

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

K-RAS GENİ EKSON-1 KODON 12 (G/T) VE 13 (G/A)
MUTASYONLARININ KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER
KANSERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Arş. Gör. Öznur BUCAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Etem AKBAŞ

MERSİN-2016

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

K-RAS GENİ EKSON-1 KODON 12 VE 13 MUTASYONLARININ
KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Arş. Gör. Öznur BUCAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Etem AKBAŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TTB (ÖB) 2014-3 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 297

MERSİN-2016

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı çerçevesinde yürütülmüş olan “*K-Ras* Geni Ekson-1 Kodon 12 (G/T) ve 13 (G/A) Mutasyonlarının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri İle İlişkisinin Araştırılması” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Etem AKBAŞ

Mersin Üniversitesi

Jüri Başkanı

Tez Savunma Tarihi 14/01/2016



Prof. Dr. Nurcan ARAS

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi



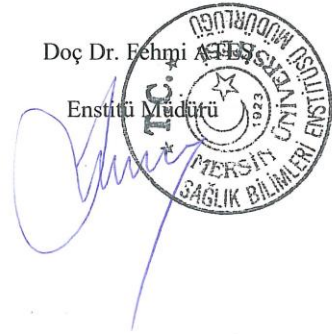
Yrd. Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Mustafa Kemal Üniversitesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 05.01.2016 tarih ve 2016/80 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Doç Dr. Fehmi AKBAŞ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, her konuda yardım ve desteğini eksik etmeyen, akademik anlamda bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Etem AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, hasta ve kontrol gruplarını temin etmemdeki rolleri ve destekleri için Sayın Uzm. Dr. Erdiç NAYIR'a, deney sonuçlarımın istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve yorumlanmasında bilgi ve katkılarını sunan Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Didem DERİCİ'ye, tezimin hazırlanmasında yardımlarını eksik etmeyen Yrd. Doç. Dr. Ebru DERİCİ EKER, Arş. Gör. Nisa UYAR ve çok değerli çalışma arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemdeki maddi ve manevi katkılarından ziyade, bir an olsun eksik etmedikleri sonsuz sevgi ve güven için güzel aileme minnet borçluyum.

Egemen ve Uygur'a...

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi	5
2.1.3. Akciğer Kanserinin Tanı ve Evrenmesi	11
2.1.4. Akciğer Kanserinin Histopatolojik Olarak Sınıflandırılması.....	12
2.1.5. Akciğer Kanserinin Moleküler Genetiği.....	15
2.2. RAS Ailesi	24
2.2.1. RAS Proteinin Yapısı.....	26
2.2.2. RAS Aktivasyonunun Moleküler Mekanizması	28
2.2.3. RAS Sinyal İletim Yolakları.....	31
2.2.4. RAS Mutasyonları	33
2.3. K-RAS (Kisten Rat Sarkoma).....	34
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	36
2.4.1. PCR'ın Temel Bileşenleri	39
2.4.2. PCR'ın Kullanım Alanları	41
2.5. Jel Elektroforez Tekniği.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	44
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	44

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	46
3.1.4. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	46
3.1.5. DNA İzolasyonu	47
3.1.6. DNA İzolasyonunda İzlenen Yol	48
3.2. Moleküler Analiz	49
3.2.1. <i>K-ras</i> Geninin Ekzon 1'deki Kodon 12 ve 13 Mutasyonunun Özgül Primerlerle Amplifikasyonu	49
3.2.2. <i>K-ras</i> Geni Ekzon 1 Kodon 12 ve 13 Mutasyonuna Ait Primerler	49
3.2.3. Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi	52
3.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	53
3.2.5. Genotiplendirme	53
3.3. İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	56
4.1. KHDAK Görülme Oranlarının Histopatolojik, Yaş ve Cinsiyet Gruplarına Göre Dağılımı	56
4.2. KHDAK Hastalarında <i>K-ras</i> Ekzon 1 Geni Kodon 12 Mutasyonuna Ait Allel ve Genotip Oranları	56
4.3. <i>K-ras</i> Ekzon 1 Geni Kodon 12 Mutasyonunun Allel ve Genotip Oranlarının Cinsiyetlere Göre Dağılımı	58
4.4. Sigara Kullanım Durumuna Göre <i>K-ras</i> Ekzon 1 Geni Kodon 12 Mutasyonlarına Ait Allel ve Genotip Dağılımları	60
4.5. KHDAK Hastalarındaki <i>K-ras</i> Ekzon 1 Geni Kodon 13 Mutasyonuna Ait Allel ve Genotip Oranları	61
4.6. <i>K-ras</i> Geni Ekzon 1 Kodon 13 Gen Mutasyonunun Allel ve Genotip Oranlarının Cinsiyetlere göre Dağılımları	63
4.7. <i>K-ras</i> Geni Ekzon 1 Kodon 13 Gen Mutasyonunun Allel ve Genotip Oranlarının Sigara Kullanım Durumuna göre Dağılımları	65
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
7. KAYNAKLAR	75
8. ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye’de erkeklerde görülen ilk on kanser türü	4
Şekil 2.2. Türkiye’de kadınlarda görülen ilk on kanser türü	5
Şekil 2.3. p53 tümör süpresör gen yolu	21
Şekil 2.4. Ras ailesi üyeleri.	26
Şekil 2.5. Ras proteinin yapısı	27
Şekil 2.6. Ras proteinlerinin post-translasyonel modifikasyon süreci	27
Şekil 2.7. Ras’ın GTP- ve GDP-bağlı durumdaki konformasyonları.....	28
Şekil 2.8. Aktif GTP ve inaktif GDP-bağlı konformasyon arasında Ras döngüsü	29
Şekil 2.9. Ras proteinin alt yolları	32
Şekil 2.10. K-ras yaban tip ve mutant tiplerin konformasyonel görüntüsü	33
Şekil 2.11. K-ras geninin 12p12.1’deki lokalizasyonu	34
Şekil 2.12. K-ras geninin yapısı	34
Şekil 2.13. PCR döngüsünün şematik gösterimi	37
Şekil 2.14. PCR aşamalarının gerçekleştiği ortalama sıcaklık değerleri	39
Şekil 3.1. K-ras genine ait kodon 12 bölgesi.....	50
Şekil 3.2. K-ras genine ait kodon 13 bölgesi.....	51
Şekil 4.1. K-ras geni ekzon 1 kodon 12 gen mutasyonuna ait genotiplerin elektroforez sonrası jel görüntüsü	57
Şekil 4.2. K-ras geni ekzon 1 kodon 13 gen mutasyonuna ait genotiplerin elektroforez sonrası jel görüntüsü	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Akciğer Kanserinin Uluslararası Evrelemesi	12
Çizelge 2.2. Malign akciğer tümörlerinde histolojik sınıflandırması	13
Çizelge 2.3. Ras mutasyon tiplerinin etkili olduğu kanser türleri	18
Çizelge 2.4. <i>K-ras</i> kodon 12 ve 13'te meydana gelen nokta mutasyonlar	35
Çizelge 3.1. <i>K-ras</i> geni kodon 12 ve kodon 13'e ait primer dizileri	50
Çizelge 3.2. <i>K-ras</i> geni kodon 12 için PCR koşulları	51
Çizelge 3.3. <i>K-ras</i> geni kodon 13 için PCR koşulları	52
Çizelge 3.4. G/T <i>K-ras</i> ekzon 1 kodon 12 bölgesi için görülen genotipler	54
Çizelge 3.5. G/A <i>K-ras</i> ekzon 1 kodon 13 bölgesi için görülen genotipler.....	54
Çizelge 4.1. <i>K-ras</i> Ekzon 1 geni kodon 12 mutasyonlarının allel ve genotip oranlarının kontrol grubu ve KHDAK'lı hastalar arasındaki dağılımı.....	57
Çizelge 4.2. Kontrol ve KHDAK'lı hasta gruplarındaki <i>K-ras</i> geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonlarının allel ve genotip sıklıklarının cinsiyete göre dağılımına ait genel bulgular.	59
Çizelge 4.3. Sigara Kullanım Durumuna Göre <i>K-ras</i> Geni Kodon 12 Mutasyonlarına Ait Allel ve Genotip Oranları	61
Çizelge 4.4. <i>K-ras</i> Ekzon 1 geni kodon 13 mutasyonlarının allel ve genotip oranlarının kontrol grubu ve KHDAK'lı hastalar arasındaki dağılımı.....	63
Çizelge 4.5. Kontrol ve KHDAK'lı hasta gruplarındaki <i>K-ras</i> geni ekzon 1 kodon 13 gen mutasyonlarının allel ve genotip sıklıklarının cinsiyete göre dağılımına ait genel bulgular..	64
Çizelge 4.6. <i>K-ras</i> Geni Kodon 13 Mutasyonlarına Ait Allel ve Genotip Oranlarının Sigara Kullanım Durumuna Göre dağılımı..	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	: Amerika Birleşik Kanser Komitesi
BAX	: BCL2-ile ilişkili X
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EBV	: Epstein Barr virus
EGF	: Epidermal büyüme faktör
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
EtBr	: Etidyum Bromür
GADD45	: Growth Arrest and DNA Damage 45
GAP	: GTPaz etkinleştirici protein
GDP	: Guanozin difosfat
GEF	: Guanin-nükleotid değiştirme faktörü
GTP	: Guanozin trifosfat
HRAS	: Harvey rat sarkoma viral onkogen homoloğu
HPV	: Human Papilloma Virus
hMPV	: Human Metapneumovirus
KETEM	: Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
K-RAS	: Kirsten rat sarkoma viral onkogene homoloğu
MDM2	: Murine Double Minute Oncogene 2
ml	: Mililitre
NF1	: Nörofibrinomatosis 1
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-kinaz
RAS	: Rat sarkoma
Rb	: Retinoblastoma
RFLP	: Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi

Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SH2	: Src Homoloji 2
SV-40	: Simian Virus-40
TGF-α	: Transforme edici büyüme faktörü
TKI	:Tirozin kinaz inhibitörü
UICC	: Uluslararası Kansere Mücadele Birliği
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
μl	: Mikrolitre

ÖZET

***K-ras* Geni Ekson-1 Kodon 12 Ve 13 Mutasyonlarının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri İle İlişkisinin Araştırılması**

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) dünyada ve ülkemizde kadınlarda ve erkeklerde ölümle sonuçlanan en yaygın kanser türlerindendir. Çalışmamızın temel amacı; KHDAK'ne yakalanmada *K-ras* geninin kodon 12 (G/T) ve kodon 13'teki (G/A) mutasyonlarının olası ilişkisinin belirlenmesidir. Ayrıca; KHDAK'ne yakalanmada diğer risk faktörlerinden ileri yaş, cinsiyet ve sigara kullanımının KHDAK'ne yakalanmaya bağımsız ve söz konusu mutasyonlarla kombine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Örneklem hacmimiz; Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı konmuş yaş ortalaması 60,16 olan 90 KHDAK'lı hasta ve yaş ortalaması 58,04 olan 96 kontrol grubu olmak üzere toplam 186 bireyden oluşturulmuştur. Kontrol ve hasta grubundaki bireylerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış ve genotipler PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

K-ras geni kodon 12 (G/T) ve kodon 13 (G/A) gen mutasyonuna ait allel ve genotip oranlarının KHDAK'ne yakalanmada bir risk faktörü olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Diğer risk faktörlerden ileri yaş, sigara kullanımı ve erkek cinsiyetin KHDAK'ne yakalanmada önemli bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, *K-ras* mutasyonu, PCR-RFLP

ABSTRACT

The Investigation of *K-ras* Gene Codon 12 and Codon 13 Mutation in NSCLC Patients

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the most common causes of death due to cancer in both men and women throughout the world. In this study, it was aimed to determine the frequency of *K-ras* mutations in codon 12 (G/T) and 13 (G/A), and the relation between the *K-ras* mutation characteristics including the age, gender, histopathological subtype and smoking in patients with NSCLC.

Our study, for Mersin population, is composed of 186 people 90 of whom are diagnosed to be NSCLC and whose average age is 60,16; and 96 healthy people whose average age is 58,04 individuals at Mersin University Medical Faculty Hospital. DNA isolation of control and patients' blood was performed and genotypes of samples were identified by PCR-RFLP method.

It is identified that there is a relationship between the allele and genotype relation that belongs to *K-ras* gene codon 12 (G/T) and codon 13 (G/A) mutations are risk factors in being caught to NSCLC ($p<0,001$). The other factors that are thought to increase the probability of being caught to NSCLC such as age, male gender and smoking.

Key words: Non-small cell lung cancer, *K-ras* mutation, PCR-RFLP

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu çevredeki dokulara ya da organlara yayılmaları ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre tüm dünyada akciğer kanseri ölümle sonuçlanan kanser türleri arasında erkeklerde birinci, kadınlarda ise ikinci sıradadır. Akciğer kanseri tüm kanser vakalarının %14,9' unu oluşturur. Kanser ölümleri arasında % 28,6'lık oranı kapsar ve 161.840 ölüm oranı ile en başta gelen ölüm nedenidir (1).

Akciğer kanserinin en büyük sebebi sigara olmakla beraber akciğer kanserlilerin % 15'e ulaşan bir oranı da sigara içmeyenlerden oluşmaktadır. Akciğer kanseri, içinde genetik faktörlerinde bulunduğu birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalık olmakla beraber; radon gazı, asbest ve hava kirliliği gibi faktörler kanser oluşumunda önemli derecede risk oluşturmaktadır (2). Akciğer kanserinin görülme oranı yaşla birlikte artar ve genelde bu kanser 50-70 yaş aralığında görülür (3). Akciğer kanserinin erken evrelerinde beş yıllık sağ kalımı % 60-70 iken, ileri evre olgularda bu oran % 5'in altına düşmektedir. Bütün alt tipler ve evreler göz önüne alındığında, tedavi ile beş yıllık sağ kalım oranı %14'tür (4).

K-ras gen mutasyonlarının akciğer kanser gelişimi sürecindeki rolleri, hastalara uygulanacak tedavi protokollerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Birçok çalışmanın da hala ana hedeflerinden biri olmaya devam etmektedir. *K-ras* gen mutasyonlarının büyük bir çoğunluğu 12. ve 13. kodonlarda ve küçük bir kısmı da 61. kodonla ilgilidir. (5). *K-ras* geninin kodon 12 ve 13'te yer alan mutasyonları 'hotspot' bölgeler olarak adlandırılmakta ve MAPK sinyal yolağını uyarmaları açısından da son derece önemlidirler. *Ras* gen ailesine ait mutasyon sıklığı kanser türlerine göre değişmekle ve tüm kanserlerin yaklaşık %30'unda *Ras* geni nokta mutasyonu görülmektedir. Ancak bu mutasyonlar sıklıkla *K-ras* geninde oluşmaktadır (6). KHDAK'lıların %20-30'unda *K-ras* gen mutasyonu meydana gelmekte ve bu nokta mutasyonlar *K-ras* genine ait spesifik kodonlarda yer almaktadırlar. Bu nokta mutasyonlar genellikle ekzon 1'deki 12. ve 13. kodonda, nadir olarak da ekzon 2'deki 59. ve 61. kodonlarda oluşmaktadır (5-7). KHDAK'larda *K-ras* gen mutasyonlarının % 95 ten fazlası kodon 12 ve 13' te görülmektedir (8). *K-ras* geninin kodonlarında

meydana gelen nokta mutasyonlar sonucu, eksprese olan *K-ras* proteinin konformasyonu değişir ve protein anormal şekilde GTPaz aktivitesi gösterir. Bu aktivite sonucunda, sürekli aktif formda bulunan protein, hücresel proliferasyon için sürekli uyarım yapar (5,6). *K-ras* gen mutasyon oranları histolojik alt tipler için değerlendirildiğinde genel olarak, adenokarsinom için %22-34, skuamöz hücreli karsinomu için %0-25, büyük hücreli karsinom için %8-33 ve adenoskuamöz karsinom için %8-11 aralığında değişmekte olduğu rapor edilmiştir (9). Akciğer kanseri ve birçok kanser türünde, sıklıkla *Ras* gen ailesinin üyelerinde nokta mutasyonları gözlemlenmektedir. *K-ras* geni kodon 12’de genellikle G→T ve G→A tek nükleotid değişimi ile karakterize olan nokta mutasyonlarında lokalizedir (10). *K-ras* geninde kodon 12’de oluşan G→T transversiyonu (GGT→TGT), Glisin aminoasidinin yerine Sistein aminoasidinin gelmesiyle sonuçlanır. Hem kodon 12 hem de kodon 13’n ilk bazında meydana gelen nokta mutasyonu sonucu meydana gelen G→A transisyonu, Glisin aminoasidinin yerine Serin aminoasitinin meydana gelmesiyle ve her iki kodonun ikinci bazındaki G→A transisyonu ise, Glisin aminoasidi yerine Aspartat aminoasidinin gelmesiyle sonuçlanır (11). *K-ras* proteini özellikle, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ve tirozin kinaz reseptör yolağının merkezi arabulucusu olarak görev yapar. *K-ras* proteininin GTPaz aktivite kaybına neden olan *K-ras* gen mutasyonları, daima *K-ras* sinyal yolağının aktif kalmasına sebep olur. Hücre proliferasyonundaki bu etkileri sebebiyle, *K-ras* gen mutasyonları kanser oluşumu ve tümör progresyonunda rol oynamaktadır. Aynı zamanda *K-ras* gen mutasyonları, Tirozin Kinaz İnhibitörleri’ne (TKI) karşı direncin biyolojik belirteci yani marker olarak da değerlendirilmektedirler. EGFR inhibitörleri olan gefitinib ve erlotinib ile yapılan tedavide *K-ras* gen mutasyonlu hastaların bu inhibitörlere karşı cevapsız kaldıkları bilinmektedir. Bu nedenle, *K-ras* gen mutasyonlarının belirlenmesi, TKI ve EGFR inhibitörlerinin kullanılacağı bireylerde, tedavi stratejisinin oluşturulması bakımından önemli etkiler sağlamaktadır.

Çalışmamızda ncelikli olarak KHDAK hastalarımızın histolojik doku tiplerine göre oransal dağılımı ve KHDAK’ne yakalanmada diğer risk faktörlerinden ileri yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı durumlarına bakılmıştır. Çalışmamızın gerçek kapsamında ise; KHDAK hastalarında, *K-ras* geninin 1. ekzondaki kodon 12 ve kodon 13 mutasyon sıklığı ve KHDAK’ne yakalanmada olası etkileri ve diğer risk faktörlerinden cinsiyet, ileri yaş ve sigara kullanımıyla kombine etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri dünyada yaygın olarak görülen kanser türlerinden biri olup kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebebi olarak bilinmektedir. Yirminci yüzyılın başlarında nadir bir hastalık olarak görülürken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmıştır (12).

Gelişmiş ülkelerdeki insidansı ve mortalite oranı yüksek seyrederken bu insidans Afrika'da daha düşük oranlarda görülmektedir. Akciğer kanserine yönelik ilk epidemiyolojik çalışmalar 1940'lı yıllarda ABD ve Avrupa ülkelerinde yapılmıştır ve 1950'li yılların başlarında ABD, Britanya ve Nazi Almanyası'nda yapılan çalışmalarla akciğer kanseri ile sigara ilişkisi ilk defa ortaya konmuştur (13-14). Sigara kullanımı akciğer kanserinin en önemli ve önlenabilir sebebi olarak gösterilmekle beraber, pasif sigara içiciliğinin de akciğer kanserine daha çok neden olabileceği ortaya konmuştur (15,16).

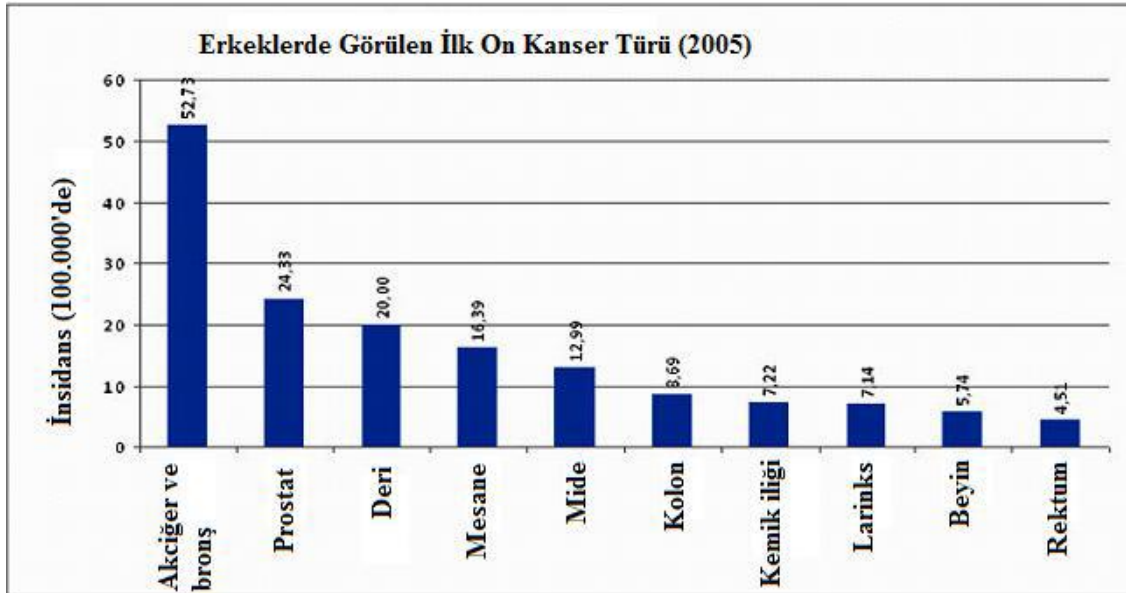
Sigara içenlerde akciğer kanserindeki ölüm riski hiç içmemiş kişilere göre yaklaşık 20 kat artış göstermektedir. Günlük 20 adet sigara tüketiminin akciğer kanseri riskini 22 kat, 41 adet günlük sigara tüketimi ise akciğer kanseri riskini 45 kat artırdığı ifade edilmektedir (17,18). Günlük sigara tüketiminin yanında sigaraya başlama yaşının da akciğer kanseri insidansında önemli bir faktör grubu oluşturmaktadır. Yirmi yaşından önce sigaraya başlamanın yanı sıra sigaraya maruziyet süresinin de artışına bağlı olarak yaklaşık 2 kat akciğer kanseri riski taşıdığı rapor edilmektedir (19).

Uluslararası Kanser Ajansının 2012 yılı için yayınladığı yeni kanser tahminlerine göre, toplam 184 ülke ve 28 kanser tipi için dünyada yeni tanı alan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler bir önceki tahminlere göre daha çok artmıştır. GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünyada en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mideden (%8,8) gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda,

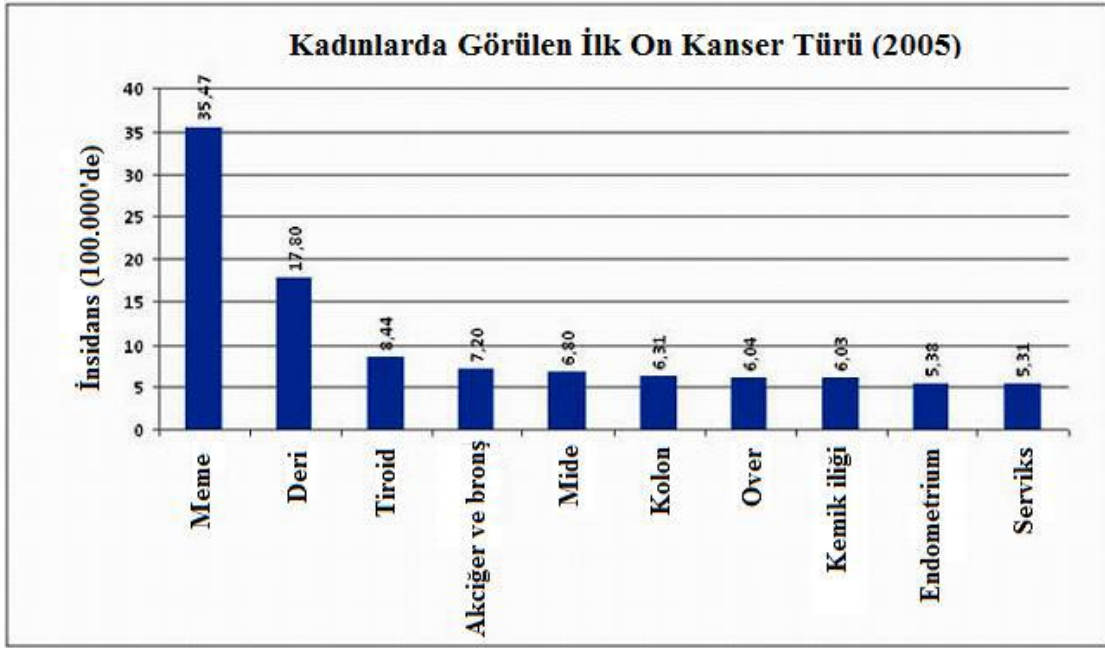
dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Gerek kanser vakalarının (%56,8) gerekse de kanserden kaynaklanan ölümlerin (%64,9) yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu gösterilmiştir (20).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre akciğer kanseri sıklığı batı ve güney bölgelerimizde en yüksek oran (Akdeniz 41.0/100.000, Ege ve İç Anadolu 39.5/100.000) en düşük oran ise Güneydoğu ve Doğu bölgelerimizde (17.7/100.000 ve 11.7/100.000) gösterilmiştir. Günümüzde dünyada karşılaşılan en sık kanser türü olan akciğer kanserinin yıllık yeni olgu sayısının bir milyondan fazla olduğu rapor edilmiştir. Bu rakam tüm yeni kanser olgularının %12.8' dir ve her yıl bu oran %3 artmaktadır (21).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı, Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi'nin (KETEM) 2009 yılındaki 'Türkiye Kanser İstatistikleri'ne göre, en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, deri, mesane, mide, kolon, kemik iliği, larinks, beyin, rektum kanserleri olmakla birlikte kadınlarda meme, deri, tiroid, akciğer, mide, kolon, over, kemik iliği, endometrium, serviks kanserleri olarak sıralanmıştır.



Şekil 2.1. Türkiye’de erkeklerde görülen ilk on kanser türü (4)



Şekil 2.2. Türkiye’de kadınlarda görülen ilk on kanser türü (4)

2.1.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinin Etiyolojisi

Mortalitesi oldukça yüksek olan akciğer kanser türünde dünya genelinde sigara kullanma alışkanlıklarındaki değişmeye bağlı olarak alt tiplerinde ve kadınlarda görülme oranlarında bazı değişimler olmuştur. Akciğer kanserinin en sık nedeni uzun süreli olarak tütün dumanına maruz kalmanın yanısıra, tüm akciğer kanserli hastaların %15'e ulaşan bir oranı sigara içmeyen gruplardan oluşmaktadır. Akciğer kanseri birçok sebebe bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir:

- A. Sigara
- B. Genetik Faktörler
- C. Diğer Faktörler
 - Meslek
 - Radyasyon
 - Asbest
 - Hava Kirliliği
 - Viral Enfeksiyonlar
 - Diyet
 - Yaş ve Cinsiyet

2.1.2.1. Sigara

1950 yılında Doll ve Hill tarafından ilk kez akciğer kanseri ve sigara arasındaki ilişki tespit edildikten birkaç ay sonra da Wynder ve Graham tarafından ortaya konmuştur (22). Bu bulgular sigara içenlerin akciğer kanserindeki ölüm riskleri hiç içmemiş kişilere göre yaklaşık 20 kat daha fazla artış göstermektedir. Günlük 20 adet sigara tüketiminin akciğer kanseri hastalığı riskini 22 kat, 41 adet günlük sigara tüketimi ise akciğer kanseri riskini 45 kat artırdığı ifade edilmektedir (23). Günlük sigara tüketiminin yanısıra sigaraya başlama yaşı da akciğer kanseri insidansında önemli bir etkidir. 20 yaşından önce sigaraya başlamanın toplam sigara maruziyet süresinin de artışına bağlı olarak yaklaşık 2 kat akciğer kanseri riski taşıdığı rapor edilmektedir (24).

Akciğer kanserli hastalarının dörtte birinin sigara içme öyküsü bulunmayan bireylerde ortaya çıkması, pasif sigara içiciliğinin akciğer kanser oluşumunda önemli bir risk faktörü olabileceğini göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, pasif sigara içen kişilerde akciğer kanser oluşum riskinin 3.5 kat arttığı belirtilmiştir. Ayrıca dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunduran sigarada 60'dan fazla kimyasal maddenin, radyoaktif özellikte olan radon, kurşun, bizmut ve polonyumun karsinojen oldukları kanıtlanmıştır (25). Bunun yanısıra sigara içme süresi, içilen sigara sayısı, içilen sigara tipi, sigaraya başlama yaşı, sigaranın filtresiz olması ve yoğun katran içermesi akciğer kanseri oluşumunu önemli derecede etkileyen risk faktörleri içerisinde (2).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, ulusal mortalite oranları ile sigara içimi arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermektedir. Puro ve pipo içiminin de akciğer kanseri gelişiminde rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Sigara içmeye devam edenler ile sigarayı bırakmış olan bireyler karşılaştırıldığında sigarayı bırakmış olan kişilerde akciğer kanseri gelişme riski azalmaktadır. Sigaranın bırakılma süresi 40 yılı aşan kişilerde bile hiç sigara içmemiş olanlara göre risk daha yüksektir. Yapılan çalışmalara göre; cinsiyet ve kullanılan tütün tipi göz önünde bulundurulmaksızın sigaranın bırakılması akciğer kanseri gelişme riskini azaltmaktadır, bu riskin azalması akciğer kanserinin tüm histolojik doku tipleri için geçerlidir (26).

Karsinojenler büyük ölçüde partikül fazındadır. Sigara dumanında bulunan başlıca karsinojenler; polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozaminler, piridin alkaloidler ve radyoaktif bileşenlerdir. Bunlardan en iyi bilinen, en güçlü ve en mutajen

olanı nitrozamin 4-(metilnitrozamin)-1-(3 piridil)-1- butanon (NNK) karsinojenidir (27). Bu karsinojen, tütünün yanması sonucu ortaya çıkarak sigara kullanıcısı tarafından teneffüs edilen bileşen, cm^3 'te 1.3×10 partikül ve gaz fazındaki serbest radikalleri içermektedir (28). Sigaranın ucunda tüten dumanın içeriği, teneffüs edilen ana dumandan farklı olup karbonmonoksit, amonyum, formaldehit, benzen, nikotin ve akrolein gibi pek çok mutajenik madde içermektedir. Sigara, karsinojenik etkisini, içermiş olduğu kanserojenlerin DNA'ya ulaşması ile DNA'da oluşan hatalı kodlamanın mutasyona yol açması ile gösterir. Sigarada bulunan bu karsinojenler doğrudan DNA hasarı oluşturabilir veya enzimler aracılığı ile aktif metabolitlere dönüşerek etki gösterebilirler. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) dokuda ilk etapta fenol, dihidrodiol, merkaptürik asite dönüşürler. Ara metabolitler olan dioller ve fenol epoksitler, PAH'ın başlıca metabolitleri olup hücredeki makromoleküller ile kovalent bağlar oluşturarak DNA komplekslerini oluştururlar ve oluşan bu moleküllerin oranı, karsinojenik aktivite ile orantılıdır. Bu kompleksler oluşuktan sonra, DNA'da nokta mutasyonlara ve eş zamanlı olmayan DNA replikasyonlarına neden olarak gen amplifikasyonuna ve bunun sonucunda malign transformasyona yol açarlar. Komplekslerin eliminasyonu, DNA tamirine, kimyasal kararsızlığa ve hücre bölünmesi ile ilgili olan işlemlere bağlıdır (29).

2.1.2.2. Diyet

Akciğer kanseri ve diyet ve ile ilgili çalışmalar özellikle son 30 yıldaki araştırmalara dayanmaktadır. Araştırmacılar, akciğer kanseri riskinin azaltılmasında diyetin olası rolü konusunda özellikle antikanserojen aktivite gösterebilen spesifik mikrobeseinler üzerine yoğunlaşmışlardır. Bu araştırmalar yüksek antioksidan içerikli besinlerin oksidatif DNA hasarını azaltabileceği ve bu yolla da antikanserojen etki gösterebileceği hipotezine odaklıdır (30). Antioksidan, mikrobeseinlerin diyetteki 7 temel kaynağı olan sebze ve meyvelerdir. Yapılan hasta, kontrol ve prospektif kohort çalışmaları, diyetleri süresince yüksek miktarda sebze ve meyve tüketen bireylerin, düşük miktarda tüketenlere göre akciğer kanseri riskinin daha az olma eğiliminde olduğu rapor edilmiştir (31). Yapılan çalışmalarda akciğer kanseri ile β -karotenler arasında çok güçlü, C vitamini için ise az kanıt olmakla beraber koruyucu bir ilişki

olduğu saptanmıştır (32). Ayrıca sigara içen bireylerde diyetel antioksidan konsantrasyonlarının düşük olma eğilimlerinin oldukları belirtilmiştir.

2.1.2.3. Hava Kirliliği

Hava kirliliği faktörü akciğer kanserlerinin % 1 kadarından sorumlu tutulmaktadır. Yapılan bir çalışmada benzopiren ve SO₂ gibi maddelere maruz kalan farelerde akciğer kanserinin geliştiği rapor edilmiştir. Aromatik hidrokarbonların çok yoğun olduğu bölgelerde akciğer kanseri olguları daha fazla artaya çıkmaktadır. Havada bulunan düşük konsantrasyonlardaki karsinojenler akciğer kanseri riskini arttırabilir. Endüstriyel alanlardaki hava kirliliği akciğer kanseri riskinin daha fazla görülmesinde etkilidir. Fosil yakıtların yakılması ile ortaya çıkan poliaromatik hidrokarbonlar, arsenik, nikel, krom, kömür dumanı, egzoz dumanı havayı kirleten önemli karsinojen etkenler arasında sayılabilir (31).

Akciğer kanseri riskinin, çeşitli polisiklik aromatik hidrokarbon bileşikleri bakımından yoğun hava kirliliğinin olduğu bölgelerde daha yüksek sıklıkta gözlenmesi, bu bileşiklerin akciğer kanser oluşumunda rol oynayabildiklerini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada Avrupa şehirlerinde hava kirliliğinin akciğer kanser oluşumunda %11 oranında etki oluşturduğunu göstermişlerdir (25).

2.1.2.4. Meslek Koşulları

Mesleki maruziyetten kaynaklanan kanserler arasında akciğer kanseri en sık görülenidir. Akciğer kanserinin çok sayıda meslek alanında etki oluşturduğu gözlenmiştir. Özellikle katran ve is içeren ortamlarda çalışan işçilerde bu risk oldukça fazladır. Arsenik, krom, nikel gibi çok sayıda metaller, mesleki maruziyet durumunu arttıran risk grubuna girmektedir (33). Yapılan birçok hasta kontrol çalışmasında kanserojen maddelerle bağlantılı olarak iş ve sosyal hayatında mesleki maruziyeti bulunan kişilerde, akciğer kanseri risk oranının ortalama %9-15 olduğu saptanmıştır (34).

2.1.2.5. Radyasyon

Yüksek doz radyasyona maruz kalmış örneklemelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, akciğer kanserinin iyonize radyasyonlar sonucu ortaya çıkan kanserlerden

biri olduğu rapor edilmiştir. Radon, uranyumun radyuma dönüşümü sürecinde doğal olarak ortaya çıkan renksiz, kokusuz ve radyoaktif bir gazdır. Radondan salınan α partikülleri 8 solunum epitel hücrelerinde DNA hasarına yol açabilme özelliğindedir. Epidemiyolojik çalışmalarda uranyum madeni işçilerinde akciğer kanserinin meydana geldiği gösterilmiştir. Bu risk geçen yüzyıl için oldukça yüksek olup, günümüzde alınan önlemler nedeniyle azalmasına rağmen hala devam etmektedir. Sigara içimi, radon dönüşüm ürünleri ile sinerjistik olarak akciğer kanseri riskini oluşturmada etkilidir (35,36)

2.1.2.6. Asbest

Mesleki bir karsinogen olan asbestin etkisi asbest liflerinin inhalasyonuna yol açmakta bu da akciğer kanseri gelişimine olanak sağlamaktadır. Asbestle ilişkili olarak yapılan çalışmalarda İngiltere'deki tekstil işçilerinde akciğer kanseri riski 10 kat artarken; ABD'deki izolasyon işçilerinde akciğer kanser riski 7 kat arttığı rapor edilmiştir (37). İnsan karsinogenlerinden kristallin, silis ve krizotil en iyi bilinenler asbestler arasındadır. Silis tozu ve asbeste maruz kalmak, akciğer kanserinin oluşumu için yüksek risk grubuna girmektedir (38). Buna benzer olarak, uranyum madenlerinde ve nükleer alanına maruz kalan işçiler, bu radyoaktif maddeler nedeniyle akciğer kanseri için daha fazla riske sahip olmaktadır (25).

2.1.2.7. Viral Enfeksiyonlar

Akciğer kanseri etiyolojisinde, Human Papilloma Virus (HPV), Epstein Barr virus (EBV) ve Simian Virus-40 (SV-40) tümör geliştirme kapasitesi kanıtlanmış virüslerdir. Genel özellikleri epiteliotropizm olan bu virüsler, tipe özgü olarak benign ya da malign proliferasyonlara sebep olabilirler. İlk kez 2001 yılında, solunum yolu enfeksiyonuna sahip kişilerden alınan solunum yolu örneklerinden izole edilen human metapneumovirus (hMPV); küçük çocuklar, yaşlılar ve immün yetmezliğine sahip hastalarda solunum yolu hastalıklarına yol açan yeni bir virüstür. Bu virüsün en az 50 yıldır toplumda var olduğu düşünülmektedir. Akciğer kanserli hastalar genellikle ileri yaş, yoğun sigara kullanımı ve immün yetmezliğine sahip olgulardır ve çoğunlukla ileri evrelerde tanısı konulmaktadır. Bu sebeple akciğer kanseri, hMPV enfeksiyonu açısından risk grubu olarak görülmektedir (39,40).

2.1.2.8. Yaş ve Cinsiyet

Akciğer kanserinin görülme insidansı yaş ilerledikçe artar. KHDAK hastaları genellikle 50-70 yaş grubu arasındadır. Tanı koyma yaşı ortalama 60 civarlarındadır ancak, hastaların % 3'ü 40 yaş altındaki genç gruplarını da kapsayabilmektedir. Ülkemizdeki olguların ortalama yaş ortalaması ise 58.4'tür (2). Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü'nün 2008 yılında yayınladığı verilerine göre akciğer kanseri dünyada erkeklerde en çok görülen kanser grubu iken, kadınlarda başta meme kanseri olmak üzere sırasıyla kolorektal ve serviks kanserinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın tüm sağlık kuruluşlarında tanı alan kanser hastalarının kaydının yapıldığı, kanser kayıt sistemi verilerine göre akciğer kanserinin görülme insidansı 5/100.000 olarak değerlendirilmektedir. Tüm akciğer kanseri hastalarının sadece % 15'i tanı konulduktan sonra 5 yıl ve bundan daha fazla yaşayabilmektedir (41).

2.1.2.9. Irk ve Genetik Faktörler

Etnik yapı, coğrafi ve irksal farklılıklar akciğer kanserinde de önemli bir etki oluşturmaktadır. Örneğin; Afrika kökenli Amerikalı erkeklerin akciğer kanseri riski karşılaştırıldığında, diğer gruplardan belirgin şekilde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde Afrika kökenli Amerikalıların 5 yıllık sağkalım süresi beyaz kökenli Amerikalılara göre % 13 daha düşük ve mortalite oranı daha yüksek gözlenmiştir (42).

Genetik faktörlerin de akciğer kanseri oluşumundaki risk faktörleri araştırılmış ve birinci derece akrabalarında kanser olan kişilerin akciğer kanseri riskinin 2.4 kat arttığı bulunmuştur. Sigara dumanında yoğun olarak bulunan ve polisiklik hidrokarbonları aktif karsinogenlere çeviren bir enzim olan aril hidrokarbon hidroksilaz enzimi yüksek aktivite gösteren kişilerde bulunduğu risk artmaktadır. Hücre proliferasyonu işlevleri ile ilgili olan bazı genlerde radyasyon, kimyasal maddeler ve virüsler gibi dış etkenler sonucu meydana gelen değişiklikler onkogenlerin oluşmasında önemlidir ve bu da karsinogeneze oldukça etkilidir. Bu onkogenlerin en önemli grupları arasında 'myc' (*C-myc*, *L-myc*, *N-myc*) ve 'ras' (*K-ras*, *H-ras*, *N-ras*) aileleri bulunmaktadır. Buna karşılık retinoblastom (*Rb*) ve *p53* geni gibi bazı tümör supresör genlerinde de meydana gelen mutasyonlar kanser hastalarında tespit edilmiştir. Sigarada polisiklik aromatik hidrokarbonların DNA bağlarını parçalaması sonucunda DNA'nın

tamir, apoptoz ve hücre döngüsünü düzenleyen *p53* geninde mutasyonlar meydana gelmektedir. *p53* geninin akciğer kanseri hastalarında yaklaşık % 50-70 oranında defektli olduğu bulunmuştur (2).

2.1.3. Akciğer Kanserinin Tanı ve Evrenlenmesi

Akciğer kanserinin patolojik tanı ve evrenlenmesinde kullanılan tanı yöntemleri; primer tümör ve metastaz bölgesine yönelik yöntemler olmak üzere iki grupta toplanabilir. Balgam sitolojisi, fiberoptik bronkoskopi ve transtorasik iğne aspirasyonu primer tümöre yönelik esas tanısal yöntemler olup; torasentez, kapalı plevra biyopsisi, torakoskopi, lenf bezi ve cilt biyopsisi ise metastatik lezyona yönelik tanısal girişimler olarak gruplandırılabilir (43,44).

Hastalığın tanısı ile klinik evrenin aynı zamanda belirlenmesi, uygun tedavi koşullarının oluşturulmasında ve hastalığın prognozu hakkında tahmin yapılmasında son derece önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda evreleme sayesinde, kanserin belirli tiplerine sahip hastalar hakkında ortak bir terminoloji elde edilmektedir. Akciğer kanserinin evrelendirilme süreci için TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Mücadele Birliği (UICC)'nin tanımlamasına göre, TNM evreleme sisteminde T: Primer tümörü, N: Bölgesel lenf nodu tutulumu, M: Uzak metastaz durumu olarak isimlendirilmektedir. Bu esas evreleme kriterleri, belli aralıklarla düzenlenip yenilenmekte ve öneri olarak yayınlanmaktadır. En son değişiklik önerilerinin yer aldığı evreleme kriterleri çizelge 2.1'de ayrıntılı olarak yer almaktadır (45).

Çizelge 2.1. Akciğer Kanserinin Uluslararası Evrelemesi (TNM evreleme ve klinik evre) (45)

Evre	T	N	M
Gizli karsinom	Tx	N0	M0
0	Tis	N0	M0
I			
IA	T1a, T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
II			
IIA	T1a, T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
III			
IIIA	T1-3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	T1-4	N3	M0
IV	T'lerden biri	N'lerden biri	M1a
	T'lerden biri	N'lerden biri	M1b

2.1.4. Akciğer Kanserinin Histopatolojik Olarak Sınıflandırılması

Akciğer kanseri, ilk tanısını vermeden önce uzun süreç gerektiren kompleks ve çok basamaklı histopatolojik olayların sonucunda ortaya çıkmaktadır ve bu durum kanserler arasındaki tanılama, sınıflama ve erken evredeki değişiklikleri açıklamaktadır. Akciğer kanseri tümörlerinin histopatolojik sınıflandırılması ışık mikroskobu görüntüleri ve standart histopatolojik boyama standartlarına göre yapılmaktadır. WHO'nun akciğer kanseri sınıflamasına göre akciğer tümörleri 2 ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'dir (46). WHO'nun 2004 yılında yaptığı ayrıntılı histopatolojik sınıflandırma Çizelge 2.2.'de ayrıntılı olarak yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Malign akciğer tümörlerinde histolojik sınıflandırma

Skvamöz hücreli karsinom	-Papiller -Berrak hücreli -Küçük hücreli -Bazaloid
Küçük hücreli karsinom	-Kombine küçük hücreli karsinom
Adenokarsinom	-Adenokarsinom, mikst subtip -Asiner adenokarsinom -Papiller adenokarsinom -Bronkoalveoler karsinom -Müsinöz -Nonmüsinöz -Mikst -Müsin salgılayan solid adenokarsinom -Fetal -Kolloid -Müsinöz kistadenokarsinom -Taşlı yüzük adenokarsinom -Berrak hücreli adenokarsinom
Büyük hücreli (BH) karsinom	-BH Nöroendokrin karsinom -BH Kombine nöroendokrin karsinom -Bazaloid karsinom -Lenfoepitelyoma benzeri karsinom -Berrak hücreli karsinom -Rabdoid fenotipinde BH karsinom
Adenoskvamöz karsinom	
Sarkomatoid karsinom	-Pleomorfik karsinom -İğ hücreli karsinom -Dev hücreli karsinom -Karsinosarkom -Pulmoner blastom
Karsinoid tümör	-Tipik karsinoid -Atipik karsinoid
Tükruk bezi tipindeki karsinomlar	-Mukoepidermoid karsinom -Adenoid kistik karsinom -Epitelyal-miyoepitelyal karsinom
Preinvaziv lezyonlar	-Skvamöz hücreli insitu karsinom -Atipik adenomatöz hiperplazi -Diffüz idiyopatik pulmoner -Nöroendokrin hücre hiperplazisi

Bu sınıflandırma içerisinde, çalışma grubumuzu oluşturan KHDAK ve alt gruplarını daha ayrıntılı şekilde inceleyecek olursak;

2.1.4.1. Skuamöz Hücreli Karsinom

Epitel hücrelerden köken alan farklı derecelerde keratinizasyon ve hücresel bağlantılar oluşturan malign bir tümördür. KHDAK'lerinin yaklaşık olarak % 25-30'unu kapsamaktadır. Genellikle erkeklerde görülen bir tümör olup, sigara kullanımı ile birlikte görülme sıklığı artmaktadır. Skuamöz hücreli karsinomun %90'dan fazlası genellikle sigara içen kişilerde gözlenmektedir. Bu karsinom, büyük bronşların merkezinden çıkma eğiliminde olup lokal hiler lenf nodlarına doğru kolay yayılmakla birlikte diğer histopatolojik tiplere oranla toraks dışında daha geç metastaz yapmaktadır. Skuamöz hücreli karsinomun papiller, berrak hücreli, küçük hücreli ve bazaloid olmak üzere kendi içinde alt tipleri de bulunmaktadır (46,47).

2.1.4.2. Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu

Akciğer karsinomlarının yaklaşık % 10-15'lik kısmını oluşturur. Daha çok proksimal hava yollarıyla ilişkili karsinomdur. Erken dönemde sınırları belirgin olmayan, submukozal ve peribronkovasküler dokularda lokalize olur. Büyüdükçe altındaki havayolu ve damarların tıkanması sebebiyle kötü sınırlı kitlelere dönüşür. Erken dönemde lenfatik ve hematojen yayılımı sık olup sistemik bir şekil kazanır (48).

Histopatolojik olarak bu tümör, matür lenfositlerin 2-3 katı büyüklüğündeki hücrelerden oluşur. Sitoplazması dar nükleuslu olup küçük ve hiperkromatik şekildedir. Ezilmiş hiperkromatik hücrelerden oluşan bölgelerin varlığıyla ya da birçok kesitte görülen bir veya daha fazla korunmuş hücre kümeleri sayesinde tanıya daha hızlı ulaştırır (49).

2.1.4.3. Adenokarsinom

Birçok ülkede genel olarak adenokarsinom, akciğer kanserinin en sık rastlanan histopatolojik alttipi olarak skuamöz hücreli karsinomu geride bırakmıştır. KHDAK olgularında % 30-35 oranında adenokarsinomlular görülmektedir. Genellikle 40 yaşın altındaki kadınlarda gözlenmektedir. Adenokarsinom doku tipi diğer histopatolojik alttiplere oranla sigara içmeyenlerde daha fazla sıklıkta gözlenmektedir. Adenokarsinomlar, skuamöz hücreli karsinoma benzer şekilde santral yerleşimli olabildiği gibi, çoğunlukla yüzey bölgelere yerleşmektedir. Genellikle yavaş gelişen bu

tümörler, daha küçük kitle meydana getirirler ve diğer alttiplere oranla daha erken evrede metastaz yaparlar (46,50).

2.1.4.4. Büyük Hücreli Karsinom

Büyük hücreli karsinom, belirgin nükleolus, büyük nükleus ve orta derecede sitoplazma ihtiva eden, büyük hücrelerden meydana gelen bir tümördür. Bu karsinomlar az diferansiye olmuşlardır ve skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve küçük hücreli karsinoma benzer özellikler barındırmazlar. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 9'luk kısmını oluşturmaktadırlar. Erken evrede uzak metastaz yapma özellikleri nedeni ile diğer histopatolojik alt tiplere göre daha kötü bir prognoz seyrine sahiptirler (51).

2.1.4.5. Adenoskuamöz Karsinom

Skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom bileşenlerinden her birinin tümörün % 10'luk kısmından fazlasını oluşturduğu bir tümördür. Genellikle dış yüzeyde yerleşirler ve santral skar formasyonu gösterebilirler (52).

2.1.5. Akciğer Kanserinin Moleküler Genetiği

Onkojenlerin mutasyonel aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücre siklusu regülasyonu ve DNA tamirinde önemli rol oynayan genlerde ortaya çıkan farklılıklar akciğer kanserinde görülen başlıca moleküler değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır.

Son 20 yıl içinde akciğer kanserinin moleküler biyolojisinde ortaya çıkan gelişmelerle birlikte, belirli hasta gruplarında adjuvan tedavi, konvansiyonel sitotoksik kemoterapi ya da yeni gelişmekte olan özel amaçlanmış ajanların tedavide kullanımları ile gündeme gelmiştir. Bu nedenle son yıllarda moleküler biyolojiye dayanan uzun süreli sağkalımı tespit edebilecek yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (53,54). Kanserlerde oluşan genetik farklılıklar, kromozomal düzeyde veya tek bir nükleotid düzeyindeki değişikliklerden oluşabilir. Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen onkojenler, tümör süpresor genlerdeki genetik değişiklikler enzim polimorfizmi gibi konakçı faktörleri ve anjiogenez, invazyon, metastaz gibi tümör konakçı etkileşimi sonucunda tümoral kitle oluşmaktadır.

Bunların dışında, DNA tamiri, hücre proliferasyonu, sinyal iletimi ve hücre siklus kontrolüyle ilişkili genler de akciğer karsinogenezisinin farklı aşamalarında hasar görebilmektedir. Akciğer kanserlerinde görülen genomik dengesizlik; pek çok anoploidi gibi kromozomal ve delesyon, amplifikasyon, nonresiprokal translokasyonları gibi yapısal sitogenetik anomallikleri kapsamaktadır (55).

2.1.5.1. Akciğer Kanseri Oluşumunda Meydana Gelen Genetik Değişiklikler

Akciğer kanserinin oluşumunda meydana gelen önemli genetik değişiklikler şu şekilde sıralanabilir (56):

- I. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu,
- II. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu,
- III. Hücre döngüsü regülasyonunda görev alan genlerde oluşan değişiklikler,
- IV. DNA tamir mekanizmasında rol oynayan genlerdeki değişiklikler ve
- V. Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişikliklerdir.

I. Onkogenlerin Mutasyonel Aktivasyonu

Onkogenler, protoonkogenler adı verilen hücresel genlerden oluşmaktadırlar. Protoonkogenlerden sentezlenen protein ürünleri, genellikle normal hücrelerin diferansiasyonun ve proliferasyonunun düzenlenmesinde, hücre membranındaki reseptörlerden alınan sinyallerin sitoplazma ve nükleusa iletilmesindeki döngüde fonksiyonel olarak rol oynamaktadır. Bu genlerde oluşabilecek mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon ve transkripsiyonal disregülasyon gibi mekanizmalar, genlerin ekspresyonunu arttırarak, aşırı derecede protein üretimine sebep olmaktadır. Bu mekanizmalar sonucu aktif hale gelmiş protoonkogenlere ‘onkogen’, oluşan protein ürünlerine ise ‘onkoprotein’ adı verilmektedir (55). Örneğin, *Ras* onkogen ailesinde çoğunlukla nokta mutasyonları sonucu onkogen oluşumu meydana gelmektedir. Diğer bir mekanizma ise, genlerin regülatör bölgelerinde ortaya çıkan değişikliklerdir ve bu değişiklikler sonucunda gen yapısının normal olmasına rağmen, sürekli uyarılma sonucu aşırı miktarda gen ürününün sentezlenmesine yol açmaktadır. Kromozomal translokasyonlar oluştuktan sonra da, eğer yeni yerleşim bölgesi genin regülatör

bölgesinde yer alıyorsa sürekli uyarılma meydana gelebilir ve bu da gen ekspresyonun artışıyla sonuçlanır. Genin yeni lokalize olduğu bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatör bölgesinin kontrolü altında ise her defasında uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu sonucuyla da hücre içindeki DNA miktarı artacaktır. *Myc* ailesi buna bir örnek oluşturabilir (57).

1. Ras Ailesi

1970 ve 1980’li yıllarda yapılan araştırmalar sıçan kaynaklı Harvey ve Kirsten kemirgen sarkoma retrovirüslerinin *Ras* (**rat** sarkoma virüsü) olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca bu virüslerin, ortak bazı genlerin aktivasyonu sonucunda kanser patojenezine yol açtıklarını gösterilmiştir ve daha sonra, bazı viral gen homologlarının fare ve insan hücrelerinde de bulunduğu tespit edilmiş ve bu homologlar *H-ras* (Harvey virüsü ras) ve *K-ras* (Kirsten virüsü ras) olarak adlandırılmışlardır (58.) Bu çalışmaların ardından, *ras* genlerinin mutasyona uğramış alelleri mesane, kolon ve akciğer kanseri hücrelerinde tespit edilmiş, ve *Ras*’ın onkogenik aktivitesine dair ilk ipuçları elde edilmeye başlanmıştır (59.) İlk etapta akciğer kanseri hücrelerinde de aktif *ras* mutant alellerine rastlanması, *ras* aktivasyonunun sadece hücre hatlarında *in vitro* oluşmadığının ilk belirtisi olmuştur (60). Bu çalışmaları takiben, *ras* onkogenleri ve diğer kanser türleri arasında özgün ilişkiler kurulmuş ve *K-ras* mutasyonlarının pankreas ve kolon kanserlerinde (61), buna karşılık *H-ras* mutasyonlarının mesane kanserlerinde (62), *N-ras* mutasyonlarının da lenf kanserleri ve melanomalarda sıklıkla gözlemlendiği belirlenmiştir (63).

Akciğer kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan genlerden biri *K-ras* genidir ve bu gen büyük sıklıkla kodon 12’de ve nadiren kodon 13 ve 61’de oluşan nokta mutasyonları ile aktive olmaktadır. Yapılan araştırmalarda *K-ras* mutasyonlarının akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık % 20-30’unda ve tüm KHDAK’ların % 15-20’sinde gözlemlendiğini, buna rağmen KHAK’inde nadiren meydana geldikleri tespit edilmiştir (64). *H-ras* mutasyonları *K-ras* mutasyonlarına göre daha az, *N-ras* mutasyonlarının ise nadiren olduğu gözlenmiştir (65). *K-ras* mutasyonun sıklığı, birçok çalışmada genellikle sigara kullanımıyla ilişkilendirilmiştir. *K-ras* mutasyonları sigara içen akciğer kanserli hastalarda hiç içmeyenlere göre daha fazla görülmektedir. Sigara dumanında bulunan polisiklik karbonlar ve nitrozaminlerin DNA hasarına neden

olmasıyla ve sonuçta *K-ras* geninde G-T transversiyon mutasyonlarına yol açmasına sebebiyet vermektedir. Erken ya da ileri evrede gelişen KHDAK'lı olgularda *K-ras* mutasyonlarının meydana gelmesi, kötü bir prognozün göstergesi olarak değerlendirilmektedir. *Ras* onkogenlerinde oluşan mutasyonlar, kanserin erken safhalarındaki önemli rolüne işaret etmektedir (66).

Çizelge 2.3. *Ras* mutasyon tiplerinin etkili olduğu kanser türleri (67).

Kanserli Doku veya Organ	<i>H-Ras</i> mutasyonu %	<i>K-Ras</i> mutasyonu %	<i>N-Ras</i> mutasyonu %
Safra yolu	%0	%33	%1
İdrar kesesi	%11	%4	%3
Meme	%0	%4	%0
Serviks	%9	%9	%1
Kolon	%0	%32	%3
Endometrium	%1	%15	%0
Böbrek	%0	%1	%0
Karaciğer	%0	%8	%10
Akciğer	%1	%19	%1
Melanoma	%6	%2	%18
Miyeloid lösemi	%0	%5	%14
Over	%0	%17	%4
Pankreas	%0	%60	%2
Tiroid	%5	%4	%7

Normal hücrelerde bulunan *ras* proteinlerinin görevi, sinyal uyarımı ile guanozin trifosfat (GTP)'a bağlanıp aktif duruma geçtikten sonra gelen sinyalleri nükleusa iletmektir. Sinyal iletimi sonlandığında ise, bağlı olan GTP molekülü, guanozin trifosfataz (GTPaz) enzimiyle hidrolize durumuna geçer. Bunu takiben *ras* proteinleri guanozin difosfat (GDP)'a bağlı durumda kalarak inaktif durumuna geçerler. Böylelikle *ras* proteinleri bir sonraki uyarı sinyallerini beklemek üzere dinlenme sürecine geçerler. Mutant *ras*

proteininde ise, GTPaz aktivitesi inhibe edildiği için gen ürünleri kontrolsüz olarak çoğaltılmaya devam etmektedir (68)

2. Myc ailesi

Sinyal iletim yolları, önemli proliferasyon ve replikasyon genlerinin ekspresyonunu regüle eden bir seri nükleer proteinlerini de etkilemektedir. *Ras* sinyal iletimi sonucunda nükleer bir protoonkogen olan *Myc*'in ürünleri aktive edilir. *Myc* ailesi, DNA'ya bağlanan ve üç fosfoproteini kodlayan *c-myc*, *n-myc* ve *l-myc* genlerinden oluşmaktadır. Bu genler, çoğu zaman amplifikasyon ve transkripsiyonal disregülasyon sonucunda onkogen haline dönüşmektedirler. Birçok solid tümörlerde *c-myc*'in ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir (69). KHAK ve KHDAK'li hastalarda en sık aktive olan *Myc* ailesi üyesi *c-myc*'dir. Diğer *Myc* ailesi üyeleri genlerinin genellikle KHAK olgularında aktif olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda KHAK'lerinin % 18-31'inde, KHDAK'lerinin ise % 8-20'sinde *Myc* ailesine ait genlerde amplifikasyonların meydana geldiği rapor edilmiştir. Hücrelerdeki *c-myc* amplifikasyonu sonucunda hücrelerin büyüme faktörü ihtiyaçlarında azalma, hücre döngüsü sırasında ise G1 evresinde kısalma ve sonuç olarak da proliferasyonda artışlar oluşmaktadır. *c-myc* amplifikasyonunun, tümör büyüme hızındaki artmayla ve sağkalım süresindeki azalmayla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (70).

3. Hücre içi sinyal iletilicileri ve nükleer transkripsiyon faktörleri

Akciğer kanseri türlerinin ekspresyonlarında artış gözlenen farklı büyüme faktörü ve reseptörlerini kodlayan genler arasında *c-erb B-1*, *c-erb B-2*, *c-fms*, *c-met*, *c-src*, *c-raf-1*, *c-fos* ve *c-jun* yer almaktadır.

- a) ***c-erb B-1***: Skuamöz hücreli kanser ekspresyonunda artışı görülen ve EGFR kodlayan gen olup, bir membran glikoproteinidir ve tirozin kinaz aktivitesine sebep olmaktadır. Bu nedenle hücre dışından gelen sinyallerin hücreye iletilmesinde önemli derecede rol oynarlar.
- b) ***c-erb b-2***: Kodladığı protein olan HER2/neu bir transmembran büyüme faktör reseptörü olarak rol oynamaktadır. HER2/neu, skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomların doku tiplerinin her ikisinde de aşırı miktarda eksprese olup,

kötü prognozun biyolojik belirteci olarak görülmektedir. Akciğer kanserlerinin ise % 30-64'ünün ekspresyonunda artış gözlenmektedir (69).

- c) **c-fms:** KHAK'lerinde ekspresyonunda artışı gözlenen, Koloni Stimüle Edici Faktör (CSF) için bir protein kodlamakta önemli rolü vardır (65).
- d) **c-met:** Bir büyüme faktörü reseptörü olan Hepatosit Büyüme Faktör (HGF) reseptörünü kodlamaktadır. KHAK'lerin çoğunda ve KHDAK'lerinin yarısında, özellikle adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomların ekspresyonunda artış gözlenmiştir (65).
- e) **c-src:** Bu protoonkogen pp60c-src N-tirozin kinazları kodlamaktan sorumludur. KHAK'lilerde ve KHDAK adenokarsinomlarının % 60'ında aynı zamanda kötü diferansiye skuamöz hücreli karsinomların ekspresyonlarında artışı gözlenmiştir (65).
- f) **c-raf-1:** Kodladığı protein, intrasellüler sinyal iletim yollarında merkezi bir rolü sahip, sitozolik bir serin treonin olan protein kinazdır. KHAK'lerin % 80'indeki bu geninde delesyonlar oluşmaktadır (65).
- g) **c-fos ve c-jun:** Protein sentezi görevi ihtiva etmeksizin, mutajenik uyarılarla aktive olan transkripsiyon faktörleridir ve akciğer kanserlerindeki rolü tam olarak bilinmemektedir.

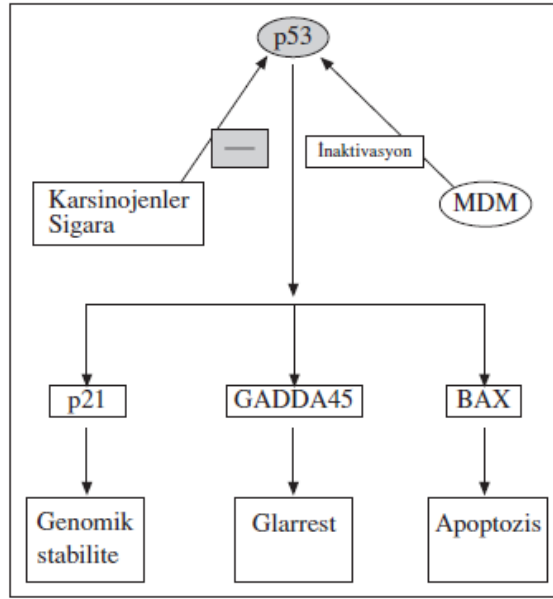
II) Tümör Baskılayıcı Genler

1) p53

p53 proteini, hücrede gen transkripsiyonu, DNA sentezi ve tamiri, genetik stabilitenin korunması, hücre siklusunun durdurulması, proliferasyonun sonlandırılması ve apoptoz gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır (71). Özellikle, gama ışını, ultraviyole ışını ve karsinojenler tarafından oluşan DNA hasarına cevapta önemli bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. p53, C-terminal ucu sayesinde DNA'daki hatalı bölgeyi tanır ve o bölgeye bağlanabilir ve aynı zamanda p21, MDM2 (murine double minute oncogene 2), GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage 45) ve BAX (Bcl2-associated X gene) gibi genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli işlevlere sahiptir. Bu genlerin ürünleri de G1/S hücre siklusu geçişini, G2/M DNA hasar

noktasını ve apoptozu düzenlemede önemli rol oynamaktadırlar. *p53* geninin fonksiyon kaybı sonucunda hücre büyümesinin kontrolü kaybolur ve hücrelerin kontrolsüz olarak amplifikasyonu başlar (69). Normal bir hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde *p53* geni genomik stabiliteyi sağlar ve hücre siklusunu G1 noktasında inhibe eder. Böylece hücreye kendini tamir etmesi için zaman kazandırır. Hücrenin hasarı tamir edememesi durumunda hücre apoptozise uğratılır.

p53 geni DNA hasarına yanıtla ilgili genlerin regülasyonunu sağlar. Bu genlerden *p21*, siklin ve siklin bağımlı kinazları G1 noktasında durdurur. *p21* KHDAK olgularında % 65-75 oranında aşırı eksprese olur ve iyi prognozla ilişkilidir. MDM2 ilişkili bir diğer gen olup, *p53* fonksiyonlarını bloke etmede önemli bir role sahiptir. Bir tümörde *p53* fonksiyon bozukluğu olmaksızın MDM2'nin aşırı ekspresyonu oluşuyorsa bu iyi prognozla ilişkilidir.



Şekil 2.3. *p53* tümör süpresör gen yolu

p53 geni 17p13.1 lokusunda lokalizedir ve insan tümörlerinde çok sık değişime uğradığı bilinen tümör baskılayıcı gendir ve bir hücre fosfoproteini olan *p53* proteininin sentezinden sorumludur (72). Akciğer, meme ve kolon kanseri en başta olmak üzere birçok kanser türü içinde *p53* geninde homozigot kaybı gözlenmektedir (50). Akciğer kanserlerinin yaklaşık 2/3'ünde *p53* geni mutasyona uğramaktadır. Tüm kanserlerin % 50'sinde, KHAK'lerin ise % 90'ında, KHDAK'lerinin % 50'den daha fazlasında meydana geldiği rapor edilmiştir. Skuamöz hücreli karsinomların % 65'inde,

büyük hücreli karsinomların % 60'ında ve adenokarsinomların % 33'ünde *p53* geninde mutasyonlar oluşmaktadır (65).

p53 gen mutasyonları karsinogenezin erken basamaklarında gözlenmektedir. *K-ras* genindeki belli bir noktalarda mutasyonlar oluşurken, *p53* mutasyonları 17. kromozom üzerinde tüm gen boyunca oluşabilmektedir. Mutant *p53* geni, karsinoma insitu evresinde gösterilmiştir. Çalışmalarda klinik olarak akciğer kanseri tanısı konmadan bir yıl önce alınan balgam örneklerinde *p53* ve *ras* mutasyonlarının varlığı rapor edilmiştir. Bu nedenle erken tanıda oldukça önem taşırlar (73).

2) Retinoblastom (*Rb*) geni

Retinoblastom geni (*Rb*), ilk tanımlanan tümör baskılayıcı genidir ve 13q14 bölgesinde lokalizedir. KHAK olguların % 90'nında ve KHDAK'nin % 15-30'unda *Rb* proteininin yokluğu görülür (74). *Rb* proteini, hücre siklusu bakımından önemli olan genlerin promotor bölgelerine doğrudan bağlanan nükleer transkripsiyon faktörlerine bağlanırlar. Bu sebeple de, hücre diferansiasyonunda önemli rol üstlenmektedirler. *Rb* proteini fosforile halde iken inaktif, fosforillenmediği zaman ise aktif formda bulunmaktadır. *Rb* proteininin fosforilasyonu siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından regüle edilmektedir (69).

p16-siklinD1-CDK4-*Rb* yolu, hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişini regüle etmektedir. Bu basamakta yer alan genlerin çoğu, kanser oluşum sürecinde mutasyona uğramaktadır ve bu yoldaki önemli proteinlerden birisi 9q21'de lokalize halde olan *p16* proteinidir. Akciğer kanserinde, bu proteini kodlayan gende allelik kayıp ya da mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar CDK4-siklinD1 kinaz aktivitesini baskılayarak, *Rb* fonksiyonunun arttırılmasına sebep olurlar. KHDAK olgularının % 10-40'ında ve KHAK'lerde daha düşük oranda bu gen inaktif halde bulunmaktadır (75).

3) Kromozomal bölgelerdeki kayıplar

Tümör baskılayıcı genler genellikle kromozomların 1p, 1q, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 11p, 11q, 14q, 17q, 18q ve 22q bölgelerinde lokalize olmaktadır. Bu bölgelerde meydana gelen delesyonlar sonucu tümör baskılayıcı genlerde fonksiyonel

kayıplar oluşmaktadır. Akciğer kanserinde ise kromozomların çoğunlukla 1p, 3p, 9p ve 17p bölgelerinde kırıkların olduğu rapor edilmiştir (70).

Akciğer kanserinde yüksek oranda 3. kromozomun kısa kolunda allelik kayıplar oluşmaktadır. KHDAK olguların % 50 veya daha fazlasında ve KHAK'ların ise hemen hemen tümünün 3. kromozomun kısa kolunda delesyonların gözlenmesi, bu kromozomal bölgede akciğer kanseri oluşumundan sorumlu olabilecek tümör baskılayıcı genler veya DNA tamir mekanizmasından sorumlu genlerin lokalize olduğunu düşündürmektedir (76).

III) Hücre Döngüsünün Regülasyonunda Görev Alan Genler

Ökaryotik hücre döngüsü G1, S, G2 ve M fazlarından meydana gelmektedir. Kromozomal replikasyon ve mitojenik ayrılma, S ve M fazlarında oluşmaktadır. Bu fazlarda gelişen olaylar ise bu fazlardan önceki G1 ve G2 fazlarında düzenlenir. Bu nedenle G1 fazındaki hücreler belli hücresel olayları tamamlandıktan sonra hücre siklusunu tamamlama emri alırlar. Hücre büyümesi G1 fazında hücre siklus transiti restriksiyon noktası (R) tarafından koordine edilir. Hücre siklus transiti için hücrenin belli bir kütleye ulaşması gereklidir. Hücreler R noktasında büyüme faktörlerine ve büyüme uyarılarına karşı duyarlıdır. R noktasını geçen hücreler, kromozomal replikasyon ve kromozomal ayrılma emri aldıktan sonra karsinogenezis sırasında R noktasındaki değişiklikler sonucu kontrolsüz hücre proliferasyonu ile sonuçlanır (77).

IV) DNA Tamir Mekanizmasında Rol Oynayan Genlerde Meydana Gelen Değişiklikler

DNA tamir mekanizması, normal hücre siklusunun sürekliliği ve genetik stabilitenin korunması için gerekli ve oldukça önemli bir mekanizmadır. Bu nedenle hatalı ya da yetersiz DNA tamiri, kanser oluşumunun sebepleri arasında yer almaktadır. Akciğer kanseri etyolojisinde yer alan sigara kullanımı ile maruz kalınan karsinojenlerden bazıları, DNA'da çeşitli hasarlara sebep olmaktadır. DNA tamir mekanizmasından sorumlu en önemli genler esas olarak 3. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize haldedirler. Kromozom 3p'deki kayıpların akciğer kanseri gelişimini 14 kat daha fazla arttırdığı belirtilmiştir (70).

V) Büyüme Faktörleri ve Reseptörlerine İlişkin Değişiklikler

Normal sağlıklı hücrelerine ek olarak akciğer kanseri hücreleri tarafından birçok büyüme faktörü ve reseptörünün eksprese edildiği bilinmektedir. Eğer bir tümör hücresi kendinde hem büyüme faktörünü hem de reseptörünü bulunduruyorsa, bu tümör hücresi kendi kendini uyaran büyüme halkasına sahip demektir ve bu ‘otokrin büyüme halkası’ olarak adlandırılmaktadır. Otokrin sistemler normal hücrelerde de bulunmasına rağmen, yalnızca fizyolojik sinyallere karşı yanıt oluşturmaktadırlar. Normal hücrelerde dengeli büyüme için düzenleyici sistemler varken, kanser hücrelerinde bu dengeler bulunmamaktadır.

Epidermal Büyüme Faktörleri (EGF) ve Transforme Edici Büyüme Faktörü- α (TGF- α), hücre proliferasyonu ve farklılaşmasına sebep olan önemli proteinlerdir. EGF etkinliğini, kendi yüzey reseptörü olan EGFR’ne (Epidermal Growth Factor Receptor) bağlanarak gerçekleştirir. EGFR, hem normal hücre proliferasyonu hem de malign transformasyona dönüşüm ile ilgili tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir transmembran glikoproteinidir. Yapılan çalışmalarda, EGFR’nin KHDAK olgularının çoğunda aşırı eksprese olduğu tespit edilmiştir. KHDAK’lerinin % 13-80’inde EGFR’lerinde yüksek oranda mutasyonlar oluşmaktadır. Bu nedenle EGFR, KHDAK’nin tedavisinde önemli bir hedef pozisyonundadır (78). Prekilinik ve klinik veriler, EGFR’de meydana gelen mutasyonların KHDAK’nin gelişiminde erken evrede gözlenebilecek bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, skuamöz hücreli karsinomların normal dokuya göre 2-3 kat daha fazla EGFR ekspresyonlarında artış meydana geldiği bildirilmiştir (65).

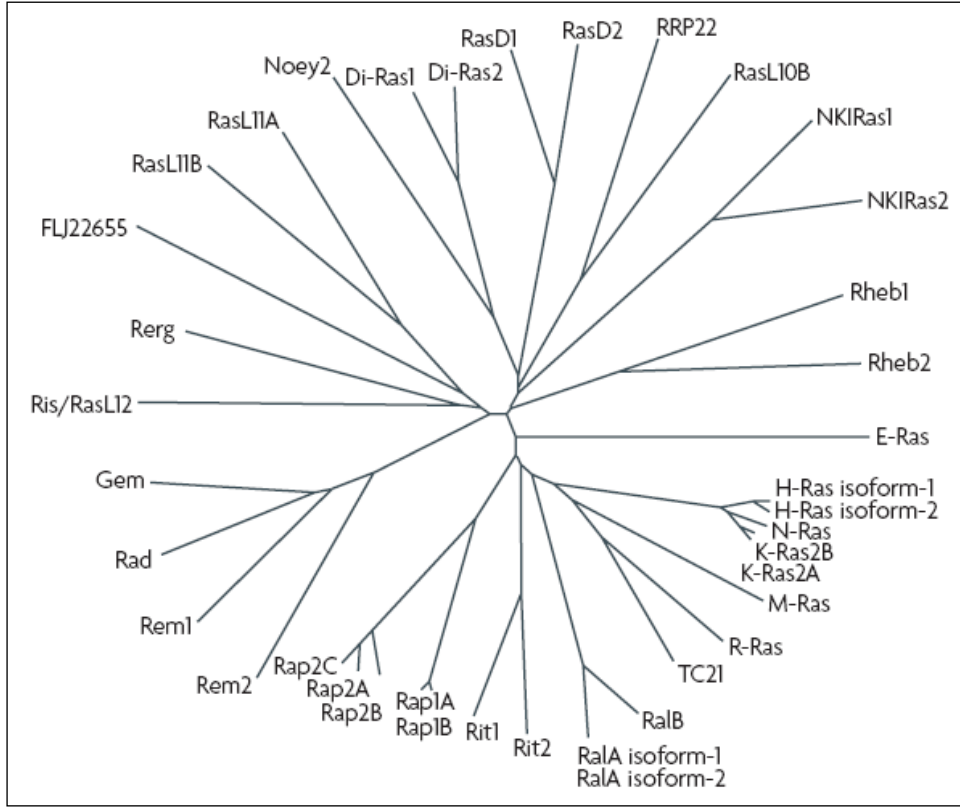
2.2. RAS Ailesi

Kompleks organizmalarda hücrenin proliferasyonu, farklılaşması ve sağkalımı büyüme faktörleri, ekstrasellüler hormonlar ve bazı sitokinler tarafından regüle edilmektedir. Bu moleküllerin hücresel reseptörlere bağlanması, intrasellüler sinyal iletim yollarının iletişim ağı süresince hücrenin dışarıdan aldığı uyarıyı nükleusa ulaştırması ile sonuçlanmaktadır. Hücre sinyal iletim yollarındaki regülasyonun bozulması, hücrelerin proliferasyonunun artmasına ve böylelikle de kanser oluşumuna sebep olmaktadır. *Ras* protoonkogeni, birçok sinyal iletim yollarında anahtar bir molekül olarak fonksiyon görmektedir (79).

Ras genleri ile ilgili çalışmalar 1960'lı yılların başlarında araştırmacıların farelerde lösemiye neden olan bir virusu tanımlamalarıyla başlamıştır. 1967'de yine farelerde, lösemiye neden olan virusların seri pasajıyla retrovirus benzeri bir virusun varlığını tespit etmişlerdir. Keşfedilen bu iki 'rat sarkom (**ras**) indükleyen retroviruslar', bunları keşfeden bilim adamları tarafından adlandırılmışlardır. *Ras* proto-onkogenleri, onkogen şeklinde ilk izole edilen genlerdir. *Ras* ailesi proteinleri hücre büyümesi, farklılaşması, hücre iskeleti organizasyonu, hücre g, membran trafiğini kontrol eden sinyal iletim yolakları ve apoptoz gibi önemli hücresel olayların düzenlenmesinde önemli rol oynayan anahtar moleküllerdir. Bu proteinler çoğunlukla reseptör tirozin kinazların yukarı yn, protein kinazların ise aşağı yn kaskadı boyunca proliferatif sinyallerin iletilmesinde önemli rol üstlenirler (80).

Ras proteinleri, *Ras* sperailesinin alt grubudur ve bu aile *Ras* (H, K, M, N ve R), *Rap* (1 ve 2) ve *Ral* gibi birçok farklı üyeden oluşmaktadırlar (şekil 2.4) (79). *Ras* ailesi GTPaz'ları insan genomunda toplam 36 gen tarafından kodlanmaktadır ve bu genler yaklaşık 39 farklı *Ras* proteinini (20-29 kDa) kodlamaktadır (81).

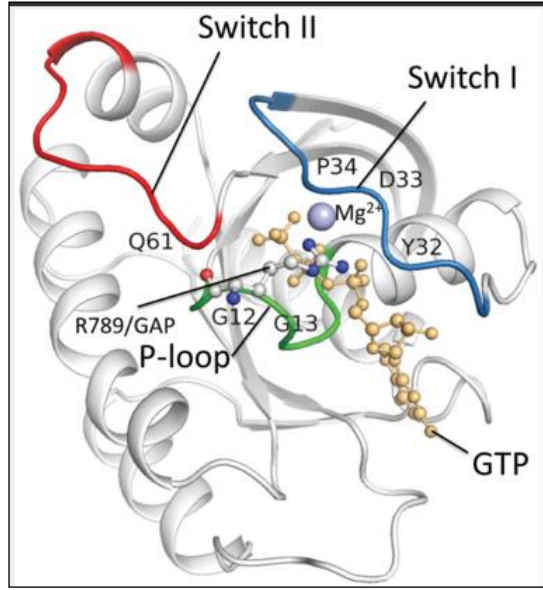
İnsan ve memeli genomlarında yüksek oranda ilişkili olan *Ras* ailesine ait olan dört protein, *H-ras*, *K-ras* ve *N-ras*  farklı gen tarafından kodlamaktadır. Bu genler sayesinde  izoform protein eksprese olur. *K-ras* geninin alternatif splicingi ile de *K-Ras4A* ve *K-Ras4B* şeklinde iki protein izoformu oluşturulur (79).



Şekil 2.4. Ras ailesi üyeleri (81)

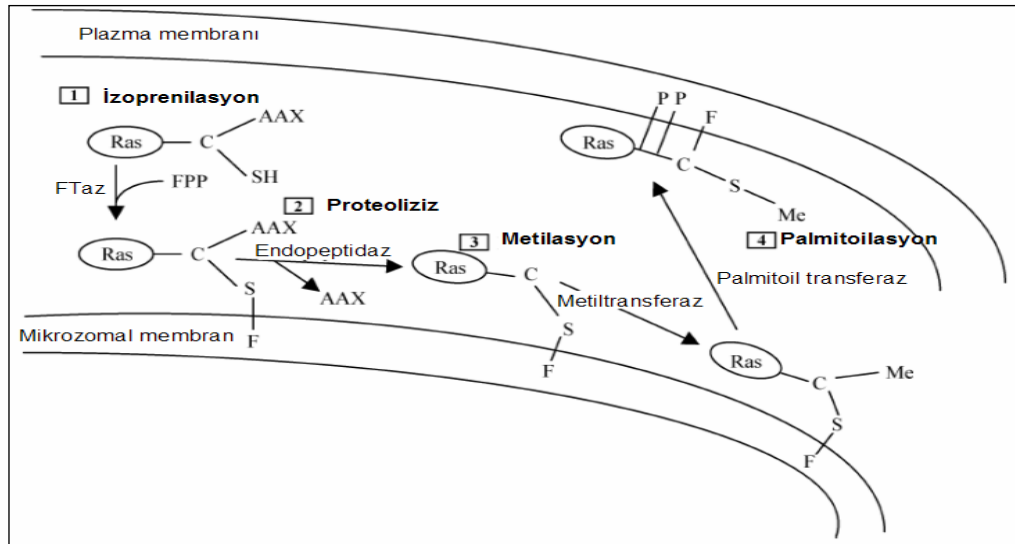
2.2.1. Ras Proteinin Yapısı

Küçük GTPaz *Ras* ailesi üyelerinin her biri, proteinin N-terminal ve C-terminalinde büyük oranda korunmuş olan yaklaşık 190 amino asitlik rezidü bulunmaktadır (79). *Ras* ailesi üyeleri arasında bulunan başlıca dizi homolojileri N-terminalde, özellikle fosfat-bağlama düğümü olan ‘P-loop’ bölgesinde ve nükleotid-duyarlı ‘switch 1’ ve ‘switch 2’ bölgelerinde gözlenirler (Şekil 2.5). Proteinin C-terminali, *Ras* ailesi üyeleri arasında farklılık göstermektedir. C-terminalin hemen yanında yer alan ve bu üyelerin farklı fonksiyonlara sahip olmasının asıl sebebi olarak görülen, yaklaşık 25 aminoasitlik çok değişken bölge bulunmaktadır (81). *Ras* proteinlerinin C-terminali, özellikle *Ras* ailesi üyelerinin membranla bağlantı kurmasında önemi olan membran hedefleyen CAAX dizisine sahiptir. CAAX dizisindeki C simgesi sisteini, A simgesi lösin, izolösin ya da valin gibi bir alifatik amino asidi ve X simgesi ise metiyonin, serin, lösin veya glutamini vurgulamaktadır(79).



Şekil 2.5. Ras proteinin yapısı (Spiral olan: α -heliks, düz olan: β -plaka) (85)

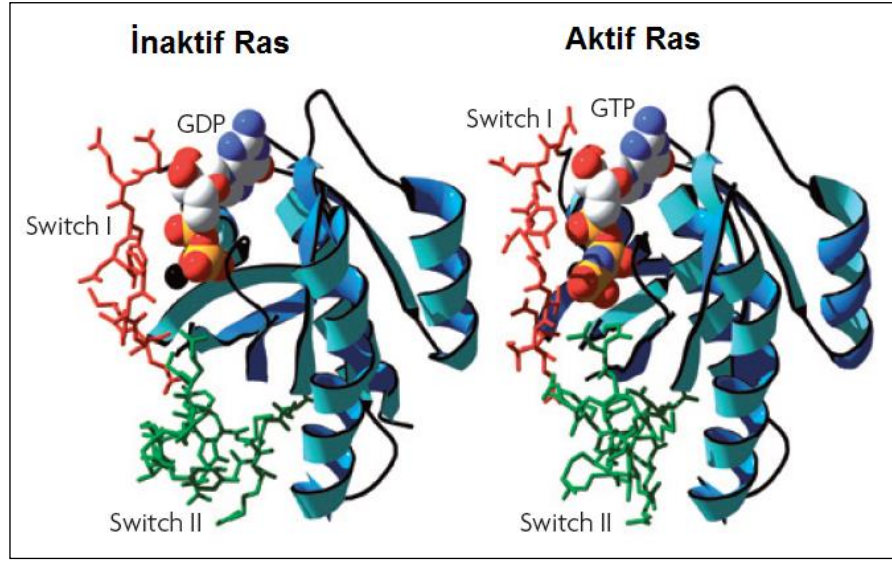
Ras proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonları, CAAX dizisinde oluşmaktadır. Posttranslasyonel modifikasyon süreci, *Ras* proteinlerinin doğru subsellüler kompartmanlara lokalize olması açısından oldukça önemli rol üstlenmektedir. *Ras* proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonu izoprenilasyon, proteoliz, karboksimetilasyon ve palmitoilasyon olmak üzere 4 basamaktan oluşmaktadır (79,80) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ras proteinlerinin post-translasyonel modifikasyon süreci (80)

2.2.2. RAS Aktivasyonun Moleküler Mekanizması

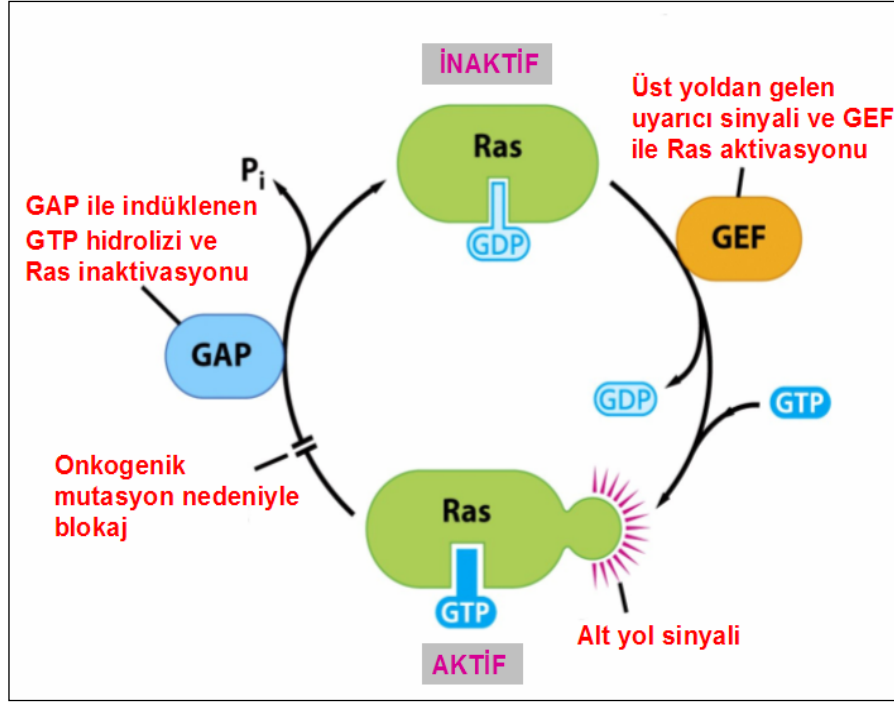
Diğer GTP bağlayan proteinler gibi, *Ras* proteinleri de aktif GTP bağlı ve inaktif GDP bağlı durum arasında döngü yaparak, önemli hücresel olaylarda anahtar ve moleküler olarak görev yapmaktadırlar (83). *Ras* proteinin GTP ve GDP bağlı durumdaki konformasyonları şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Ras'ın GTP- ve GDP-bağlı durumdaki konformasyonları (82)

G proteinlerine benzerliklerinin yanı sıra *Ras* proteinleri sırasıyla; dinlenme halindeki yani inaktif durumda olan bir GDP moleküne bağlanır ve daha sonra sinyal kaskadında uyarıcı sinyallerini aldıktan sonra GDP'ye bağlı durumunu bırakır ve serbest kalan GDP yerine bir GTP molekülü elde eder. Bunu takiben GTP'ye bağlanarak, aktif sinyal yayma konfigürasyonuna dönüştükten kısa bir süre sonra kendi GTPaz fonksiyonunu kullanarak GTP'den ayrılır ve böylece yeniden sinyal yaymayan konfigürasyon durumuna geçer. (82).

Ras proteininin aktif ve inaktif formları arasındaki değişimi ayarlayarak düzenleyen iki tip sinyal iletim proteini vardır. Bunlardan biri *Ras* proteinini etkinleştirerek, GDP'nin ayrışmasını ve ardından GTP'nin sitozolden alınımını uyararak bağlı olduğu nükleotidin değişimini uyaran Guanin nükleotid değiştirme faktörü olan GEF'dir. İkinci tip protein ise *Ras*'da bulunan GTP'nin hidroliz hızını arttırarak *Ras*'ı etkisiz hale getiren GTPaz etkinleştirici proteinler yani GAP'dir (Şekil 2.12) (86).



Şekil 2.8. Aktif GTP-bağlı ve inaktif GDP-bağlı konformasyon arasında Ras döngüsü (Weinberg 2007).

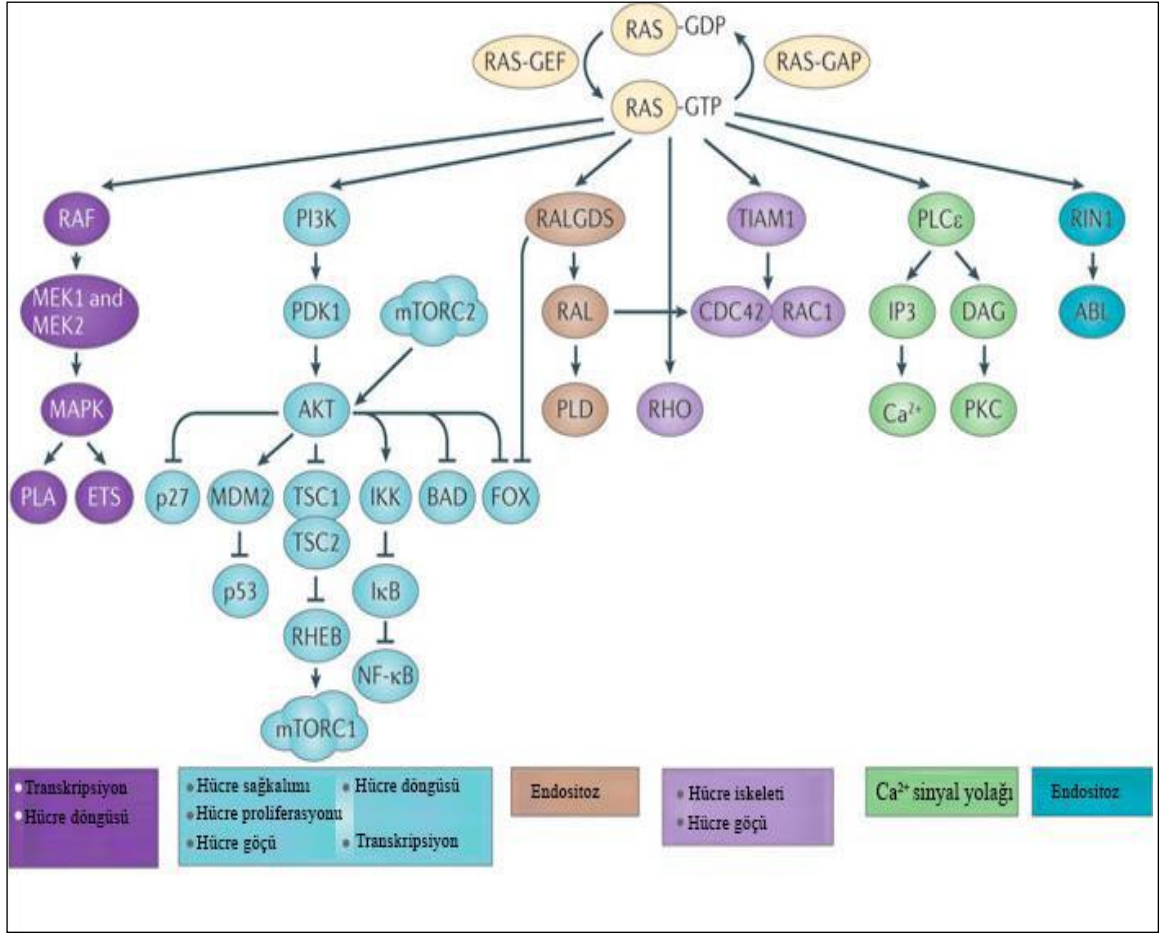
Büyüme faktörü reseptörleri uyarıldıktan sonra, *Ras*'dan guanin nükleotidlerini uzaklaştırmak için GEF'leri aktive eden birtakım adaptör proteinlerini toplar. Ardından *Ras*, GDP'den on kat daha fazla konsantrasyondaki GTP'ye bağlanarak aktive olur. GTP bağlı halde, *Ras*'ın iki switch bölgesindeki (switch I ve II) konformasyonlarını değiştirirler. Bu konformasyonel switch ile *Ras*, *Raf-1* gibi *Ras* efektör proteinlerine bağlanır ve bu proteinlerin aktif hale gelmesini sağlar. EGF gibi bir ekstrinsik ligandın reseptörüne bağlanarak reseptör dimerleşir ve intrinsik reseptör tirozin kinaz aktif hale getirilir. Bu reseptörün intrasellüler tarafındaki spesifik tirozin rezidüleri otofosforilasyonla fosforillenir. Fosforillenen tirozinler daha sonra Grb2 gibi adaptör proteinlerin Src Homoloji 2 (SH2) domain kısımlarına bağlanırlar. Grb2 proteinleri SH2 domaini yanında SH3 domaini de barındırır ve SOS gibi diğer proteinlerin prolinden zengin motiflerine bağlanırlar. *Ras* için anahtar bir adaptör protein olan Grb2, aktive olan EGF reseptörünü SOS'a bağlar. Bu bağlanma ile SOS plazma membranında ilişki kuracak şekilde kuvvetli hale gelir. SOS'un *Ras*'a bağlanması, *Ras*'ın GTP'ye bağlanmasına izin veren ve onu aktif hale getiren GDP'nin ayrılmasına sebep olur ve *Ras* konformasyonunda bir değişikliğe yol açar. Sonuç olarak, *Ras* aktif hale

gelmektedir (79). Reseptör tirozin kinazlar GEF'leri aktive etmek veya GAP'ları baskılamak amacıyla *Ras*'ı aktive edebilirler. *Ras*'ı aktif duruma getiren asıl olay, reseptör tirozin kinazların dolaylı olarak bir GEF'e bağlanmasıdır. *Ras*'a spesifik olan GEF'lerdeki aktivasyon ile *Ras*'da oluşacak fonksiyon kaybı benzer etkiyi göstermektedir (86). Normal bir *Ras* proteini, düşük GTPaz aktivitesine sahip olduğundan genellikle *Ras* sinyal kaskadları geçici olarak aktive edilmektedir. GAP'lar bu düşük GTPaz aktivitesini kuvvetlendirmek amacıyla hızlandırır. Bu suretle, GAP'lar normal *Ras*'ın zayıflatıcısı haline gelirler. Bunun yanı sıra, *Ras*'ın onkogenik mutasyonları sadece intrinsik GTPaz aktivitesini bozmakla kalmaz aynı zamanda GAP indükleyici GTPaz aktivasyonunu da bozar. Bir GAP olan nörofibromatozis 1 (NF1)'in fonksiyonunun bozulmasıyla normal bir *Ras* anormal bir biçimde aktive olur ve belirli melanomları kapsayan nörofibromatozis tip 1'e neden olur. NF1, normal *Ras* sinyalinin atenuasyonu için oldukça önemlidir. *Ras* GTPazı daha fazla aktif hale getiren NF1, *Ras*'ın tüm efektörleriyle olan ilişkisini bloke ederek, onkogenik *Ras*'ın sebep olduğu malign transformasyonu baskılar (79).

2.2.3. *Ras* Sinyal İletim Yolakları

Yukarıda da bahsedildiği gibi *Ras*'ın aktif durumu GTP ya da GDP'ye bağlıdır. GTP'ye bağlı olduğu durumunda, *Ras* ailesi üyeleri sinyal iletim yollarını uyarma yeteneğinde olur (Şekil 2.9). Bu yollardan en başta olanı *Ras/Raf/MEK/ERK* sinyal iletim yolağıdır. Hormonlar, büyüme faktörleri, diferensiasyon faktörleri ve tümör uyarıcı faktörler bu sinyal iletim yolağını kullanarak *Ras* aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla *Raf* (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı boyunca ilerler. İlk efektör molekül olan *Raf* proteini, bir serin/treonin kinaz proteini olup, ERK1 ve ERK2'yi aktif hale getiren, mitojen-aktive-edici protein kinaz 1 ve 2'yi fosforiller. ERK1/2'nin substratları sitozolik ve nükleer proteinlerini içermektedir. ERK, *c-fos* ve *c-jun*'nın ekspresyonunu regüle eden ELK-1 gibi ETS ailesi transkripsiyon faktörlerini fosforiller. Bu durum, FOS-JUN heterodimeri oluşturan AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasının bir sonucu olarak, hücre döngüsünün G1 fazı boyunca hücrenin gelişmesinde rol oynayan D-tipi siklinler gibi, anahtar hücre döngüsü regülatör proteinleri eksprese edilmektedir (88,89).

Buna ek olarak, *Ras*'ın membrana translokasyonunun ve konformasyonel değişikliklerinin bir sonucu olarak, *Ras* proteini fosfatidilinositol-3-kinazlarla (PI3K) doğrudan etkileşime geçer. PI3K, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatı, fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfat oluşturmak için fosforiller. PI3K, ileri sinyal iletim yolağındaki enzimlerin büyük çoğunluğunun aktivitesini regüle eder. Kinaz 3 fosfatidilinositid bağımlı protein kinaz-1 (PDK-1) ve Akt kinazın aktivitesi de oldukça önemlidir ve bunun yanı sıra Akt, değişik hedefleri fosforilleyerek güçlü apoptotik etkiye sahiptir ve *Ras* tarafından gerçekleştirilen sağkalım sinyalinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. *Ras*-GTP aynı zamanda, hücre morfolojisinde değişimlere sebep olan yolda *Rac* ve *Rho G* proteinlerini aktive etmektedir. *Rho* proteini, membran büzülmesi gibi süreçleri etkileyen aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde, fokal adhezyon bölgelerinin ve filopodların oluşturulmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Bunun yanında *Rho* proteini, transforme hücrelerin invaziv özelliklerini arttıran morfolojik değişikliklere de sebebiyet vermektedir. Böylece, *Ras*'ın daimi aktivasyonu, yoğun aktin polimerizasyonuna ve artan sayıda fokal adhezyona yol açmaktadır ve *Ras* ayrıca *Ral* (*Ras* ilişkili protein) proteinlerini de uyarmaktadır. Bu uyarılmanın devamında fosfolipaz D1 ve CDC42 aktive edilir. Bu yolak, Akt yolağı boyunca Fox O ailesinin FORK-HEAD transkripsiyon faktörünü inhibe etmektedir ve aynı zamanda bu yolak, siklin bağımlı kinaz inhibitörü KIP1 ya da P27'nin uyarılmasıyla birlikte hücre siklusunun durdurulmasında ve Fas-Fas ligandının ekspresyonuyla da apoptozda önemli rol oynamaktadır. *Ras*-GTP ayrıca fosfolipaz C'ye doğrudan bağlanmak amacıyla onu aktif hale getirmektedir ve ardından fosfolipaz C'yi, kalsiyum salınımına ve aktif protein kinaz C'nin aktifleşmesine yardımcı olan PIP2'ye ve daha sonra diaçilgliserole hidroliz etmektedir (90).

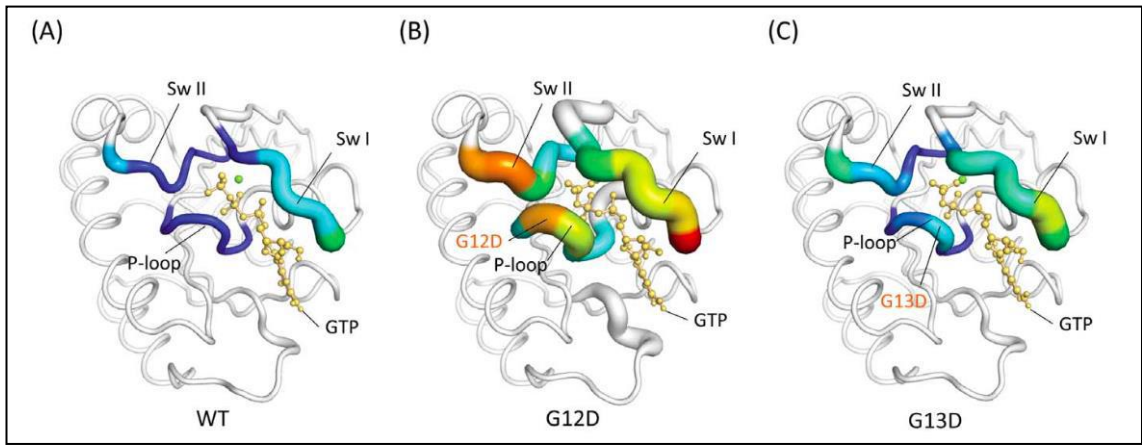


Şekil 2.9 Ras proteinin alt yolakları ()

2.2.4. Ras Mutasyonları

Ras proteini özellikle embriyonik dönemin aktif sürecinde önemli derecede rol alır. Yetişkin bir insanda kemik iliği gibi daima bölünen hücrelerde aktif şekilde bulunur. Bunun haricinde kanser hücrelerinde özellikle mitotik aktivite ve göç için ideal bir protein oluşturmaktadır. Bu sebeple *ras* proteinin üç formu, *K-ras*, *N-ras* ve *H-ras*, değişik kanser türlerinin farklı noktalarında 20 mutasyon gösterebilmektedir. *K-ras* geni akciğer kanserlerinin özellikle ekzon 1’inde kodon 12 ve 13’de P-loop bölgesinde mutasyon gösterir (Şekil 2.10). Ayrıca ekzon 2’nin kodon 61 bölgesinde switch I’de mutasyon göstermektedir. P-loop bölgesinde mutasyon sonucu her iki kodonda da glisinin yerine geçen aminoasitler daha büyük oldukları için GTP bağlanma bölgesine GTP bağlanmasından sonra GTP’nin hidrolizini konformasyonel olarak engeller ve sürekli aktif *K-ras* molekülü hücre içinde yer alır. Bu durum hastaların kötü prognozu

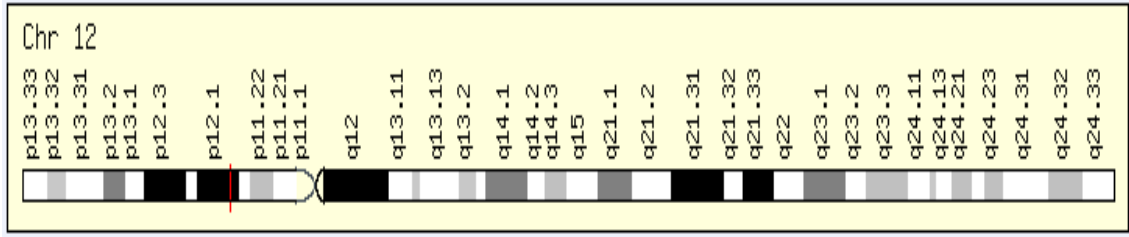
ile ilişkilidir. Ayrıca *K-ras* gen mutasyonuna sahip KHDAK hastalarının sağkalımı *K-ras* mutasyonu olmayanlara göre daha kısa olduğu tespit edilmiştir. *K-ras* mutasyonları KHDAK kanserlerinde skuamöz hücreli doku tipi ile sigara kullanımı ilişkilendirilmiştir. Özellikle sigara içerisinde bulunan benzamin türevleri ile ilişkili olduğuna dair raporlar bulunmaktadır. Aynı zamanda *K-ras* mutasyonu ve EGFR mutasyonuna sahip hastalarda EGFR-TKI ilaçlara karşı direnç oluştuğu belirlenmiştir (84).



Şekil 2.10 K-ras yaban tip ve mutant tiplerin konformasyonel görüntüsü A) yaban tip B) G12D mutasyonu C) G13D mutasyonu (85)

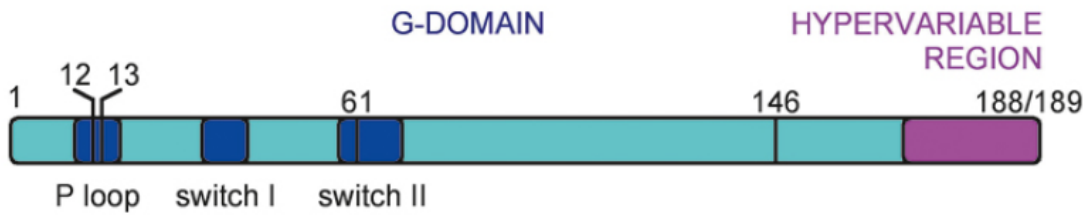
2.3. K-RAS (Kirsten Rat Sarkoma)

Ras gen ailesi üyelerinden olan *K-ras* geni, Kirsten Rat Sarkoma (Ki- veya K-Ras) viral onkogen homologudur (79). *K-ras* geni, 12. kromozomun 12p12.1 bölgesinde lokalize haldedir ve 6 ekzondan oluşmaktadır. *K-ras* geninde meydana gelen alternatif splicing sonucu iki mRNA izoformu oluşmaktadır (*K-ras4A* ve *K-ras4B*). *K-ras4B*, embriyonik ve yetişkin dokularında her zaman eksprese olurken, *K-ras4A* ekspresyonu kısıtlıdır ve yetişkin bireylerin kalp dokularında eksprese oldukları rapor edilmiştir (91). Küçük bir GTPaz olan *K-ras* proteini, 188-189 aminoasitten oluşmaktadır ve proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok yolda yer alan Ras/Raf/MAPK sinyal iletiminde anahtar olarak görev üstlenmektedir (79).



Şekil 2.11. *K-ras* geninin 12p12.1'deki lokalizasyonu (92).

K-ras geninde kodon 12 ve 13, GTP'nin bağlandığı P-loop bölgesinde yer almaktadır. Kodon 61'in lokalizasyonu ise, *Ras* regülatörlerinin ve efektörlerinin bağlanmasını kontrol eden 'switch II' bölgesinde yer almaktadır (Şekil 2.12). *K-ras* proteininin G domaini, yüksek derecede korunmuştur. Çok değişkenli bölge ise, aminoasit rezidülerinin membran lokalizasyonunu regüle etmektedir (93).



Şekil 2.12. *K-ras* geninin yapısı (93).

Ras gen ailesine ait mutasyon sıklığı kanser türlerine göre değişmekle birlikte, tüm kanserlerin yaklaşık % 30'unda *Ras* geninde nokta mutasyonu meydana gelmektedir ve oluşan bu mutasyonlar çoğunlukla *K-ras* geninde ortaya çıkmaktadır (6). KHDAK olgularının % 20-30'unda *K-ras* gen mutasyonu meydana gelmektedir ve *K-ras* nokta mutasyonları, bu gene ait spesifik kodonlarda oluşmaktadır. Bu nokta mutasyonları genellikle ekzon 1 bölgesindeki 12. ve 13. kodonda, ender olarak da ekzon 2 bölgesindeki 59. ve 61. kodonlarda meydana gelmektedir (6,94). KHDAK'lilerde, *K-ras* mutasyonlarının % 95'ten fazlasının kodon 12 ve 13'te ve % 80-90'ının ise sadece kodon 12'de olduğu belirtilmektedir (95). *K-ras* geninin kodonlarında meydana gelen nokta mutasyonları sonucu, eksprese olan *K-ras* proteinin konformasyonu değişir ve protein anormal şekilde GTPaz aktivitesi gösterir. Bunun sonucunda da, sürekli aktif halde bulunan protein, hücresel proliferasyon için durmadan uyarım yapar (96).

Histopatolojik alt tipler için tespit edilmiş *K-ras* mutasyon oranları genel olarak, adenokarsinom için % 22-34, skuamöz hücreli karsinomu için % 0-25, büyük hücreli karsinom için % 8-33 ve adenoskuamöz karsinom için % 8-11 aralığında farklılık göstermektedir (97). Yapılan araştırmalarda, *K-ras* mutasyonlarının Batı ülkelerinde daha fazla meydana geldiği, bunun tersine Asya kıtasındaki ülkelerde mutasyonun daha ender gözlemlendiği bildirilmiştir (98).

K-ras geninde meydana gelen mutasyonlarda, kodon 12 içinde en sık gözlenen tek baz çifti değişiminin G→T ve G→A şeklinde olduğu, ancak çoğunlukla G→T transversiyonunun gözlemlendiği belirtilmiştir (99). *K-ras* geninde kodon 12’de meydana gelen G→T transversiyonu (GGT→TGT), yani Glisin aminoasidinin Sistein aminoasidine dönüşmesiyle oluşmaktadır. Hem kodon 12 hem de kodon 13’ün ilk bazında meydana gelen nokta mutasyonu sonucu oluşan G→A transisyonu, Glisin aminoasidinin Serin aminoasidine dönüşmesiyle, diğer yandan her iki kodonun ikinci bazında oluşan G→A transisyonu ise Glisin aminoasidi yerine Aspartat aminoasidinin meydana gelmesiyle sonuçlanır (Çizelge 2.4). *K-ras* geninde sıklıkla oluşan bu iki tip nokta mutasyonunun, sigara ve sigaranın dumanında yüksek oranda bulunan benzo(a)piren ve N-nitrozamin gibi iki tip kimyasal karsinojenin etkisi sonucunda oluştuğu rapor edilmektedir (100).

Çizelge 2.4. *K-ras* geni kodon 12 ve 13’te meydana gelen nokta mutasyonlar

GGTGGC → (<i>K-ras</i> ekzon 1, kodon 12 ve 13)			
Protein	Aminoasit	Oluşan Mutasyonlar	
G12S	Glisin→Serin	GGTGGC → AGTGGC	12. Kodondaki Mutasyonlar
G12R	Glisin→Arjinin	GGTGGC → CGTGGC	
G12C	Glisin→Sistein	GGTGGC → TGTGGC	
G12D	Glisin→Aspartik asit	GGTGGC → GATGGC	
G12A	Glisin→Alanin	GGTGGC → GCTGGC	
G12V	Glisin→Valin	GGTGGC → GTTGGC	
G13S	Glisin→Serin	GGTGGC → GGTAGC	13. Kodondaki Mutasyonlar
G13R	Glisin→Arjinin	GGTGGC → GGTCGC	
G13C	Glisin→Sistein	GGTGGC → GGTTGC	
G13D	Glisin→Aspartik asit	GGTGGC → GGTTAC	
G13A	Glisin→Alanin	GGTGGC → GGTTCC	
G13V	Glisin→Valin	GGTGGC → GGTTTC	

KHDAK olgularında *K-ras* gen mutasyonları sıklıkla EGFR mutasyonları ile karşılaştırılmaktadır (94, 100). KHDAK'li hastalarda yapılan araştırmalarda, *EGFR* mutasyonları belirlenen olgularda *K-ras* mutasyonunun saptanamadığı belirtilmiştir. Ayrıca *K-ras* gen mutasyonuna sahip olguların, *EGFR* mutasyonuna sahip olgularına göre hayatta kalma sürelerinin daha kısa olduğu belirtilmektedir (105). *EGFR* mutasyonlarının aksine, *K-ras* genindeki mutasyona sahip KHDAK olgularında gefitinib ya da erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI) karşı primer direnç gözlenmektedir (94). Esas olarak *K-ras* mutasyonları, akciğer kanserinin tedavisinde uygulanacak TKI ve EGFR inhibitörlerinin hedef alındığı tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli sonuçlar sağlamaktadır (106).

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik bir DNA parçasının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak çoğaltılmasına dayalı in vitro bir işlemidir. Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin iki segment arasındaki baz dizilerinin komplementeri olan bir çift sentetik oligonükleotid (primer) kullanılarak sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesi temeline dayanır. PCR reaksiyonlarında DNA'nın iki zincirini yüksek ısı ile birbirinden ayırma işlemi (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanma işlemi (annealing) ve zincirin uzama işlemi (extension) kapsayan 3 esas basamak vardır ve çoğaltılmış ürün miktarı, teorik olarak bu üç adımın tekrarlanma sayısına dayanır (107,108).

a) Denatürasyon Evresi

Bu evrede çoğaltılmak istenen DNA'nın çift sarmallarını bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere uygun ısıyla denatüre edilir. Bu ısı genellikle 94-98 °C aralığında gerçekleştirilmektedir.

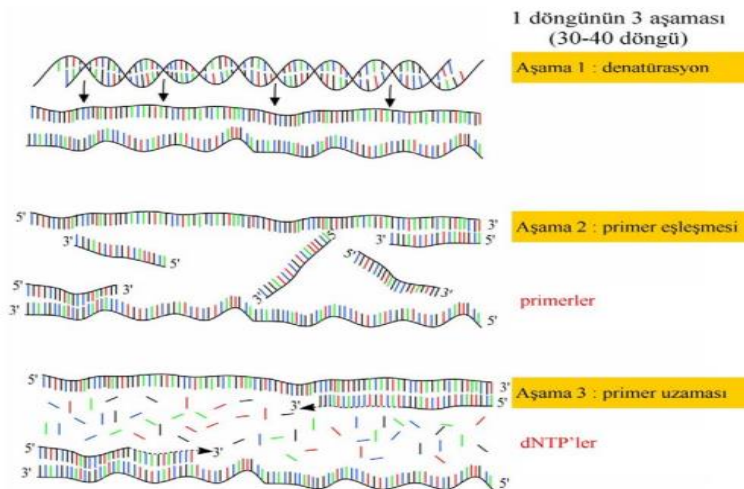
b) Primerlerin Bağlanma İşlemi (annealing):

Bu evrede primer olarak adlandırılan ve çoğaltılmak istenen DNA bölgesi için spesifik olan oligonükleotidler, ilk evrede oluşturulan DNA'nın tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisi ile hibridize (annealing) oluştururlar. Bunun için tepkime karışımı, hedeflenen DNA dizisine komplementer oligonükleotid

zincirler olan primerlerin yapışmasına olanak sağlayan bir ısıya düşürülür ve bu ısı da yaklaşık olarak 37-65 °C arasındadır. Primerler, hedef DNA sarmalının amplifikasyonunu başlatmak suretiyle kullanılır. Bu nedenle primer öncü olarak isimlendirilmişlerdir.

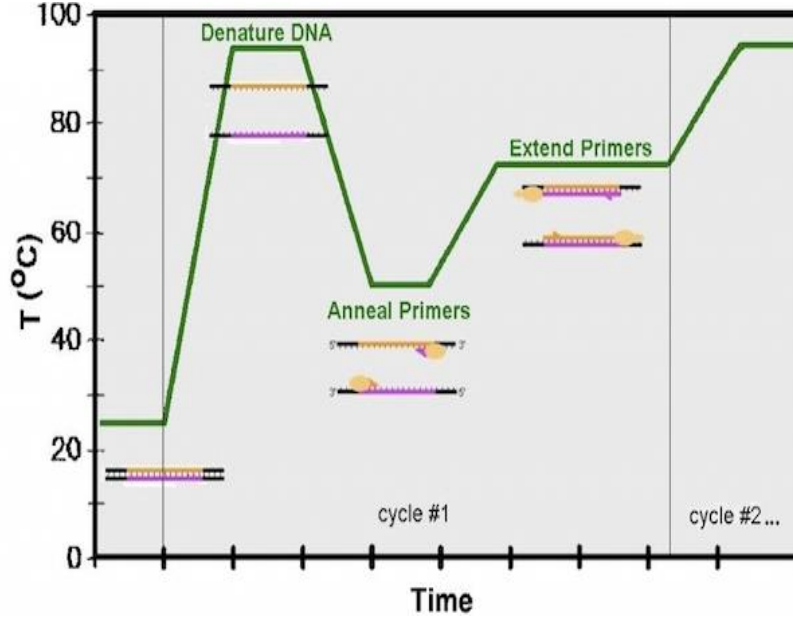
c) Primerlerin Uzatılması (extension) ve Amplifikasyon İşlemi:

Bu aşamada Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' yönüne doğru dNTP'leri ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyası elde edilir. Genellikle 70-75 °C aralığındaki sıcaklıkta gerçekleşen sentez aşamasında 1 dakikada yaklaşık 2 kb uzunluğundaki DNA bölgesini amplifiye etmektedir. Daha sonra gerçekleşen son sentez basamağı ise, ortalama 5-10 dakikada ve 1 döngü şeklinde gerçekleştirilir ve denatürasyon, yapışma (annealing) ve DNA sentezi döngüsü sonradan birçok kez tekrar edilir. Denatürasyon, annealing ve çift zincirli DNA sentezi basamaklarının tamamı bir PCR döngüsünü oluşturur. Bir döngü ortalama 3-5 dakika sürer ve 20-40 defa tekrarlanır. Amplifikasyonun tek bir döngüsünden oluşan ürünler sonraki döngü için kalıp işlevi gördüğünden her gerçekleşen döngü, esas olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, annealing ve sentez (extension) aşamaları ile DNA fragmentleri üssel olarak artış gösterir. Bu üssel artışın sebebi, her bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi görmesidir. Bu şekilde, her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin 2 katına çıkması ile sonuçlanır.



Şekil 2.13. PCR döngüsünün şematik gösterimi

Termostabil DNA polimerazlar ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen ‘termal cycler’ olarak adlandırılan cihazların kullanıma sunulması, PCR’in veriminde ve kullanımı için önemli gelişmelerin önünü açmıştır. Verimli bir PCR için döngü sayısı, kullanılan sıcaklığın derecesi ve süresinin ayarlanması oldukça önemlidir. Başlangıç evrede denatürasyon için genomik DNA gibi kompleks bir yapının ayrılmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar kullanılmaktadır. Fakat PCR sırasında genellikle etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu gösterilmiştir. Denatürasyonun ardından primerin bağlanma aşaması için erime ısısının (melting temperature-T_m) hesaplanması oldukça önemlidir. Primerlerin uzama aşamasında sıklıkla Taq/Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivesi için en uygun sıcaklık derecesi 72 °C olarak saptanmıştır ve toplam döngü sayısı genellikle 25-40 arasında gerçekleşir. Döngü sayısının arttırılması halinde istenmeyen ürünler artarken, çoğaltılması istenen ürünlerde herhangi bir artış olmamaktadır. Bu sebeple 40’dan çok sayıda döngüden oluşan PCR reaksiyonları genellikle başarılı sonuçlar vermez dolayısıyla bu siklus sayısının üzerinde çalışıldığı takdirde DNA polimerazın miktarı azaltılır. Taq DNA polimerazın yarı ömrü 97.5 °C’de 10 dk; 95 °C’de 40 dk şeklindedir (107). Bu nedenle PCR’in sonlarına doğru gelindikçe sikluslarda aktivitesi sınırlanmaktadır. Ayrıca PCR ortamındaki primerlerin bitmesi, dNTP konsantrasyonu gibi diğer sınırlayıcı etmenler de döngü sayısının ortalama 25-40 olarak tutulmasında belirleyici bir etkidir.



Şekil 2.14. PCR aşamalarının gerçekleştiği ortalama sıcaklık değerleri.

2.4.1. PCR'ın Temel Bileşenleri

2.4.1.1. Kalıp DNA

DNA polimerazın, polimerizasyon aktivitesini gerçekleştirebilmesi için ihtiyaç duyduğu yapılardan biri de kalıp DNA'dır. PCR işleminde genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. DNA, PCR ortamına tek ya da çift zincirli olarak eklenebilir. DNA'nın uzunluğu önemli bir faktör olmasa da genomik DNA gibi çok yüksek moleküler ağırlıklı DNA'lar bir restriksiyon enzimi ile kesilebilirler. PCR içeriği için gerekli olan DNA miktarını ayarlamak her zaman mümkün olmayabilir, bu yüzden bunu saptayabilmek için seri halde DNA konsantrasyonları hazırlanarak en uygun miktar belirlenebilir.

2.4.1.2. DNA polimeraz enzimleri

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe komplementer bir DNA ipliği oluşturmak üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dNTP'lerden uzun polinükleotid zincirin sentezini meydana getirirler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp

moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına yani primerlere ihtiyaç duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonunu gerçekleştirir. Termostabil enzimlerden en sık olarak kullanılan enzim, *Thermus aquaticus* türünden elde edilen **Taq DNA Polimeraz** enzimi olarak bilinir. Bunun dışında *Thermus aquaticus* türünden **Amplitaq**, *Thermus flavis* türünden **Hot Tub** ve **Protase**, *Thermus termophilus* türünden **Tth**, *Pyrococcus furiosus* türünden **Pfu** gibi diğer termostabil enzimler de kullanılabilir. Taq DNA polimerazın bazı enzimatik özellikleri arasında optimum sıcaklıkta (70-80°C) ve saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonunu gerçekleştirilmesi ve 5'→3' eksonükleaz aktivitesine sahip olması şeklinde sayılabilir (110).

2.4.1.3. Primerler

Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuarlardan veya ticari olarak tasarlanabilirler. Gen çoğaltılması dahil PCR'ın bir çok uygulama alanı için kalıp DNA'ya tamamen komplementer olan primerlere ihtiyaç vardır. Genellikle kalıp ile yüksek oranda bağlanma işlemi sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğunda olmaktadır. PCR'ın ortamındaki primer konsantrasyonu PCR verimliliği açısından oldukça önemlidir. Yüksek konsantrasyonda olmaları halinde istenen hedef DNA dizisi dışındaki bölgelerde de amplifike olmaya başlarlar. Bu da ortamda istenmeyen ürünlerin birikmesine sebep olur. Primer derişiminin gerekenden az olması halinde ise istenilenden çok daha az miktarda ürün elde edilerek PCR verimi düşer. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar öneme alınır. Bu bölgelere komplementer olacak olan primerler tasarlanmaktadır (107, 109).

2.4.1.4. Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP)

Deoksiribonükleotid trifosfatlar dATP, dGTP, dTTP ve dCTP olmak üzere 4 ana gruba ayrılır. Bunlar yüksek saflıkta ya tek tek veya dördü karışım halinde (dNTP mix) ticari olarak tasarlanabilirler. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında kalıp zincire uygun bazları seçmede oldukça başarılıdır. Ayrıca, her bir dNTP'nin birbirine eşit konsantrasyonda olması, olası yanlış eşleşmeleri engellemek açısından

oldukça önemlidir. dNTP derişimlerinin düşük olması, hedef olmayan bölgelerde hatalı oranını en aza düşürür ve hatalı birleşmiş nükleotidlerin uzama olasılığını azaltır. Bu nedenle PCR'ın özgülüğü ve verimi düşük konsantrasyonlardaki dNTP derişimi kullanılarak artırılır.

2.4.1.5. PCR Tamponu (PCR Buffer)

Genellikle kullanılan PCR tamponları, 10mM Tris-HCl ve 50mM KCl içeren tampondan oluşur. KCl'nin 50mM kadar olan derişimi primer yapışmayı kolaylaştırdığı için tepkime karışımına dahil edilmektedir fakat; fazla miktarda kullanılırsa, Taq DNA polimeraz etkisini engellemektedir. Dimetilsülfoksit (DMSO), PCR'ın verimliliğini artırır fakat % 10'luk DMSO'nun Taq DNA polimerazın etkisini % 50 oranında azaltması sebebiyle kullanımı aynı tepkimede birden fazla diziyi çoğaltan protokoller dışında önerilmemektedir. İçeriğinde uygun derişimlerde Mg^{+2} iyonu bulunan tamponlar bulunmakla birlikte çoğu zaman PCR ortamına ayrıca ilave edilmektedir. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözülebilen kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve primer kalıp etkileşimini uygun hale getirirler. Bu nedenle Mg^{+2} 'un PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde oldukça büyük bir etkisi vardır. Genellikle optimum konsantrasyonu olarak 1-1.5 mM'lık değerler tercih edilmektedir. Düşük konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine neden olmaktadır. PCR'da Mg^{+2} içeren tamponlar kullanılıyorsa ayrıca Mg^{+2} eklenmesine ihtiyaç yoktur (107). Bir PCR reaksiyonu için optimum koşulların sağlanması özgül ve verimli bir reaksiyon için önemlidir. Ancak her zaman maksimum özgülük için hazırlanan bu optimum koşullar yüksek verimle oluşturmayabilir. Bu durum PCR'ın verimini olumsuz yönde etkileyecek şartların bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu koşullar aşağıdaki gibi sayılabilir:

- ✓ Ortamda RNA seviyesinin yüksek olması.
- ✓ EDTA'nın ortamda yüksek konsantrasyonda bulunması (EDTA'nın Mg^{+2} 'ye bağlanma özelliği vardır).
- ✓ Ortamda heparin bulunması
- ✓ Ortamda fenol kalıntısının bulunması.
- ✓ DMSO'nun ortamda % 10'luk konsantrasyonda olması.

2.4.2. PCR'ın Kullanım Alanları

PCR tekniği araştırmacı Kary Mullis tarafından 1985' te bulunmuş ve günümüze kadar birçok çalışma için hala yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR; ilk defa, aynı yıl R. Saiki, K. Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya sokulmuştur. 1993 yılında bu çalışma Kary Mullis'e Nobel ödülünü kazandırmıştır. PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir. PCR'ın kullanım alanları;

- ✓ DNA' nın dizi analizi ve DNA haritalamasında
- ✓ Genetik hastalık teşhisinde (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, AIDS, lösemi v.b.)
- ✓ DNA parmak analizinde
- ✓ İnsan evrimi araştırmalarında
- ✓ İnsan Genom Projesi'ndeki araştırmalarda
- ✓ Allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde
- ✓ Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi
- ✓ Tarımda (tohum saflığının belirlenmesi)
- ✓ Sistemik ve evölüsyon çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde) önemli rol oynamaktadır (112).

2.5. Jel Elektroforez Tekniği

Jel elektroforezi, birçok önemli makromolekülleri (aminoasitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) büyüklük, elektrik yükü ve diğer fiziksel özellikler esasında ayıran bir yöntemdir. Elektro kelimesi elektrik anlamına karşılık gelmekle beraber, forez kelimesi karşıya geçirmek/taşımak anlamına gelmektedir. Elektroforez, yüklü partiküllerin elektrik akımı etkisi altında hareketini açıklamaktadır. Yani elektrik varlığında hareketlenen moleküllerin jel boyunca karşı tarafa hareket ettiği bir tekniktir. Bunun için gerekli olan güç, jelin her iki ucunda bulunan elektrotlara

uygulanan voltajdan ibarettir ancak bir elektrik alanının molekülü jel ortamında hangi hızla hareket ettireceği molekülün özelliklerine bağlıdır. Biyolojik makromoleküller iyonlaşabilen gruplara sahiptirler ve pH'ya bağlı olarak katyon (+) veya anyon (-) konumunda çözeltide elektrik yükü taşıyan türler halinde bulunurlar. Yüklü partiküller katoda ya da anoda doğru hareket ederler ve elektrik alanının uygulandığı jel nötral pH'da olduğu sürece DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları anoda doğru hareket edecektir. Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayırımı, tanımlanması ve saflaştırılmasında kullanılabilen ve DNA fragmanlarını hızlı bir şekilde çözebilme yeteneğine sahip olan bir yöntemdir. DNA'nın konumu belli konsantrasyonlarda floresan veren etidyum bromür ile boyandığında belirlenebilir (113).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastaları ile kontrol grubu arasındaki *K-ras* geni kodon 12 ve kodon 13 gen mutasyonlarının tespit edilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, deney grubumuz Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalında KHDAK tanısı almış 90 kişiden oluşmuştur. Kontrol grubu ise deney grubumuzla paralel yaş ve cinsiyet özellikleri göz önünde tutularak seçilen 96 kişiden oluşmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden DNA izolasyonu için 6-7 ml'lik venöz kan alınarak %2'lik etilendimetiltetraasetik asit (EDTA) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konulmuş olup DNA izolasyonuna kadar -20°C'de saklanmıştır. DNA izolasyonu PureLink™ Genomic DNA Kit ile yapıldı. Elde edilen DNA'lardan *K-ras* geni exon 1 kodon 12 ve kodon 13 mutasyonlarına ait gen bölgeleri PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile amplifiye edildikten sonra Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi uygulandı. Elde edilen PCR/RFLP ürünleri elektroforez ile görüntüledikten sonra saptanan polimorfizm verileri istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- ✓ Termal Cykler (Techne Progene, Cambridge, UK)
- ✓ Elektroforez Tankı (Midicell EC-350)
- ✓ Elektroforez Güç Kaynağı (EC-135-90)
- ✓ Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallee, France)
- ✓ Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- ✓ Santrifüj (Nüve NF-800)
- ✓ Etüv (Nüve EN-500)
- ✓ Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- ✓ Vorteks (VELP)
- ✓ Hassas Terazî (AND)
- ✓ Mikropipet Seti (Eppendorf)
- ✓ Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)

- ✓ Mikrodalga Fırın (Alaska)
- ✓ Derin Dondurucu (Arçelik-2031D)
- ✓ Buzdolabı (Arçelik-8188 NF)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ✓ EDTA (Sigma E-5134)
- ✓ Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- ✓ Tris Base (Sigma T-6066)
- ✓ Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- ✓ Ethidyum Bromide (Sigma E-1510)
- ✓ Orange G (Sigma O-3756)
- ✓ Gliserol (Merck 4091)
- ✓ Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- ✓ Agaroz (LE Prone Basica 051342 PR)
- ✓ Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas EP 0402)
- ✓ Proteinaz K (MBI Fermentas E00491)
- ✓ Gene Ruler 20bp DNA Ladder (MBI Fermentas SM0371)
- ✓ 2 mM dNTPmix (MBI Fermentas R0242)
- ✓ 10X PCR Buffer with (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas #B33)
- ✓ Bidistile Su (Sigma W-3500)
- ✓ BstNI 3000U(MBI Fermentas ER0661)
- ✓ HaeIII 3000U(MBI Fermentas ER2001)
- ✓ Primerler;

G/T *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonu için;

F: 5'- ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'

R: 5'- CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCAGTA-3

G/A *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonu için;

F: 5'- GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAA-3'

R: 5'- GTATCGTCAAGGCACTCTTGCCTAGG-3'

3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.3.1. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

I. 10XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

- ✓ Tris Base.....108 gr
- ✓ Borik asit 54.8 gr
- ✓ EDTA.....5.44 gr

Distile su ile 1lt'ye tamamlanarak çözüldü.

II. Elektroforez Yürütme Tamponu

10X TBE tamponundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE içerisine 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde etidyum bromid (EtBr) konularak hazırlandı.

III. Orange G çözeltisi

- ✓ Na₂ EDTA.....2.232 gr
- ✓ Orange G.....200 mg

60 ml Gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solüsyon içerisinde çözüldü.

IV. % 2'lik Agaroz Jel Çözeltisi

300 ml 1X TBE tamponu içerisinde 6 gr agaroz (Agarose plus) mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr eklenerek hazırlandı.

3.1.4. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Hasta grubu, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı tarafından küçük hücreli dışı akciğer kanseri teşhisi konmuş, 40-80 yaş aralığındaki 86 bireyden; kontrol grubu ise herhangi bir hastalığı olmayan 96 sağlıklı bireyden ve kontrol grubu hasta grubuyla sayı ve cinsiyet dağılımı açısından uyumlu olacak şekilde oluşturulmuştur. Çalışmaya başlamadan önce Mersin Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylere ait bilgiler, etik kurul tarafından

belirtilen onam formları kullanılarak alınmıştır. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyin onayı alındıktan sonra, 6-7 ml periferik kanlar alınarak 1 ml, % 2'lik EDTA içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerinde muhafaza edilmiştir.

3.1.5. DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın moleküler analizi için yapılması gereken ilk adım olan DNA izolasyonu, nükleuslu hücrelere sahip olan periferik kan hücreleri, kemik iliği, koryonik villus sıvısı (CVS), amniyon sıvısı, biyopsi materyali, saç teli veya herhangi bir dokudan elde edilebilmesi için birçok farklı yöntemler bulunmaktadır.

DNA'nın saf eldesi için 3 basamak bulunmaktadır:

1. Birinci basamak genomik DNA'ya ulaşmak için hücre duvarının parçalanması
2. DNA'nın protein komplekslerinden ve diğer moleküllerden denatürasyon ile birbirinden ayrılması
3. DNA'nın protein, RNA ve diğer makromoleküllere enzimatik veya kimyasal reaksiyonlar yoluyla ayrılması.

Nükleustaki DNA'ya ulaşmak için ilk etapta hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Bu parçalama fiziksel ve kimyasal yollarla yapılabilir. Fiziksel olarak ısıtılan hücreler aynı zamanda kimyasal karışımlara maruz bırakılarak hücre membranının parçalanması sağlanır. Bu kimyasal kimyasal karışım içindeki tuz, membrandan geçerek proteinleri DNA'dan ayırır. Deterjan ise membranın geçirgenliğini artırarak hücre içeriğinin serbest kalmasına sebep olur. EDTA magnezyumu bağlayarak DNaz aktivitesini inhibe eder ve daha sonrasında DNA stabil halde kalabilir. Proteolitik enzimler ise hücrenin protein içeriğini parçalayarak, sonraki aşamalar açısından homojen bir karışım eldesini sağlamaktadırlar. Hücre içinde bulunan RNA'lar tek iplikçik halde stabil kaldıklarından dolayı onların da ortamdan uzaklaştırılması için de RNaz enzimi kullanılır.

DNA protein kompleksinin çözülmesinde kullanılan yöntem denatürasyon işlemine dayanmaktadır. Ancak günümüzde daha çok DNA'yı tutma özelliklerine sahip spin kolonları geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem için çoğunlukla fenol ekstraksiyonu tercih edilmekte ve proteinlerin fenolle denatüre edilerek ortamdan

uzaklaştırılmaları sağlanır. Bu yolla fenol ile proteinler ve DNA fragmanları birbirinden ayrılır. Spin kolonlarının kullandığı fiziksel çözülmede ise, özel solüsyonlar sayesinde DNA'nın tüpler içine özel olarak yerleştirilen matriks tabakasına tutunması sağlanır. Aynı aşamada DNA dışındaki moleküller matrikse tutunamadığı için ortamdan uzaklaşırlar. Spin kolonlar belirli solüsyonlar ile yine DNA dışındaki maddelerin tamamen uzaklaşması için 'yıkama' denilen işleme maruz bırakılırlar. Son aşamada ise DNA ile matriksi birbirinden ayıran solüsyonların kullanıldığı 'Elüsyon' aşaması vardır ve bu aşama ile birlikte DNA son halini almakta ve izole edilmektedir.

3.1.6. DNA İzolasyonunda İzlenen Yol

Yaptığımız çalışmada hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden 6-7 ml periferik kan alındıktan sonra içerisinde 1 ml EDTA bulunan 15 ml' lik plastik tüplerde -20 °C' de muhafaza edilmiştir. Ayrıca her birey için özel protokol numarası kaydedilmiştir. Her bireye ait 200 µl periferik kan, 1,5 ml'lik steril santrifüj tüplerine eklenerek aşağıdaki yöntemler uygulanmıştır:

- ✓ Steril santrifüj tüpü içerisine 200µl periferik kan pipetlendikten sonra üzerine 400µl Lysis Solüsyonu ve 20µl Proteinaz K Solüsyonu eklendi, vorteksenerek karışması sağlandı,
- ✓ Örnekler su banyosunda 10 dakika 56 °C'de inkübasyona tabi tutuldu,
- ✓ İnkübasyon süresi tamamlanan örneklerin üzerine 200µl % 96'lık etanol eklendi ve vorteksenerek karıştırıldı,
- ✓ Hazırlanan karışım 2ml'lik toplama tüpüne konularak kolonlara aktarıldı ve 6000 rpm'de 1dakika santrifüj edildi ve daha sonra toplama tüpü atılarak kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi,
- ✓ Kolon üzerine 500 µl Wash Buffer I ekleyip pipetledikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak kolon tekrar yeni tüpe yerleştirildi,
- ✓ Kolon üzerine 500 µl Wash Buffer II eklenip pipetlendi ve maksimum hızda (>12000rpm) 3dk santrifüj edildi ve toplama tüpü atılarak kolon 1,5ml'lik steril saklama tüpüne yerleştirildi,
- ✓ Kolon üzerine 200µl Elution Buffer eklendi ve 2dk oda ısısında bekletildikten sonra 8000rpm'de 1 dk santrifüj edildi,

- ✓ Kolon atıldıktan sonra elde edilen DNA moleküler analizine kadar +4 °C’de saklandı.

3.2. Moleküler Analiz

3.2.1. *K-ras* Geni Ekzon 1 Kodon 12 ve 13 Mutasyonunun Özgül Primerlerle Amplifikasyonu

K-ras geninde ekzon 1 bölgesindeki kodon 12 ile 13 gen mutasyonları ayrı ayrı değerlendirildi. PCR ortamı 1500 µl’lik steril ependorf tüpünde hazırlandı. Herbir örnek için PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı:

Bidistile su.....	16 µl
10X PCR Buffer (without MgCl ₂).....	2,5 µl
2 mM dNTPmix	2,5 µl
Primer (F)	0,5µl
Primer (R)	0,5µl
MgCl ₂	2 µl
DMSO	2 µl
Taq DNA Polimeraz	0,3µl
Kalıp DNA	3µl

3.2.2. *K-ras* Geni Ekzon 1 Kodon 12 ve 13 Mutasyonuna Ait Primerler

K-ras geninde ekzon 1 bölgesindeki kodon 12 ile kodon 13’ün PCR analizi için kullanılan primer dizileri aşağıda verilmektedir:

Çizelge 3.1. *K-ras* geni kodon 12 ve kodon 13’e ait primer dizileri

Primerler	Sekansları	Uzunluk
<i>K-ras</i> Kodon 12 (G/T)		
Forward Primer	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT-3'	30
Reverse Primer	5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCAGTA-3'	29
<i>K-ras</i> Kodon 13 (G/A)		
Forward Primer	5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAA-3'	30
Reverse Primer	5'-GCATCGTCAAGGCACTCTTGCCTAGG-3'	26

K-ras geninin amplifiye edilen ekzon 1 bölgesinin kodon 12’deki (162 bp) ve baz dizisi ve primerlerin yerleşimi şekil 3.1’de, *K-ras* geninin amplifiye edilen ekzon 1 kodon 13’teki (159 bp) bölgesinin baz dizisi ve primerlerin yerleşimi şekil 3.2’de verilmektedir.

GAGGGTGTGCTACAGGGTGTAGAGCACTGTGAAGTCTCTACATGAGTGAAGT
CATGATATGATCCTTTGAGAGCCTTTAGCCGCCGCAGAACAGCAGTCTGGCTA
TTAGATAGAACAACCTTGATTTTAAGATAAAAGAACTGTCTATGTAGCATTTAT
GCATTTTTCTTAAGCGTCGATGGAGGAGTTTGTAATGAAGTACAGTTCATTA
CGATACACGTCTGCAGTCAACTGGAATTTTCATGATTGAATTTTGTAAGGTATT
TTGAAATAATTTTTTCATATAAAGGTGAGTTTGTATTAAAAGGTACTGGTGGAG
TATTTGATAGTGTATTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTC
ATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATG**ACTGAATATAAACTTGTGGTAGT**
TGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAAT
CATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATATGC
ATAT**TACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAG**ATAAAGGTTTCTCTGACCATT
TTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTAAGTTATCTGAAATG
TACCTTGGGTTTCAAGTTATATGTAACCATTAAATATGGGAACCTTTACTTTCCTT
GGGAGTATGTCAGGGTCCATGATGTTCACTCTCTGTGCATTTTGATTGGAAGT
GTATTTCAAGAGTTTCGTGAGAGGGTAGAAATTTGTATCCTATCTGGACCTAAA
AGACAATCTTTTTATTGTAACCTTTATTTTTATGGGTTTCTTGGTATTGTGACAT
CATATGTAAAGGTTAGATTTAATTGTACTAGTGAAATATAATTGTTTGATGGTT
GATTTTTTTAAACTTCATCAGCAGTATTTTCCTATCTTCTTCTCAACATTAGAG

Şekil.3.1. *K-ras* genine ait kodon 12 bölgesi (Sarı renk: Forward primer; Mavi renk: Reverse primer)

AGAGGTGGGGGTCCACTAGGAAAACCTGTAACAATAAGAGTGGAGATAGCTG
TCAGCAACTTTTGTGAGGGTGTGCTACAGGGTGTAGAGCACTGTGAAGTCTC
TACATGAGTGAAGTCATGATATGATCCTTTGAGAGCCTTTAGCCGCCGCAGAA
CAGCAGTCTGGCTATTTAGATAGAACAACCTTGATTTTAAGATAAAAGAACTGT
CTATGTAGCATTATGCATTTTTCTTAAGCGTCGATGGAGGAGTTTGTAATGA
AGTACAGTTCATTACGATACACGTCTGCAGTCAACTGGAATTTTCATGATTGA
ATTTTGTAAGGTATTTTGAAATAATTTTTCATATAAAGGTGAGTTTGATTAAA
AGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAAACCTTATGTGTGACATGTTCTAA
TATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATAT
AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATAC
AGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAAT
CTTGTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAAG
GTTTCTCTGACCATTTTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTT
AAGTTATCTGAAATGTACCTTGGGTTTCAAGTTATATGTAACCATTAATATGGG
AACTTTACTTTTCTTGGGAGTATGTCAGGGTCCATGATGTTCACTCTCTGTGC
ATTTTGATTGGAAGTGTATTTTCAGAGTTTCGTGAGAGGGTAGAAATTTGTATC
CTATCTGGACCTAAAAGACAATCTTTTATTGTAACTTTTATTTTATGGGTTTC

Şekil.3.2. K-ras genine ait kodon 13 bölgesi (Pembe renk: Forward primer; Yeşil renk: Reverse primer)

K-ras ekzon 1 kodon 12 ve 13 gen bölgelerinin ampifikasyonu için uygulanan PCR yönteminde aşağıdaki prosedür uygulandı.

1. Yukarıda belirtilen miktarlarda ve her bir ekzon için özgül primerler kullanılarak steril bir ependorf tüp içinde hazırlanan PCR karışımı, üzerinde her bireye ait protokol numarası bulunan 0.5 ml'lik steril ependorf tüplerine eşit miktarlarda (26,3 µl) konuldu.
2. Her tüpe, ait olduğu bireyin DNA'sından 3 µl eklendikten sonra tüpler thermal cycler cihazında (Techne PTC) amplifiye edildi.

Thermal Cycler'da Kodon 12 ve Kodon 13 için PCR koşulları aşağıdaki gibidir:

Çizelge 3.2. K-ras geni Kodon 12 için PCR koşulları

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre
Pre-inkübasyon				
	1		95 °C	10 dk
Amplifikasyon				
	30	Denatürasyon	95 °C	1 dk
		Annealing	60 °C	1 dk
			72 °C	1 dk
		Ekstensiyon	72 °C	2 dk

Çizelge 3.3. *K-ras* geni kodon 13 için PCR koşulları

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre
Pre-inkübasyon				
	1		95 °C	10 dk
Amplifikasyon				
	30	Denatürasyon	95 °C	1 dk
		Annealing	50 °C	1 dk
			60 °C	1 dk
		Ekstensiyon	72 °C	2 dk

3.2.3. Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi

G/T *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 12 mutasyonunun belirlenmesinde BstNI, G/A *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 13 gen mutasyonunun belirlenmesinde HaeIII restriksiyon enzimleri kullanıldı. Bu enzimlerin optimum aktivasyon gösterdikleri tamponlar ise sırasıyla BstNI için 1X Buffer Tango [33mM Tris-acetate (pH 7.9), 10mM magnesium acetate, 66mM potasium acetate, 0.1mg/ml BSA], HaeIII için 1X Buffer R [10mM Tris- HCl (pH 8.5), 10mM MgCl₂, 100mM KCL, 0.1mg/ml BSA]

G/T *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 12 mutasyonunu ve G/A *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 13 mutasyonunu için hazırlanan kesim reaksiyonu karışımları aşağıda verilmektedir:

G/T *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 12 için RFLP karışımı:

- ✓ dH₂O.....9.5 µl
- ✓ Buffer Tango.....2.5 µl
- ✓ BstNI.....0.3 µ

G/A *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 13 için RFLP karışımı:

- ✓ dH₂O.....9.5 µl
- ✓ Buffer R.....2.5 µl
- ✓ HaeIII.....0.5 µl

3.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Hazırlanan bu reaksiyon karışımı vortekslendikten sonra her bir örneğe 12'şer µl olacak şekilde bölündü ve kısa süre için vortekslendi. BstNI enzimi ve HaeIII enzimi ile kesilen örnekler 37°C' de 1-16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüm örnekler % 3' lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu ve jel görüntüleme sistemi ile genotipler belirlendi. Amplifiye edilen ve RFLP uygulanan PCR ürünlerinin uzunluğunu belirlemek için aşağıdaki prosedüre göre hazırlanan agaroz jel elektroforezi uygulandı.

Her iki polimorfizm için de 9 g agaroz ve 300 ml 1X TBE solüsyonu bir beher içerisine konulup, mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar ısıtıldı. Daha sonra elektromanyetik karıştırıcıda yaklaşık 200 dev/dk, 10-15 dk biraz soğuyana kadar karıştırıldı. Karıştırma işlemi devam ederken 27 µl, 10 mg/ml'lik EtBr eklendi. Jel uygun ısıya düşünce, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine dikkatlice döküldü. Bu işlem sırasında özellikle jelde hava kabarcığı kalmamasına ve EtBr son derece kanserojen bir madde olduğu için jelin buharıyla mümkün olduğu kadar temas etmemeye dikkat edildi. Jel tamamen katılaştıktan sonra, dikkatlice taraklardan ayrılıp elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ile amplifiye edilen örneklerin her birine 10 µl Orange-G çözeltisi eklenip birkaç saniye santrifüjde 3500 rpm'de çevrildi. Bu işlemi takiben her bir örnek bir mikropipet ile elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırayla bırakıldı. Örneklerin ilk sırasına 8µl marker bırakıldı. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak elektroforez cihazı, güç kaynağından 120 volt akım geçecek şekilde ayarlandıktan sonra çalıştırıldı ve örnekler yaklaşık 30-40 dk yürütüldü. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi sırasında, G/T ekzon 1 kodon 12 ve G/A ekzon 1 kodon 13 gen bölgesinin belirlenmesi için moleküler ağırlık markeri olarak 8µl, Gene Ruler 20bp DNA Ladder (Fermantas) kullanıldı.

3.2.5. Genotiplendirme

PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez jeli, jel görüntüleme sisteminde 260 nm dalga boyundaki UV ışıktaki görüntülendi. UV ışıktaki görünür hale gelen DNA bantlarının büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak saptandı. G/T *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 12 mutasyonu yapılan elektroforez sonucunda gözlenen bantların

uzunlukları 107 bp ve 77 bp olarak belirlendi. Çizelge 3.4'te bant bölgelerinin genotipleri ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. G/T *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 bölgesi için görülen genotipler.

K-ras Kodon 12	Wild Tip	Heterozigot	HomozigotMutant
77 bp	GG	-	-
107-77 bp	-	GT	-
107 bp	-	-	TT

G/A *K-ras* geni ekzon 1 bölgesindeki kodon 13 mutasyonu için yapılan elektroforez sonucunda gözlenen bantların uzunlukları 85bp, 74bp, 48bp olarak belirlendi. Çizelge 3.5'te bant bölgelerinin genotipleri ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

Çizelge 3.5. G/A *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 bölgesi için görülen genotipler.

K-RAS Kodon 13	Yabanıl Tip	Heterozigot	Mutant
85-48-26 bp	GG	-	-
85-74-48 bp	-	GA	-
85-74 bp	-	-	AA

3.3. İstatistiksel Analiz

K-ras gen mutasyonlarının küçük hücreli dışı akciğer kanseri ile arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla uygulanan istatistiksel testler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapılmıştır. Hasta ve kontrol grubunun örneklem sayısının belirlenmesi için 'Power

analizi” yöntemi kullanılmıştır. Yaş bakımından gruplar arasında bir farklılık olup olmadığının incelenmesi amacıyla ‘Independent Samples t test’ kullanılmıştır. Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri ‘Ki-kare’ veya ‘Likelihood ratio’ testleri ile incelenmiştir. Genotipler bakımından hasta ve kontrol gruplarının ‘Hardy-Weinberg’ dengeleri kontrol edilmiştir. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verilmiştir. İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapılmış, istatistik analizlerde $p<0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bulgularımız; öncelikli olarak KHDAK hastalarımızın histolojik doku tiplerine göre oransal dağılımı ve KHDAK'ne yakalanmada diğer risk faktörlerinden ileri yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı değerlendirildi. Devamında ise KHDAK hastalarında, *K-ras* geninin 1. ekzondaki kodon 12 ve kodon 13 mutasyon sıklığı ve KHDAK'ne yakalanmada olası etkileri ve diğer risk faktörlerinde cinsiyet, ileri yaş ve sigara kullanımının kombine etkilerine dair bulgular değerlendirilmiştir.

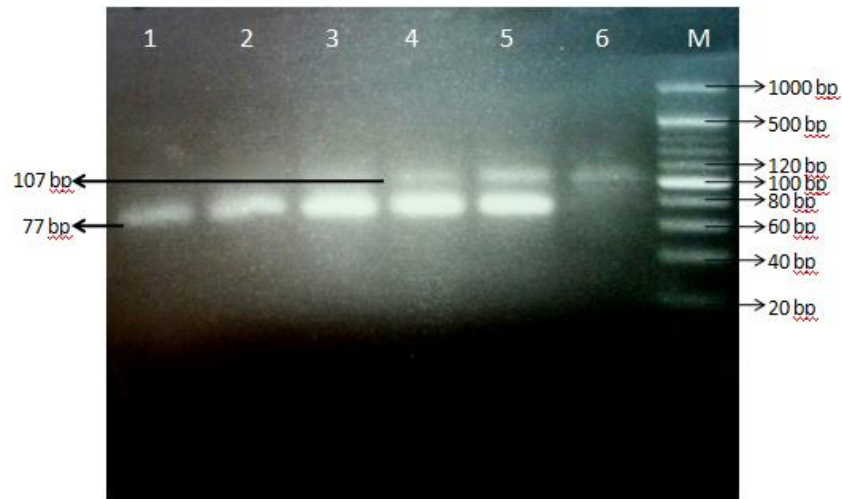
4.1. KHDAK Görülme Oranlarının Histopatolojik, Yaş ve Cinsiyet Gruplarına Göre Dağılımı

KHDAK hastalarının histopatolojik doku tiplendine göre dağılımı; 28'i (% 31,1) adenokarsinom ve 15'i (% 16,7) skuamöz hücreli karsinom şeklindedir. KHDAK hastalarından oluşan deney grubumuzun yaş ortalaması 60,16 olup 78'i erkek ve 12'si kadın olmak üzere toplam 90 kişidir. Kontrol grubunun yaş ortalaması 58,04 olup 81'i erkek 15'i kadın olmak üzere toplam 96 kişidir.

KHDAK hastalarından oluşan deney grubumuzun yaş ortalaması 60,16; kontrol grubunun yaş ortalaması ise 58,04 tür. KHDAK'lı hastalarımız ≤ 40 , 40-49, 50-59, 60-69 ve ≥ 70 olmak üzere beş yaş grubundaki dağılımı incelendiğinde; 3 kişinin (% 3,3) 40 yaş altında, 5 kişinin (% 5,6) 40-49 yaşında, 37 kişinin (% 41,1) 50-59 yaşında 31 kişinin (% 34,4) 60-69 yaşında ve 14 kişinin (% 15,6) 70 yaş üzerinde) oldukları belirlendi ($p < 0,05$).

4.2. KHDAK Hastalarında *K-ras* Ekzon 1 Geni Kodon 12 Mutasyonuna Ait Allel ve Genotip Oranları.

KHDAK'lı deney ve kontrol grubuna ait bireylerin genotip oranları incelendiğinde; GG yabanıl genotip oranı kontrol grubunda % 71,9 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 28,9; GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubunda %16,7 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 28,9; TT homozigot mutant genotip oranı ise kontrol grubunda % 11,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 42,2 şeklinde daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonuna ait genotiplerin RFLP sonrası elektroforez jel görüntüsü. (Marker 20 bp) 1-3 numaralı örnekler GG, 4,5 numaralı örnekler GT, 6 TT genotipi.

KHDAK'lı deney ve kontrol grubuna ait bireylerin allel sıklıkları incelendiğinde ise; G yabancıl alleli kontrol grubunda %80,2 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 43,3; T mutant alleli kontrol grubunda % 19,8 iken KHDAK'lı hasta grubunda bu oran % 56,7 olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *K-ras* geni Ekzon 1 kodon 12 mutasyonlarının allel ve genotip oranlarının kontrol grubu ve KHDAK'lı hastalar arasındaki dağılımı.

K-RAS KODON 12		KONTROL N (%)	KHDAK N (%)	P	OR	GÜVEN ARALIĞI	P
Genotip Sıklığı	GG	69 (71,9)	26 (28,9)	<0,001	1,00	-	-
	GT	16 (16,7)	26 (28,9)		4,31	2,00-9,30	<0,001
	TT	11 (11,5)	38 (42,2)		9,17	4,08-20,58	<0,001
Allel Sıklığı	G	154 (80,2)	78 (43,3)	<0,001	5,30	3,34-8,41	<0,001
	T	38 (19,8)	102 (56,7)				

4.3. *K-ras* Ekzon 1 Geni Kodon 12 Mutasyonunun Allel ve Genotip Oranlarının Cinsiyetlere Göre Dağılımı

KHDAK hasta örneklemimiz 78 erkek ve 12 kadından oluşmaktadır. Yani KHDAK erkek cinsiyette daha sık görülmektedir ($p<0.001$). *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun genotip oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde; GG yabanıl genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 66,7 iken, KHDAK'lı kadınlar için bu oran % 33,3; kontrol grubu erkeklerde % 72,8 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 28,2; GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 26,7 iken; KHDAK'lı kadınlar için bu oran %33,3; kontrol grubu erkeklerde % 14,8 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 28,2; TT homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 6,7 iken, KHDAK'lı kadınlar için bu oran %33,3; kontrol grubu erkeklerde % 12,3 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 43,6 olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

K-ras geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun allel oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde; G yabanıl alleli kontrol grubu kadınlarda % 80,0 iken, KHDAK'lı kadınlarda bu oran % 50,0; kontrol grubu erkeklerde % 80,2 iken, KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 42,3 olarak bulunmuştur. T mutant alleli kontrol grubu kadınlarda % 20,0 iken, KHDAK'lı kadınlarda % 50,0; kontrol grubu erkeklerde % 19,8 iken, KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 57,7 olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Kontrol ve KHDAK'lı hasta gruplarındaki *K-ras* geni Ekzon 1 kodon 12 mutasyonlarının allel ve genotip sıklıklarının cinsiyete göre dağılımına ait genel bulgular.

K-RAS KODON 12		ERKEK		P		KADIN		P
		KONTROL N (%)	KHDAK N (%)			KONTROL N (%)	KHDAK N (%)	
Genotip Sıklığı	GG	59 (72,8)	22 (28,2)	<0,001	GG	10 (66,7)	4 (33,3)	0,119
	GT	12 (14,8)	22 (28,2)		GT	4 (26,7)	4 (33,3)	
	TT	10 (12,3)	34 (43,6)		TT	1 (6,7)	4 (33,3)	
Allel Sıklığı	G	130 (80,2)	66 (42,3)	<0,001	G	24 (80,0)	12 (50,0)	0,042
	T	32 (19,8)	90 (57,7)		T	6 (20,0)	12 (50,0)	

KHDAK'lı deney ve kontrol gruplarındaki *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonlarının genotip sıklıklarının cinsiyete göre OR değeri hesaplandığında; *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonu için GT genotipine sahip olan erkeklerin KHDAK'ne yakalanma riski 4,92 kat daha fazladır (OR=4,92 (2,09-11,58)). Mutant TT genotipine sahip olan erkeklerin KHDAK'ne yakalanma riski 9,12 kat daha yüksektir. KHDAK'lı deney ve kontrol gruplarındaki *K-ras* geni kodon 12 mutasyonlarının allel sıklıklarının cinsiyete göre OR değeri hesaplandığında; Mutant T alleleline sahip olan erkeklerin KHDAK'ne yakalanma riski 5,54 kat daha yüksektir (OR=5,54 (3,36-9,14)). Kadınlarda *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonu için ise, KHDAK'lı hasta grubunda T alleleline sahip olanların küçük hücreli dışı akciğer kanserine yakalanma riski kontrol grubuna göre 4 kat daha yüksektir (OR=4,0 (1,20-13,28)).

4.4. Sigara Kullanım Durumuna Göre *K-ras* Ekzon 1 Geni Kodon 12 Mutasyonlarına Ait Allel ve Genotip Dağılımları

Sigara kullanmayanlarda kontrol grubunu oluşturan 96 kişiden 62'si (% 64,6) iken - KHDAK'lı hasta örneklemindeki sigara kullanmayan 90 kişiden 73'ü (% 81,1) şeklindedir. Sigara kullananlar kontrol grubunu oluşturan 96 kişiden 64'ü (% 66,7) iken - KHDAK'lı hasta örneklemindeki 90 kişiden 73'ü (% 81,1) şeklindedir ($p<0.001$). Sigara kullanımı KHDAK'i için risk faktörüdür. KHDAK'lı deney ve kontrol grubuna ait *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonlarının allel ve genotiplerinin sigara kullanım durumlarına ait genel bulguları ayrıntılı olarak çizelge 4.3'te verilmiştir.

K-ras geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun genotip oranlarının sigara kullanım durumlarına göre dağılımı incelendiğinde; Sigara içmeyenlerde GG yabanıl genotip oranı kontrol grubu % 73,5 iken, KHDAK'lı hastalarda % 41,2; GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubunda % 14,7 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 23,5 dir. TT homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu % 11,8 iken, KHDAK'lı hastalarda % 35,3 daha yüksektir ($p=0,045$). Sigara İçenlerde GG yabanıl genotip oranı kontrol grubunda % 71,0 iken KHDAK'lı hastalarda % 26 ; GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubunda % 17,7 iken, KHDAK'lı hastalarda % 30,1, TT homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içenlerde % 11,3 iken - KHDAK'lı hastalarda bu oran % 43,9 daha yüksektir ($p<0,001$).

KHDAK'lı hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin allel sıklıkları incelendiğinde ise; Sigara içmeyenlerde G yabanıl alleli oranı % 80,8 iken, KHDAK'lı hastalarda % 52,9 olarak bulunmuştur. T mutant alleli ise kontrol grubu % 19,2 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 47,1'e yüksek bulunmuştur ($p=0,007$). Sigara İçenlerde G yabanıl alleli kontrol grubu % 79,8 iken, KHDAK'lı hastalarda % 56,1'dir. T mutant alleli kontrol grubunda % 20,2 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 43,9 şeklinde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.3. Sigara Kullanım Durumuna Göre *K-ras* Geni Ekzon 1Kodon 12 Mutasyonlarına Ait Allel ve Genotip Oranları

K-RAS KODON 12		SİĞARA İÇMEYEN		P		SİĞARA İÇEN		P
		KONTROL N (%)	KHDAK N (%)			KONTROL N (%)	KHDAK N (%)	
Genotip Sıklığı	GG	25 (73,5)	7 (41,2)	0,065	GG	44 (71,0)	19 (26,0)	<0,001
	GT	5 (14,7)	4 (23,5)		GT	11 (17,7)	22 (30,1)	
	TT	4 (11,8)	6 (35,3)		TT	7 (11,3)	32 (43,9)	
Allel Sıklığı	G	55 (80,8)	18 (52,9)	0,007	G	99 (79,8)	60 (56,1)	<0,001
	T	13 (19,2)	16 (47,1)		T	25 (20,2)	86 (43,9)	

4.5. KHDAK Hastalarındaki *K-ras* Ekzon 1 Geni Kodon 13 Mutasyonuna Ait Allel ve Genotip Oranları

KHDAK'lı deney ve kontrol grubuna ait bireylerin genotip oranları incelendiğinde; GG yabanıl genotip oranı kontrol grubunda % 62,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 24,4; GA heterozigot genotip oranı kontrol grubunda %24,0 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 32,2 ($p=0,003$) ; AA mutant genotip oranı kontrol grubunda % 13,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 43,3 şeklinde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) (Çizelge 4.4).



Şekil 4.2. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonuna ait genotiplerin RFLP sonrası elektroforez jel görüntüsü. (Marker 20 bp) 1 numaralı örnek GG; 4 numaralı örnek GA; 2,3,5-8 nolu örnekler AA genotipini göstermektedir.

KHDAK'lı hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin allel sıklıkları incelendiğinde ise; G yabanıl alleli kontrol grubunda %74,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 40,5; A mutant alleli kontrol grubunda %25,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda bu oran % 59,5 olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *K-ras* Ekzon 1 geni kodon 13 mutasyonlarının allel ve genotip oranlarının kontrol grubu ve KHDAK'lı hastalar arasındaki dağılımı.

<i>K-RAS</i> KODON 13		KONTROL N (%)	KHDAK N (%)	P	OR	GÜVEN ARALIĞI	P
Genotip Sıklığı	GG	60 (62,5)	22 (24,4)	<0,001	1,00	-	-
	GA	23 (24,0)	29 (32,2)		3,44	1,65-7,16	0,003
	AA	13 (13,5)	39 (43,3)		8,18	3,69-18,12	<0,001
Allel Sıklığı	G	143 (74,5)	73 (40,5)	<0,001	4,28	2,75-6,64	<0,001
	A	49 (25,5)	107 (59,5)				

4.6. *K-ras* Geni Ekzon 1 Kodon 13 Gen Mutasyonunun Allel ve Genotip Oranlarının Cinsiyetlere göre Dağılımları

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun genotip oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde; GG yabanıl genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 60,0 iken, KHDAK'lı kadınlar için bu oran %25; kontrol grubu erkeklerde % 63,0 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 24,4; GA heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubu ve KHDAK'lı kadınlar için bu oran %33,3; kontrol grubu erkeklerde % 22,2 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran %32; AA homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 6,7 iken, KHDAK'lı kadınlar için bu oran % 41,7; kontrol grubu erkeklerde % 14,8 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 43,6 olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) (çizelge 4.5)

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun allel oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde; G yabanıl alleli kontrol grubu kadınlarda % 77,0 iken, KHDAK'lı kadınlarda bu oran % 41,6; kontrol grubu erkeklerde % 74,0 iken, KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 40,4 olarak bulunmuştur. A mutant alleli kontrol

grubu kadınlarda % 23,0 iken, KHDAK'lı kadınlarda % 58,4; kontrol grubu erkeklerde % 26,0 iken, KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 59,6 şeklinde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.5. Kontrol ve KHDAK'lı hasta gruplarındaki *K-ras* geni Ekzon 1 kodon 13 gen mutasyonlarının allel ve genotip sıklıklarının cinsiyete göre dağılımına ait genel bulgular.

K-RAS KODON 13		ERKEK		P		KADIN		P
		KONTROL N (%)	KHDAK N (%)			KONTROL N (%)	KHDAK N (%)	
Genotip Sıklığı	GG	51 (63,0)	19 (24,4)	<0,001	GG	9 (60,0)	3 (25,0)	0,054
	GA	18 (22,2)	25 (32,0)		GA	5 (33,3)	4 (33,3)	
	AA	12 (14,8)	34 (43,6)		AA	1 (6,7)	5 (41,7)	
Allel Sıklığı	G	120 (74,0)	63 (40,4)	<0,001	G	23 (77,0)	10 (41,6)	0,019
	A	42 (26,0)	93 (59,6)		A	7 (23,0)	14 (58,4)	

KHDAK'lı deney ve kontrol gruplarındaki *K-ras* geni kodon 13 mutasyonlarının allel ve genotip sıklıklarının cinsiyete göre OR değeri hesaplandığında; *K-ras* geni ekzon 1 13 mutasyonu için GA genotipine sahip olan erkeklerin KHDAK'ne yakalanma riski 3,73 kat daha fazladır (OR=3,73 (1,67-8,32)). Mutant AA genotipine sahip olan erkeklerin KHDAK'ne yakalanma riski 7,60 kat daha yüksektir. KHDAK'lı deney ve kontrol gruplarındaki *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonlarının allel sıklıklarının cinsiyete göre OR değeri hesaplandığında; Mutant A alleleline sahip olan erkeklerin KHDAK'ne yakalanma riski 4,22 kat daha yüksektir (OR=4,22 (2,62-6,78)). Kadınlarda *K-ras* geni ekzon 1 13 mutasyonu için ise, KHDAK'lı hasta grubunda A alleleline sahip olanların küçük hücreli dışı akciğer kanserine yakalanma riski kontrol grubuna göre 4,60 kat daha yüksektir (OR=4,60 (1,42-14,86)).

4.7. K-ras Geni Ekzon 1 Kodon 13 Mutasyonlarına Ait Allel ve Genotip Oranlarının Sigara Kullanım Durumuna Göre Dağılımları

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun genotip oranlarının sigara kullanım durumlarına göre dağılımı incelendiğinde; GG yabanıl genotip oranı kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 61,8 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 29,4; GA heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 29,4 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 29,4; AA homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 8,8 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 41,2 olarak bulunmuştur ($p<0,001$). GG yabanıl genotip oranı kontrol grubu sigara içenlerde % 62,9 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 23,3; GA heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içenlerde % 21,0 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 32,9; AA homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içenlerde % 16,1 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 43,8 olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). (çizelge 4.6)

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun allel oranlarının sigara kullanım durumlarına göre dağılımı incelendiğinde; G yabanıl alleli kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 76,4 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 40,5 olarak bulunmuştur. A mutant alleli kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 23,6 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 59,5 olarak bulunmuştur ($p<0,001$). G allel sıklığı kontrol grubu sigara içenlerde % 73,4 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 39,7 olarak bulunmuştur. A allel sıklığı kontrol grubu sigara içenlerde % 26,6 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 60,3 şeklinde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.6. *K-ras* Geni Ekzon 1 Kodon 13 Mutasyonlarına Ait Allel ve Genotip Oranlarının Sigara Kullanım Durumuna Göre dağılımı.

K-RAS KODON 13		SİGARA İÇMEYEN		P		SİGARA İÇEN		P
		KONTROL N (%)	KHDAK N (%)			KONTROL N (%)	KHDAK N (%)	
Genotip Sıklığı	GG	21 (61,8)	5 (29,4)	0,015	GG	39 (62,9)	17 (23,3)	<0,001
	GA	10 (29,4)	5 (29,4)		GA	13 (21,0)	24 (32,9)	
	AA	3 (8,8)	7 (41,2)		AA	10 (16,1)	32 (43,8)	
Allel Sıklığı	G	52 (76,4)	15 (40,5)	<0,001	G	91 (73,4)	58 (39,7)	<0,001
	A	16 (23,6)	22 (59,5)		A	33 (26,6)	88 (60,3)	

KHDAK'lı deney ve kontrol gruplarındaki *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonlarının allel ve genotip sıklıklarının cinsiyete göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunan grupların OR değerleri hesaplanmıştır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonu için sigara içenlerde KHDAK'lı hastalarda GA genotipine sahip olanların oranı kontrol grubuna göre 4,23 kat daha fazladır (OR=4,23 (1,75-10,24)). A allellini homozigot (AA) veya heterozigot (GA) olarak taşıyan erkek bireylerde, G alleli bakımından homozigot olan bireylere göre küçük hücreli dışı akciğer kanserine yakalanma riskinin 5,58 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonu için ise sigara içen KHDAK'lı hasta grubunda A alleleline sahip olanların küçük hücreli dışı akciğer kanserine yakalanma riski kontrole göre 4,18 kat daha fazladır (OR=4,18 (2,49-7,02)).

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonu için ise sigara içmeyen KHDAK'lı hasta grubunda A yabancıl alleleline sahip olanların oranı kontrol grubuna göre 4,77 kat daha fazladır (OR=4,77 (2,01-11,30)). *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonu için sigara içmeyenlerde KHDAK'lı hastalarda GA genotipine sahip olanların oranı kontrol

grubuna göre 2,10 kat daha fazladır (OR=2,10 (0,49-8,96)). A allelini homozigot (AA) veya heterozigot (GA) olarak taşıyan erkek bireylerde, G alleli bakımından homozigot olan bireylere göre küçük hücreli dışı akciğer kanserine yakalanma riskinin 3,88 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (OR=3,88(1,11-13,55)).

5. TARTIŞMA

KHDAK hastalarının histopatolojik doku tiplendine göre dağılımı; % 31,1'i adenokarsinom ve % 16,7'si skuamöz hücreli karsinom şeklindedir. KHDAK hastalarından oluşan deney grubumuzun yaş ortalaması 60,16 olup 78'i erkek ve 12'si kadın mak üzere toplam 90 kişidir. Kontrol grubunun yaş ortalaması 58,04 olup 81'i erkek 15'i kadın olmak üzere toplam 96 kişidir. KHDAK'lı hastalar kendi içinde yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde 40 yaşından 59 yaşına kadar oransal artış göstermektedir ($p<0,001$).

KHDAK'lı deney ve kontrol grubuna ait bireylerin *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonu genoti bulguları; GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubunda % 16,7 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 28,9 daha yüksektir. TT homozigot mutant genotip oranı kontrol grubunda % 11,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda bu oran % 42,2 daha yüksektir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 gen mutasyonu için mutant T allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda % 19,8 iken KHDAK'lı hasta grubunda bu oran % 56,7 daha yüksektir.

KHDAK'a yakalanmada diğer risk faktörlerinden ileri yaş değerlendirdiğinde; Hastalarda en genç birey 35 yaşında iken en yaşlı birey 99 yaşındadır. KHDAK'lı hastalar kendi içinde yaş gruplarına göre ayrı ayrı birbirileriyle karşılaştırıldığında 40 yaştan 50-59 yaş aralığına gidildikçe yükselmektedir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun genotip oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı; GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 26,7 iken; KHDAK'lı kadınlar için bu oran % 33,3 daha yüksektir. Kontrol grubu erkeklerde % 14,8 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 28,2 daha yüksektir. TT homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 6,7 iken, KHDAK'lı kadınlarda % 33,3 daha yüksektir. Kontrol grubu erkeklerde % 12,3 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 43,6 daha yüksektir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun allel oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde; T mutant alleli kontrol grubu kadınlarda % 20,0 iken, KHDAK'lı kadınlarda % 50,0 daha yüksektir. Kontrol grubu erkeklerde % 19,8 iken, KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 57,7 daha yüksektir.

K-ras geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun genotip oranlarının sigara kullanım durumlarına göre dağılımı incelendiğinde; GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol

grubu sigara içmeyenlerde % 14,7 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 23,5 daha yüksektir. TT homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 11,8 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 35,3 daha yüksektir. GT heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içenlerde % 17,7 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 30,1 daha yüksektir. TT homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içenlerde % 11,3 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 43,9 daha yüksektir. *K-ras* geni ekzon 1 Kodon 12 mutasyonunun allel oranlarının sigara kullanım durumlarına göre dağılımı incelendiğinde; mutant T allel sıklığı kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 19,2 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 47,1 daha yüksektir. Mutant T allel sıklığı kontrol grubu sigara içenlerde % 20,2 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 43,9 daha yüksektir.

KHDAK'lı deney ve kontrol grubuna ait bireylerin *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonu genotip bakımından değerlendirildiğinde; GA heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubunda % 24 iken KHDAK'lı hasta grubunda % 32,2 daha yüksektir. AA homozigot mutant genotip oranı kontrol grubunda % 13,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda bu oran % 43,3 daha yüksektir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonu için mutant A allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda % 25,5 iken KHDAK'lı hasta grubunda bu oran % 59,5 daha yüksektir.

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun genotip oranlarının cinsiyetlere göre incelendiğinde; Kontrol grubu erkeklerde % 22,2 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 32 daha yüksektir. AA homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu kadınlarda % 6,7 iken, KHDAK'lı kadınlar için bu oran % 41,7 daha yüksektir. Kontrol grubu erkeklerde % 14,8 iken KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 43,6 daha yüksektir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun allel oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde; A mutant alleli kontrol grubu kadınlarda % 23,0 iken, KHDAK'lı kadınlarda % 58,4 daha yüksektir. Kontrol grubu erkeklerde % 26,0 iken, KHDAK'lı erkeklerde bu oran % 59,6 daha yüksektir.

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun genotip oranlarının sigara kullanım durumlarına göre dağılımı; AA homozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 8,8 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 41,2 daha yüksektir. GA heterozigot mutant genotip oranı kontrol grubu sigara içenlerde % 21,0 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 32,9 daha yüksektir. AA homozigot mutant genotip oranı kontrol

grubu sigara içenlerde % 16,1 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 43,8 daha yüksektir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 mutasyonunun allel oranlarının sigara kullanım durumlarına göre dağılımı incelendiğinde; mutant A allel sıklığı kontrol grubu sigara içmeyenlerde % 23,6 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 59,5 daha yüksektir. Mutant A allel sıklığı kontrol grubu sigara içenlerde % 26,6 iken, KHDAK'lı hastalarda bu oran % 60,3 daha yüksektir.

Konuyla ilişkili olarak yapılan araştırma örneklerine baktığımızda; Tam ve ark. (100) Japonya örnekleminde KHDAK'lilerde *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) mutasyonunu yaş ortalaması 61,4 olan 103 erkek ve 138 kadın olmak üzere toplam 241 kişide çalışmışlardır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12'nin G→T transversiyonları için T mutant allel frekansı % 42,86, mutasyon oranının erkeklerde görülme sıklığı % 16,7 olup kadınlara göre % 5,3 daha yüksek, adenokarsinom doku tipi % 8,84 olarak belirlenmiştir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyon frekansını sigara kullanım durumuna göre eski içicilerde % 21,4, aktif içicilerde % 19, sigara içmeyenlerde ise % 3,6 olup *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunda sigara kullanımı KHDAK'a yakalanmada riski arttırırken, yaş ve histopatolojik doku tipinin etkilemediğini saptamışlardır. Ramiez ve ark. (120) İspanya örnekleminde, KHDAK'lilerde *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) mutasyonunu yaş ortalaması 63 olan 49 erkek ve 2 kadın olmak üzere toplam 51 kişide çalışmışlardır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 için GGT→TGT sistein aminoasidi dönüşümüne ait G→T transversiyonları için T mutant allel frekansı % 16, adenokarsinom doku tipi % 26,7; skuamöz hücreli karsinom ise % 16 olarak belirlemişlerdir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyon frekansı sigara içenlerde % 8 oranında bulmuşlardır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunda genotip oranları ve sigara kullanımının KHDAK'a yakalanmada erkek cinsiyetin ve ileri yaş'ın risk faktörü olduğunu saptamışlardır. Mitsudomi ve ark. (103) Japonya örnekleminde, 103 KHDAK ve KHAK akciğer kanserli hastada grubundan oluşturduğu olgularda, *ras* onkogeninin kodon 12 ve 13 nokta mutasyonlarının KHDAK grubunda % 36 oranında görüldüğünü *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12'de G→T transversiyonu daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Camps ve ark. (121) İspanya örnekleminde, KHDAK'lilerde *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) mutasyonunu yaş ortalaması 64 olan 63 erkek ve 4 kadın olmak üzere toplam 67 kişide çalışmışlardır. *K-ras* geni kodon 12 için GGT→GTT valin aminoasidi dönüşümüne ait G→T transversiyonları için T

mutant allel frekansı % 30, adenokarsinom doku tipi % 45; skuamöz hücreli karsinom ise % 26 olarak belirlenmiştir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyon frekansını sigara içenlerde % 65,6; sigara içmeyenlerde ise % 4,5 oranında bulmuşlardır. *K-ras* geni kodon 12 mutasyonunun genotip oranlarının KHDAK'a yakalanmada risk faktörü olmadığını ancak, erkek cinsiyet, ileri yaş, ve sigara kullanımının KHDAK'a yakalanmada risk faktörü olduğunu saptamışlardır. Grossi ve ark. (99), İtalya örnekleminde, KHDAK'lilerde *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) ve *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 (G/A) mutasyonunu yaş ortalaması 64 olan 242 erkek ve 27 kadın olmak üzere toplam 269 kişide çalışmışlardır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 için G→T transversiyonlarını için, T mutant allel sıklığı % 18 iken; *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 G→T transversiyonları için, A mutant allel sıklığı % 6 olarak bulmuşlardır. *Ras* onkogenlerinden en çok *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonlarının gözlendiği ve bunların içinde en sık G→T transversiyonuna ait nokta mutasyonunun olduğu belirtilmiştir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun KHDAK'a yakalanmada bir risk faktörü olduğunu saptamışlardır. Nelson ve ark. (118) ABD örnekleminde, KHDAK'lilerde *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) mutasyonunu yaş ortalaması 65,6 olan 76 erkek ve 79 kadın olmak üzere toplam 155 kişide çalışmışlardır. *K-ras* geni kodon 12 mutasyonu erkeklerde % 17,4 olup kadınlarda bu oran % 26,2 daha yüksektir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 nokta mutasyonunu ifade eden G→T ve G→A transversiyonlarında; GGT→AGT (serin) için % 9.1, GGT→ATT (valin) için % 20.5, GGT→TGT (sistein) için % 52.3 olarak saptanırken; adenokarsinom % 22,1 ve skuamöz hücreli karsinom % 2,8 olarak bulunmuştur. *K-ras* geni kodon 12 mutasyonunun genotip oranları, kadın cinsiyet ve sigara kullanımının KHDAK'a yakalanmada riski arttırdığını saptamışlardır. Baykara ve ark. (119) Türkiye'de KHDAK ile *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) mutasyonunu 44 erkek ve 6 kadın olmak üzere toplam 50 kişide çalışmışlardır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 için G→T transversiyonlarını ifade eden T mutant allelinin erkeklerdeki frekansı % 33,3 iken kadınlarda % 4,5 daha düşük bulunurken; adenokarsinomlarda % 15 oranında saptanmış ancak skuamöz hücreli karsinomda mutasyona rastlanmamıştır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) mutasyonun KHDAK'ne yakalanma riskini etkilemediği ancak, sigara kullanımı ve erkek cinsiyetin KHDAK'ne yakalanmada bir risk faktörü olduğunu belirlemişlerdir. Stephen ve ark. (102) New York örnekleminde KHDAK'lilerde *K-ras*

geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunu toplam 213 kişide çalışmışlar ve *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 G→T transversiyonları için T mutant allel frekansı % 16,4 oranında belirlenirken; adenokarsinom doku tipinde % 29 skuamöz hücreli karsinomda ise % 1,6 daha düşük bulmuşlardır. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunda, doku tipinin KHDAK'a yakalanmada riski arttırdığı, genotip oranlarının ise etkilemediğini saptamışlardır. Rosel ve ark. (104) İspanya örnekleminde KHDAK'liler ile *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 ve 13 nokta mutasyonunu toplam 66 kişide çalışmışlardır. KHDAK olgusuna ait *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12'de GGT'den GTT'ye yani glisinden valine dönüşümü (G→T transversiyonu) ifade eden mutant T allel frekansı % 18,2 oranında belirlenmiş ancak; *K-ras* geni kodon 13'te mutasyon tespit edememişlerdir. *K-ras* geni kodon 12 mutasyonu skuamöz hücreli karsinomda % 21,1 iken adenokarsinomda % 13,6 daha düşük bulunmuştur. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 mutasyonunun KHDAK'a yakalanmada risk faktörü olduğunu saptamışlardır. Hatzaki ve ark. (114) Yunan örnekleminde KHDAK'liler ile *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 ve 13 mutasyonlarını toplam 70 kişide çalışmışlar ve G→T transversiyonu bakımından mutant T alleli frekansı % 20 olarak bulunmuş ancak, kodon 13'te mutasyon tespit edememişlerdir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 ve 13 mutasyonunun KHDAK'a yakalanmada risk faktörü oluşturmadığını saptamışlardır. Cho ve ark. (111), Güney Kore örnekleminde KHDAK'liler ile *ras* geni (*K-ras*, *H-ras*, *N-ras*) kodon 12 ve 13 nokta mutasyonlarını yaş ortalaması 57 olan 46 erkek 12 kadın olmak üzere toplam 58 kişide çalışmışlar ve daha çok *K-ras* geni kodon 12'de GGT-GAT (aspartat) G→A transversiyonunu ifade eden mutant A allel frekansını % 24 oranında bulmuşlardır. *K-ras* geni kodon 12 mutasyonunun KHDAK'a yakalanmada risk faktörü oluşturmadığını saptamışlardır.

Sonuçlarımızı literatür bulgularıyla kıyasladığımızda; *K-ras* geni ekzon 1 kodon 12 ve kodon 13 mutasyonlarına ait allel ve genotip oranları KHDAK'ne yakalanmada risk faktörü olduğu şeklindeki bulgumuz Grossi ve ark. (99), Tam ve ark. (100), Stephen ve ark. (102), Mitsudomi ve ark. (103), Rosel ve ark. (104), Nelson ve ark. (118), Ramiez ve ark. (120), ile örtüşürken, Cho ve ark. (111), Hatzaki ve ark. (114), Baykara ve ark. (119), Camps ve ark. (121) ile çelişmektedir. *K-ras* geni ekzon 1 kodon 13 için KHDAK'ne yakalanmada risk faktörü olduğu şeklindeki bulgularımız; Grossi ve ark. (99) ile örtüşürken; Mitsudomi ve ark. (103), Rosel ve ark. (104), Hatzaki ve ark. (114), Hatzaki ve ark. (114) ile çelişmektedir. KHDAK'ne yakalanmada diğer risk faktörlerine

dair önemli bulgularımız değerlendirildiğinde; KHDAK'lı hastalar kendi içinde yaş gruplarına göre ayrı ayrı birbirileriyle karşılaştırıldığında 40 yaştan 50-59 yaş aralığına gidildikçe KHDAK'ne yakalanma riski yükselmektedir. Ayrıca sigara kullanımı ve erkek cinsiyette olma KHDAK' ne yakalanmada önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. KHDAK tanısı almış bireylerin adenokarsinom doku tipinin gözlenme sıklığının skuamöz hücreli dokuya göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. KHDAK'ne yakalanmada ileri yaşın bir risk faktörü olduğu şeklindeki bulgumuz; Riely ve ark. (8), Hunt ve ark. (11), Tam ve ark. (100) ile örtüşmektedir. KHDAK'ne yakalanmada sigara kullanımının bir risk faktörü olduğuna dair bulgularımız; Riely ve ark. (95), Tam ve ark. (100), Reynold ve ark.(101), Nelson ve ark. (118) ve Ramiez ve ark. (120) ile örtüşürken, Sasaki ve ark. (98), Baykara ve ark. (119) ve Camps ve ark. (121) ile çelişmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ras ailesi üyelerinden olan *K-ras*, intraselüler bir GTPazdır. *K-ras* geninde meydana gelen mutasyonlar, *K-ras*'ın GTPaz aktivite kaybına sebep olmaktadır ve bu da sürekli *K-ras* sinyal yolağının aktif şekilde kalmasıyla sonuçlanır. Çalışmamızda, Mersin ili örneklemindeki Türk toplumunda, *K-ras* geni kodon 12 ve 13 mutasyonlarının KHDAK'ne yakalanma riskine olası etkisinin belirlenmesi temel hipotezimizi oluşturulmuştur. Ayrıca KHDAK'ne yakalanmada etkili olduğu düşünülen yaş, cinsiyet, histopatolojik doku tipi ve sigara kullanım durumu gibi risk faktörlerinin hastalıkla ilişkisi araştırılmıştır.

K-ras geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) mutasyonuna ait genotip frekansı karşılaştırıldığında; kontrol grubunda GT genotipine sahip olma % 16,7 iken, KHDAK hastalarında GT genotipine sahip olma % 28,9 olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuca göre *K-ras* geni kodon 12 (G/T) mutasyonu KHDAK'ne yakalanmada bir risk faktörüdür. KHDAK hastalarında mutant T alleleline sahip olanların KHDAK'ne yakalanma riski kontrol grubuna göre 5,3 kat daha yüksektir [OR; 5,30 (3,34-8,41)].

K-ras geni ekzon 1 kodon 13 (G/A) mutasyonuna ait allel frekansı karşılaştırıldığında; kontrol grubunda GA genotipine sahip olma % 24 iken, KHDAK hastalarında GA genotipine sahip olma % 32,2 olarak saptanmıştır. *K-ras* geni kodon 13 (G/A) mutasyonu KHDAK'ne yakalanmada bir risk faktörüdür. KHDAK hastalarında mutant A alleleline sahip olanların KHDAK'ne yakalanma riski kontrol grubuna göre 4,28 kat daha yüksektir [OR; 4,28 (2,75-6,64)].

K-ras geni ekzon 1 kodon 12 (G/T) ve kodon 13 (G/A) mutasyonları diğer risk faktörleri açısından değerlendirildiğinde; ileri yaş, sigara kullanımı ve erkek cinsiyetin KHDAK'ne yakalanmada önemli bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmanın bulguları; KHDAK'lı olgularda *K-ras* geni kodon 12 ve 13 mutasyonlarının sıklıkla gözlemlendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, KHDAK'lı olgularda *K-ras* mutasyonlarının daha net ortaya konabilmesi için daha geniş örneklemlemlerle yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. **Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ.** Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 2008; 58:71–96.
2. **Müsellim, B.** (2007) Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, 58: 113-118.
3. Minna JD (2004). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, 506–516
4. (web) <http://www.kansergenetigi.com/tr>
5. **Do, H., Krypuy, M., Mitchell, P. L., Fox, S. B., and Dobrovic, A.** (2008) High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*, 8: 142.
6. **Krypuy, M., Newnhawn, G. M., Thomas, D. M., Conron, M., and Dobrovic, A.** (2006) High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6: 295.
7. **Kabir Z, Bennett K, Clancy L.** Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? *Ir Med J*. 2007 Feb;100(2):367-9.
8. **Riely, G. J., Marks, J., and Pao, W.** (2009) KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, Vol 6: 201-205.
9. **Aviel-Ronen, S., Blackhall, F. H., Shepherd, F. A., and Tsao, M. S.** (2006) K-ras Mutations in Non-Small-Cell Lung Carcinoma: A Review. *Clinical Lung Cancer*, Vol. 8, No.1, 30-38.
10. **Wang, Z., Wu, Y. L., Zhang, G. C., Zhou, Q., Xu, C. R., and Guo, A. L.** (2008) EGFR/KRAS Mutations and Gefitinib Therapy in Chinese NSCLC Patients. *Onkologie*, 31: 174-178.
11. **Hunt, J. D., Strimas, A., Martin, J. E., Eyer, M., Haddican, M., Luckett, B. G., Ruiz, B., Axelrad, T. W., Backes, W. L., and Fontham, E. T. H.** (2002) Differences in KRAS Mutation Spectrum in Lung Cancer Cases between African Americans and Caucasians after Occupational or Environmental Exposure to Known Carcinogens. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 11: 1405-1412.
12. Akciğer kanserinde epidemiyoloji *Toraks Dergisi*; toraksdergisi.org/pdf
13. **Proctor R.** The Nazi war on cancer. Princeton, NJ: Princeton University Press 1999.
14. **Wynder EL, Graham EA.** Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc* 1950; 143: 329–336.

15. The health consequences of involuntary smoking: a report of the Surgeon General. Washington, DC: US Government Printing Office, US Department of Health and Human Services 1986; 87: 8398.
16. Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. Washington, DC: US Government Printing Office, US Environmental Protection Agency 1992; publication EPA/600/600F.
17. **Doll R, Petro R.** Mortality in relation to smoking: 20 years observations on male British doctors. *Br Med J* 1976; 2: 1525–1536.
18. **Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barros-Dios JM.** Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. *Public Health* 2003; 117: 149–156.
19. **Hegmann KT, Fraser AM, Keaney RP, et al.** The effect of age at smoking initiation on lung cancer risk. *Epidemiology* 1993; 4: 444–448.
20. (web) <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-d%C3%BCnya-kanser-istatistikleri-yay%C4%B1nland%C4%B1.html>
21. **Akkoçlu A, Öztürk C.** Akciğer Kanseri, Multidisipliner Yaklaşım. Toraks Kitapları No:IBilimsel TıpYayınevi Ankara 1999, 238s.
22. **Doll R, Hill AB.** Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. *Br Med J* 1950; 2: 739–748.
23. **Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barros-Dios JM.** Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. *Public Health* 2003; 117: 149–156.
24. **Benhamou S, Benhamou E.** The effect of age at smoking initiation on lung cancer risk. *Epidemiology* 1994; 5: 560.
25. **Boffetta, P.** (2006) Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res.*, 608(2): 157-162.
26. **Wu-Williams A, Samet JM.** Lung cancer and cigarette smoking. In: Samet JM, ed. *Epidemiology of lung cancer* New York, NY: Marcel Dekker 1994; 71–108.
27. **Jeffery PK.** Cigarette smoke induce damage of airway mucosa. In: Lenfant C, Cheritn J, Dusser D, eds. *Enviromental impact on the airways from injury to repair. Biology of lung cancer* New York, *Marcel Inc* 1996; (93,13):299-353.
28. **Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ.** Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(4):225-49.29. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1194–1210.

29. **Hecht SS.** Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1194–1210.
30. **Alberg AJ, Ford JG, Samet JM.** Epidemiology of lung cancer; ACCP Evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132:29-55.
31. **Alberg A J, Samet J M.** Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* 2003; 123:21-49
32. **Wright ME, Mayne ST, Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, Virtoma J, Albones D.** Development of comprehensive dietary antioxidants index and application to lung cancer risk in cohort of male smokers. *Am J Epidemiol* 2004; 160:68-76.
33. **Smith AH, Lopipero PA, Barroga VR.** Meta-analysis of studies of lung cancer among silicotics. *Epidemiology* 1995; 6:617–624.
34. **Siemiatycki J.** Risk factors for cancer in the workplace. Boston, MA: CRC Press, 1991.
35. Health risks of radon and other internally deposited alpha-emitters: BEIR IV. Washington, DC: National Academy Press, National Research Council, *Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation*, 1988.
36. **Lubin JH, Boice JD Jr, Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, Kusiak RA, Morrison HI, Radford EP, Samet JM.** Lung cancer in radon-exp 28. Doll R. Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med* 1955; 12:81–86.
37. **Selikoff IJ, Hammond EC, Seidman H.** Mortality experience of insulation workers in the United States and Canada, 1943–1976. *Ann NY Acad Sci* 1979; 330:91–116.
38. **Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., and Adjei, A. A.** (2008) Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin. Proc.*, 83(5): 584-594.
39. **Akkoçlu A, Öztürk C.** Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım. Bilimsel Tıp Yayınevi, 1999.
40. **Van Den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J et al.** A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-24.
41. **Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):134
42. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. American College of Chest Physicians. *Chest* 2007; 132(3 Suppl): 29-55.
43. Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. *Toraks Dergisi* 2006; 7 (Ek 2): 1-37.

44. **Schreiber G, McCrory DC.** Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer. Summary of published evidence. *Chest* 2003; 123: 115s-128s.
45. **Detterback, F. C., Tanoue, L. T., and Boffa, D. J.** (2009) Anatomy, Biology and Concepts, Pertaining to Lung Cancer Stage Classification. *J. Thorac. Oncol.*, 4:437-443.
46. **Travis WD, Brambilla E, Muller-Mermelink HK, Harris CC.** Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 2004; 10: 1-344.
47. **Spiro, S. G., and Porter, J. C.** (2002) Lung cancer-where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166: 1166-1196.
48. **Yesner R.** Small cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*, 1983; 7: 775-785.
49. **Davenport RD.** Diagnostic value of crush artifact in cytologic specimens. Occurrence in small cell carcinoma of the lung. *Acta Cytol* 1990; 34(4): 502-504.
50. **Kumar, V., Cotran, R. S., and Robbins, S. L.** (2000) Temel Patoloji, (Çev. Ed: Çevikbaş, U.), *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, s132-174.
51. **Yılmazbayhan, D.,** (2007) Akciğer Tümörleri ve Plevra Hastalıkları, Temel Patoloji, (Mocan Kuzey, G., Özdamar, Ş., Zengeroglu, S.), Güneş Kitabevi, Ankara, s381-390.
52. **. Brambilla E, Travis WD.** Adenosquamous carcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology & Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Tymus and Heart. World Health Organization Classification of Tumours 2004: 51-52
53. **Cox G, Jones JL, Andi A, ve ark.** A biological staging model for operabl non-small cell lung cancer. *Thorax* 2001;56:561-566.
54. **Groegeer AM, Esposito V, Mueller MR, ve ark.** Advances in the understanding oflung cancer. *Anticancer Research* 1997;17: 2519-2522.
55. **Savaş, İ.** (1995) Onkogenler. *T. Klin. Tıp Bilimleri*, 15: 374-377.
56. **Field, J. K.** (1999) Selection and validation of new lung cancer markers for the molecular-pathological assesment of individuals with a high risk of developing lung cancer. In: Brambilla C., Brambilla, E., eds. Lung tumors fundamental biology and clinical management. *Marcel Dekker Inc.*, New York, s287-302.
57. **Roth JA.** Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer* 1994; 10 (Supl 1):3s-15s.
58. **DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, et al.** (1981) Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3328-3332.

59. **Parada LF, Tabin CJ, Shih C, ve Weinberg RA.** (1982) Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297: 474-478.
60. **Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, Pierotti MA, Della-Porta G, ve Barbacid M.** (1984) Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 223: 661-664.
61. **Hirai H, Okabe T, Anraku Y, Fujisawa M, Urabe A, et al.** (1985) Activation of the c-K-ras oncogene in a human pancreas carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 127: 168-174.
62. **Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, et al.** (1984) Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 309: 464-466.
63. **Padua RA, Barrass NC, ve Currie GA.** (1985) Activation of N-ras in a human melanoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 5: 582-585.
64. **Richardson, G. E., and Johnson B. E.** (1993) The biology of lung cancer. *Semin Oncol.*, 20: 105.
65. **Köktürk, N., Kırıçoğlu, C. E., ve Öztürk, C.** (2003) Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. *Solunum*, 5: 127-138.
66. **Hastürk, S.** (2000) Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi, (Hastürk, S., Yüksel, M.), Akciğer Kanseri, *Bilmedya Grup*, İstanbul, s1-28.
67. **Schubbert S, Shannon K, ve Bollag G.** (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Canc.* 7: 295- 308.
68. **Fong, K. M., and Minna, J. D.** (2002) Molecular biology of lung cancer: clinical implication. *Clinics In Chest Medicine*, 23: 83-101.
69. **Spivack, S. D., Fasco, M. J., Walker, V. E., and Kaminsky, L. S.** (1997) The Molecular Epidemiology of Lung Cancer. *Crit. Rev. Toxicology*, 27(4): 319-365.
70. **Fong, K. M., Sekido, Y., Minna, J. D.** (1999) Molecular pathogenesis of lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 118: 1136-1152.
71. **Lecture, G. F. F.** (1996) Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest*, 109(1):14-19.
72. **Yılmaz E,Altunok V.**Kanser ve p53 geni,Avkae Dergisi 2011 ;1:19-23
73. **Laudansli J, Niklinska W, Burzykowski T, ve ark.** Prognostic significance of p53 and bcl-2 abnormalities in operable nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2001;17:660-666.

74. Dosaka-Akita, H., Hu, S. X., Fujino, M., Harada, M., Kinoshita, I., Xu, H. J., Kuzumaki, N., Kawakami, Y., and Benedict, W. F. (1997) Altered retinoblastoma protein expression in non-small cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer*, 79(7): 1329-37.
75. Marchetti, A., Milella, M., Felicioni, L., Cappuzzo, F., Irtelli, L., Grammastros, M. D., Sciarrotta, M., Malatesta, S., Nuzzo, C., Finocchiaro, G., Perrucci, B., Carlone, D., Gelibter, A. L., Ceribelli, A., Mezzetti, A., Iacobelli, S., Cognetti, F., and Buttitta F. (2009) Clinical Implications of KRAS Mutations in Lung Cancer Patients Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors: An Important Role for Mutations in Minor Clones. *Neoplasia*, 11(10): 1084-1092.
76. Breuer, R. H. J., Postmus, P. E., Smit, E. F. (2005) Molecular pathology of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Respiration*, 72: 313-330.
77. Scalfani RA, Schaurer IE, Langan TA. Alterations in cell cycle conyrol in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA , eds. Biology of lung cancer. New York, *Marcel Dekker Inc.* 1998;295-315.
78. Zhang, X., and Chang, A. (2008) Molecular Predictors of EGFR-TKI Sensitivity in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Med. Sci.*, 5(4): 209-217.
79. Adjei, A. A. (2001) Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 1062-74.
80. Saxena, N., Lahiri, S. S., Hambarde, S., and Tripathi, R. P. (2008) RAS: Target for Cancer Therapy. *Cancer Investigation*, 26: 948-955.
81. Karnoub, A. E., and Weinberg, R. A. (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Molecular Cell Biology*, 9: 517-531.
82. Weinberg, R. A. (2007) The Biology of Cancer, Garland Science, Taylor & Francis Group, *LLC*, New York, s22-63.
83. Kratz, C. P., Niemeyer, C. M., and Zenker, M. (2007) An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. *J. Mol. Med.*, 85: 227-235.
84. Cox DA, Der JC. Ras history. *Small GTPases* 2010; 1(1): 2-27.
85. Chen C-C, Er T-K, Liu Y-Y, Hwang J-K, Barrio MJ, Rodrigo M, et al. (2013) Computational Analysis of KRAS Mutations: Implications for Different Effects on the KRAS p.G12D and p.G13D Mutations. *PLoS ONE* 8(2): e55793. doi:10.1371/journal.pone.0055793
86. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008) Hücrenin Moleküler Biyolojisi, (Çev. Ed: Buyru, E., Dalay, N., Özgüç, M., Öztürk, M., Sakızlı, M.), *Tüba Yayınları*, Ankara, s1315-1342.

87. **Berndt N, Andrew D, Hamilton M, Sebt SM.** Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 775-791.

88. **White MA, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, et al.** (1995) Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 80: 533-541. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein

89. **B, ve Velculescu VE.** (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch repair status. *Nature* 418: 934.

90. **Han L, ve Colicelli JA.** (1995) A human protein selected by interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf-1. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1318-1323.

91. **Plowman, S. J., and Hancock, J. F.** (2005) Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochim. Biophys Acta*, 1746: 274-283.

92. Gene Cards. <http://genecards.bioinformatics.nl/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KRAS>

93. **Wicki, A., Herrmann, R., and Christofori, G.** (2010) Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med. Wkly.*, 140: w13112.

94. **Pao, W., and Ladanyi, M.** (2007) Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin. Cancer Res.*, 13(17): 4954-4955.

95. **Riely, G. J., Kris, M. G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A., Chitale, D. A., Nafa, K., Riedel, E. R., Hsu, M., Pao, W., Miller, V. A., and Ladanyi, M.** (2008) Frequency and Distinctive Spectrum of KRAS Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14(18): 5731-4.

96. **Do, H., Krypuy, M., Mitchell, P. L., Fox, S. B., and Dobrovic, A.** (2008) High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*, 8: 142.

97. **Aviel-Ronen, S., Blackhall, F. H., Shepherd, F. A., and Tsao, M. S.** (2006) K-ras Mutations in Non-Small-Cell Lung Carcinoma: A Review. *Clinical Lung Cancer*, Vol. 8, No.1, 30-38.

98. **Sasaki, H., Okuda, K., Kawano, O., Endo, K., Yukiue, H., Yokoyama, T., Yano, M., and Fujii, Y.** (2007) *Nras* and *Kras* mutation in Japanese lung cancer patients: Genotyping analysis using LightCycler. *Oncology Reports*, 18: 623-628.

99. **Grossi, F., Loprevite, M., Chiaramondia, M., Ceppa, P., Pera, C., Ratto, G. B., Serrano, J., Ferrara, G. B., Costa, R., Boni, L., and Ardizzoni, A.** (2003) Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *European Journal of Lung Cancer*, 39: 1242-1250.

100. Tam, I. Y. S., Chung, L. P., Suen, W. S., Wang, E., Wong, M. C. M., Ho, K. K., Lam, W. K., Chiu, S. W., Girard, L., Minna, J. D., Gazdar, A. F., and Wong, M. P. (2006) Distinct Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutation Patterns in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Different Tobacco Exposure and Clinicopathologic Features. *Clin. Cancer Res.*, 12(5): 1647-1653.

101. Reynold, S. H., Anna, K. C., Brown, K. C., and Weist, J. S. (1991) Activated proto-oncogenes in human tumors in smokers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 1085-1089.

102. Stephen L. Graziano, Gary P. Gamble, Nancy B. Newman, Lynn Z. Abbott, Michelle Rooney, Sulagna Mookherjee, Melissa L. Lamb, Leslie J. Kohman, and Bernard J. Poiesz Prognostic Significance of K-ras Codon 12 Mutations in Patients With Resected Stage I and II Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO February 1999* vol. 17 no. 2 **668**

103. Mitsudomi T, Viallet J, Mulshine JL, Linnoila RI, Minna JD, Gazdar AF. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. NCI-Navy Medical Oncology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20889-5105. *Oncogene* [1991, 6(8):1353-1362]

104. Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, Tolosa E, Armengol P, Barnadas A, Ariza A. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. Department of Medical Oncology, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain. *Oncogene* [1993, 8(9):2407-2412]

105. Jang, T. W., Oak, C. H., Chang, H. K., Suo, S. J., and Jung, M. H. (2009) EGFR and KRAS Mutations in Patients With Adenocarcinoma of the Lung. *Korean J. Intern. Med.*, 24: 48-54.

106. Hann, C. L., and Brahmer, J. R. (2007) "Who Should Receive Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors for Non-Small Cell Lung Cancer and When?". *Current Treatment Options in Oncology*, 8: 28-37.

107. Xie D, Shu X O, Deng Z, Wen W Q, Creek K, Dai Q, Gao Y T, Jin F, Zheng W. Population based case control study of HER2 genetic polymorphisms and breast cancer risk., *J Natl Cancer Inst*, **2000**; 92: 412-417.

108. Pajvani U B, Xueliang D, Combs T P. Structure function studies of the adipocytesecreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity., *J Biol Chem*, **2003**; 278:9073-9085.

109. Benusiglio P R, Lesueur F, Luccarini C, Conroy D M, Shah M, Easton D F, Day N E, Dunning A M, Pharoah P D, Ponder B A J. Common ERBB2 polymorphisms and risk of breast cancer in a white British population: a case-control study., *Breast Cancer Res*, **2005**; 7:204-209.

110. Fearon E R, Cho K R, Nigro J M, Kern S E, Simons J W, Ruppart J M. Identification of chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, **1990**; 247: 49-56.

- 111. Cho JY, Kim JH, Lee YH, et al.** Correlation between K-ras gene mutation and prognosis of patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 1997; 79, 462–467.
- 112. Ari Ş.,** ‘Dna’Nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr) Ile Çoğaltılması’, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 1. Baskı , Temizkan G., Arda N., Ed., *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, ss.57-67-, 1999
- 113. Westermeier, R.** (1997). *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and • Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.
- 114. Hatzaki A, Razi E, Anagnostopoulou K, Iliadis K, Kodaxis A, Papaioannou D, Labropoulos S, Vasilaki M, Kosmidis P, Saetta A, Mihalatos M, Nasioulas G.** A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. *Mol Cell Probes*. 2001 Oct;15(5):243-7.
- 115. Sushma C, Prasad S, Devi R, Murthy S, Rao Ts, Naidu C.** High Frequency of Codon 12 but not Codon 13 and 61 K-ras Gene Mutations in Invasive Ductal Carcinoma of Breast in a South Indian Population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(8):3505-8.
- 116. Nishikawa T, Maemura K, Hirata I, Matsuse R, Morikawa H, Toshina K, Murano M, Hashimoto K, Nakagawa Y, Saitoh O, Uchida K, Katsu K.** A simple method of detecting K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using onestep polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis.
- 117. Schulten HJ, Salama S, Al-Ahmadi A, Al-Mansouri Z, Mirza Z, Al-Ghamdi K, Al-Hamour OA, Huwait E, Gari M, Al-Qahtani MH, Al-Maghrabi J.** Comprehensive survey of HRAS, KRAS, and NRAS mutations in proliferative thyroid lesions from an ethnically diverse population. *Anticancer Res*. 2013 Nov;33(11):4779-84.
- 118. Nelson HH, Christiani DC, Mark EJ, et al.** Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:2032-2038.
- 119. Onur Baykara, Merve Tansarıkaya, Ahmet Demirkaya, Kamil Kaynak, Serhan Tanju, Alper Tokar, Nur Buyru.** Association of epidermal growth factor receptor and K-Ras mutations with smoking history in non-small cell lung cancer patients. *Exp Ther Med*. 2013 February; 5(2): 495–498.
- 120. Ramirez JL, Sarries C, de Castro PL, et al.** Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2003; 193:207-216.
- 121. Camps C, Sirera R, Bremnes R, et al.** Is there a prognostic role of K-ras point mutations in the serum of patients with advanced non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* 2005; 50:339-346.

122. Morris VK, Lucas FA, Overman MJ, Eng C, Morelli MP, Jiang ZQ, Luthra R, Meric-Bernstam F, Maru D, Scheet P, Kopetz S, Vilar E. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2014 Oct;25(10):2008-14. doi: 10.1093/annonc/mdu252. Epub 2014 Jul 9.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Mersin’de doğdu. İlkokul ve ortaokulu Mersin’de tamamladı. Lise eğitimini Mersin İsa Öner Çok Programlı Lisesinde tamamladı. 2007 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2013 yılı Ocak ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.