleri boyunca beklide asla semptomatik olmayacak ve yaşam sürelerine etkisi olmayacak akciğer kanserlerine tanı konabileceği anlaşılmıştır. Bu semptomsuz ve ilerleme göstermeyecek tümörler için olgulara invaziv tanı ve tedavi yöntemleriyle yaklaşmak gerekebilmekte ve bu mortalite,

morbidite oranlarına olumsuz yansımaktadır. Olguları tek başına değerlendirecek olursak, kişiye asla zarar vermeyecek bir tümörün masraflı ve hasta konforunu bozacak şekilde tanısını koyma ve tedavi etme gündeme gelmektedir. Bu sebeple İtalya merkezli yapılan COSMOS akciğer kanseri tarama programı düşük doz BT ile saptanan tümörlerin hacminin iki katına çıkma zamanı ‘volume doubling time’ (VDT) üzerine odaklanmıştır.(80) Seri BT görüntülemeleri çekilen olgularda tümör boyutunda 400 günden kısa sürede değişim gösteren olgular hızlı büyüyen tümörler, 400 gün ile 599 gün arasında boyut değişikliği gösteren tümörler yavaş büyüyen tümörler, 600 günden daha yavaş büyüyen tümörler ise tembel tümörler olarak kabul edilmiş ve aşırı tanı konma durumundan 600 günden yavaş büyüyen tümörler suçlanmıştır.(80) Ayrıca mortalite oranını azalttığını gösteren randomize çalışmaların olmaması nedeniyle düşük doz BT’yi risk gruplarının rutin kitle taramalarında önermek için erkendir.

Akciğer kanseri taramasına yönelik düşük doz bilgisayarlı tomografi teknolojisi sonrası PET-BT ile yapılabilecek akciğer kanseri taramasına yönelik iki çalışma yapılmıştır. (81-82) Bu çalışmalarda PET-BT düşük doz BT ile saptanan kalsifiye olmayan 7 milimetre üzerindeki nodüllere yönelik kullanılmış ve BT ile tarama algoritmasının bir parçası olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta düşük doz BT ile yapılan taramaya ek olarak çekilen PET-BT’nin tanıda duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değerler açısından daha iyi sonuçlar sağladığı görülmüştür.

Radyolojik ve bronkoskopik yöntemler dışında akciğer kanserinin tarama çalışmalarında teknolojik ve genetik gelişmeler ışığında yeni yaklaşımlarda gündeme gelmiştir. Bu yeni yaklaşımlar ile akciğer kanserinin taraması riskli popülasyonda direkt olarak yapılabileceği gibi, bir kısım çalışmada yeni risk faktörleri tanımlayarak radyolojik taramanın bu popülasyonda yapılması hedef alınmıştır. Bu amaçla kullanılan teknolojiler;

- 1) Balgam örneklerinin tümör markerları açısından immünohistokimyasal ve moleküler çalışmalar ile tetkik edilmesi (p16, inka4a, prometer bölgesinin hipermetilasyonu, p53 mutasyon analizi) (83-84)
- 2) Otomatik görüntü sitometri ile balgam analizi (85)
- 3) Floresan bronkoscopi (86)
- 4) Ekshale nefes analizi ile uçucu organik bileşenlerin akciğer kanseri tanısı olan olgularda değerlendirilmesi (87-88)

- 5) Bronkoskopik örneklerin genomik ve proteomik analiz çalışmaları (89-90)
- 6) Moleküler belirteçleri tespit etmek için protein mikroyarray çalışmalarıdır. (91)

Proteomik Yaklaşım

Kanser araştırmalarının en önemli amacı, hedefe yönelik tedavi planı yapmak, kanserli hücreleri erken tespit etmek, tedavi seçeneğini belirleme, prognozu belirleme için daha iyi bir sınıflama yapabilmek adına hücresel yeni moleküler hedefler ve biomarkırlar bulmak olmuştur. Karsinogenez genetik ve epigenetik olayları içeren çok aşamalı bir süreçtir. Hücreler çevresel etkilere gen ekspresyonlarını modifiye etmek suretiyle cevap verirler. Genler aktive olduğunda mesajcı ribonükleik asit (m RNA) üretmek üzere transkripsiyon meydana gelir ve bu sitoplazmada ribozomlarda protein sentezlenmesiyle sonuçlanır. Tüm hücreler aynı Deoksiribonükleik asit (DNA) yapısına sahip olsalar da yaklaşık olarak %3 ile %5 arasındaki gen eksprese olmaktadır. Genomda hangi genin eksprese olacağı konusundaki seçici düzenleme transkripsiyon aşamasında olmaktadır. Ayrıca transkribe olan her genin protein düzeyinde ifadesi her zaman gerçekleşmemekte ya da translasyon sonrası modifikasyonlar nedeniyle farklı dokularda yani aynı gen ifadesinden farklı işlevdeki proteinler üretilebilmektedir. Moleküler seviyedeki bu heterojen yapı farklı histolojik alt gruplarda, tedaviye olan yanıtta farklılığı da açıklayabilmektedir. Bu bağlamda tümörün genetik ve proteomik yapılarının ayrıntılı incelenmesi, karar verme aşamasında klinisyenlere yardımcı olabilecek bir yaklaşımdır.

Gen mikro-array ve gen ekspresyon profiline yönelik sağlanan gelişmelere rağmen tümör çalışmalarında genomik yaklaşımlarda kısıtlılıklar mevcuttur. Nükleik asitlerden ziyade proteinler hücrelerin fonksiyonel sonuçlarını temsil etmektedir. RNA ekspresyonu sentezlenen proteinle tam olarak aynı değildir. Genomik analizler protein sentezi sonrası gelişen glikolizasyon, proteolitik ve konjugasyon aşamaları gibi post-translasyonel modifikasyonları içermemektedir. Bu modifikasyonlar onkogeneze kritik sinyal yollarında etki gösterebilmektedir. Bu açıdan DNA ve RNA'ya yönelik çalışmalardan ziyade protein son ürününe yönelik yapılan çalışmalar insan tümörlerinin kompleks yapısını anlamada daha doğru bilgiler vermektedir.

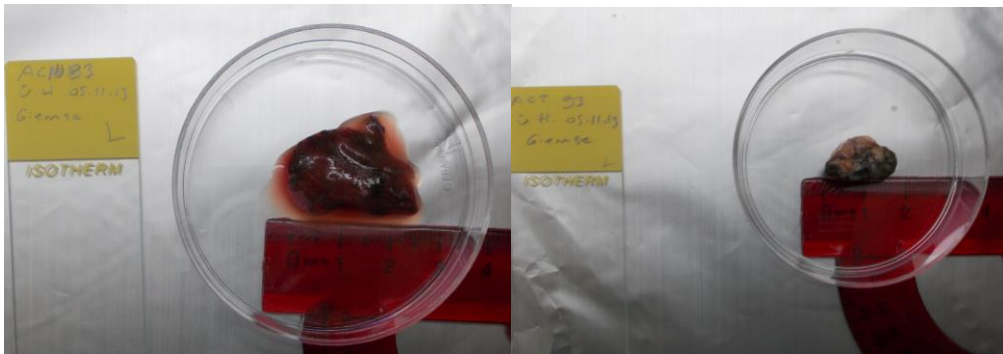
Proteomik teknolojisi, iki boyutlu (2D) jel elektroforezi, görüntüleme analizi, kütle spektrometresi, amino asit dizi analizi ve biyoinformatik gibi gelişmiş tekniklerin

birleşimini kullanmaktadır. Proteomik alanındaki gelişmeler iki boyutlu jel elektroforezinin 1975 yılında kullanımıyla başlamıştır. Son olarak geliştirilen MALDI-TOF spektrometre teknolojisi ile de dokularda moleküler çalışmalar hız kazanmıştır. MALDI spektrometre iyon oluşturma, kütle ve iyon yükü farklarına göre molekülleri ayırma prensibiyle çalışmaktadır. MALDI protein yapılarla çalışmaya uygundur ve özellikle post-translasyonel modifikasyonlara yönelik çalışmalarda dokudaki protein spektrumlarının saptanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca bu spektrometre sistemi çeşitli bilgisayar yazılımları ile entegre edilerek çalışma yapılan hedef dokuların protein parmak izlerini tam olarak belirleyebilmektedir.

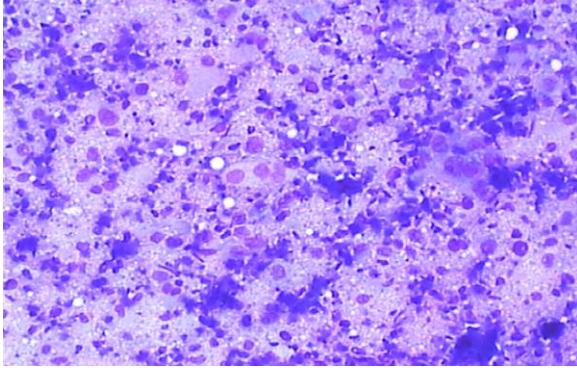
GEREÇ VE YÖNTEM

Doku ve kan örneklerinin toplanması:

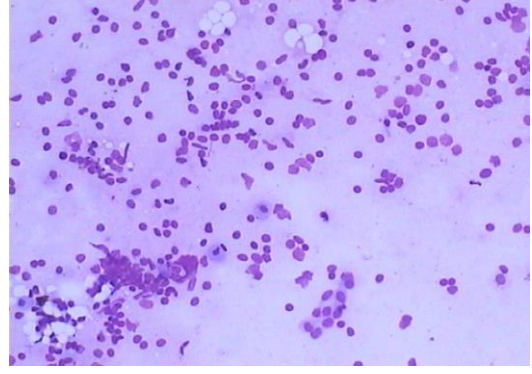
Dokuz Eylül Üniversitesi Göğüs hastalıkları Anabilim Dalı ve Göğüs Cerrahisi Anabilim Dallarına, ocak 2013 ile eylül 2013 tarihleri arasında başvuran toplam 153 olgudan alınan örnekler arasından seçilen, 36 akciğer kanserli bireyin taze doku ve biyopsi örnekleri; erken evre ve geç evre akciğer kanseri örnekleri olarak 2 gruba ayrıldı ve her bir grup, 18 squamoz hücreli karsinom ve 18 adenokarsinom alt gruplarından oluşturuldu. (resim-2,3) Örnek olarak, cerrahi müdahale sırasında hastanın tümörlü ve eşlenik normal dokusundan alınan biyopsilerden, patoloji tanısı için yeterli örnek alındıktan sonra geriye kalan dokular kullanılmıştır. Her bir hastada ki protein değişimleri, normal dokusuna göre karşılaştırılarak tümörlü dokuda ki protein ifade farklılıkları belirlenmiştir. Protein örneklerinin uygun şartlarda ön hazırlıklarının yapılarak, saklanması DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Proteomik ile ilgili örneklerin proteomik analize hazırlık aşamaları DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji laboratuvar çalışanları ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Kimya Bölümü çalışanları ile birlikte İYTE'de gerçekleştirilmiştir. Geri kalan aşamalar proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezinde yürütülmesi, protein spotlarının seçimi ve kütle spektrometreye verilerek informatik analizleri İYTE'de gerçekleştirilmiştir.



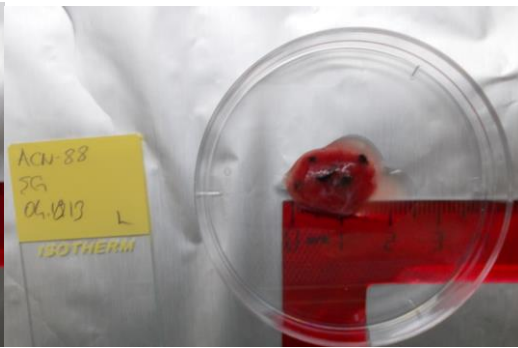
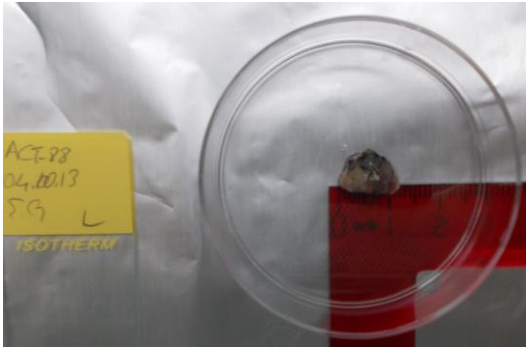
Resim 2. Adekoarsinom makroskopi



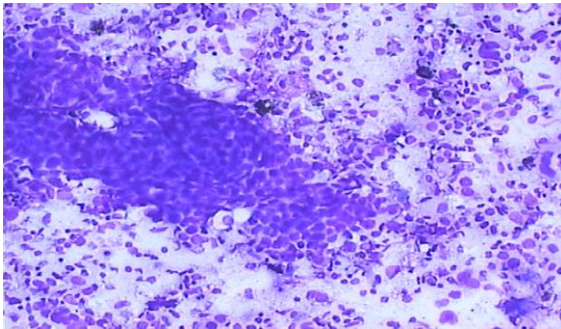
Resim 3. Adenokarsinom mikroskopi malign



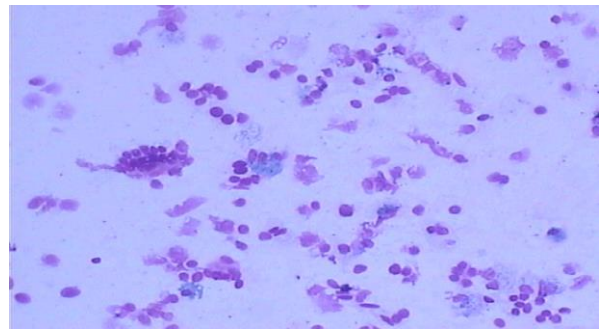
Resim 4. Adekoarsinom mikroskopi benign



Resim 5. Skuamöz hücreli karsinom makroskopi



Resim 6. Skuamöz hücreli karsinom mikroskopi malign



Resim 7. Skuamöz hücreli karsinom benign mikroskopi

Protein Analizleri:**Protein izolasyonu:**

Dokudan protein izolasyonu için Total Protein İzolasyon (Merck-Millipore) kiti kullanılarak homojenizatörde homojenize edilmiş santrifüj sonrası elde edilen süpernatant iki boyutlu jel elektroforezine verilerene kadar -80°C 'de saklanmıştır.

2-boyutlu jel elektroforezi ve proteinlerin boyanması:

Homojenize edilmiş protein örnekleri 2 boyutlu jel elektroforezi için Protean i12 IEF sistemi (BioRad) kullanılarak protein örnekleri izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılmıştır. Bu ayrıştırmada pH 3-10 IPG stripler kullanılmıştır. İzole edilen proteinlerden 100-200ug protein örneği, rehidrasyon tampon solüsyonu ile karıştırılarak, IPG striplere yüklenmiştir. 1 saat inkübasyon süresinden sonra, 3mL mineral yağ eklenip, IEF programı başlatılmıştır. %12lik resolving SDS jel Protean II XICell sisteminde dökülmüştür. İzoelektrik noktalarına göre ayrılmış proteinlerin bulunduğu IPG stripler, 15'er dakika sırasıyla dengeleyici solüsyon I ve dengeleyici solüsyon II içerisinde inkübe edilmiştir. Proteinleri 2. boyut olan moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için 12% SDS jeline 1 saat 16mA de 5-6 saat 180V'da yürütülmüştür. Kütle spektrometri analizi yapılacak olan proteinlerin ayrıştırılacağı jeller, Comassie ve gümüş boyama teknikleri ile boyanmıştır. Comassie boyaması için, jeller 8 saat boyunca boyama solüsyonu içerisinde tutulmuştur. Daha sonra distile su ile yıkanan jeller sırasıyla 3 dakika boyunca nötralizasyon solüsyonu, 1 dakika boyunca destaining solüsyonu ve 8 saat boyunca fiksasyon solüsyonu içerisinde tutulduktan sonra protein profil analizi gerçekleştirilmiştir. Protein farklılıklarının gözlemlenmesi için PDQuest Advanced 2-D Analysis Software kullanılmıştır. Gümüş boyama için ise, SDS jeli %40'lık etanol ve %10'luk HAc içerisinde 10 saat fiske edilmiştir. Daha sonra 30 dakika %30 EtOH, %4.1 NaAc ve %0.2 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solüsyonu içerisinde hassaslaştırılmıştır. Distile su ile yıkandıktan sonra, AgNO_3 ve formalin içeren solüsyon ile 40 dakika boyunca boyanmıştır. Distile su yıkamalarının ardından, Na_2CO_3 ve formalin içeren solüsyon ile muamele edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için % 1.46 EDTA içerisinde bekletilen jel, distile su yıkamalarının ardından görüntülenmeye hazır hale gelmiştir (92).

Proteinlerin kütle spektrometri analizi için jelde parçalanması:

2-boyutlu jelden 2-4mm çapında ve 1mm kalınlığında kesilen, kontrol ve tümör örnekleri arasında farklı yoğunluk gösteren protein bantları 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine konulmuştur. Protein bantları gece boyunca oda sıcaklığında metanol ve asetik asit içeren yıkama solüsyonunda yıkanmıştır. Ertesi gün taze yıkama solüsyonu ile bu yıkama 3-4 saat daha gerçekleştirilmiştir. Gümüş boyama için destaining protokolü Comassie'den farklı olarak potassium ferricyanide ve sodium thiosulfate karışımı ile gerçekleştirilerek 30 dakika içerisinde kullanılmıştır. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra asetonitril ile jel parçaları dehidre edilmiştir. Dehidre olan jel parçaları oda sıcaklığında kurutularak 2-3dk vakum-santrifuj yapılmıştır. Sırasıyla, DTT, iodoacetamide ve asetonitril içerisinde inkübe edilmiştir. Jel parçaları amonyum bikarbonat içerisinde inkübe edilerek rehidrasyon sağlanmıştır. Asetonitril ile tekrar dehidrasyondan sonra örnekler kurutulmuş ve tripsin solüsyonu içerisinde, buz üzerinde tekrar rehidre edilmiştir. Tripsin ortamdan uzaklaştırılıp, örneklerin üzerine amonyum bikarbonat eklenerek parçalama işlemi gece boyunca 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Parçalanmış örneklerin üzerine bir miktar daha amonyum bikarbonat eklenip, örnekler hafifçe vortekslenerek ve santrifujlenmiştir. Süpernatantlar yeni bir eppendorf tüpüne toplanmıştır. Kalan jel parçalarının üzerine ekstraksiyon solüsyonu eklenerek vortekslenmiş ve santrifuj sonucunda elde edilen süpernatant önceki süpernatant ile aynı tüpe eklenmiştir. Bu işlem 1 kere daha tekrar edildikten sonra örnekler analiz yapılana kadar -80°C de saklanmıştır. Kütle analizi yapılmadan hemen önce ZipTipTM protokolü uygulanmıştır. Bu yöntemde, protein ekstraktı ayrı bir mikrosentrifuj tüpüne alınmış ve trifluoroasetik asit ile pipetaj yapılmıştır. ZipTipTM'ler, asetonitril ile birkaç kez ıslatılmıştır. Islatılan pipet uçları, yine trifluoroasetikasit ile dengeye getirilmiştir. Asidifiye edilmiş peptidleri ZipTipTM'e bağlamak için, peptid karışımı ZipTipTM ile pipetlenmiştir. Daha sonra ZipTipTM trifluoroasetikasit ile yıkanmıştır. Yeni bir mikrosentrifuj tüpüne konacak asetonitril solüsyonunu ZipTipTM ile pipetlenmiştir. Bu aşama sonunda, elimizde asetonitril solüsyonu içerisindeki peptidler elde edildi (93).

Kütle Spektrometri analizi:

Kütle spektrometri analizleri için MALDI TOF/TOF MS analizi uygulandı (94). Kan serumu, 1:20 oranında saf su ile dilüe edilip direkt olarak altın kaplı MALDI hedef

plağına uygulanıp, kütle analizi MALDI-TOF-TOF (Bruker/ Autoflex III smartbeam) ile yapılmıştır.

Bunun için İYTE Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde bulunan 'Autoflex III MALDI TOF/TOF MS' sistemi (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) kullanıldı. Herbir spektrum için, 100Hz lazer frekansındaki en az 1000 lazer vuruşunun ortalaması alındı ve sistem, peptid kalibrasyon karışımı (Bruker Daltonics, Peptide Calibration mixture) kullanılarak dışarıdan kalibre edildi. Matriks olarak, α -CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid), ya da SA (Sinapinic acid) kullanıldı. Matriksler uygun çözelti içerisinde çözündükten sonra örneklerle karıştırılıp, her bir karışım altın-kaplı ya da paslanmaz çelikten oluşan MALDI hedef plakasına koyuldu ve laboratuvar sıcaklığında kurumaya bırakıldı. MALDI analiz sonuçları MASCOT arama motorunda (v.2.2) İzmir İleri teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Prof. Dr. Talat Yalçın ve ekibinin desteği ile analiz edilmiştir. MALDI analiz sonuçlarında elde edilen protein profillerindeki yoğunluk farklılıkları Decodon Advanced 2D Gel Image Analysis sistemi ile değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS (Power Analysis and Sample Size) 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Fisher-Freeman-Halton testi kullanıldı. Anlamlılık $p<0,01$ ve $p<0,05$ düzeylerinde değerlendirildi.

Hastaların kendi normal dokuları ile tümör dokularının karşılaştırılmasında bağımlı iki grup karşılaştırmada non parametrik Wilcoxon ve chi-square testleri kullanıldı. Protein değişimleri için heatmapler ve clustergramlar oluşturulmuştur.

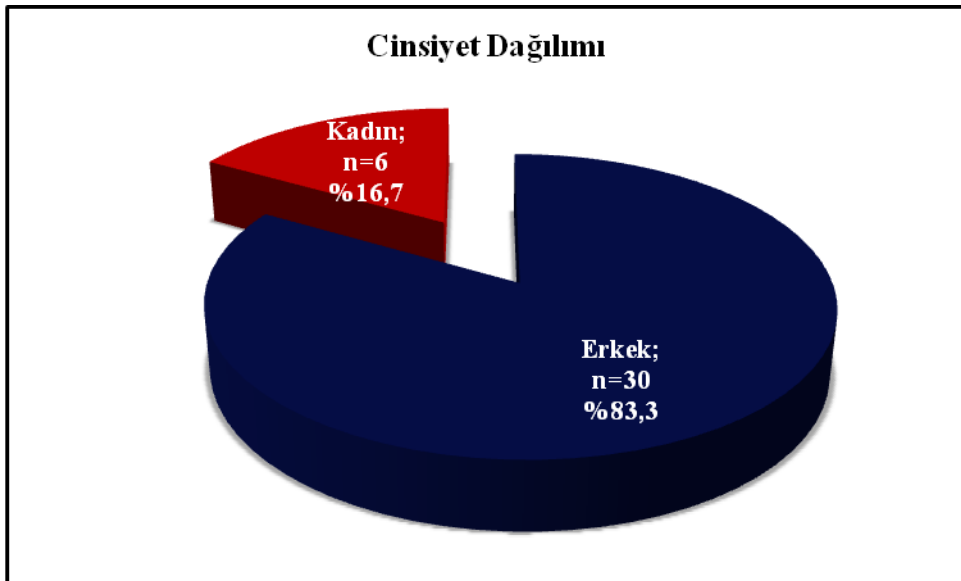
BULGULAR

Klinik ve Demografik Özellikler

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Göğüs Cerrahisi Kliniği'nde %83,3'ü (n=30) erkek, %16,7'si (n=6) kadın olmak üzere toplam 36 malign olgu ile yapılmıştır. Olguların yaşları 51 ile 79 yıl arasında değişmekte olup, ortalama $61,86 \pm 7,59$ yıldır.

Tablo 8: Yaş ve Cinsiyet Dağılımı

		Min-Mak	Ort $\pm$ SD
Yaş (yıl)		51-79	61,86 $\pm$ 7,59
		n	%
Cinsiyet	Erkek	30	83,3
	Kadın	6	16,7

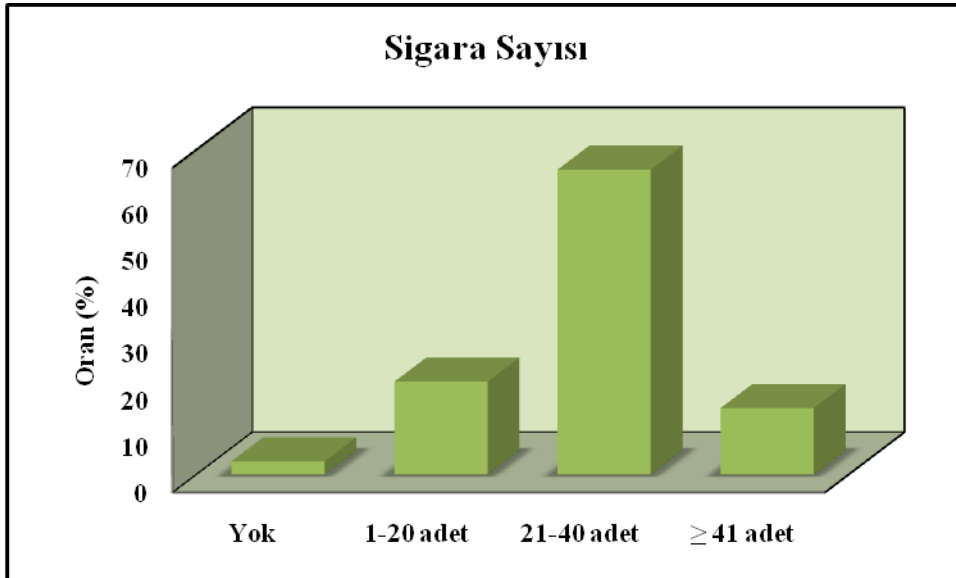


Grafik 1: Cinsiyet dağılımı

Tablo 9: Sigara Kullanımına İlişkin Dağılımlar

		Min-Mak	Ort±SD	Medyan
Sigara Sayısı (adet)		0-50	30,81±11,34	31,0
		n	%	
Sigara Kullanımı	Yok	1	2,8	
	Var	35	97,2	
	1-20 adet	7	20,0	
	21-40 adet	23	65,7	
	≥ 41 adet	5	14,3	

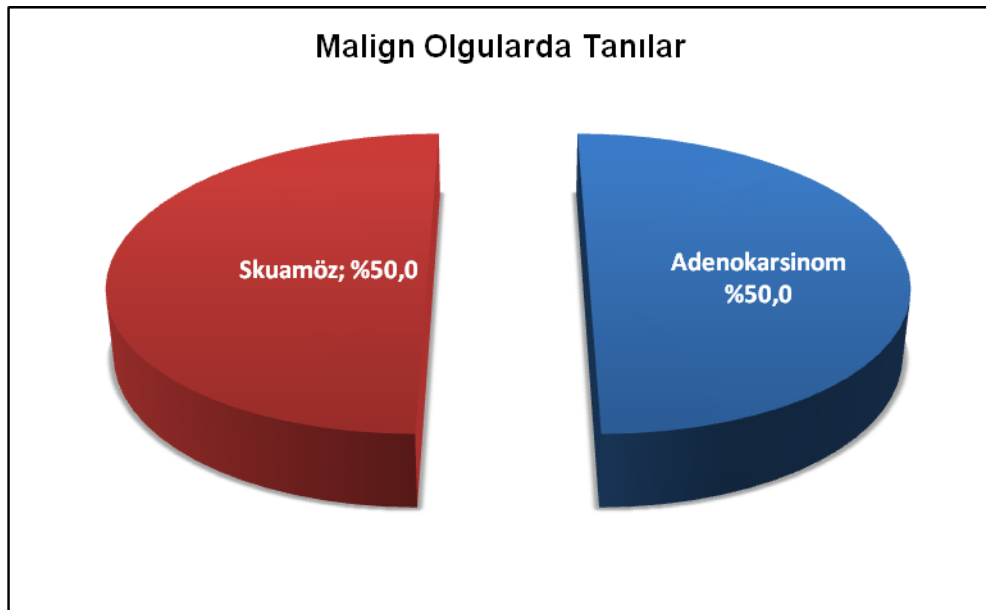
Olguların sigara kullanımları 0 ile 50 adet arasında değişmekte olup, ortalama 30,81±11,34 adet ve medyanı 31 adettir. Olguların sigara kullanımları incelendiğinde; 36 olgudan 1 (%2,8) olgu sigara kullanmazken, 35 (%97,2) olgu sigara kullanmaktadır. Bu olguların %20'si (n=7) 1 ile 20 adet arasında kullanmakta, %65,7'si (n=23) 21 ile 40 adet arasında kullanmakta ve %14,3'ü (n=5) 41 adet ve üzerindedir.

**Grafik 2:** Olguların sigara kullanım oranları dağılımı

Tablo 10: Malign Olgularda; Tanı, Evre, Erken/Geç Evre ve Evrelere Göre Tanıların Dağılımı

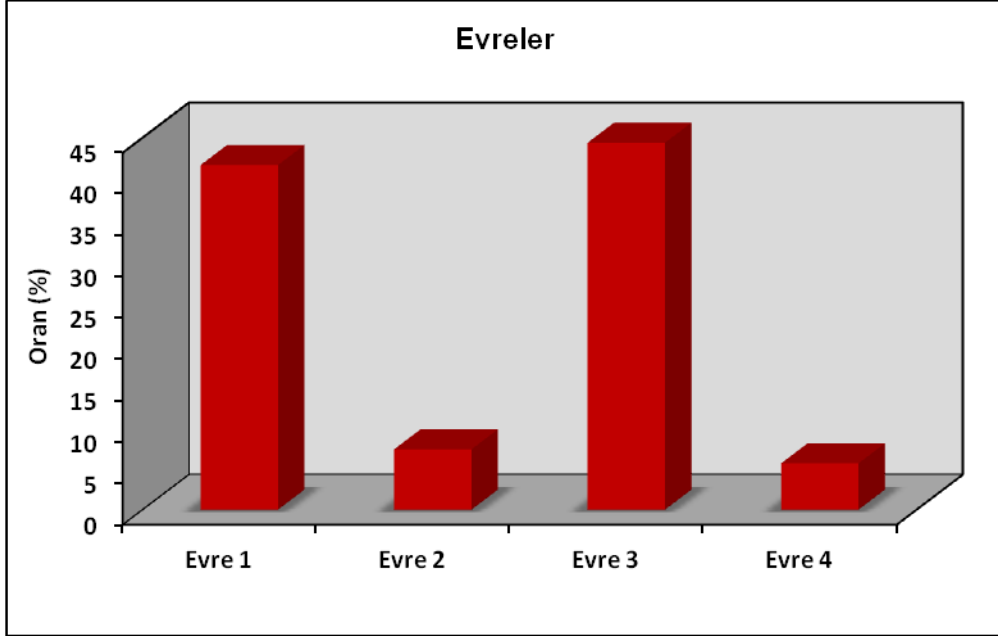
Malign Olgularda (n=36)		n	%
Tanı	Adenokarsinom	18	50,0
	Skuamöz	18	50,0
Evre	Evre 1	15	41,7
	Evre 2	3	7,3
	Evre 3	16	44,4
	Evre 4	2	5,6
Erken/Geç Evre	Erken	18	50,0
	Geç	18	50,0
Evrelere Göre Tanılar	Adenokarsinom+Erken Evre	9	25,0
	Adenokarsinom+Geç Evre	9	25,0
	Skuamöz +Erken Evre	9	25,0
	Skuamöz +Geç Evre	9	25,0

Malign olguların %50,0'si (n=18) Adenokarsinom iken, %50,0'si (n=18) Skuamöz'dur.



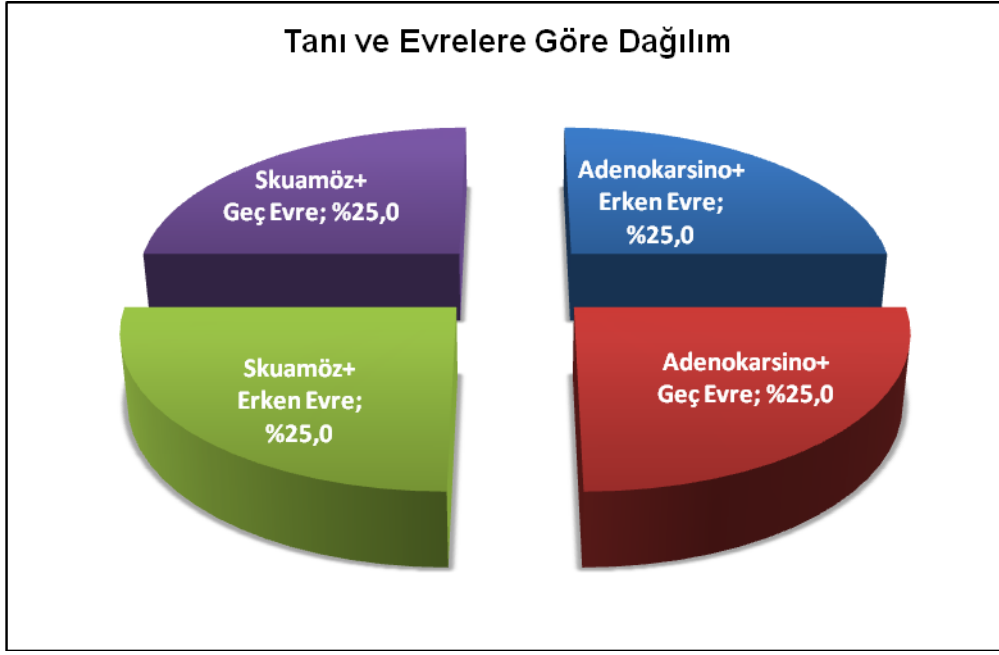
Grafik 4: Malign olgularda tanıların dağılımı

Malign olguların %41,7'si (n=15) Evre 1 iken, %7,3'ü (n=3) Evre 2, %44,4'ü (n=16) Evre 3 ve %5,6'sı (n=2) Evre 4'tür. Olguların %50,0'si (n=18) geç, %50,0'si (n=18) erken evrededir.



Grafik 6: Malign olgularda evrelerin dağılımı

Malign olguların evrelere göre tanıları incelendiğinde; %25,0'i (n=9) erken evre Adenokarsinom, %25,0'i (n=9) geç evre Adenokarsinom, %25,0'i (n=9) erken evre Skuamöz, %25,0'i (n=9) geç evre Skuamöz'dur.

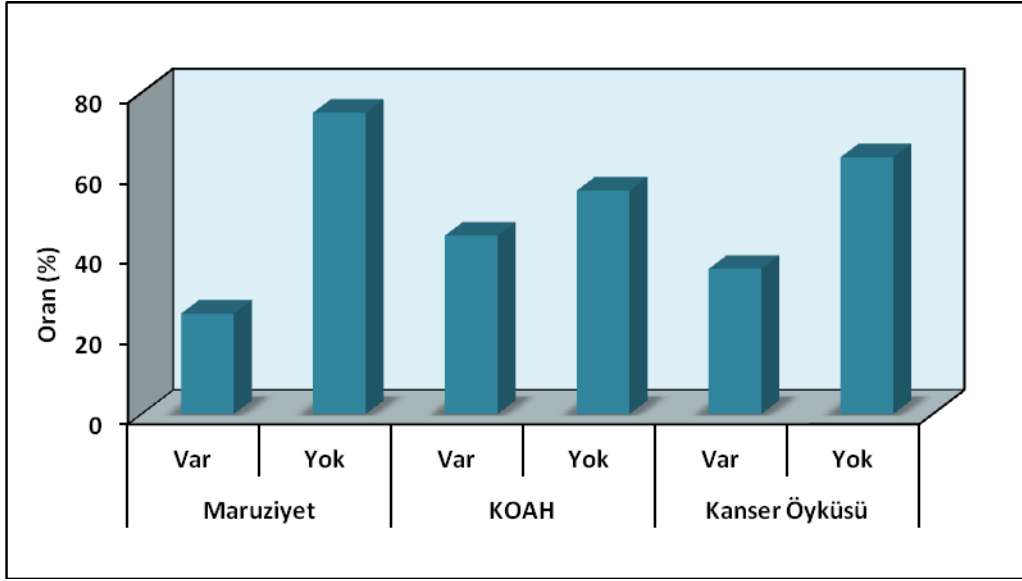


Garfik 7: Malign olguların evrelere göre tanılarının dağılımı

Tablo 11: Malign Olgularda; Maruziyet, KOAH ve Kanser Öyküsü Görülme Oranları Dağılımı

Malign Olgularda (n=36)		n	%
Maruziyet	Var	9	25,0
	Yok	27	75,0
KOAH	Var	16	44,4
	Yok	20	55,6
Kanser Öyküsü	Var	13	36,1
	Yok	23	63,9

Benign olgularda (n=9) maruziyet, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve kanser öyküsü görülmemektedir. Malign olguların (n=36); %25,0'inde (n=9) maruziyet, %44,4'ünde (n=16) KOAH ve %36,1'inde v(n=13) kanser öyküsü görülmektedir.

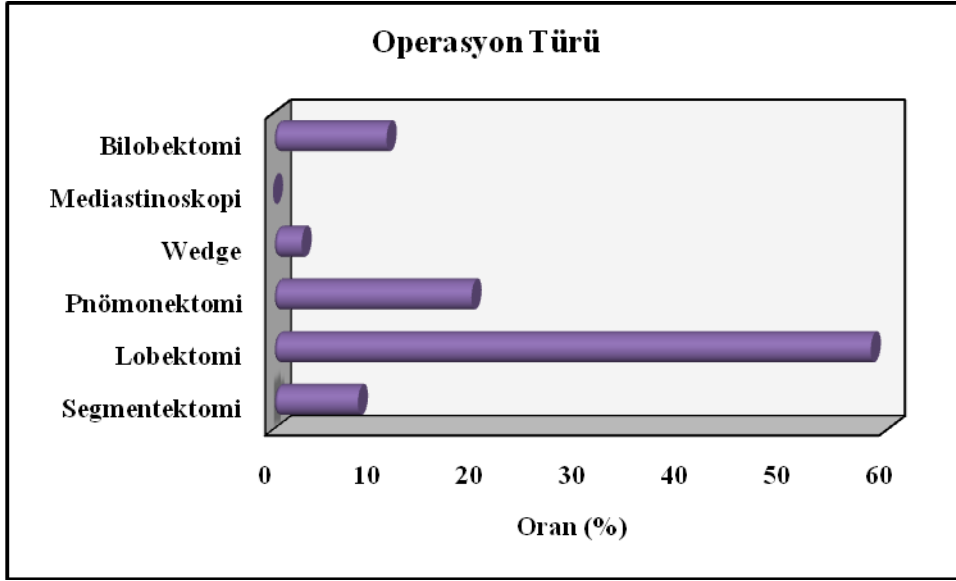


Grafik 8: Malign olgularda; maruziyet, KOAH ve kanser öyküsü görülme oranları dağılımı

Tablo 12: Malign Olgularda Operasyon Türleri Dağılımı

Operasyon Türü	Malign	
	n	%
Segmentektomi	3	8,3
Lobektomi	21	58,4
Pnöminektomi	7	19,4
Wedge	1	2,8
Mediastinoskopi	0	0,0
Bilobektomi	4	11,1

Olguların operasyon türleri incelendiğinde; %8,3'ünde (n=3) Segmentektomi, %58,4'ünde (n=21) Lobektomi, %19,4'ünde (n=7) Pnöminektomi, %2,8'inde (n=1) Wedge, ve %11,1'inde (n=4) Bilobektomi görülmekte iken olguların hiçbirinde Mediastinoskopi görülmemektedir. Olgulara ilişkin uygulanan operasyon türleri Tablo 6'da görülmektedir.



Grafik 9: Malign olgularda operasyon türleri dağılımı

Tablo 13: Gruplara Göre Yaş ve Cinsiyet Değerlendirilmeleri

	Adenokarsinom +Erken Evre	Adenokarsinom +Geç Evre	Skvamöz+ Erken Evre	Skvamöz +Geç Evre	p
	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
Yaş (yıl)	62,44±7,35 (62,0)	58,00±6,12 (57,0)	62,22±8,91 (63,0)	64,78±7,34 (63,0)	^a 0,215
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Cinsiyet					
Erkek	7 (%77,8)	7 (%77,8)	8 (%88,9)	8 (%88,9)	^b 1,000
Kadın	2 (%22,2)	2 (%22,2)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	

^aKruskal Wallis Test ^bFisher-Freeman-Halton Test

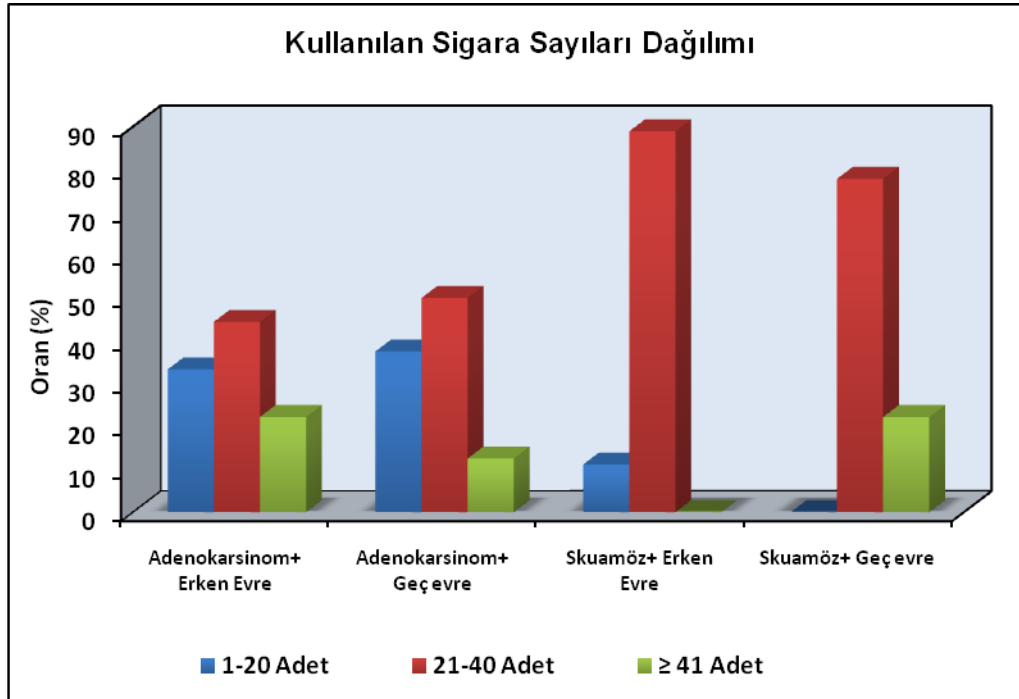
Gruplara göre olguların yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Tablo 14: Gruplara Göre Kullanılan Sigara Sayılarına İlişkin Değerlendirilmeler

Sigara Sayısı	Adenokarsinom +Erken Evre	Adenokarsinom +Geç Evre	Skumöz+ Erken Evre	Skumöz +Geç Evre	p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
1-20 Adet	3 (%33,3)	3 (%37,5)	1 (%11,1)	0 (%0,0)	0,193
21-40 Adet	4 (%44,4)	4 (%50,0)	8 (%88,9)	7 (%77,8)	0,159
≥ 41 Adet	2 (%22,2)	1 (%12,5)	0 (%0,0)	2 (%22,2)	0,614

Fisher-Freeman-Halton Test •Sigara kullanmayan bir olgu istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.

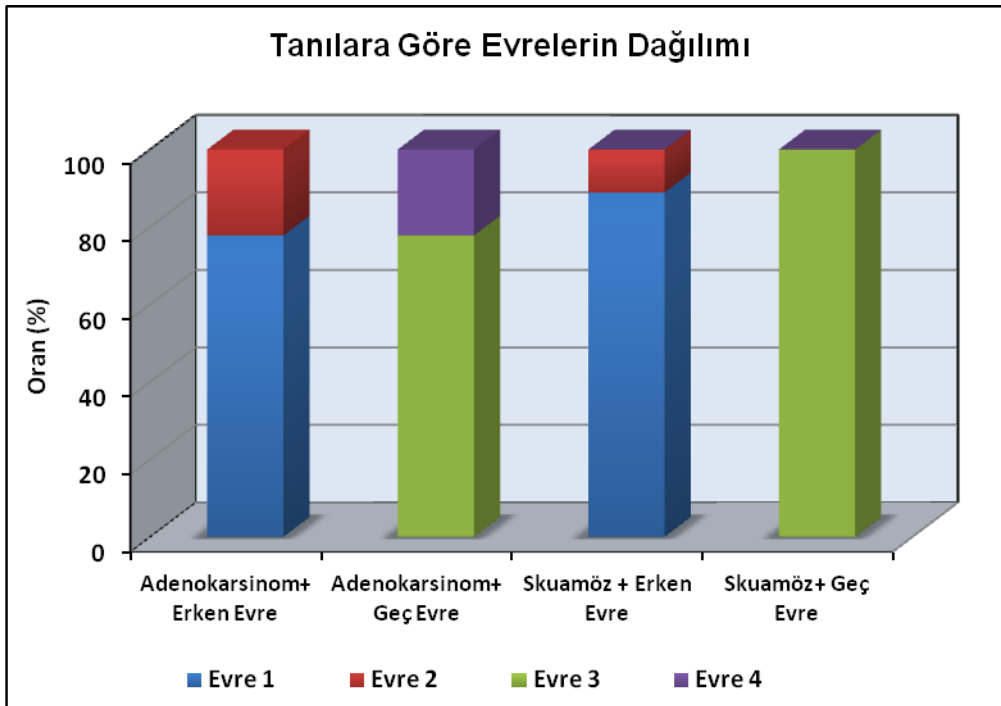
Gruplara göre olguların kullandıkları sigara sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

**Grafik 10:** Kullanılan sigara sayıları dağılımı

Tablo 15: Gruplara Göre Evrelerin Dağılımı

Evreler	Adenokarsino m+Erken Evre	Adenokarsino m+Geç Evre	Skumöz +Erken Evre	Skumöz +Geç Evre
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Evre 1	7 (%77,8)	0 (%0,0)	8 (%88,9)	0 (%0,0)
Evre 2	2 (%22,2)	0 (%0,0)	1 (%11,1)	0 (%0,0)
Evre 3	0 (%0,0)	7 (%77,8)	0 (%0,0)	9 (%100,0)
Evre 4	0 (%0,0)	2 (%22,2)	0 (%0,0)	0 (%0,0)

Adenokarsinom tanısı alan ve erken evrede olan olguların %77,8'i (n=7) Evre 1'de iken, %22,2'si (n=2) Evre 2'dedir. Adenokarsinom tanısı alan ve geç evrede olan olguların %77,8'i (n=7) Evre 3'de iken, %22,2'si (n=2) Evre 4'dedir. Skumöz tanısı alan ve erken evrede olan olguların %88,9'u (n=8) Evre 1'de iken, %11,1'i (n=1) Evre 2'dedir. Skumöz tanısı alan ve geç evrede olan olguların %100'ü (n=9) Evre 3'dedir.

**Grafik 11:** Gruplara göre evrelerin dağılımı

Tablo 16: Gruplara Göre Maruziyet, KOAH ve Kanser Öyküsü Görülme Oranlarının Değerlendirilmesi

	Adenokarsino m+Erken Evre	Adenokarsino m+Geç Evre	Skvamöz +Erken Evre	Skvamöz +Geç Evre	p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Maruziyet					
Var	3 (%33,3)	2 (%22,2)	1 (%11,1)	3 (%33,3)	0,833
Yok	6 (%66,7)	7 (%77,8)	8 (%88,9)	6 (%66,7)	
KOAH					
Var	3 (%33,3)	3 (%33,3)	5 (%55,6)	5 (%55,6)	0,690
Yok	6 (%66,7)	6 (%66,7)	4 (%44,4)	4 (%44,4)	
Kanser Öyküsü					
Var	5 (%55,6)	4 (%44,4)	1 (%11,1)	3 (%33,3)	0,317
Yok	4 (%44,4)	5 (%55,6)	8 (%88,9)	6 (%66,7)	
Fisher-Freeman-Halton Test					

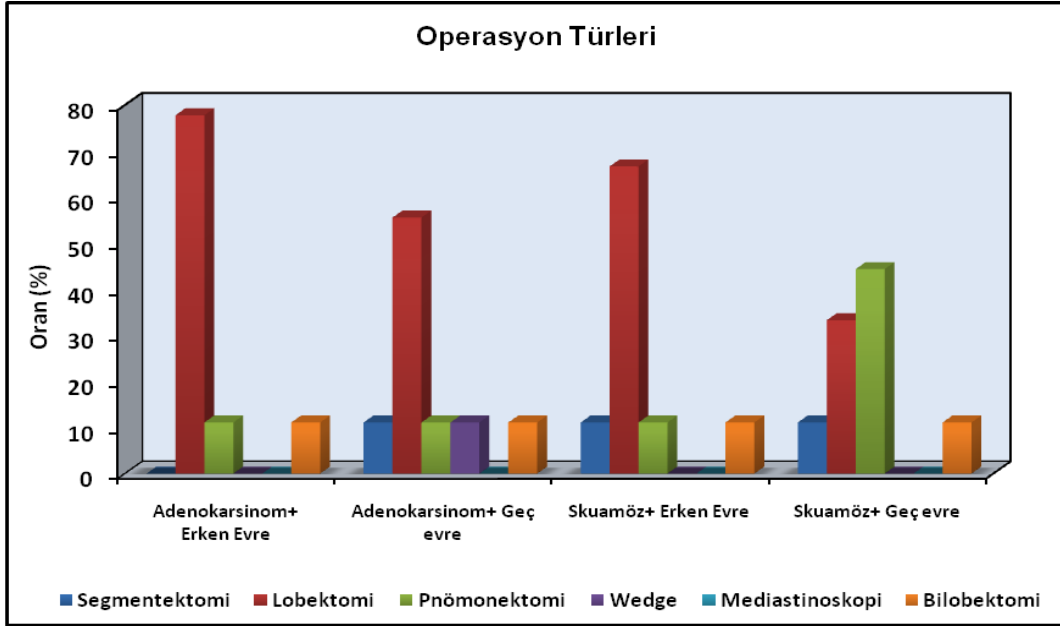
Gruplara göre olgularda maruziyet, KOAH ve kanser öyküsü görülme oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Tablo 17: Gruplara Göre Operasyon Türlerinin Değerlendirilmesi

Operasyon	Adenokarsinom +Erken Evre	Adenokarsinom +Geç Evre	Skvamöz +Erken Evre	Skvamöz +Geç Evre	p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Segmentektomi	0 (%0,0)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	0,297
Lobektomi	7 (%77,8)	5 (%55,6)	6 (%66,7)	3 (%33,3)	
Pnöminektomi	1 (%11,1)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	4 (%44,4)	
Wedge	0 (%0,0)	1 (%11,1)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
Mediastinoskopi	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
Bilobektomi	1 (%11,1)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	

Fisher-Freeman-Halton Test

Gruplara göre olguların operasyon türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken ($p>0,05$); geç evre Skvamöz olgularda Pnöminektomi görülme oranı, erken evre Adenokarsinom, geç evre Adenokarsinom ve erken evre Skvamöz olgulardan yüksek olması ve erken evre Adenokarsinom olgularda lobektomi görülme oranı da, geç evre Adenokarsinom, erken evre Skvamöz ve geç evre Skvamöz olgulardan yüksek olması dikkat çekicidir.

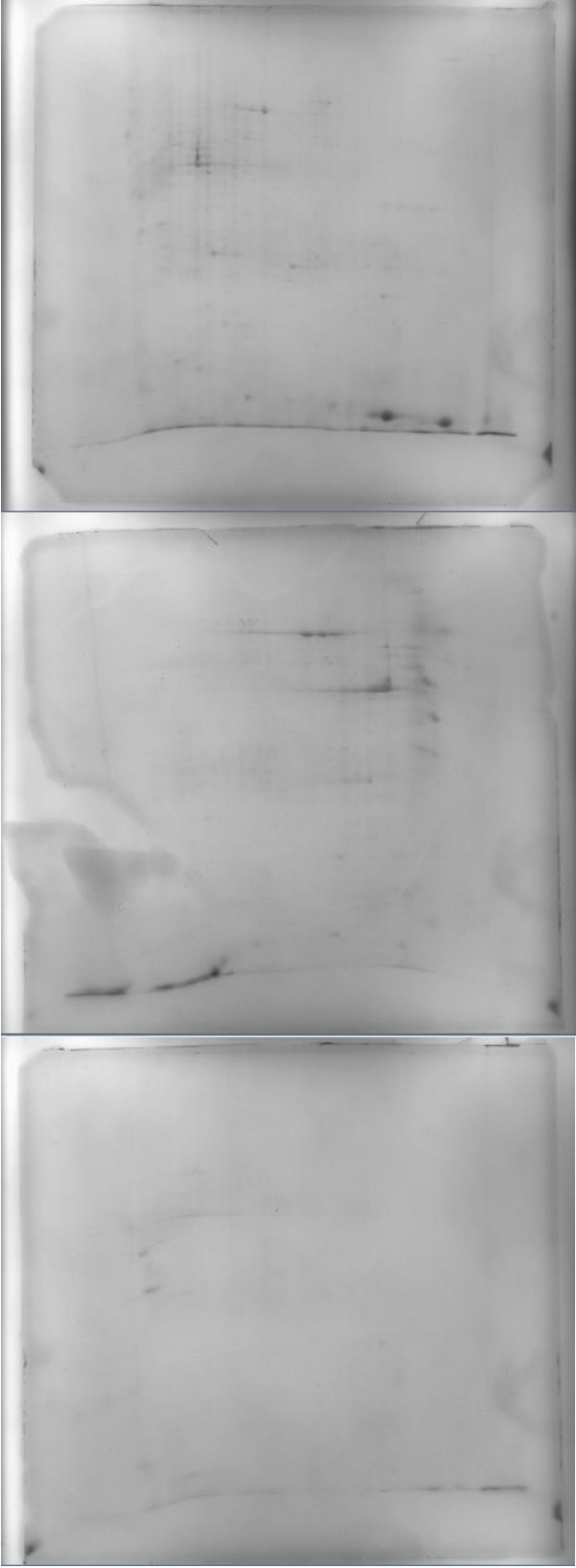


Grafik 12: Gruplara göre operasyon türleri dağılımı

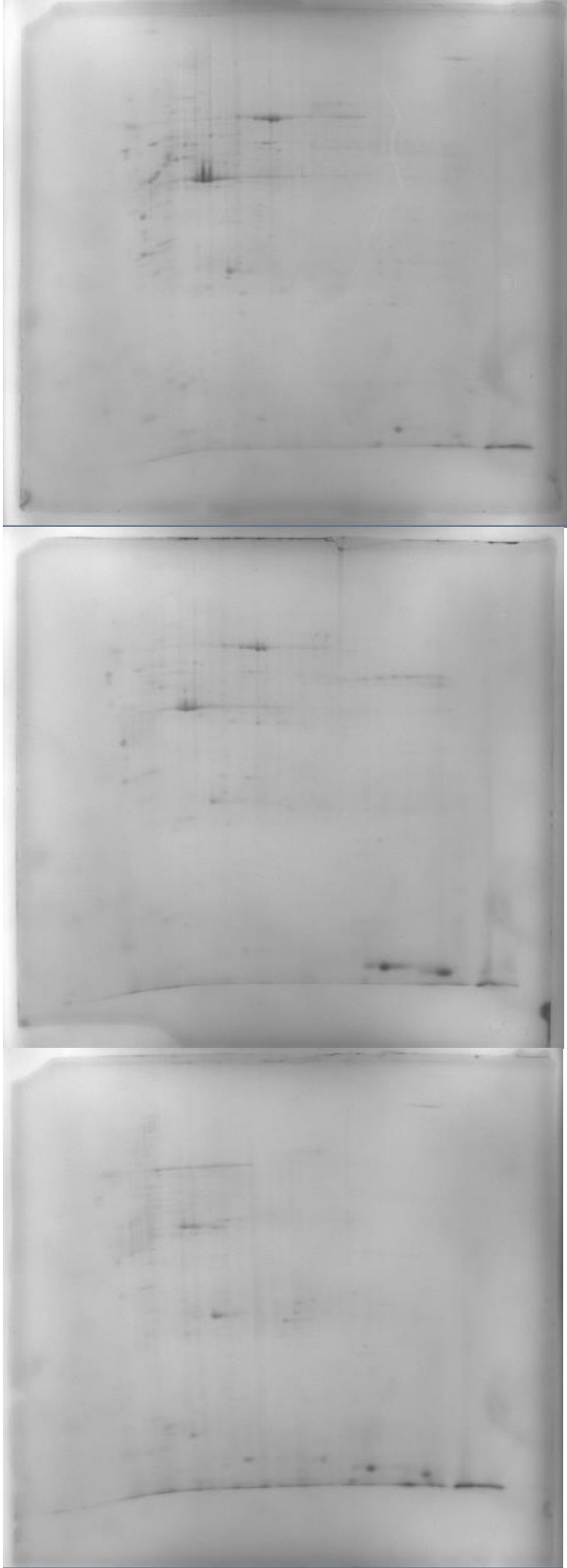
Jel elektroforez adenokarsinom hastaları tümörlü ve normal parankim sonuçları



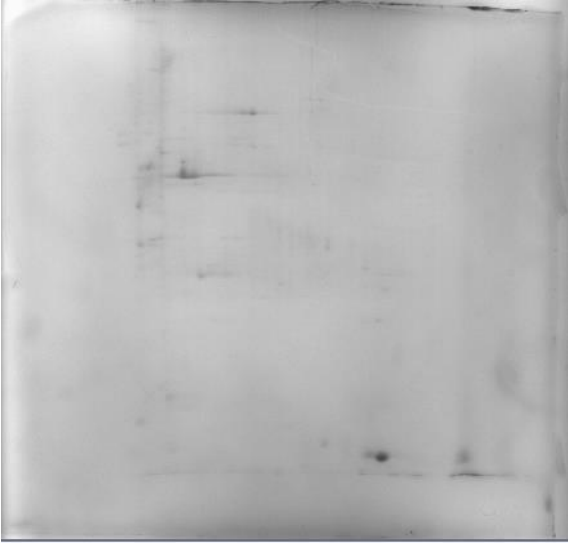
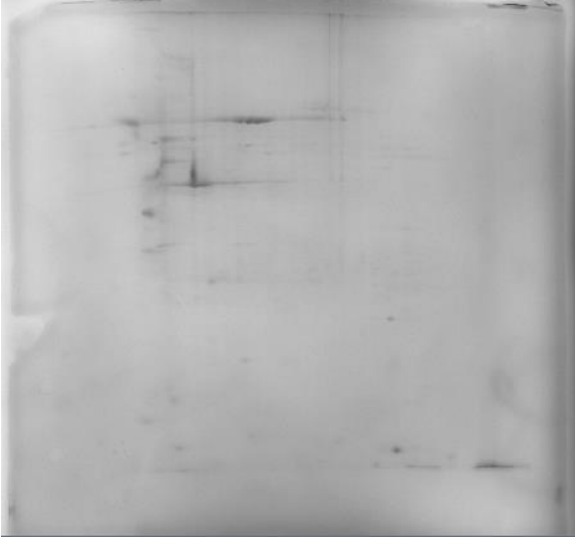
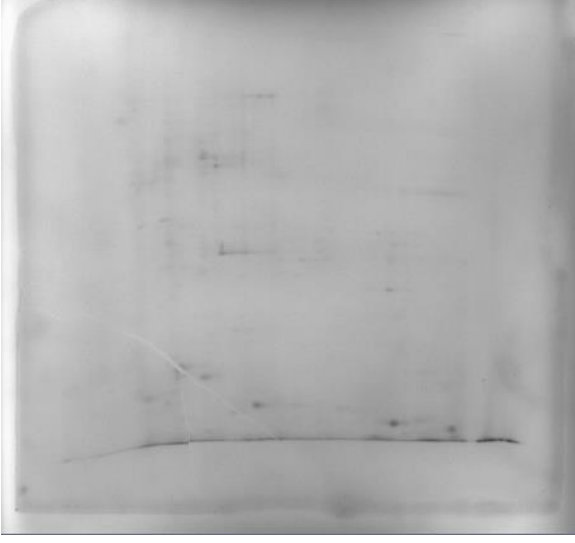
Resim 8. Adenokarsinom erken evre grubu normal parankim örneklerinin 2D jel elektroforez görüntüleri



Resim 9. Adenokarsinom geç evre grubu normal parankim örneklerinin 2D jel elektroforez görüntüleri

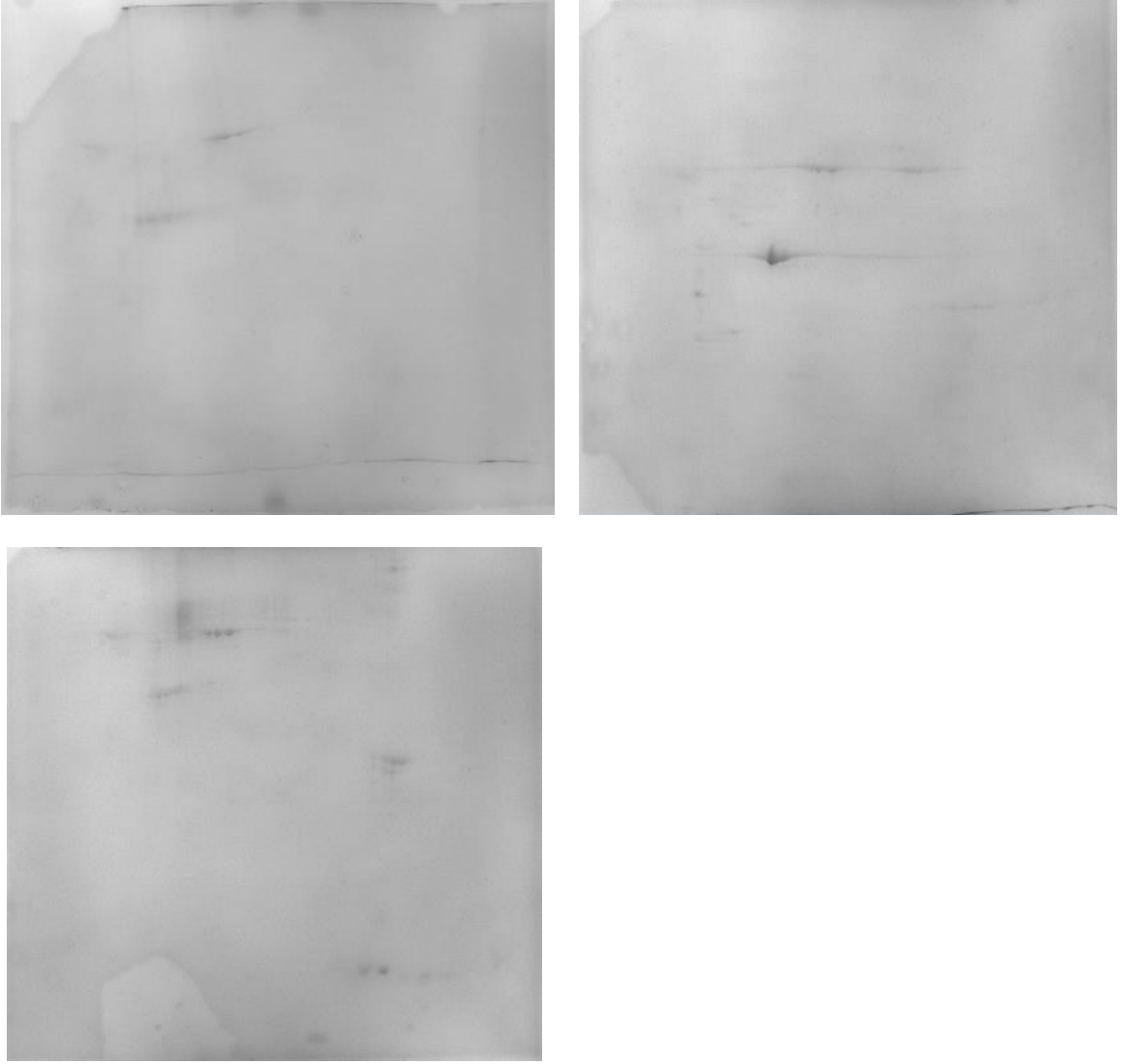


Resim 10. Adenokarsinom erken evre grubu tümörlü parankim örneklerinin 2D jel elektroforez görüntüleri

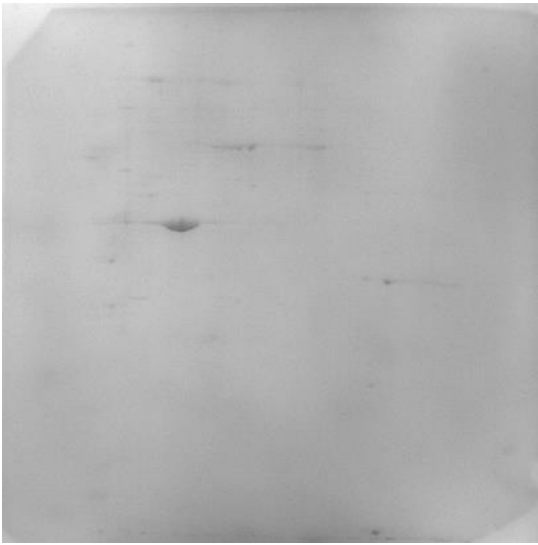
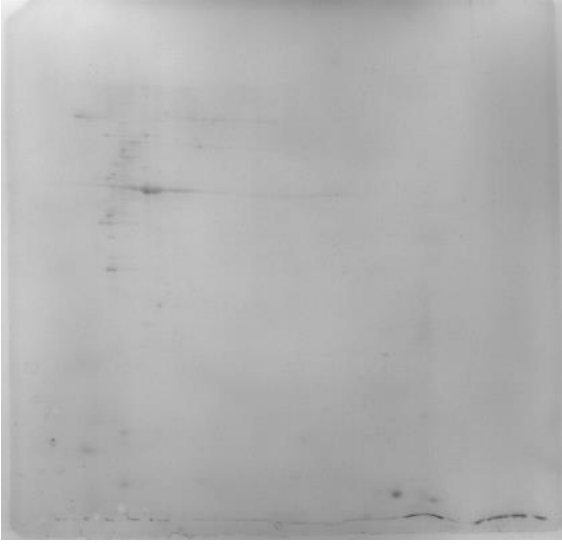
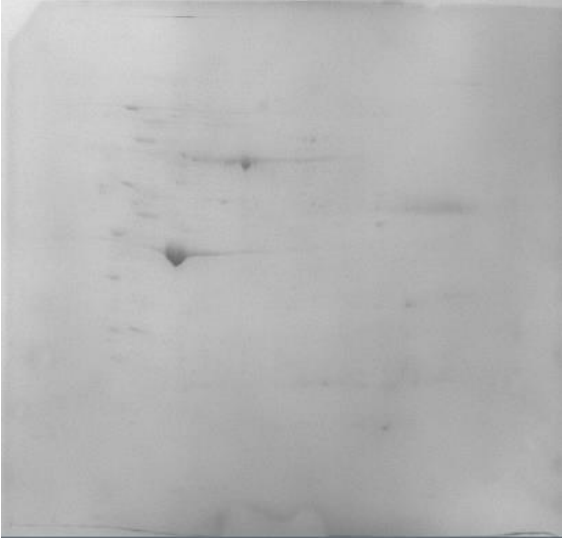


Resim 11. Adenokarsinom geç evre grubu tümörlü parankim örneklerinin 2D jel elektroforez görüntüleri

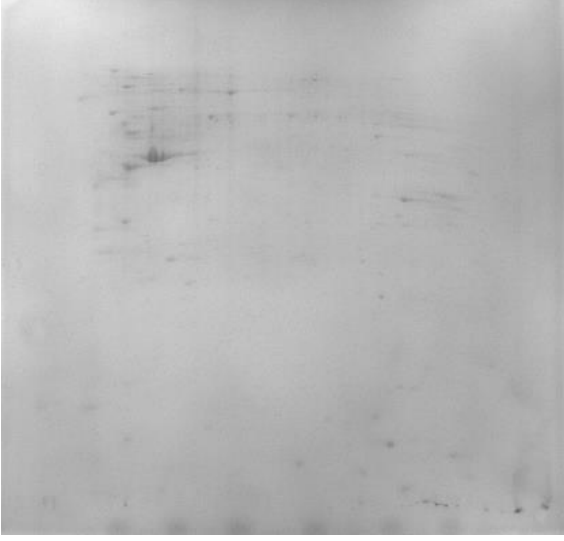
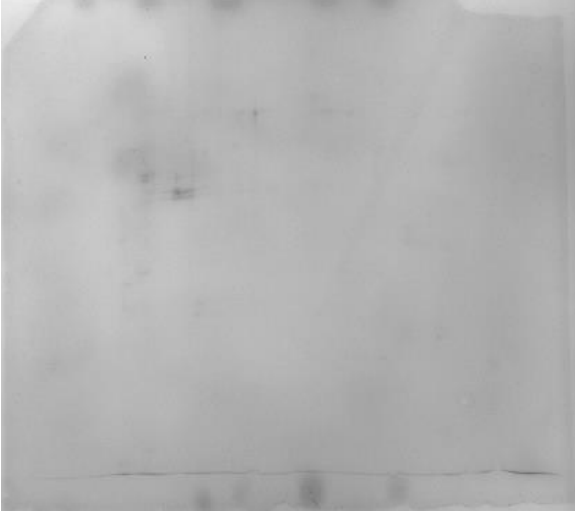
Jel elektroforez skuamöz hücreli karsinom hastalarında tümörlü ve normal parankim sonuçları



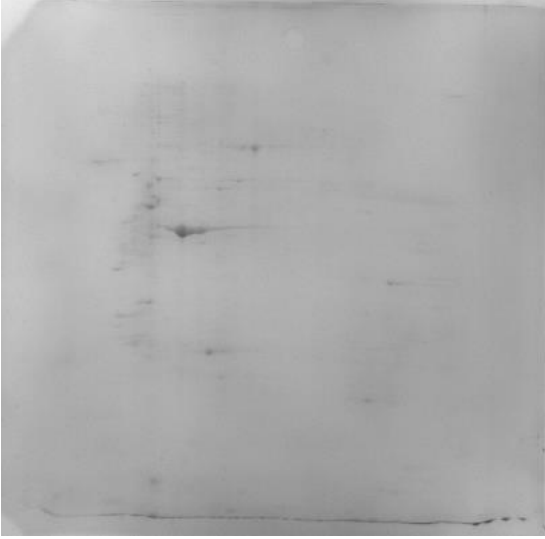
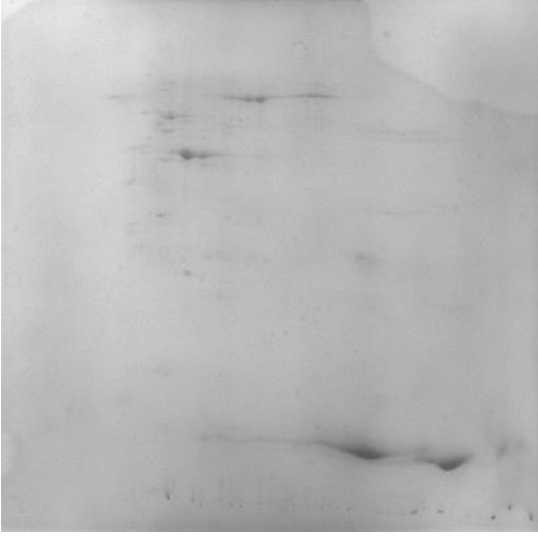
Resim 12. Skuamöz hücreli karsinom erken evre grubu normal parankim örneklerinin 2D jel elektroforez görüntüleri



Resim 13. Skuamöz hücreli karsinom geç evre grubu normal parankim örnekleri 2D jel elektroforez görüntüleri



Resim 14. Skuamöz hücreli karsinom erken evre grubu tümörlü parankim 2D jel elektroforez görüntüleri



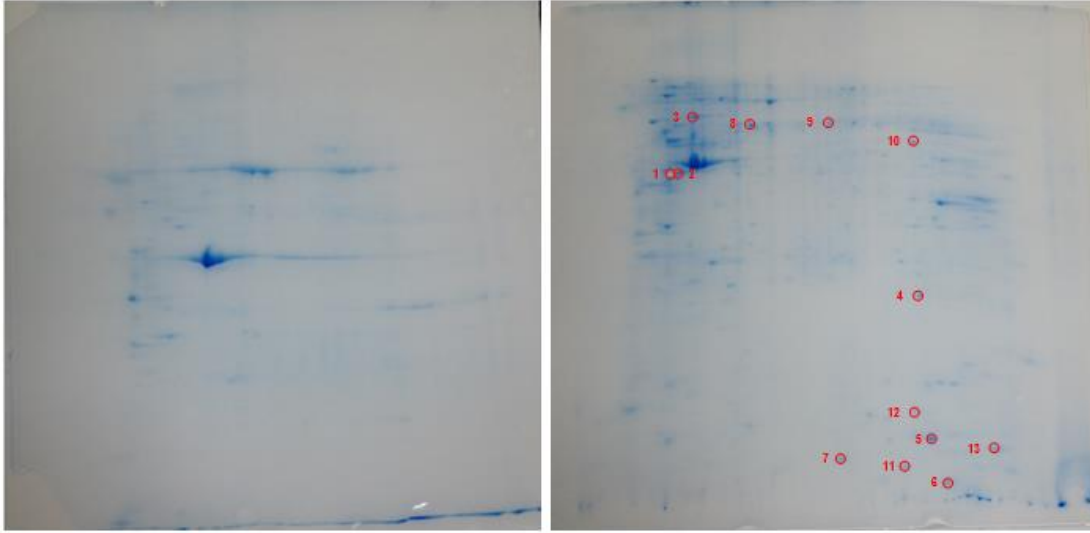
Resim 15. Skuamöz hücreli karsinom geç evre grubu tümörlü parankim örnekleri 2D jel elektroforez görüntüleri

MALDI-TOF kütle spektrometresi ile aynı hasta grubunda tümörlü doku ve sağlam parankimin karşılaştırılması

AC6

Normal

Tumor

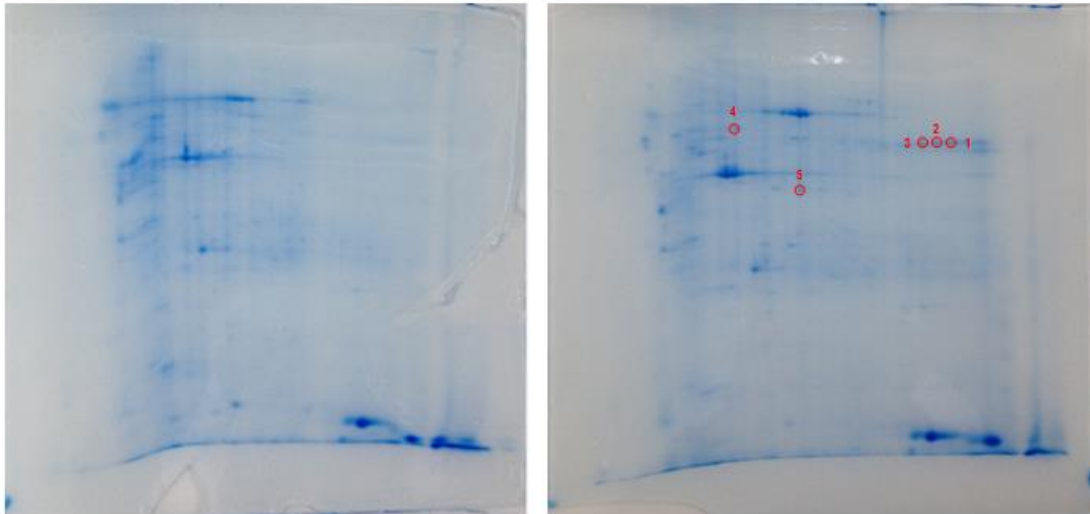


Resim16.Skvamöz hücreli karsinom MALDI spektrometre’de çalışılan spot örnekleri

AC52

Normal

Tumor



Resim17.Adenokarsinom MALDI spektrometre’de çalışılan spot örnekleri

Tablo18. Skuamöz hücreli karsinom alt grubunda saptanan hücre farklılıkları

SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM ALT GRUBUNDA SAPTANAN PROTEİN FARKLILIKLARI
1. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) 2. Annexin A2 isoform 2 3. Alpha-enolase isoform 1 4. Muscle-specific enolase 5. Endoplasmin precursor 6. Heat shock protein gp96 precursor 7. Tumor rejection antigen (gp96) 1 8. Actin, cytoplasmic 1 9. Chain A, Human Serum Albumin In A Complex With Myristic Acid And Tri- Iodobenzoic Acid 10. Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I 11. Vimentin 12. Carbonic anhydrase 1 13. Beta-globin 14. Myosin light chain 3 15. Actin, alpha skeletal muscle 16. Beta globin chain variant 17. Phospholipase C-alpha 18. 60 kDa heat shock protein, mitochondrial 19. Phospholipase C-alpha 20. 2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase

Tablo19. Adenokarsinom alt grubunda saptanan hücre farklılıkları

ADENOKARSİNOM ALT GRUBUNDA SAPTANAN PROTEİN FARKLILIKLARI
1. Beta-fibrinogen precursor, partial
2. Chaperonin (HSP60)

2 D jel ve MALDI kütle spektrometre sonuçlarına göre adenokarsinom tümörlü doku ile normal parankim protein profilinde 2 adet protein, Beta-fibrinogen precursor ve Chaperonin (HSP60) düzeylerinde farklılık saptandı. Bu iki proteinden sadece HSP60 proteininde erken ve geç evre tümör dokusunda normal parankime oranla anlamlı düzeyde ekspresyon saptadık ($p=0,0001$). Erken evre ve geç evre tümör dokularının protein profillerindeki farklılıkların karşılaştırmasında ise, erken ve geç evre alt gruplarında anlamlı istatistiksel fark saptamadık ($p=0,113$). Skuamöz hücreli karsinom tümörlü dokusu ile normal parankim dokusu arasında 20 adet protein farklılığı saptadık. Bunlardan sadece annexin2 proteini düzeyinde erken ve geç evre tümörlü dokularda, normal parankime oranla anlamlı düzeyde daha fazla ekspresyon olduğunu saptadık ($p=0,002$). Skuamöz hücreli karsinom alt grubunda, erken evre ve geç evre tümör dokularının protein profillerindeki farklılıkların karşılaştırmasında ise, iki grup arasında anlamlı istatistiki fark bulamadık ($p=0,181$).

TARTIŞMA

Akciğer kanserinde prognozu ve sağ kalım oranlarını tahmin etmek için kullanılan yaklaşım olguların evresidir. Akciğer kanserinin evrelemesinde yeni değişiklikler olsada, kanser olgularında tanı ve tedavinin kişiselleştirilmesi noktasına gelinmiştir. Yani olguya verilecek tedaviler sadece evresine göre değil, olgunun tümörünün sahip olduğu moleküler yapıya göre değişiklik gösterebilecektir.

Toplum temelli düşünüldüğünde ise günümüz sağlık politikaları ve kanser tedavisinde, önleme yaklaşımından sonra gelen en önemli basamak erken tanı ve erken tedavidir. Bu akciğer kanseri için erken evrede semptomatik hale gelmeden olguların tanısını koyarak, cerrahi ile tam tedavisini sağlamak olmalıdır. Klinik uygulamada akciğer kanseri olgularında tarama, tanı ve tedaviye yanıt radyolojik yaklaşımlarla yapılmaktadır. Fakat bu amaçla yapılan radyolojik tetkiklerin dışında klinik uygulamada kullanılan biyobelirteçler mevcut değildir.

Çalışmamızda akciğer adenokarsinom alt grubu için HSP60, skuamöz hücreli karsinom alt grubu içinse annexin2 proteininin akciğer kanserinin erken tanısında, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde klinikte kullanılabilecek biyobelirteçler olabileceğini belirledik

Çalışmada doku örnekleri değerlendirilen 36 olgunun %83,8’ü erkek cinsiyettedir. Bu literatürde akciğer kanserinin erkek cinsiyette daha sık görüldüğü bilgisi ile uyumludur.(23) Akciğer kanserine sebep olduğu bilinen en önemli faktör tütün mamülleri kullanımıdır. Çalışmaya dahil edilen olgulardan sadece 1 tanesi sigara kullanmamaktadır. Bu durum olgularda sigara kullanımına bağlı bronş sisteminde oluşacak inflamatuvar yanıtın gruplar arasında protein farklılıklarına etkisini minimuma indirmektedir. Olgularımızın yaşları homojen bir yapı göstermekte ve ortalama 61,86’dır. Bu yaş dağılımıda akciğer kanserinin en sık görüldüğü yaş grubu ile uyumludur. (23) Çalışmaya dahil edilen olgularımızın %58,4’üne akciğer kanseri için standart cerrahi yaklaşım olan lobektomi ve mediastinal lenf nodu disseksiyonu yapılmıştır ve uluslararası göğüs cerrahisi klinikleri ile benzerdir. (44) Bu istatistikler akciğer kanseri tanısı konan genel popülasyon özellikleriyle benzerlik göstermektedir ve çalışmamızın sonuçlarının güvenilirliğini artıran bir faktördür.

Kanser çalışmalarında 1994 yılında proteomik kavramı ortaya konduğundan buyana yapılan literatür çalışmalarında çoğunlukla ELİSA teknolojisi kullanılmıştır. Çalışmamızda tümör ve normal dokulardaki proteomik farklılıkları değerlendirme konusunda ELİSA ve diğer yöntemlere üstünlüğü gösterilmiş olan MALDI TOF kütle spektrometre kullanılmıştır.(99) MALDI spektrometresi proteinlerin amino asit dizilimlerini saptamada küçük örnekler üzerinde bile yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. (99) Çalışmamız bu açıdan en güncel yaklaşımla planlanmıştır ve literatürdeki bir çok çalışmaya göre daha doğru sonuçları elde ettiğimizi düşünmekteyiz. Literatürde akciğer kanseri üzerine yapılan az sayıda MALDI spektrometre çalışması çoğunlukla serum örneklerinde üzerinde yapılmıştır. Serum örneklerinin dinamik yapısı, çok fazla komplek yapı içermesi, serum toplamadaki standardizasyon problemleri, serumdaki proteaz aktivitesinin fazlalığı bu örnekler üzerinde yapılan çalışmaları sınırlamaktadır. Çalışmamızda olduğu gibi direkt dokuda saptanan proteomik farklılıkların bir sonraki aşamada serum örneklerinde çalışılması bu açıdan daha anlamlı sonuçlar verecektir. Az sayıda direkt tümör dokusu üzerinde yapılan çalışma patoloji tarafından formol içerisinde hazırlanan parafin bloklar üzerinde yapılmıştır ve protein yapıların çoğunlukla denatüre olma olasılığı mevcuttur. (100) Bu yaklaşımlar doğru proteomik yapıyı ortaya koymada bu çalışmaların en önemli kısıtlılığıdır. Daha önce yapılan literatür çalışmalarında tanımlanan proteinlerin çoğu inflamasyon, hücre farklılaşması, proliferasyon ve apoptoz gibi dinamik süreçler ile ilgili moleküllerdir. (101) Bu açıdan bakıldığında protein yapıların bozulmadan çalışmamızda olduğu gibi doğru yaklaşımla saklanması elde edilecek sonuçların doğruluğu açısından çok önemlidir. Çalışmamızda cerrahiden hemen sonra alınan taze dokular kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalara olan en önemli üstünlüğümüzün bu olduğunu düşünmekteyiz.

Akciğer kanserine yönelik çalışmamıza benzer taze doku örnekleri üzerinde yapılan tek çalışmada, kontrol grubu ile skuamöz hücreli akciğer kanseri tanısı konmuş dokularda 102 proteomik farklılık saptanmış ve bunlardan selenyum binding protein-1(SELENBP-1) bronş epitelinde akciğer kanserli olgularda azalan oranlarda bulunduğu gösterilmiştir. (102) Çalışmamızda skuamöz hücreli karsinom alt grubunda normal parankim ve tümör dokusu arasında saptadığımız proteomik farklılıklar arasında SELENBP-1 proteini yoktur. Skuamöz hücreli karsinom alt grubunda sadece annexin2 proteininde anlamlı farklılık saptadık. Bu açıdan çalışmamız literatürdeki bu çalışma ile uyuşmamaktadır.

Selenium polisiklik aromatik hidrokarbonların onkojenik etkilerini antagonize ederek kanser gelişimine karşı koruyucu etki göstermektedir ve bu etkiyi SELENBP-1 reseptörü üzerinden gösterir. Tümör hücrelerinin SELENBP-1 düzeylerindeki düşüklük skuamöz hücreli akciğer kanseri gelişiminde öncü belirteç olabileceği bu çalışmada belirtilmiştir. Çalışmada cerrahi sonrası alınan dokularda patoloji tarafından normal, skuamöz metaplazi, atipik hiperplazi, karsinoma in situ, invaziv skuamöz hücreli akciğer kanseri olduğu gösterilen doku örnekleri kullanılmıştır. Skuamöz hücreli karsinom tanısı alan olgular cerrahi olarak tedavi edilmiş, kemoterapi ve radyoterapi tedavileri almaya gerek görülmeyen olgular arasından seçilmiştir. Sonuç olarak çalışmada skuamöz hücreli karsinom alt grubunda 102 proteomik farklılık saptanırken çalışmamızda toplamda 20 proteomik farklılık olduğu görülmüştür. Bu açıdan bakıldığında çalışmanın hem çok erken evre lezyonlarda yapılması hemde daha çok proteomik yapı saptanması, olguların semptom vermeden erken tanısının konmasında, çalışmamızdan daha ayrıntılı ve doğru sonuçlar verdiğini düşündürmektedir. Fakat bu çalışmanın kaç olgu üzerinde yapıldığı ve kontrol grubu olarak kullanılan materyalin özellikleri belirtilmemiştir. Proteomik farklılıkların sadece tümör dokularında değil premalign lezyonlardada çalışılması ve hangi lezyonların malign ilerleme göstereceği kesin olmadığı için anlamsız sonuçlarda vermiş olabilir. Bu parametreler göz önüne alınınca iki çalışma arasındaki farklılığın nereden kaynaklandığını söylemek tam olarak mümkün değildir.

Çalışmamızda adenokarsinom alt grubu için tümörlü ve normal parankim arasında 2 adet, skuamöz hücreli karsinom tümörlü ve normal parankim için ise 20 adet proteomik farklılık saptadık. Chi-square testi ile İstatistiki değerlendirme sonrası adenokarsinom alt grubunda chaperonin (HSP60) proteininde ($p=0,0001$) erken ve geç evre adenokarsinom olgu grubunda kendi normal parankimine oranla istatistiksel olarak anlamlı farkı saptadık. HSP60 proteini hücrede mitokondride, sitoplazmada ve hücreler arası matrikste bulunabilir. Mitokondri proteinleriyle etkileşime girerek bunların doğru uzaysal konfigrasyonda olmalarını sağlar. Ayrıca literatürde tümör hücrelerinin büyümesi ve yaşamda kalmalarını desteklediği gösterilmiştir. Apoptoz sırasında sito-protektif etki göstererek tümör hücrelerinin ölümünü engellediği saptanmıştır. (103) Literatürde HSP60 proteini ile akciğer adenokarsinomu üzerine Xu X. Ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 103 olguda HSP60 proteinine yönelik immünohistokimyasal boyama ile, HSP60 proteinindeki ekspresyon artışının hastalıksız sağkalım konusunda bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Klinik uygulamada akciğer adenokarsinomu tanısı almış

olgularda prognozu saptamada önemli bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. (104) Bu aşamada çalışmamızda olguların prognozları üzerine bir değerlendirme yapmak erkendir. Bu amaçla olgularımızın uzun dönem takipleri yapıldıktan sonra elde edilecek sonuçlar değerlendirilmelidir. Ayrıca bu literatür çalışmasında akciğer kanserinin erken tanısında HSP60 proteininin önemli bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir ve bu açıdan çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir. Akciğer kanseri dışında HSP60 proteini seröz over karsinomlarında prognoz ve tedaviye yanıt takibi açısından önemli bir biyobelirteç olduğu saptanmıştır. Hjerpe E. ve arkadaşlarının over kanrsinomlu olgularda yaptığı bu çalışmada HSP60 proteini eksprese olan olgularda ortalama sağ kalım 31 ay, eksprese olmayan olgularda ise 60 ay olarak saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmanın önemli sonuçlarından biride HSP60 proteinini hedefleyen kemoterapi tedavilerinin sağ kalımı artırabileceği olmuştur. (105) Over kanseri için saptanan sonuçlar çalışmamızdaki akciğer adenokarsinom alt grubunda saptadığımız yüksekliği desteklemekte ve aynı sonuçların akciğer kanseri içinde geçerli olabileceğini düşündürmektedir.

Akciğer kanseri skuamöz hücreli karsinom alt grubunda ise 20 adet protein farklılığından bir tanesindeki farklılığı anlamlı olarak saptadık ($p=0,002$). Annexin a2 izoform-2 proteinini erken ve geç evre skuamöz hücreli karsinom olgularında artmış olarak belirledik. Annexin 2 olarakda isimlendirilen bu protein kalsiyum bağımlı fosfolipit bağlayıcı proteinler grubundadır. Hücre büyümesinde, sinyal iletim yollarında işlev görür. Hücre iskeleti ile bağlantılı olarak endositoz, ekzositoz, fibrinoliz, iyon kanallarının oluşturulması ve hücre motilitesi üzerine de etkiler gösterir. Annexin 2 asıl olarak pleyotropik bir proteindir ve fonksiyonu hücre içerisinde nerede ve ne zaman bulunduğuna göre değişiklik göstermektedir. (106) Annexin 2 proteininin tümörögenizde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Hücre proliferasyonu, apoptoz, morfoloji kontrolü, transkripsiyonel düzenlemeler, invazyon, metastaz, anjiogenez ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (107-108-109) Wang P. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre annexin 2 proteinin akciğerden yapılan surfaktan salgısının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. (110) Qi Yj. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; özefagus kanserinde malignleşme sürecinde annexin 2 proteini ekspresyonunda, malignleşme göstermeyen premaling lezyonlara göre azalma saptanmıştır. Ayrıca prostat kanseri ve osteosarkom tanılı metastaz saptanan olgularda annexin 2 protein oranlarında azalma gösterilmiştir. Bu kanser türlerinde annexin 2 protein ekspresyonundaki düşüşten farklı olarak akciğer karsinomları, primer nöroektodermal tümör, karaciğer kanserleri, kolorektal kanserler,

mide kanserleri, pankreas kanserleri, akut promyelositik lösemi ve dudak skuamöz hücreli karsinomunda annexin 2 protein düzeyleri artmış olarak saptanmıştır. Bu literatür bilgileri ışığında annexin 2 proteinin değişik tümörler üzerine etkisi pleyotropik doğasının özelliklerindeki yansıtacak şekilde tümöre ve dokuya özgü özellikler göstermektedir.(111) Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç olarak, annexin proteinindeki erken ve geç evre olgularda saptanan ekspresyon yüksekliği literatür ile uyumludur. Annexin 2 proteiniyle ilgili olarak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ve literatür bilgileriyle olan uyumu bu proteinin akciğer skuamöz hücreli karsinom alt grubu için erken tanıda önemli bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Bu protein ile erken tanı için yapılabilecek çalışmalar dışında, literatürde akciğer kanserinde metastaz yapma potansiyeli, olguların prognozu üzerine bilgiler edinmek için kullanılabilecek bir biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir.(112) Ayrıca karsinogenez aşamasındaki rolü ayrıntılı olarak ortaya konduktan sonra yeni kemoterapi tedavileri için hedef molekül olma potansiyelide vardır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda adenokarsinom alt grubundaki olguların erken ve geç evre tümörlü dokusunda chaperonin (HSP60) proteinini diğer kanser türlerinde gösterildiği gibi literatür ile uyumlu olarak anlamlı değerde yüksek saptadık. Ayrıca skuamöz hücreli karsinom alt grubunda da erken ve geç evrede annexin 2 proteinin ekspresyonunda anlamlı yükselmeyi belirledik. Akciğer kanserinde adenokarsinom grubunda HSP60'ın, skuamöz hücreli karsinom alt grubunda annexin 2 proteinin klinik uygulamada erken tanıda kullanılabilecek bir biyobelirteç olduğunu saptadık. Literatürdeki proteomiks konusundaki yayınlar bizi bu anlamda desteklemektedir.

Akciğer kanserinde tümör dokusundaki proteomik farklılıklar karsinogenez konusunda bize ayrıntılı bilgi verecektir. Literatürde yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi HSP60 proteinini, over kanseri olgularında klinik rutinde olgunun prognozunu, tümörün metastaz yapabilme potansiyellerini gösterebilecektir. Cerrahi yada diğer tedavi seçenekleriyle kür sağlanmış olguların tedavi yanıtı ve nüks açısından takibinde ek bilgiler verebilecektir.

Adenokarsinom grubunda HSP60, skuamöz hücreli karsinom grubunda annexin2 proteinlerindeki izole yükseklik farkları, bu proteinlerin akciğer kanserinin en sık görülen patolojik alt tipleri adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom ayırıcı tanısında yardımcı olabilecek potansiyele sahiptir. Hatta HSP60 ve annexin2 proteinine yönelik yapılacak ileri çalışmalarla, bu iki proteini hedefleyen yeni kemoterapi protokolleri tanımlanabilecektir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların klinik uygulamada karşılığı olabilmesi için daha fazla olgu üzerinde çalışma yapılması uygundur. Çalışmada değerlendirilen materyallerin alındığı olgular ülkemizdeki sınırlı bir popülasyonu yansıtmaktadır. Elde edilen sonuçların farklı ırk ve toplumlarda yapılacak benzer çalışmalarla birlikte değerlendirilmesi daha sağlıklı olacaktır. Ayrıca çalışmamızda olguların kontrol grubu olarak kendi sağlam parankimleri kullanılmıştır. Aynı proteomik farklılıkların benzer demografik özelliklere sahip, risk grubunda olan bir kontrol grubuyla karşılaştırılması bize ek bilgiler sağlayacaktır.

Tanımladığımız bu iki proteinin klinikte kullanılabilecek bir biyobelirteç olabilmesi için serum örneklerinde western blot ya da ELISA gibi yöntemlerle ile saptanabilir olması

kullanımını uygun hale getirebilecektir. Olguların prognozunu değerlendirme amaçlı geniş olgu serilerinde, bu proteinlere yönelik immünohistokimyasal boyalarla yapılacak uzun dönem takiplere dayalı çalışmalarda çok değerli bilgilere ulaşılabilecektir. Ayrıca daha geniş serilerde protein ekspresyon farklarının belirlenmesi ve bu çalışmadaki olguların uzun süre takipleri ile klinik veriler de ki değişikliklerinin belirlenmesi bu proteinlerin metastaz, tedavi yanıtı ve sağ kalım gibi diğer parametreler açısından önemli olup olmayacağını daha ayrıntılı gösterebilecektir. Akciğer kanser dokularında proteomik temelli yapılan bu çalışma ile HSP 60 ve annexin2 proteinlerinin olası iki biyobelirteç olabileceği ortaya konmuştur. Bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olup hasta sayısının artırılarak daha geniş serilerde yeni proteinlerin tanımlanması ve bu proteinler de ki değişimlerin diğer standart laboratuvar yöntemleriyle konfirme edilmesi gerekmektedir. Dünyada ve ülkemizde en sık görülen akciğer kanseri olgularının tanı ve tedavilerine yönelik olarak bu proteinlerin düzeylerinin belirlenmesinin hem olgulara hem de bilimsel literatüre katkı sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1166-96.
2. Parkin GM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 33-64.
3. Jemal A, Thomas A, Murray T et al. Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 23-47.
4. Shields TW. 'General Thoracic Surgery', 2009; Volume 2; 7th Edition, Lippincott Williams and Wilkins.
5. Marcus PM, Bergstralh EJ, Fagerstrom RM, et al. *Natl Cancer Inst.* 2000;92(16):1308.
6. U.S. Preventive Services Task Force SO *Ann Intern Med.* 2004;140(9):738.
7. Marcus PM, Bergstralh EJ, Zweig MH et al. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(11):748.
8. Berlin NI, Buncher CR, Fontana RS et al. *Rev Respir Dis.* 1984;130(4):545.
9. Frost JK, Ball WC Jr, Levin ML, Tockman MS, Baker RR, Carter D, Eggleston JC, Erozan YS, Gupta PK, Khouri NF SO *Am Rev Respir Dis.* 1984;130(4):549.
10. Melamed MR SO *Cancer.* 2000;89(11 Suppl):2356
11. Stitik FP, Tockman MS. SO *Radiol Clin North Am.* 1978;16(3):347.
12. Bach PB, Jett JR, Pastorino U, Tockman MS, Swensen SJ, Begg CB SO *JAMA.* 2007;297(9):953.
13. Veronesi G, Maisonneuve P, Bellomi M, Rampinelli C, et al. SO *Ann Intern Med.* 2012 Dec;157(11):776-84.
14. Zeng X. Lung Cancer serum Biomarker Discovery Using Glycoprotein Capture and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 2010;9:6440-6449.
15. Kang SM. The Haptoglobin beta chain as a supportive biomarker for human lung cancers. *Molecular BioSystems* 2011;7: 1167-1175.
16. Groseclose MR. High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics* 2008; 8:3715-3724
17. Ocak S. Mass Spectrometry-based Proteomic Profiling of Lung Cancer. *Proceedings of the American thoracic Society*, 2009;6:159-170

18. Kondo Tadashi. Tissue proteomics for cancer biomarker development-Laser microdissection and 2D-DIGE- BMB reports, 2008: 626-634.
19. Tang C, Luo D, Yang H, et al. Expression of SHP2 and Related Markers in Non-Small Cell Lung Cancer: A Tissue Microarray Study of 80 Cases. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2013
20. Tang H, Xiao G, Behrens C, et al. A 12-Gene Set Predicts Survival Benefits from Adjuvant Chemotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. Clin Cancer Res. 2013, (Epub ahead of print).
21. World Health Organization internet sitesi. International Agency for Research on Cancer (IARC) GLOBOCAN 2008, section for cancer information. Web adresi (<http://globocan.iarc.fr/>)
22. Novello S, Baldini E. Women and lung cancer. Ann oncology 2006;17 suppl2: 79-82
23. Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey 1994-1998. Respiration 2002;69:207-10.
24. De Leyn P, Vansteenkiste J, Cuypers P, Van Raemdonck D, Coosemans W, Verschakelen J, Lerut T. Role of cervical mediastinoscopy in staging of non-small cell lung cancer without enlarged mediastinal lymph nodes on CT scan. Eur J Cardiothorac Surg. 1997;12:706-12.
25. Tolaza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. Chest. 2003;123:137-46.
26. Kameda K, Adachi S, Kono M. Detection of T-factor in lung cancer using magnetic resonance imaging and computed tomography. J Thorac Imaging. 1988;3:73-80.
27. Dwamena BA. Metastases from NSCLC: Mediastinal staging in the 1990s-Meta-analytic comparison of PET and CT. Radiology 1999; 213:530-6.
28. Kumanlıoğlu K, Değirmenci B. Akciğer kanserlerinde nükleer tıbbın yeri. In: Haydaroğlu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2000: 139-46.
29. Ayesha S. Bryant, MSPH, MD, and Robert James Cerfolio, MD, FACS. The Maximum Standardized Uptake Values on Integrated FDG-PET/CT Is Useful in Differentiating Benign From Malignant Pulmonary Nodules. Ann Thorac Surg 2006;82:1016-20.

30. Kumanlıoğlu K, Değirmenci B. Akciğer kanserlerinde nükleer tıbbın yeri. In: Haydaroglu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2000: 139-46.
31. Schenk DA, Bower JH, Bryan CL, Currie RB, Spence TH, Duncan CA, Myers DL, Sullivan WT. Transbronchial needle aspiration staging of bronchogenic carcinoma. *Am Rev Respir Dis.* 1986;134:146-8
32. Demirhan R, Küçük HF, Sancaklı İ, Özdemir N, Özyurt Y, Bilgin S, Kurt N, Gülmen M. Servikal mediastinoskopi uygulanan 36 olgunun değerlendirilmesi. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;11:178-80
33. Carlen E. Mediastinoscopy: a method for inspection and tissue biopsy in the superior mediastinum. *Dis Chest.* 1959;36:343-52.
34. Kirschner P. Extended mediastinoscopy. In Jepsson O, Rubeck-Soransen H, eds. *Mediastinoscopy.* Odense, Denmark. Odense University Press 1971:131.
35. Rinsberg RJ, Rice TW, Golberg M, Waters PF, Schmock BJ. Extended cervical mediastinoscopy. A single staging procedure for bronchogenic carcinoma
36. De Leyn P, Lardinois D, Van Schil PE, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M, Waller DA, Lerut T, Weder W. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;32:1-8
37. Zhong L, Hidalgo GE, Stromberg AJ, et al. Using protein microarray as a diagnostic assay for non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1308
38. Pass HI. International staging system for lung cancer. *Lung Cancer.* Lippincott Williams and Wilkins, second edition. 2000; 591-601
39. Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986;89:225
40. American Joint Committee on Cancer (AJCC). Lung. In: Beahrs OH, Hensen E, Hutter RVP, et al. Eds. *Manual for staging cancer.* Ed 4. Philadelphia: JB Lippincott, 1992
41. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111:1710-1717
42. Ward HB, Pliego M, Diefenthal HC, et al. The impact of phantom CT scanning on surgery for the solitary pulmonary nodule. *Surgery* 1989; 106:734-738
43. Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey 1994-1998. *Respiration* 2002;69:207-10.

44. López-Encuentra A, García-Luján R, Rivas JJ, et al. Comparison between clinical and pathologic staging in 2,994 cases of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005; 79:974
45. Ginsberg RJ, Port JL. Surgical therapy of stage I and stage II nonsmall cell lung cancer. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH et al; eds. *Lung cancer principles and practice*. Philadelphia: Lippicott Williams&Wilkins; 2000: 682-93.
46. Warren WH, Faber LP. Segmentectomy versus lobectomy in patients with stage I pulmonary carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:1087-94.
47. Johnson D, Arriagada R, Barthelemy N et al. Postoperative adjuvant therapy for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 17(Suppl1): 23s-25s.
48. PORT Meta-analysis Trialists' Group: Postoperative radiotherapy in NSCLC: Systematic review and metaanalysis of individual patient data from nine randomized controlled trials. *Lancet* 1998; 352: 257-63.
49. Rowell NP, Williams CJ. Radical radiotherapy for stage I/II nonsmall cell lung cancer in patients not fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review. *Thorax* 2001; 56: 628-38.
50. Douillard J.Y, Rosell R, De Lena M. A prospective randomized study of aAdjuvant chemotherapy with navelbine + cisplatin in completely resected non small cell lung cancer.
51. Pepe C, Hasan B, Winton TL, et al. Adjuvant vinorelbine and cisplatin in elderly patients: National Cancer Institute of Canada and Intergroup Study JBR.10. *J Clin Oncol* 2007; 25:1553.
52. Depierre A, Milleron M, Moro-Sibilot D, et al. Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (Except T1N0), II, and IIIa Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO*; 2002: 247-253.
53. Pisters KW. Adjuvant ve neoadjuvant therapy for early stage nonsmall cell lung cancer. *Semin Oncol* 2001; 28(4S14): 23-28.
54. Rusch VW, Giroux DJ, Kraut MJ et al. Induction chemoradiation and surgical resection for non-small cell lung carcinoma of the superior sulcus: Initial results of Southwest Oncology Group trial 9416 (Intergroup trial 0160). *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 472-83.

55. PORT Meta-analysis Trialists' Group: Postoperative radiotherapy in NSCLC: Systematic review and metaanalysis of individual patient data from nine randomized controlled trials. *Lancet* 1998; 352: 257-63.
56. Gandara DR, Leigh B, Vallieres E, Albain KS. Preoperative chemotherapy in stage III non-small-cell lung cancer: long term outcome. *Lung Cancer* 1999; 26: 3-6.
57. Waller D, Peake MD, Stephens RJ et al. Chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer: the surgical setting of the Big Lung Trial. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:173-82.
58. The International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350:351-60.
59. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1166-96
60. Fontham ET, Correa P, Reynolds P, et al. Environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking women. A multicenter study. *JAMA* 1994; 271:1752.
61. Tong L, Spitz MR, Fueger JJ, Amos CA. Lung carcinoma in former smokers. *Cancer* 1996; 78:1004.
62. Patz EF Jr, Goodman PC, Bepler G. Screening for lung cancer. *N Engl J Med* 2000; 343:1627.
63. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111:1710
64. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 2011; 365:395.
65. Brenner DJ. Radiation risks potentially associated with low-dose CT screening of adult smokers for lung cancer. *Radiology* 2004; 231:440.
66. Mascalchi M, Belli G, Zappa M, et al. Risk-benefit analysis of X-ray exposure associated with lung cancer screening in the Italung-CT trial. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187:421.
67. van den Bergh KA, Essink-Bot ML, Borsboom GJ, et al. Long-term effects of lung cancer computed tomography screening on health-related quality of life: the NELSON trial. *Eur Respir J* 2011; 38:154.

68. Manser R, Lethaby A, Irving LB, et al. Screening for lung cancer. Cochrane Database Syst Rev 2013; 6:CD001991
69. Berlin NI, Buncher CR, Fontana RS, et al. The National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Detection Program. Results of the initial screen (prevalence). Early lung cancer detection: Introduction. Am Rev Respir Dis 1984; 130:545.
70. Brett GZ. The value of lung cancer detection by six-monthly chest radiographs. Thorax 1968; 23:414.
71. Marcus PM, Bergstralh EJ, Fagerstrom RM, et al. Lung cancer mortality in the Mayo Lung Project: impact of extended follow-up. J Natl Cancer Inst 2000; 92:1308
72. Melamed MR. Lung cancer screening results in the National Cancer Institute New York study. Cancer 2000; 89:2356.
73. Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB, et al. Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York. Chest 1984; 86:44.
74. Kubik A, Parkin DM, Khlat M, et al. Lack of benefit from semi-annual screening for cancer of the lung: follow-up report of a randomized controlled trial on a population of high-risk males in Czechoslovakia. Int J Cancer 1990; 45:26.
75. U.S. Preventive Services Task Force. Lung cancer screening: recommendation statement. Ann Intern Med 2004; 140:738
76. Sobue T. A case-control study for evaluating lung cancer screening in Japan. Cancer 2000; 89:2392.
77. National Lung Screening Trial Research Team, Church TR, Black WC, et al. Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer. N Engl J Med 2013; 368:1980.
78. Sagawa M, Tsubono Y, Saito Y, et al. A case-control study for evaluating the efficacy of mass screening program for lung cancer in Miyagi Prefecture, Japan. Cancer 2001; 92:588.
79. Infante M, Brambilla G, Lutman F, et al. DANTE: a randomized trial on lung cancer screening with low-dose spiral CT (LDCT): initial announcement. Chest 2003; 124:118S.

80. de Koning HJ, Plevritis S, Hazelton WD, et al. Benefits and Harms of Computed Tomography Lung Cancer Screening Programs for High-Risk Populations. Agency for Healthcare Research and Quality; Rockville, MD, MD 2013.
81. Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M, U.S. Preventive Services Task Force. Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2004; 140:740.
82. Jaklitsch MT, Jacobson FL, Austin JH, et al. The American Association for Thoracic Surgery guidelines for lung cancer screening using low-dose computed tomography scans for lung cancer survivors and other high-risk groups. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012; 144:33.
83. Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* 2003; 123:2115.
84. Petty RD, Nicolson MC, Kerr KM, et al. Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3237.
85. Baryshnikova E, Destro A, Infante MV, et al. Molecular alterations in spontaneous sputum of cancer-free heavy smokers: results from a large screening program. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1913.
86. Henschke CI. Medicine on lung cancer screening: a different paradigm. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1143.
87. George PJ. Fluorescence bronchoscopy for the early detection of lung cancer. *Thorax* 1999; 54:180.
88. Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* 1999; 353:1930.
89. Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, et al. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:1286.
90. Petty RD, Nicolson MC, Kerr KM, et al. Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3237.
91. Rahman SM, Shyr Y, Yildiz PB, et al. Proteomic patterns of preinvasive bronchial lesions. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1556.

92. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *BMJ* 1995;311:899-909.
93. Michael Kinter and Nicholas E.Sherman. protein sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry ISBN 0-471-32249-0 Copyright 2000 Wiley-interscience, inc
94. Howard BA et al. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis. *Proteomics*, 2003;3: 1720-1724
95. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002;8: 816–24.
96. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13790–95.
97. López E, Cho WC. *Int J Mol Sci.* 2012 Sep 26;13(10):12287-314. doi: 10.3390/ijms131012287.
98. Tessitore A, Gaggiano A, Ciciarelli G, Verzella D, Capece D, Fischietti M, Zazzeroni F, Alesse E. *Int J Proteomics.* 2013;2013:125858. doi: 10.1155/2013/125858. Epub 2013 Jan 15.
99. Yang J, Song YC, Song TS, Hu XY, Guo YM, Li ZF, Dang CX, Huang C. *J Clin Lab Anal.* 2012 May;26(3):148-54. doi: 10.1002/jcla.21502.
100. Hassanein M, Callison JC, Callaway-Lane C, Aldrich MC, Grogan EL, Massion PP. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012 Aug;5(8):992-1006. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0441. Epub 2012 Jun 11. Review.
101. Zeng GQ, Yi H, Zhang PF, Li XH, Hu R, Li MY, Li C, Qu JQ, Deng X, Xiao ZQ. *PLoS One.* 2013 Aug 19;8(8):e71865. doi: 10.1371/journal.pone.0071865.
102. Nakamura H, Minegishi H. *Curr Pharm Des.* 2013;19(3):441-51. Review.
103. Xu X, Wang W, Shao W, Yin W, Chen H, Qiu Y, Mo M, Zhao J, Deng Q, He J. *J Surg Oncol.* 2011 Nov 1;104(6):598-603. doi: 10.1002/jso.21992. Epub 2011 Jun 13.
104. Hjerpe E, Egyhazi S, Carlson J, Stolt MF, Schedvins K, Johansson H, Shoshan M, Avall-Lundqvist E. *Int J Gynecol Cancer.* 2013 Mar;23(3):448-55. doi: 10.1097/IGC.0b013e318284308b.

105.www.wikipedia.org

106.Lokman N.A. et al. 2011 the role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenviron.* 4, 199-208.

107.Zhao P, et al. 2011 HAb18G/CD147 promotes cell motility by regulating annexin II-activated RhoA and Rac1 signaling pathways in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 54, 2012–2024.

108.Hollås H, et al. 2006 Annexin A2 recognises a specific region in the 3'-UTR of its cognate messenger RNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1325–1334.

109.Wang P, Chintagari NR, Gou D, Su L, Liu L. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Oct;37(4):467-76. Epub 2007 Jun 15.

110.Qi YJ, He QY, Ma YF, Du YW, Liu GC, Li YJ, Tsao GS, Ngai SM, Chiu JF. *J Cell Biochem.* 2008 Aug 1;104(5):1625-35. doi: 10.1002/jcb.21727.

111.An N, Zhu W, Feng Z, Ye S, Yu C, Cai C. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2008 Jun 20;11(3):311-20. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2008.03.018. Chinese.