

**BETÜL ÇELİK**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**DOKTORA TEZİ**

**İSTANBUL-2022**



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA KIFC1  
PROTEİNİNİN EKSPRESYON VE METİLASYON  
PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BETÜL ÇELİK**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. NECAT VAKUR OLGAÇ**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI  
KANSER GENETİĞİ BİLİM DALI**

**İSTANBUL-2022**

**TEZ ONAYI**

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



**BEYAN**



## İTHAF

Değerli aileme ithaf ediyorum...

## TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitü Müdürü Prof. Dr. Bülent Zülfikar'a,  
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Bilge Becerir'e,  
Doktora eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Necat Vakur Olgaç'a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyiminden faydalandığım eş tez danışmanım Prof.Dr. Hülya Yazıcı'ya,

Doktora tezimi hazırlamamda ve tüm doktora eğitim sürecinde yardımını esirgemeyen Enstitü Müdür Yardımcısı ve Kanser Genetiği Bilim Dalı Başkanı Dr. Öğr. Üyesi Şeref Buğra Tunçer'e

Çalışmaktan büyük zevk aldığım Temel Onkoloji Bilim Dalı çalışma arkadaşlarım Dr. Sena Şen'e, Dr. Seda Kılıç Erciyas'a, Dr. Zübeyde Yalnız Kayım'a, Dr.Özge Şükriüoğlu Erdoğan'a, Dr. Demet Akdeniz Ödemiş, Arzu Burnuva, Türkan Şen Feradoğlu, Büşra Kurt ve ismini sayamadığım tüm çalışma arkadaşlarıma,

Kıymetli arkadaşım Dr.Öğr. Üyesi Özge Pasin'e,

Hayallerimi gerçekleştirmede desteklerini maddi ve manevi olarak hep hissettiğim annem ve babam Meral ve Nurhan Çelik'e, kızkardeşlerim M.Gülhan Çelik Çal ve Zeynep Çelik Alpay'a sevgi ve saygılarımı teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36429

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xiv
ÖZET .....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
ZUSAMMENFASSUNG / RESUME.....	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Epigenetik .....	3
2.1.1. DNA Metilasyonu .....	4
2.1.1.1. DNA Hipermetilasyonu .....	5
2.1.1.2. DNA Hipometilasyonu.....	5
2.1.2. Histon Modifikasyonu.....	6
2.1.3. miRNA Regülasyonu .....	6
2.2. Akciğer Kanseri .....	7
2.2.1. Akciğer Anatomisi .....	7
2.2.2. Akciğer Kanserinin Orijin Hücreleri.....	8
2.2.3. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi .....	10
2.2.4. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	13
2.2.5. Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	16
2.2.6. Akciğer Kanseri Histopatolojisi.....	19
2.2.6.1. Öncü Glandüler Lezyonlar .....	20
2.2.6.2. Adenokarsinom .....	20
2.2.6.3. Adenoskuamöz Karsinom .....	21
2.2.6.4. Skuamöz hücreli karsinom.....	21

2.2.6.5. Büyük Hücreli Karsinom .....	21
2.2.6.6. Sarkomatoid Karsinom.....	22
2.2.6.7. Küçük Hücreli karsinom .....	22
2.2.7. Akciğer Kanseri Evrelemesi .....	22
2.2.8. Akciğer Kanseri Prognozu .....	24
2.2.8.1. KHDAK Prognozu .....	24
2.2.8.2. KHAK Prognozu .....	24
2.2.9. Akciğer Kanseri Tanı ve Tarama Yöntemleri.....	25
2.2.9.1. Yüksek Riskli Grupları Tarama .....	25
2.2.9.2. Radyografik Tarama ve Tanı .....	25
2.2.9.3. Sputum Muayenesi.....	25
2.2.9.4. Bronkoskopi ve Akciğer Doku Biyopsisi .....	26
2.2.10. Akciğer Kanserinde Kullanılan Biyobelirteç Numuneleri.....	26
2.2.10.1. Sputum .....	26
2.2.10.2. Bronkoalveolar Lavaj (BAL) .....	27
2.2.10.3. Periferik Kan .....	27
2.2.10.4. İdrar .....	28
2.2.11. Akciğer Kanseri Tedavisi.....	28
2.2.12. Akciğer Kanserinin Önlenmesi.....	29
2.3. KIFC1 (Kinesin Süper Ailesi C1) Proteini ve Kanseri .....	29
2.3.1. KIFC1 Proteinin Yapısal Özellikleri.....	29
2.3.2. KIFC1 Proteinin Hücredeki Fonksiyonları .....	30
2.3.3. KIFC1 Proteininin Kanserdeki Rolü.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. MATERYAL .....	36
3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	36
3.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar .....	37
3.2. YÖNTEM .....	38
3.2.1. Hastalara ait Taze Doku ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması .....	38
3.2.2. Hasta ve Kontrol Örnek Kanlarından Lenfosit Eldesi .....	38
3.2.3. Hasta ve Kontrol Örnek Kanlarından Serum Eldesi .....	38
3.2.4. Hastalara Ait Taze Tümör ve Eşlenik Normal Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	38

3.2.5. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Serum Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	40
3.2.6. Taze Doku ve Lenfosit Örneklerinden RNA İzolasyonu .....	41
3.2.7. Metilasyon ve Ekspresyon Tespiti için Primer Dizayını .....	42
3.2.8. Metilasyon Deneylei .....	43
3.2.8.1. Bisülfid Dönüşümü .....	43
3.2.8.2. <i>KIFC1</i> Geninin Metilasyon Spesifik PCR Yöntemi ile Analizi .....	45
3.2.8.3. Yatay Jel Elektroforezi .....	45
3.2.9. <i>KIFC1</i> Ekspresyon Deneylei .....	46
3.2.9.1. cDNA Sentezi .....	46
3.2.9.2. <i>KIFC1</i> Gen Ekspresyonunun Real-Time Yöntemi ile Analizi .....	47
3.2.10. İstatistiksel Analiz .....	47
4. BULGULAR .....	49
4.1. Akciğer Kanserli Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri .....	49
4.2. <i>KIFC1</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	51
4.3. <i>KIFC1</i> Geninin Metilasyon Analizi .....	61
4.3.1. Tümör Dokularının Metilasyon Analizi .....	62
4.3.2. Tümöre Eşlenik Normal Dokuların Metilasyon Analizi .....	64
4.3.3. Hasta Serum Örneklerinin Metilasyon Analizi .....	67
4.3.4. Sağlıklı Kontrol Serum Örneklerinin Metilasyon Analizi .....	69
4.3.5. Akciğer Kanserli Hastalara Ait Tümör, Eşlenik Normal Doku ve Serum Örnekleri İle Kontrol Grubuna Ait Serum Örneklerindeki Metilasyon Verilerinin Karşılaştırılması .....	70
4.3.6. <i>KIFC1</i> Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırması .....	72
4.3.6.1. Akciğer Eşlenik Normal Doku Örneklerinde <i>KIFC1</i> Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması .....	72
4.3.6.2. Akciğer Tümör Doku Örneklerinde <i>KIFC1</i> Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması .....	73
4.3.6.3. Akciğer Hasta Serum Örneklerinde <i>KIFC1</i> Geninin Metilasyon Ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması .....	73
4.3.6.4. Sağlıklı Kontrol Serum Örneklerinde <i>KIFC1</i> Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması .....	74
5. TARTIŞMA .....	75
6. KAYNAKLAR .....	84

HAM VERİLER .....	96
FORMLAR .....	97
ETİK KURUL KARARI .....	98
PATENT HAKKI İZİNİ .....	99
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	100
ÖZGEÇMİŞ .....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>



## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ya göre Akciğer Kanserinde Görülen Önemli Genetik Değişiklikler [93]. .....	13
Tablo 2-2. Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017 ve GLOBOCAN 2020 İstatistiklerine Göre Erkeklerde En Fazla Görülen Kanser Türleri .....	15
Tablo 2-3. Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017 ve GLOBOCAN 2020 İstatistiklerine Göre Türkiye'de Kadınlarda En Fazla Görülen Kanser Türleri .....	15
Tablo 2-4. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri 8. Baskı TNM Evrelemesi Özellikleri [143].....	23
Tablo 2-5. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri 8. Baskı Evrelemesi [143].....	24
Tablo 3-1. Deneysel İşlemlerde Kullanılan Cihazlar.....	36
Tablo 3-2. Deneysel İşlemlerde Kullanılan Kitler ve Kimyasallar .....	37
Tablo 3-3. Taze Tümör ve Eşlenik Normal Dokulardan DNA İzolasyon Protokolü .....	39
Tablo 3-4. Serum Örneklerinden DNA izolasyonu Protokolü .....	40
Tablo 3-5. Taze Doku ve Serumlarından RNA İzolasyonu Protokolü .....	41
Tablo 3-6. Metilasyon Spesifik PCR KIFC1 Metile ve Unmetile Revers ve Forward Primer Dizileri .....	42
Tablo 3-7. Metilasyon Spesifik PCR referans DAPK1 Metile Revers ve Forward Primer Dizileri .....	43
Tablo 3-8. Real-Time KIFC1 Reverse ve Forward Primer Dizileri .....	43
Tablo 3-9. Real-Time $\beta$ -actin Reverse ve Forward Primer Dizileri.....	43
Tablo 3-10. CT Conversion Reagent Hazırlama ve Bisülfid Dönüşümü Protokolü .....	44
Tablo 3-11. KIFC1 Metilasyon Spesifik PCR Protokolü .....	45
Tablo 3-12. Yatay Jel elektoroforez Protokolü.....	46
Tablo 3-13. cDNA Sentezi Protokolü.....	46
Tablo 3-14. KIFC1 Real-Time Deney Protokolü .....	47
Tablo 4-1. Akciğer Kanserli Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri .....	50
Tablo 4-2. Sağlıklı Kontrollere Ait Özellikler.....	51
Tablo 4-3. Nicel değişkenlere ait istatistiksel ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerler .....	52

Tablo 4-4. Akciğer Tümör Dokusu, Tümöre Eşlenik Normal Doku, Hastalara ve Sağlıklı kontrollere ait Lenfosit örneklerinin $\Delta Ct$ Ortalamaları Bakımından Karşılaştırılması.....	53
Tablo 4-5. <i>KIFC1</i> gen ekspresyonu artan ve azalanlar arasında yaş ortalaması .....	54
Tablo 4-6. <i>KIFC1</i> Ekspresyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi .....	56
Tablo 4-7. Hastaların Tümör Doku, Tümöre Eşlenik Normal Doku ve Lenfosit Örneklerine Ait $\Delta Ct$ Değerlerinin Birbirleri İle Korelasyon Durumlarının İncelenmesi	58
Tablo 4-8. Akciğer Normal Doku, Akciğer Tümör Doku, Hasta Serum Ve Sağlıklı Serum $\Delta Ct$ Ortalamalarının Karşılaştırılması.....	59
Tablo 4-9. Tümör Doku Metilasyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi .....	63
Tablo 4-10. Tümöre Eşlenik Normal Doku Metilasyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi.....	65
Tablo 4-11. Hasta Serum Örneklerinin Metilasyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi.....	68
Tablo 4-12. Akciğer Kanserli Hastaların Tümör, Eşlenik Normal Doku ve Serum Örnekleri İle Kontrol Grubuna Ait Serum Örneklerinde Metilasyon Verilerinin Karşılaştırılması.....	71
Tablo 4-13. Akciğer Kanserli Hastaların Eşlenik Normal Doku Örneklerinde <i>KIFC1</i> Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması .....	73
Tablo 4-14. Akciğer Tümör Doku Örneklerinde <i>KIFC1</i> Geninin Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması.....	73
Tablo 4-15. Akciğer Kanserli Hastaların Serum Örneklerinde <i>KIFC1</i> Geninin Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması.....	74
Tablo 4-16. Akciğer Kanserli Hastaların Serum Örneklerinde <i>KIFC1</i> Geninin Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması.....	74

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Akciğer Anatomisi ve Dört Ana Akciğer Kanseri Türünün Köken Aldığı Bölgeler [57].	8
Şekil 2-2. Akciğer Kanserinin Orijin Hücreleri [81].	10
Şekil 2-3. Akciğer Kanserinin Oluşum Aşamaları [82].	12
Şekil 2-4. GLOBOCAN 2020 Verileri Dünya Geneli Hem Kadın Hem Erkeklerde En Sık Görülen Kanseri Türleri [1].	14
Şekil 2-5. GLOBOCAN 2020 Verileri Dünya Geneli Hem Kadın Hem Erkeklerde Kanseri Kaynaklı Mortalite Oranları [1].	14
Şekil 2-6. KIFC1 Proteininin Domainleri [179].	30
Şekil 2-7. Hücre Bölünmesi Sırasında KIFC1 Proteininin Senrozom Kümeleneş Aşamalarındaki Rolü [8].	32
Şekil 4-1. Hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerin hedef gen ( <i>KIFC1</i> ) ve referans gen için aplikasyon eğrileri.	51
Şekil 4-2. Akciğer kanserli hastalara ait tümör, eşlenik normal doku ve serum örneklerinde <i>KIFC1</i> geninin referans göre Ct değerleri kullanılarak hesaplanan delta $\Delta$ Ct değerlerinin sütun grafik ile gösterimi. .... <b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>	
Şekil 4-3. Tümör örneklerinde eşlenik normal doku örneklerine göre <i>KIFC1</i> geninin ekspresyon seviye değişikliklerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fold change formülü ile analizinin logaritmik dağılım grafiği. 1,5 cut off noktasının üstünde olan değerler ekspresyon artışı, 1,5'un altında olan değerler ise ekspresyon azalışı olarak kabul edildi.....	60
Şekil 4-4. Hasta serum örneklerinde sağlıklı kontrol serum örneklerine göre <i>KIFC1</i> geninin ekspresyon seviye değişikliklerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fold change formülü ile analizinin logaritmik dağılım grafiği. 1,5 cut off noktasının üstünde olan değerler ekspresyon artışı, 1,5'un altında olan değerler ise ekspresyon azalışı olarak kabul edildi.....	61
Şekil 4-5. Akciğer kanserli Tümör, Eşlenik Normal Doku ile Hastalara Ait serum ile Sağlıklı Serumların (Nor) $\Delta$ Ct Değerlerinin Karşılaştırılması <b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>	
Şekil 4-6. Hasta serumlarına ait metile ve unmetile jel görüntüsü (M: Metile; U: unmetile; bp: base pair).....	61

Şekil 4-7. Akciğer kanserli 39 hastaya ait tümör örneklerinde <i>KIFC1</i> geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği. Tümör örneklerinin 9'unda metilasyon ve 29'unda unmetilasyon gözlemlendi. ....	62
Şekil 4-8. Akciğer kanserli 39 hastaya ait eşlenik normal doku örneklerinde <i>KIFC1</i> geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği. Eşlenik normal doku örneklerinin 11'inde metilasyon ve 26'sında unmetilasyon gözlemlendi. ....	65
Şekil 4-9. Akciğer kanserli 39 hastaya ait serum örneklerinde <i>KIFC1</i> geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği. Serum örneklerinin 5'inde metilasyon ve 32'sinde unmetilasyon gözlemlendi. ....	67
Şekil 4-10. Sağlıklı 39 hastaya ait serum örneklerinde <i>KIFC1</i> geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği. Serum örneklerinin 28'inde metilasyon ve 9'unda unmetilasyon gözlemlendi. ....	70
Şekil 4-11. Hastalara ait tümör, eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı serumlara ait <i>KIFC1</i> geninin metilasyon durumunun sütun grafiği. ....	72

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KIFC1	: Kinesin ailesi üyesi C1
GLOBOCAN	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
miRNA	: mikro RNA
siRNA	: Susturucu interferning RNA
mRNA	: mesajcı RNA
CpG	: Sitozin Fosfat Guanin
SAM	: S-Adenozil Metiyonin
DNMT	: DNA metiltransferaz
TSG	: Tümör supresör gen
ATP	: Adenozin trifosfat
LOH	: Heterozigotluk Kaybı
LOI	: Loss of Imprinting
CIS	: Karsinoma in situ
MSI	: Mikrosatelit instabilite
MIA	: Minimal invaziv adenokarsinom
CEA	: Karsino embriyonik antijen
NSE	: Nöron-spesifik enolaz
SQHK	: Skuamöz hücreli karsinom antijeni
MSP	: Metilasyon spesifik PCR
PCR	: Polimeraz zincirleme reaksiyonu
AAD	: Akciğer adenokarinomu
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücre dışı akciğer kanseri
HPV	: İnsan papilloma virüsü
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

KIF : Kinsein Ailesi  
ALK : Anaplastik lenfoma kinaz  
TNM : Tümör Nod Metastaz



## ÖZET

Çelik, B. (2022). Akciğer Kanserli Hastalarda KIFC1 Proteininin Ekspresyon ve Metilasyon Profillerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kansere bağlı ölümlerde ilk sıralarda yer alan akciğer kanseri en sık görülen kanser türüdür. Akciğer kanserinin tanı, tedavi ve takibine yönelik keşfedilen biyomarkerlar ve hedefe yönelik ajanlar olmasına rağmen halen hem ülkemizde hem de dünyada kanser bağlı ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Bu nedenle akciğer kanserinin moleküler alt yapısını aydınlatmaya yönelik yeni mekanizmaların bilinmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Kinesin aile üyesi (*KIFC1*)'in normal hücrelerdeki işlevi ve fonksiyonel rolü tartışılmaktayken birçok kanser türünde malign hücrelerin hayatta kalmasında etkili ve kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir. *KIFC1* proteini kanser hücrelerinde sentrozomların kümelenmesinde ve mikrotübül dinamiğinde kritik rol oynayarak, apoptotik hücre ölümünden kaçmaya yardımcı olan malign hücrelerin hayatta kalması için oldukça önemlidir. Yürütülen çalışmada *KIFC1* proteininin akciğer kanserinde invaziv veya non-invaziv biyomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağına belirlenmesi amacıyla akciğer kanseri teşhisi alan 39 hastanın tümör dokusu ve tümöre eşlenik normal dokusu ile serum ve lenfositleri ve sağlıklı kontrollere ait lenfosit ve serum örneklerinde ekspresyon ve metilasyonu durumları araştırıldı. qRT-PCR yöntemi kullanılarak doku ve lenfosit numunelerinde *KIFC1* gen ekspresyonu karşılaştırıldı. Metilasyon durumunu belirlemek için Metilasyon Spesifik PCR (MSP) yöntemi kullanıldı. Çalışmada ekspresyon düzeyleri artış/azalışı ile metilasyon profilleri ile hastaların klinik ve patolojik özellikleri istatistiksel yöntemler kullanılarak analiz edildi. *KIFC1* gen ekspresyonu artan %62,1 (24/37) hastanın %95,8'inde (23/24) unmetilasyon tespit edildi. Hastaların tümör ve eşlenik normal doku örneklerinin ortalama fold&change değerleri karşılaştırıldığında tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre 3,2 kat *KIFC1* geninin ekspresyon seviyesinde artma olduğu gözlemlendi. Hasta serum örnekleri ile sağlıklı serum örneklerinin fold&change değerleri karşılaştırıldığında hasta serumlarında sağlıklı serumlara göre 2,4 kat *KIFC1* geninin ekspresyon seviyesinde artış olduğu tespit edildi. Aynı zamanda hastalara ait klinik parametreler ile metilasyon ve ekspresyon sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında da *KIFC1* ekspresyonu ile

metastaz ( $p=0,013$ ), tümör evresi ( $p=0,040$ ) ve tümör grade ( $p=0,010$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi. Sonuç olarak, akciğer kanseri tanılı hastalara *KIFC1* geninin ekspresyon seviyesindeki artışın sağlıklı popülasyona göre daha fazla olduğu ve bu nedenle *KIFC1* geninin ekspresyon ve metilasyon durumlarının akciğer kanser tarama biyomarkeri olarak kullanılabilceği düşünölmektedir. Ayrıca *KIFC1* geninin metilasyon profilinin akciğer kanserinin skuamöz hücreli akciğer kanseri alt tipini tayin etmede potansiyel bir biyomarker olabileceği de değeriendirilebilir. Çalışma sonucu ortaya çıkan sonuçların, daha geniş hasta sayısı ile analiz edilerek devam etmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Metilasyon, ekspresyon, akciğer kanseri, *KIFC1*, diyagnoz

## ABSTRACT

Celik, B. (2022). Investigation of expression and methylation profiles of KIFC1 protein in patients with lung cancer. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Basic Oncology. Doctoral Thesis. Istanbul.

Lung cancer is the most common cancer, ranking first in cancer-related deaths. Despite the discovery of biomarkers and targeted agents for the diagnosis, treatment, and follow-up of lung cancer, it is still a leading cause of cancer-related deaths in our country and the world. Thus, there is a need for new mechanisms to elucidate the molecular mechanisms of lung cancer. While the functional role of the kinesin family member (KIFC1) in normal cells is debated, it has been reported to play an effective and crucial role in malignant cell survival in many cancers. The KIFC1 protein plays a critical role in centrosome clustering and microtubule dynamics in cancer cells and is essential for the survival of malignant cells that escape apoptotic cell death. To determine whether KIFC1 protein can be used as an invasive or noninvasive biomarker in lung cancer, this study examined the expression and methylation of 39 patients with diagnosed lung cancer, tumor tissue and tumor-conjugated normal tissue, serum, and lymphocytes, as well as lymphocyte and serum samples from healthy controls. *KIFC1* gene expression was compared in tissue and lymphocyte samples using the qRT-PCR method. The methylation-specific PCR(MSP) method was used to determine methylation status. The study analyzed the increase/decrease in expression level, methylation profiles, and clinical and pathological characteristics of the patients using statistical methods. Unmethylation was detected in 95.8% (23/24) of 62.1% (24/37) patients with increased *KIFC1* gene expression. When the mean fold & change values of tumor and conjugated normal tissue samples of the patients were compared, the expression level of *KIFC1* gene was found to be increased 3.2-fold in tumor tissue compared to conjugated normal tissue. When the Fold&Change values of the patient serum samples were compared with the healthy serum samples, it was found that the expression level of the *KIFC1* gene was increased 2.4-fold in the patient serum compared with the healthy serum. At the same time, statistical significance was found between *KIFC1* expression and metastasis ( $p=0.013$ ), tumor stage ( $p=0.040$ ), and tumor grade ( $p=0.010$ ) when patients' clinical parameters and methylation and expression

results were statistically compared. *KIFC1* gene expression is thought to be more elevated in patients diagnosed with lung cancer than in the healthy population, so *KIFC1* gene expression and methylation status can be used as biomarkers for lung cancer screening. In addition, it can be assumed that the methylation profile of the *KIFC1* gene could be a potential biomarker for determining the squamous cell lung cancer subtype of lung cancer. The results of the study need to be followed up by analysis of a larger number of patients.

**Key Words:** Methylation, expression, lung cancer, *KIFC1*, diagnosis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36429

**ZUSAMMENFASSUNG / RESUME**



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde kanser insidansı ve mortalitesi hızla artmaktadır. Günümüzde hızlı nüfus artışı ve nüfustaki yaşlı oranının artması, kanserin önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almasına neden olmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (GLOBOCAN) istatistiklerine göre 2020 yılında dünya’da ortalama 19,3 milyon yeni kanser vakası teşhis edilmiş ve 10 milyon kişi kanserden dolayı hayatını kaybetmiştir. GLOBOCAN 2020 yılı verilerine göre ise 2,2 milyon kişi akciğer kanseri tanısı almış ve 1,79 milyonu bu kanser türü nedeniyle hayatını kaybetmiştir [1].

Akciğer kanseri global olarak hem erkeklerde hem de kadınlarda önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Her yıl yaklaşık 1,6 milyon kişi akciğer kanserinden dolayı hayatını kaybederken, 5 yıllık sağ kalım oranları %15’dir [2]. Akciğer kanseri %11,6 ‘lık oranla hem kadın hem de erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Kanser kaynaklı ölüm sebepleri arasında akciğer kanseri %18 oran ile ilk sırada yer alırken, kolorektal kanser ikinci, mide kanseri üçüncü ve karaciğer kanseri dördüncü sırada yer almaktadır. 2020-2030 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) akciğer, meme, prostat ve kolorektal kanserlerinin ‘dört büyük kanser’ olarak kabul edileceği bildirilse de, 2030 yılına kadar tiroid kanserinin, kolorektal kanserin yerini alabileceği, melanoma ve rahim kanserinin de sırasıyla en sık görülen beşinci ve altıncı kanser olacağı tahmin edilmekle birlikte akciğer kanserinin bu süre zarfında en fazla ölüme sebep olan kanser türü olmayı sürdüreceği öngörülmektedir [3]. Dünya sağlık örgütü (WHO) 2050 yılında insanların %16’sının kanser hastası olacağını öngörmektedir [4].

Cerrahi alanda yaşanan teknolojik gelişmelere ve yeni anti-tümör ilaçlara rağmen akciğer kanserli hastalarda sağ kalım oranları uzun yıllardır değişmemektedir. Bu nedenle, akciğer kanserinde hücre proliferasyonunun altında yatan moleküler, genetik ve epigenetik değişikliklerin araştırılması son derece önemlidir. Epigenetik ve genetik değişiklikler uzun zamandan beri karsinogeneze sebep olan iki ayrı mekanizma olarak kabul edilmektedir. Hem genetik hem de epigenetik mekanizmalarda tümör baskılayıcı genlerin ve/veya onkogenlerin mutasyona uğraması, fonksiyon kaybına veya kazancına yol açarak anormal gen ekspresyonu sonucu kanser oluşumuna neden olmaktadır [5]. Tümör oluşumu başlayıp ilerlerken genom boyunca DNA metilasyon kaybı

(hipometilasyon), CpG adacıklarının promotör bölgelerindeki metilasyon artışı (hipermetilasyon) ve histon modifikasyonları gibi çeşitli epigenetik değişiklikler olmaktadır [5].

Akciğer kanserinin erken ve doğru teşhisi, hastalığın etkin tedavisi için oldukça önemlidir. Moleküler yöntemler ve analitik platformlardaki gelişmeler sayesinde, akciğer kanseri teşhisinde çok sayıda potansiyel biyobelirteç tanımlanmıştır. Moleküler biyobelirteçler, akciğer kanserinin erken ve invaziv olmayan bir evresinde hastalığın seyrini, tedaviye yanıtını izlemeye ve tanı koymada faydalı olabilir, ancak bunların hiçbiri henüz klinik ortamda ilk tercih olarak kullanılamamaktadır. Son yıllarda, vücut sıvılarında farklı kanser türlerine ait biyobelirteçlerin araştırılması oldukça yaygın bir metodolojidir. Yapılan çalışmalar balgam, kan ve idrar örneklerinin biyobelirteç talebine cevap verebileceğini göstermiştir [6]. Akciğer kanserinin erken teşhisi için daha güvenilir testlerin geliştirilmesi ve yeni biyobelirteçlerin keşfi, hastalıkta etkin tedaviye cevabın artmasına, hasta konforunun sağlanmasına ve sağlık otoritelerinin daha güvenilir ve kanıta dayalı tedavi planlamalarına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Kinesin ailesi üyesi C1 (KIFC1/HSET), kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan hem premalin hem de malin lezyonlarda gözlenen bir proteindir [7]. KIFC1 proteininin kanser hücrelerinde ekstra sentrozomların kümlenmesinde etkin rol aldığı bilinsede bunu hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği günümüzde hala belirsizdir [8]. Literatürde akciğer kanseri tanılı tümör/eşlenik normal doku ve serum örneklerinde *KIFC1* gen ekspresyon ve metilasyon durumunu gösteren bir çalışma mevcut değildir. Sentromer stabilitesi, hücrede mitoz bölünme esnasında metilasyon mekanizması ile düzenlenebildiğinden ve KIFC1 proteininin de sentromerler üzerinde oldukça etkin bir protein olduğu gerçeğinden yola çıkarak akciğer kanseri hastalarında *KIFC1* gen ekspresyon durumu ile metilasyon mekanizması arasındaki ilişki araştırıldı. Ayrıca ekspresyon artışı azalışın metilasyon mekanizması ile kontrol edilip edilmediği değerlendirildi. Akciğer kanserli hastalara ait doku, eşlenik normal doku ve serum ve lenfositleri ile yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş kontrol lenfosit ve serumlarında metilasyon ve ekspresyon durumları arasındaki ilişki açığa çıkarılıp karşılaştırılarak *KIFC1*'in akciğer kanserli hasta grubunda invaziv/non-invaziv biyomarker olup olmayacağı değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

Kanser, dünya çapında önde gelen ikinci ölüm nedenidir ve 2020'de tahmini 10 milyon ölümden sorumludur. Dünya genelinde, her 6 ölümden 1'i kansere bağlıdır GLOBACAN ve TÜİK verilerine göre Türkiye'de ise bu sayı 5 ölümden 1'dir [9, 10]. 2020 yılı Türkiye kanser istatistiklerine göre 2018 yılındaki toplam kanser vaka sayısı 210.537'dir. Ülkemizde kanserden kaynaklı ölümlerde ise total sayı 116.710'dur. Kanser kaynaklı ölümler incelediğinde ise % 28,9 oranla akciğer kanseri en yüksek mortalite oranına sahiptir [11].

Akciğer kanserinde 5 yıllık sağ kalım oranları, teşhis anındaki hastalığın evresine bağlı olarak %4-17 arasında değişmektedir [12]. İnvaziv/non-invaziv biyobelirteçlerin geliştirilmesi, akciğer kanserinin erken teşhis olasılığını artırsa da, akciğer kanseri vakaların yalnızca %10-15'i erken evrede teşhis edilebilmektedir [13].

Akciğer kanserinde en önemli etken tütün ürünlerinin kullanımından kaynaklı radon gazı, asbest, hava kirliliği ve kronik enfeksiyonlar akciğer kanseri oluşumuna katkıda bulunmaktadır [14]. Ayrıca, çok sayıda kalıtsal veya de-novo mutasyonlar da akciğer kanserine yatkınlığa sebep olmaktadır [15].

Tümör oluşumu, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu ortaya çıkan çok aşamalı bir süreçtir. Tümör oluşumu süresince malign hücreler hayatta kalabilmek için tümör mikro-çevresine uyum sağlayan çeşitli özellikler kazanırlar. Kanser hallmarks olarak bilinen başlıca ayırt edici özellikleri, kontrolsüz hücre çoğalması, metabolik yeniden programlanma, tümör anjiyogenezi, metastaz ve bağışıklık sisteminden kaçışı olarak sıralanabilir. Ayrıca epigenomun bozulması da, insan kanserlerinin ayırt edici özelliği olarak kabul edilmiş ve tümör patogenezi ile ilişkilendirilmiştir [16].

### 2.1. Epigenetik

Kanserin genetik mutasyonların birikimi sonucu ortaya çıktığı kabul edilsede [17]; bu paradigma günümüzde epigenetik mekanizmalarında kanserlerde yaygın olarak etkin olduğu şeklinde genişletilmiştir [18, 19]. 'Epigenetik' terimi ilk defa 1942 yılında Conrad W. tarafından DNA sekansında bir değişiklik olmaksızın fenotipteki kalıtsal değişiklikleri tanımlamak için kullanılmıştır. 2008 Cold Spring Harbor Epigenetiği toplantısından sonra ise daha kapsamlı olarak 'DNA sekansında değişiklikler

olmaksızın kromozomdaki değişikliklerden kaynaklanan kalıtsal bir fenotip' olarak tanımlanmıştır [20]. Günümüzde ise epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerin incelenmesini ifade etmektedir.

Epigenetik ve genetik değişiklikler uzun zamandır karsinogeneze dahil olan iki ayrı mekanizma olarak kabul görmektedir. Tüm eksom dizileme çalışmaları sonucunda epigenomu kontrol eden genlerdeki inaktive edici birçok mutasyonun keşfiyle epigenetik mekanizmaların kanser oluşumunda etkileri daha net anlaşılmıştır. Epigenetik düzenlemeler DNA metilasyonu, histon modifikasyonu (histonlarda kovalent değişiklik), nükleozom konumlandırma (fiziksel değişiklikler) ve kodlamayan RNA'ların (miRNA, siRNA) translasyon sonrası gen düzenlemelerini içermektedir. Bu metabolik süreçlerin herhangi birinde meydana gelen bozukluklar, kanser oluşumu, gelişimi ve metastazında rol oynayan anormal gen fonksiyonuna ve değişen gen ekspresyonuna neden olmaktadır [21].

### **2.1.1. DNA Metilasyonu**

İnsan genomunda sitozin ile guanin nükeobazlarının bir araya gelerek oluşturdukları bölgeler CpG adacıkları olarak adlandırılmaktadır. CpG adacıkları, tüm genomun %1'ni, gen ifadesini düzenleyen promotör bölgelerin ise yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır [22]. CpG adacıkları DNA'nın (genin) başlangıç bölgeleri olarak bilinen promotör bölgelerinde normalden fazla yerleşim göstermektedir. CpG adacıklarının görevi bir nevi genin başlangıç noktasını belirleyerek, DNA'ya bağlanacak molekül için tanıma bölgesi oluşturmaktır [23].

Metilasyon, DNA promotör bölgelerinde bulunan CpG (C;sitozin-P;fosfat-G;Guanin) adacıklarındaki sitozin bazının 5 numaralı karbonuna kimyasal olarak metil grubunun eklendiği epigenetik bir mekanizmadır [24]. Sitozin bazının 5 numaralı karbonuna metil grubunu veren S-Adenozil Metiyonin (SAM

)'dir. CpG adacıklarına metil gurubu ekleyen enzim ise DNA metiltransferaz (DNMT)'lardır [25].

Memeli genomunda, DNA metilasyonu, kanserle ilişkili ilk epigenetik belirteç olarak kabul görmektedir. Tümör süpresör genlerin hipermetilasyonu, onkogenler ve retrotranspozonların hipometilasyonu tümör oluşumu ve gelişimine sebep olan epigenetik mekanizmalardır [26]. DNA metilasyonu hücrelerde gen ekspresyonunun

düzenlenmesi, mitoz bölünme esnasında sentromer stabilitesi ve kromozom ayrımı, X-kromozomu inaktivasyonu mekanizmasında [27] ve imprint genlerin monoalelik susturulmasında oldukça önemli rollere sahiptir [28]. Tüm bu etkileri göz önüne alındığında metilasyon mekanizmaları kanser oluşum ve gelişmesinde oldukça etkili olan epigenetik olaylardır.

### **2.1.1.1. DNA Hipermetilasyonu**

DNA hipermetilasyonu DNA promotör bölgelerinde bulunan CpG adacıklarındaki sitozin bazına metil grubu eklenmesidir ve tümör-spesiftir [29-32]. CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile gen ekspresyonu susturulabilmekte, hücre döngüsü, farklılaşması, sinyalizasyonu, ve apoptoz olayları düzenlenebilmektedir [33].

Tümör supresör genlerin (TSG) hipermetilasyonu kanser oluşumunda oldukça etkili bir mekanizmadır. Tümör supresör genler hücrelerde büyüme, çoğalma ve apoptoz gibi birçok fizyolojik süreci düzenlemektedir. Ayrıca, transkripsiyon faktörlerini, adezyon moleküllerini, anjiyogenez ve DNA tamir mekanizmalarında rol alan proteinler ile hücre döngüsünü düzenleyen siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ve GTP-az moleküllerini kodlamaktadırlar [21, 34, 35].

Kanserde, tümör supresör özelliğe sahip genlerin ekspresyonu promotör bölgelerindeki CpG adacıklarının metillenmesiyle baskılanmaktadır [36]. Tümör supresör genlerin epigenetik olarak susturulması, karsinogenezin erken evrelerinde meydana gelmektedir. Benign tümörlerde ve erken neoplastik süreçlerde de tümör supresör gen ekspresyonu epigenetik olarak baskılanabilmektedir [26]. DNA tamir mekanizmasında rol alan genlerin promotör bölgelerindeki hipermetilasyon ile DNA hasarı onarım sürecini engellenmekte ve genetik kararsızlık ortaya çıkmaktadır. Hücrede genetik kararsızlığın birikmesi karsinogenezi başlatmaktadır [21, 37]. Örneğin, *CDKN2A* geninin akciğer kanseri alt tiplerinde hiper metile olduğu tespit edilmiştir [33].

### **2.1.1.2. DNA Hipometilasyonu**

DNA hipometilasyonu, DNA'nın metil kaybıdır. Hipometilasyon, SINE veya LINE gibi tekrarlayan dizilerin ve retrotranspozonların hipometilasyonu ile oluşan mikrosatellit instabilitesi; onkogenlerin hipometilasyon ile aşırı ekspresyonu; ve loss of

imprinting (LOI) olmak üzere üç moleküler mekanizma ile karsinogeneze yol açmaktadır [38].

### 2.1.2. Histon Modifikasyonu

DNA yaklaşık 146 baz çifti halinde histon proteinlerinin etrafına sarılmaktadır [39]. Histon modifikasyonları(asetilasyon ve metilasyon) ile gen aktivitesi düzenlenmektedir. Histon asetilasyonu ile gen ekspresyonu aktive edilirken, histon metilasyonu ile inaktif edilmektedir [40]. Histon asetiltransferaz histonları asetilleyerek transkripsiyonel ifadeyi aktive ederken ve histon deasetiltransferazlar deasetilasyon mekanizması ile gen ifadesini baskılamaktadır [41]. Histon modifikasyonları, yalnızca DNA'nın transkripsiyon, onarım ve replikasyon düzenlenmesinde değil, aynı zamanda kromatin yapısını ve stabilitesini düzenlemesinde de rol oynadığından [42] kromatin düzenlemesinde rol alan genlerin malign transformasyon sırasında değişime uğraması şartıcı değildir. Akciğer kanserinde *SETDB1* ile *UTX/JMJD3* histon modifikasyonundan sorumlu genlerde mutasyonlar tespit edilmiştir [43].

### 2.1.3. miRNA Regülasyonu

miRNA'lar hedef mRNA'ya bağlanıp translasyonu etkileyerek gen ifadesini kontrol etmektedirler. miRNA'lar hücre gelişimi, farklılaşması, döngüsü ve apoptoz mekanizmalarında rol oynamaktadır. Ayrıca diyabet, immün veya nörodejeneratif bozukluklar ve kanser gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde de yer alırlar [44]. miRNA'lar insan genomundan yer alan protein kodlayan genlerin yaklaşık % 30'unun işlevini düzenlemektedir [45]. Sağlıklı bir hücrede miRNA'nın fonksiyon kaybı malign dönüşümü başlattığında, o miRNA'nın tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı anlaşılmaktadır. Bir miRNA'nın fonksiyon kaybı nedenleri ise, genomik delesyon, mutasyon, epigenetik susturma olarak sıralanabilir [46].

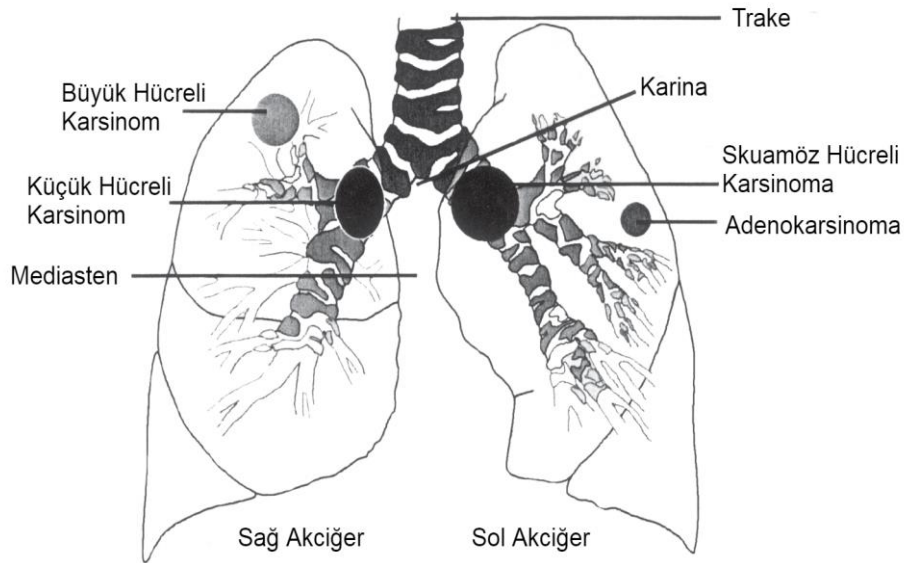
miRNA'ların %50'si CpG adacıkları ile ilişkilidir. Bu özelliklerinden dolayı miRNA'lar epigenetik değişikliklere yatkın hale gelmektedirler [47]. Literatürde, miRNA'ların epigenetik olarak düzenlendiği de çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [48]. miRNA'ların hücre ve tümöre özgü olduğu belirlenmiştir. Örneğin, Let-7a-3 meme kanserinde aşırı oranda metile iken aksine akciğer tümörlerinde hipometiledir [49].

## 2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır [50]. KHAK'lar genel olarak sigaradan kaynaklanan agresif akciğer tümörleridir. Akciğer kanserlerinin %15-20'si KHAK'lardır. KHDAK'lar ise kendi arasında akciğer adenokarsinomu (AAD), akciğer skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve bronşiyal karsinoid tümör olmak üzere dört alt tipe ayrılır. Bunlar arasında akciğer adenokarsinomu, KHDAK'nin en yaygın alt tipidir ve en sık görülen primer akciğer tümörüdür. Akciğer adenokarsinomu sıklıkla sigara içmeyen kadınlarda ortaya çıkar [50, 51]. Küçük hücreli karsinomlar kötü diferansiye ve yüksek gradlı nöroendokrin tümörler olup, oldukça agresiflerdir [52]. Erken evrede metastaz ile karakterizedir ve hastaların yarısından fazlası ileri evrede teşhis edilir [53]. KHAK'lı hastalarda immünosupresif durum, prognozu etkileyebilir [54]. Adenokarsinom, akciğer kanserinin en yaygın histolojik tipidir ve küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin %40'ından fazlasını oluşturur [55].

### 2.2.1. Akciğer Anatomisi

Akciğerler, plevral kese ise sarılmış ve göğüs boşluğunun her iki tarafına yerleşmiş koni şeklindeki organlardır. Sağ akciğer daha büyük ve üç lob içermektedir. Daha küçük olan sol akciğer iki lobdan oluşmaktadır. Akciğerler iki adet primer bronştan oluşur ve bronşlar giderek daha da küçülen bronşlara ayrılır ve terminal dalları bronşiyol olarak adlandırılmaktadır. Bronşiyol epiteli 4 adet hücre tipini içermektedir. Bunlar; silyalı kübik(izosilindirik) epitel hücre, silyasız (prizmatik) Clara hücresi, fırçamsı kenarlı Brush hücreleri ile küçük granüler hücrelerdir. Bronşiyollerin başlangıç kısımlarında epitel çok katlı prizmatik epitelidir. Terminal uç kısımları ise tek katlı titrektüylü prizmatik veya kübik epitel ile döşelidir. [56]. Akciğer kanserleri farklı hücreler ve bölgelerdeki hücrelerden köken aldığı Şekil 2-1'de gösterilmiştir.



**Şekil 2-1. Akciğer Anatomisi ve Dört Ana Akciğer Kanser Türünün Köken Aldığı Bölgeler [57].**

### 2.2.2. Akciğer Kanserinin Orijin Hücreleri

Akciğer hava yolları ve alveoller olmak üzere iki farklı anatomik kısımdan oluşmaktadır. Hava yollarındaki bazal epitel hücreleri silyalı, nöroendokrin ve kulüp hücrelerine farklılaşabilmektedir [57, 58]. Bazal hücreler, skuamöz hücreli karsinomun orijin hücresi olarak kabul edilir. Silyalı hücreler, akciğer hava yolunda baskın hücre tipidir. Bu hücreler, sillerini koordineli bir şekilde atarak [59] akciğeri eksojen elementlerden temizler [60]. Silyalı hücreler aynı zamanda hava yollarının kemosenör ve mekanosenörleridir [61, 62]. Silyalı hücreler, akciğerdeki en farklı hücre tipi olduğu düşünülmektedir. Displazi gösterebilir ve daha sonra sillerini kaybederek akciğer adenokarsinomuna dönüşebilmektedirler. Bu hücre tipi daha sonra pulmoner AAD'nin öncü lezyonu olan genişlemiş çekirdekli mukus kolumnar hücreler haline de gelebilir [63]. Ayrıca akciğerin silyalı hücreleri mukonodüler papiller tümörü gibi diğer nadir tümörlere de dönüşebilir [64].

Pulmoner nöroendokrin hücreler (PNEH) bronşiyol epitel hücrelerdir [65]. Akciğer hava yollarındaki mekanik gerilme, hipoksi veya hiperkarbi gibi birçok farklı koşullara yanıt oluşturmada etkindirler. Nöropeptitler aracılığıyla akciğerdeki bağışıklık cevabı aktive ederler [66]. Akciğer hasarı sırasında, PNEH'ler kulüp ve silyalı hücreleri oluşturabilir [67]. PNEH'ler büyük hücreli nöroendokrin karsinom ile ve pulmoner

karsinoid tümörler olmak üzere farklı tümör tiplerinin orjin hücreleri olabilir. Ancak, AAD'ye de dönüşebilirler [68].

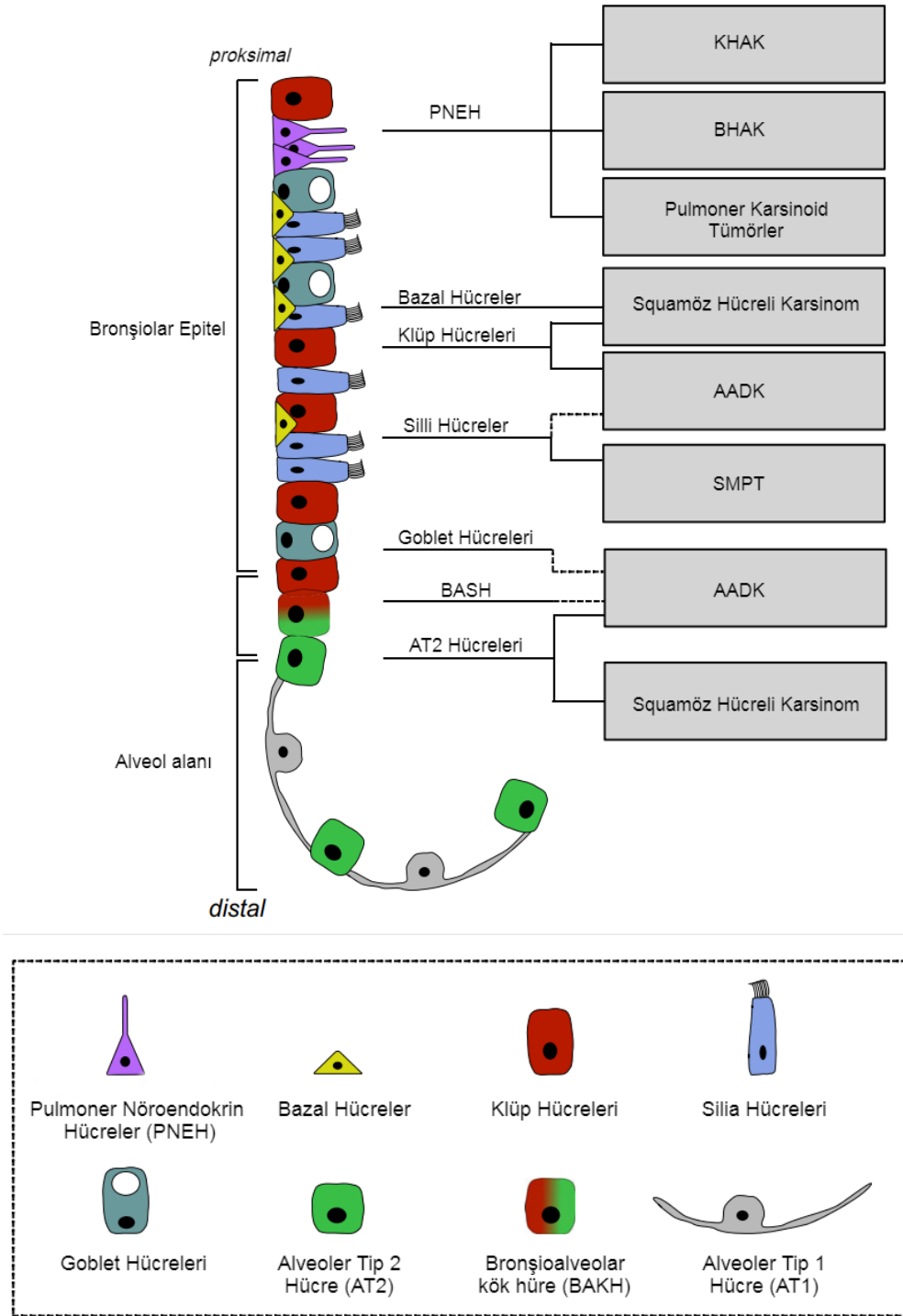
Kulüp hücreleri, akciğerin büyük ve küçük bronşiyollerine yayılmış olan küboid hücrelerdir. Bronşiyollerini kaplayan bileşenleri salgılayan ve distal solunum yollarındaki salgı içeriğini düzenlerler. Kulüp hücreleri, endoplazmik retikulumlarında bulunan sitokrom p450 enzimleri aracılığıyla akciğerin detoksifikasyonunda rol oynar ve kendilerini yenileyebilirler. Ayrıca siliyer, kadeh ve alveolar tip 2 (AT2) hücrelerin öncüsüdürler [69]. Kulüp hücrelerinin *KRAS* mutasyonlarında hayatta kaldığı ve AAD'a yol açabileceği bilinmektedir [70].

Goblet hücreleri, solunum yolu yüzeyinde, solunan partiküllerin ve mikroorganizmaların yakalanması ve taşınmasını sağlayan müsinleri salgılar [71]. Literatürde yüksek müsin seviyeleri AAD agresifliği ile ilişkilendirilmiştir [72]. Bununla birlikte, goblet hücreleri nadir olarak AAD'a sebep olmaktadır [73, 74].

Hava yolları ve alveolar boşluk arasındaki bölge bronşioalveolar kanal bileşkesi olarak adlandırılmaktadır. Bu kanal hem hava yolu hem de alveolar hücrelere dönüşebilen bronşioalveolar kök hücrelerini içerir [75]. *KRAS* mutasyonlarında, bu hücreler bronşioalveolar kanal bileşkesinde çoğalır ve potansiyel olarak AAD oluşumuna katkıda bulunurlar [76, 77].

Alveolar boşlukta, alveollerdeki yüzey gerilimini azaltarak çökmelerini önleyen alveollere pulmoner sürfaktan sağlayan AT2 progenitör hücreleri bulunmaktadır. AT2 hücreleri kendini yenileyebilir ve hava-kan bariyerinin bir parçası olan özel bir epitel hücresi türü olan alveolar tip 1 (AT1) hücrelerini oluşturabilir. AT2 hücreleri, AAD'daki en iyi karakterize edilmiş hücrelerden biridir [78, 79].

Özetle akciğer kanseri, farklı akciğer epitel hücrelerinden köken alır. Bronşiyolar epitel hücreleri, bronşioalveolar kanalı ve alveolar boşluğu kaplar. PNEH epitel hücreleri küçük hücreli akciğer karsinomu ve büyük hücreli akciğer karsinom oluşumunda temel hücrelerdir. Bazal hücreler, kulüp hücreleri ve AT2 hücreleri ise skuamöz hücreli karsinomaya yol açabilirler. AT2 hücreleri, genellikle akciğer adenokarsinomunun köken aldığı hücreler olup silyalı hücreler, goblet hücreleri ve bronşioalveolar kök hücreleri de akciğer adenokarsinomuna yol açabilmektedir. AT1 hücrelerinin ise akciğer kanseri gelişimine katkı sağlayabilecek hücre olduğuna dair bir kanıt yoktur [80]. Akciğer kanseri orijinleri Şekil 2-2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2-2. Akciğer Kanserinin Orijin Hücreleri [81].**

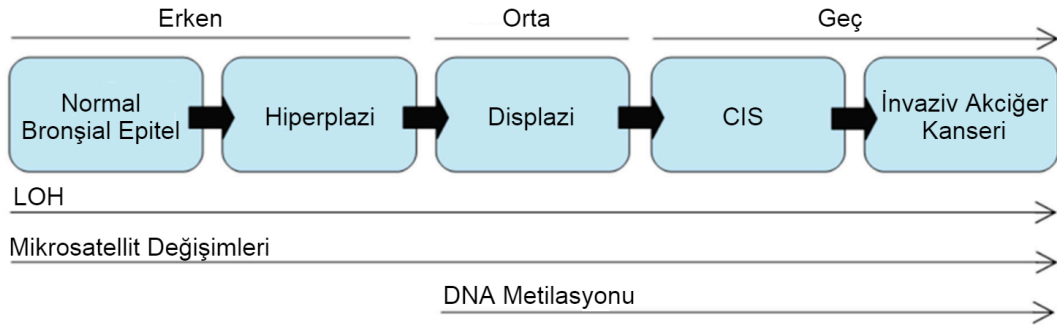
### 2.2.3. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi

Normal sağlıklı bir akciğer hücresinin, malign akciğer kanseri fenotipine dönüşümü çok aşamalı bir dizi genetik ve epigenetik değişiklik sonucu olmaktadır.

Hiperplazi, metaplazi, displazi ve karsinoma in situ (CIS) gibi morfolojik anormallikler, invaziv kanserlerden önceki aşamalarıdır. Kronik inflamasyon ve mekanik travma sonucu genellikle bronş epitel hiperplazisi ve skuamöz metaplazisi gibi reaktif değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Displazi ve karsinoma in situ, akciğerin skuamöz hücreli karsinomundan önce oluşan premalign değişikliklerdir [82-84].

Akciğerlerde meydana gelen epigenetik değişiklikler DNA yapısının bozulmasına ve sonraki mutasyonlara daha fazla duyarlı hale gelmesine yol açar. Hücre döngüsünü düzenleyen protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genleri ile DNA hasar onarım mekanizmalarındaki mutasyonlarla oluşan neoplastik süreç nedeniyle hücre bölünme mekanizmaları bozulmaktadır. Ayrıca, büyüme faktörlerinin artan ekspresyonu, sürekli anjiyogenez, anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen mutasyonları ile apoptozdan kaçınma, sınırsız replikasyon potansiyeli, doku invazyonu ve metastaz gibi diğer değişiklikler de tümör ilerlemede rol oynarlar [85].

Kanserin ilk oluşumu, kanser hücrelerinde meydana gelen somatik değişiklikler veya 'vuruşlar' ile ortaya çıkmaktadır [86]. Bronş epitelinde meydana gelen ilk moleküler değişiklik mikrosatellit değişiklikleridir. Mikrosatellit değişiklikleri, küçük tekrarlayan DNA dizilerinin uzaması (extensions) veya silinmesidir(deletions). Mikrosatellit instabilite (MSI, alel kayması) veya normal olarak mevcut bir alelin yokluğu olan heterozigotluk kaybı (LOH) şeklinde gerçekleşmektedir. Bir hücrenin kansere dönüşmesi için minimum üç veya daha fazla genomik değişiklik gerekirken, tümör ilerlemesi ve metastaz lezyonları için daha fazla DNA değişikliklerine ihtiyaç duyulur. Displazi evresinde sıklıkla saptanan moleküler değişiklikler zamanlama açısından orta evre değişiklikleri, CIS veya invaziv evrelerde saptanan değişiklikler geç evre değişiklikleri olarak adlandırılır. Displazi aşamasında ayrıca DNA metilasyonu gerçekleşmektedir [82, 87, 88]. Akciğer kanseri oluşum aşamaları Şekil 2-3'de gösterilmiştir.



**Şekil 2-3. Akciğer Kanserinin Oluşum Aşamaları [82].**

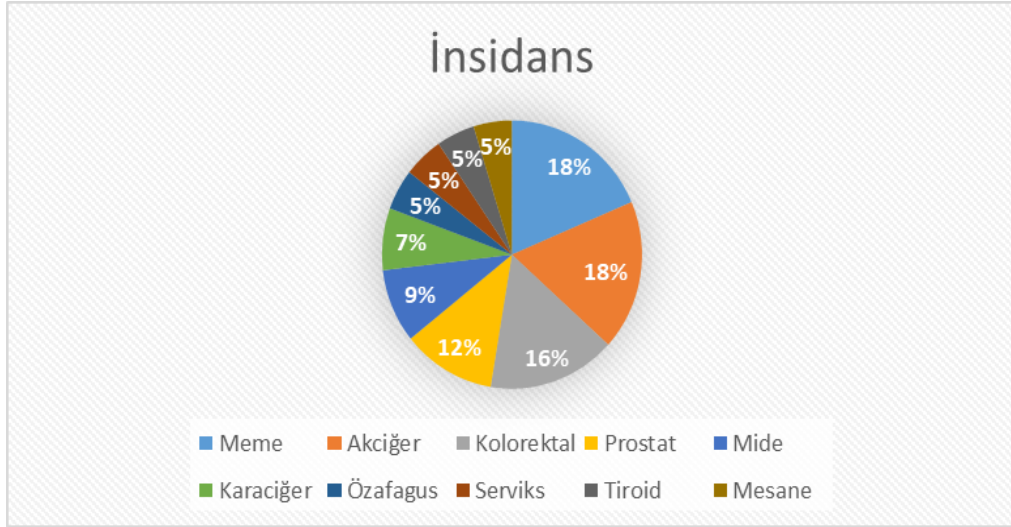
Mutasyonlar, akciğer kanseri gelişiminde sıklıkla meydana gelir. Bu mutasyonların saptanması, hastalığın hem teşhis hem de tedavi aşamalarında önem taşır. Kanser hücrelerine büyüme avantajı sağlayan bu mutasyonlar sürücü (driver) mutasyonlar olarak adlandırılır. Karsinogeneze sebep olan sürücü mutasyonların sayısı sınırlıdır. Birçok solid tümör, 40 ila 150 adet sessiz olmayan mutasyona (non-silent) sahiptir. Bu non-silent mutasyonların çoğu, malign fenotipe katkıda bulunmayan yolcu (passenger) mutasyonlar olarak kabul edilir. Genomik değişiklikler, DNA'nın yeniden düzenlenmesini (rearrangements) kapsar. Bunlar, nokta mutasyonları olarak bilinen tek nükleotid varyantları ile amplifikasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlardır [86, 89, 90]. Akciğer kanseri oluşumu sırasında meydana gelen genomik değişiklikler ise genellikle nokta mutasyonları (missense ve nonsense mutasyonlar, çerçeve kayması), yeniden düzenlenme (transversiyon transition ve somatik kopya sayısı farklılıkları) değişiklikleridir [91]. Akciğer kanseri birçok genetik anormallik içerebilir [92]. 2015 WHO 'ya göre akciğer kanseri alt tiplerinde tanımlanmış önemli değişiklikler Tablo 2-1'de verilmiştir.

**Tablo 2-1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ya göre Akciğer Kanserinde Görülen Önemli Genetik Değişiklikler [93].**

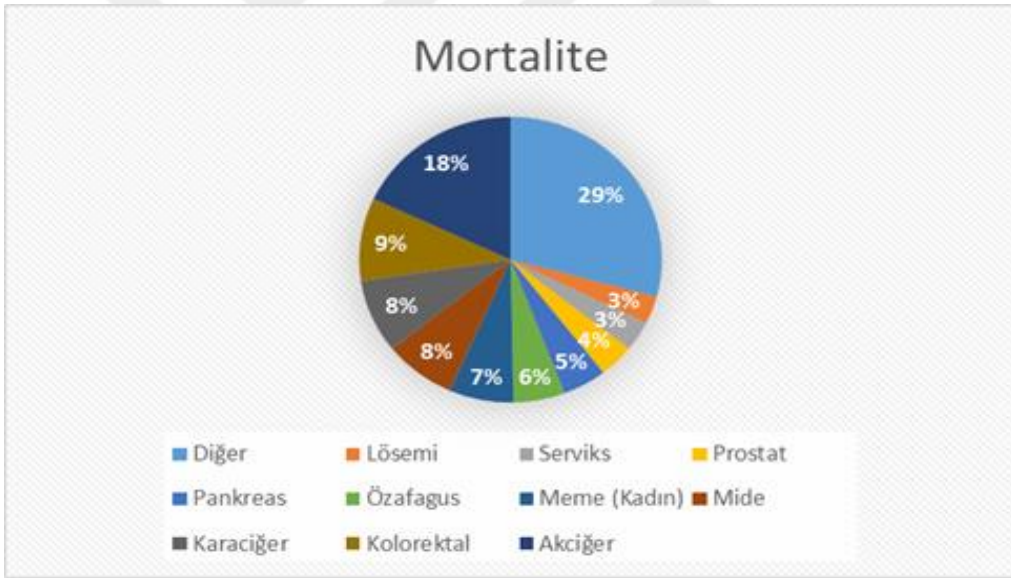
<b>Mutasyon</b>	<b>Küçük Hücreli Karsinom</b>	<b>Adenokarsinom</b>	<b>Skuamoz Hücreli Karsinom</b>
<i>BRAF</i>	0	<5	0
<i>EGFR</i>			
Beyaz Irk	<1	10-20	<5
Asyalılar	<5	35-45	< 1
<i>ERBB2/HER2</i>	0	<5	0
<i>KRAS</i>			
Beyaz Irk	<1	15-35	<5
Asyalılar	<1	5-10	<5
<i>PIK3CA</i>	<5	<5	5-15
<i>RB</i>	>90	5-15	5-15
<i>TP53</i>	>90	30-40	50-80
<b>Amplifikasyon</b>			
<i>EGFR</i>	< 1	5-10	10
<i>ERBB2/HER2</i>	< 1	<5	< 1
<i>MET</i>	< 1	<5	<5
<i>MYC</i>	20-30	5-10	5-10
<i>FGFR1</i>	< 1	<5	15-25
<b>GenYeniden Düzenlenmesi</b>			
<i>ALK</i>	0	5	< 1
<i>RET</i>	0	1-2	0
<i>ROS1</i>	0	1-2	0
<i>NTRK1</i>	0	1-2	0
<i>NRG1</i>	0	< 1	0

#### 2.2.4. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Kanser yükünün 2050 yılına kadar iki katına çıkacağı ve akciğer kanserinin ilk sırada olacağı tahmin edilmektedir [94]. GLOBOCAN 2020 verilerine göre hem kadın hem erkeklerde en sık görülen ve fazla mortaliteye sebep olan 10 kanser türü Şekil 2-4 ve Şekil 2-5'de gösterilmiştir.



**Şekil 2-4. GLOBOCAN 2020 Verileri Dünya Geneli Hem Kadın Hem Erkeklerde En Sık Görülen Kanser Türleri [1].**



**Şekil 2-5. GLOBOCAN 2020 Verileri Dünya Geneli Hem Kadın Hem Erkeklerde Kanser Kaynaklı Mortalite Oranları [1].**

Ülkeler arasında akciğer kanseri insidansı ve demografik dağılım önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların tütün kullanım oranları ve ekonomik gelişimle bağlantılı olduğu kaydedilmiştir [95]. Ülkemizde ve tüm dünyada erkeklerde en fazla görülen akciğer kanseri iken; Türkiye’de kadınlarda en sık görülen dördüncü kanser akciğer kanseridir [96]. Kanser istatistiklerine göre Çin, Endonezya, Doğu Avrupa ve Afrika'nın Kuzey ve Güney bölgelerinde sigara içme prevalansının son

zamanlarda artmasıyla birlikte bu bölgelerde akciğer kanseri insidansı artmıştır [14]. Erkeklerde en yüksek akciğer kanseri insidans oranları Orta ve Doğu Avrupa'da görülmektedir. Batı Afrika'da ise düşük insidans oranları görülmektedir. Kadınlarda, insidans oranları genellikle daha düşüktür ve coğrafi dağılımı erkeklerden biraz farklıdır. Bu da esas olarak tütün içiciliğine farklı tarihsel maruziyetten kaynaklanmaktadır. Böylece, en yüksek oran Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da, nispeten yüksek oran Doğu Asya'da ve en düşük oranlar yine Batı ve Orta Afrika'da görülmektedir [97]. Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017 ve GLOBOCAN 2020 istatistiklerine göre erkeklerde ve kadınlarda en fazla görülen kanserler sırasıyla Tablo 2-1 ve Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2-2. Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017 ve GLOBOCAN 2020 İstatistiklerine Göre Erkeklerde En Fazla Görülen Kanser Türleri [98].**

	Türkiye	Dünya	Batı Asya	Orta Doğu ve Avrupa	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Akciğer	Akciğer	Prostat
2	Prostat	Prostat	Prostat	Prostat	Akciğer
3	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Mesane	Mide	Mesane	Mide	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Mide	Mesane	Deri Melanomu

**Tablo 2-3. Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017 ve GLOBOCAN 2020 İstatistiklerine Göre Türkiye'de Kadınlarda En Fazla Görülen Kanser Türleri [98].**

	Türkiye	Dünya	Batı Asya	Orta Doğu ve Avrupa	A.B.D
1	Meme	Meme	Meme	Meme	Meme
2	Tiroit	Kolorektal	Tiroit	Kolorektal	Akciğer
3	Kolorektal	Akciğer	Kolorektal	Uterus Korpusu	Kolorektal
4	Akciğer	Uterus serviksi	Akciğer	Akciğer	Uterus Korpusu
5	Uterus Korpusu	Tiroit	Uterus Korpusu	Uterus serviksi	Deri Melanomu

Batı ülkelerindeki akciğer kanserlerinin yaklaşık %10-15'i ise hiç sigara kullanmamış kişilerde görülmektedir. Bunun sebepleri arasında pasif içicilik, radon ve hava kirliliği maruziyeti ile genetik faktörlerin etkili olduğu çalışmalarla gösterilmiştir

[99]. Kistikfibroz, Alfa-1 antitripsin eksikliği, Birt-Hogg-Dubé, Lenfanjio leiomyomatozis, Pulmoner fibroz hastalıklarının da akciğer kanseri geliştirme riski ile ilişkisi olduğu literatürde belirtilmiştir [15].

Sürveyans Epidemiyoloji Sonuç verilerine göre akciğer kanseri 5 yıllık sağkalım oranı 2011'de % 15,6'iken ve 2019'da bu oran %19,4 olarak belirlenmiştir [100]. Sağ kalımdaki bu iyileşmeyi sağlayan faktörler arasında tütün kullanımında azalma, artan torakoskopik ameliyatlara ve erken evre hastalık için stereotaktik radyasyon ve ileri evre hastalık için de hedefe yönelik ve immünolojik tedaviler yer almaktadır [101, 102].

Akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi kadınlarda erkeklere göre daha düşüktür. Bunun nedenleri arasında ilk olarak akciğer kanseri teşhisi konan kadınların demografik özelliklerinin erkeklerden farklı olmasıdır. İkinci olarak kadınların daha genç yaşta akciğer kanseri teşhisi alması, sigara içme oranlarının erkeklerden daha düşük olması ve kadınlarda adenokarsinom teşhisi konma olasılığının daha yüksek olmasıdır [103]. Ancak, mevcut eğilimlerin devam etmesi durumunda 2045'te kadınlarda akciğer kanserinden ölümlerinin sayısının erkeklerden daha fazla olacağı öngörülmektedir [104].

Akciğer kanseri en çok 70 yaş ve üzeri kadın ve erkeklerde görülmekteyken, 40 yaş ve üstü erkeklerde ve 60 yaş ve üstü kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir [101]. Akciğer kanseri tanısında ortalama medyan yaş 70 iken, akciğer kanserinden ölümden ortalama median yaş 72'dir [105].

### 2.2.5. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanseri oluşumuna sebep olan birçok risk faktörü bulunmaktadır. Son zamanlardaki epidemik araştırmalar, akciğer kanseri insidansındaki artışından tütün kullanımı, radon maruziyeti, iç ve dış hava kirliliği, zararlı mesleki maruziyetler, kalıtsal yatkınlık, radyasyona maruz kalma ve dengesiz beslenmenin sorumlu olduğu bulunmuştur [97].

Akciğer kanseri cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Dünya çapında artan akciğer kanseri yükü daha çok erkek akciğer kanseri vakalarından kaynaklansa da, çoğu ülkede kadınlarda artan bir insidans gözlemlenmektedir [14]. Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmasına rağmen [106], akciğer kanseri, Kuzey Amerika, Kuzey/Batı Avrupa, Avustralya ve Yeni Zelanda dahil

olmak üzere birçok bölgede kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Bu bölgelerdeki yüksek ölüm oranlarının sebebi olarak yerel sigara içme alışkanlıkları gösterilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, dünya genelinde tahmini erkeklerin %48'inin ve kadınların %10'unun sigara kullandığını vurgulamıştır. Tütün kullanım oranlarının düşük olduğu Çinli kadınlarda ise sigara içme prevalansının daha düşük olmasına rağmen akciğer kanseri oranı birçok Avrupa ülkesindekiyle benzerdir. Bu durumun kömür, ısınma veya yemek pişirmeden kaynaklanan dumanın solunmasıyla ilişkili olabileceği varsayılmaktadır [14].

Tütün kullanımı, akciğer kanserine sebep olan açık ara en önemli risk faktörüdür. Dünya'da akciğer kanseri vakalarının erkeklerde %80'i, kadınlarda ise %50'si sigaradan kaynaklanmaktadır [107]. Sigara içenlerde akciğer kanseri riski, uzun yıllar boyunca sigara içilmesiyle birlikte artar. Akciğer kanserinde sigara içme süresinin, günlük içilen sigara miktarından daha etkili olduğu bildirilmiştir [108].

Pasif içicilikte akciğer kanseri riskini arttırmaktadır. Sigara içmeyen akciğer kanserlerinin en az %17'si çocukluk ve ergenlik döneminde yüksek düzeyde sigara dumanına maruziyetten kaynaklandığı bildirilmiştir [109]. Dünya çapındaki tüm akciğer kanseri vakalarının %25'i hiç sigara içmeyen bireylerde görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmaya göre akciğer kanserinin kadınlarda %19'u ve erkeklerde ise %9'u sigara içmeyenlerde görülmektedir [110]. Güney Asya ülkelerinde ise akciğer kanseri tanılı kadınların ise %80 kadarının hiç sigara içmediği rapor edilmiştir [111].

İklim değişikliği ve hızla ilerleyen sanayileşme sonucu artan hava kirliliği çeşitli kanserlere sebep olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, hava kirliliğinin, sigaradan bağımsız olarak artan akciğer kanseri riski ve mortalitesi ilişkili olduğunu belirtmiştir [112]. Dünya genelinde önemli bir sorun kaynağı olan hava kirliliğinden dolayı oluşan partikül, kükürt dioksit ve duman kansere sebep olan etmenler arasında yer almaktadır. Fabrikalar ve otomobillerin neden olduğu kirli hava, yemek dumanlarına veya iç mekan dekorasyonundan kaynaklanan formaldehitlere uzun süre maruz kalma akciğer kanseri riskini yüksek oranda arttırmaktadır [113]. Araç egzozundan çıkan nitrik oksit ve nitrojen dioksit gibi kimyasal maddeler de kanserojenik etki göstermektedir [113]. Dünya çapında yaklaşık 3 milyar insan, enerji kaynağı olarak katı yakıtları

kullanmaktadır. Çin'de evlerde kömürün yemek pişirme amacıyla kullanılmasının akciğer kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir [114].

Radon, akciğer kanserinin sigaradan sonra ikinci en yaygın nedenidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 20.000 akciğer kanseri ölümünün radonla ilgili olduğu bildirilmiştir [115]. Radon, uranyumun bozunma serisindeki radyumdan doğal olarak üretilen bir soy gazdır [116]. Artan akciğer kanseri riskine neden olan etiyolojik faktörlerin başlangıçta tozla ilişkili pnömokonyoz, arsenik veya kobalt olduğu düşünülse de, gerçek kanserojenler, başta radon ve onun bozunma ürünleri olmak üzere radyoaktif maddelerdir. Avrupa, Kuzey Amerika ve Çin'de yürütülen üç kohort çalışması, kronik olarak radona maruz kalmanın akciğer kanseri oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermiştir [117].

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, akciğer kanserine sebep olan 12 adet mesleki ajan belirlemiştir. Bunlar alüminyum, arsenik, asbest, bis-klorometil eter, berilyum, kadmiyum, altı değerlikli krom, kok kömürü ve dumanları, kristal silika, nikel, radon ve kurumdur [118]. Asbest, iyi bilinen mesleki bir kanserojendir ve doğal olarak oluşan silikat minerallerinin çeşitli formlarını içerir. Yüksek düzeyde asbeste maruz kalmak akciğer kanserine ve mezotelyomaya neden olabilir [119]. Dünya çapında erkekler arasında akciğer kanseri ölümlerinin %10'unun ve kadınlar arasında %5'inin mesleki kanserojenlere, yani asbest, arsenik, berilyum, kadmiyum, krom, nikel, silika ve dizel dumanlarına maruz kalmaya bağlı olabileceği tahmin edilmektedir [120].

Akciğer kanserinin patogeneğinde genetik faktörler de etkilidir [107]. Ailede kanser öyküsü, özellikle erken yaşta akciğer kanserine yakalanan aile üyelerinin varlığı akciğer kanseri riskini arttırmaktadır [121, 122]. Ailesinde akciğer kanseri öyküsü olan ve sigara içen kişilerde ise akciğer kanseri riski iki kat daha fazladır [123]. Akciğer kanseri gelişiminden sorumlu en yaygın genetik mutasyonlar, küçük hücreli akciğer kanseri için *MYC*, *BCL2* ve *TP53* genlerinde ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri için *EGFR*, *KRAS* ve *p16* genlerinde görülmektedir [124, 125].

Epidemiyolojik çalışmalar ile yüksek dozda radyasyona maruz kalmanın akciğer kanseri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Akciğer kanserine sebep olan iki tür radyasyon tanımlanmıştır. Bunlar: düşük lineer enerji transfer radyasyonu olan X ve Gamma ışınları ile yüksek lineer enerji transfer radyasyonları olan nötronlar ve radondur.

Bununla birlikte, düşük doz radyasyonun akciğer ile ilgili olup olmadığı günümüzde hala belirsizliğini korumaktadır [126].

Beslenme alışkanlıkları da kanser oluşumunda etkilidir. Retinol ve beta-karoten gibi antikanserojenik aktiviteye sahip olduğu düşünülen mikrobeyinlerin özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olduğu bildirilmiştir [127, 128]. Kırmızı et, süt ürünleri, doymuş yağlar ve lipidler gibi belirli diyet öğelerinin akciğer kanseri riskini artırdığı öne sürülmüştür. Bir meta-analiz, yüksek kırmızı et tüketiminin akciğer kanseri riskinde önemli (% 24) bir oranda arttırdığı bulunmuştur [129].

Kronik akciğer hastalıkları, akciğer kanserine sebep olan etiyolojik faktörler arasında yer almaktadır. Özellikle erkeklerde kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ile akciğer kanseri arasında güçlü bir ilişki vardır [130]. Ayrıca Alfa1-antitripsin eksikliği olanlarda akciğer kanseri riskinin iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. İnterstisyel fibrozisli hastalarda da akciğer kanseri riskinin 8,25 kat olacak şekilde belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir [131]. Diğer fibrozan hastalıklardan olan asbestoz ve skleroderma hastalıklarında artan akciğer kanseri ile ilişkisi literatürde bildirilmiştir [132].

Akciğer kanseri etiyolojik faktörleri arasında viral enfeksiyonlar da vardır. Bronşiyal skuamöz hücre lezyonlarında tespit edilen insan papilloma virüsü (HPV) akciğer kanseri için potansiyel bir risk faktörüdür [133]. Asya kohortlarında, özellikle sigara içmeyen akciğer kanseri vakalarında yüksek oranda HPV DNA insidansı bildirilmiştir; ancak, Batı Avrupa'daki çalışmalar, akciğer kanserinde HPV'nin etiyolojik etkisini göstermemiştir [134]. Kanser Genom Atlas verilerine göre, akciğer kanseri doku örneklerinin %21'inde, eşlenik normal dokuya kıyasla daha fazla viral diziler bulunduğunu bildirmiştir [135].

### **2.2.6. Akciğer Kanseri Histopatolojisi**

Akciğer kanserinin patofizyolojisi oldukça karmaşıktır. Sigara dumanı gibi kanserojenlere sürekli olarak maruz kalmak akciğer epitelinde displaziye yol açar. Karsinojenlere maruziyet devam ettikçe, genetik mutasyonlar ortaya çıkarak birikmekte ve protein sentezini etkilemektedir. Böylece hücre döngüsü bozulurak karsinogenez oluşumu başlamaktadır [136].

Akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırması, akciğer kanserlerinin teşhis ve tedavisinin önemli bir parçası olan hücresel ve moleküler alt tiplerine göre yapılmaktadır. 2021 Dünya Sağlık Örgütü akciğer tümörleri sınıflandırma sistemi, akciğer kanserlerini:

1. Öncü glandüler lezyonlar,
2. Adenokarsinomlar,
3. Adenoskuamöz karsinomlar,
4. Skuamöz öncü lezyonlar,
5. Skuamöz hücreli karsinomlar,
6. Büyük hücreli karsinomlar,
7. Sarkomatoid karsinomlar,
8. Akciğer nöroendokrin neoplazmalar,
9. Tükürük bezi tipi tümörleri,
10. Nöroendokrin tümörler,
11. Nöroendokrin karsinomlar,
12. Diğer Epitel Tümörler olarak gruplandırılmaktadır [98].

#### **2.2.6.1. Öncü Glandüler Lezyonlar**

Öncü glandüler lezyonlar arasında atipik adenomatöz hiperplazi ve adenokarsinoma in situ bulunur. AAH, akciğer adenokarsinomu için preinvaziv bir lezyondur ve genellikle 5 mm veya daha küçüktür. Adenokarsinoma in situ ise müsinöz veya non-müsinöz olabilir. Bu tümörler genellikle 3 cm'den küçük veya eşittir. Alveolar yapılar boyunca kısıtlı büyüme olarak tanımlanan 'lepidik' büyüme paterni gösterirler. Noninvazivdirler [137].

#### **2.2.6.2. Adenokarsinom**

Adenokarsinom patolojisi glandüler neoplastik diferansiyasyon veya intrasitoplazmik müsin üretimi ile karakterizedir. Glandüler neoplastik diferansiyasyon oran ve yapısına göre müsinöz ve non-müsinöz olarak sınıflandırılmaktadır. Non-müsinöz alt tipleri: Asiner, papiller, mikropapiller, lepidik ve solid'tir. Bu alt tiplerin

patolojik olarak tanımlanması prognoz açısından önemlidir. Solid, mikropapiller ve kribriform paternleri kötü prognoza sahiptir [138]. Adenokarsinomanın daha az görülen diğer formları arasında kolloid, enterik-benzeri, lenfoepitelyal ve fetal gelmektedir [137].

Minimal invaziv adenokarsinom (MIA), 3 cm'den küçük veya eşit olan soliter bir adenokarsinomdur. Genel olarak bir lepidik büyüme paterni gösterir ve minimal invazyon derinliği 5 mm'den azdır. İnvazyon derinliği 5 mm'den fazla ise lepidik-predominant adenokarsinom olarak tanımlanır. Daha önce müsinöz bronşiyoloalveolar karsinom olarak tanımlanan invaziv müsinöz adenokarsinom, MIA olarak sınıflandırılmayan müsinöz lezyonları içerir. %10'dan fazla müsinöz ve non-müsinöz büyüme paternleri mevcutsa lezyon mixed adenokarsinom olarak sınıflandırılır [137].

#### **2.2.6.3. Adenoskuamöz Karsinom**

Adenoskuamöz karsinomlar, %10'dan fazla glandüler ve skuamöz hücreli karsinom bileşeni içeren akciğer tümörleridir. Nadir görülen ve oldukça agresif bir akciğer tümörüdür. Yüksek rekürrens ve beyin metastazı riski nedeniyle, tüm beyin postoperatif profilaktik radyoterapi ile radikal olarak rezeke edilmiş evre 1 tümörlerde bile adjuvan kemoterapi önerilmektedir [139].

#### **2.2.6.4. Skuamöz hücreli karsinom**

Sitolojik olarak keratin, hücreler arası dezmozom içeren skuamoid görünüm sergileyen tümörlerdir. İmmünohistokimyasal olarak p40 ve p63 veya desmoglein ekspresyonu gibi biyobelirteçlerin pozitifliği ile skuamöz hücreli karsinom tanısı alınır. Skuamöz hücreli karsinomun alt tipleri, Keratinize skuamöz hücreli karsinom, Non-keratinize skuamöz hücreli karsinom, bazoloid skuamöz hücreli karsinomlardır. Skuamöz hücreli karsinomlar en sık kavitasyon veya nekroz ile sonuçlanan akciğer tümörleridir. Bu kanserler Pancoast tümörleri ve hiperkalsemi olarak ortaya çıkabilir. Pancoast tümörlerinde ameliyat sonrası nükslerin en sık görüldüğü yer beyindir [137].

#### **2.2.6.5. Büyük Hücreli Karsinom**

Büyük hücreli karsinom, glandüler, skuamöz veya nöroendokrin kanserlerle uyumlu sitolojik özelliklere sahip olmayan malign bir epitelyal neoplazmdır. Tipik olarak immünohistokimyasal olarak p40 ve TTF-1 ekspresyonları yoktur. Küçük hücreli karsinomun sitolojik özelliklerinden de yoksundurlar. Büyük hücreli karsinom tipik

olarak, belirgin nükleollere sahip yuvarlak ve poligonal şekilli hücrelerden oluşur. Hücreler, herhangi bir tanımlayıcı özelliği olmayan bol sitoplazmalı ve büyüktür [140].

#### **2.2.6.6. Sarkomatoid Karsinom**

Sarkomatoid karsinomlar malin epitelyal bileşen içeren ve sarkomları düşündüren az difereansiye akciğer kanseridir. Alt tipler arasında pleomorfik karsinom, karsinosarkom ve pulmoner blastom bulunur [137].

#### **2.2.6.7. Küçük Hücreli karsinom**

Küçük hücreli karsinom, az miktarda sitoplazmaya sahip, yuvarlak/ oval şekilli hücrelerden oluşan, dinlenme fazındaki lenfosit büyüklüğünde hücrelerin oluşturduğu akciğer kanseridir. Belirgin bir nükleol görülmez. KHK'lar yaygın olarak nekrotiktir. Genellikle kromogranin veya sinaptofizin ile pozitif boyanırlar. WHO daha önce KHK'yı üç hücre alt tip olarak sınıflandırmıştır ancak bu tür bir sınıflandırmanın çok fazla klinik önemi veya prognostik değeri olmadığı gösterilmiştir [141].

#### **2.2.7. Akciğer Kanseri Evrelemesi**

Klinik evreleme, akciğer kanseri hastalarında tedavi seçeneğini etkilemenin yanı sıra sağ kalım tahmininde de çok önemli rol oynar. En doğru prognostik belirteçleri sağlamak için daha fazla veri elde edildikçe, kılavuzlar sürekli olarak güncellenmekte ve akciğer kanserinin klinik tespiti ve evrelenmesine yardımcı olmaktadır. TNM evreleme metodu 1970'lerde kullanıma başlamasından bu yana, uluslararası olarak geçerli olmak üzere en son 8. baskı ile önemli revizyonlardan geçerek belirlenmiştir. Akciğer kanseri evrelemesinde TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. T:birincil tümör boyutunu; N:bölgesel lenf düğümleri tutulum derecesini; M: uzak metastatik yayılım varlığını veya yokluğunu tanımlarlar. TNM klinik evresi (k-evresi) cerrahi olmayan hastalarda ve TNM patolojik evresi (p-evre) ise cerrahi olan akciğer kanserli hastalarda tümörü evrelemek için kullanılmaktadır [142].

TNM sınıflandırmasının 8. baskısı, KHDAK, KHAK ve bronşiyal karsinoidlerin evrelenmesi için geçerlidir. Akciğer kanserinin için 8. Baskı TNM evreleme sistemi ve 5 yıllık sağ kalım oranları Tablo 2-4'de gösterilmiştir [143].

**Tablo 2-4. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri 8. Baskı TNM Evrelemesi Özellikleri [144]**

Kategori	Özellikler	5 yıllık sağ kalım
<b>Tx</b>	Görüntüleme veya bronkoskopide değerlendirilmeyen tümör Balgam veya bronşiyal yıkama sıvısında malin hücre varlığı	
<b>T0</b>	Primer tümör kanıtı yok	
<b>Tis</b>	Karsinom in situ; lepidik paternli 3 cm'den küçük adenokarsinom	
<b>T1</b>	≤ 3 cm tümör	
<b>T1a (mi)</b>	Minimal invasiv adenokarsinom	
<b>T1a</b>	En geniş tümör çapı ≤1 cm <sup>2</sup>	% 92
<b>T1b</b>	En geniş tümör çapı >1 cm, ≤2 cm	% 83
<b>T1c</b>	En geniş tümör çapı >2 cm, ≤3 cm	% 76
<b>T2</b>	En geniş tümör çapı >3 cm, ≤5 cm *Ana bronş,visseral pleza invazyonu *Atektazi veya obstrüktif pnömoni	
<b>T2a</b>	En geniş tümör çapı >3 cm, ≤4 cm	% 67
<b>T2b</b>	En geniş tümör çapı >4 cm, ≤5 cm	% 60
<b>T3</b>	En geniş tümör çapı >5- ≤7 cm *Göğüs duvarı(pancoat tümörler dahil) Frenik sinir,pariyetal perikard invazyonu *Primer tümör lobunda nodül	% 52
<b>T4</b>	En geniş tümör çapı >7 cm *Diyafra,mediasten, carina,trakea,kalp,büyük damarlar Rekürren laringeal sinir,özefagus,vertebral body invazyonu *Primer tümör lobundan farklı lobda nodül	
<b>N0</b>	Lenf bezlerine metastaz yok	% 75
<b>N1</b>	*İpsilateral peribronşiyal,hiler, intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon	% 49
<b>N2</b>	*İpsilateral mediastinal ve subkarinal lenf bezlerine metastaz	% 36
<b>N3</b>	* Kontralateral mediastinal,ipsilateral veya kontralateral supraklaviküler veya skalen lenf bezlerine metastaz	% 20
<b>M0</b>	Uzak metastaz yok *Karşı akciğerde metastatik nodül	
<b>M1a</b>	Plevral/perikardiyal metastatik nodül Malin plevral /perikardiyal efüzyon	% 11,4
<b>M1b</b>	Tek ekstratorasik organ metastazı	% 11,4

**Tablo 2-5. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri 8. Baskı Evrelemesi [144].**

Stage		5 yıllık sağ kalım
Stage IA1	T1mi / T1aN0M0	% 92
Stage IA2	T1bN0M0	% 83
Stage IA3	T1cN0M0	% 77
Stage IB	T2aN0M0	% 68
Stage IIA	T2bN0	% 60
Stage IIB	T1a,b,c / T2a,bN1M0 / T3N0M0	% 53
Stage IIIA	T1a,b,c / T2a,bN2M0 / T3N1M0/ T4N0/N1M0	% 36
Stage IIIB	T1a,b,c/ T2a,bN3M0 / T3 / T4N2M0	% 26
Stage IIIC	T3 / T4N3M0	% 13
Stage IVA	TNM1a / M1b	% 10
Stage IVB	TNM1c	0

## 2.2.8. Akciğer Kanseri Prognuzu

### 2.2.8.1. KHDAK Prognuzu

KHDAK'lı hastalarda başvuru sırasındaki TNM evresi, prognoz üzerinde en önemli etkiye sahiptir. Yüksek bir TNM evrelemesi ileri hastalık ve kötü sonuçlarla ilişkilidir. Kötü prognoza işaret eden diğer faktörler arasında tanı anında hastanın durumu, anoreksi, kilo kaybı ve karaciğer veya deri metastazlarının varlığı yer almaktadır [145]. Adenokarsinomlu hastalarda EGFR'nin aktive edici mutasyonların varlığı hastaların, EGFR mutasyonları olmayanlara göre daha iyi prognoza sahip olduğunu ortaya koymuştur [146].

### 2.2.8.2. KHAK Prognuzu

Kanserin boyutu ve yayılımı ve başvuru anındaki evre, KHAK'lı hastalar için en önemli prognostik faktördür. Hastanın genel durumu ve kilo kaybı KHAK için bağımsız prognostik faktörlerdir [137].

## **2.2.9. Akciğer Kanseri Tanı ve Tarama Yöntemleri**

### **2.2.9.1. Yüksek Riskli Grupları Tarama**

Yüksek risk gruplarının taranması, akciğer kanserini tedavi edilebilir aşamada erken teşhisine olanak tanır. Yüksek risk grubu: yoğun sigara içme öyküsü olanlar, halen sigara içenler veya 15 yıldan daha kısa bir süre önce sigarayı bırakmış olanlar ile 55-80 arası yaş grubu arasında olanları içerir [147].

Amerikan Kanser Derneği 2020 yılı için 135.720 kişinin akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybettiğini bildirmiş ve yüksek risk gruplarının daha yaygın taranması ile Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık ortalama 45.000 hayat kurtarabilmiştir. Böylece akciğer kanseri tarama başlama yaşının 55'ten 50'ye düşürülmesini ve sigara öyküsünün 30 yıldan 20 yıla düşürülmesini tavsiye etmiştir. Şu anda, önerilen popülasyonun yalnızca bir kısmı taranmaktadır. Akciğer kanseri tarama kılavuzları ve bu muayeneleri yüksek riskli hastalar için reçeteleme ile daha da yaygınlaştırılmalıdır [147].

### **2.2.9.2. Radyografik Tarama ve Tanı**

Japonya'da yapılan bir çalışmada, akciğer kanseri için yıllık göğüs röntgeni taramasının, akciğer kanseri mortalitesini %25 oranında azalttığını göstermiştir [148]. Japonya, Osaka'da gerçekleştirilen bir çalışmada yayınlanan sonuçlar, düşük doz sarmal bilgisayarlı tomografi (LDCT) kullanılarak yüksek riskli sigara içicilerinin taraması, standart radyografik taramaya kıyasla akciğer kanserinde %20'lik bir azalma gösterdiğini ortaya çıkarmıştır [149]. Akciğer kanseri teşhisinde kullanılan göğüs radyografisi ile yaklaşık 1 cm çapında olan ve  $10^9$ 'dan fazla hücreye bronşiyal ve vasküler epitel tümörler tespit edilebilir [148].

### **2.2.9.3. Sputum Muayenesi**

Akciğer kanserinin kullanılan diğer bir tanı prosedürü ise sitolojik sputum incelemesidir. Sputum muayenesi daha büyük bronşlardan (skuamöz ve küçük hücreli karsinomlar) kaynaklanan merkezi tümörlerin saptanmasına yardımcı olmaktadır. Genel olarak, sputum örnekleri küçük bronşlar, bronşiyoller ve alveoller gibi hava yolu dallarından kaynaklanan küçük adenokarsinomları (çap  $\leq 2$  cm) tespit edemez. Sigaraya maruz kalma değişiklikleri (filtreler ve azalan nikotin içeriği) adenokarsinomları

arttırdığı ve skuamöz karsinomları azalttığı için bu daha büyük bir önem kazanmıştır. Sputum sitolojisinin erken akciğer kanserine duyarlılığı %20-30 oranındadır [150].

#### **2.2.9.4. Bronkoskopi ve Akciğer Doku Biyopsisi**

Beyaz ışık bronkoskopisi (BIB), akciğer kanserinin histolojik teşhisinde en sık kullanılan tanı aracıdır. Bununla birlikte, bronkoskopinin malign öncesi lezyonlar için önemli tanı sınırlamaları vardır. Bu lezyonlar, 0,2-1 mm kalınlığında ve birkaç milimetre çapında birkaç hücre katmanından oluştuğu için görsel olarak tespit edilmesi zordur. Vakaların sadece %29'u deneyimli kişiler tarafından yapılan bir bronkoskopi sonrası tespit edilmektedir. Bu yöntem erken invaziv ve in situ kanserleri tespit edebilse de, displazilerin tespit edilmesinde net sonuçlar sağlamayabilir [54].

Akciğer doku biyopsisi kanser doğrulaması için altın standarttır. Akciğer dokusu biyopsi örnekleri, histopatolojik yöntemlerle akciğer kanserinin alt tipini tanımlamak için yeterli doku materyaline sahip olmalıdır. İlk biyopsi, erken tanıyı doğrulamak, artan komplikasyon riskini azaltmak, tedaviye erken başlamak ve biyopsiyi tekrarlamaktan kaçınmak için kritik öneme sahiptir [54].

Akciğer kanseri tanısında yaygın olarak kullanılan prosedürler, fiber optik bronkoskopisi (transbronşiyal iğne aspirasyonu ile birlikte olan/olmayan), endobronşiyal ultrasonografi, transtorasik-iğne aspirasyonu, mediastinoskopi, plevral sıvı analizi (torasentez), torakoskopi ve cerrahi yaklaşımları içerir. Tüm bu prosedürler maliyetlidir, komplikasyonlara eğilimlidir ve daha fazla numuneye ihtiyaç duyulabilir [151].

#### **2.2.10. Akciğer Kanserinde Kullanılan Biyobelirteç Numuneleri**

##### **2.2.10.1. Sputum**

Balgamın sitolojik incelemesi akciğer kanserinin erken teşhisi için yararlı bir tarama aracı olmasına rağmen, daha küçük hava yollarından kaynaklanan adenokarsinomlar gibi periferik tümörler gözden kaçabilir [54].

Akciğer kanserinde yaygın olarak inaktive edilmiş veya mutasyona uğramış gen p16 genidir [152]. Akciğer kanseri hastalarının balgamındaki CpG adalarının hipermetilasyonunun ölçümü, KHDAK kanserinin erken evreleri ile yüksek bir korelasyon göstermiştir. Bu da p16 CpG hipermetilasyonunun akciğer kanserinin erken teşhisinde yardımcı olabileceğini düşündürmektedir [54].

miRNA'lar akciğer kanseri taraması ve erken teşhisi için potansiyele sahiptir ve akciğer kanserinin erken teşhisinde miRNA'larda kullanılabilir. miRNA'lar, genellikle mRNA dizilerini hedefleyen 22 nükleotid uzunluğundaki kodlamayan RNA'lardır. Translasyonu önler ya da mRNA bozulmasını destekler ve belirli genlerin down regülasyonuna yol açar. mRNA'dan daha kararlı yapıda olan miRNA'lar, akciğer kanser riski veya teşhisi için klinik uygulamada bir belirteç olarak daha pratiktir. Bu miRNA'lar, akciğer kanseri evre 1 de dahil olmak üzere tüm kanser evrelerini sağlıklı kontrollerden ayırt etmek için yüksek özgüllük ve duyarlılık sergileyen miR-155 ve miR-197 içerir [153].

#### 2.2.10.2. Bronkoalveolar Lavaj (BAL)

Bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinin rutin sitopatolojik analizi, yıllardır yaygın bir tanı materyali olarak kullanılmaktadır. BAL örneklerinde *TP53* ve *KRAS* mutasyonları tespit edilebilir. *p16* geninin CpG adasının metilasyonu ve mikrosatellit değişikliğini içeren moleküler belirteçler de bulunmuştur [154].

#### 2.2.10.3. Periferik Kan

Akciğer karsinomlarının sınırlı erişilebilirliği, serum veya plazma gibi daha erişilebilir ve invaziv olmayan numunelerde tümörle ilişkili belirteçleri belirleme çabalarına yol açmıştır. DNA teknolojilerinin gelişmesi ve kanda dolaşan DNA'nın nanogram miktarlarını tespit edebilen PCR tekniklerinin kullanılmasıyla, kanser hastalarının plazma ve serumunda sağlıklı kontrollere göre dört kat daha fazla serbest DNA'nın bulunduğu tespit edilmiştir [155]. KHAK hastalarında tümör ve plazma DNA'larındaki mikrosatellit değişikliklerinin karşılaştırıldığı çalışma sonrasında; tümör DNA'sında mikrosatellit değişiklikleri olan hastaların %93'ünün plazma DNA'sında da değişiklikler gösterdiğini bildirilmiştir [156]. Bu sonuçlar, dolaşımdaki DNA modifikasyonlarının akciğer kanseri için erken tespit biyobelirteçleri olarak kullanılabileceğini göstermektedir [54].

Dolaşımdaki DNA'daki bir başka modifikasyon ise DNA metilasyonudur. Hipermetile DNA, tüm kanser evrelerinde bulunduğu ve erken akciğer kanseri tespit belirteci olasılığını ortaya çıkarmıştır. *T53* ve *RAS* gen mutasyonları, pankreas ve kolorektal kanserlerinde gibi diğer kanser hastalarının plazma ve serumunda belirteç olarak yerleşmiş, akciğer kanserinde henüz belirlenmemiştir [157].

#### 2.2.10.4. İdrar

Biyobelirteç arayışında idrar nadiren incelenir. Bununla birlikte, idrar, akciğer kanserinin bir biyolojik belirteci olarak kullanım potansiyeli gösterir. Uçucu organik bileşiklerin varlığı ve proteomik analizler, akciğer kanseri teşhisi için potansiyel biyobelirteçler olarak önerilmiştir [54].

Yakın zamanda önerilen bir başka test, antiviral FDA onaylı ilaç amantadinin dönüştürülmesidir. Amantadin, spermin spermidin SSAT-1 veya N<sup>1</sup>-asetiltransferaz enzimi tarafından asetillenir [158] ve asetillenmiş moleküller katalize edilmediğinden, idrar numunelerinde asetillenmiş amantadin seviyeleri tespit edilebilir [159]. SSAT-1, hücre döngüsünde rolü olan ve akciğer kanserinde upregüle olan bir enzimdir [160]. İdrardaki asetil amantadin düzeylerinin ölçümü kanserin ilerlemesini göstermek için kullanılabilir ve invaziv değildir (idrar örneği), basittir ve akciğer kanseri teşhisi için klinik uygulanabilirliği vardır [158].

Son zamanlarda, akciğer kanseri teşhisinde hücre dışı veziküllerin potansiyel kullanımı önerilmiştir [161]. Bu veziküller, idrar, BAL ve fare serumu dahil olmak üzere farklı vücut sıvılarından izole edilmektedir. Bu vücut sıvılarında EpCAM seviyeleri ölçülür. Çünkü bu protein, bir hücre-hücre adhezyonunun aracısı olarak tümör oluşumuna dahil olur [162]. Fareler sigara dumanına maruz bırakıldığında, BAL'deki vezikül konsantrasyonunda bir artış gözlemlendiğinden bu da farklı vücut sıvılarında veziküllerin saptanmasının akciğer kanserinin erken teşhisi için potansiyel olarak uygulanabilir olabileceğini düşündürmüştür. Ancak veziküllerin insanlarda test edilmemiş olması dikkat çekicidir ve testin validasyonu için daha fazla çalışma yapılmalıdır [54].

#### 2.2.11. Akciğer Kanseri Tedavisi

Akciğer kanseri tedavisinde hastanın tümör evresine ve alt tipine göre farklı tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar, cerrahi, lokal postoperatif radyasyon, adjuvan kemoterapi, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) [163], ALK (Anaplastik lenfoma kinaz),ROS-1 inhibitörleri, immünoterapi, lobektomi ve ardından adjuvan kemoterapi, platin bazlı kemoterapi ve lokal postoperatif radyasyondur [137].

Hastalığın erken evrelerinde tümörü ve yakındaki lenf düğümlerini çıkarmak için yapılan cerrahi en tutarlı ve başarılı tedavidir. Tümörler anatomik segmentektomi, lobektomi veya pnömonektomi ile çıkarılmaktadır [164-166].

### 2.2.12. Akciğer Kanserinin Önlenmesi

Akciğer kanserinin önlenebilmesi için en önemli tedbir, tüm bireylerde sigaranın bırakılmasıdır. Hastalar, her klinisyen ziyaretinde akciğer kanserinin sigara ile klinik korelasyonu hakkında bilgilendirilmelidir [137]. Akciğer kanserine bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltmada diğer bir yöntem ise bireylerin etkin taranmasıdır. Yüksek riskli bireyler için birincil koruma düşük doz sarmal bilgisayarlı tomografidir. 66-80 yaşları arasındaki sigara içenlerin, 55-64 yaşındakilere kıyasla taramadan daha fazla fayda sağladığı belirlenmiştir [167].

Akciğer hastalığı öyküsü, ailede akciğer kanseri öyküsü ve asbeste maruz kalma gibi klinik faktörleri içeren farklı modeller akciğer kanserinin mortalite ve morbidite oranlarını düşürmede yararlı olabilir. Bu modellemeler ile yüksek risk altındaki bireyleri belirlemek için uygulanabilir. Yüksek riskli bireyler, 20 paket/yıl üzerinde sigara içme öyküsü olan ve aktif olarak sigara içen veya son 15 yıl içinde sigarayı bırakmış kişiler olarak tanımlanmaktadır [137]. ABD’de hazırlanan güncel kılavuzlar, sigara içme öyküleri nedeniyle yüksek akciğer kanseri riski taşıyan 50 ila 80 yaş arasındaki hastalar için yıllık LDCT önermektedir [168].

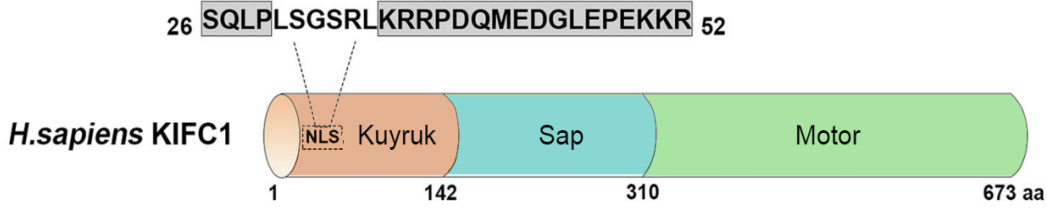
## 2.3. KIFC1 (Kinesin Süper Ailesi C1) Proteini ve Kanser

### 2.3.1. KIFC1 Proteinin Yapısal Özellikleri

KIF süper ailesi, 39 adet N-kinesin, 3 adet C-kinesin ve 3 adet M-kinesin olmak üzere toplam 45 üyeden oluşan motor protein ailesidir [169]. KIF süper ailesinin mikrotübül eksi ucuna bağlanan tek alt grubu Kinesin 14 ailesi (KIF 14) ‘tür [170]. KIF14 proteinleri, C-terminal kinesinlerdir [171, 172]. KIFC1 memeli hücrelerinde iğipliklerinin eksi ucuna etki ederek hücre içi motiliteye sebep olan KIF14 ailesine mensup olan tek üyedir [173].

*HSET* olarak da adlandırılan *KIFC1*, 6. kromozomun kısa koluna lokalize olan 2. bölge 1 bant 3. alt bant ikinci alt zonda bulunur [174]. *KIFC1*’in toplamda 20 ekzon içeren dört transkripti vardır. Yapısal olarak *KIFC1* kuyruk, sap ve motor olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Şekil 2-5’de *KIFC1* gen domainleri gösterilmiştir. C terminal ucu mikrotübül bağlama bölgesini ve ATP’nin hidrolizi için katalitik bölgeleri içerir [175, 176]. Sap domain hücre içi taşıma hareketlerini [175, 177] ve mikrotübül

organizasyonunu düzenlemektedir [178] KIFC1 kuyruk domain ise zarlı organeller [179], veziküller ve  $\gamma$ -tubulini tanıma ve bağlamada rol alır [180, 181]. KIFC1'in kuyruk (NLS) domaini ayrıca interfazda kinesin proteinlerinin çekirdeğe transferini sağlar [182]. KIFC1 protein domainleri Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2-6. KIFC1 Proteinin Domainleri [183].

### 2.3.2. KIFC1 Proteinin Hücredeki Fonksiyonları

**Kromozom ve Mikrotübül Dinamiği;** KIF'ler kromozom ve mikrotübül dinamiğine etki ederek mitoz bölünme sırasında önemli roller oynamaktadır [184, 185]. Mitoz bölünme, hücre çekirdeğindeki kardeş kromatidlerin ayrılarak her birinin kendi çekirdeğine ayrılmasıyla son bulan hücre döngüsünün bir parçasıdır. Mitoz sırasında, kromozomlar yoğunlaşarak hücrenin ortasına sıralanır. Daha sonra her bir kromozomlar hücrenin karşı taraflarına çeken iğ ipliklerine bağlanır. Karyokinez ile kardeş kromatidler iğ iplikleri vasıtasıyla özdeş iki çekirdeğe ayrılır. Daha sonra her biri sitokinez ile kendi ayrı sitoplazmik bölmesinde çevrelenerek yeni hücreler oluşur. Mitoz bölünme esnasındaki disregülasyon, hücrelerin normalden az veya daha fazla sayıda kromozom içermesine sebep olabilir. Bu da anöploid hücre oluşumuna sebep olur [186]. Mitoz sırasında meydana gelen disregülasyonlar apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indükleyebilir veya mutasyonlara neden olabilir. Bu tür mutasyonlarda belirli kanser türlerinde ortaya çıkabilir [187]. Bu nedenle, KIF ekspresyonundaki değişiklikler kanser oluşumuna neden olabilir.

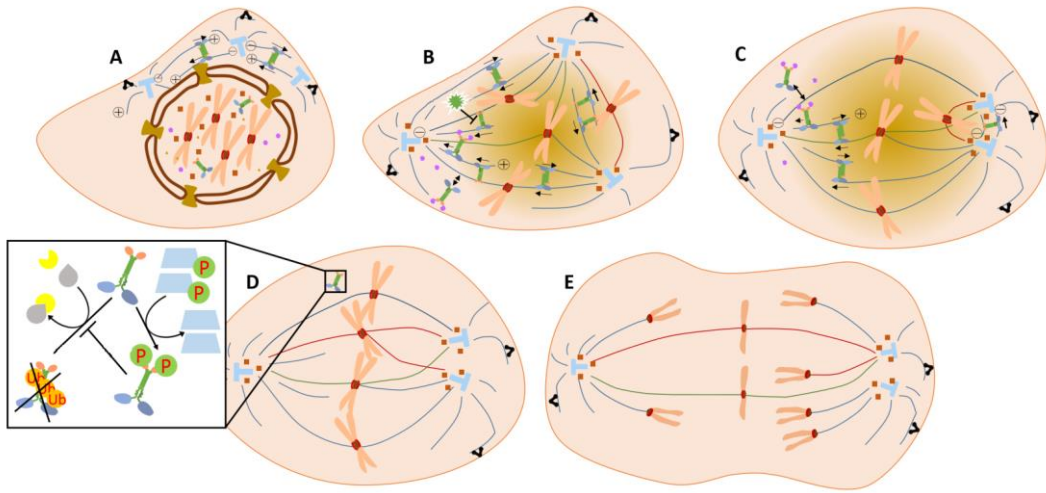
**Sentrozom Kümelenmesi;** KIFC1 kanser hücrelerinde ekstra sentrozom kümelenmesinde kritik role sahip olan motor proteindir[188]. Sentrozom, mitoz bölünme sırasında iğ ipliklerini oluşturan mikrotubul organizasyon merkezleridir. Normal sağlıklı hücrede her biri zıt kutupta olan karşılıklı bir çift sentrozom bulunmaktadır [189]. Hücre bölünmesi sırasında, sentrozomlar S(sentez) evresinde

kendini eşler [190]. Hücrelerin ikiden fazla sentrozoma sahip olduğu durum sentrozom amplifikasyonu olarak adlandırılır. Sentrozom amplifikasyonu kanser hücrelerine özgüdür ve artan tümör evresi [191-193] ve kromozomal instabilite ile ilişkilidir [194]. Sentrozom amplifikasyonu, multipl(çoklu) kutup oluşumuna sebep olarak genetik kararsızlığa neden olur ve bu durum ve birçok kanser hücrelerinin ayırt edici özelliğidir. Genetik kararsızlık (instabilite) seviyesi ise sentrozom amplifikasyonu ile birlikte artmaktadır [195, 196]. Sentrozom amplifikasyonu, kromozomal instabilite, anöploidi, hücre döngüsü, apoptozu ve tümörögenез basamaklarını etkiler. Sentrozom amplifikasyonu ayrıca tümör farklılaşması, metastaz ve nüks ile ilişkilidir. KIFC1'e ekstra sentrozomların bi-polar olarak bir araya gelmesindeki etkilerine bakıldığında tümörögenезe sebep olan oldukça etkili bir protein olduğu anlaşılmaktadır[190, 197].

Çok kutuplu(multipl) hücreler , bipolar kutuplu hücrelere dönüşürken hücrede herhangi bir hata meydana gelirse hücre apoptozaya yönelmektedir[198]. Ancak, artan *KIFC1* ekspresyonu çok kutuplu kanser hücrelerinin normal sağlıklı hücrelerde olduğu gibi iki kutuplu hale dönüşmesine yardımcı olarak kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına aracılık eder. Böylece normal bipolar hücre bölünmesi ile genetik kararsızlığı ortadan kaldırarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasına olanak sağlamaktadır [199, 200].

*KIFC1*'in kanser hücrelerindeki sentrozom kümelenmesindeki etki mekanizmaları Şekil 2-7'de gösterilmiştir. İnterfaz evresinde amplifiye olan sentrozomlar, prometetafaz evresinde geçici olarak çoklu kutupları oluşturur. Bu geçici çoklu kutuplaşma kanser hücrelerinde genetik kararsızlığa sebep olur. Daha sonra mikrotübüller merotelik bağlanma şeklinde kinetokorlara bağlanarak sentrozomların kümelenmesini başlatır. Kısa bir süre sonra, psödobipolar iğ iplikleri oluşarak amplifiye sentrozomların kümelenmesini daha da teşvik eder [201]. Merotelik bağlanmalar devam ettikçe anafaz evresinde artan laging kromozomlar, kromozom instabilitesini daha da artırır [201, 202]. Bu işlem sırasında, *KIFC1* çekirdeğe taşınmaktadır [203]. *KIFC1* polar(antiparalel, zıt kutuplara giden) mikrotübüllerin uçlarına çapraz bağlanıp, mikrotübüller boyunca kayarak mikrotübül organizasyon merkezi olan hücre kutuplarına doğru hareket eder. *KIFC1* ve mikrotübüller arasındaki çapraz bağlanma sadece polar(zıt kutuplara giden) mikrotübüller arasında gerçekleşir. Bu şekilde *KIFC1* mikrotübül kilitleme kuvvetleri üretir. Kilitleme kuvveti bu iki

sentrozomun birlikte kümelenmesine neden olur. Hücre döngüsünde etkili olan bazı siklinlerin artan ekspresyonunu, anafaz evresinin gecikmesine neden olur. Bu gecikme ise KIFC1'a çok kutuplu hücrelerin normal bipolar kutupla hale dönüşmesi için gereken süreyi sağlamaktadır. Yapılan araştırmalarda *KIFC1* inhibe edilerek susturulmasıyla siklin-A'nın sentezinin geciktirildiği gösterilmiştir [204]. KIFC1'in aşırı ekspresyonu ise, Mad1'in Mad2'ye oranını ve Aurora-B kinazın aktivitesini artırarak anafazı uzatırken tüm hücre döngüsünü kısaltan [205] siklin B1, siklin D ve siklin A ekspresyonlarını arttırır. Mitozdan çıkışta ise, tüm sorumluluğunu yerine getiren KIFC1 ubiquitinasyon ile degrede edilmektedir [8]. Hücre bölünmesi sırasında KIFC1 proteininin sentrozom kümelenmesi aşamalarındaki rolü Şekil 2-7'de gösterildi.



**Şekil 2-7. Hücre Bölünmesi Sırasında KIFC1 Proteininin Sentrozom Kümelenmesi Aşamalarındaki Rolü [8].**

İnterfaz evresinde duplike olan sentrozomlar, profaz evresinde birbirinden ayrılır. KIFC1 bu arada çekirdeğe taşınmıştır (Şekil 2-7a). Ran-GTPase gradyanı kademeli olarak azalarak KIFC1'in mikrotübüllerle bağlanmasını düzenler [206]. KIFC1, yalnızca sentrozomların organizasyonuna yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda mikrotübüllere çapraz bağlanarak ve mikrotübül boyunca kayarak ekstra sentrozomları kümeler [207] (Şekil 2-7b). Bu işlem sırasında, NuMA, sentrozomların etrafındaki eksi uçlara yardımcı olur ve dynein, astral mikrotübül uçlarını hücre korteksine gömer [208]. Eg5, spindle şeklini hassas bir şekilde düzenlemek için KIFC1'e karşı zıt kuvvet oluşturur [208] (Şekil 2-7c). Geç metafazda KIFC1, APC/C kompleksi tarafından degrede edilebilmektedir. SAC kompleksleri merotelik kinetokor

mikrotübülleri ve sentetik kinetokor mikrotübülleri düzenlendiği gibi, çok kutuplu kanser hücrelerinin bipolar kutuplara dönüştürmede de rolü vardır (Şekil 2-7d). Bu arada lagging kromozomların oranı artmaya devam eder [201] (Şekil 2-7e).

**Tümör İlerlemesi;** KIFC1 kanser hücresinin survival sinyallerini koruyarak tümör ilerlemesine de sebep olur. KIFC1 bunu survivin proteininin, E3 ligaz APC/C molekülleri tarafından degrade edilerek ortadan kaldırılmasını engelleyerek yapmaktadır. KIFC1, survivin'e bağlanır ve survivin'in poly-ubikitinasyondan korur [205] ve bu şekilde kanser hücreleri apoptozdan kaçarak hayatta kalır.

**Diğer Roller;** KIFC1 hücre içerisindeki organellerin, protein komplekslerinin ve mesajcı RNA'ların (mRNA'lar) taşınmasını da sağlar [209]. Ayrıca KIFC1'in, hücre içi vezikül ve organellerin taşınmasında [210], oosit gelişiminde [211], spermatogenezde [212, 213] ve çift sarmallı DNA taşınmasında rol oynadığı bilinmektedir [214].

### 2.3.3. KIFC1 Proteininin Kanserdeki Rolü

KIFC1, çeşitli kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen ve tümör evresi ve malignitesi ile pozitif olarak ilişkili olan bir proteindir [8]. *KIFC1*, yumurtalık kanseri, meme kanseri ve küçük hücre dışı akciğer kanserinde up-regüle edilir ve kanserin başlamasını ve ilerlemesine aracılık eder [215]. KIFC1'in yumurtalık kanserinde kötü prognozu ve daha kısa genel sağ kalım oranını tahmin etmede ve potansiyel metastaz belirteci olarak kullanabileceği bildirilmiştir [216]. KIFC1'in ayrıca meme kanseri dokularında ve hücre hatlarında da aşırı eksprese edildiği ve KIFC1 ekspresyonunun susturulması durumunda meme kanseri hücre canlılığının azaldığı bildirilmiştir [215]. *KIFC1*'in hepatoselüler karsinomda in-vitro olarak proliferasyonu arttırdığı belirtilmiştir [217], KIFC1'in ayrıca yumurtalık [216], meme [205], mesane [218], akciğer [219], böbrek [220] tümörlerinde yaygın olarak eksprese edildiği bildirilmiştir.

KIFC1'in kanser metastazına sebep olduğu bildirilmiştir. Küçük hücre dışı akciğer kanserinde, Alzheimer antijeni ve N-kaderin ile birlikte, *KIFC1*'in aşırı ekspresyonu beyin metastazı oluşabilecek vakaları belirlemek için kullanıma aday olduğu rapor edilmiştir [219]. Benzer şekilde, in-siliko gen ekspresyonu veri analizi ile *KIFC1* ekspresyon profilinin yumurtalık kanseri için metastaz tahminini belirlemede aday olabileceği düşünülmektedir [216]. Ayrıntılı mekanizmalar henüz bilinmemektedir, ancak, KIFC1'in kanser hücrelerinde, hücre polaritesini devamını

sağlayarak epitelyal-mezenkimal geçişi de (EMT) güçlendirdiği varsayılan hipotezler arasındadır. Ve böylece hücre hareketliliğini artırarak metastaza sebep olabileceği bildirilmektedir[191].

KIFC1, kanser hastaları için potansiyel bir kemoterapi hedefi olarak önerilmiştir. Şimdiye kadar KIFC1'i inhibe eden üç adet ajan tespit edilmiştir. CW069 ve AZ82 KIFC1'i doğrudan inhibe etmektedir. KIFC1'i transkripsiyonel olarak baskılayabilen PJ34 de umut verici bir seçenektir. PJ34 polimeraz (PARP) inhibitörü olarak görev yapmaktadır [221]. PJ34 ile tedavi edilen çeşitli meme kanseri hücre hatlarında KIFC1 mRNA miktarının önemli ölçüde azaldığının gösterilmesinden dolayı [215] PARP inhibitörlerin de daha önce bir transkripsiyonu düzenleyici olarak bildirildiği göz önüne alındığında, PJ34'ün KIFC1 ekspresyonunu transkripsiyonel olarak baskıladığı düşünülmektedir [222].

KIFC1'in ilaç direnci artışına sebep olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Meme ve prostat kanseri [223] üzerine yapılan çalışmalarda, KIFC1'in ilaç direnciyle alakalı olduğu bildirilmiştir. Dosetaksel ve paklitaksel'in etki mekanizması mikrotübüllerin alt birimi olan beta tubuline bağlanarak mikrotübüllerin ayrışmasını önler ve mikrotübül organizasyonu ve uzamasını bozar [224]. KIFC1 inhibe eden ilaçların, prostat kanseri hücrelerinin taksan duyarlılığını artırdığı da gözlemlenmiştir [225].

KIFC1 çeşitli doku tiplerinde eksprese edilen ve çok sayıda biyolojik olaya dahil olan hem somatik hem de germ hücreler için oldukça önemli olan bir protein olsa da işlevi oldukça belirsizdir. KIFC1'in bir çift sentrozomu olan normal somatik hücrelerde fonksiyonu belirsizdir. Ayrıca, KIFC1 ve NUMA proteinlerinin mikrotübüllerin eksi uç organizasyonunda etkili olan redundant proteinler olduğu bildirilmiştir [226]. Ayrıca, çoklu sentrozoma sahip olmayan MCF-7 hücre hatları canlılığının, KIFC1'in deplesyonundan önemli ölçüde etkilenmediği de bildirilmiştir [199]. Ayrıca, KIFC1'in normal RPE1 hücrelerinde (hTERT-immortalize insan Retinal Pigment Epitelyal hücreleri) de redundant olduğu da kanıtlanmıştır [188].

Yapılan çalışmalar sonrasında akciğer kanseri oluşumu ve gelişiminde birçok biyokimyasal ve moleküler süreç bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında planlanan tez çalışmasında ekspresyon ve metilasyon profillemeye teknikleri kullanılarak *KIFC1*'in ekspresyon ve metilasyon değişiklikleri, akciğer kanserli hastaların tümör, eşlenik

normal doku, serum ve lenfosit örnekleri ile sağlıklı kontrollerin serum ve lenfosit örneklerinde analiz edilerek, *KIFCI*'in akciğer kanserinde invaziv/non-invaziv biyomarker olarak kullanılması araştırıldı.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

25.02.2020 tarih ve 2020/324 numaralı Etik Kurulu onayı ile İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş olan çalışmada, 2020-2021 yılları arasında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran 39 akciğer kanserli hastaya ait tümör, eşlenik normal doku, serum ve lenfosit örnekleri ile hastalarla yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 39 sağlıklı bireye ait serum ve lenfosit örneklerinden DNA ve RNA izolasyonu yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Hem hasta hem sağlıklı kontroller çalışma öncesinde konu hakkında bilgilendirildikten sonra gönüllü onam formlarını imzalamış ve çalışmada yer almaya kabul eden hastaların serum, akciğer tümör, eşlenik normal doku örnekleri kullanılmıştır.

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyisel işlemlerde kullanılan cihazlar Tablo 3-1'de belirtilmiştir.

**Tablo 3-1. Deneyisel İşlemlerde Kullanılan Cihazlar**

<b>Kullanılan Cihaz Adı</b>	<b>Marka</b>
Bilgisayar	Hp
Jel Dökümasyon Sistemi	BRL
Jel Görüntüleme Sistemi	BRL
-80 Derin Dondurucu	Sanyo
Yatay Gel Elektroforez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri	BIORAD
Yüksek Hızlı Soğutmalı Santrifüj	Heraeus
Mikropipetler	Gilson
Spektrofotometre NanoDrop 2000	Thermo Scientific
QPCR Cyclers	MIC
Yatay Gel Elektroforez Tankı	BRL
Etüv	Nüve
Otaklav	Nüve
Vorteks	FINEPZR

Mini Thermal Cycler	Accuris
+4 Buzdolabı	Arçelik
Azot Tankları	Boss

### 3.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

Deneysel işlemlerde kullanılan kitler ve kimyasallar Tablo 3-2’de belirtilmiştir.

**Tablo 3-2. Deneysel İşlemlerde Kullanılan Kitler ve Kimyasallar**

Kullanılan Kit Adı	Marka
Agarose, Molecular Grade	Bioline
HyperLadder 100bp	Bioline
Quick-DNA Miniprep Plus Kit	ZymoResearch
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	ZymoResearch
Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers)	Sentebiolab
1 gen bölgesi için MSP primer sentezi	Sentebiolab
ZymoTaq™ Polymerase	ZymoResearch
Quick-RNA™ MiniPrep Kit	ZymoResearch
SensiFAST cDNA Synthesis Kit	Bioline
SensiFAST SYBR No-ROX Kit	Bioline
<i>KIFC1</i> Ekspresyon Spesifik Primer	Sentebiolab
Kontrol Primer	Sentebiolab
Etidyum Bromür	Merck
Etanol	Merck

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. Hastalara ait Taze Doku ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması**

Akciğer kanseri tanısına sahip 39 hastanın akciğer tümörü, eşlenik normal dokusu, lenfosit ve serum örnekleri metilasyon ve ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere numaralandırıldı ve gruplandı. Elde edilen örnekler deneysel aşamalara kadar geçen süre zarfında -270°C'azot tanklarında ve -80°C buzdolaplarında saklandı.

### **3.2.2. Hasta ve Kontrol Örnek Kanlarından Lenfosit Eldesi**

Cerrahi öncesinde akciğer kanseri tanısı alan hastalar ile sağlıklı kontrollerden 10 ml periferik kan EDTA'lı tüplere alındı. Daha sonra içerisinde fikol bulunan falcon tüplerine transfer edilerek ve 1500 rpm'de yarım saat süreyle santrifüj edildi. Falcon tüplerinin orta kısmında toplanan lenfositler toplanarak başka bir tüplere alındı 1950 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Üzerinde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve 4ml phosphate buffered saline (PBS) eklendi ve hacimleri 1'er ml olacak şekilde 4 adet cryo tüpe dağıtıldı. Deneysel işlemlere kadar önce -80°C buzdolaplarında saklandı ve daha sonra 270°C'azot tanklarına alındı.

### **3.2.3. Hasta ve Kontrol Örnek Kanlarından Serum Eldesi**

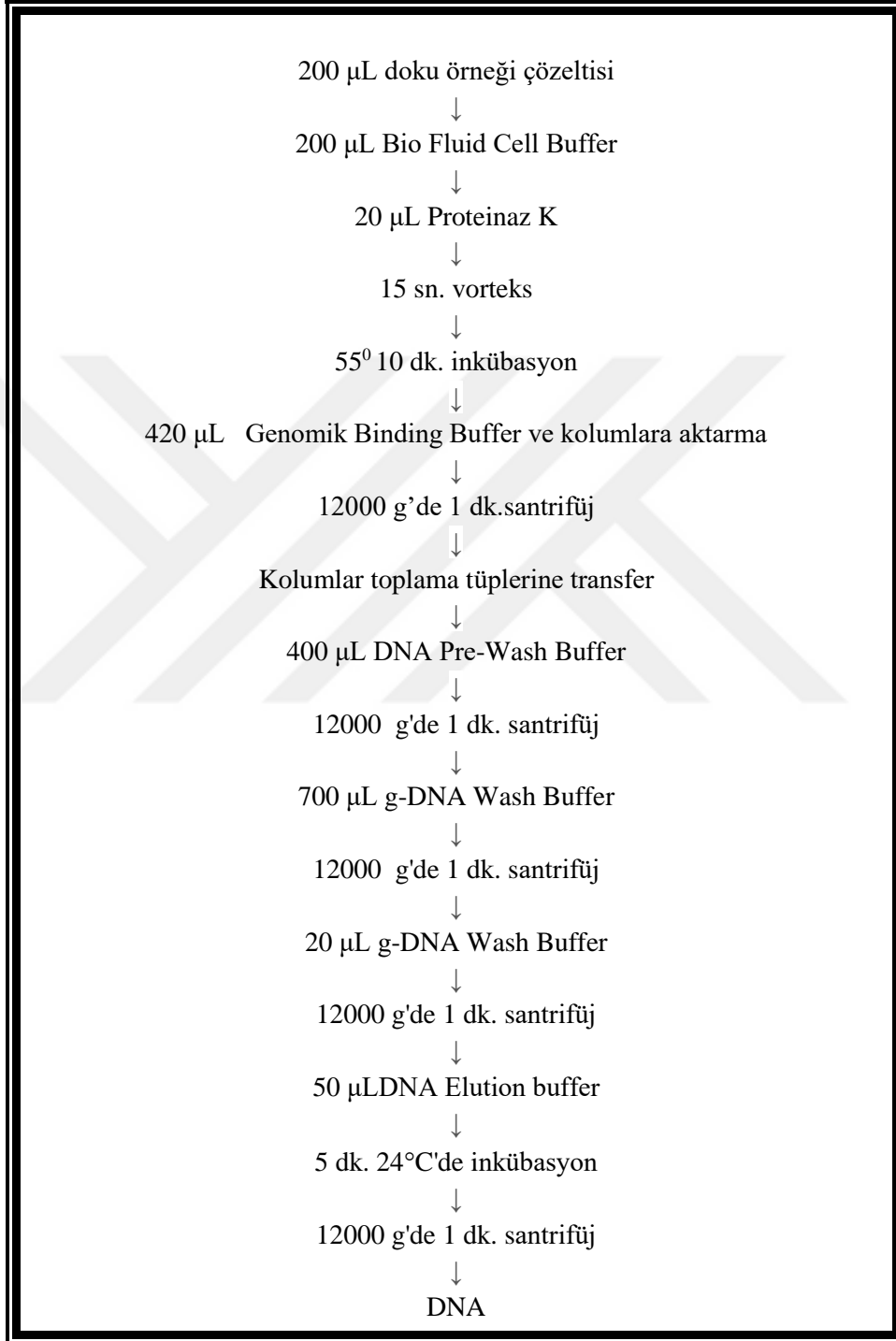
Cerrahi öncesinde, biyopsi ile akciğer kanseri tanısı alan hastalardan 9 mL kan numunesi alındı. Sağlıklı kontrollerden alınan kan numuneleri 9 mL olacak şekilde serum (kuru tüplere) ayrıldı. Serum tüpüne alınan kanlar 1950 rpm'de yarım saat süreyle santrifüj edildikten sonra en üstte toplanan serum sıvısı 4 adet cryo tüpe hacimleri 1'er ml olacak şekilde dağıtıldı. Deneysel işlemlere kadar -80°C buzdolaplarında saklandı.

### **3.2.4. Hastalara Ait Taze Tümör ve Eşlenik Normal Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu**

Taze doku örneklerinden DNA izolasyonu 'Quick-DNA TM Miniprep Plus Kit' kullanılarak gerçekleştirildi. Dokulara Proteinaz K çözeltisi ilave edildikten sonra 55°C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra 12.000xg'de 1 dakika boyunca çözülmeyen kalıntıları uzaklaştırmak için santrifüj edildi. DNA konsantrasyon ölçümü Nanodrop 2000 (ThermoFisher, ABD) cihazı ile ölçüldü, elde edilen DNA varlığının confirmasyonu ise 0.8'lik agaroz jel ile sağlandı. Bisülfüt dönüşümü işlemine başlandı.

Toplanan hasta ve sağlıklı bireylere ait tümör/eşlenik normal doku örneklerinden DNA eldesi Tablo 3-3'de detaylı olarak gösterilmektedir.

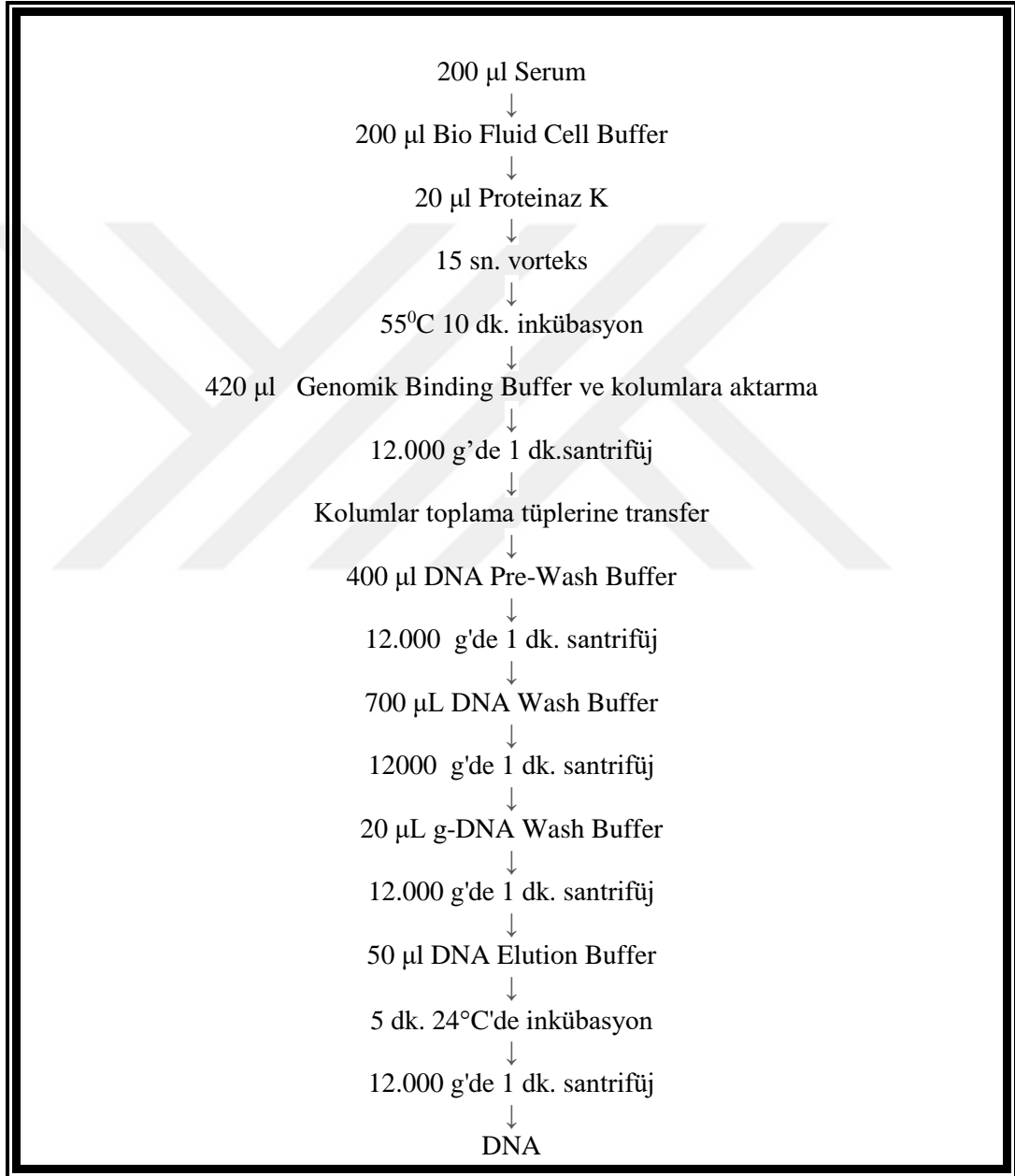
**Tablo 3-3. Taze Tümör ve Eşlenik Normal Dokulardan DNA İzolasyon Protokolü**



### 3.2.5. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Serum Örneklerinden DNA İzolasyonu

'Zymo Research Quick-DNA TM Miniprep Plus Kit' kullanılarak hasta ve kontrol serum örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı ve Tablo 3-4'te detaylı olarak gösterilmektedir.

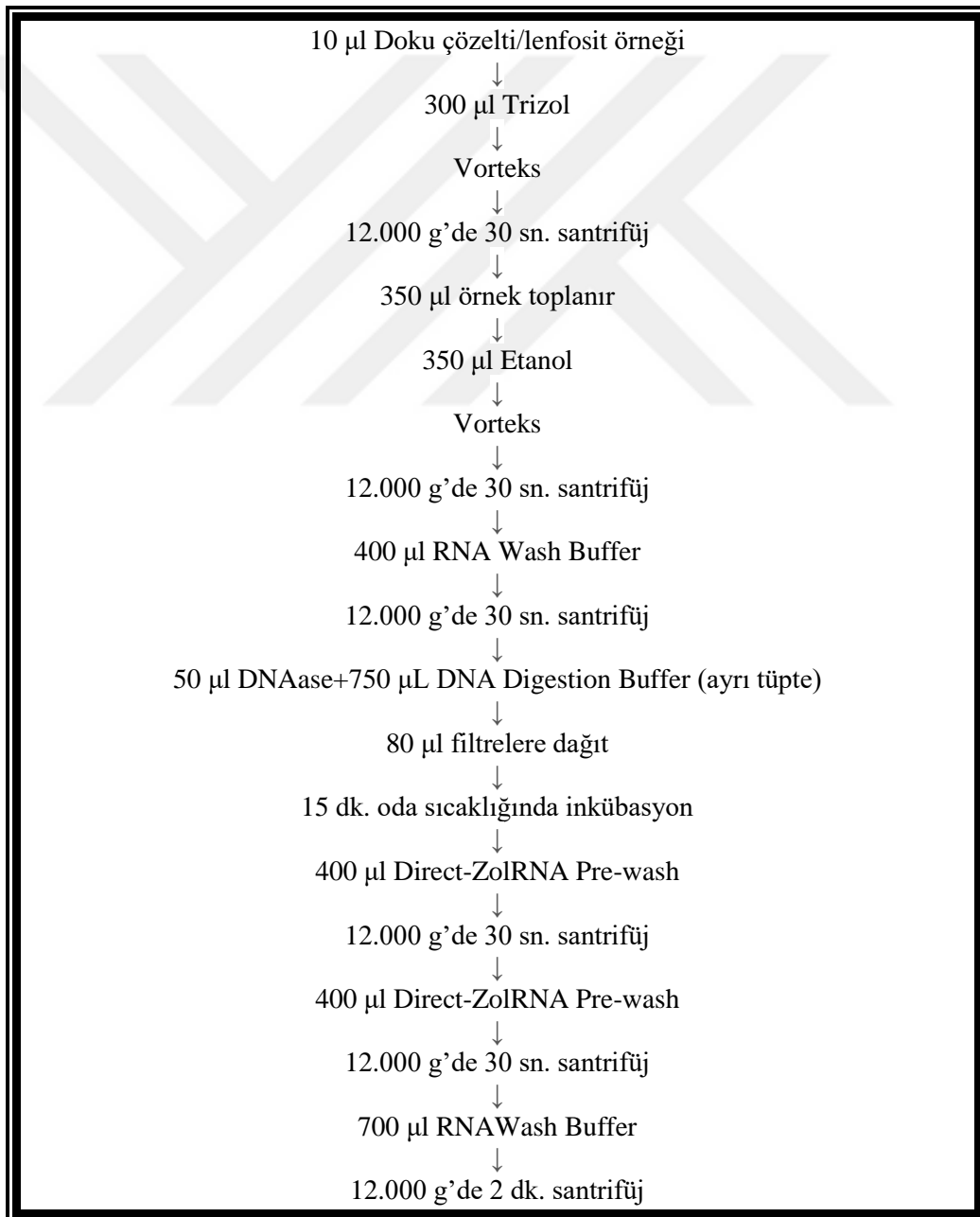
**Tablo 3-4. Serum Örneklerinden DNA izolasyonu Protokolü**

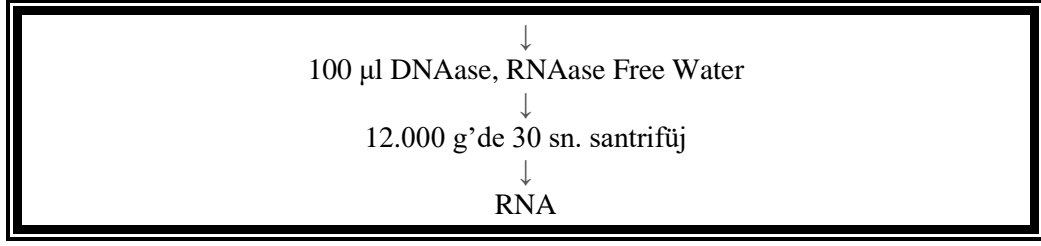


### 3.2.6. Taze Doku ve Lenfosit Örneklerinden RNA İzolasyonu

Hastalara ait tümör ve eşlenik normal doku ile hastalardan alınan lenfosit örneklerinden RNA izolasyonu Tablo 3-5’de gösterildiği şekilde ‘Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep Plus Kit’ kullanılarak gerçekleştirildi. Toz halinde kit içerisinde bulunan RNA Pre-Wash Buffer üzerine 48 mL % 100 Etanol ve Direct-zol™ RNA Pre-Wash Buffer üzerine 10 mL % 100 etanol eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. RNA Nanodrop 2000 cihazı ile ölçülerek sonraki aşama olan cDNA sentezi işlemine geçildi.

**Tablo 3-5. Taze Doku ve Lenfositlerden RNA İzolasyonu Protokolü**





### 3.2.7. Metilasyon ve Ekspresyon Tespiti için Primer Dizaynı

*KIFC1* geni için gerekli olan primerler <https://www.urogene.org/methprimer/> ve <https://primer3.ut.ee/> online araçlardan faydalanılarak tasarlandı. *KIFC1* metile ve unmetile primerleri (Sentebiolab) deneysel aşamalarda konsantrasyonu 10 nmol olacak şekilde sulandırıldı ve daha sonra aliquot edildi. Tablo 3-6'da Metilasyon Spesifik PCR *KIFC1* metile ve unmetile revers ve forward primer dizileri gösterilmektedir. Metile ve unmetile kontrol gen primerleri olarak 'Zymo Research EZ-DNA Methylation-Gold™ Kit'e (Zymo, ABD) ait *DAPK1* kontrol primerleri kullanıldı ve Tablo 3-7'de *DAPK1* metile ve unmetile revers ve forward primer dizileri gösterilmektedir. Real-Time *KIFC1* reverse ve forward primer dizileri Tablo 3-8'de, Real-Time *beta-actin* reverse ve forward primer dizileri Tablo 3-9'da gösterilmektedir.

**Tablo 3-6. Metilasyon Spesifik PCR *KIFC1* Metile ve Unmetile Revers ve Forward Primer Dizileri**

<i>KIFC1</i> Metile Revers	5' AACGAATTAATTCCACTTCCGA 3'
<i>KIFC1</i> Metile Forward	5' GTTTTTCGGTACGGGTTTTTC 3'
<i>KIFC1</i> Unmetile Revers	5' AACAAATTAATTCCACTTCCAA 3'
<i>KIFC1</i> Unmetile Forward	5' TTTTGGTATGGGTTTTTGT 3'

**Tablo 3-7. Metilasyon Spesifik PCR referans *DAPK1* Metile Revers ve Forward Primer Dizileri**

<i>DAPK1</i> Metile Revers	5'ATTGGGAAGGTTAAGGYGGAGGGAAATTTGGT 3'
<i>DAPK1</i> Metile Forward	5'CCCCAAACRAACAATCCCCAAAACCACATTCCTA 3'

**Tablo 3-8. Real-Time *KIFC1* Reverse ve Forward Primer Dizileri**

<i>KIFC1</i> Ekspresyon Revers	5' CGTCTTCACTTCCTGTTGGC 3'
<i>KIFC1</i> Ekspresyon Forward	5' AACTCTCTGGGTGGTAGTGC 3'

**Tablo 3-9. Real-Time *beta-actin* Reverse ve Forward Primer Dizileri**

<i>beta-actin</i> Ekspresyon Revers	5' TGCTTGCTGATCCACATCTG 3'
<i>beta-actin</i> Ekspresyon Forward	5' GCACCACACCTTCTACAATG 3'

### 3.2.8. Metilasyon Deneyleri

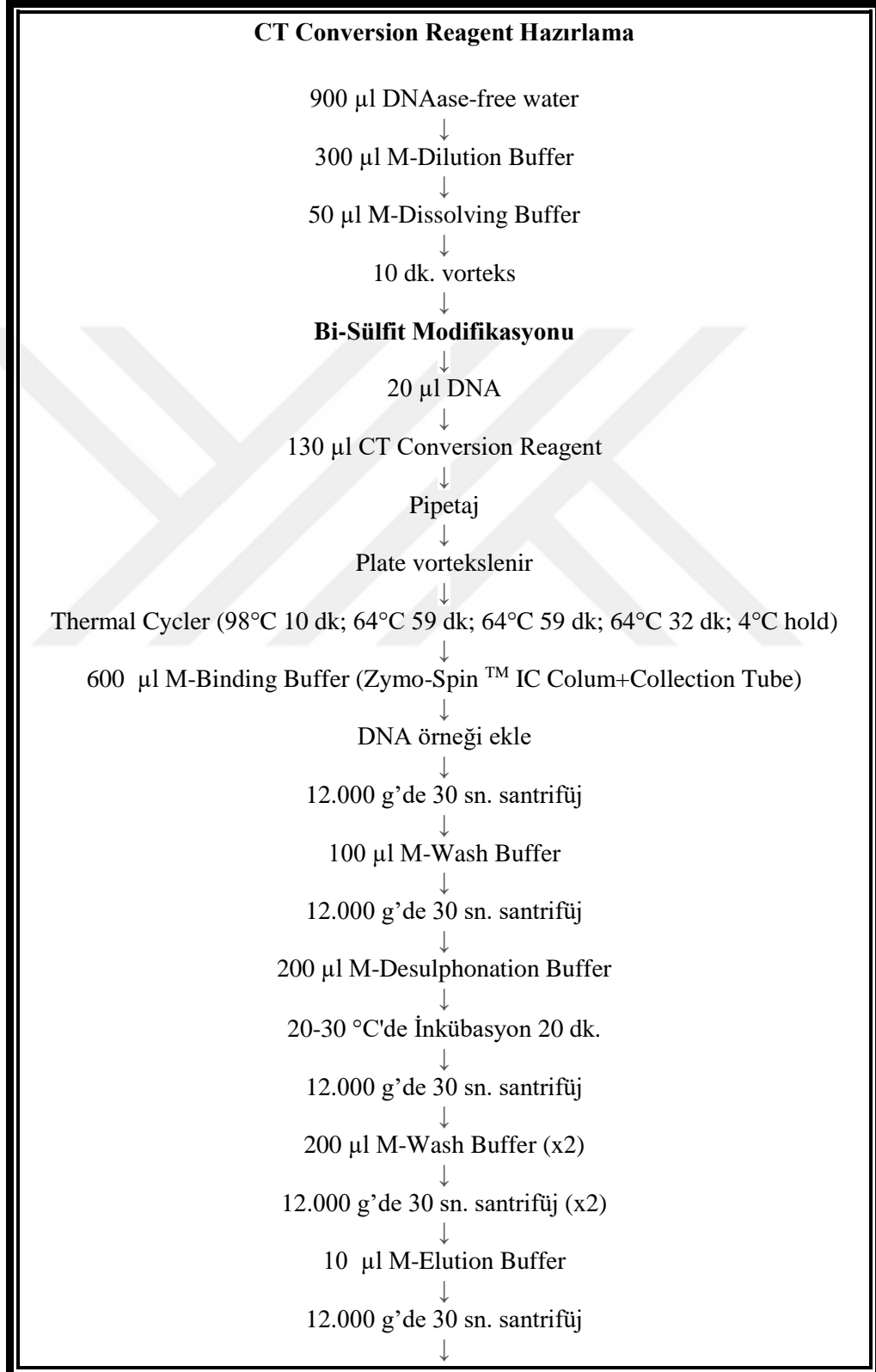
Akciğer kanseri tanısı almış hastalara ait tümör ve eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı kontrollere ait serum örneklerinde Metilasyon Spesifik PCR (MSP) yöntemiyle *KIFC1* geni promotör metilasyonu araştırıldı. Metilasyon reaksiyonları 'Zymo Research EZ-DNA Methylation-Gold™ Kit' ve 'Zymo Taq™ Pre-Mix, Zymo Kit' prokollerine uygun olarak yapıldı.

#### 3.2.8.1. Bisülfid Dönüşümü

Akciğer kanseri tanıli hastalara ait tümör ve eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile yaş ve cinsiyet olarak hastalarla eşleştirilmiş sağlıklı bireylere ait serumlardan elde edilen DNA örneklerinde 'EZ-DNA Methylation-Gold™ Kit' kullanılarak bisülfid dönüşümleri gerçekleştirildi. Bisülfid dönüşüm deney aşamalarına başlamadan önce kit protokolüne göre CT Conversion Reagent hazırlama işlemi

yapıldı. CT conversion reagent hazırlama ve bisülfıt dönüşümü Tablo 3-10'da detaylı olarak gösterilmektedir.

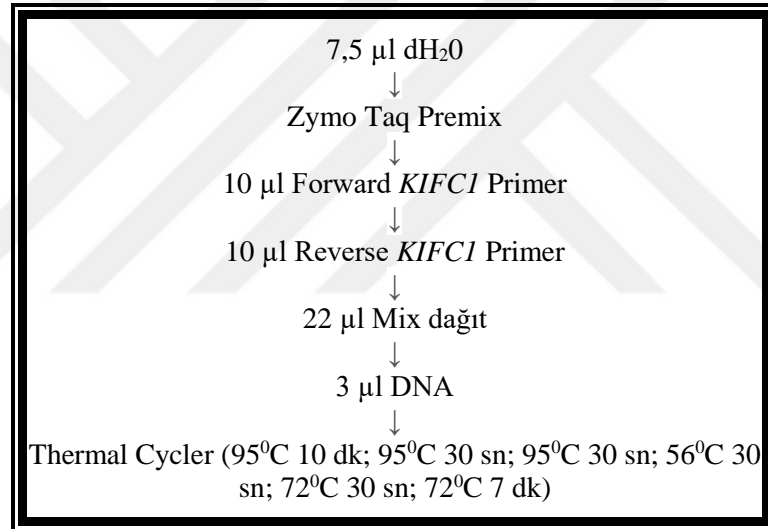
**Tablo 3-10. CT Conversion Reagent Hazırlama ve Bisülfıt Dönüşümü Protokolü**



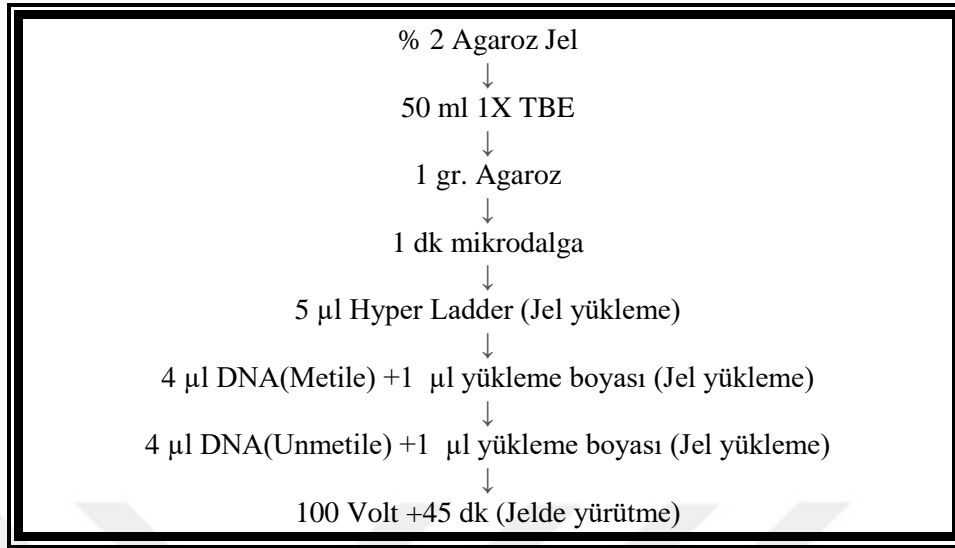
## DNA

**3.2.8.2. *KIFC1* Geninin Metilasyon Spesifik PCR Yöntemi ile Analizi**

*KIFC1* geni metilasyon profillerinin belirlenmesi için MSP yöntemi kullanıldı. Metile ve unmetile PCR aşamaları ‘Zymo Taq™ Pre-Mix’ kit kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 3-11’de metile ve unmetile PCR aşamaları gösterilmektedir. Bu aşamadan sonra %2’lik agoroz jelde elde edilen örnekler yürütülerek metile ve unmetile örnekler tespit edildi.

**Tablo 3-11. *KIFC1* Metilasyon Spesifik PCR Protokolü****3.2.8.3. Yatay Jel Elektroforezi**

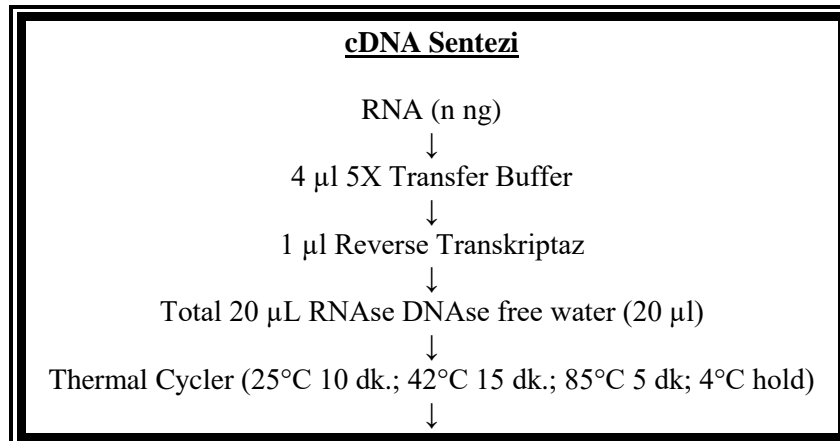
Metile ve unmetile PCR aşamaları gerçekleştirildikten sonra % 2’lik agoroz jel hazırlanarak örneklerin metilasyon durumları değerlendirildi. Agoroz jel hazırlama ve örneklerin jele yüklenme aşamaları Tablo 3-12’de detaylı olarak gösterilmektedir.

**Tablo 3-12. Yatay Jel elektoroforez Protokolü****3.2.9. KIFC1 Ekspresyon Deneşleri**

Hastalara ait tümör,eşlenik normal doku ve lenfosit örnekleri ile,yaş ve cinsiyet olarak hastalar ile eşleştirilmiş sağlıklı bireylere ait lenfosit örneklerinden ‘Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep Plus Kit’ kullanılarak RNA örnekleri izole edildi. Daha sonra ‘Bioline SensiFAST cDNA Synthesis kit’ kullanılarak RNA örneklerinden cDNA elde edildi. *KIFC1* ekspresyon seviyesindeki farklılıklar karşılaştırıldı.

**3.2.9.1. cDNA Sentezi**

İzole edilen RNA’dan ‘Bioline SensiFAST cDNA Synthesis Kit’ (Meridian, Bioline, ABD) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.Tablo 3-13’te cDNA sentez aşamaları detaylı olarak gösterilmektedir.

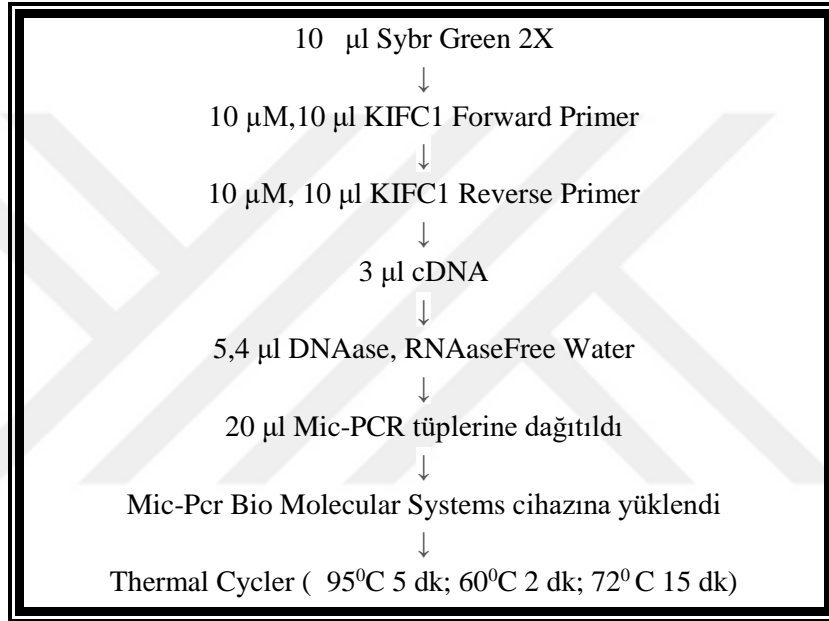
**Tablo 3-13. cDNA Sentezi Protokolü**

cDNA

### 3.2.9.2. *KIFC1* Gen Ekspresyonunun Real-Time Yöntemi ile Analizi

*KIFC1* gen ekspresyon analizi için SYBR Green yöntemi kullanılarak eş zamanlı qRT-PCR deneyleri yapıldı. Deneyler ‘SensiFAST™SYBR®No-ROXKit-Bioline’kit kullanılarak ‘Mic PCR Biomolecular Systems’ cihazında gerçekleştirildi. Real-Time deneyi Tablo 3-14’de ayrıntılı olarak gösterildi.

**Tablo 3-14. *KIFC1* Real-Time Deney Protokolü**



Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait tüm doku ve periferik kan örneklerindeki  $\Delta Ct$  (Hedef gen Ct-Referans Gen Ct) değerleri ile aynı hastanın tümöre eşlenik normal doku örneklerinin  $\Delta Ct$  (Hedef gen Ct-Referans Gen Ct) değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  fold change formülü kullanılarak hesaplandı [227].

### 3.2.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki nitel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak, nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ise ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum olarak verilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. İki bağımsız grup ortalama karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İki'den fazla bağımsız grup ortalama karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda post hoc test olarak Dunn testi kullanılmıştır. Nitel değişkenler

arasındaki ilişkiler Pearson ki kare, Fisher Exact test, Fisher Freeman Halton testleri ile incelenmiştir. Nicel değişkenler arasındaki ilişkiler ise Spearman korelasyon katsayısı ile araştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi  $p<0,05$  olarak alınmış ve hesaplamalarda SPSS (28 Version, Armonk, NY: IBM Corp) kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Akciğer Kanseri Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri

Çalışmada, akciğer kanseri tanısı almış hastalara ait tümör dokusu, tümöre eşlenik normal doku, lenfosit ve serumları ile hastalar ile yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş sağlıklı kontrol örneklerinin lenfosit ve serumlarındaki *KIFCI* ekspresyon seviyeleri ve metilasyon profilleri değerlendirildi. *KIFCI* genindeki ekspresyon ve metilasyon profillerindeki farklılıklarının tespiti ve analizi için hasta tümör, tümöre eşlenik normal doku ve serum ve lenfosit örnekleri ile sağlıklı bireylere ait serum ve lenfosit örnekleri hem kendi aralarında hem de gruplar arasında karşılaştırıldı.

Akciğer kanserli hastaların ortalama yaşı 63 (45-78)'tür. Bu hasta grubunun 22'si erkek (%56.4), 17'si (%43.6) ise kadın hastalardan oluşmaktadır. Akciğer kanseri tanılı hastaların %71,8'i (28/39) sigara kullanmakta iken, % 17,9'u (7/39) alkol kullanmaktadır.

TNM evreleme sistemi kullanılarak akciğer kanseri tanısı almış bireylerin metastaz bulgusu ve kanser evreleri değerlendirildi. Akciğer kanseri tanısı alan hastaların % 30,8'inde (12/39) radyolojik olarak metastaz bulgusu bildirilmiş olup bu bireylerin % 41,7'sinin (5/12) metastaz bölgesi beyindir. Hastaların % 20,5 (8/39) evre 1, %48,7 (19/39) evre 2, %30,8'i (12/39) evre 3 olarak sınıflandırılmıştır. Akciğer kanseri tanılı hastaların % 20,5'i (8/39) akciğer adenokarsinomu, %28,2'si (11/39) KHAK, % 41'i (16/39) skuamöz hücreli karsinom ve %10,3'ü (4/39) diğer alt tiplere sahiptir. Hastaların %25,6'sı (10/39) çalışma sırasında veya sonrasında hayatını kaybetmiştir. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri Tablo 4-1'de gösterilmektedir. Sağlıklı kontrollere ait özellikler de Tablo 4-2'de gösterilmektedir. Nitel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak verilmiştir.

**Tablo 4-1. Akciğer Kanseri Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri**

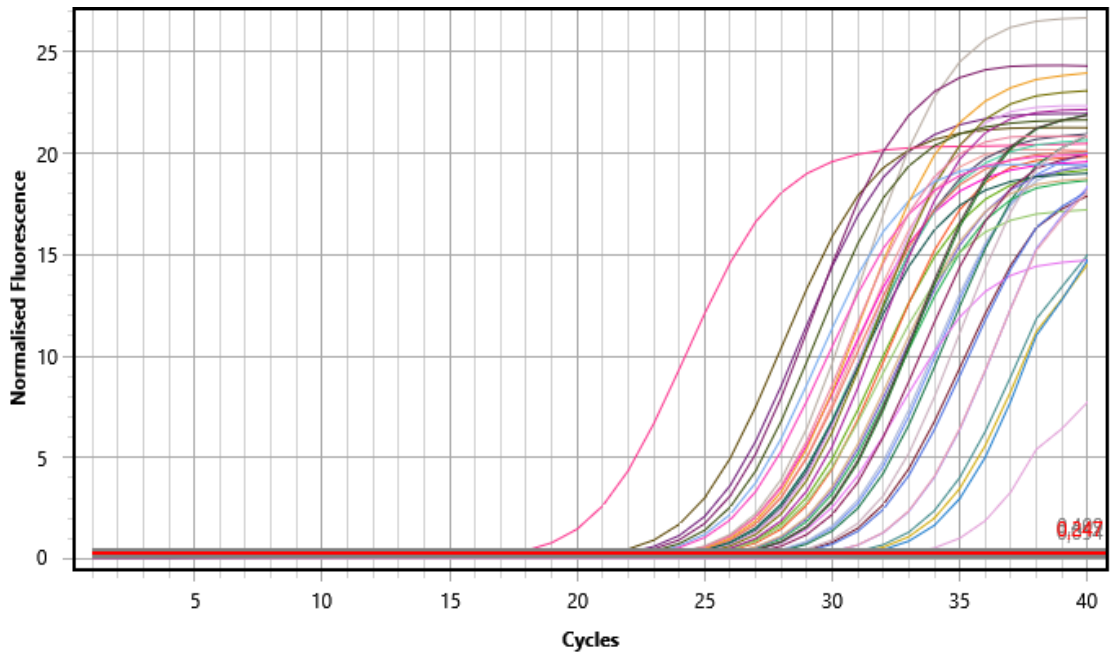
Parametreler		N	%
Cinsiyet	Kadın	17	43,6
	Erkek	22	5,4
<63 yaş	Kadın	19	48,7
	Erkek	20	51,3
<71 yaş	Kadın	30	76,9
	Erkek	9	23,1
Patoloji tipi	Adenokarsinom	8	20,5
	KHAK	11	28,2
	Skvamöz Hücreli	16	41,0
	Diğer	4	10,3
Ölü-Sağ	Ölü	10	25,6
	Sağ	29	74,4
Metastaz Durumu	Var	12	30,8
	Yok	27	69,2
Beyin Metastazı	Var	5	12,8
	Yok	34	87,2
Evre	1	8	20,5
	2	19	48,7
	3	12	30,8
Grade	1	8	20,5
	2	12	30,8
	3	11	28,2
	4	8	20,5
Sigara Kullanımı	Evet	28	71,8
	Hayır	11	28,2
Alkol Kullanımı	Evet	7	17,9
	Hayır	32	82,1
Tümör Doku Metilasyonu	Unmetile	29	7,3
	Metile	9	23,7
Normal Doku Metilasyonu	Unmetile	26	70,3
	Metile	11	29,7
Hasta Serum Metilasyonu	Unmetile	32	86,5
	Metile	5	13,5
<i>KIFC1</i> Ekspresyon Değişimi	Artma	22	59,4
	Azalma	15	40,6

Tablo 4-2. Sağlıklı Kontrollere Ait Özellikler

Parametreler		Sağlıklı Kontrol Sayısı	
Yaş	<63	14	%35.8
	>63	25	%64.1
Cinsiyet	Erkek	21	%53.8
	Kadın	18	%46.1

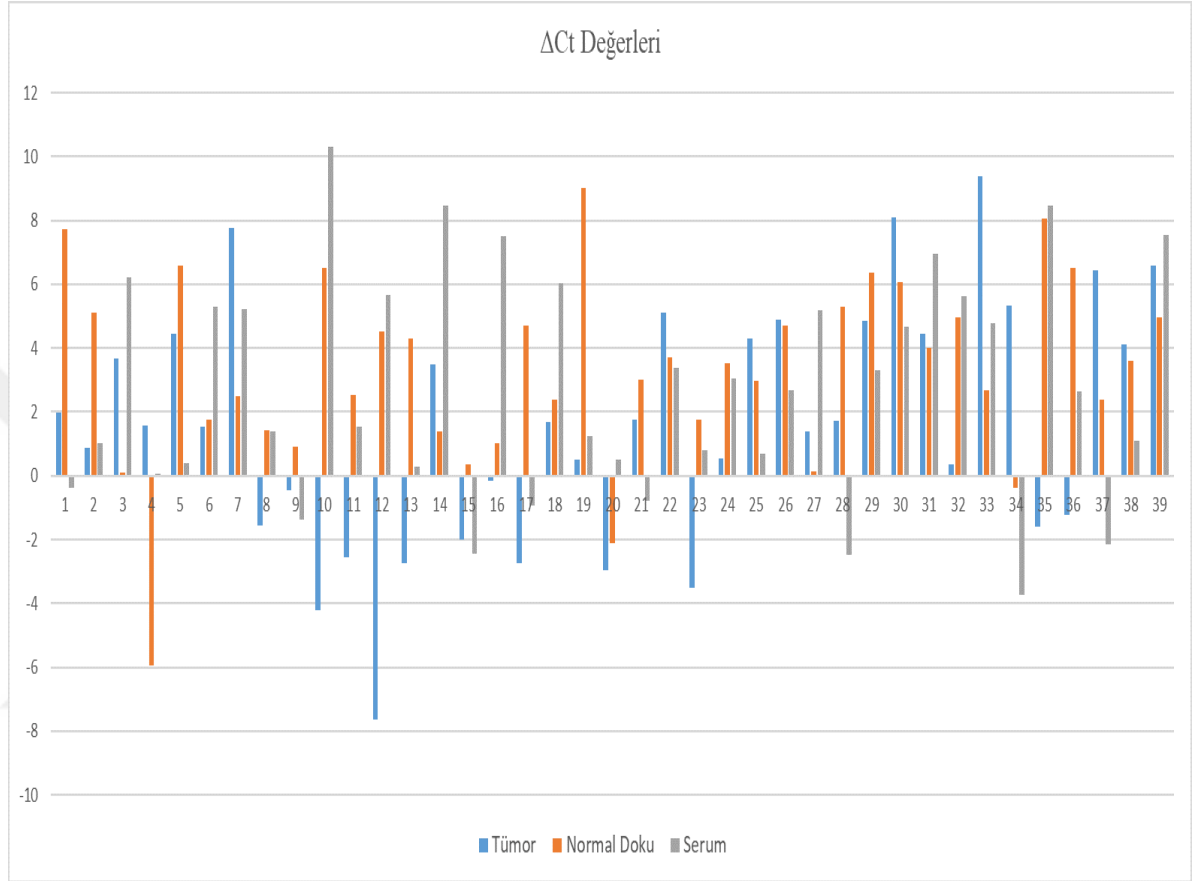
#### 4.2. *KIFC1* Geninin Ekspresyon Analizi

Akciğer kanseri tanısı almış hastalara ait tümör ve tümöre eşlenik normal doku ve lenfosit örnekleri ile hastalar ile yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş sağlıklı kontrol lenfosit örneklerinde *KIFC1* ekspresyonu qRT-PCR metodu kullanılarak analiz edildi ve karşılaştırıldı. Deneyler Mic PCR Biomolecular Systems cihazında gerçekleştirildi. Hastalara ait tümör örneklerinin  $\Delta Ct$  (Hedef gen Ct-Referans Gen Ct) değerleri ile aynı hastanın tümöre eşlenik normal doku örneklerinin  $\Delta Ct$  (Hedef gen Ct-Referans Gen Ct) değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  fold change formülü kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4-1. Hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerin hedef gen (*KIFC1*) ve referans gen için aplikasyon eğrileri

*KIFC1* geni ile referans gen ekspresyon seviyeleri kullanılarak akciğer kanserli hastalara ait tümör, tümöre eşlenik normal doku örneği ve lenfositlerinde  $\Delta Ct$  değerleri hesaplandı (Şekil 4-2). Böylece her bir hastanın tümör, tümöre eşlenik normal doku ve lenfosit örneklerinde  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değer farklılıkları tespit edildi.



**Şekil 4-2.** Akciğer kanserli hastalara ait tümör, tümöre eşlenik normal doku ve lenfosit örneklerinde *KIFC1* geninin delta  $\Delta Ct$  değerlerinin sütun grafik ile gösterimi.

Nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum olarak Tablo 4-3'te gösterilmektedir.

**Tablo 4-3.** Nicel değişkenlere ait istatistiksel ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerler

	Ortalama	Medyan	Std. Sapma	Minimum	Maksimum
Yaş	63,10	63,00	8,580	45	78
AT $2^{-\Delta\Delta Ct}$	7,04888	0,33319	31,594551	0,002	197,928
AN $2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,90096	0,08621	9,854875	0,002	61,704

<b>AL</b> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	1,24505	0,04946	5,370986	00,001	33,477
<b>SL</b> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	1,20910	0,05466	3,757015	0,000	21,445

(**AT**: Akciğer Tümör doku örneği; **AN**: Akciğer Tümörü eşlenik Normal Doku örneği; **AL**: Akciğer kanser tanımlı hasta lenfosit; **SL**: Sağlıklı kontrol lenfosit).

Hastalara ait akciğer tümörü, tümöre eşlenik normal doku, lenfosit örnekleri ile sağlıklı kontrollere ait lenfosit örnekleri kendi aralarında 2<sup>-ΔΔCt</sup> ortalamaları bakımından karşılaştırılması sonucunda elde edilen tanımlayıcı istatistik değerleri ve p değerleri istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel olarak anlamlı çıkan parametreler Tablo 4-4'te gösterilmektedir. Metastaz bulgusu olan hastaların lenfosit örneklerinde 2<sup>-ΔΔCt</sup> ortalamaları, metastaz olmayan hastalara göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır (p=0,033). Bu durum hasta lenfosit örneklerinin metastaz bulgularını değerlendirmede kullanılabilirliğini göstermektedir. Ayrıca Grade 4 tanımlı hastalara ait akciğer tümör dokusundaki 2<sup>-ΔΔCt</sup> ortalaması Grade 1, 2 ve 3 olanlara göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır (p=0,019). Bu durum akciğer tümör dokularındaki *KIFC1* geni ekspresyon profilinin hastalık evrelendirme değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini düşündürmektedir.

**Tablo 4-4. Akciğer Tümör Dokusu, Tümöre Eşlenik Normal Doku, Hastalara ve Sağlıklı Kontrollere Ait Lenfosit Örneklerinin 2<sup>-ΔΔCt</sup> Ortalamaları Bakımından Karşılaştırılması**

2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Metastaz Durumu	n	Ortalama	Medyan	Std.Sapma	Minimum	Maksimum	p değeri
<b>AT</b> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Var	12	2,47343	1,04292	3,400227	0,035	11,411	0,111
	Yok	27	9,08241	0,29534	37,948420	0,002	197,928	
<b>AN</b> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Var	12	5,25102	0,02041	17,779085	0,002	61,704	<b>0,049</b>
	Yok	27	0,41205	0,12690	0,853064	0,011	4,336	
<b>AL</b> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Var	12	3,23757	0,31849	9,540164	0,001	33,477	<b>0,033</b>
	Yok	27	0,35949	0,04316	1,004366	0,001	4,095	
<b>SL</b> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Var	12	1,12698	0,18823	2,066320	0,008	6,610	0,126
	Yok	27	1,24560	0,04040	4,338082	0,000	21,445	
2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Grade	n	Ortalama	Medyan	Std.Sapma	Minimum	Maksimum	p değeri
<b>AT</b> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	1	8	0,79312	0,02787	2,056913	0,002	5,877	<b>0,019</b>

	2	12	1,38899	0,19021	2,743342	0,012	7,765	
	3	11	1,49123	0,71079	1,942770	0,029	6,635	
	4	8	29,43624	3,52773	68,384676	0,035	197,928	
<b>AN 2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	1	8	0,14887	0,16595	0,116914	0,015	0,380	
	2	12	0,62061	0,10462	1,240122	0,025	4,336	0,481
	3	11	5,84224	0,12560	18,529663	0,002	61,704	
	4	8	0,15432	0,02807	0,267886	0,004	0,772	
1	8	0,46219	0,03273	1,228281	0,007	3,502		
<b>AL 2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	2	12	2,83264	0,03560	9,650720	0,001	33,477	0,186
	3	11	0,49516	0,29934	0,588237	0,001	1,818	
	4	8	0,67765	0,08468	1,402755	0,003	4,095	
	1	8	0,03362	0,03119	0,029801	0,002	0,096	
<b>SL 2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	2	12	3,16626	0,13559	6,411418	0,003	21,445	0,331
	3	11	0,65849	0,08045	1,239242	0,000	4,050	
	4	8	0,20594	0,11428	0,250296	0,012	0,702	

(**AT**: Akciğer Tümör doku örneği; **AN**: Akciğer Tümörü eşlenik Normal Doku örneği; **AL**: Akciğer kanser tanılı hasta lenfosit; **SL**: Sağlıklı kontrol lenfosit).

Ekspresyon profili ile cinsiyet arasında ( $p=0,112$ ) ve  $< 63$  yaş durum arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ( $p=0,748$ ). *KIFC1* ekspresyon profili artan ve azalanlar bireyler arasında yaş ortalaması bakımından da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiş ( $p=0,835$ ) olup ve Tablo 4-5'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-5. *KIFC1* gen ekspresyonu artan ve azalanlar arasında yaş ortalaması**

	<i>KIFC1</i> Ekspresyon	N	Ortalama	Std. Sapma	p değeri
Yaş	Artma	24	63,33	8,063	0,835
	Azalma	15	62,73	9,632	

Akciğer kanserli hastaların tümör doku, tümöre eşlenik normal doku ve lenfosit örnekleri ile sağlıklı kontrollere ait lenfosit örneklerindeki *KIFC1* ekspresyon düzeylerindeki artış/azalışı, hastaların klinik ve patolojik özellikleri ile karşılaştırıldı. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri ile *KIFC1* ekspresyon seviyeleri

karşılaştırıldığında cinsiyet, patolojik alt tip, sigara kullanımı, alkol tüketimi, arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. ( $p > 0,05$ ). Akciğer kanserli hastalarının *KIFC1* gen ekspresyonu ile tümör evresi ( $p = 0,040$ ) ve tümör gradı ( $p = 0,010$ ) ile arasında da anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. *KIFC1* gen ekspresyonu ile metastaz durumu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p = 0,013$ ).

Hastalardaki *KIFC1* gen ekspresyonu ile metastaz durumu arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p = 0,013$ ). Ekspresyon profili artan hastalarda metastaz görülme oranı %45.8 (11/24) iken ekspresyon profili azalanlarda %6.7 (1/15) oranında metastaz bulgusu görülmektedir.

Hastalardaki *KIFC1* gen ekspresyonu ile tümör evresi arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $p = 0,040$ ) evre 1 tanılı hastalarda *KIFC1* ekspresyon oranı anlamlı derecede düşük iken 6/8 (%40); *KIFC1* ekspresyonu artan hastaların %50'si (12/24) evre 2 ve % 41,7'si (10/24) evre 3'tür ( $p = 0,040$ ). Bu veriler *KIFC1* ekspresyon seviyesi arttıkça tümör evresinin arttığını ve *KIFC1* ekspresyon artışının ileri tümör evresi ile istatistiksel bir anlamlılık olduğunu göstermektedir ( $p = 0,040$ ).

Hastalardaki *KIFC1* gen ekspresyonu ile histolojik grade arasında anlamlı derecede ilişki görülmüştür ( $p = 0,010$ ). *KIFC1* ekspresyonu artan hastaların %33,3'ünün grade 3 ve grade 4 olduğu, ekspresyon seviyesi düşen hastaların ise %40'ının grade 1 ve grade 2 hastaları olduğu tespit edilmiştir. Bu durum ise *KIFC1* ekspresyon artışı ile grade artışı arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunduğunu göstermektedir ( $p = 0,010$ ).

Hastalardaki *KIFC1* gen ekspresyonu ile hasta serumlarının metilasyon durumu arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $p = 0,042$ ). *KIFC1* ekspresyonu artan hastaların %95,8'inde unmetilasyon durumu tespit edilmiştir. Bu veriye göre hasta serumlarında *KIFC1* ekspresyon seviyesi artan hastalarda unmetilasyon durum gözlenmesi dikkat çekicidir ( $p = 0,042$ ).

*KIFC1* gen ekspresyon profilinde artış ve azalma durumu bakımından ilgili değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesi sonucunda elde edilen p değerleri ve tanımlayıcı istatistikler Tablo 4-6.'da yer almaktadır.

Tablo 4-6. *KIFCI* Ekspresyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi

Parametreler			<i>KIFCI</i> Ekspresyon Profili		p
			Artan	Azalan	
<b>Cinsiyet</b>	Kadın	Hasta sayısı	13	4	0,112
		%	54,2	26,7	
	Erkek	Hasta sayısı	11	11	
		%	45,8	73,3	
<b>&lt;63 yaş</b>	63 yaş altı	Hasta sayısı	11	8	0,748
		%	45,8	53,3	
	63 yaş üstü	Hasta sayısı	13	7	
		%	54,2	46,7	
<b>&lt;71 yaş</b>	71 yaş altı	Hasta sayısı	20	10	0,266
		%	83,3	66,7	
	71 yaş üstü	Hasta sayısı	4	5	
		%	16,7	33,3	
<b>Patoloji tipi</b>	Adenokarsinom	Hasta sayısı	4	4	0,108
		%	16,7	26,7	
	KHAK	Hasta sayısı	10	1	
		%	41,7	6,7	
	Skuamöz H.	Hasta sayısı	8	8	
		%	33,3	53,3	
Diğer	Hasta sayısı	2	2		
	%	8,3	13,3		
<b>Ölü-Sağ</b>	Ölü	Hasta sayısı	7	3	0,711
		%	29,2	20,0	
	Sağ	Hasta sayısı	17	12	
		%	70,8	80,0	
<b>Metastaz Durumu</b>	Var	Hasta sayısı	11	1	0,013
		%	45,8	6,7	
	Yok	Hasta sayısı	13	14	
		%	54,2	93,3	
<b>Beyin Met</b>	Var	Hasta sayısı	4	1	0,631
		%	16,7	6,7	
	Yok	Hasta sayısı	20	14	
		%	83,3	93,3	
<b>Evre</b>	1	Hasta sayısı	2	6	0,040
		%	8,3	40,0	
	2	Hasta sayısı	12	7	
		%	50,0	46,7	
	3	Hasta sayısı	10	2	
		%	41,7	13,3	
<b>Grade</b>	1	Hasta sayısı	2	6	0,010

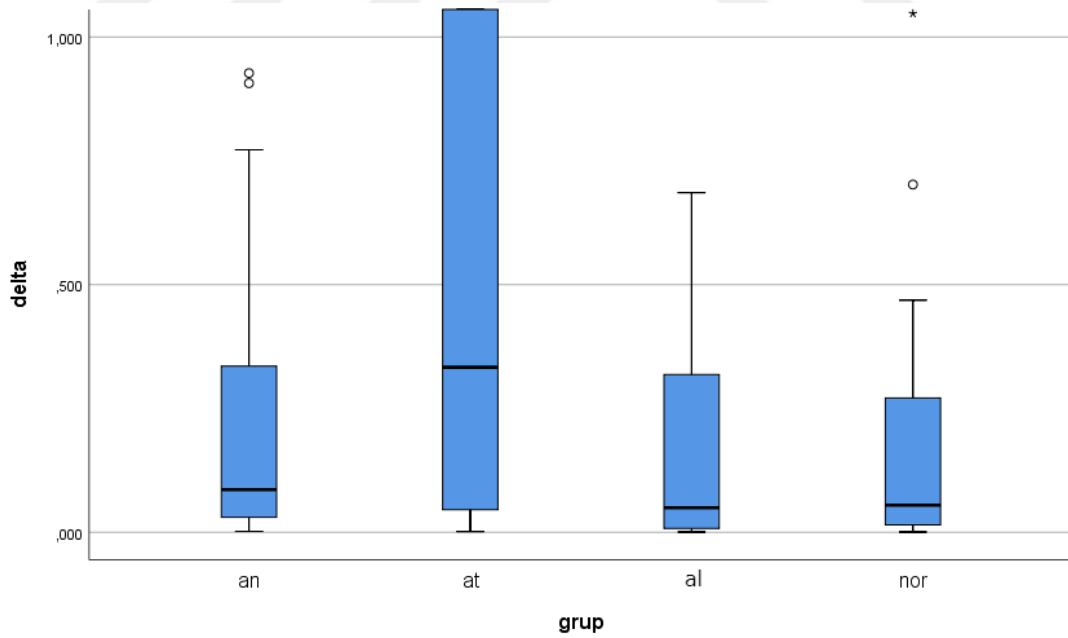
		%	8,3	40,0	
	2	Hasta sayısı	6	6	
		%	25,0	40,0	
	3	Hasta sayısı	8	3	
		%	33,3	20,0	
	4	Hasta sayısı	8	0	
		%	33,3	0,0	
<b>Sigara</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı	15	13	0,150
		%	62,5	86,7	
	Kullanmıyor	Hasta sayısı	9	2	
		%	37,5	13,3%	
<b>Alkol</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı	3	4	0,396
		%	12,5	26,7	
	Kullanmıyor	Hasta sayısı	21	11	
		%	87,5	73,3	
<b>Tümör Doku Metilasyon</b>	Unmetile	Hasta sayısı	16	13	0,273
		%	69,6	86,7	
	Metile	Hasta sayısı	7	2	
		%	30,4	13,3	
<b>Normal Doku Metilasyon</b>	Unmetile	Hasta sayısı	18	8	0,080
		%	81,8	53,3	
	Metile	Hasta sayısı	4	7	
		%	18,2	46,7	
<b>Hasta Serum Metilasyon</b>	Unmetile	Hasta sayısı	23	9	0,042
		%	95,8	69,2	
	Metile	Hasta sayısı	1	4	
		%	4,2	30,8	

Hastalara ait tümör, tümöre eşlenik normal doku ve lenfosit örneklerine ait  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerlerinin birbirleri ile korelasyon durumları incelenmiştir. Tablo 4-7'de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri arasındaki ilişkileri non-parametrik korelasyon testi ile incelenmesi sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı ve p değerleri yer almaktadır. Hastaların lenfosit örneklerinin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri ve sağlıklı kişilere ait lenfosit örneklerinin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  t değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ( $r=0,491$ ;  $p=0,002$ ). Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun lenfosit örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark söz konusudur. Tümör dokularına ait  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri ile tümöre eşlenik normal dokulara ait  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri, hastaların lenfosit örnekleri ile sağlıklı kontrol grubunun lenfosit örneklerine ait  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0,821$ ;  $p=0,152$ ;  $p=0,397$ ).

**Tablo 4-7. Hastaların Tümör Doku, Tümöre Eşlenik Normal Doku ve Lenfosit Örneklerine Ait  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Değerlerinin Birbirleri İle Korelasyon Durumlarının İncelenmesi**

		$AN2^{-\Delta\Delta Ct}$	$AH2^{-\Delta\Delta Ct}$	$SL2^{-\Delta\Delta Ct}$
$AT2^{-\Delta\Delta Ct}$	r	0,037	0,234	0,139
	p	0,821	0,152	0,397
	N	39	39	39
$AN2^{-\Delta\Delta Ct}$	r		-,201	0,083
	p		0,219	0,615
	N		39	39
$AL 2^{-\Delta\Delta Ct}$	r			<b>0,491</b>
	p			<b>0,002</b>
	N			39

(AT: Akciğer Tümör doku örneği; AN: Akciğer Tümörü eşlenik Normal Doku örneği; AL: Akciğer kanser tanılı hasta lenfosit; SL: Sağlıklı kontrol lenfosit).



**Şekil 4-3. Akciğer kanserli hastaların Tümör Doku, tümöre Eşlenik Normal Doku ile Hastalara Ait lenfosit ve Sağlıklı kontrollere ait lenfosit örneklerinin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Değerlerinin Karşılaştırılması**

Gruplar arasında  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ortalamaları bakımından karşılaştırmalar yapılmış ve tanımlayıcı istatistikler ve p değerleri Tablo 4-8’de verilmiştir. Gruplar arasında  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

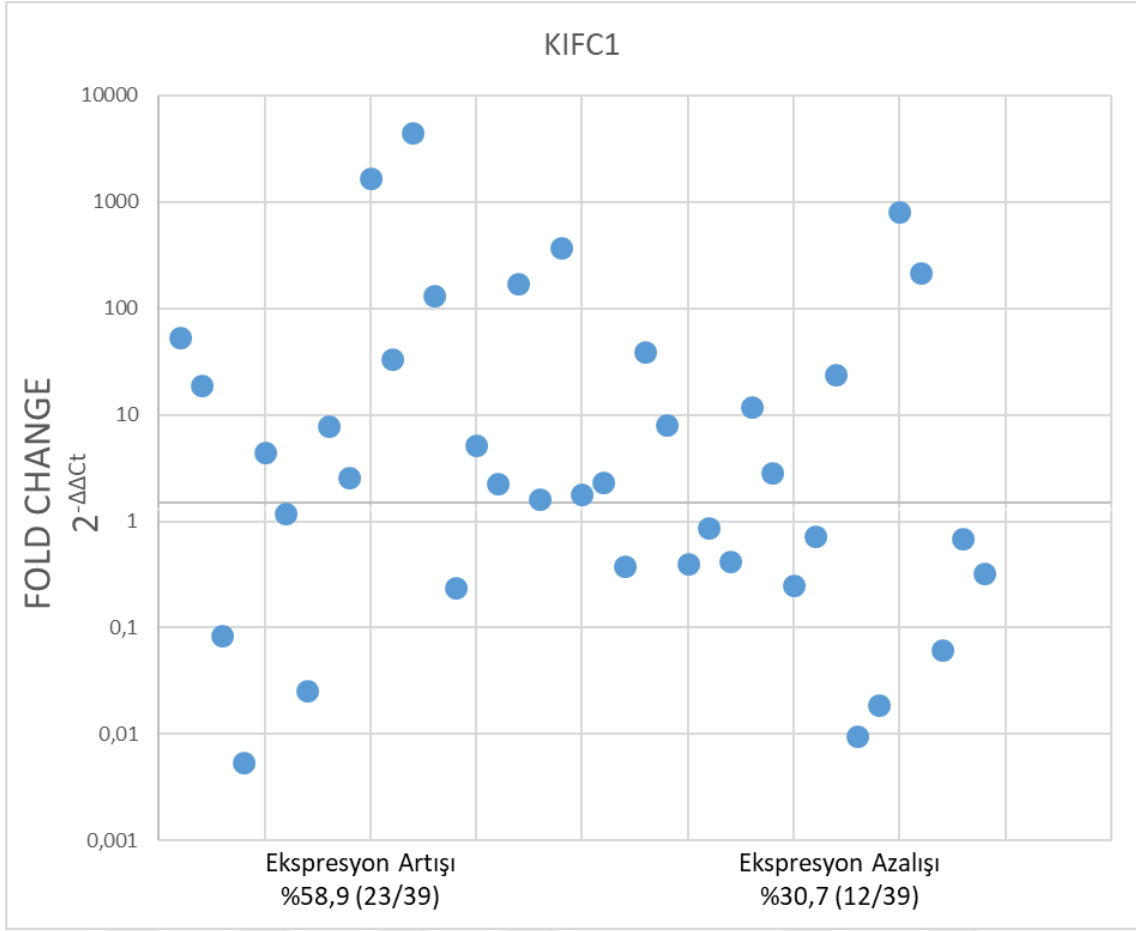
ortalamları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0,025$ ). Farklılıklar detaylı olarak incelendiğinde, akciğer kanserli hastaların tümör doku (AT) grubunun  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ortalaması, hastaların tümöre eşlenik normal doku (AN), hastalara ait lenfosit örnekleri (AL), ve sağlıklı kontrollere ait lenfosit örnekleri (SL)  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,050$ ;  $p=0,005$ ;  $p=0,015$ ).

**Tablo 4-8. Akciğer Normal Doku, Akciğer Tümör Doku, Hasta Serum Ve Sağlıklı Serum  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Ortalamalarının Karşılaştırılması**

Grup	Ortalama	Medyan	Std. Sapma	Minimum	Maksimum	p
AN $2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,90096	0,08621	9,854875	0,002	61,704	
AT $2^{-\Delta\Delta Ct}$	7,04888	0,33319	31,594551	0,002	197,928	<b>0,025</b>
AL $2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,24505	0,04946	5,370986	0,001	33,477	
SL $2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,20910	0,05466	3,757015	0,000	21,445	

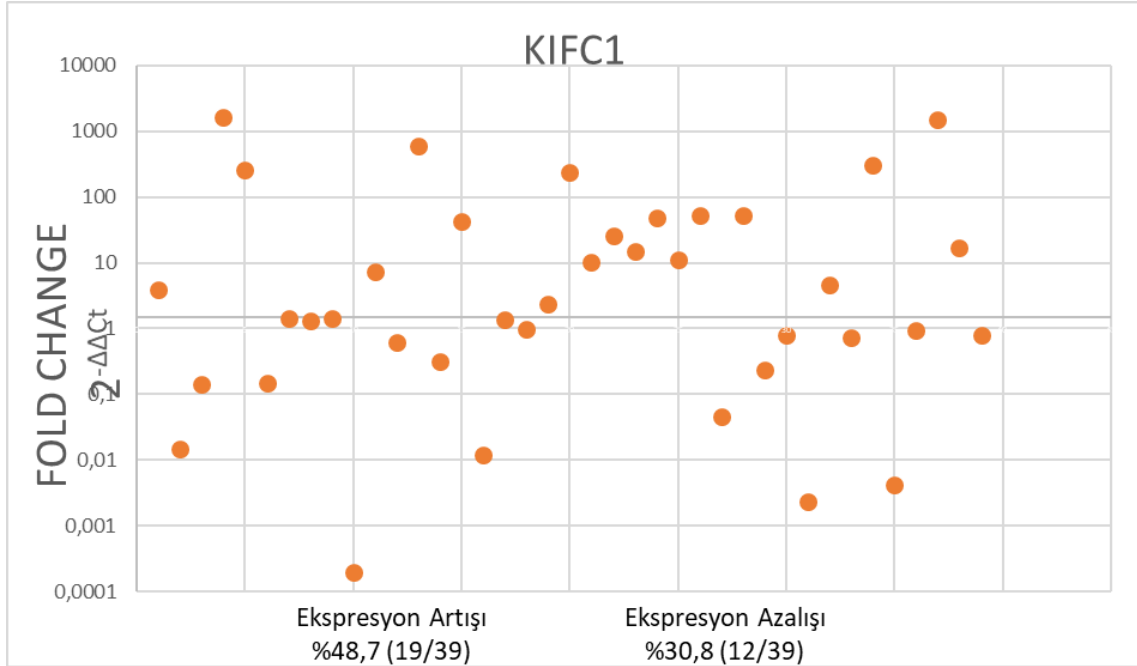
(**AT**: Akciğer tümör doku örneği; **AN**: Akciğer tümörü eşlenik normal doku örneği; **AL**: Akciğer kanser tanılı hasta lenfosit; **SL**: Sağlıklı kontrol lenfosit).

*KIFC1* gen nihai ekspresyon seviyeleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  fold change formülü kullanılarak hesaplandı (Şekil 4-3). Hastaların tümör dokusunda, tümöre eşlenik normal dokuya göre %59'unda (23/39) ekspresyon seviyesinde artış, %30,8'inde (12/39) ise ekspresyon seviyesinde azalma görüldü. Hastaların %10,2'sinde (4/39) ise tümör dokusu ve tümöre eşlenik normal doku arasında anlamlı ekspresyon farklılığı saptanmadı. Gruplar arası nicel analiz yapıldığında, akciğer kanseri tanılı hastaların tümör örneklerinde, tümör dokusuna eşlenik normal dokuya göre *KIFC1* geninin 3,2 kat arttığı hesaplandı.



**Şekil 4-4.** Tümör örneklerinde eşlenik normal doku örneklerine göre *KIFC1* geninin ekspresyon seviye değişikliklerinin  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  fold change formülü ile analizinin logaritmik dağılım grafiği. 1,5 cut off noktasının üstünde olan değerler ekspresyon artışı, 1,5'un altında olan değerler ise ekspresyon azalışı olarak kabul edildi.

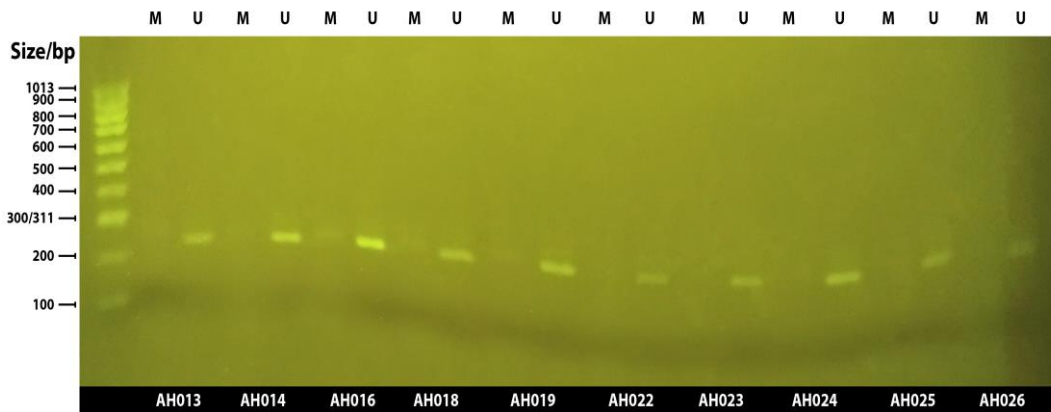
Hasta lenfosit örnekleri ile sağlıklı kontrollerin lenfosit örnekleri karşılaştırıldığında hasta lenfosit örneklerinin %48,7'inde (19/39) sağlıklı kontrol lenfosit örneklere göre *KIFC1* geni ekspresyon seviyesinde artma, %30,8'sinin (12/39) de ise ekspresyon seviyesinde azalma tespit edildi. Hastalara ait lenfosit örneklerinin %20,5'inde (8/39) ise hastalara ait lenfosit örnekleri ve sağlıklı kontrollere ait lenfosit örnekleri arasında anlamlı ekspresyon farklılığı saptanmadı. Gruplar arası nicel analiz yapıldığında, akciğer kanseri tanılı hastaların lenfosit örneklerinde, sağlıklı kontrollerin lenfosit örneklere göre *KIFC1* geninin 2,4 kat arttığı hesaplandı.



**Şekil 4-5.** Hasta serum örneklerinde sağlıklı kontrol serum örneklerine göre KIFC1 geninin ekspresyon seviye değişikliklerinin  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  fold change formülü ile analizinin logaritmik dağılım grafiği. 1,5 cut off noktasının üstünde olan değerler ekspresyon artışı, 1,5'un altında olan değerler ise ekspresyon azalışı olarak kabul edildi.

#### 4.3. KIFC1 Geninin Metilasyon Analizi

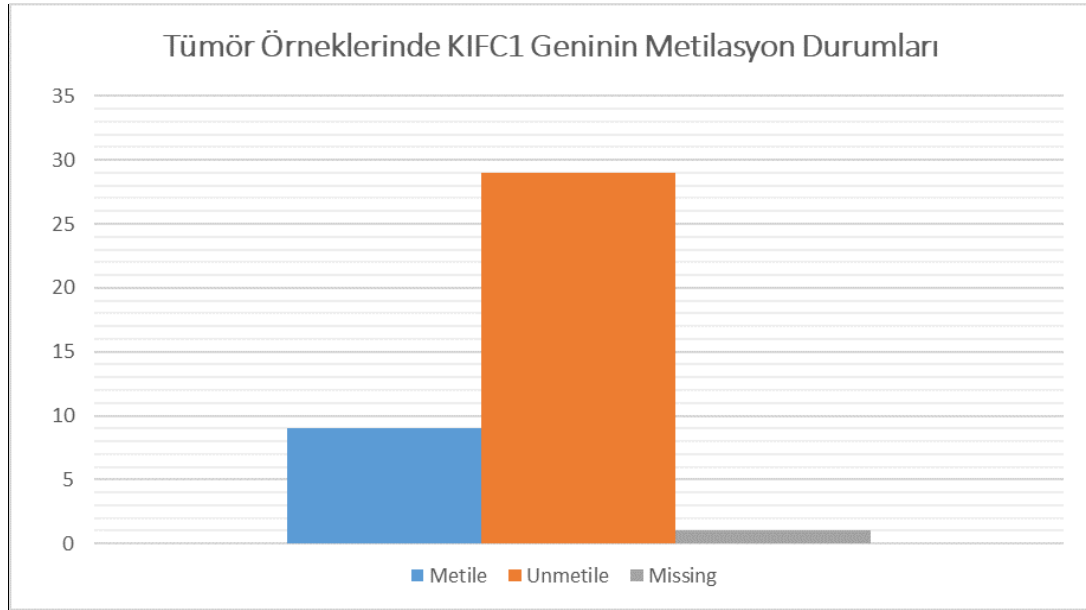
Akciğer kanseri tanısı almış 39 hastaya ait tümör dokusu, tümöre eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile hastalarla yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 39 sağlıklı bireye ait serum nünunelerinde *KIFC1* metilasyon profili MSP yöntemi kullanılarak araştırıldı.



**Şekil 4-6.** Hasta serumlarına ait metile ve unmetile jel görüntüsü (M: Metile; U: unmetile; bp: base pair)

#### 4.3.1. Tümör Dokularının Metilasyon Analizi

Akciğer kanserli hastaların tümör örneklerinin %23,1'inde (9/39) metilasyon, %74,4'ünde (29/39) unmetilasyon durumu gözlemlendi (Şekil 4-7). Hastaların tümör dokularının %2,5'inde (1/39) ise metilasyon profili saptanamadı.



**Şekil 4-7. Akciğer kanserli 39 hastaya ait tümör örneklerinde *KIFC1* geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği.** Tümör örneklerinin 9'unda metilasyon ve 29'unda unmetilasyon gözlemlendi. 1 örnekte ise metilasyon profili saptanamadı.

Hastaların klinik ve patolojik özellikleri ile metilasyon profilleri karşılaştırıldığında hastalara ait tümör dokularındaki metilasyon profili ile patolojik alt tipleri arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $p=0,050$ ). Skuamöz hücreli patolojiye sahip akciğer hastalarının tümör dokusunda unmetile oranı %93,75 (15/16) oranında anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. KHAK tanılı hastaların tümör dokusunda unmetile oranı %54,6 (6/11) olarak tespit edilmiştir. AAD tanılı hastalarına tümör dokularında ise % 62,5 (5/8) oranında unmetilasyon görülmüştür ve analizler akciğer kanseri alt tiplerinde metilasyon profillerinin farklı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca sigara kullanımı ile metilasyon profili arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,044$ ). Metilasyon profili tespit edilebilen örnekler arasında sigara kullanan hastaların tümör dokularında unmetile oranı %85,2'dir (23/27). Bu durum ise sigara kullanımının akciğer kanserinde metilasyon profilini etkileyebileceğini göstermektedir. Hastalara ait tümör dokularında metilasyon profili ile ilgili değişkenler arasındaki ilişkilerin

incelenmesi sonucunda elde edilen p değerleri ve tanımlayıcı istatistikler Tablo 4-9'da gösterilmektedir.

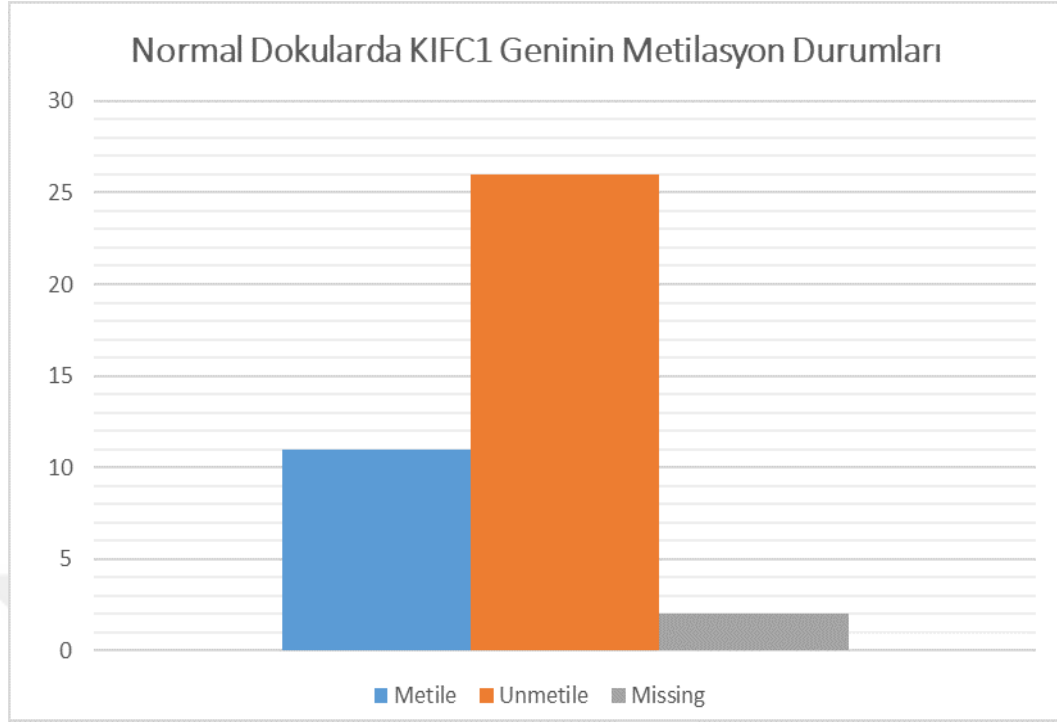
**Tablo 4-9. Tümör Doku Metilasyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi**

Parametreler	Akciğer Tümör Doku Metilasyon Profili		p	
	Unmetile	Metile		
<b>Cinsiyet</b>	Kadın	Hasta sayısı	12	0,703
		%	41,4	
	Erkek	Hasta sayısı	17	
		%	58,6	
<b>&lt;63 yaş</b>	63 yaş altı	Hasta sayısı	15	1,000
		%	51,7	
	63 yaş üstü	Hasta sayısı	14	
		%	48,3	
<b>&lt;71 yaş</b>	71 yaş altı	Hasta sayısı	22	1,000
		%	75,9	
	71 yaş üstü	Hasta sayısı	7	
		%	24,1	
<b>Patoloji tipi</b>	Adenokarsinom	Hasta sayısı	5	0,050
		%	17,2	
	KHAK	Hasta sayısı	6	
		%	20,7	
	Skvamöz H.	Hasta sayısı	15	
		%	51,7	
Diğer	Hasta sayısı	3		
	%	10,3		
<b>Ölü-Sağ</b>	Ölü	Hasta sayısı	7	1,000
		%	24,1	
	Sağ	Hasta sayısı	22	
		%	75,9	
<b>Metastaz Durumu</b>	Var	Hasta sayısı	10	0,689
		%	34,5	
	Yok	Hasta sayısı	19	
		%	65,5	
<b>Beyin Met</b>	Var	Hasta sayısı	5	0,312
		%	17,2	
	Yok	Hasta sayısı	24	
		%	82,8	
<b>Evre</b>	1	Hasta sayısı	7	0,133
		%	24,1	
	2	Hasta sayısı	11	
		%	37,9	

	3	Hasta sayısı %	11 37,9	1 11,1			
<b>Grade</b>	1	Hasta sayısı %	5 17,2	2 22,2	0,873		
	2	Hasta sayısı %	9 31,0	3 33,3			
	3	Hasta sayısı %	8 27,6	3 33,3			
	4	Hasta sayısı %	7 24,1	1 11,1			
	<b>Sigara</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı %	23 79,3		4 44,4	0,044
		Kullanmıyor	Hasta sayısı %	6 20,7		5 55,6	
	<b>Alkol</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı %	7 24,1		0 0,0	0,164
			Hasta sayısı %	22 75,9		9 100,0	
Kullanmıyor		Hasta sayısı %					

#### 4.3.2. Tümöre Eşlenik Normal Dokuların Metilasyon Analizi

Akciğer kanseri tanılı hastaların tümöre eşlenik normal dokularının %28,2'sinde (11/39) metilasyon, %66,7'sinde (26/39) unmetilasyon durumu gözlemlendi (Şekil 4-8). Hastaların tümöre eşlenik normal dokularının %5,1'inde (2/39) ise metilasyon profili saptanamadı.



**Şekil 4-8. Akciğer kanserli 39 hastaya ait eşlenik normal doku örneklerinde *KIFC1* geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği.** Eşlenik normal doku örneklerinin 11'inde metilasyon ve 26'sında unmetilasyon gözlemlendi. 2 örnekte ise metilasyon profili saptanamadı.

Hastaların klinik ve patolojik özellikleri ile metilasyon profilleri karşılaştırıldığında hastalara ait tümöre eşlenik normal doku metilasyon profili ile sigara kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $p=0,018$ ). Tümör dokusuna eşlenik normal dokularında metilasyon profili belirlenmiş sigara kullanan hastaların %59,3'ünde (16/27) unmetilasyon; %40,7'sinde (11/27) gözlemlendi. Bu durum sigara kullanımının metilasyon profilini etkileyebileceğini göstermektedir. Hastalara ait tümöre eşlenik normal dokularında metilasyon profili ile ilgili değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesi sonucunda elde edilen p değerleri ve tanımlayıcı istatistikler Tablo 4-10'de gösterilmektedir.

**Tablo 4-10. Tümöre Eşlenik Normal Doku Metilasyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi**

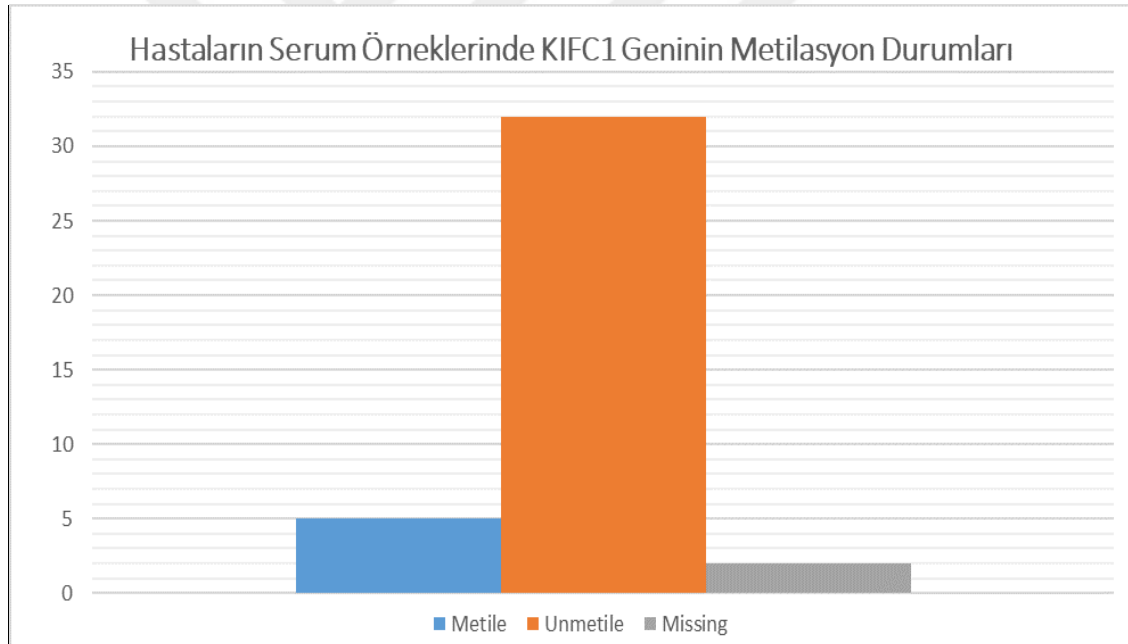
Parametreler	Akciğer Eşlenik Normal Doku Metilasyon Profili		<i>p</i>
	Unmetile	Metile	
Cinsiyet	Hasta sayısı	13	0,072
	%	50,0	
		2	18,2

	Erkek	Hasta sayısı %	13 50,0	9 81,8	
<b>&lt;63 yaş</b>	63 yaş altı	Hasta sayısı %	12 46,2	6 54,5	0,728
	63 yaş üstü	Hasta sayısı %	14 53,8	5 45,5	
<b>&lt;71 yaş</b>	71 yaş altı	Hasta sayısı %	19 73,1	9 81,8	0,695
	71 yaş üstü	Hasta sayısı %	7 26,9	2 18,2	
<b>Patoloji tipi</b>	Adenokarsinom	Hasta sayısı %	6 23,1	2 18,2	0,775
	KHAK	Hasta sayısı %	8 30,8	2 18,2	
	Skvamöz H.	Hasta sayısı %	10 38,5	5 45,5	
	Diğer	Hasta sayısı %	2 7,7	2 18,2	
<b>Ölü-Sağ</b>	Ölü	Hasta sayısı %	6 23,1	2 18,2	1,000
	Sağ	Hasta sayısı %	20 76,9	9 81,	
<b>Metastaz Durumu</b>	Var	Hasta sayısı %	9 34,6%	1 9,1	0,224
	Yok	Hasta sayısı %	17 65,4	10 90,9	
<b>Beyin Met</b>	Var	Hasta sayısı %	3 11,5	1 9,1	1,000
	Yok	Hasta sayısı %	23 88,5	10 90,9	
<b>Evre</b>	1	Hasta sayısı %	5 19,2	3 27,3	0,324
	2	Hasta sayısı %	12 46,2	7 63,6	
	3	Hasta sayısı %	9 34,6	1 9,1	
<b>Grade</b>	1	Hasta sayısı %	4 15,4	4 36,4	0,211
	2	Hasta sayısı %	8 30,8	4 36,4	
	3	Hasta sayısı %	7 26,9	3 27,3	
	4	Hasta sayısı %	7 26,9	0 0,0	

<b>Sigara</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı	16	11	<b>0,018</b>
		%	61,5	100,0	
	Kullanmıyor	Hasta sayısı	10	0	
		%	38,5	0,0	
<b>Alkol</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı	3	3	<b>0,335</b>
		%	11,5	27,3	
	Kullanmıyor	Hasta sayısı	23	8	
		%	88,5	72,7	

#### 4.3.3. Hasta Serum Örneklerinin Metilasyon Analizi

Akciğer kanserli hasta serum örneklerinin %12,8'inde (5/39) metilasyon durumu gözlenirken, %82,1'inde (32/39) unmetilasyon durumu gözlemlendi (Şekil 4-9). Hastaların serum örneklerinin %5,1'inde (2/39) ise metilasyon profili saptanamadı.



**Şekil 4-9. Akciğer kanserli 39 hastaya ait serum örneklerinde KIFC1 geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği.** Serum örneklerinin 5'inde metilasyon ve 32'sinde unmetilasyon gözlemlendi. 2 örnekte ise metilasyon profili saptanamadı.

Hastaların klinik ve patolojik özellikleri ile metilasyon profilleri karşılaştırıldığında hastalara ait serum örneklerinin metilasyon profili ile <63 yaş hasta bireyler arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $p=0,046$ ). Serum örneklerinde metilasyon profili belirlenmiş 63 yaş altı hastalarda unmetilasyon oranı %100'dür(18/18) ve metilasyon oranına göre anlamlı derecede yüksektir ( $p=0,046$ ).

Buda akciğer kanserli hastalarda yaş ile metilasyon profilinin bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

Akciğer kanseri hasta serumlarının metilasyon profili ile hastalığın gradı arasında da anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,040$ ). Serum örneklerinde metilasyon profili belirlenmiş grade 4 tanılı olan hastaların tamamında unmetilasyon görülmüştür. Bu bağlamda hastalığın grade artışı ile unmetilasyon oranını arasında anlamlı bir ilişki olduğu düşünülebilir. Hastaların serum örneklerinin metilasyon profili ile ilgili değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesi sonucunda elde edilen  $p$  değerleri ve tanımlayıcı istatistikler Tablo 4-11’de gösterilmiştir.

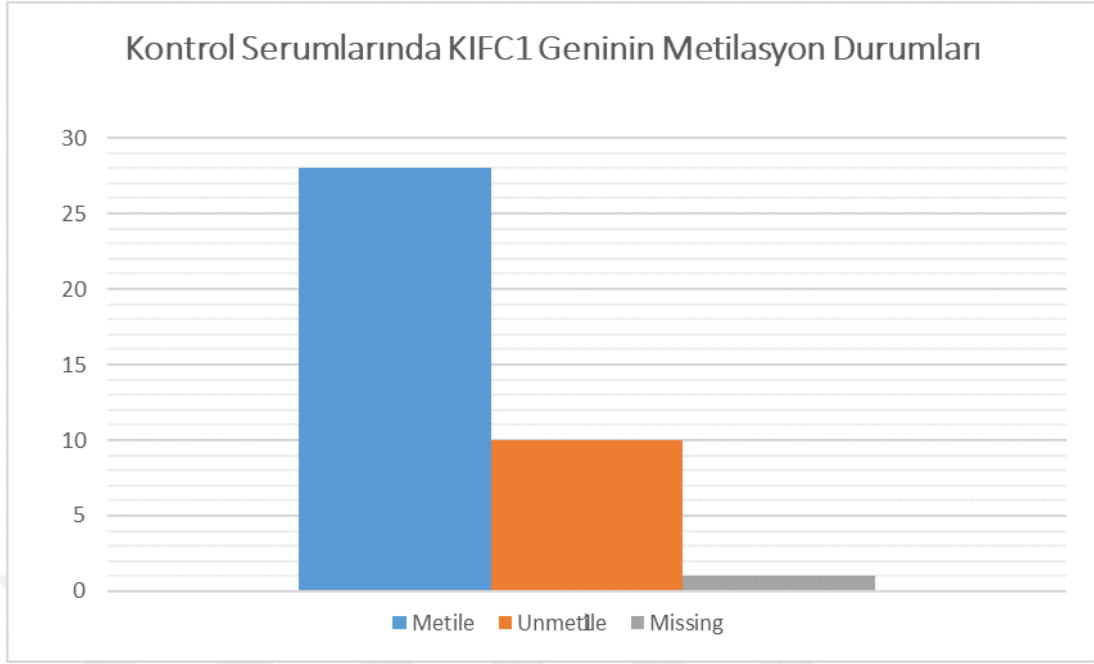
**Tablo 4-11. Hasta Serum Örneklerinin Metilasyon Profili ile İlgili Değişkenlerin İncelenmesi**

Parametreler	Hasta Serumlarının Metilasyon Profili		$p$	
	Unmetile	Metile		
Cinsiyet	Kadın	Hasta sayısı	14	1,000
		%	43,8	
	Erkek	Hasta sayısı	18	
		%	56,3	
<63 yaş	63 yaş altı	Hasta sayısı	18	<b>0,046</b>
		%	56,3	
	63 yaş üstü	Hasta sayısı	14	
		%	43,8	
<71 yaş	71 yaş altı	Hasta sayısı	26	<b>0,046</b>
		%	81,3	
	71 yaş üstü	Hasta sayısı	6	
		%	18,8	
Patoloji tipi	Adenokarsinom	Hasta sayısı	4	0,208
		%	12,5	
	KHAK	Hasta sayısı	11	
		%	34,4	
	Skvamöz H.	Hasta sayısı	13	
		%	40,6	
	Diğer	Hasta sayısı	4	
		%	12,5	
Ölü-Sağ	Ölü	Hasta sayısı	8	0,597
		%	25,0	
	Sağ	Hasta sayısı	24	
		%	75,0	

<b>Metastaz Durumu</b>	Var	Hasta sayısı	11	1	1,000
		%	34,4	20,0	
	Yok	Hasta sayısı	21	4	
		%	65,6	80,0	
<b>Beyin Met</b>	Var	Hasta sayısı	5	0	1,000
		%	15,6	0,0	
	Yok	Hasta sayısı	27	5	
		%	84,4	100,0	
<b>Evre</b>	1	Hasta sayısı	6	1	0,302
		%	18,8	20,0	
	2	Hasta sayısı	15	4	
		%	46,9	80,0	
	3	Hasta sayısı	11	0	
		%	34,4	0,0	
<b>Grade</b>	1	Hasta sayısı	5	3	0,040
		%	15,6	60,0	
	2	Hasta sayısı	9	1	
		%	28,1	20,0	
	3	Hasta sayısı	10	1	
		%	31,3	20,0	
	4	Hasta sayısı	8	0	
		%	25,0	0,0	
<b>Sigara</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı	22	4	1,000
		%	68,8	80,0	
	Kullanmıyor	Hasta sayısı	10	1	
		%	31,3	20,0	
<b>Alkol</b>	Kullanıyor	Hasta sayısı	5	1	1,000
		%	15,6	20,0	
	Kullanmıyor	Hasta sayısı	27	4	
		%	84,4	80,0	

#### 4.3.4. Sağlıklı Kontrol Serum Örneklerinin Metilasyon Analizi

Kontrol serumlarının %71,8'inde (28/39) metilasyon durumu gözlenirken, %25,7'sinde (10/39) unmetilasyon durumu gözlendi (Şekil 4-10). Sağlıklı kontrol serum örneklerinin %2,5'inde (1/39) ise metilasyon profili saptanamadı.



**Şekil 4-10. Sağlıklı 39 kontrole ait serum örneklerinde KIFC1 geninin metilasyon durumlarının sütun grafiği.** Serum örneklerinin 28'inde metilasyon ve 10'unda unmetilasyon gözlemlendi. 1 örnekte ise metilasyon profili saptanamadı.

Sağlıklı kontrollere ait serum örneklerinin metilasyon oranı %71,8(28/39) iken akciğer kanseri hasta serumlarında bu oran %12,8'dir (5/39). Bu durum akciğer kanserli hastaların serum örnekleri ile sağlıklı kontrol serumlarındaki metilasyon profillerinin oldukça farklı olduğunu göstermektedir. Akciğer kanseri tanısında *KIFC1* geni metilasyonu araştırılarak biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ve hastaların metilasyon profili açısından değerlendirilebileceğini göstermektedir.

#### **4.3.5. Akciğer Kanserli Hastalara Ait Tümör, Eşlenik Normal Doku ve Serum Örnekleri İle Kontrol Grubuna Ait Serum Örneklerindeki Metilasyon Verilerinin Karşılaştırılması**

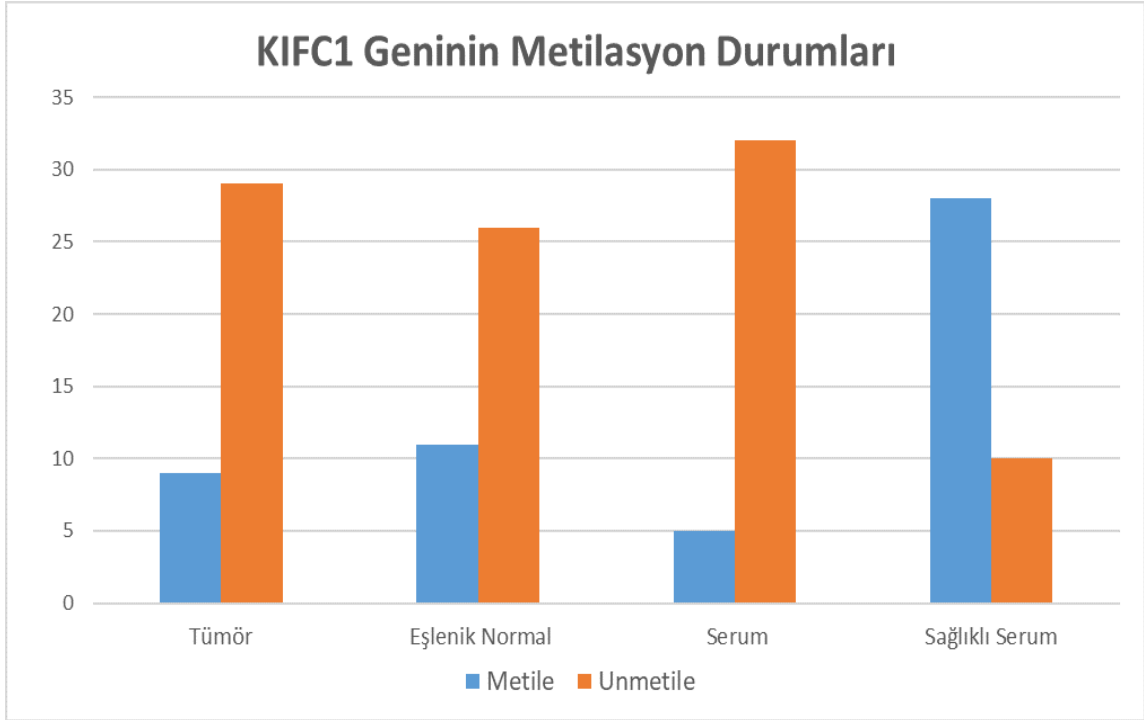
Akciğer kanserli tümör dokularının %23,7'sinde (9/38) metilasyon, %76,3'ünde (29/38) unmetilasyon durumu gözlemlendi; hastaların eşlenik normal dokusunun %29,7'sinde (11/37) metilasyon, %70,3'ünde (26/37) unmetilasyon durumu gözlemlendi. Hasta serum örneklerinin %13,5'inde (5/37) metilasyon gözlemlenirken, %86,5'inde (32/37) unmetilasyon gözlemlendi; kontrol serum örneklerinin %73,7'sinde (28/38) metilasyon, %26,3'ünde (10/38) unmetilasyon görüldü ve Tablo 4-12'de gösterilmektedir. Hastalara ait tümör, eşlenik normal doku ve serum örneklerinin

tamamında unmetilsayon oranı yüksek iken ; kontrol serum örneklerinde metilasyon oranı daha yüksek bulunmuştur. Akciğer kanserli hastaların serumlarında unmetile oranı %86,5 metilasyon oranı ise göre %13,5 iken ;sağlıklı kontrol serumlarında ise %73,7 oranında metilasyon %26,3 oranında unmetilasyon görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda hasta serumlarındaki *KIFCI* metilasyon oran artışının akciğer kanseri hastalarının rutin taramalarının yanında tümör ilerlemesinin değerlendirmede kullanılabilirliğini göstermektedir. Akciğer kanseri tanılı hastalara ait tümör ve normal eşlenik doku ve serumları ile yaş ve cinsiyet olarak hastalarla eşleştirilmiş sağlıklı bireylere ait serum örneklerindeki metilasyon profillerinin kendi aralarında karşılaştırılmaları sonucunda anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p <0,001) ve Tablo 4-12’da gösterilmektedir.

**Tablo 4-12. Akciğer Kanserli Hastaların Tümör, Eşlenik Normal Doku ve Serum Örnekleri İle Kontrol Grubuna Ait Serum Örneklerinde Metilasyon Verilerinin Karşılaştırılması**

		Gruplar				P	
		Normal Doku	Tümör Doku	Hasta Serum	Kontrol Serum		
Metilasyon Durumu	Unmetile	n	26	29	32	10	<0,001
		%	70,3	76,3	86,5	26,3	
	Metile	n	11	9	5	28	
		%	29,7	23,7	13,5	73,7	
Toplam	n	37	38	37	38	150	
	%	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	

Şekil 4-11’de hastalara ait tümör,eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı bireylere ait serum örneklerinde *KIFCI* geninin metilasyon durumunun sütun grafiği gösterilmektedir. Hastalara ait serum ve doku nünunleri kendi arasında incelendiğinde unmetilasyon oranı en yüksek olan grup hasta serum örnekleridir. Analiz edilen tüm gruplar karşılaştırıldığında hastalara ait serum örneklerinde %86,5 (32/37) unmetilasyon profili görülmekteyken bunu sırasıyla akciğer tümör dokusu %76,3(29/38), akciğer eşlenik normal dokusu %70,3 (26/37) ve kontrol serum %26,3 (10/38) örnekleri takip etmektedir.



**Şekil 4-11. Hastalara ait tümör, eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı serumlara ait *KIFC1* geninin metilasyon durumunun sütun grafiği.**

#### 4.3.6. *KIFC1* Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırması

Akciğer kanserli doku, eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile kontrol serumlarında *KIFC1* gen ekspresyon ve metilasyon profilleri istatistiksel olarak karşılaştırıldıktan sonra analiz edildi. Analiz sonucunda yalnızca hastaların serum örneklerinde *KIFC1* genine ait ekspresyon ve metilasyon verileri arasında istatistiksel bir anlamlılık gözlemlendi ( $p=0,042$ ). Böylece *KIFC1* serum metilasyon değerlendirmelerinin akciğer kanserli hastalarda non-invaziv bir biyomarker olarak araştırılabileceğini düşünülebilir.

##### 4.3.6.1. Akciğer Eşlenik Normal Doku Örneklerinde *KIFC1* Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması

Akciğer kanserli hastaların tümör eşlenik normal doku örneklerinde *KIFC1* genine ait ekspresyon ve metilasyon verilerinin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlılık gözlenmedi ( $p=0,063$ ) (Tablo 4-13).

**Tablo 4-13. Akciğer Kanserli Hastaların Eşlenik Normal Doku Örneklerinde *KIFC1* Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması**

		Eşlenik Normal Dokuların Metilasyon Profili		p
		Unmetile	Metile	
<b><i>KIFC1</i> Ekspresyon Durumu</b>	<b>Artma</b>	n	18	0,063
		%	69.2	
	<b>Azalma</b>	n	8	
		%	30.8	
<b>Toplam</b>	n	26	11	37
	%	100.0	100.0	100.0

#### 4.3.6.2. Akciğer Tümör Doku Örneklerinde *KIFC1* Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması

Akciğer kanserli hastaların tümör örneklerinde *KIFC1* genine ait ekspresyon ve metilasyon verilerinin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlılık gözlenmedi ( $p=0,226$ ) (Tablo 4-14).

**Tablo 4-14. Akciğer Kanserli Hastaların Tümör Doku Örneklerinde *KIFC1* Geninin Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması**

		Tümör Dokularının Metilasyon Profili		p
		Unmetile	Metile	
<b><i>KIFC1</i> Ekspresyon Durumu</b>	<b>Artma</b>	n	16	0,226
		%	55.2	
	<b>Azalma</b>	n	13	
		%	44.8	
<b>Toplam</b>	n	29	9	38
	%	100.0	100.0	100.0

#### 4.3.6.3. Akciğer Hasta Serum Örneklerinde *KIFC1* Geninin Metilasyon Ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması

Akciğer kanserli hastaların serum örneklerinde *KIFC1* genine ait ekspresyon ve metilasyon verilerinin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlılık gözlendi ( $p=0,042$ ) (Tablo 4-15). Hasta serum örneklerinde *KIFC1* gen ekspresyonu artan %62,1

(24/37) hastanın %95,8'inde (23/24) unmetilasyon gözlemlendi. Yüksek oranda unmetilasyon gözlenen hastalarda *KIFC1* gen ekspresyondaki artış oldukça dikkat çekici olup; bu gen ekspresyon artışının unmetilasyondan kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Dolayısıyla, *KIFC1*'in akciğer kanserli hastalarda non-invaziv biyomarker olarak kullanılabileceği düşünülebilir.

**Tablo 4-15. Akciğer Kanserli Hasta Serum Örneklerinde *KIFC1* Geninin Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması**

			Hasta Serumlarının Metilasyon Profili		p
			Unmetile	Metile	
<b><i>KIFC1</i> Ekspresyon Durumu</b>	<b>Artma</b>	n	23	1	<b>0,042</b>
		%	71.9	20.0	
	<b>Azalma</b>	n	9	4	
		%	28.1	80.0	
<b>Toplam</b>	n	32	5	37	
	%	100.0	100.0	100.0	

#### 4.3.6.4. Sağlıklı Kontrol Serum Örneklerinde *KIFC1* Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması

Sağlıklı kontrol serum örneklerinde *KIFC1* genine ait ekspresyon ve metilasyon verilerinin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel bir anlamlılık gözlenmedi (p=0,968) (Tablo 4-16).

**Tablo 4-16. Sağlıklı Kontrol Serum Örneklerinde *KIFC1* Geninin Metilasyon ve Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması**

			Sağlıklı Kontrol Serum Metilasyon Profili		p
			Unmetile	Metile	
<b><i>KIFC1</i> Ekspresyon Durumu</b>	<b>Artma</b>	n	6	17	<b>0,968</b>
		%	60.0	60.7	
	<b>Azalma</b>	n	4	11	
		%	40.0	39.3	
<b>Toplam</b>	n	10	28	38	
	%	100.0	100.0	100.0	

## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %25'ini oluşturur [228] ve özellikle gelişmiş ülkelerde en sık teşhis edilen kanserdir [229]. Küresel olarak, kanser yükünün 2050 yılına kadar iki katına çıkacağı ve akciğer kanserinin en sık görülen kanser olmayı sürdüreceği öngörülmektedir. Akciğer kanseri hastalarının % 70'i ileri evrede tanı almaktadır ve 5 yıllık sağkalım oranı %15,6'dır [230]. Akciğer kanseri için standart tedaviler, tek başına veya kombinasyon halinde cerrahi, platin bazlı kemoterapi, radyoterapi, kombine kemo radyoterapi ve hedefe yönelik tedaviyi içerir [228]. Ancak iyileştirilmiş tedavilere rağmen, akciğer kanseri kötü prognoza sahiptir [231]. Akciğer kanserinin mevcut teşhisi, biyopsilerin patolojik değerlendirilmesiyle tamamlanan farklı görüntüleme sistemlerini içerir ancak bu teknikler akciğer kanserini erken evrede tespit edememektedir [54]. Günümüzde akciğer kanserinde kullanılan tanı araçları, göğüs radyografisi ve balgam sitolojisi, küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) teşhisinde yeterince hassas değildir. CEA (karsinoembriyonik antijen), CYFRA 21-1, NSE(nöron-spesifik enolaz) ve SQHK (skumöz hücreli karsinom antijeni) gibi tümör belirteçleri ise akciğer kanserinin erken evresinde tanıyı mümkün kılmaz [13]. Bu veriler, radyolojik yaklaşımlara alternatif ve tamamlayıcı olarak kullanılabilir ve akciğer kanseri tespitini ve evresinin belirlenmesini iyileştirebilecek daha spesifik, daha az invaziv biyomarkerların bulunması ihtiyacını göstermektedir [232].

Yürütülen tez çalışmasında *KIFCI* geninin akciğer kanseri tanımlı hastalarda tanı, tedavi ve prognoz izlenmesinde invaziv/non invaziv biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı belirlenmesi amacıyla ekspresyon profilleri ile metilasyon durumlarının belirlenmesi hedeflendi. Kanser araştırmalarında epigenetik ve genetik mekanizmaların kanser oluşumu ve gelişimi üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması oldukça önemlidir. DNA metilasyonu genin promotör bölgesindeki CpG adacıklarındaki sitozin bazına metil grubunun eklendiği epigenetik bir mekanizmadır [24]. Akciğer kanseri de genetik ve epigenetik değişiklikler arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan ve % 95 ölüm ile sonuçlanan bir kanserdir [228].

DNA metilasyon durumlarında gözlenen değişiklikler kanser hücrelerinin önemli bir özelliğidir. DNA hipometilasyonunun, kanser evresi ile bağıntılı olduğu

bildirilmiştir. Tümör iyi huylu bir kitleden metastatik kansere ilerledikçe genom çapında DNA metilasyonunun azaldığı (hipometilasyon) bilinmektedir [233]. Bu veriler CpG dinükleotidlerinde DNA hipometilasyonu veya hipermetilasyonunun kanser tanısında kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, epigenetik değişiklikler dinamik ve geri dönüşümlü olduğundan, kansere karşı daha etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesi için umut verici hedeflerdir. Akciğer kanserinde yüksek vaka sayısı ve ölüm oranını azaltmaya yardımcı olabilecek epigenetik modifikasyonları hedefleyen tanısal ve terapötik yaklaşımlara odaklanmak oldukça akıllıca bir çözüm sunabilir [228]. Çalışmamızda akciğer kanseri tanısı almış hastaların tümör, eşlenik normal doku ve periferik kan örnekleri ile sağlıklı kontrollere ait örneklerde *KIFC1* ekspresyon ve metilasyon durumları açısından değerlendirilip istatistiksel olarak analiz edildikten sonra akciğer kanserinde invaziv/non-invaziv biyobelirteç olup olmayacağı araştırıldı. Bu bağlamda hastaların doku, lenfosit ve serumlarından izole edilen DNA ve RNA örnekleri analiz edildi ve istatistiksel analizi sonrasında değerlendirme sonuçları verildi.

Kinesin süper ailesi proteinleri (KIF'ler), mikrotübüllere bağlanabilen, organelleri, protein komplekslerini ve mesajcı RNA'ları (mRNA) mikrotübül boyunca taşıyarak hareket eden motor proteinlerdir. KIF'lerin kromozomal ve iğ ipliklerinin hareketlerine katılarak mitoz hücre bölünmesinde rol aldığı bildirilmiştir [185] bu nedenle, KIF ekspresyon artışının kanser oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir [8]. *KIFC1* ise mitoz bölünme sırasında kromozomların bir araya gelerek hücrenin ekvatoryal düzlemine hizalanması için gerekli olan KIF ailesi proteindir [234]. *KIFC1*'in, çeşitli kanser hücrelerinde artan ekspresyonunun tümör evresi ve malignitesi ile pozitif olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir [8]. *KIFC1*'in hepatoselüler karsinomda in-vitro olarak proliferasyonu arttırdığı belirtilmiştir [217], yumurtalık [216], meme [205], mesane [218], böbrek [220] kanserlerinde yaygın olarak eksprese edildiği bildirilmiştir. Ancak *KIFC1*'in akciğer kanseri alt tiplerindeki ekspresyon profili, ekspresyon profilinin hangi mekanizmalar ile düzenlendiği ve metilasyon profili henüz tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca *KIFC1* geninin akciğer kanserli hastalara ait tümör, eşlenik normal doku ve periferik kanlarında invaziv/non-invaziv biyomarker olarak kullanımının araştırıldığı bir çalışma da yoktur. Çalışmada qRT-PCR ve MSP metodları kullanılarak akciğer tümürlü taze doku numunelerinde ve eşlenik normal dokusunda, hasta ve kontrol periferik kan örneklerinde *KIFC1* ekspresyon seviyeleri ile

metilasyon durumları araştırıldı. Çalışmada, ilk kez hem KHAK hem de KHDAK hastaların tümör doku, eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı kontrol serum örnekleri *KIFC1* ekspresyon ve metilasyon profilleri açısından araştırıldı. Çalışmamızda literatüre uygun bir şekilde akciğer kanserli hastaların *KIFC1* gen ekspresyonu ile tümör evresi arasında anlamlı bir ilişki görüldü ( $p=0,040$ ). Evre 1 tanı hastalarda *KIFC1* ekspresyon oranı anlamlı derecede düşük iken 6/8(%40); *KIFC1* ekspresyonu artan hastaların %50'si (12/24) evre 2 ve % 41,7'si (10/24) evre 3'tür( $p=0,040$ ). Bu veriler *KIFC1* ekspresyon seviyesi arttıkça tümör evresinin arttığını ve *KIFC1* ekspresyon artışının ileri tümör evresi ile ilişkili olduğunu önermektedir. Ayrıca Grade 4 tanı hastalara ait akciğer tümör dokusundaki  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ortalaması Grade 1, 2 ve 3 olanlara göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ( $p=0,019$ ). Bu durum akciğer tümör dokularındaki *KIFC1* geni ekspresyon profilinin hastalık evrelendirme değerlendirilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

*KIFC1*'in kanser hücrelerinde, hücre polaritesini arttırıp bu polaritenin sürekliliğini sağlayarak epitelyal-mezenkimal(EMT) geçişe yol açtığı bildirilmiştir. Ogden ve ark. tarafından *KIFC1*'in hücre hareketliliğini artırıp EMT'yi hızlandırarak metastaza sebep olduğu önerilmiştir [191]. İn-siliko gen ekspresyonu veri analizine göre *KIFC1* ekspresyon profilinin yumurtalık kanseri için metastaz tahminini belirlemede kullanılabileceği önerilmiştir [216]. Çalışmamızda verilen literatürle uygun olacak şekilde hastaların artan *KIFC1* gen ekspresyonu ile metastaz durumu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p=0,013$ ). Ekspresyon profili artan hastalarda metastaz görülme oranı %45.8 (11/24) iken ekspresyon profili azalanlarda %6.7 (1/15) oranında metastaz bulgusu saptandı. Bu durum *KIFC1*'in artan ekspresyonun metastaza sebep olabileceğini ve akciğer kanserinde onkogenik özelliğe sahip bir gen olarak kabul edilebileceğini önerebilir. Çalışmamızda spesifik olarak hastaların lenfosit örneklerindeki metastaz oranı anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ( $p=0,033$ ). Bu durum akciğer kanserli hasta lenfosit örneklerinin metastaz bulgularını değerlendirmede kullanılabileceğini göstermektedir.

Beyin metastazları tüm kanser türleri arasında en yaygın olarak KHAK ve KHDAK kanserlerinde görülmektedir. Literatürde küçük KHDAK hastalarının %25'inin beyin metastazlarından etkilendiği bildirilmiştir [219]. Grinberg-Rashi ve ark. çalışmalarında primer KHDAK tümörlerinde *KIFC1* genide dahil olmak üzere *CDH2*

ve *FALZ* genlerinin gen ekspresyon durumlarını qPCR metoduyla incelemiştir ve *CDH2* birlikte *KIFCI*'in beyin metastazını öngörebilmede kullanabileceğini önermişlerdir [219]. Küçük hücre dışı akciğer kanserinde, Alzheimer antijeni ve N-kaderin ile birlikte, *KIFCI*'in artan ekspresyonu beyin metastazı oluşabilecek vakaları belirlemek için aday olduğu rapor edilmiştir [219]. Ancak çalışmamızda *KIFCI* ekspresyon profili ile ilgili değişkenlerin incelenmesi sonucunda *KIFCI* ekspresyon seviyesi ile beyin metastazı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).

Çalışmamız *KIFCI* ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde akciğer kanserli hastaların tümör dokusunda, tümöre eşlenik normal dokuya göre %59'unda (23/39) ekspresyon seviyesinde artış, %30,8'inde (12/39) ise ekspresyon seviyesinde azalma görüldü ve tümör örneklerinde eşlenik normal dokuya göre *KIFCI* geninin 3,2 kat arttığı hesaplandı. Hasta lenfosit örnekleri ile sağlıklı kontrollerin lenfosit örnekleri karşılaştırıldığında ise hasta lenfosit örneklerinin %48,7'inde (19/39) sağlıklı kontrol lenfosit örneklere göre *KIFCI* geni ekspresyon seviyesinde artma, %30,8'sinin (12/39) de ise ekspresyon seviyesinde azalma tespit edildi ve hastaların lenfosit örneklerinin, sağlıklı kontrollerin lenfosit örneklere göre *KIFCI* geninin 2,4 kat arttığı hesaplandı.

DNA metilasyonu gibi biyobelirteçlerin kanseri tespit etmek için, genetik mutasyon taramasına göre çeşitli avantajlara sahip olduğu ve anormal DNA metilasyonunun insidansının somatik mutasyonlarından daha yüksek olduğu bildirilmiştir [228]. Global DNA hipometilasyonunun akciğer kanseri için tanısal bir belirteç olarak kullanılabilmesi önerilmiştir. Ayrıca, gene özgü promotör DNA metilasyonu, erken akciğer kanseri teşhisi için güvenilir ve güçlü bir belirteç olarak ve aynı zamanda hasta prognozunu izlemek için kullanılabilmesi de bildirilmiştir [228]. Dolayısıyla doku ve vücut sıvılarındaki DNA metilasyon durumunun değerlendirildiği birçok çalışma mevcuttur. Ahrendt ve ark. çalışmalarında KHDAK hastalarından elde edilen bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinin %24'ünde *CDKN2A* promotör metilasyonu gözlemlenmiştir [88]. Tsou ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise adenokarsinomlu hastalarda *OPCML* ve *CDKN2A* genlerinde evre 1 tümör örneklerinde dahi DNA metilasyonu varlığı gösterilmiştir [235]. Leng ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise akciğer kanserli hastaların sputum nümunelerinde akciğer kanser risk değerlendirmesinde kullanmak amacıyla 31 adet genin promotör metilasyonu analiz edilmiştir [236]. Bu bağlamda erken evre akciğer kanseri tespitini sağlamak amacıyla

spesifik hedefleri belirlemek için bu hasta grubunda birçok gen açısından değerlendirilmiştir. Hsu ve ark. tarafından yürütülen çalışmada ise *FHIT*, *CDKN2A*, ve *CDH13* genlerinin promotör bölgelerinde hipermetilasyonu değerlendirmeleri sonucunda bu genlerin %73 duyarlılık ve %82 özgüllük ile akciğer kanseri riskini değerlendirmede kullanılabileceğini önermişlerdir [237]. Çalışmamızda *KIFC1* geninin metilasyon profilini araştırdık ve akciğer kanserli hastalarda invaziv/non-invaziv biyomarker olarak kullanılabileceğini değerlendirdik. Çalışma sonuçlarına göre hastalara ait tümör, eşlenik normal doku ve serum örneklerinin tamamında unmetilasyon oranı yüksek iken ; kontrol serum örneklerinde metilasyon oranı daha yüksek bulunmuştur. Akciğer kanserli hastaların serumlarında unmetile oranı %86.5 metilasyon oranı ise göre %13,5 iken ;sağlıklı kontrol serumlarında ise %73,7 oranında metilasyon %26,3 oranında unmetilasyon görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda hasta serumlarındaki *KIFC1* metilasyon oran artışının akciğer kanseri hastalarının rutin taramalarının yanında kullanılabilirliğini göstermektedir.

Dikkat çekici bir şekilde literatürde, tümör dokuları ile eşleşen plazma numunelerinin metilasyon oranlarının karşılaştırılması sonucunda %75'e varan uyumlu sonuçların elde edildiği çalışmalar mevcuttur. Belinsky ve ark. tarafından yürütülen çalışmada hem kan hem de tümör dokusunda metilasyon profilleri araştırılan *DAPK*, *GATA5*, *PAX5b*, ve *CDKN2A*' genlerinin kandaki promotör metilasyon oranının tümör dokusundakinden 0,2-0,6 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir [238]. Daha sonraki çalışmalarda ise *CDKN2A*'nın metilasyon oranlarını %22,2'den %75,7'ye kadar değiştiği gösterilmiştir [239]. Çalışmamızda akciğer kanseri tanıli hastalara ait tümör ve normal eşlenik doku ve serumları ile yaş ve cinsiyet olarak hastalarla eşleştirilmiş sağlıklı bireylere ait serum örneklerindeki metilasyon profillerinin kendi aralarında karşılaştırılmaları sonucunda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Akciğer kanserli hastaların serumlarında *KIFC1* geni %86,5(32/37) oranında unmetile iken tümör dokularında %76,3'ü(29/38), eşlenik normal dokuların %70,3'ü(26/37) ve sağlıklı kontrollere ait serumlarda ise %26,3'ünde(10/38) unmetile durum tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ). Çalışmamızda yukarıda belirtilen çalışmalara benzer şekilde tümör doku ve eşleşen plazma örneklerinde olduğu gibi hastaların tümör dokuları ile serumları arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir. Çalışmamızda gruplar arasında  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ortalamaları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ( $p=0,025$ ). Çalışmamızın bu anlamlı grup korelasyon analiz sonuçlarına göre *KIFC1* akciğer

kanseri teşhisi ve aynı zamanda prognozunu izlemede invaziv/non-invaziv bir biyomarker olarak kullanılabilceği önerildi.

Kandaki metilasyonu saptamanın klinik önemi, rutin taramanın yanında tümör ilerlemesinin değerlendirilmesini kolaylaştırmasıdır. Bununla birlikte, kan örneklerinde biyobelirteçlerin bulunması, akciğer kanserinin invaziv hale geldiğinin göstergesi kabul edildiğinden [17] ileri meteztazı yansıtmaktadır. Çalışmamızda akciğer kanseri hasta serumlarının metilasyon profili ile gradei arasında anlamlı bir ilişki bulundu ( $p=0,040$ ). Serum örneklerinde *KIFCI* metilasyon profili belirlenmiş grade 4 tanılı olan hastaların tamamında unmetilasyon görülmüştür. Bu bağlamda hastalığın grade artışı ile *KIFCI* unmetilasyon oranını arasında anlamlı bir ilişki olduğu ( $p=0,040$ ) ve bunun da akciğer tümörü evrelemesinde ve invazyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılabilceği önerildi. Ayrıca hastalara ait serum örneklerinin metilasyon profili ile <63 yaş hasta bireyler arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $p=0,046$ ). 63 yaş altı hastalarda unmetilasyon oranı %100'dür(18/18) ve bu metilasyon oranına göre anlamlı derecede yüksektir ( $p=0,046$ ). Buda akciğer kanserli hastalarda yaş ile metilasyon profilinin bağlantılı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca sağlıklı kontrollere ait serum örneklerinin metilasyon oranı %71,8(28/39) iken hasta serumlarında %12,8'dir (5/39). Bu durum da akciğer kanserli hastaların serum örnekleri ile sağlıklı kontrol serumlarındaki metilasyon profillerinin oldukça farklı olduğunu göstermektedir. Akciğer kanseri tanısında *KIFCI* geni metilasyonu araştırılarak biyobelirteç olarak kullanılabilceğini ve hasta serumlarının metilasyon profili açısından değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Akciğer kanseri için ideal DNA metilasyon markerları belirleyebilmek için tümör dokularındaki metilasyon profilinin eşlenik normal dokuya kıyasla önemli ölçüde farklı olması gerektiği bildirilmiştir [235]. Tsou ve ark. çalışmalarında akciğer adenokarsinomu için hassas ve spesifik DNA metilasyon belirteçlerinden oluşan bir panelin tanımlanması amacıyla yaptıkları çalışmada akciğer adenokarsinomu alt tipinde ve sağlıklı kontrollerde 28 genin metilasyon profillerini karşılaştırmıştır. Akciğer adenokarsinomlu hastalarda sağlıklı kontrollerden anlamlı derecede farklı olarak *OPCML*, *CDX2*, *HOXA1*, ve *CDKN2A* genlerinde hipermetilasyon durumunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise hastalara ait tümör dokularındaki *KIFCI* metilasyon durumu ile skuamöz patolojik alt tipi arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $p=0,050$ ).

Skvamöz hücreli patolojiye sahip akciğer hastalarının tümör dokusunda unmetilasyon oranı %93,75 (15/16) iken, KHAK bu oran %54,6 (6/11), ve AAD tanıli tümör dokularında ise % 62,5 (5/8) olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre *KIFC1* metilasyon profilinin skuamöz hücreli patolojiye sahip akciğer hastaları için biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Sigara kullanımı akciğer kanseri, özellikle skuamöz ve küçük hücreli akciğer kanseri ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Tüm akciğer kanserlerinin %80'den fazlası da sigaraya atfedilebilmektedir [240]. Literatürde sigara kullanımının ve akciğer kanseri ile ilişkili metilasyon değişikliklerini etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Russo ve ark. çalışmalarında bronş epitelinin %35'inde, sigara içenlerin kan örneklerinin %41'inde *DAPK* geninde hipermetilasyon durumu tespit ederken, sigara içmeyenlerin ise etkilenmemiş olduğunu tespit etmiştir. Sigara/akciğer kanseri ile ilişkili metilasyon değişikliklerinin bağlantılı olduğunu önermiştir [241]. Çalışmamızda sigara kullanımı ile metilasyon profili arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,044$ ). Metilasyon profili tespit edilebilen örnekler arasında sigara kullanan hastaların tümör dokularında unmetile oranı %85,2'dir (23/27). Bu durum ise sigara kullanımının literatürde belirtildiği şekilde akciğer kanserinde metilasyon profilini etkileyebileceğini ve bununla akciğer kanseri oluşumuna katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

DNA metilasyonu, kanserle ilişkili belirlenen ilk epigenetik belirteçtir. Tümör süpresör genlerin hipermetilasyonu, onkogenler ve retrotranspozonların hipometilasyonu tümör oluşumuna sebep olan epigenetik mekanizmalardır [26]. DNA metilasyonu hücrelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesi, mitoz bölünme esnasında sentromer stabilitesi ve kromozom ayrımı, X-kromozomu inaktivasyonu mekanizmasında [27] oldukça önemlidir. Çalışmamızda akciğer kanserli hastaların serum örneklerinde *KIFC1* genine ait ekspresyon ve metilasyon verilerinin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlılık gözlemlendi ( $p=0,042$ ). Hasta serum örneklerinde *KIFC1* gen ekspresyonu artan %62,1 (24/37) hastanın %95,8'inde (23/24) unmetilasyon gözlemlendi. Yüksek oranda unmetilasyon gözlenen hastalarda *KIFC1* gen ekspresyondaki artış oldukça dikkat çekici olup; bu gen ekspresyon artışının unmetilasyondan kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Dolayısıyla, *KIFC1*'in akciğer kanserli hastalarda onkogenik bir gen olarak önerilebileceği ve non-invaziv biyomarker olarak kullanılabilmesi düşünülebilir. Ayrıca *KIFC1* hücrelerde mitoz bölünme sırasında kromozomların taşınması sırasında iğ ipliklerinin hareketlerine

katılarak mitoz hücre bölünmesinde rol aldığı [185] ve DNA metilasyon mekanizmasının mitoz bölünme sırasında iğ ipliklerinin bağlandığı sentromer stabilitesi üzerindeki etkileri bilindiğinden [27] *KIFC1* gen ekspresyonunu malign hücrelerde metilasyon mekanizması ile kontrol edilebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda hastaların serum örneklerinde *KIFC1* genine ait ekspresyon ve metilasyon verilerinin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlılık gözlemlendi ( $p=0,042$ ). Hasta serum örneklerinde *KIFC1* gen ekspresyonu artan %62,1 (24/37) hastanın %95,8'inde (23/24) unmetilasyon gözlemlendi. Unmetilasyon gözlenen hastalardaki *KIFC1* gen ekspresyondaki artış oldukça dikkat çekici olup; bu gen ekspresyon artışının unmetilasyondan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Akciğer kanserinin erken evrede teşhisi, hasta prognozunu iyileştirmek ve son derece yüksek olan vaka sayıları ile %95'e kadar çıkabilen ölüm oranlarını azaltmak için oldukça önemlidir. Bu nedenle yüksek risk gruplarındaki bireyler ile erken evredeki akciğer kanserli hastalar için invaziv olmayan, doğru ve hızlı yöntemlere acil ihtiyaç duyulmaktadır. *KIFC1* hipometilasyon oranları tümör doku, eşlenik normal doku ve hasta serumlarında oldukça yüksek ve anlamlıdır. Bu hipometilasyon *KIFC1* genin onkogenik özelliğini göstermesine neden olarak ekspresyon artışı sağladığı varsaydığımızda elde edilen hipometilasyon verisinin ekspresyon verisi ile birlikte daha anlamlı hale geldiğini düşündürmektedir. Bu iki moleküler değişikliğin hastalığın klinik seyrinde etkili olduğunu düşündürmektedir. *KIFC1* geninin ekspresyon seviyesindeki artışın sağlıklı popülasyona göre daha fazla olduğu ve bu nedenle *KIFC1* geninin ekspresyon ve metilasyon durumlarının akciğer kanser tarama biyomarkeri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak daha yüksek hasta sayılarını içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



## 6. KAYNAKLAR

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
3. Rahib, L., et al., *Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States*. Cancer Res, 2014. **74**(11): p. 2913-21.
4. Bray, F. and B. Moller, *Predicting the future burden of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(1): p. 63-74.
5. You, J.S. and P.A. Jones, *Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?* Cancer Cell, 2012. **22**(1): p. 9-20.
6. Pass, H.I., et al., *Biomarkers and molecular testing for early detection, diagnosis, and therapeutic prediction of lung cancer*. Thorac Surg Clin, 2013. **23**(2): p. 211-24.
7. Wright, N., et al., *Kinesin Family Member C1 (KIFC1/HSET): A Potential Actionable Biomarker of Early Stage Breast Tumorigenesis and Progression of High-Risk Lesions*. J Pers Med, 2021. **11**(12).
8. Xiao, Y.X. and W.X. Yang, *KIFC1: a promising chemotherapy target for cancer treatment?* Oncotarget, 2016. **7**(30): p. 48656-48670.
9. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
10. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Istatistikleri-2017-27592>.
11. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/country-profiles/cancer/tur-2020.pdf?sfvrsn=51c9ad6a\\_2&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/country-profiles/cancer/tur-2020.pdf?sfvrsn=51c9ad6a_2&download=true).
12. Hirsch, F.R., et al., *Lung cancer: current therapies and new targeted treatments*. Lancet, 2017. **389**(10066): p. 299-311.
13. Xi, K.X., et al., *The role of plasma miRNAs in the diagnosis of pulmonary nodules*. J Thorac Dis, 2018. **10**(7): p. 4032-4041.
14. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
15. Benusiglio, P.R., et al., *Lung cancer is also a hereditary disease*. Eur Respir Rev, 2021. **30**(162).
16. Senga, S.S. and R.P. Grose, *Hallmarks of cancer-the new testament*. Open Biol, 2021. **11**(1): p. 200358.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
18. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 726-34.
19. Sandoval, J. and M. Esteller, *Cancer epigenomics: beyond genomics*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(1): p. 50-5.
20. Nebbioso, A., et al., *Cancer epigenetics: Moving forward*. PLoS Genet, 2018. **14**(6): p. e1007362.
21. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.

22. Brait, M. and D. Sidransky, *Cancer epigenetics: above and beyond*. Toxicol Mech Methods, 2011. **21**(4): p. 275-88.
23. Bird, A., *Ii2 transcription unleashed by active DNA demethylation*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 208-9.
24. Bestor, T.H., *Cloning of a mammalian DNA methyltransferase*. Gene, 1988. **74**(1): p. 9-12.
25. Costello, J.F. and C. Plass, *Methylation matters*. J Med Genet, 2001. **38**(5): p. 285-303.
26. Brzezińska, E., A. Dutkowska, and A. Antczak, *The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(1): p. 309-25.
27. Gartler, S.M. and A.D. Riggs, *Mammalian X-chromosome inactivation*. Annu Rev Genet, 1983. **17**: p. 155-90.
28. Reik, W., et al., *Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice*. Nature, 1987. **328**(6127): p. 248-51.
29. Esteller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3225-9.
30. Costello, J.F., C. Plass, and W.K. Cavenee, *Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas*. Brain Tumor Pathol, 2000. **17**(2): p. 49-56.
31. Baylin, S.B., et al., *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 687-92.
32. Bird, A., *The essentials of DNA methylation*. Cell, 1992. **70**(1): p. 5-8.
33. Belinsky, S.A., *Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer*. Carcinogenesis, 2005. **26**(9): p. 1481-7.
34. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
35. Pali, S.S. and K.D. Robertson, *Epigenetic control of tumor suppression*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2007. **17**(4): p. 295-316.
36. Merlo, A., et al., *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
37. Jacinto, F.V. and M. Esteller, *Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer*. Mutagenesis, 2007. **22**(4): p. 247-53.
38. Ehrlich, M., *DNA hypomethylation in cancer cells*. Epigenomics, 2009. **1**(2): p. 239-59.
39. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
40. Morillon, A., et al., *Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription*. Mol Cell, 2005. **18**(6): p. 723-34.
41. Yasmin, R., et al., *Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 201703.
42. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
43. Kanwal, R., K. Gupta, and S. Gupta, *Cancer epigenetics: an introduction*. Methods Mol Biol, 2015. **1238**: p. 3-25.
44. Poy, M.N., et al., *A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 226-30.
45. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.

46. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, *MicroRNAs in Cancer*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 167-79.
47. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
48. Malumbres, M., *miRNAs and cancer: an epigenetics view*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(4): p. 863-74.
49. Brueckner, B., et al., *The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1419-23.
50. Howlader, N., et al., *The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality*. N Engl J Med, 2020. **383**(7): p. 640-649.
51. Wong, S.K. and W.T. Iams, *Front Line Applications and Future Directions of Immunotherapy in Small-Cell Lung Cancer*. Cancers (Basel), 2021. **13**(3).
52. Geddes, D.M., *The natural history of lung cancer: a review based on rates of tumour growth*. Br J Dis Chest, 1979. **73**(1): p. 1-17.
53. Horn, L., M. Reck, and D.R. Spigel, *The Future of Immunotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer*. Oncologist, 2016. **21**(8): p. 910-21.
54. Nooreldeen, R. and H. Bach, *Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(16).
55. Travis, W.D., L.B. Travis, and S.S. Devesa, *Lung cancer*. Cancer, 1995. **75**(1 Suppl): p. 191-202.
56. Charles Molnar , J.G., *Chapter 20. The Respiratory System / Systems of Gas Exchange*, in *Concepts of Biology* 2015.
57. Rock, J.R., et al., *Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12771-5.
58. Desai, T.J., D.G. Brownfield, and M.A. Krasnow, *Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer*. Nature, 2014. **507**(7491): p. 190-4.
59. Braiman, A. and Z. Priel, *Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating*. Respir Physiol Neurobiol, 2008. **163**(1-3): p. 202-7.
60. Yaghi, A. and M.B. Dolovich, *Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease*. Cells, 2016. **5**(4).
61. Horvath, G. and E.J. Sorscher, *Luminal fluid tonicity regulates airway ciliary beating by altering membrane stretch and intracellular calcium*. Cell Motil Cytoskeleton, 2008. **65**(6): p. 469-75.
62. Shah, A.S., et al., *Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1131-4.
63. Park, W.Y., et al., *Ciliated adenocarcinomas of the lung: a tumor of non-terminal respiratory unit origin*. Mod Pathol, 2012. **25**(9): p. 1265-74.
64. Lu, Y.W. and Y.C. Yeh, *Ciliated Muconodular Papillary Tumors of the Lung*. Arch Pathol Lab Med, 2019. **143**(1): p. 135-139.
65. Boers, J.E., et al., *Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 758-63.
66. Branchfield, K., et al., *Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response*. Science, 2016. **351**(6274): p. 707-10.

67. Song, H., et al., *Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(43): p. 17531-6.
68. Fisseler-Eckhoff, A. and M. Demes, *Neuroendocrine tumors of the lung*. Cancers (Basel), 2012. **4**(3): p. 777-98.
69. Rokicki, W., et al., *The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases*. Kardiochir Torakochirurgia Pol, 2016. **13**(1): p. 26-30.
70. Spella, M., et al., *Club cells form lung adenocarcinomas and maintain the alveoli of adult mice*. Elife, 2019. **8**.
71. Rogers, D.F., *Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders*. Eur Respir J, 1994. **7**(9): p. 1690-706.
72. MacDermed, D.M., et al., *MUC1-associated proliferation signature predicts outcomes in lung adenocarcinoma patients*. BMC Med Genomics, 2010. **3**: p. 16.
73. Ichinokawa, H., et al., *Clinicopathological characteristics of primary lung adenocarcinoma predominantly composed of goblet cells in surgically resected cases*. Pathol Int, 2011. **61**(7): p. 423-9.
74. Tajima, S., et al., *Extensive goblet cell metaplasia of the peripheral lung may harbor precancerous molecular changes: comparison of two cases*. Pathol Int, 2014. **64**(10): p. 533-8.
75. Lee, J.H., et al., *Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis*. Cell, 2014. **156**(3): p. 440-55.
76. Kim, C.F., et al., *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer*. Cell, 2005. **121**(6): p. 823-35.
77. Dovey, J.S., et al., *Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 11857-62.
78. Mainardi, S., et al., *Identification of cancer initiating cells in K-Ras driven lung adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(1): p. 255-60.
79. Xu, X., et al., *Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(13): p. 4910-5.
80. Sainz de Aja, J., A.F.M. Dost, and C.F. Kim, *Alveolar progenitor cells and the origin of lung cancer*. J Intern Med, 2021. **289**(5): p. 629-635.
81. Cersosimo, R.J., *Lung cancer: a review*. Am J Health Syst Pharm, 2002. **59**(7): p. 611-42.
82. Hirsch, F.R., et al., *Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(1): p. 5-22.
83. Gazdar, A.F. and E. Brambilla, *Preneoplasia of lung cancer*. Cancer Biomark, 2010. **9**(1-6): p. 385-96.
84. Wistuba, II, et al., *Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma*. Oncogene, 1999. **18**(3): p. 643-50.
85. Wadowska, K., et al., *Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(13).
86. Mullauer, L., *Next generation sequencing: clinical applications in solid tumours*. Memo, 2017. **10**(4): p. 244-247.
87. Hubers, A.J., et al., *Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer*. Br J Cancer, 2013. **109**(3): p. 530-7.

88. Ahrendt, S.A., et al., *Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(4): p. 332-9.
89. Zhang, X., et al., *Application of next-generation sequencing technology to precision medicine in cancer: joint consensus of the Tumor Biomarker Committee of the Chinese Society of Clinical Oncology*. Cancer Biol Med, 2019. **16**(1): p. 189-204.
90. Kadara, H., et al., *Early Events in the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2016. **9**(7): p. 518-27.
91. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
92. Travis, W.D., et al., *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(9): p. 1243-1260.
93. Travis, W.D., *The 2015 WHO classification of lung tumors*. Pathologie, 2014. **35 Suppl 2**: p. 188.
94. *Release Notice - Canadian Cancer Statistics: A 2020 special report on lung cancer*. Health Promot Chronic Dis Prev Can, 2020. **40**(9): p. 325.
95. Bade, B.C. and C.S. Dela Cruz, *Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention*. Clin Chest Med, 2020. **41**(1): p. 1-24.
96. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2017.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf).
97. Mao, Y., et al., *Epidemiology of Lung Cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2016. **25**(3): p. 439-45.
98. Nicholson, A.G., et al., *The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015*. J Thorac Oncol, 2022. **17**(3): p. 362-387.
99. Couraud, S., et al., *Lung cancer in never smokers--a review*. Eur J Cancer, 2012. **48**(9): p. 1299-311.
100. [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/).
101. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
102. Boyer, M.J., et al., *Improved Survival of Stage I Non-Small Cell Lung Cancer: A VA Central Cancer Registry Analysis*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(12): p. 1814-1823.
103. Donington, J.S. and Y.L. Colson, *Sex and gender differences in non-small cell lung cancer*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **23**(2): p. 137-45.
104. Jeon, J., et al., *Smoking and Lung Cancer Mortality in the United States From 2015 to 2065: A Comparative Modeling Approach*. Ann Intern Med, 2018. **169**(10): p. 684-693.
105. Torre, L.A., R.L. Siegel, and A. Jemal, *Lung Cancer Statistics*. Adv Exp Med Biol, 2016. **893**: p. 1-19.
106. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
107. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
108. Peto, R., *Influence of dose and duration of smoking on lung cancer rates*. IARC Sci Publ, 1986(74): p. 23-33.
109. Janerich, D.T., et al., *Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household*. N Engl J Med, 1990. **323**(10): p. 632-6.

110. Wakelee, H.A., et al., *Lung cancer incidence in never smokers*. J Clin Oncol, 2007. **25**(5): p. 472-8.
111. Sun, S., J.H. Schiller, and A.F. Gazdar, *Lung cancer in never smokers--a different disease*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 778-90.
112. Li, J., et al., *Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer*. Clin Respir J, 2017. **11**(5): p. 539-546.
113. Raaschou-Nielsen, O., et al., *Air pollution from traffic and risk for lung cancer in three Danish cohorts*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(5): p. 1284-91.
114. Bonjour, S., et al., *Solid fuel use for household cooking: country and regional estimates for 1980-2010*. Environ Health Perspect, 2013. **121**(7): p. 784-90.
115. Pawel, D.J. and J.S. Puskin, *The U.S. Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon*. Health Phys, 2004. **87**(1): p. 68-74.
116. Alberg, A.J., et al., *Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 29S-55S.
117. Darby, S., et al., *Residential radon and lung cancer--detailed results of a collaborative analysis of individual data on 7148 persons with lung cancer and 14,208 persons without lung cancer from 13 epidemiologic studies in Europe*. Scand J Work Environ Health, 2006. **32 Suppl 1**: p. 1-83.
118. Steenland, K., et al., *Review of occupational lung carcinogens*. Am J Ind Med, 1996. **29**(5): p. 474-90.
119. Ridge, C.A., A.M. McErlean, and M.S. Ginsberg, *Epidemiology of lung cancer*. Semin Intervent Radiol, 2013. **30**(2): p. 93-8.
120. Fingerhut, M., et al., *The contribution of occupational risks to the global burden of disease: summary and next steps*. Med Lav, 2006. **97**(2): p. 313-21.
121. Spitz, M.R., et al., *An expanded risk prediction model for lung cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2008. **1**(4): p. 250-4.
122. Cassidy, A., et al., *The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer*. Br J Cancer, 2008. **98**(2): p. 270-6.
123. Matakidou, A., T. Eisen, and R.S. Houlston, *Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk*. Br J Cancer, 2005. **93**(7): p. 825-33.
124. Lindeman, N.I., et al., *Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*. J Mol Diagn, 2013. **15**(4): p. 415-53.
125. Lindeman, N.I., et al., *Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology*. J Mol Diagn, 2018. **20**(2): p. 129-159.
126. Hendee, W.R., *Estimation of radiation risks. BEIR V and its significance for medicine*. JAMA, 1992. **268**(5): p. 620-4.
127. Peto, R., et al., *Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?* Nature, 1981. **290**(5803): p. 201-8.
128. Alberg, A.J. and J.M. Samet, *Epidemiology of lung cancer*. Chest, 2003. **123**(1 Suppl): p. 21S-49S.

129. Gnagnarella, P., et al., *Carcinogenicity of High Consumption of Meat and Lung Cancer Risk Among Non-Smokers: A Comprehensive Meta-Analysis*. *Nutr Cancer*, 2018. **70**(1): p. 1-13.
130. Turner, M.C., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(3): p. 285-90.
131. Yang, P., et al., *Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk*. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(10): p. 1097-103.
132. Antoniou, K.M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: a clinical and pathogenesis update*. *Curr Opin Pulm Med*, 2015. **21**(6): p. 626-33.
133. Syrjanen, K.J., *Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix*. *Lung*, 1980. **158**(3): p. 131-42.
134. de Freitas, A.C., et al., *Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016. **142**(12): p. 2415-2427.
135. Cao, S., et al., *Divergent viral presentation among human tumors and adjacent normal tissues*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 28294.
136. Cagle, P.T., T.C. Allen, and R.J. Olsen, *Lung cancer biomarkers: present status and future developments*. *Arch Pathol Lab Med*, 2013. **137**(9): p. 1191-8.
137. Siddiqui, F., S. Vaqar, and A.H. Siddiqui, *Lung Cancer*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
138. Kadota, K., et al., *The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype*. *Mod Pathol*, 2014. **27**(5): p. 690-700.
139. Filosso, P.L., et al., *Adenosquamous lung carcinomas: a histologic subtype with poor prognosis*. *Lung Cancer*, 2011. **74**(1): p. 25-9.
140. Rajdev, K., et al., *An Unusually Aggressive Large Cell Carcinoma of the Lung: Undiagnosed until Autopsy*. *Cureus*, 2018. **10**(2): p. e2202.
141. Aisner, S.C., et al., *The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung*. *J Clin Oncol*, 1990. **8**(3): p. 402-8.
142. Lim, W., et al., *The 8(th) lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications*. *Quant Imaging Med Surg*, 2018. **8**(7): p. 709-718.
143. Kandathil, A. and R.M. Subramaniam, *FDG PET/CT for Primary Staging of Lung Cancer and Mesothelioma*. *Semin Nucl Med*, 2022.
144. Kandathil, A., et al., *Role of FDG PET/CT in the Eighth Edition of TNM Staging of Non-Small Cell Lung Cancer*. *Radiographics*, 2018. **38**(7): p. 2134-2149.
145. Hoang, T., et al., *Clinical model to predict survival in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with third-generation chemotherapy regimens based on eastern cooperative oncology group data*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(1): p. 175-83.
146. D'Angelo, S.P., et al., *Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib*. *J Thorac Oncol*, 2012. **7**(12): p. 1815-1822.
147. Usman Ali, M., et al., *Screening for lung cancer: A systematic review and meta-analysis*. *Prev Med*, 2016. **89**: p. 301-314.

148. Sobue, T., et al., *Screening for lung cancer with low-dose helical computed tomography: anti-lung cancer association project*. J Clin Oncol, 2002. **20**(4): p. 911-20.
149. Toyoda, Y., et al., *Sensitivity and specificity of lung cancer screening using chest low-dose computed tomography*. Br J Cancer, 2008. **98**(10): p. 1602-7.
150. Risse, E.K., G.P. Vooijs, and M.A. van't Hof, *Relationship between the cellular composition of sputum and the cytologic diagnosis of lung cancer*. Acta Cytol, 1987. **31**(2): p. 170-6.
151. Hirsch, F.R., et al., *Fluorescence versus white-light bronchoscopy for detection of preneoplastic lesions: a randomized study*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(18): p. 1385-91.
152. Liu, Y., et al., *Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients*. Neoplasia, 2006. **8**(1): p. 46-51.
153. Zheng, D., et al., *Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(6): p. 575-86.
154. Spira, A., et al., *Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 361-6.
155. Rotunno, M., et al., *A gene expression signature from peripheral whole blood for stage I lung adenocarcinoma*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(10): p. 1599-608.
156. Chen, X.Q., et al., *Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1033-5.
157. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 286-98.
158. Bras, A.P., et al., *Spermidine/spermine n(1)-acetyltransferase catalyzes amantadine acetylation*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(5): p. 676-80.
159. Maksymiuk, A.W., et al., *Use of amantadine as substrate for SSAT-1 activity as a reliable clinical diagnostic assay for breast and lung cancer*. Future Sci OA, 2019. **5**(2): p. FSO365.
160. Hegde, S.S., et al., *Mechanistic and structural analysis of human spermidine/spermine N1-acetyltransferase*. Biochemistry, 2007. **46**(24): p. 7187-95.
161. Pulliero, A., et al., *Extracellular vesicles in biological fluids. A biomarker of exposure to cigarette smoke and treatment with chemopreventive drugs*. J Prev Med Hyg, 2019. **60**(4): p. E327-E336.
162. Bertolini, G., et al., *Microenvironment-Modulated Metastatic CD133+/CXCR4+/EpCAM- Lung Cancer-Initiating Cells Sustain Tumor Dissemination and Correlate with Poor Prognosis*. Cancer Res, 2015. **75**(17): p. 3636-49.
163. Crequit, P., et al., *Comparative efficacy and safety of second-line treatments for advanced non-small cell lung cancer with wild-type or unknown status for epidermal growth factor receptor: a systematic review and network meta-analysis*. BMC Med, 2017. **15**(1): p. 193.
164. Molina, J.R., et al., *Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(5): p. 584-94.
165. Cagle, P.T. and L.R. Chirieac, *Advances in treatment of lung cancer with targeted therapy*. Arch Pathol Lab Med, 2012. **136**(5): p. 504-9.

166. Schuchert, M.J., et al., *Sublobar resection for early-stage lung cancer*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2010. **22**(1): p. 22-31.
167. Tammemagi, M.C., et al., *Evaluation of the lung cancer risks at which to screen ever- and never-smokers: screening rules applied to the PLCO and NLST cohorts*. *PLoS Med*, 2014. **11**(12): p. e1001764.
168. Force, U.S.P.S.T., et al., *Screening for Lung Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement*. *JAMA*, 2021. **325**(10): p. 962-970.
169. Miki, H., et al., *All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(13): p. 7004-11.
170. Fink, G., et al., *The mitotic kinesin-14 Ncd drives directional microtubule-microtubule sliding*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(6): p. 717-23.
171. Ando, A., et al., *Cloning of a new kinesin-related gene located at the centromeric end of the human MHC region*. *Immunogenetics*, 1994. **39**(3): p. 194-200.
172. DeLuca, J.G., et al., *Purification and characterization of native conventional kinesin, HSET, and CENP-E from mitotic hela cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 28014-21.
173. Dagenbach, E.M. and S.A. Endow, *A new kinesin tree*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 1): p. 3-7.
174. [www.genenames.org](http://www.genenames.org), h.
175. Friel, C.T. and J. Howard, *Coupling of kinesin ATP turnover to translocation and microtubule regulation: one engine, many machines*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2012. **33**(6): p. 377-83.
176. Shimizu, T., et al., *Comparison of the motile and enzymatic properties of two microtubule minus-end-directed motors, ncd and cytoplasmic dynein*. *Biochemistry*, 1995. **34**(5): p. 1575-82.
177. She, Z.Y. and W.X. Yang, *Molecular mechanisms of kinesin-14 motors in spindle assembly and chromosome segregation*. *J Cell Sci*, 2017. **130**(13): p. 2097-2110.
178. Wendt, T.G., et al., *Microscopic evidence for a minus-end-directed power stroke in the kinesin motor ncd*. *EMBO J*, 2002. **21**(22): p. 5969-78.
179. Zhang, Y. and A.O. Sperry, *Comparative analysis of two C-terminal kinesin motor proteins: KIFCI and KIFC5A*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2004. **58**(4): p. 213-30.
180. Olmsted, Z.T., et al., *Kinesin-14 Pkl1 targets gamma-tubulin for release from the gamma-tubulin ring complex (gamma-TuRC)*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(5): p. 842-8.
181. Rodriguez, A.S., et al., *Protein complexes at the microtubule organizing center regulate bipolar spindle assembly*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(9): p. 1246-53.
182. Wang, S.Z. and R. Adler, *Chromokinesin: a DNA-binding, kinesin-like nuclear protein*. *J Cell Biol*, 1995. **128**(5): p. 761-8.
183. Wei, Y.L. and W.X. Yang, *Kinesin-14 motor protein KIFCI participates in DNA synthesis and chromatin maintenance*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(6): p. 402.
184. Hirokawa, N., et al., *Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(10): p. 682-96.
185. Sharp, D.J., G.C. Rogers, and J.M. Scholey, *Microtubule motors in mitosis*. *Nature*, 2000. **407**(6800): p. 41-7.
186. Draviam, V.M., S. Xie, and P.K. Sorger, *Chromosome segregation and genomic stability*. *Curr Opin Genet Dev*, 2004. **14**(2): p. 120-5.

187. Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland, *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 773-85.
188. Kleylein-Sohn, J., et al., *Acentrosomal spindle organization renders cancer cells dependent on the kinesin HSET*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 22): p. 5391-402.
189. Kellogg, D.R., M. Moritz, and B.M. Alberts, *The centrosome and cellular organization*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 639-74.
190. Anderhub, S.J., A. Kramer, and B. Maier, *Centrosome amplification in tumorigenesis*. Cancer Lett, 2012. **322**(1): p. 8-17.
191. Ogden, A., P.C. Rida, and R. Aneja, *Heading off with the herd: how cancer cells might maneuver supernumerary centrosomes for directional migration*. Cancer Metastasis Rev, 2013. **32**(1-2): p. 269-87.
192. Ogden, A., P.C. Rida, and R. Aneja, *Let's huddle to prevent a muddle: centrosome declustering as an attractive anticancer strategy*. Cell Death Differ, 2012. **19**(8): p. 1255-67.
193. Pannu, V., et al., *Induction of robust de novo centrosome amplification, high-grade spindle multipolarity and metaphase catastrophe: a novel chemotherapeutic approach*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e346.
194. Ghadimi, B.M., et al., *Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **27**(2): p. 183-90.
195. Brinkley, B.R., *Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(1): p. 18-21.
196. Lingle, W.L., et al., *Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1978-83.
197. Fukasawa, K., *Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(12): p. 911-24.
198. Zasadil, L.M., et al., *Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles*. Sci Transl Med, 2014. **6**(229): p. 229ra43.
199. Kwon, M., et al., *Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes*. Genes Dev, 2008. **22**(16): p. 2189-203.
200. Basto, R., et al., *Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1032-42.
201. Ganem, N.J., S.A. Godinho, and D. Pellman, *A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 278-82.
202. Silkworth, W.T., et al., *Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6564.
203. Braun, M., et al., *The human kinesin-14 HSET tracks the tips of growing microtubules in vitro*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(9): p. 515-21.
204. Kim, N. and K. Song, *KIF11 is essential for bipolar spindle formation and genomic stability in the primary human fibroblast IMR-90 cell*. Cell Struct Funct, 2013. **38**(1): p. 21-30.
205. Pannu, V., et al., *HSET overexpression fuels tumor progression via centrosome clustering-independent mechanisms in breast cancer patients*. Oncotarget, 2015. **6**(8): p. 6076-91.
206. Weaver, L.N., et al., *The Ran-GTP gradient spatially regulates XCK2 in the spindle*. Curr Biol, 2015. **25**(11): p. 1509-14.

207. Cai, S., et al., *Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(5): p. 1348-59.
208. Mountain, V., et al., *The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(2): p. 351-66.
209. Liu, Y., et al., *The overexpression of KIFC1 was associated with the proliferation and prognosis of non-small cell lung cancer*. *J Thorac Dis*, 2016. **8**(10): p. 2911-2923.
210. Nath, S., et al., *Kif5B and Kifc1 interact and are required for motility and fission of early endocytic vesicles in mouse liver*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(5): p. 1839-49.
211. Hall, V.J., et al., *Developmental competence of human in vitro aged oocytes as host cells for nuclear transfer*. *Hum Reprod*, 2007. **22**(1): p. 52-62.
212. Yang, W.X. and A.O. Sperry, *C-terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport*. *Biol Reprod*, 2003. **69**(5): p. 1719-29.
213. Yang, W.X., H. Jefferson, and A.O. Sperry, *The molecular motor KIFC1 associates with a complex containing nucleoporin NUP62 that is regulated during development and by the small GTPase RAN*. *Biol Reprod*, 2006. **74**(4): p. 684-90.
214. Farina, F., et al., *Kinesin KIFC1 actively transports bare double-stranded DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(9): p. 4926-37.
215. Li, Y., et al., *KIFC1 is a novel potential therapeutic target for breast cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2015. **16**(9): p. 1316-22.
216. Pawar, S., et al., *KIFC1, a novel putative prognostic biomarker for ovarian adenocarcinomas: delineating protein interaction networks and signaling circuitries*. *J Ovarian Res*, 2014. **7**: p. 53.
217. Wang, X., et al., *KIFC1 promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(6): p. 5739-5746.
218. Xu, Y., et al., *Screening and Identification of Key Biomarkers for Bladder Cancer: A Study Based on TCGA and GEO Data*. *Biomed Res Int*, 2020. **2020**: p. 8283401.
219. Grinberg-Rashi, H., et al., *The expression of three genes in primary non-small cell lung cancer is associated with metastatic spread to the brain*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(5): p. 1755-61.
220. Chan, J.Y., *A clinical overview of centrosome amplification in human cancers*. *Int J Biol Sci*, 2011. **7**(8): p. 1122-44.
221. Antolin, A.A., et al., *Identification of pim kinases as novel targets for PJ34 with confounding effects in PARP biology*. *ACS Chem Biol*, 2012. **7**(12): p. 1962-7.
222. Tulin, A. and A. Spradling, *Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at Drosophila puff loci*. *Science*, 2003. **299**(5606): p. 560-2.
223. Ashworth, A. and R. Bernards, *Using functional genetics to understand breast cancer biology*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(7): p. a003327.
224. Kamath, K., et al., *BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(13): p. 12902-7.

225. Martin, S.K. and N. Kyprianou, *Exploitation of the Androgen Receptor to Overcome Taxane Resistance in Advanced Prostate Cancer*. *Adv Cancer Res*, 2015. **127**: p. 123-58.
226. Walczak, C.E., et al., *A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity*. *Curr Biol*, 1998. **8**(16): p. 903-13.
227. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
228. Mehta, A., et al., *Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy*. *Cancer Metastasis Rev*, 2015. **34**(2): p. 229-41.
229. de Sousa, V.M.L. and L. Carvalho, *Heterogeneity in Lung Cancer*. *Pathobiology*, 2018. **85**(1-2): p. 96-107.
230. Dela Cruz, C.S., L.T. Tanoue, and R.A. Matthay, *Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention*. *Clin Chest Med*, 2011. **32**(4): p. 605-44.
231. Thomas, A., et al., *Trends and Characteristics of Young Non-Small Cell Lung Cancer Patients in the United States*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 113.
232. Santarpia, M., et al., *Liquid biopsy for lung cancer early detection*. *J Thorac Dis*, 2018. **10**(Suppl 7): p. S882-S897.
233. Weber, M., et al., *Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells*. *Nat Genet*, 2005. **37**(8): p. 853-62.
234. Gordon, M.B., L. Howard, and D.A. Compton, *Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(3): p. 425-34.
235. Tsou, J.A., et al., *Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma*. *Mol Cancer*, 2007. **6**: p. 70.
236. Leng, S., et al., *Defining a gene promoter methylation signature in sputum for lung cancer risk assessment*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(12): p. 3387-95.
237. Hsu, H.S., et al., *Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma*. *Cancer*, 2007. **110**(9): p. 2019-26.
238. Belinsky, S.A., et al., *Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(8): p. 1278-83.
239. Suga, Y., et al., *Quantitative p16 and ESR1 methylation in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer*. *Oncol Rep*, 2008. **20**(5): p. 1137-42.
240. Balgkouranidou, I., T. Liloglou, and E.S. Lianidou, *Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers*. *Biomark Med*, 2013. **7**(1): p. 49-58.
241. Russo, A.L., et al., *Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(7): p. 2466-70.

**HAM VERİLER**

**FORMLAR**

**ETİK KURUL KARARI**



**PATENT HAKKI İZİNİ**



## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA KIFC1 PROTEİNİNİN EKSPRESYON VE METİLYON PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>11</b>	% <b>10</b>	% <b>2</b>	% <b>4</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>2</b>	<a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444">nek.istanbul.edu.tr:4444</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>4</b>	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://dspace.baskent.edu.tr">dspace.baskent.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://1library.net">1library.net</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<a href="http://www.sozcu.com.tr">www.sozcu.com.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

[riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)