T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER ADENOKARSİNOMU VE MALİGN PLEVRAL MEZOTELYOMA AYIRICI TANISINDA GEN EKSPRESYON FARKININ ARAŞTIRILMASI

Gökçen ÖMEROĞLU ŞİMŞEK

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA TEZİ

İZMİR-2016

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-201197

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER ADENOKARSİNOMU VE MALİGN PLEVRAL MEZOTELYOMA AYIRICI TANISINDA GEN EKSPRESYON FARKININ ARAŞTIRILMASI

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA TEZİ

Gökçen ÖMEROĞLU ŞİMŞEK

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012. KB. SAG. 004 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-201197067

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Gökçen ÖMEROĞLU ŞIMŞEK" **"Akciğer Adenokarsinomu Ve Malign Plevral Mezotelyoma Ayırıcı Tanısında Gen Ekspresyon Farkının Araştırılması"** konulu Doktora tezini 22.06.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Hülya ELDİDOKUZ
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Oğuz KILINÇ
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. İlhan ÖZTOP
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Pınar ÇELİK
ÜYE
Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ufuk YILMAZ
YEDEK ÜYE
Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve
Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi

Doç. Dr. Yasemin BASKIN
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü

İÇİNDEKİLER……...……i

TABLO DİZİNİ…….iii

ŞEKİL DİZİNİ…….....……...…...……iii

KISALTMALAR.....v

TEŞEKKÜR.....vi

TÜRKÇE ÖZET……....……1

İNGİLİZCE ÖZET…….....3

1.0. GİRİŞ VE AMAÇ……..…..…...5

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi……...……5

1.2. Araştırmanın Amacı……5

2.0. GENEL BİLGİLER……6

2.1. Akciğer Kanseri…….....6

2.2. Akciğer Kanseri Genetiği……6

2.3. Malign Plevral Mezotelyoma ve Genetiği……..…....8

3.0. GEREÇ VE YÖNTEMLER……10

3.1. Araştırmanın Tipi……...…….....10

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....:……..…...……10

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi…….....……...…….….10

3.4. Çalışma Materyali……..……...10

3.5. Cihazlar ve Gereçler…….…….…….……...11

3.6. Sarf Malzemeler…….…….……..11

3.7. Araştırmanın Zaman Çizelgesi.....12

3.8. RNA izolasyonu, Ölçümü ve cDNA sentezi……..……...12

3.9. *RT-PCR Array* Analizi……..18

3.10. İstatistik Yöntem……...20

4.0. BULGULAR…….……22

5.0. TARTIŞMA……..49

6.0. SONUÇ VE ÖNERİLER……..51

7.0. KAYNAKLAR ……52

8.0. EKLER……..56

8.1. Etik Kurul Onayı……...……56

8.2. Dipnot…….…...…….57

8.3. Özgeçmiş ve Yayın Listesi……...58

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Mevcut Cihazlar……...……...…11

Tablo 2: Araştırmanın Zaman Çizelgesi……...……...……...…12

Tablo 3: Total Volume 10 Mikrolitre Olması İçin Gereken Hesaplama Yöntemi……..…..…17

Tablo 4: cDNA Master Mix Hazırlama Protokolü……..……..17

Tablo 5: Ekspresyon Analizi Yapılan Genler…….……..……21

Tablo 6: AADK ve MPM tümör hücrelerinde expresyon gösteren DNA onarım ilişkili genler içinde kontrol gruba göre elde edilen "fold change" değerleri ….....……..……22

Tablo 7: MPM ve AADK tümör hücrelerinde 2 grubun birbirine göre alınan "fold change" değerlerinde istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunan genler.....……....23

Tablo 8: Yaş.....…….....23

Tablo 9: Ailede Kanser Öyküsü.....23

Tablo 10: Yaşam Süresi - 1.....24

Tablo 11: Yaşam Süresi - 2.....24

Tablo 12: Yaşam Süresi - 3.....24

Tablo 13: Akciğer Adenokarsinomu Olgularının Evreleri……..…….…..…..25

Tablo 14: MPM olguları ……..…….....……....……..…..25

Tablo 15: Akciğer Adenokarsinomu Olguları.....,,,.....26

Tablo 16: Gen Ekspresyon Analizleri.....29

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: MPM Olgularının Mikroskopik Görüntüleri……...……27

Şekil 2: MPM, AADK, Kontrol Gruplarının Kat Değişimi Gösteren Genler İçin Karşılaştırmalı "Clustergram"ı …….....……45

Şekil 3: *p* Değeri Anlamlı Çıkan Genlerin "Clustergram"ı ……..……..……..…...46

Şekil 4: *p* Değeri Anlamlı Çıkan Genlerin AADK ve MPM'de Kat Artışları.....……..47

Şekil 5: Analizi Yapılan Tüm Genlerin "Clustergram"ı.……48

KISALTMALAR

MPE: Malign Plevral Efüzyon

MPM: Malign Plevral Mezotelyoma

AADK: Akciğer Adenokarsinomu

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde sevgi ve sabırla bana emek veren, bilgi, deneyim ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, her biri alanında söz sahibi Tez Danışmanı Hocam Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a, Göğüs Hastalıkları Prof. Dr. Atila AKKOÇLU'ya, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a, Onkoloji Enstitüsü Müdiresi Prof. Dr. Nur OLGUN'a, Tıbbi Onkoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. İlhan ÖZTOP'a, Prof. Dr. Hilal KOÇDOR'a, Doç. Dr. Zekiye ALTUN'a, Doç. Dr. Yasemin BASKIN'a ve tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren çok değerli hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma, personelimize, bu süreçte daima yanımda olan Sevgili Eşim Evrim Şimşek'e, ders zamanı karnımda, tez zamanı kucağımda olan ve bitirme zamanı elini tuttuğum kızım Umay'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Gökçen ÖMEROĞLU ŞİMŞEK

AKCİĞER ADENOKARSİNOMU VE MALİGN PLEVRAL MEZOTELYOMA AYIRICI TANISINDA GEN EKSPRESYON FARKININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

GİRİŞ

Akciğer kanseri 2008 yılında dünya genelinde 1.600.000 yeni olgu ve 1.380.000 ölüm ile en sık görülen ve mortalitesi en fazla olan kanserdir. Türkiyede en sık görülen akciğer kanseri tipi squamoz hücreli karsinom olup sigara öyküsü olmayan olgularda ve kadınlarda ise artan oranlarda adenokarsinom görülmektedir. Malign plevral efüzyonlar (MPE), plevranın primer tümörünün, akciğer ya da akciğer dışı malignitelerin bir belirtisidir. Akciğer adenokarsinom olguları genellikle MPE ile presente olmakta ve malign plevral mezotelyoma (MPM) ile ayrımı net olarak yapılamamaktadır. Türkiye'de çevresel nedenlerden dolayı asbest maruziyeti olup MPE saptanan olgularda ayırıcı tanı zorluğu yaşanmaktadır. Immunohistokimyasal yöntemlerde tanısal kısıtlılıklar ilgiyi gen expresyonuna yöneltmiştir. Bu nedenle çalışmamızda tedavi ve prognozu farklı bu iki grupta tümör hücrelerinde RT-PCR array yöntemi ile gen expresyon farklılıklarını göstermeyi hedefledik.

YÖNTEM

Yeni tanı alan, aydınlatılmış onamları alınan, cinsiyet farkı gözetilmeden, toplam 12 adenokarsinom olgusu ve MPM tanılı 12 parafin doku çalışmaya alınmıştır. Kontrol grubuna sağlıklı olduğu bilinen 8 adet olgu kan mononükleer hücre örneği dahil edilmiştir. Adenokarsinom olgularının taze örnekleri işleme alındıktan sonra -80°C de saklanarak**;** MPM olgularının parafin dokuları deparafinize edilerek ardından RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR Array Analizi ile DNA onarım ilişkili 84 adet genin ekspresyon analizi yapılmıştır. Hücrelerin ekspresyonuna göre her koşulun ekspresyonunun kat değişimleri (FOLD CHANGE) SA Bioscience'ın data analysis expression sayfasında hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak T test uygulanmış $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada housekeeping gen olarak dört gen kullanılmıştır: ACTB, B2M, GADPH, RPLP0. RT-PCR Array Analizi ile gen ekspresyon analizi sonucunda akciğer adenokarsinom ve MPM olguları kontrol grubu ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Adenokarsinomda BRCA1, BRCA2, CDK7, MLH3, MSH4, NEIL3, SMUG1, UNG, XRCC2, XRCC4 genlerde kontrole

göre 5 kat üstü ekspresyon artışı gözlenmiştir. MPM de APEX2, BRCA1, BRCA2, CDK7, MLH1, MLH3, MSH3, MSH4, NEIL3, PARP2, PARP3, PMS1, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51D, RAD52, RPA3, SMUG1, UNG, XPA, XRCC2, XRCC4 genlerinde kontrole göre 5 kat üstü ekspresyon artışı gözlenmiştir. MPM, adenokarsinom ile karşılaştırıldığında CDK7, MLH1, TREX1, PRKDC, XPA, PMS1, UNG, RPA3 genlerde istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon yüksekliği saptanmıştır.

SONUÇ

Bu çalışma ile adenokarsinom ve MPM tümör hücrelerinde DNA tamir genlerinde expresyon farklılıkları olduğunu gördük. *TREX1, PRKDC, PMS1* genleri MPM - akciğer adenokarsinom ayırıcı tanısında MPM lehine anlamlı bulunmuştur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: akciğer adenokarsinom, mezotelyoma

EVALUATION OF GENE EXPRESSIONS IN THE DIAGNOSIS OF LUNG ADENOCARSINOMA AND MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA

ABSTRACT

BACKGROUND

Malignant pleural effusion (MPE) is a sign of primary tumors of pleura, malignancies originating from lung or extrapulmonary. Commonly, the cases of lung adenocarsinoma (LADCA) manifest as MPE and the diagnosis can not be clearly differentiated from malignant pleural mesothelioma (MPM). Gene expression methods deserved more research attention by reason of limitations in the immunohistochemical methods. We aimed to show the differences in gene expression profiles in tumor cells by using RT-PCR array, between two seperate groups of LADCA and MPM which have discrepancies on treatment and prognosis.

METHODS

Twelve newly diagnosed patients with LADCA, paraffin-embedded tissues of 12 patients with MPM and eight healthy individual as a control group were included in this review without considering gender differences. After treatment of the fresh samples of LADCA stored at -80 ° C for RNA isolation, cDNA synthesis and the expression of 84 gene were associated with DNA repair were analysed with RT-PCR Array. Paraffin tissues of patients with MPM were deparaffinized and the same procedure was applied. According to the expression of tumor cells, expression of each clause fold change is calculated in “SA Bioscience” data analysis expression page.

RESULTS

ACBT, B2N, GADPH and RPLPO genes were identified as housekeeping genes. It was compared that the results of comparison of analysis of 3 groups by RT-PCR array gene expression profiles of LADCA, MPM and healthy-individiuals control group. It was observed that BRCA1, BRCA2, CDK7, MLH3, MSH4, NEIL3, SMUG1, UNG, XRCC2, XRCC4 genes showed more than 5 fold expression when LADCA cases were compared with control group. Besides MPM cases showed 5 fold expression increase in APEX2, BRCA1, BRCA2, CDK7, MLH1, MLH3, MSH3, MSH4, NEIL3, PARP2, PARP3, PMS1, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51D, RAD52, RPA3, SMUG1, UNG, XPA, XRCC2, XRCC4 genes compared with control cases. Comparing MPM with LADCA cases, we found that CDK7, MLH1, TREX1, PRKDC, XPA, PMS1, UNG, RPA3 genes were overexpressed.

CONCLUSION

We showed that there are differences between expression profiles of DNA repair genes in LADCA and MPM tumor cells. Our study suggests that TREX1, PRKDC, PMS1 genes can be significant in support of differential diagnosis between MPM and LADCA.

KEY WORDS: adenocarsinoma, mesothelioma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Akciğer kanserinin görülme sıklığı, sigara içme davranışındaki artışla birlikte giderek artmıştır (1). Bu konuda yapılan araştırmalar göstermiştir ki sigara en önemli etken olmakla birlikte genetik yapı, mesleksel maruziyetler (radyasyon, nikel, asbest, gibi) geçirilmiş akciğer hastalıklarının sekelleri de akciğer kanseri gelişme riskini arttırmaktadır (2). Türkiyede en sık görülen akciğer kanseri tipi skuamoz hücreli karsinom olup sigara öyküsü olmayan olgularda akciğer adenokarsinomlarının (AADK) daha fazla saptandığı belirtilmiştir. Malign plevral mezotelyoma (MPM) ise %70-90 asbest teması ile oluşan ve endüstriyel alanda gelişmiş ülkelerde sık rastlanan bir kanser tipidir. Çevresel olarak bulunmasından dolayı ömür boyu temas varlığı nedeniyle Türkiye'de de sık gözlenen bir kanser türüdür (1, 3, 4, 5). Kanserlerde tanı anında malign plevral efüzyonlar (MPE) gözlenebilmekte ve %5-15 inde primer odak saptanamamaktadır. Malign plevral efüzyonlarla akciğer kanserlerinden sonra en sık meme kanserleri ve lenfomalarda karşılaşılmaktadır. AADK %15'i, MPM'nın %90'ı malign plevral efüzyon ile presente olur (6). Efüzyonlu olguların %60'ında sitoloji ile tanı konulabilmektedir. İki örnekten daha fazlasının tanıya katkısının az olduğu, tanı koyabilmek için immunohistokimyasal boyamaların yapılması gerektiği belirtilmektedir (7-10). AADK ve MPM'nın tanısal ayrımı tam yapılamamaktadır ve mezotelyoma için sitolojinin tanısallığı %4-77 arasında değişmektedir (11). Ayırıcı tanıya ulaşabilmek için bazı tümör belirteçleri, CEA, mezotelin (14, 15, 16) kalretinin, sitokeratin, TTF-1 (17, 18, 19) geliştirilmiştir. Mezotelin artışı MPM için %48-84 duyarlılık, %70-100 özgüllük göstermekle birlikte negatif sonuçlar tanıyı dışlamamaktadır (20). Diğer belirteçlerden, mezotelyomada mezotel hücrelerinde hiyaluronik asit artışı ya da CDKN2A kaybı da araştırılmaktadır (21, 22).

Tanısal kısıtlılıklar ilgiyi gen expresyonuna yöneltmiştir (23). Gordon ve ark. solid tümörü olan olgularda PCR ile saptadıkları dört gen expresyonunun akciğer adenokarsinomu ve MPM ayırıcı tanısında anlamlı olduğunu belirtmişlerdir (24). Akciğer adenokarsinomu ve MPM tanılı, plevral efüzyonlu olgularda yapılan araştırmalarda ise bazı gen expresyonlarının iki kanser tipi arasında anlamlı olarak farklı olduğu gözlenmiştir (25).

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, tanısal karmaşa yaşanan akciğer adenokarsinomu ve MPM kanserlerinde, DNA micro-array PCR yöntemi ile gen expresyon farkını göstererek doğru tanıya ulaşılmasını sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünyada en sık görülen kanser türüdür. XX. yüzyılın başlarında daha az sıklıkta gözlenirken, özellikle kadınlar ve gençler arasında sigara kullanımının artması nedeniyle günümüzde görülme sıklığı artmıştır (1). Sigara, akciğer kanserine neden olduğu kanıtlanmış bir etkendir (26). Ayrıca genetik yapı, mesleksel maruziyetler, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalıklarının sekelleri, viral enfeksiyonlar sorumlu tutulmaktadır (2). Ülkemizde en sık skuamoz hücreli akciğer kanserleri görülmektedir. Kadınlarda ise sigaradan bağımsız olarak adenokarsinomlar daha fazla izlenmektedir (1, 3). Uzakdoğuda yapılan çalışmalarda kızartma yağı dumanını inhale eden kadınlarda akciğer adenokarsinomlarının sık görüldüğü saptanmıştır (27). Akciğer kanseri olgularının çoğu tanı anında ileri evrede olup cerrahi tedaviden faydalanamamaktadırlar (1). Bu olgular hemoptizi, göğüs ağrısı, öksürük gibi çeşitli pulmoner sorunlarla başvurmakla birlikte çoğu zaman ileri evrelere kadar semptomsuz olabilmektedirler (28). Tanıda fizik muayene bulgularının yanında radyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Hastalığın tanısını koymada ve tedavi planlamasında patolojik sınıflamadan faydalanılmaktadır (29). Sigara kullanımının azaltılmasını sağlayan politikalar ile hastalığın önlenmesine, ayrıca risk faktörleri taşıyan olguların tarama programlarına dahil edilmesi ile erken tanıya ulaşılmasına çalışılmaktadır (1).

2.2. Akciğer Kanseri Genetiği

Akciğer kanserinde, birçok tümör baskılayıcı gen ve onkogenlerin, yaşamsal mekanizmaların bir parçası olan hücre döngüsü ilerlemesi ve düzenlenmesinde doğrudan ya da dolaylı bir biçimde, fakat önemli bir oranda rol oynadığı bilinmektedir. Kromozomal değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve dominant onkogenlerin aktivasyonu gibi moleküler olayların göstergesi olarak kabul edilmektedir. Akciğer kanserlerinin benzer kromozomal değişiklikleri paylaştığı, bu kromozomal değişikliklerin de bazı histolojik tiplere özgü karakteristik yapıya sahip olduğu belirtilmiştir. Yapılan araştırmada küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde 1q, 3p, 8p, 9p, 13q, 17p kromozom kolu kaybı gözlenmiştir (30).

Tümör baskılayıcılarının inaktivasyonu bir allelin büyük bir DNA parçasının silinmesi ve küçük bir başka allelin daha mutasyonu ya da epigenetik inaktivasyonu.olmak üzere iki olayı ortaya çıkarmaktadır. Tumor baskılayıcı genler, neoplastik sürecin oluşmasında en iyi açıklanmış hipotez “two-hit” hipotezidir. Resesif özellikte olmaları nedeniyle her iki allelde de değişiklik (çift vuruş - two hit) olması durumunda inaktive olmakta ve hücre üzerindeki

baskılayıcı etkilerinin ortadan kalkmasına bağlı olarak neoplastik süreç başlamaktadır. Onkogenler ise dominant olmaları nedeniyle tek bir mutasyon ile aktive olup kanser gelişimine neden olmaktadırlar. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu; DNA metilasyon değişiklikleri, nokta mutasyonlar, heterozigotisite kaybı ile gerçekleşmektedir. Bu süreçte akciğer kanserlerinde p53, MDM2, p14ARF gibi, P16INK4A, retinoblastom (RB), siklin D (CDK) gibi yolaklar tanımlanmıştır (31).

Transforming growth faktör-β (TGF-β), kısmen Myc down-regülasyonu yanı sıra CDK inhibitörlerinin indüksiyonu aracılığıyla normal epitel hücrelerinin hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. TGF-β sinyalinin, "mitogen- activated protein kinase (MAPK)" kaskadı ve "nuclear factor-KB (NF-KB)" yolağının aktivasyonu ile engellendiği bilinmektedir. Akciğer kanseri hücreleri çoğu zaman TGF-β sinyallerine yanıtsızdır ve normal akciğer dokusuna göre akciğer kanseri doku örneklerinde TGF-β reseptör tip-2 gen expresyonunun azaldığı tanımlanmıştır. LKB1/STK11 bir diğer önemli tümör baskılayıcı gen olup, akciğer adenokarsinomlarının üçte birinde "nonsense" mutasyonu ile inaktivasyonu saptanmıştır. Ayrıca adenokarsinomların %26'sında LKB1 protein expresyonu kaybı gösterilmiştir (32).

Hücre siklusu kontrol ve DNA tamir mekanizmaları, önemli onkogenlerden RAS gen ailesi, Myc onkogenleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri, anjiogenez faktörleri, telomeraz aktivitesi diğer önemli neoplastik süreç elemanlarıdır. Ras ailesi içerisinde bulunan Kras, reseptör tirozin kinazlardan alınan sinyalleri iletirler. Spesifik Ras geni mutasyonları kolon, akciğer, meme ve mesane kanserleri gibi birçok farklı kanser hücrelerinde sıklıkla gözlenir ve neredeyse tüm olgularda codon 12, 13 ve 61'de saptanır. Bu mutasyonlar, GTPase aktivitesinde azalmaya bağlı olarak GTP-Ras inaktivasyonunun çok yavaşlaması neden olur. Bu da, reseptör aracılığı ile gelen sinyallere verilen aşırı hücresel yanıt ile karakterizedir. Akciğer kanserlerinde gözlenen EGFR amplifikasyonları bunlardan bazılarıdır (34).

MYC geni; 8q24 bölgesine lokalize olup hücre proliferasyonun regülasyonunda etkili nükleer bir proteini kodlar. Yeniden düzenlenme esnasında, genellikle MYC geni 1. ekzonu kaybolur. Ancak, bu ekzon protein üretiminde yer almadığı için MYC fonksiyonunda bir değişikliği neden olmaz. MYC bölgesinin immunoglobulin genlerinden birisi ile translokasyonu sonrasında normalden çok daha fazla MYC gen ürünü ekpresyonuna bağlı kontrolsüz hücre çoğalması gözlenmektedir (35).

Tirozin kinaz, serin/treonin kinazlar büyümeyi destekleyen yolaklarda yer alır. 2007 yılında yapılan bir çalışmada NSCLC saptanan hastalarda, echinoderm microtubule-

associated protein-like 4 (EML4) geni ile anaplastik lenfoma kinaz (ALK) geni tarafından kodlanan tirozin kinaz reseptörünün intraselüler parçasının füzyonu ile karakterize yeni bir kromozomal değişiklik saptanmıştır. ALK (2p23) bölgesi yeniden düzenlenmeleri akciğer kanserinde de tanımlanmıştır. Bu tür hastalarda kullanılmak üzere ALK kinaz inhibitörleri geliştirilmiş ve ileri evre akciğer kanseri hastalarda ilk sıra tedavilere yanıt alınmadığı durumlarda İHK ya da FISH ile ALK pozitifliği saptanan olgulara uygulanmaktadır. Akciğer küçük hücreli dışı karsinomlarının yaklaşık %3-7'sinde saptanan EML4-ALK füzyonlarının çoğu akciğer adenokarsinomlarında gözlenmektedir. EML4-ALK füzyonları saptanan olgularda KRAS mutasyonlarının bulunmadığı, EGFR mutasyonlarının ise çok az oranda birlikte bulunabileceği ileri sürülmektedir (33). Yine Tirosin kinaz reseptörleri olan ROS1 ve RET translokasyonları da bildirilmektedir ve bu hedeflere yönelik tedaviler geliştirimektedir.

Anjiogenez tümör progresyonu ve metastazlarda önemli rol oynamaktadır. Birçok sitokin ve büyüme faktörü tarafından pozitif ya da negatif olarak kontrol edilmektedir. KHDAK'de Ang-1 ve TIE2 expresyonu ve akciğer kanserinde hipoksemi ile ilişkili yüksek oranda VEGF expresyonu tanımlanmıştır. Telomeraz ise telomerik DNA'nın bir zincirinden sentezlenen, ribonükleoprotein yapısında bir reverstranskriptaz'dır ve büyük bir enzim kompleksidir. Telomeraz aktivitesi, birçok insan somatik dokusunda görülmez. Genellikle yüksek replikatif kapasitesi olan dokularda ve birçok insan kanser türünde görülür Telomeraz aktivasyonu KHDAK'DE %80, KHAK'DE %100 olmak üzere akciğer kanserlerinde sık görülmekte ve telomeraz aktivitesinin KHDAK'de hücre proliferasyonu ve patolojik süreç ile korele olduğu belirtilmiştir (36).

Halen devam etmekte olan DNA micro-array ve kütle spektrometresi teknolojileri gen expresyon analizlerini mümkün kılmaktadır. Akciğer kanserinin gen ekspresyon profilleri ile, histolojik tipe özel ekspresyon paternleri, AADK heterojenitesi ve spesifik ekspresyon ile klinik sonuçlar arasındaki ilişki belirlenmektedir (37).

2.3. Malign Plevral Mezotelyoma ve Genetiği

Malign mezotelyoma, plevra, periton, perikardın seröz yüzeylerinden köken alan bir tümördür. Birçok çalışma asbest liflerinin kromozom anormalliklerine, DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonunun artmasına sebep olması nedeni ile MPM ile maruziyet arasındaki ilişkiyi göstermiştir (49,51). Asbest endüstride çok sık kullanılmakta, son zamanlarda kullanımı yasaklanmış olup ülkemizde çevresel olarak bulunmakta ve ömür boyu maruziyetlere neden olmaktadır.

Malign plevral mezotelyomalı hastaların çoğu plevral efüzyon ile başvurmaktadır ve bu sıvıların sitolojik incelemesinde malign hücreler ile reaktif mezotel hücrelerinin ayrımını yapmak zordur. Immunohistokimyada sitokeratin, vimentin pozitifliği, CEA, Leu-M1 ve TAG 72 negatifliği MPM tanısını desteklemektedir. Fakat yapılan çalışmalarda bu belirteçlerin hem MPM hem de akciğer adenokarsinomlarında pozitif olabilecekleri gösterilmiştir. Bu nedenle halen ayırıcı tanıya ulaşmada zorluklar yaşanmaktadır (38).

MPM genetiği hakkında yapılan daha az sayıda çalışma olmakla birlikte özellikle sarkamatoid tip mezotelyomada 1p36, qp21.3, 3p21.3, 4q22, 6q25, 9p21.3, 13q ve 22q kayıpları ve 1q ve 8q de artış, ayrıca en sık olarak CDKN2A ve CDKN2B de içeren 9p kayıpları görülmüştür. Bu sonuçların hastalığın kötü prognozu ve nüks ile ilişkili olduğu da belirtilmektedir (41-42). Bazı çalışmalarda mevcut bulguların akciğer kanserleri içinde yaygın olup MPM ya özgü olmadığı ve benign-malign süreç ayrımına katkıda bulunmadığı da belirtilmiştir (43-44). Mevcut bilgilerle BAP-1 MPM ile en çok ilişkilendirilen gen olmakla birlikte ayrıca nörofibromatozis tip 2 (NF2) 22q12 kaybı ve telomeraz reverse transkriptaz (TERT) mutasyonları da araştırılmaktadır (46,47).

Son yıllarda akciğer kanseri genetiği hakkında çeşitli araştırmalar yapılmış ve akciğer kanserinin tanı ve tedavisinde çok önemli gelişmeler yaşanmıştır. Ayrıca hastalığın görüldüğü populasyonun gençleşmesi ve sigaranın akciğer kanserine sebep olduğu kanıtlanmasına rağmen insidansın ve mortalitenin giderek artması nedeniyle konu giderek önem kazanmaktadır (1).

Türkiye'de insidans ve mortalite açısından kesin sayılar verilememektedir. Fakat 2001 yılında İzmir'den yayınlanan veriler erkeklerde en sık, kadınlarda ise yedinci sıklıkta gözlenen kanser türüdür. Önlenebilir bir hastalık olması nedeniyle toplum sigaranın zararları konusunda bilinçlendirilmekte, sigara kullanımı azaltmak ve bıraktırmak için çeşitli ekonomi ve sağlık politikaları uygulanmaktadır. Genetik akciğer kanseri riskini 2,4 kat arttırmakta ve eşlik eden faktörler bu riski perçinlemektedir Akciğer kanserinde farklı hücre alt tipleri mevcut olup bu alt tiplere farklı tedaviler uygulanmakta ayrıca hedefe yönelik tedaviler planlanması nedeniyle hastalığın meydana geldiği DNA yeniden düzenlenmeleri araştırılmaktadır (39).

Bu çalışmada, akciğer adenokarsinomunun MPM'dan ayırıcı tanısında ve tedavisinde yaşanan birçok gelişmeye rağmen halen histopatolojik ayırıcı tanıda tamamen yeterli olmayan yöntemlere alternatif sunulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Analitik tipte bir araştırma olup vaka-kontrol çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesinde 2011-2013 yılları arasında yapılmıştır. Tez araştırmasının laboratuvar aşaması Nisan-Mayıs 2013 tarihleri arasında Temel Onkoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Aralık 2015'te tez tamamlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu çalışmaya; Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesinde Göğüs Hastalıkları, Tıbbi Onkoloji ve Göğüs Cerrahisi kliniklerinde 2011-2013 yılları arasında akciğer kanseri yeni tanısını alarak opere olan 50 hastadan, aydınlatılmış onamları alınan, cinsiyet farkı gözetilmeden, 12 akciğer adenokarsinom olgusu dahil edilmiştir. Mezotelyoma olguları asbest maruziyeti belirgin olan Diyarbakır merkezinden temin edilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

BAP bütçe kısıtlaması nedeniyle her bir gruptan 12 olgu ve normal kontrol olarak 8 olgu dahil edilmiştir. Kontrol olgulardan periferik kan mononükleer hücreler kullanılmıştır. Olgular prospektif olarak izlenmiştir. Olguların demografik, klinik, patolojik özellikleri ve gen ekspresyon verileri kaydedilmiştir. Olguların alınan örneklerinden tanı için incelemelerden artan tümör dokuları kullanılmıştır. Hastalara ek girişim yapılmamıştır.

3.5. Cihazlar ve Gereçler

Tablo 1: Mevcut Cihazlar

Hassas Terazi (Sartorius BP221S)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Real time PCR	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Vorteks (Velp Scientifica ZX3)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
pH-metre (Hanna HI 9321)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
saf su sistemi	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Mikroskop olympus bx50	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Derin dondurucu (Sanyo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı.
Sıvı azot tankı	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Laminar Flow	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Mikrosantrfuj thermo	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
Pastör fırın	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı
-80°C derin dondurucu	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuarı

3.6. Sarf Malzemeler

- RNA izolasyon kiti
- cDNA sentez kiti
- İnsan kökenli DNA repair RT-PCR Array kiti
- Kriotüpler
- Tüp
- Steril pastör pipet
- Pipetörler ve pipet ucu
- Örnek saklama kutuları

3.7. Araştırmanın Zaman Çizelgesi

Tablo 2: Araştırmanın Zaman Çizelgesi

Takvim	2011-2012		2013		2014		2015		2016
	Ekim -Aralık	Ocak-Aralık	Ocak-Haziran	Temmuz - Aralık	Ocak-Haziran	Temmuz-Aralık	Ocak-Haziran	Temmuz-Aralık	Ocak-Haziran
Konu seçimi									
Kaynak inceleme									
Proje ön hazırlığı									
Labotaruvar aşaması									
Veri toplama									
Veri girişi ve temizliği									
Çözümleme									
Yazım									

3.8. RNA izolasyonu, Ölçümü ve cDNA sentezi

Mezotelyoma olgularının arşiv parafin bloklardan tümörü temsil eden alandan hematoksilen eosin boyalı lamlarla karşılaştırılarak örnek alındı. 2x2x2 mm boyuttaki örnek steril ependorf içine kondu. Parafin ksilol, azalan alkol serilerinden örnek geçirilerek uzaklaştırıldı. Örnek gece proteinaz >k içinde bekletilip RNA izolasyonuna geçildi.

Taze akciğer adenokarsinom olgularında ameliyatta çıkarılan spesimenden akciğer kanseri alanı patolog tarafından steril olarak tanıyı etkilemeyecek şekilde örneklenmiş ve RPMI ve

%1 penisin streptomisin içeren transfer ortamı içinde Temel Onkoloji Laboratuarına ulaştırılmıştır. İmprint yapılıp giemsa ile boyanıp tümör konfirmasyonu yapıldıktan sonra mekanik 2x2x2 mm doku steril bistüri ile ayrılıp steril ependorf içine dondurma ortamında konup -80 derecede saklanmıştır. RNA izolasyonu öncesi mekanik vibrasyonla parçalanmıştır. PBS ile yıkama yapılıp santırfuj edilip süpernatan atılmış ve RNA izolasyonuna geçilmiştir.

RNA izolasyonu yönteminde temel prensip; hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp, fenol kullanılarak RNA nın ekstrakte edilmesine dayanır. Günümüzde kullanılan protokoller 1987 de Chomczynski ve Sacchi tarafından gerçekleştirilmiş olan RNA izolasyon protokolünün modifiye halleridir. RNA izolasyonundan maksimum verim elde edebilmek için örneklerden hücreler bekletilmeden direkt olarak izole edilmeli ve hemen çalışılmamalıdır. Öncelikli olarak izole edilen hücreler sıvı azotta (-196°C) yaklaşık olarak 5 dakika gibi kısa bir süre şoklandıktan sonra RNA izolasyonuna geçilmelidir. Buradaki temel amaç; hücre duvarlarının parçalanmasını sağlayarak elde edilecek olan RNA'nın verimliliğini arttırmaktır.

İzole edilen PBMC 'leri uygun seyreltme işlemleri ardından TOMA lamı ile sayılmıştır. Buna göre $1x10^6$ hücre başına yaklaşık 15 µg RNA eldesi için uygulanacak prosedür şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan RNA izolasyon kiti Macherey-Nagel olup bufferlar hazır olarak temin edilmiştir.

İzolasyon işlemi için öncelikle ön hazırlıklar yapıldı. Bunun için;

RA3 Wash Buffer (Macherey-Nagel Lot:PAF0029660) solüsyonuna 20 ml etanol eklendi ve aşağıdaki prosedür izlendi.

Kriyoviyollerdeki hücreler 1,5 ml 'lik konik tabanlı mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

Steril mikrosantrifüj tüplerine alınan hücreler 1500 rpm 5 dakika santrifüj yapıldı.

Filtreli tüplere ve onların konulduğu koleksiyon tüpleri iç içe geçirilip üzerlerine hasta adları yazıldı.

Santrifüj işleminden sonra üst kısım çekilerek atıldı. Bu işlem steril filtreli pipet uçları kullanılarak gerçekleştirildi.

Hücrelerin üzerlerine 350 µl RA1 Lysis buffer (Macherey-Nagel Lot:PAF0029425) eklendi ve pipetaj yapıldı.

Hücrelerin üzerlerine 3,5 µl merkaptoetanol eklendi ve bir kaç saniye vorteks yapıldı.

Önceden koleksiyon tüpüne takılmış olan filtrelere bu hücreler aktarıldı.

11000 g' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu aşama filtreleme aşamasıydı ve artan şeylerin uzaklaştırılması amacıyla yapıldı. O yüzden filtreli kısımlar atıldı.

Alt kısımlar koleksiyon tüplerinin kapakları olmadığı için yeni steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

Her bir örneğin üzerine 350 µl %70' lik etanol ilave edildi.

Nükleospin columnları (Macherey-Nagel Lot:SPB000898) açılıp üzerlerine hasta isimleri yazıldı.

Mikrosantrifüj tüplerindeki hücreler bu nükleospin columnlarına aktarıldı.

30 saniye 11000 g de santrifüj yapıldı.

Filtreli kısımlar alınıp yeni koleksiyon tüplerine aktarıldı.

Her bir tüpe 350 µl MDF buffer (membrane desalting buffer Lot:PAF0029626 Macherey-Nagel) eklendi.

11000 g' de 1 dakika santrifüj yapıldı.

Santrifüj işlemi gerçekleşirken DNase reaction mix hazırlandı.

Bu amaçla;

10 µl rDNase (Macherey-Nagel Lot:D0809R) X Örnek sayısı

+

90 µl reaction buffer (Macherey-Nagel Lot:PAF0029394) X Örnek sayısı

Her bir örneğin üzerindeki filtreli tüpe hazırlamış olduğumuz bu karışımdan eklendi.

Ekleme işlemi tamamlandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Bekleme sürecinin bitmesiyle yıkama aşamasına geçildi. Bunun için hücrelerin üzerlerine 200 µl RA2 (Macherey-Nagel Lot:PAF0029438) solüsyonu eklendi.

30 saniye 11000 g de santrifüj yapıldı.

Alt kısımlar atıldı.

Filtreli kısımlar yeni koleksiyon tüplerine takıldı.

Her bir örneğe ilk kullanımda 20 ml etanol ilavesi yapmış olduğumuz RA3 wash buffer solüsyonundan (Macherey-Nagel Lot: PAF0029660 5ml) 600 µl eklendi.

30 saniye 11000 g de santrifüj yapıldı.

Alttaki koleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı.

Her bir örneğin üzerine 250 µl RA3 wash buffer solüsyonundan (Macherey-Nagel Lot: PAF0029660 5ml) eklendi.

11000 g de 2 dakika santrifüj yapıldı.

Böylelikle RNA toplama aşamasına gelindi. Bu aşamada steril mikrosantrifüj tüplerinin üzerlerine hasta isimleri yazıldı.

Alt kısımlar uzaklaştırılıp filtreli kısımlar önceden üzerlerine hasta isimleri yazmış olduğumuz steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılır.

Her bir hasta örneği üzerine 60 µl RNase free su (Macherey-Nagel Lot:PAF0029490) eklendi. Bu işlem gerçekleştirilirken filtrenin suyu hemen emmesinden dolayı suyu çeperlere değilde filtrenin tam ortasına isabet ettirmeye dikkat edildi.

11000 g de 1 dakika santrifüj yapıldı.

Böylelikle alttaki 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerinde RNA' yı elde etmiş olduk.

Bu RNA daha sonra çalışmak için -80°C 'de saklandı.

cDNA sentezi yapmadan önce ne kadar RNA kullanmamız gerektiğini anlamak için RNA ölçümü yapıldı. Bunun için; T80+UV/VIS Spektrofotometer cihazı (PG Instrument) kullanıldı. Bu amaçla;

Yeni steril mikrosantrifüj tüplerine hasta adları yazıldı.

RNA ölçümü için 1:25 oranında seyreltme yapıldı (72 µl distile su ve 3 µl RNA her bir mikrosantrifüj tüpüne eklendi.

Pipetaj yapıldı.

Saf su ile küvetler yıkandı.

Bilgisayardan UV WIN programı çalıştırılıp application→setting' den ayarlar yapılmıştır. (A1/A2→260/280)

Her 2 küvete de 75 µl distile su konularak sıfırlama işlemi yapıldı.

Ölçüm işlemi gerçekleştirildi.

Örnekler 1:25 oranında seyreldiği için çıkan sonuçlar 25 ile çarpıldı.

RNA kalitesi ile ilgili olarak; her türlü kontaminasyondan kaçınılarak steril çalışmaya ve pipetajların doğru yapılmasına dikkate edildi.

cDNA, RNA molekülünden revers transkriptaz enzimi yardımıyla DNA kopyasının sentezlenmesi işlemidir. Hedeflenen hücrenin DNA sı ele alındığı zaman işlemlenen ya da işlemlenmeyen tüm genleri içerir. O yüzden hücrelerin anlatım yapan işlemlenen kısmı olan mRNA lar kullanılır. Böylelikle mRNA dan cDNA elde edildiği zaman yalnızca anlatımı yapılan genler bulunur. Bu amaçla önce RNA izolasyonu ardından cDNA çevrimi gerçekleştirilir. Burada mRNA işlenirken intronlar uzaklaştırılır geriye ekzonlar kalır **.**

cDNA sentezini gerçekleştirmek için RNA kullanılır. cDNA sentezi için kullanılan revers transkriptaz enzimine başlangıç için ihtiyaç duyduğu primer poli A kuyruğundan bağlanır. Enzimde poli A kuyruğunun olması revers transkripsiyon basamağında üstünlük sağlamasına neden olmaktadır. Ardından revers transkriptaz mRNA'yı kalıp olarak kullanarak primeri yardımıyla uzamanın gerçekleşmesini sağlar ve tek zincirli cDNA kopyasını oluşturulur**.**

Bir "plate"te kullanılması gereken total RNA miktarının 1 mikrogram olması için gereken RNA miktarı hesaplandı

A hastası için RNA miktarı 222,222 ise;

1000 µl 222,222

X 1

1000/222,222=4,500 µl

Tablo 3: Total Volume 10 Mikrolitre Olması İçin Gereken Hesaplama Yöntemi

RNA	Buffer GE	RNase free su	total
4,500 µl	2 µl	3,500 µl	10 µl

cDNA sentezi konvansiyonel PCR cihazı (NY-X Teknik ATC 401 model) kullanılarak gerçekleştirildi.

Küçük PCR tüplerine hasta isimleri yazıldı.

Yukarıda her bir hasta için hesaplanmış olan su miktarları eklendi.

Her bir örnek üzerine 2 µl GE buffer (24 µl Lot:DW27-2) eklendi.

Her hasta için hesaplanan miktardaki RNA lar eklendi.

Birkaç saniye ufak bir spin işlemi gerçekleştirildi.

Spin işleminden sonra 42°C 5 dakika ya ayarlanmış olan SAcDNA 1 programı çalıştırıldı.

SAcDNA 1 programı tamamlandıktan sonra en az 1 dakika kadar buzda bekletildi.

Bu sırada cDNA nın oluşmasında çeviri kısmında görev alan master mix toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlandı. Bunun için;

Tablo 4: cDNA Master Mix Hazırlama Protokolü

	Bir Hasta İçin
Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transkriptaz master mix	2 µl
RNase free water	3 µl

Örnekler buzdan raka (+4°C) alındı ve hazırlanmış olan master mix den her bir örneğe 10 µl eklendi.

Birkaç saniyelik ufak bir spin yapıldı.

SAcDNA2 programı (NY-X Teknik ATC 401 model) çalıştırıldı.

SAcDNA2 programı tamamlandıktan sonra her bir örnek üzerine 91 µl RNase free su' dan eklendi.

Böylelikle cDNA sentezlenmiş oldu.

3.9. *RT-PCR Array* Analizi

Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (REAL - TIME PCR), DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir.

Real-time PCR dizi analizi yapılacak olan kit (QIAGEN PAHS-042A Lot:CB23.7-R1) insan kökenli olup DNA tamir enzimlerini kodlayan genler için hazırlanmış standart bir ticari kittir. Yapılmış olan data analizinde Tablo 1' de belirtilen genlerin ekspresyonları hakkında bilgi edinilmiştir.

Elde edilen RNA' lar cDNA' ya çevrilmiştir. cDNA' lar uygun PCR karışımlarına DNA kontaminasyonundan özenle kaçınılarak eklenmiştir.

Her bir kuyucuğa koymamız gereken RNase free su, cDNA ve master mix den oluşan karışım hazırlandı. Bunun için;

1248 µl RNase free water 5 ml' lik steril tüpe aktarıldı.

102 µl cDNA eklendi.

SYBR Green Rox qPCR mastermix den 1,35 ml konulup pipetaj yapıldı.

RT^2 profiller PCR Array Human DNA repair (Qiagen PAHS-042A Lot:DH26-10) array inde her bir kuyucuğa 25 µl bu karışımdan eklendi.

Kuyucuklar tek tek kontrol edildi ve üstleri strip ile kapatıldı.

Çeperde kalanların dairesel hareketler çizecek şekilde sallanarak aşağıya inmeleri sağlandı.

AB Applied Biosystem 7000 Sequence Detection System cihazı ve bilgisayar çalıştırıldı.

Bilgisayardan 7000 System Software Programı açıldı.

Assay: Absolute Quantification (standart curve)

Countainer: 96-well clear

Template: Blank Documents

Operator: XP

Seçildikten sonra ileri tuşuyla devam edildi.

- Dedector name→GADPH

  Reporter → SYBR

  ↓

  Add

  ↓

  İleri

- Instruments ;

  ✓ Stage 3 silindi.

  ✓ Stage 1 Stage 2

  Reps : 1 Reps: 40

  95:00 95:00

  10:00 00:15

  ↓

  Add step

↓

60

1:00

- ✓ Sample volume :25

Start seçilerek cihaz çalıştırıldı ve PCR tamamlandıktan sonra sonuçlar kaydedildi.

3.10. İstatistik Yöntem

Gen ekspresyonuna göre her koşulun ekspresyonunun artışı ya da azalışı kat değişimleri (fold change) hesaplanmıştır. Bu analizler SA Bioscience'ın data analysis expression sayfasında yapılmıştır. Bu sitenin kullanımı ücretsizdir. Heat map ve clustergramlar ile gen ekspresyon analizleri desteklenmiştir. T test tabanlı p değerli bu sitede değerlendirilmiştir. SA Bioscience'ın data analysis expression http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php sayfasında yer alan 2'Average delta CT değerleri kullanılarak SPSS'de (15.0 SPSS Programı) Mann-Whitney U, Kaplan Meier sağkalım analizi, Log Rank testleri yapılmıştır. Tek değişkenli analizlerde sayımla belirtilen değişkenlerin karşılaştırılmasında Fisher Kesin Test, ölçümle belirtilen değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. Yaşam analizinde Kaplan Meier kullanılmıştır. İki yaşam eğrisi Log Rank ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p<0.005$ kabul edilmiştir.

Tablo 5: Ekspresyon Analizi Yapılan Genler

Baz Ekzisyon Tamiri (BER): APEX1, APEX2, CCNO, LIG3, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, POLB, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1.
Nükleotid Eksizyon Tamiri (NER): ATXN3, BRIP1, CCNH, CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SLK, XAB2, XPA, XPC.
Mismatch Tamir (MMR): MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, POLD3, TREX1.
Çift Zincir Kırığı Tamir (Double-Strand Break - DSB) : BRCA1, BRCA2, DMC1, FEN1, LIG4, MRE11A, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51L1, RAD51L3, RAD52, RAD54L, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6.
DNA Tamir İlişkili Diğer Genler: ATM, ATR, EXO1, MGMT, RAD18, RFC1, TOP3A, TOP3B, XRCC6BP1.

4.0.BULGULAR

Bu çalışmada housekeeping gen olarak 4 tane gen kullanılmıştır: ACTB, B2M, GADPH, RPLP0. RT-PCR Array Analizi ile gen ekspresyon analizi sonucunda AADK ve MPM olgularının kontrol gruba göre ve birbirleri ile yapılan karşılaştırmalarında elde edilen sonuçlar tablo 6 ve tablo 7'de belirtilmiştir.

Tablo 6: AADK ve MPM tümör hücrelerinde expresyon gösteren DNA onarım ilişkili genler içinde kontrol gruba göre elde edilen "fold change" değerleri

Gen	AADK/Kontrol Grubu	MPM/Kontrol Grubu	*p (AADK/MPM)*
APEX2	1,6763	6,1243	>0.05 / >0.05
BRCA1	9,5919	20,2646	>0.05 / 0,01558
BRCA2	4,3804	10,8169	>0.05 / 0,012071
CCNH	2,3922	4,4773	>0.05 / 0,032102
CDK7	3,909	15,4192	>0.05 / 0,019161
LIG4	2,2608	13,7822	0,044834 / >0.05
MLH1	2,5581	7,5515	>0.05 / 0,013792
MLH3	5,9579	15,4275	>0.05 / >0.05
MSH3	2,2494	10,2785	>0.05 / >0.05
MSH4	6,5356	12,0767	>0.05 / >0.05
NEIL3	14,3334	80,5092	0,015299 / >0.05
PARP1	0,9019	2,0543	>0.05 / >0.05
PARP2	4,7127	7,4604	0,043874 /0,009579
PARP3	2,3613	8,2119	>0.05 / 0,049911
PMS1	1,8236	7,3582	>0.05 / 0,039034
RAD50	2,6223	10,2765	>0.05 / 0,03758
RAD51	2,6223	10,2765	>0.05 / >0.05
RAD51B	4,3683	16,7622	>0.05 / >0.05
RAD51D	3,2769	7,0688	>0.05 / >0.05
RAD52	2,0126	5,1099	>0.05 / >0.05
RPA3	2,8581	7,9353	>0.05 / >0.05
PRKDC	0,5309	2,9778	>0.05 / >0.05
SMUG1	6,7053	18,0914	>0.05 / >0.05
TREX1	0,5115	4,1669	>0.05 / >0.05
UNG	7,422	26,6752	0,027669 / 0,009662
XPA	2,0485	8,8342	>0.05 / >0.05
XRCC2	5,6758	17,6367	>0.05 / >0.05
XRCC4	5,9765	17,0836	>0.05 / >0.05

Tablo 7: MPM ve AADK tümör hücrelerinde 2 grubun birbirine göre alınan "fold change" değerlerinde istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunan genler

Gen	MPM / AADK	*p*
CDK7	4.39	<0.05
MLH1	5.32	<0.05
TREX1	9.29	<0.05
PRKDC	7.64	<0.05
XPA	5.54	<0.05
PMS1	5.19	<0.05
UNG	4.93	<0.05
RPA3	2.97	<0.05

Tablo 8: Yaş

Olguların yaş ortalamaları benzerdi.

Tanı	Ortalama	N	Std. Deviasyon	Minimum	Maximum	Median
Adenokarsinom	57,8333	12	8,31027	42,00	73,00	56,0000
Mezotelyoma	62,9167	12	11,44519	48,00	84,00	58,0000
Toplam	60,3750	24	10,12020	42,00	84,00	57,5000

Tablo 9: Ailede Kanser Öyküsü

Malign plevral mezotelyoma olguları içinde ailede kanser öyüsü olmayıp, adenokarsinom grubunda üç hastanın ailesinde kanser öyküsü alındı.

	Tanı		
Ailede Kanser	Adenokarsinom	Mezotelyoma	Toplam
Yok	9	12	21
	75,0%	100,0%	87,5%
Var	3	0	3
	25,0%	,0%	12,5%
Toplam	12	12	24
	100,0%	100,0%	100,0%

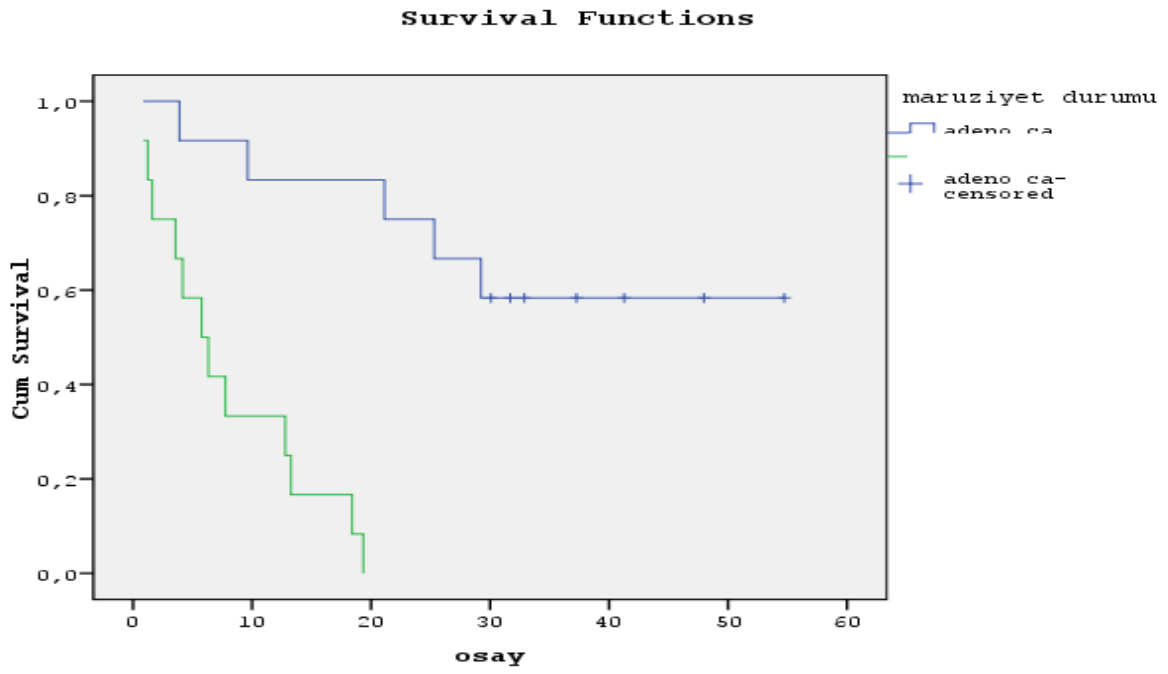
Tablo 10: Yaşam Süresi – 1: Akciğer adenokarsinomu ve malign plevral mezotelyoma grupları içinde mezotelyoma tanısı ile izlenen hastaların tamamı yaşamını yitirmiş. Adenokarsinom tanılı olgulardan yedisi hayattaydı.

Tanı	Toplam Olgu		Hayatta olan	
	N	%	N	%
Adenokarsinom	12	5	7	58,3%
Mezotelyoma	12	12	0	,0%
Toplam	24	17	7	29,2%

Tablo 11: Yaşam Süresi – 2: Ortalama yaşam süresi 19 ay olarak saptandı.

N	24
Mean	19,17
Median	15,83
Std. Deviation	15,913

Tablo 12: Yaşam Süresi – 3: Malign plevral mezotelyoma tanısı ile izlenen olguların yaşam sürelerinin adenokarsinom olgularına göre çok daha kısa ve hastalığın hızlı seyir gösterdiği gözlendi.



Tablo 13: Akciğer Adenokarsinoma Olgularının Evreleri: Akciğer adenokarsinomu olgularının 7 si %58,3'ü erken evre, 5'i %41,6'sı ileri evre grubunda hastalardı. Erken evre olan hasta grubundan 1 hasta yaşamını yitirmiş. 6 hasta hayatta iken, ileri evre olan 5 hastadan 1'i halen hayattaydı.

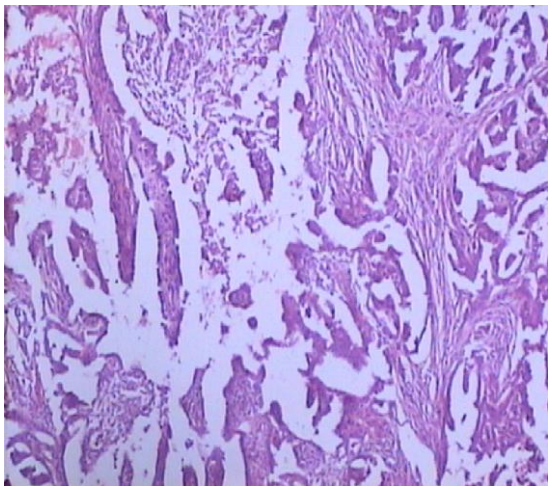
Tanı	Olgu		Hayatta Olan		Yaşamını Yitiren	
	N	%	N	%	N	%
Erken evre	7	58,3	6	85,7	1	14,2
İleri evre	5	41,6	1	20	4	80
Adenokarsinom	12	100,0	7	58,3	5	4,6

Tablo 14: MPM Olguları

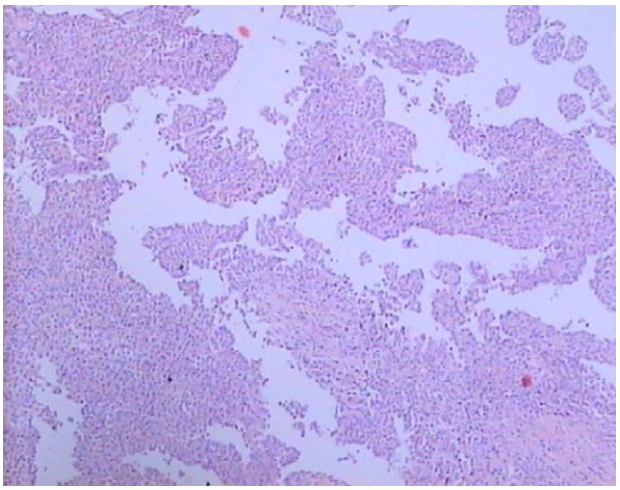
Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Tanı Tarihi	Son İzlem Tarihi
1	56	Erkek	04-05-2011	23-12-2011
2	58	Erkek	14-12-2012	05-06-2013
3	53	Kadın	08-11-2012	17-05-2013
4	56	Erkek	24-03-2011	27-07-2011
5	57	Kadın	01-08-2012	16-11-2012
6	84	Kadın	20-09-2012	07-11-2012
7	59	Kadın	12-10-2011	16-04-2013
8	72	Erkek	28-09-2011	30-04-2013
9	48	Erkek	10-05-2012	29-05-2013
10	76	Erkek	18-12-2012	24-01-2013
11	58	Erkek	27-04-2012	30-05-2013
12	78	Erkek	02-03-2012	28-03-2012

Tablo 15: Akciğer Adenokarsinomu Olguları

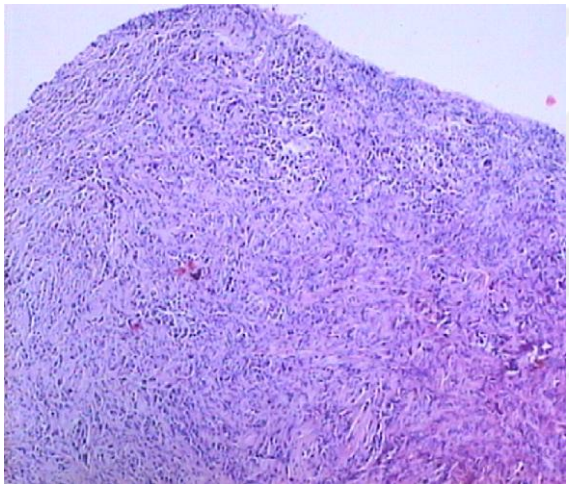
Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Tanı Tarihi	Son İzlem Tarihi
1	73	Erkek	25-03-2013	2015-...
2	54	Kadın	04-05-2011	2015-...
3	55	Kadın	20-06-2012	14-11-2014
4	70	Erkek	31-10-2012	25-02-2013
5	42	Erkek	09-10-2012	2015-...
6	55	Erkek	10-06-2013	06-03-2015
7	58	Erkek	18-02-2013	2015-...
8	65	Erkek	23-11-2011	2015-...
9	53	Kadın	26-02-2013	27-03-2013
10	59	Erkek	11-06-2012	2015-...
11	53	Erkek	14-11-2012	30-08-2013
12	57	Kadın	13-05-2013	2015-...



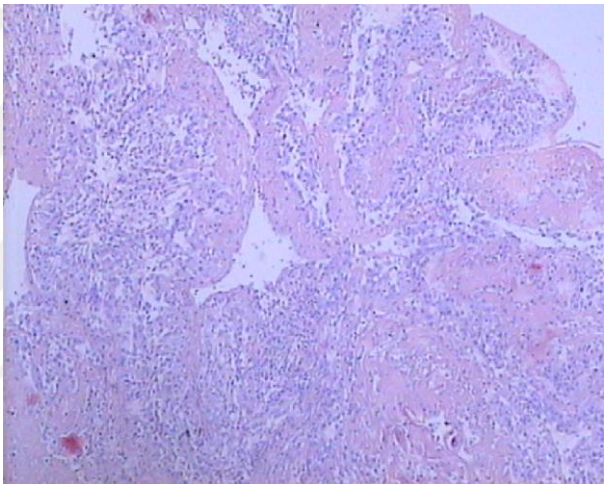
Mezotelyoma no 1



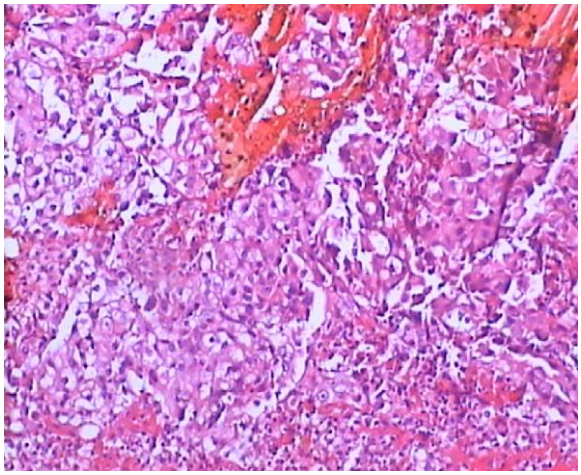
Mezotelyoma no 2



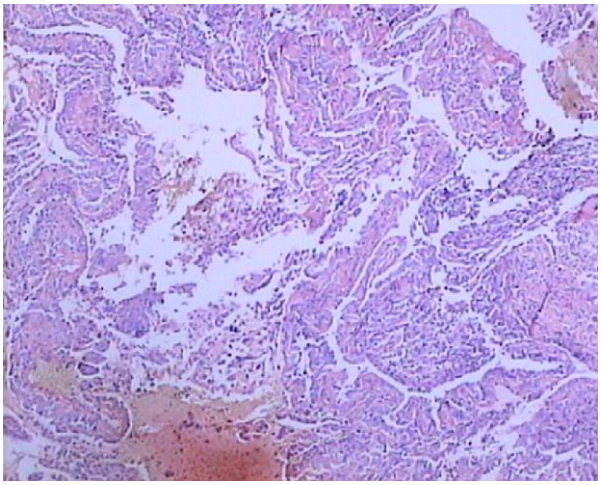
Mezotelyoma no 3



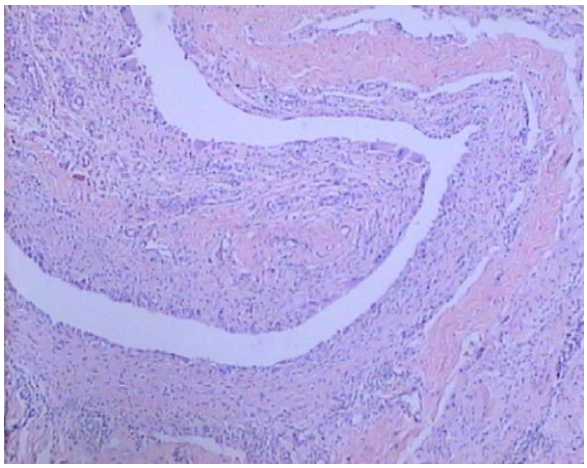
Mezotelyoma no 4



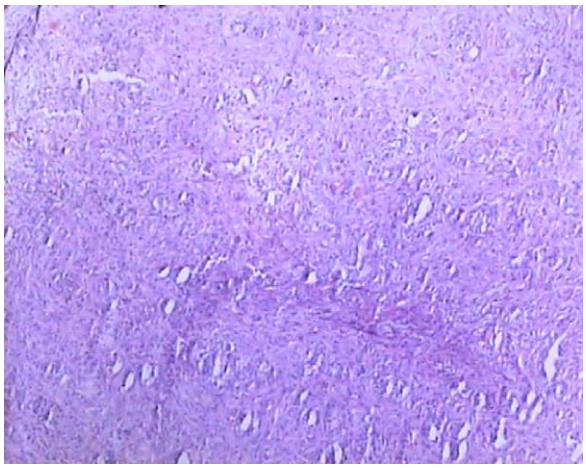
Mezotelyoma no 5



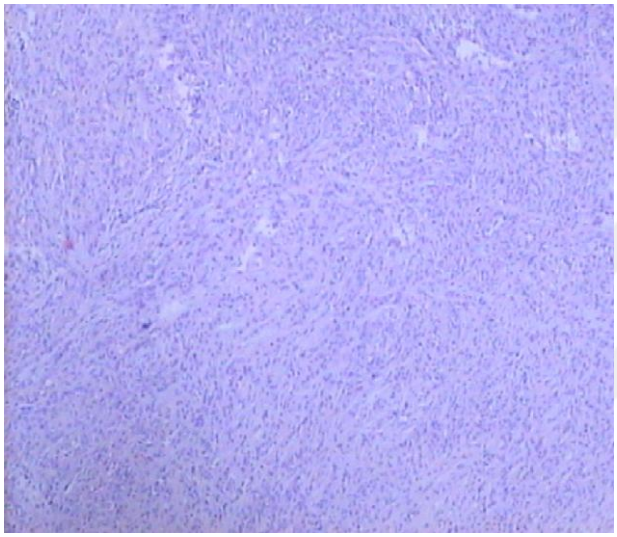
Mezotelyoma no 6



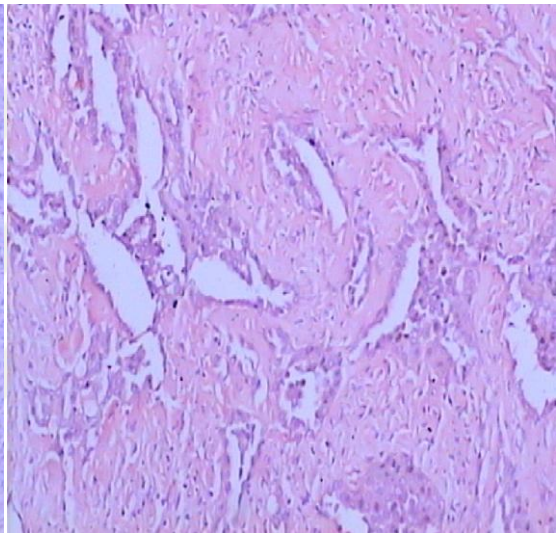
Mezotelyoma no 7



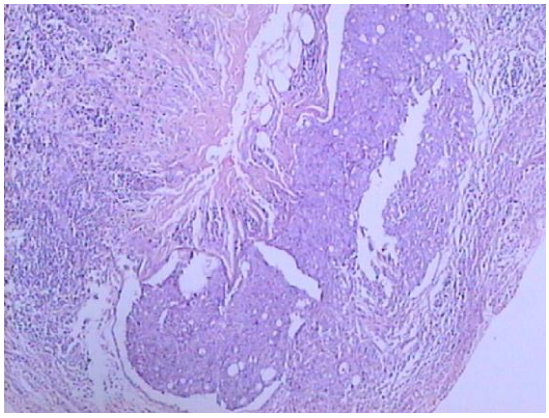
Mezotelyoma no 8



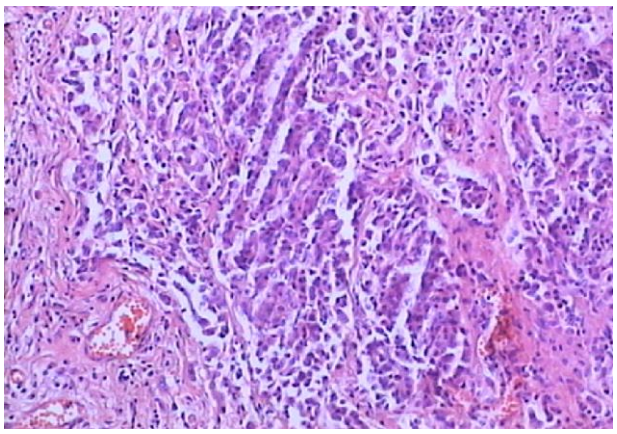
Mezotelyoma No 9



Mezotelyoma no 10



Mezotelyoma No 11



Mezotelyoma No 12

Şekil 1:MPM Olgularının Mikroskopik Görüntüleri

Tablo 16: Gen Ekspresyon Analizleri

Pozisyon	AADK1	AADK2	AADK3	AADK4	AADK5	AADK6	AADK7
A01	34,47	32,11	38,94	32,28	31,23	28,02	28,42
A02	37,99	36,44	38,88	37,25	36,44	34,58	31,65
A03	36,43	37,41	40	36,06	7,68	36,04	30,5
A04	36,06	34,56	36,06	35,29	36,17	34,14	29,19
A05	37,77	34,99	36,6	35,2	34,26	33,03	30,31
A06	35,27	35,19	37,79	36,14	37,8	31,89	30,1
A07	38,76	35,61	40	38,67	38,78	34,06	31,72
A08	35,23	34,42	35,72	35,79	35,09	30,99	30,39
A09	33,03	32,15	34,17	32,7	32,32	27,51	26,19
A10	30,43	30,84	30,55	31,55	30,5	27,67	29,28
A11	35,26	35,93	39,66	34,01	33,16	29,58	27,81
A12	35,44	32,54	34,19	34,02	32,46	29,85	28,42
B01	34,93	34,91	40	38,78	35,6	34,16	30,74
B02	36,64	37,12	39,27	37,93	35,46	35,1	32,52
B03	33,94	34,85	35,79	34,74	34,17	32,92	30,39
B04	35,77	35,94	38,36	35,71	34,99	32,45	31,1
B05	38,69	37,21	39,84	36,71	34,84	34,84	30,51
B06	36,39	33,77	39,42	37,76	36,79	31,38	30,2
B07	33,22	32,92	37,89	35,23	33,72	29,53	27,67
B08	37,69	36,23	39,93	37,62	37,21	31,72	29,62
B09	35,71	33,08	37,28	34,52	32,4	28,24	28,33
B10	37,8	36,93	39,82	35,41	37,08	31,77	30,97
B11	37,11	36,64	35,69	33,84	33,88	31,19	30,82
B12	35,82	36,18	37,57	34,47	35,99	31,58	31,19
C01	37,27	33,47	36,89	37,58	34,69	30,13	29,37
C02	37,38	33,57	40	33,27	34,94	33,96	30,18
C03	35,64	35,77	38,72	36,73	33,89	33,87	28,16
C04	35,02	32,91	39,49	34,1	34,46	35	28,22
C05	35,19	33,99	35,98	35,12	34,72	31	29,12
C06	35,93	32,57	37,83	35,63	34,3	30,55	28,69
C07	33,48	33,3	34,74	33,31	32,88	30,84	30,2

C08	35,08	32,53	37,79	34,4	34,8	29,27	27,52
C09	32,71	32,57	34,02	33,21	33,51	30,8	28,16
C10	34,06	33,72	35,01	33,65	33,89	30,82	29,98
C11	36,11	34,91	39,12	36,92	36,49	31,06	31,71
C12	35,23	34,07	39,47	36,55	33,53	29,43	28,33
D01	37,84	35,11	36,27	34,67	35,25	30,09	29,5
D02	34,16	34,18	37,51	34,89	35,85	33,4	29,75
D03	34,4	33,18	36,16	34,38	33,75	29,58	28,63
D04	36,55	35,43	37,07	36,49	37,03	34,07	31,31
D05	34,45	34,36	44,77	34,09	33,91	32,05	28,65
D06	32,93	33,42	36,84	32,94	33,73	30,96	30,06
D07	37,62	36,53	39	37,21	37,19	34,42	30,77
D08	35,69	33,9	36,52	34,45	34,19	30,81	29,17
D09	35,26	32,83	39,01	36,4	34,09	30,2	28,98
D10	35,5	34,23	37,06	35,86	35,17	31,67	30,89
D11	35,57	33,34	40	35,49	34,65	28,94	28,13
D12	34,1	31,84	35,7	35,2	33,61	28,84	28,1
E01	32,62	31,94	34,01	33,24	33,45	29,12	28,62
E02	36,11	33,79	37,49	34,63	34,63	30,03	29,04
E03	35,01	33,27	34,6	34,22	33,46	30,32	30,4
E04	36,7	36,21	36,3	35,78	35,22	32,45	31,4
E05	35,22	35,22	37,72	34,78	35,4	33,03	29,98
E06	32,36	31,92	31,99	32,03	31,55	29,32	28,9
E07	33,45	31,95	35,46	32,69	32,84	29,98	25,71
E08	33,43	33,56	34,07	33,55	33,63	29,73	29,97
E09	35,05	31,21	36,43	32,57	32,09	29,29	27,7
E10	34,94	34,14	36,43	35,09	33,92	30,17	29,15
E11	37,05	36,04	38,12	36,84	36,39	33,8	31,04
E12	35,82	33,5	38,9	37,59	35,08	33,71	28,34
F01	35,16	35,59	37,68	35,51	35,35	34,16	31,23
F02	36,01	34,83	36,26	34,87	35,19	31,03	29,46
F03	37,34	34,43	38,22	36,26	35,71	30,19	28,44
F04	34,84	34,72	34,91	34,27	33,6	32,32	31,35

F05	36,5	35,94	35,64	32,81	36,22	31,98	29,9
F06	33,77	31,36	36,69	33,25	32,61	28,99	28,53
F07	34,94	33,51	36,96	32,55	32,77	29,86	29,25
F08	32,48	31,19	34,54	33,1	30,87	27,06	26,55
F09	34,61	33,82	35,29	34,38	33,37	28,17	29,81
F10	34,51	32,21	34,48	34,25	33,17	28,74	28,51
F11	32,31	33,46	33,42	32,53	32,19	28,93	29,07
F12	34,73	34,6	35,03	34,09	34,95	30,72	30,51
G01	35,14	33,93	36,03	33,92	34,39	40	31,13
G02	34,31	33,14	37,89	32,81	32,05	29,89	28,52
G03	31,99	31,97	32,7	31,79	31,21	29,19	28,5
G04	36,1	35,03	37,13	34,3	34,09	30,74	31,1
G05	35,76	35,22	36,09	35,11	34,58	30,82	31,25
G06	33,48	34,05	34,72	33,86	33,57	29,25	29,27
G07	35,51	33,19	32,51	34,49	34,33	40	29,74
G08	32,72	32,45	32,19	32,55	32,11	26,47	29,23
G09	31,5	31,21	32,29	30,87	30,57	25,13	23,52
G10	28,88	28,53	33,52	30,01	28,29	24,33	24,2
G11	30,59	30,96	32,01	30,32	29,78	25,22	27,26
G12	35,06	34,25	33,75	34,41	33,76	29,13	30,76
H01	30,55	28,61	31,12	28,89	27,91	27,16	25,79
H02	29,34	29,42	38	27,31	27,51	28,05	23,35
H03	33,69	29,74	34,19	31,12	29,06	28,09	27,02
H04	34,23	34,4	35,87	33,41	33,18	29,29	30,03
H05	29,26	29,17	39,01	26,81	26,66	27,55	25,81
H06	35,33	33,62	37,19	35,3	34,94	33,85	31,76
H07	24,13	23,39	23,47	25,35	23,47	22,11	23,26
H08	23,72	23,11	23,21	24,91	23,16	21,73	23,07
H09	23,69	22,92	23,1	24,72	23,01	21,6	22,81
H10	19,04	20,07	20,04	20,2	20,04	18,42	20,09
H11	18,65	19,9	20,01	20,12	20,04	18,22	19,99
H12	19,61	19,64	20	20,09	20,02	18	20,05

Pozisyon	AADK8	AADK9	AADK10	AADK11	AADK12
A01	28,74	27,47	33,03	26,48	33,03
A02	33,1	32,97	36,8	32,97	36,8
A03	31,5	31,63	39,7	31,63	39,7
A04	31,78	30,42	36,5	30,22	36,5
A05	31,38	31,94	36,29	31,94	34,2
A06	33,28	32,88	37,23	32,88	37,23
A07	33,1	32,39	39,17	32,39	39,17
A08	32,44	31,1	35,51	32	35,51
A09	29,97	28,62	33,14	28,62	33,14
A10	29,27	30,24	28,37	31,21	27,92
A11	30,94	30,3	32,91	30,3	32,91
A12	29,31	29,47	33,81	29,47	33,81
B01	30,65	31,3	35,37	31,3	35,37
B02	33,85	33,74	37,7	33,74	37,7
B03	30,83	32,07	36,11	30,39	30,83
B04	33	32,67	37,1	31,1	33
B05	32,15	31,71	39,22	30,51	32,15
B06	31,83	31,55	38,52	30,2	31,83
B07	29,28	28,87	33,39	27,67	29,28
B08	31,94	30,79	38,96	29,62	31,94
B09	30,46	32,11	36,66	28,33	30,46
B10	33,4	32,47	37,79	30,97	33,4
B11	30,84	30,2	36,49	30,82	30,84
B12	32,73	32,33	35,89	31,19	32,73
C01	30,56	31,3	38,57	29,37	30,56
C02	30,3	30,19	34,56	30,18	30,3
C03	31,22	31,32	38,35	28,16	31,22
C04	30,97	30,93	37,61	28,22	30,97
C05	31,15	30,64	34,82	29,12	31,15
C06	30,77	30,76	35,16	28,69	30,77
C07	30,07	29,88	34,09	30,2	30,07
C08	30,72	30,05	36,55	32,53	37,79

C09	30,22	29,63	32,64	32,57	34,02
C10	31,36	31,52	33,87	33,72	35,01
C11	33,56	33,31	37,43	34,91	39,12
C12	32,14	31,53	36,37	34,07	39,47
D01	30,6	30,84	35,99	35,11	36,27
D02	31,58	32,12	36,86	34,18	37,51
D03	31,46	31,32	34,82	33,18	36,16
D04	32,39	33,01	37,19	35,43	37,07
D05	32,05	32,21	33,97	34,36	44,77
D06	33,07	31,63	33,17	33,42	36,84
D07	32,04	33,05	37,29	36,53	39
D08	31,05	31,02	35,3	33,9	36,52
D09	31,79	31,2	34,83	32,83	39,01
D10	32,35	32,12	35,18	34,23	37,06
D11	30,3	30,02	34,13	33,34	40
D12	31,17	31,08	33,56	31,84	35,7
E01	30,25	31,01	33,41	31,94	34,01
E02	31,08	30,47	34,35	33,79	37,49
E03	31,1	30,06	33,91	33,27	34,6
E04	32,65	32,58	35,89	35,78	35,22
E05	30,14	29,84	34,87	34,78	35,4
E06	30,22	30,34	31,34	32,03	31,55
E07	29,08	28,41	32,42	32,69	32,84
E08	30,84	31,36	33,16	33,55	33,63
E09	28,69	29,1	32,46	32,57	32,09
E10	31,09	29,95	34,45	35,09	33,92
E11	32,83	32,81	35,37	36,84	36,39
E12	31,38	31,11	37,76	37,59	35,08
F01	31,51	32,34	35,07	35,51	35,35
F02	31,7	31,59	36,38	34,87	35,19
F03	31,63	30,98	37,06	36,26	35,71
F04	31,56	32,06	34,22	34,27	33,6
F05	30,15	30,17	36,1	32,81	36,22

F06	29,33	29,74	33,61	33,25	32,61
F07	29,94	29,48	32,04	32,55	32,77
F08	28,5	28,44	31,28	33,1	30,87
F09	30,94	30,61	33,65	34,38	33,37
F10	30,46	29,71	33,48	34,25	33,17
F11	31,07	30,92	32,49	32,53	32,19
F12	31,58	32,24	35,11	34,95	34,73
G01	30,38	31,73	33,78	34,39	35,14
G02	28,62	28,55	33,43	32,05	34,31
G03	29,18	29,84	31,52	31,21	31,99
G04	30,66	30,51	34,52	34,09	36,1
G05	31,36	31,99	34,28	34,58	35,76
G06	30,14	30,51	33,06	33,57	33,48
G07	30,89	31,06	34,45	34,33	35,51
G08	30,35	29,7	32,18	32,11	32,72
G09	28,78	28,57	31,07	30,57	31,5
G10	26,11	25,64	30,21	28,29	28,88
G11	28,39	28,03	30,62	29,78	30,59
G12	31,87	31,66	33,45	33,76	35,06
H01	24,13	24,93	28,47	31,05	30,55
H02	21,85	22,5	27,33	31,74	29,34
H03	26,07	26,56	30,47	33,34	33,69
H04	29,39	29,3	33,12	32,94	34,23
H05	24,28	23,77	26,27	32,76	29,26
H06	31,66	32,01	35,61	32,4	35,33
H07	24,65	23,48	23,59	23,68	24,13
H08	24,22	23,16	23,33	23,35	23,72
H09	24,18	23,08	23,11	23,11	23,69
H10	19,91	20,08	20,06	19,25	19,04
H11	19,17	20	19,91	19,19	18,65
H12	19,53	20,09	19,93	19,22	19,61

Pozisyon	MPM1	MPM2	MPM3	MPM4	MPM5	MPM6
A01	39,78	35,75	39,15	30,28	34,97	37,04
A02	38,06	35,49	37,6	34,41	37,29	36,06
A03	39,03	35,86	40	31,4	38,93	34,93
A04	36,19	34,88	36,76	31,99	35,92	34,25
A05	31,45	35,13	35,41	33,23	35,09	34,56
A06	38,04	35,92	38,07	32,2	35,3	35,19
A07	40	38,2	40	32,73	39,59	35,61
A08	36,25	35,37	38,23	33,8	35,6	34,38
A09	35	33,54	34,71	29,14	32,64	31,75
A10	28,93	29,74	30,35	29,42	28,08	30,24
A11	34,06	32,61	40	30,17	33,32	31,68
A12	35,81	32,52	37,84	29,05	33,38	31,71
B01	39,32	32,58	40	31,69	36,82	35,58
B02	39,14	37,06	40	31,54	37,64	36,27
B03	36,62	35,46	37,06	33,11	35,53	33,43
B04	36,28	36,13	37,14	32,21	36,48	35,13
B05	40	37,36	40	33,57	39,13	36,61
B06	39,78	37,43	40	31,74	37,48	34,03
B07	38,71	34,65	39,79	29,6	35,42	32,31
B08	39,94	34,75	40	31,21	38,73	33,63
B09	36,19	36,44	36,2	32,03	37,03	34,62
B10	37,09	37,71	40	33,16	38,92	36,78
B11	39,02	34,6	37,35	30,98	37,27	35,68
B12	36,12	34,59	38,38	32,24	35,82	35,03
C01	39,66	35,82	39,94	31	36,36	33,19
C02	33,83	35,11	34,37	30,63	35,45	33,25

C03	39	35,41	37,19	30,67	37,98	33,92
C04	35,13	36,7	40	30,12	34,56	32,21
C05	36,2	35,06	37,82	31,4	36,01	34,2
C06	36,67	36,27	39,07	30,2	35,59	34,02
C07	34,52	33,83	34,54	30,8	34,11	33,33
C08	37,9	36,79	38,44	31,82	37,36	34,42
C09	34,15	33,18	34,1	32,04	34,24	33,31
C10	34,28	33,33	35,1	31,4	33,8	33,29
C11	39,21	37,04	38,26	33,68	38,01	35,61
C12	38,61	37,47	39,8	31,81	36,01	34,95
D01	39,2	34,35	36,36	29,87	35,38	33,02
D02	34,25	35,25	38,64	31,49	36,75	33,91
D03	34,68	34,08	36,78	31,8	34,32	34,05
D04	37,65	37,25	38,92	33,51	34,3	36,23
D05	35,01	34,02	35,97	31,33	34,35	33,72
D06	33,39	32,57	35,25	31,44	33,11	32,67
D07	39,09	37,3	40	33,42	38,08	36,91
D08	35,76	34,92	38,82	30,62	35,72	34,33
D09	37,42	34,82	39,51	30,84	37,57	33,69
D10	35,81	34,64	36,49	32,37	35,13	34,68
D11	36,04	33,56	36,24	30,09	35,17	31,45
D12	35,51	34,66	36,19	31,7	34,9	34,86
E01	34,24	32,96	34,55	30,21	33,08	32,82
E02	37,12	35,88	38,52	30,52	36,01	34,39
E03	34,16	33,18	35,39	31,73	34,06	33,4
E04	37,16	36,25	37,86	32,29	37,1	35,26
E05	34,82	36,07	38,44	30,11	34,11	32,78

E06	32,41	31,65	32,43	30,29	31,27	31,62
E07	34,5	34,07	38,07	29,49	34,35	33,32
E08	33,54	33,11	35,12	30,42	33,86	32,36
E09	36,27	33,99	38,35	28,31	34,13	31,27
E10	34,31	33,52	34,99	30,46	35,47	33,24
E11	35,77	36,31	38,65	32,34	37,21	35,58
E12	37,57	37,11	38,96	31,91	35,42	34,72
F01	36,35	35,06	37,27	31,62	35,79	34,62
F02	35,54	34,15	37,14	31,15	35,36	33,21
F03	36,96	35,13	39,37	30,2	37,12	33,09
F04	34,94	34,07	35,1	31,9	34,63	33,45
F05	35,38	36,23	39,42	31,66	36,99	35,4
F06	36,83	34,07	38,43	29,09	36,38	33,04
F07	34,31	32,44	38,93	29,26	34,12	32,7
F08	35,22	33,33	37,23	28,09	34,46	30,23
F09	34,45	34,23	35,96	30,97	35,22	32,8
F10	34,88	34,36	38,24	29,91	36,25	34,11
F11	33,49	32,12	34,04	30,41	32,44	31,62
F12	34,69	34,18	35,96	30,58	35	34,1
G01	35,11	33,15	36,18	30,77	34,67	33,15
G02	33,31	32,98	38,96	28,15	33,93	31,05
G03	32,15	30,99	33,58	28,72	32,23	31,26
G04	35,15	33,75	38,34	29,41	35,64	33
G05	36,11	33,26	37,42	33,06	35,82	34,49
G06	37,27	32,47	35,64	33,8	34,55	32,97
G07	36,11	33,38	38,48	30,64	36,24	33,99
G08	33,01	31,73	33,96	29,3	32,65	31,78

G09	31,9	30,5	33,82	28,52	30,94	29,64
G10	33,07	28,42	36,52	26,11	29,78	27,83
G11	30,93	30,6	32,23	28,92	30,71	29,2
G12	34,31	32,9	32,82	31,61	32,69	33,49
H01	32,59	31,05	32,01	25,45	30,89	30,37
H02	33,29	31,74	38,37	25,12	28,62	28,83
H03	30,26	33,34	37,35	24,96	31,64	31,63
H04	34,21	32,94	35,27	30,09	34,66	33,64
H05	38,88	32,76	33,18	27,01	37,29	31,5
H06	36,8	32,4	36,07	32,71	35,98	35,4
H07	23,51	23,68	36,5	23,42	23,19	23,25
H08	23,09	23,35	36,08	23,21	23,04	22,88
H09	22,97	23,11	35,27	23,74	22,75	22,77
H10	19,93	19,25	19,47	19,56	20,14	19,97
H11	19,78	19,19	19,38	19,55	19,82	20
H12	19,86	19,22	19,47	19,65	19,67	20,01

Pozisyon	MPM7	MPM8	MPM9	MPM10	MPM11	MPM12
A01	39,92	27,54	27,71	29,29	35,4	38,34
A02	37,29	32,48	33,69	33,46	37,12	36,68
A03	35,07	31,24	31,18	32,26	37,38	35,61
A04	35,53	31,42	31,49	32,04	35,32	35,45
A05	37,52	32,74	32,11	32,97	36,76	35,35
A06	37,68	31,96	32,5	33,57	37,95	37,65
A07	36,34	32,83	32,89	33,09	40	35,77
A08	35	32,2	32,13	32,82	33,54	34,02
A09	32,68	29,23	29,28	28,97	34,14	33,16
A10	29,32	28,87	29,28	29,6	29,15	29,8
A11	33,02	29,21	29,97	30,01	39,41	33,47
A12	33,56	28,08	27,84	29,27	34,89	32,97
B01	37,9	31	31,11	32,37	39,28	38,51
B02	37,47	33,25	33,09	34,15	29,65	37,39
B03	34,71	32,04	31,75	32,2	35,05	34,62
B04	36,43	31,14	31,64	32,27	35,26	35,25
B05	38,82	32,43	31,84	32,71	38,38	38,04
B06	37,38	30,78	30,94	32,3	37,43	35,3
B07	34,51	29,64	29,26	30,88	37,54	34,1
B08	37,94	31,74	31,21	32,46	38,25	37,39
B09	37,33	31,19	31,74	32,36	37,86	35,35
B10	37,75	32,48	32,33	32,75	34,91	37,89
B11	37,51	31,11	31,27	32,58	37,3	35,54
B12	35,15	32,2	32,11	33,05	34,75	34,58
C01	37,29	29,76	28,78	30,13	38,82	35,02
C02	35,35	29,59	28,58	29,84	38,91	34,1
C03	35,27	32,28	31,09	31,6	37,97	37,04
C04	35,03	29,59	30,02	30,41	37,06	33,31
C05	35,01	30,96	30,49	31	34,14	34,16
C06	35,41	30,93	29,89	30,93	35,12	34,14
C07	34,06	31,02	29,21	30,64	33,23	33,11
C08	36,88	31,18	31,02	31,52	36,75	36,25

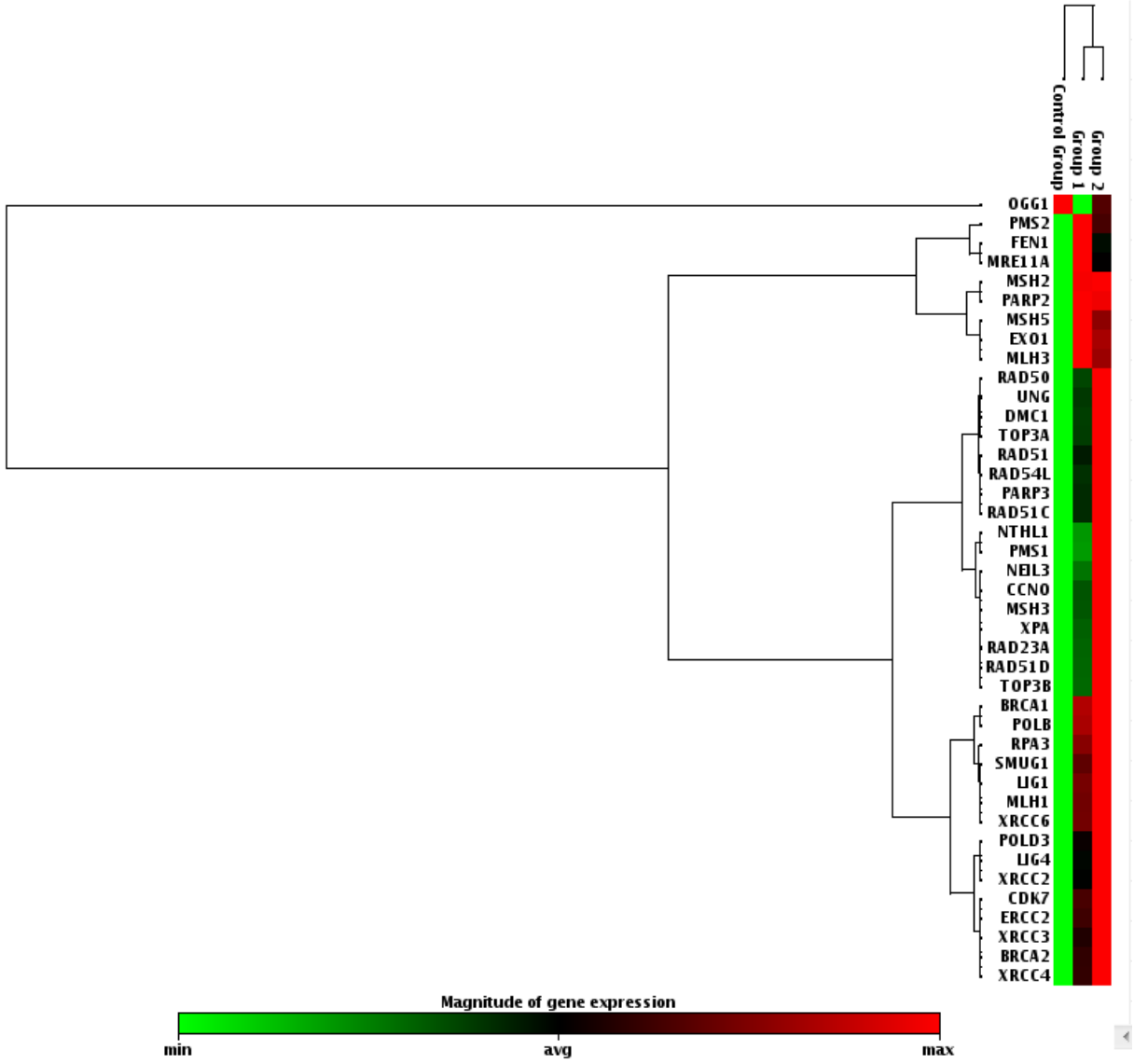
C09	34,1	31,37	30,72	30,77	33,58	33,29
C10	33,77	30,13	31,14	31,36	32,35	32,43
C11	37,21	33,11	32,23	33,25	36,53	36,23
C12	36,73	31,08	31,25	32,2	38,4	36,33
D01	33,81	29,81	29,99	29,89	38,75	35,15
D02	36,06	31,24	31,11	31,48	36,77	35,06
D03	34,57	31,78	30,55	31,7	33,7	33,68
D04	36,56	32,8	32,53	33,04	37	36,42
D05	34,48	31,07	31,11	31,78	32,88	33,57
D06	33,2	31,02	30,94	31,1	31,6	31,91
D07	37,67	32,92	32,36	32,94	37,54	37,53
D08	35,12	29,81	30,16	30,36	35,28	34,94
D09	36,76	30,89	30,18	31,44	38,03	36,69
D10	35,05	32,65	31,43	32,63	35,36	34,38
D11	32,22	29,29	29,62	30,24	38,35	33,47
D12	34,91	31,17	29,82	31,84	34,95	34,48
E01	34,29	30,03	30,86	30,49	33,87	33,16
E02	36,46	30,33	30,81	30,92	35,71	34,59
E03	34,15	31,4	31,44	31,76	33,15	32,84
E04	35,65	32,54	31,64	32,45	35,25	35,41
E05	32,36	30,13	28,42	29,36	37,05	31,53
E06	32,02	29,39	29,25	29,9	32,2	31,61
E07	34,45	28,94	27,89	28,81	34,31	33,44
E08	33,39	30,22	29,59	30,61	32,54	32,2
E09	34,09	28,1	27,78	28,12	35,04	33,12
E10	33,68	29,84	29,34	30,6	36,05	33,57
E11	36,27	32,07	32,09	32,2	37,85	35,96
E12	34,91	30,27	31,01	31,08	37,19	35,04
F01	35,67	32,23	31,38	33,45	35,9	35,01
F02	34,07	30,71	30,39	31,59	35,38	34,26
F03	37,42	30,38	30,21	31,27	37,12	34,33
F04	33,78	31,43	31,37	31,99	33,42	32,98
F05	34,35	31,61	30,47	31,09	37,13	36

F06	34,34	30,19	29,2	30,07	36,23	34,33
F07	33,88	29,52	29,55	29,38	36,63	33,24
F08	32,88	29,06	28,23	28,07	34,94	32,61
F09	34,26	30,61	30,14	31,05	34,7	33,06
F10	35,06	30,06	29,42	29,59	35,53	34,35
F11	31,86	30,08	29,43	30,31	30,94	31,04
F12	34,2	31,06	30,17	31,07	33,76	33,14
G01	34,1	31,28	30,8	30,99	34,66	32,73
G02	31,13	28,7	28,17	28,48	35,82	30,77
G03	30,4	29,14	28,43	29,42	31,22	31,02
G04	33,9	30,36	29,34	30,89	36,83	33,29
G05	35,28	32,03	31,8	32,04	34,73	34,59
G06	33,44	30,32	30,07	30,32	33,31	33,18
G07	34,67	30,57	31,26	31,08	35,61	34,1
G08	32,08	28,32	30,37	30,22	32,01	31,97
G09	30,29	25,33	28,5	28,08	31,2	29,81
G10	29,3	28,25	25,12	25,13	32,6	28,4
G11	29,81	32,35	28,3	28,2	29,32	29,35
G12	34,04	32,35	32,42	32,35	33,06	33,44
H01	31,1	25,66	25,19	24,87	31,87	30,41
H02	30,38	25,8	25,09	24,63	37,07	29,15
H03	33,67	25,7	25,56	26,53	35,79	33,54
H04	34,12	30,07	29,9	30,26	33,53	33,2
H05	33,66	26,78	25,59	25,37	33,88	33,01
H06	36,04	32,16	31,7	32,92	36,28	35,84
H07	23,33	23,66	24,23	24,61	26,35	24,73
H08	22,89	23,31	23,7	24,16	26,03	24,34
H09	22,73	23,1	23,55	24,08	25,76	24,16
H10	19,9	19,79	20,09	20,29	20,26	20,23
H11	19,74	19,58	19,89	20,19	20,12	20,09
H12	19,94	19,67	19,57	19,68	20,15	19,97

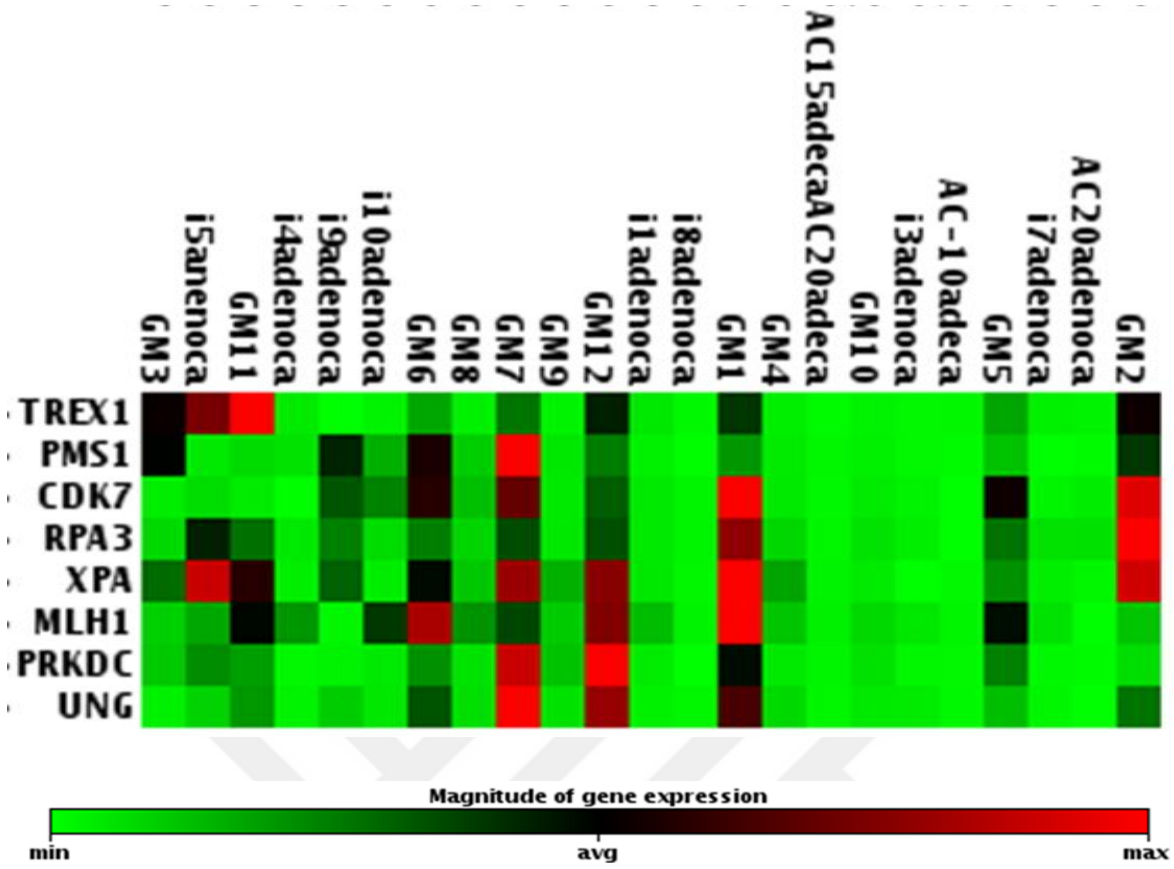
Pozisyon	Kontrol1	Kontrol 2	Kontrol3	Kontrol 4	Kontrol5	Kontrol 6	Kontrol7	Kontrol8
A01	34,49	31,13	32,42	31,28	31,14	32,23	25,17	24,91
A02	40	36,29	38,39	36,66	38,14	37,41	30,13	29,9
A03	40	32,11	35,22	32,63	34,27	35,71	25,45	25,38
A04	35,17	35,1	34,64	34,4	37,15	35,66	27,93	27,66
A05	37,39	33,32	35,79	33,49	35,4	34,54	27,47	27,3
A06	40	39,91	40	39,29	39,72	40	30,19	29,67
A07	40	40	40	38,83	40	40	30,49	30,19
A08	39,05	34,65	37,93	35,64	33,77	36,76	30,28	29,86
A09	34,17	33,4	33,18	32,24	33,11	34,26	26,4	26,36
A10	30,61	31,43	30,42	30,83	30,75	31,01	30,36	29,85
A11	40	34,02	35,5	35,55	34,69	40	27,53	27,77
A12	32,69	31,14	33,1	31,52	31,79	40	26,09	25,56
B01	38,28	35,49	40	38,07	34,95	40	27,99	27,36
B02	40	39,47	38,14	39,23	39,3	37,49	32,54	32,34
B03	36,79	33,35	38,1	36,25	34,75	34,49	28,28	28,03
B04	40	35,53	38,64	37,23	34,01	38,13	29,42	29,02
B05	40	38,45	36,29	35,45	39,43	40	28,15	28,04
B06	40	34,32	36,14	34,3	35,31	40	28,27	28,01
B07	33,55	32,17	33,97	32,39	33,22	33,35	25,69	25,45
B08	39	36,94	34,78	34,84	36,59	37,05	28,21	28,02
B09	35,32	33,85	35,22	33,46	32,87	35,75	28,25	27,87
B10	40	39,41	40	39,42	35,19	40	31,27	31,14
B11	38,54	36,7	37,45	35,2	35	38,59	29,79	29,07
B12	36,23	34,92	40	36,03	36,78	40	29,31	29,08
C01	34,47	32,33	40	33,81	33,4	40	27,36	27,36
C02	39,42	36,63	36,51	34,02	36,59	36,71	28,17	28,01
C03	35,66	32,37	35,75	33,69	32,87	36,08	27,75	27,44
C04	39,77	34,71	34,48	37,49	34,59	38,78	27,26	27,07
C05	39,86	34,6	40	36,69	35,3	39,33	28,17	28,15
C06	35,48	33,5	38,26	34,11	34,03	36,27	27,49	27,27
C07	34,41	33,31	35,05	33,88	34,63	34,96	27,74	27,08

C08	35,74	37,69	36,73	37,6	38,06	40	28,35	28,05
C09	38,97	33,31	40	33,04	33,98	35,87	26,88	26,56
C10	35,42	34,64	36,51	34,33	34,09	36,95	28,17	28,06
C11	40	35,55	40	37,83	38,23	40	32,32	31,67
C12	39,51	34,82	38,64	35,59	35,58	39,47	29,6	28,8
D01	34,91	33,54	37,38	33,97	33,88	37,93	27,06	26,62
D02	38,75	33,51	35,24	34,24	37,48	37,32	28,14	28,33
D03	35,14	34,13	35,32	33,14	34,24	34,37	29,15	28,19
D04	40	35,01	40	38,2	38,97	36,05	29,64	29,05
D05	40	37,61	40	37,42	38,24	40	31,93	31,04
D06	35,7	34,25	35,51	33,69	33,62	35,05	30,13	29,49
D07	35,47	33,96	39,81	35,06	35,49	35,55	28,04	27,83
D08	35,96	32,03	34,53	33,35	33,29	36,3	26,8	26,49
D09	39,75	34,51	40	35,1	34,5	40	28,43	28,44
D10	36,11	35,16	37,08	35,19	36,22	38,55	29,65	29,65
D11	35,61	34,2	38,88	33,14	35,03	34,72	27,48	27,48
D12	36,3	32,17	33,43	33,08	33,16	35,57	27,02	26,71
E01	31,8	30,28	33,68	31,29	32,25	32,19	26,77	26,19
E02	35,18	37,7	40	37,54	33,69	39,92	26,99	27,07
E03	35,53	35,88	34,3	33,57	35,75	35,59	28,17	27,31
E04	35,32	35,29	36,67	34,07	35,03	34,77	28,44	28,1
E05	35,84	33,07	34,07	32,22	33,88	34,3	26,5	26,33
E06	32,61	31,68	31,63	31,24	32,2	31,78	27,71	27,36
E07	33,8	31,29	33,39	32,09	32,1	33,78	24,56	24,27
E08	33,97	33,35	34,34	33,4	33,67	37,88	26,78	26,38
E09	33,38	31,76	34,34	31,62	32,77	34,93	26,12	25,72
E10	36,2	34,31	36,89	34,22	34,92	36,15	29	28,49
E11	38,71	37,28	39,78	37,52	38,11	39,24	31,35	31,16
E12	36,74	36,37	36,59	35,35	35,49	40	30,02	29,72
F01	35,24	33,79	34,49	33,72	34,65	34,68	27,82	27,38
F02	34,68	34,7	37,66	34,46	36,91	36,57	28,84	28,36
F03	38,56	34,64	38,95	34,18	34,83	38,67	27,45	27,23
F04	38,17	36,39	37,24	34,63	37	34,89	30	29

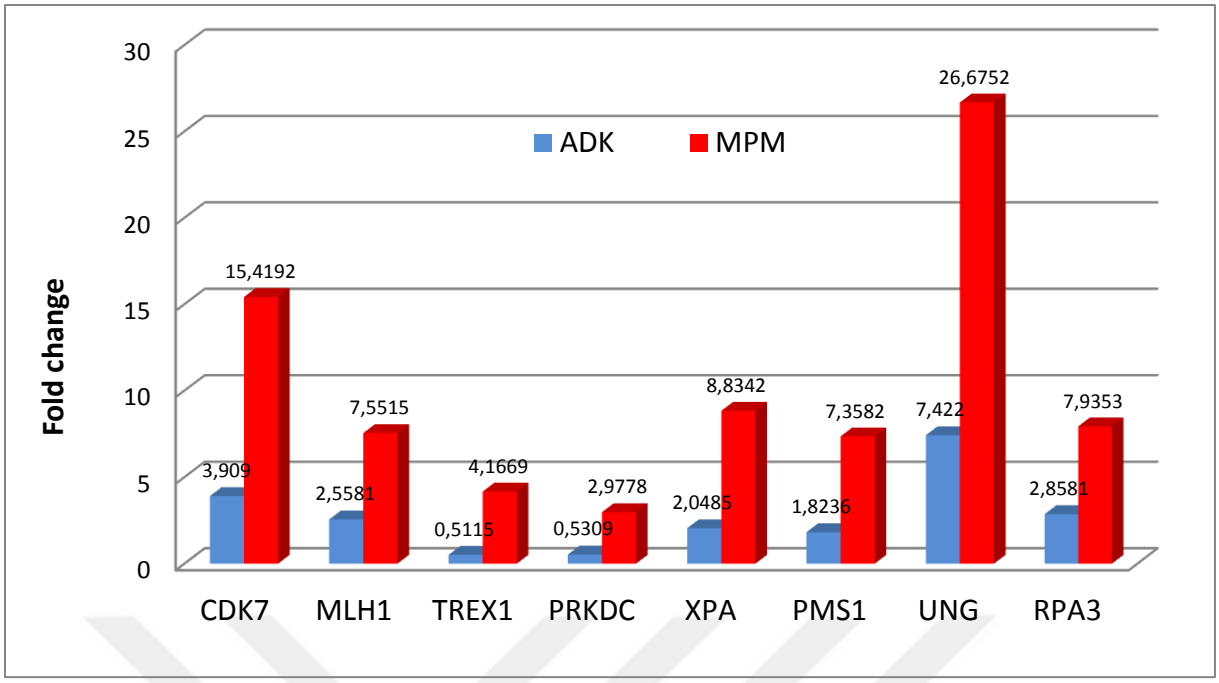
F05	35,12	36,58	38,84	36,64	36,81	40	27,09	26,6
F06	32,45	31,37	34,01	31,74	32,13	34,32	26,32	26,06
F07	35,35	33,1	36,07	35,37	34,44	35,28	27,84	27,58
F08	32,64	29,73	32,01	30,15	32,45	32,9	25,24	25,17
F09	36,52	35,65	38,14	36,47	37,2	37,37	28,37	27,96
F10	34,26	34,24	34,52	34,18	37,86	40	26,62	26,32
F11	34,28	33,58	34,1	32,64	34,6	36,33	28,57	27,86
F12	36,53	33,41	39,09	33,17	34,51	38,51	28,01	27,54
G01	36,59	32,89	36,1	32,52	33,78	34,73	27,54	26,75
G02	35,26	34,71	36,02	35,86	34,21	39,64	28,35	28,13
G03	31,69	31,23	33,26	31,04	31,32	32,99	26,8	26,35
G04	38,28	36,07	39,25	33,11	33,78	38,8	26,08	26,08
G05	34,35	31,42	33,51	32,39	33,49	39,25	26,7	26,09
G06	33,61	32,35	32,76	32,17	35,65	34,66	27,61	26,95
G07	37,66	35,34	37,95	36,13	37,58	38,99	30,1	29,47
G08	34,14	32,77	34,01	32,69	33,9	33,46	28,9	28,3
G09	33,05	32,6	33,19	32,51	32,78	31,94	27,91	27,5
G10	28,96	27,36	30	27,65	28,29	29,68	23,64	23,42
G11	33,04	31,49	32,1	30,86	31,84	32,84	26,36	25,81
G12	35,07	32,45	35	34,71	34,53	34,44	29,18	29,09
H01	38,35	27,02	28,08	27,4	26,86	28,6	19,17	18,82
H02	34,14	33,74	35,02	33,68	33,51	35,41	26,63	26,25
H03	29,03	26,39	28,72	27,42	26,81	29,41	22,04	21,69
H04	30,5	28,42	31,35	28,63	29,47	32,12	23,08	22,41
H05	27,41	25,67	27,17	26,33	26,52	27,73	19,02	18,59
H06	38,14	36,05	36,37	35,42	34,73	38,37	31,26	30,65
H07	27,87	23,22	22,77	22,92	23,79	23,25	23,54	23,32
H08	22,55	23,06	22,56	22,56	23,56	23,09	23,24	23,16
H09	22,44	22,89	22,47	22,46	23,4	22,86	23,12	23,03
H10	18,7	18,7	18,76	18,68	19	18,17	18,66	18,59
H11	18,62	18,53	18,72	18,57	18,81	18,73	18,71	18,53
H12	18,68	18,52	18,63	18,66	18,86	18	18,87	18,73



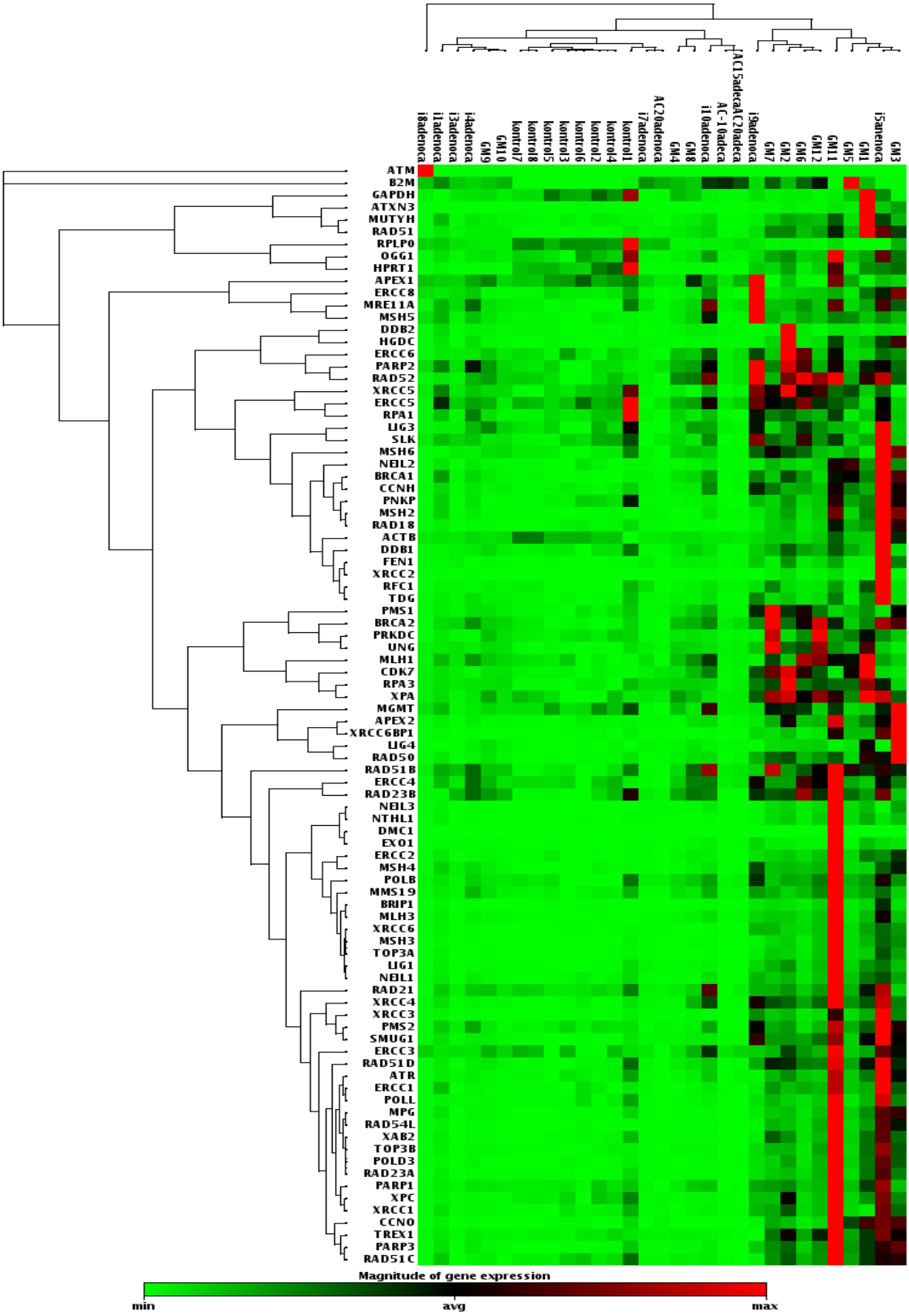
Şekil 2: MPM, AADK, Kontrol Gruplarının Kat Değişimi Gösteren Genler İçin Karşılaştırmalı "Clustergram"ı



Şekil 3: "*p*" Değeri Anlamlı Çıkan Genlerin "Clustergram"ı



Şekil 4: *"p"* Değeri Anlamlı Çıkan Genlerin AADK ve MPM'de Kat Artışları



Şekil 5: Analizi Yapılan Tüm Genlerin “Clustergram”ı

5.0.TARTIŞMA

Akciğerde periferal yerleşimli adenokarsinomlarda mezotelyoma ile ayırıcı tanı söz konusu olabilmektedir. Bu konuda özellikle mezotelyomaların epitelial tiplerinde zorluk yaşanmaktadır. Malign plevral mezotelyoma (MPM) özellikle plevral efüzyon analizi gibi daha az invaziv yöntemlerle tanı koyması zor olan, hızlı ve ölümcül seyreden bir hastalıktır.

Plevral efüzyonlar pulmoner hastalıkların sık rastlanılan bir komplikasyonu ve plevral hastalıkların en sık belirtisidir.plevralral efüzyonların neredeyse yarısına rutin tanısal yöntemlerle tanı konulmakla birlikte diğer yarısının ço büyük bir kısmı tanısız kalmaktadır. Tanısal zorluklar yaşanan efüzyonların genellikle malignite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Malign hücre gözlenen plevral sıvılar malign plevral sıvı olarak tanımlanabilmektedir fakat bazı hastalıklarda bu gözlem yeterli olmamakta ve ımmunohistokimyasal yöntemler ve genetik analizler yapılması gerekmektedir.

Malign plevral mezotelyoma ve akciğer adenokarsinomu plevral sıvıları arasında ayırıcı tanı yapılması gerekmektedir. Özellikle epitel tip MPM ayırıcı tanı sorunu yaşanmaktadır. Malign plevral efüzyonlar kanserin tanı anında saptanabilmektedir ve akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %15'i ve MPM %90'ı plevral sıvı ile tespit edillmektedir (6). AADK ve MPM arasındak yaşanan tanısl kısıtlılıklar ilgiyi gen ekspresyon analizlerine yöneltmiştir(11, 23). Gordon ve ark. MPM için gen ekspresyon oranları tabanlı prognostik ve tanısal bir test geliştirmiş MPM hastalarından cerrahi olarak alınan doku örneklerinden mRNA ekspresyon profili bilgilerini kullanarak iki farklı gruptaki genel sağkalım sürelerini tanımlamak için prediktör bir model geliştirmiştir. İki grup arasında ters korele anlamlı ekspresyon farkı gösteren genler tanımlanmış ve prognostik açıdan değerlendirilmiştir. Bunun üzerine histolojik tipten bağımsız 4 genden oluşan bir profil oluşturmuşlardır. Sonrasında bu örnekleri ince iğne biyopsi ile alarak RT-PCR ile RNA izolasyonu ve 6 genin (CALB2, CLDN7, ANXA8, EPCAM, CD200, and NKX2-1) ekspresyonunu inceleyerek 3 ayrı gen çifti ekspresyon oranlarını hesaplamışlardır (24). Plevral efüzyonlar ile yapılan gen ekspresyon analizlerinde de AADK ve MPM arasında anlamlı gen ekspresyon farklılıklarının olduğu gözlenmiştir (GAS6, SEMA3C, KIBRA, GFPT2, S1-5, RALDH2). AADK ve MPM arasında önemli gen ekspresyon farklılıklarının olduğu ve gen ekspresyon değerlerinin MPM için tedaviye yanıt oranlarının tahmini açısından anlamlı olduğu gözlenmiştir. (25).

Her iki malignite türünde de tanıda anlamlı olduğu düşünülen gen ekspresyon analizlerinin mpm ve akciğer kanserleri arasında ayırıcı tanıda kullanılıp kullanılamayacağı

araştırılmış. DNA metilasyonu 1413 otozomal CpG lokus ilişkili 773 kanserle ilişkili gen bakılmış ve akciğer adenokarsinomlarında %60 daha fazla DNA metilasyonu saptanmış (48).

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve kromatin immunopresipitasyonu ile 6157 CpG adacığının metilasyonu paralel değerlendirildiğinde; KAZALD1 (Kazal-Type Serine Peptidase Inhibitor Domain 1), MAPK13 (Mitogen-Activated Protein Kinase 13) ve TMEM30B (Transmembrane Protein 30B) genlerinin hipermetile olduğu saptanmış, bunun MPM'ya ozgun olduğu ve ayrıcı tanıda kullanılabileceği duşunulmuştur. Dokuz aday genin promotor bolgelerine ait metilasyon durum analizi yapılan bir calışmada; E-cadherin (%71.4) ve FHIT (%78) genlerinin promotor metilasyonlarının ACP1A (%14.3), RASSF1A (%19.5) ve DARK (%20) genlerine gore cok yuksek olduğu bulunmuştur (49).

MicroRNA (miRNA) ekspresyonunun mezotelyoma ve akciğer adenokarsinomunu ayırt etmek üzere kullanılabileceği fakat bu teknolojinin biyolojik temelinin literatürde yeterince bildirilmemiş olduğu gözlenmiş ve miRNA ekspresyonu ile hastalıklar arasındaki patogenez farklılıklarını ortaya koymaya katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. miR-200 gen ailesinin üyelerinden miRNA'lardan bir panel oluşturularak, kantitatif RT-PCR daha hassas algılama yöntemi ile MPM akciğer adenokarsinom ile karşılaştırılmış ve MPM da hepsinin downregüle olduğu saptanmıştır. 100 MPM'lerinde ve 32 akciğer adenokarsinomlarında bu değişikliklerin özgüllüğü valide edilmiştir. analizler bu miRNA'ların biyomarker olarak değerleri olabileceğini öngörmektedir. Wnt sinyal yolağında regültör oldukları ve Tümör progresyonunda rolü olduğunu ve hedefe yönelik tedaviler için seçenek oluşturdukları bildirilmiştir (50).

Ayırıcı tanı için DNA tamir genlerinin seçilme nedeni, mezotelyomada asbest gibi belirgin bir epidemiyolojik ajanın mezotelyoma karsinogenezinde etkin olduğunun bilinmesidir. "Oluşacak bir hasarda hangi DNA tamir genleri devreye giriyor?", "Bu tamir genleri adenokarsinomda inaktifse ayırıcı tanıda kullanılabilir mi?" şeklindeki bilimsel sorumuza bu çalışma ile büyük ölçüde yanıt alınmıştır. Tablolarımızda listelenen ondan fazla gen arasında mezotelyomada artan adenokarsinomda artan ve her ikisi karşılaştırmalı sadece mezotelyomada artan gen ekspresyonları ayrı ayrı sorgulanmıştır. Bu çalışma ile AADK ve MPM tümör hücrelerinde DNA tamir genlerinde expresyon farklılıkları olduğunu gördük. *TREX1, PRKDC, PMS1* genleri MPM-AADK ayırıcı tanısında MPM lehine anlamlı bulunmuştur.

6.0. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bulgularımız TREX1, PRKDC, PMS1 genlerinin en belirgin olarak malign plevral mezotelyomada ekspresyon artışı olduğunu göstermiştir.

PMS1, DNA hatalı eşleşme onarım mutL / HEXB familyasına ait bir proteini kodlar. Bu proteinin, DNA hatalı eşleşme onarımında rol oynadığı düşünülmektedir. Lynch sendromu olarak da bilinen HNPCC fenotipini oluşturu ve PMS1 geni akciğer kanserlerinde tün genom sekanslamada anlamlı olabilecek genler arasında saptanmıştır (51).

PRKDC geni HYRC; p350; DNAPK; DNPK1; HYRC1; XRCC7; DNA-PKcs olarak bilinmekte olup 8. kromozomun uzun kolunda lokalizedir. DNA bağımlı protein kinazın (DNA-PK) katalitik alt biriminin kodlanmasında görev alır. DNA çift zincir kırık onarımında ve rekombinasyonda Ku70/Ku80 heterodimer proteini ile fonksiyon gösterir. Bu protein PI3/PI4-kinaz ailesinin bir üyesini kodlar. PRKDC geninin inhibe edilmesinin MYC ilişkili akciğer kanserlerinde anlamlı olabileceği halen araştırılmaktadır (52)

TREX1 3. kromozomun kısa kolunda lokalize olup, insan hücrelerinde 3’ > 5’ yönünde DNA ekzonükleazı kodlar. İnsan DNA polimerazı için hata onarım özelliğine sahip *non-processive* bir ekzonükleazdır. Ayrıca SET kompleksinin (endoplazmik retikulum ilişkili kompleks) bir komponentidir ve granzym A’lı (apoptozisin kaspaz bağımsız hücre ölümünde aktivite gösterir) hücre ölümü boyunca DNA nın 3’ ucunun hızla degrade olmasında rol oynar. Bu gendeki mutasyonlar Aicardi-Goutieres sendromu, SLE ile overlap yapmakta, Chilblain Lupus ile sonuçlanmaktadır. Otoimmun hastalıklar ile ilişkilendiirlmiş. Yanlış eşleşme onarımı ile ilişkilidir. Otoimmun hastalıklar ve özefagus, pankreas malignitelerinde ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir. TREX1 geni primer exonükleaz DNA tamir genleri arasında olup akciğer kanserlerinde düşük oranda eksprese olduğu belirtilmektedir (53).

Bu genlerin geniş olgu serilerinde ayırıcı tanı yönünden RNA ve immunhistokimyasal olarak protein düzeyinde araştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1- S piro SG, Porter JC, Lung Cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. Am J Respir Crit CareMed 2002; 166: 1166-96

2- Bilgel N. Akciğer Kanserlerinin Epidemiyolojisi. Engin K, Özyardımcı N, 6. Uludağ Onkoloji Sempozyumu ve Konsensus Raporu. Bursa: Uludağ Üniversitesi Yayınları,2001: 35-8

3- Çırak K, Tatar D, Özacar R, Halilçolar H. 40 yaş altı akciğer kanseri olgularımız. XXI. Ulusal Türk Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Kitabı, 1996: 417-22

4- Powers A, Carbone M, the role of environmental carcinogens, viruses and genetic predisposition in the pathogenesis of mesothelioma. Cancer Biol Ther 2002; 1: 350-5

5- Metintaş M, Özdemir N, Hillerdal G ve ark. Environmental asbestos exposure and malignant pleural mesothelioma. Respir Med. 1999; 93: 349-55

6- Heffner JE, Diagnosis end management of malignant pleurol effusions. Respirology2008; 13: 5-20

7- Salyer WR, Eggleston JC, Erozan YS. Efficacy of pleural needle biopsy and pleural fluid cytopathology in the diagnosis of malignant neoplasm involving the pleura. Chest 1975; 67: 536-9.

8- Nance KV, Shermer RW, Askin FB. Diagnostic efficacy of pleural biopsy as compared with that of pleural fluid examination. Mod Pathol 1991; 4: 320-4.

9- Prakash UB, Reiman HM. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. Mayo Clin Proc 1985; 60: 158-64.

10- Garcia LW, Ducatman BS, Wang HH. The value of multiple fluid specimens in the cytological diqgnosis of malignancy. Mod Pathol 1994; 7: 665-8

11- Renshaw AA, Dean BR, Antman KH, Sugarbaker DJ, Cibas ES.The role of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma. Chest 1997;111: 106-9.

12- Porcel M, Vives M, Esquerda A, et al. Use of a panel of tumour markers (carcinoembryonic antigen, cancer antigen125, carbohydrate antigen 15-3 and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions. Chest 2004; 126: 1757-63.

13- Sherpereel A, Grigoriu B, Conti M, et al. Soluble mesothelin- related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173: 1155-60.

14- Creaney J, Yeoman D, Naumoff L, et al. Soluble mesothelin in effusions: a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma. Thorax 2007; 62: 569-76.

15- Ordonez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and LA. Am J Surg Pathol 2003;27: 1031-51.

16- Ordonez NG. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. Mod Pathol 2003;16: 192-7.

17- Ordonez NG. Role of immunohistochemistry in differentiating epithelial mesothelioma from Lung adenocarsinoma. Review and update. Am J Clin Pathol 1999; 112: 75-89.

18- Abutaily AS, Addis BJ, RocheWR. Immunohistochemistry in the distinction between malignant mesothelioma and pulmonary LA: a critical evaluation of new antibodies. J Clin Pathol 2002;55: 662-8.

19- Hecht JL, Pinkus JL, Pinkus GS. Monoclonal antibodyMOC-31 reactivity as amarker for LAincytologic preparations.Cancer2005;108: 56-9.

20- Davies HE, Sadler RS, Bielsa S et al. The clinical impact and reliability of pleural fluid mesothelin in undiagnosed pleural effusions. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 437-44.

21- Afify AM, Stern R, Michael CW. Differentiation of mesothelioma from LA in serous effusions: the role of hyaluronic acid and CD44 localization. Diagn Cytopathol 2005; 32: 145-50.

22- Illei PB, Ladanyi M, Rusch VW, Zakowski MF. The use of CDKN2A deletion as a diagnostic marker for malignant mesothelioma in body cavity effusions. Cancer 2003; 99: 51-6.

23- Tothill RW, Kowalczyk A, Rischin D, et al. An expression-based site of origin diagnostic method designed for clinical application to cancer of unknown origin. Cancer Res 2005; 65: 4031-40.

24- Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL, et al. Translation of microarray data into clinically relevant cancer diagnostic tests using gene expression ratios in lung cancer and mesothelioma. Cancer Res 2002; 62: 4963-7.

25- Holloway, AJ, Diyagama, DS, Opeskin K ve ark. A molecular diagnostic test for distinguishing LA from malignant mesothelioma using cells Collected from Pleural Effusions, Clin Cancer Res 2006;12: 5129-5135.

26- Halilçolar H, Tatar D, Ertuğrul G, Çakan A, Acıtaş MG, Kömürcüoğlu B, Akkoçlu A, Öztürk C, Akciğer Kanseri Multidisipliner Yaklaşım. Toraks Kitapları, Sayı:1, 1999: 17-22

27- Chih-Hong Pan, Chang-Chuan Chan, and Kuen-Yuh Wu, Effects on Chinese Restaurant Workers of Exposure to Cooking Oil Fumes: A Cautionary Note on Urinary 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17(12):3351–7

28- Kvale PA, Lung Cancer in ACCP Pulmonary Board Rewiev. Continuing medical education course syllabus, USA, 2002; 35-50

29- WHO, Histological typing of lung and pleural tumors. WHO, Copenhagen, 1999.

30- Balsara BR, Test JR, Choromosomal imbalances in human lung cancer, Oncogene 2002; 21: 6877-6883

31- Knudson AG Jr, Hetchcote HW, Brown BW, Mutation and childhood cancer: A probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sti USA, 1975; 72: 5116-5120

32- Osada H, Tatematsu Y, Masuda A ve ark. Heterogeneous transforming growth factor (TGF-β) unresponsiveness and loss of TGF-β receptor type II expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. Cancer Res 2001; 61: 8331-8339

33- Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y,

Mano H, Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer, Cancer Res. 2008; 68(13): 4971-6

34- Moodie SA, Willumsen BM, Wever MJ, Wolfman A, Complexes of Ras .GTP with Raf-1 and mitogen activated protein kinase, Science 1993; 260: 1658-1681

35- Guo QM, Malek RL, Kim S ve ark, Identification of c-myc responsive genes using rat Cdna microarray, Cancer Res 2000; 60: 5922-5928

36- Prescott J.C., Blackburn E.H., Telomerase: DR. Jekyll or Mr. Hyde? Curr. Opin. Geneticd end Development 1999; 9:368-373

37- Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ ve ark, Proteomic patterns of tumour subsets in NSCLC, Lancet 2003; 362: 433-439

38- Metintaş M, Özdemir N, Hillerdal G ve ark, Environmental asbestos exposure and malignant pleural mesothelioma. Respir Med 1999; 93: 349-355

39- Fidaner C, Eser SY, Parkin DM, Incidence in Izmir in 1993-1994; First results from Izmir Cancer Registry. Eur J Cancer 2001; 37: 83-92

40- Newkirk HL, Knoll JH, Rogan PK (2005) Distortion of quantitative genomic and expression hybridization by Cot-1 DNA: mitigation of this effect. Nucleic Acids Res 33(22):e191.

41- Taniguchi T, Karnan S, Fukui T et al (2007) Genomic pro fi ling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent nonrandom chromosomal alteration regions including jun ampli fi cation on 1p32. Cancer Sci 98(3):438–446

42- Christensen BC, Houseman EA, Poage GM et al (2010) Integrated pro fi ling reveals a global correlation between epigenetic and genetic alterations in mesothelioma. Cancer Res 70(14):5686–5694

43- Takeda M, Kasai T, Enomoto Y et al (2012) Genomic gains and losses in malignant mesothelioma demonstrated by fi sh analysis of paraffin-embedded tissues. J Clin Pathol 65(1):77–82

44- Chiosea S, Krasinskas A, Cagle PT et al (2008) Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas. Modern Pathol 21(6):742–747

45- Pass HI, Vogelzang N, Hahn S, Carbone M. Malignant pleural mesothelioma. Curr Probl Cancer. 2004;28:93–174

46- Sekido Y, Pass HI, Bader S, Mew DJ, Christman MF, Gazdar AF, et al. Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. Cancer Res. 1995;55:1227–31

47- Assunta De Rienzo, William G. Richards, Beow Y. Yeap, et al. Sequential Binary Gene Ratio Tests Define a Novel Molecular Diagnostic Strategy for Malignant Pleural Mesothelioma *Clin Cancer Res* 2013;19:2493-2502.

48- Brock C. Christensen, Carmen J. Marsit, E. Andres Houseman, Differentiation of Lung Adenocarcinoma, Pleural Mesothelioma, and Nonmalignant Pulmonary Tissues Using DNA Methylation Profiles Cancer Res 2009; 69: (15). August 1, 2009

49- Yasuhiro Goto, Keiko Shinjo, Yutaka Kondo, Epigenetic Profiles Distinguish Malignant Pleural Mesothelioma from Lung Adenocarcinoma, Cancer Res 2009; 69: (23). December 1, 2009

50- Gretchen V. Gee, Devin C. Koestler, Brock C. Christensen, Downregulated MicroRNAs in the Differential Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma, Int J Cancer. Author manuscript; December 15. 2011

51- Elena Belloni, Giulia Veronesi, Luca Rotta, Sara Volorio, Whole exome sequencing identifies driver mutations in asymptomatic computed tomography-detected lung cancers with normal karyotype, Cancer Genetics**,** Volume 208, Issue 4, April 2015, Pages 152–155

52- Zongxiang Zhou , Manishha Patel , Nicholas Ng, Mindy H Hsieh, Anthony P Orth, John R Walker, Serge Batalov, Jennifer L Harris and Jun Liu, Identification of synthetic lethality of PRKDC in MYC-dependent human cancers by pooled shRNA screening, Zhou et al. BMC Cancer 2014, 14:944

53- http://www.proteinatlas.org/ENSG00000213689-TREX1/cancer

Gökçen Dinçyürek Şimşek

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	243-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Akciğer Adenokarsinomu ve Malign Plevral Mezotelyoma Ayırıcı Tanısında Gen Ekspresyon Farkının Araştırılması**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/18-16	Tarih:02.06.2011
	Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ'un sorumlusu olduğu **"Akciğer Adenokarsinomu ve Malign Plevral Mezotelyoma Ayırıcı Tanısında Gen Ekspresyon Farkının Araştırılması"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Doç.Dr.Işıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

EK-2: DİPNOTLAR

EVALUATION OF GENE EXPRESSION PROFILES FOR THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF LUNG ADENOCARCINOMA AND MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA

[1]Gökcen Ömeroğlu Şimşek, [2]İsmail Ağababaoğlu, [1]Duygu Dursun, [3]Selver Özekinci, [1]Pınar Erçetin, [1]Safiye Aktaş, [1]Hülya Ellidokuz, [4]Duygu Gurel, [1]İlhan Oztop, [5]Atila Akkoclu;
[1]Department of Basic Oncology, Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences, İzmir/TURKEY, [2]Department of Thoracic Surgery , [4]Department of Pathology, [5]Department of Chest Diseases, Dokuz Eylül University Medicine School, İzmir/TURKEY, [3]Dicle University Medicine School, Department of Pathology, Diyarbakır/TURKEY
Communication e-mail: onkoloji@deu.edu.tr

Background

Squamous cell carcinoma is the most commonly diagnosed lung cancer type in Turkey; however lung adenocarcinoma diagnosis has risen among women and nonsmokers. Malignant pleural mesothelioma (MPM) is common in Turkey because of the high asbestos exposition rates. Mostly, lung adenocarcinoma cannot be clearly differentiated from MPM. Because of The limitations in the immunohistochemical methods there has been a growing interest in the use of gene expression profiling for diagnosis in many cancers.

Objectives

We aimed to evaluate the gene expression profiles in tumor cells by using RT-PCR array, between two separate groups of lung adenocarcinoma and MPM patients.

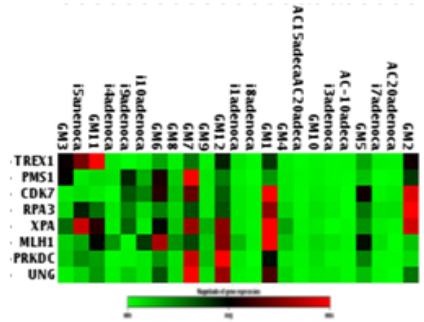


Image 1. Clustergram Of The Genes That Fold Change Values Were Statistically Significant (P <0.05) İn MPM And Adenocarcinoma

Materials and Method

Ten newly diagnosed patients with adenocarcinoma and paraffin-embedded tissues of 12 patients with MPM were included in this study without considering gender differences. Eight healthy individual were recruited as a control group. After processing the fresh samples of lung adenocarcinoma stored at -80 ° C for RNA isolation, cDNA synthesis and the expression of 84 genes were associated with DNA repair were analyzed with RT-PCR Array. Paraffin tissues of patients with MPM were deparaffinized and the same procedure was applied. Fold change values of gene expressions in each group are calculated in "SA Bioscience" data analysis expression page.

Results

ACBT, B2N, GADPH and RPLPO genes were identified as housekeeping genes. Table 1 and 2 shows the comparisons of fold change values of the gene expression differences between lung adenocarcinoma, MPM and control groups and Image 1 shows the clustergram and Graphic 1 shows the genes that the expressions were statistically significant (p <0.05) in MPM and adenocarcinoma tumor cells relative to each other.

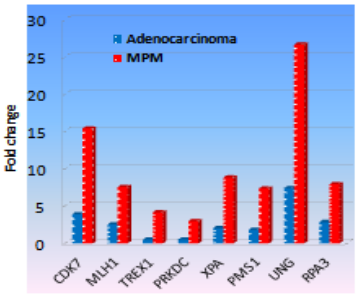
Table 1: Fold changes of the gene expressions of lung adenocarcinoma and MPM tumor cells comparing to control group

Gene	Adenocarcinoma / control fold change	MPM / control fold change	p value (comparing to control group adenocarcinoma & MPM)
APEX2	1,6763	6,1243	>0.05 / >0.05
BRCA1	9,5919	20,2646	>0.05 / 0,01558
BRCA2	4,3804	10,8169	>0.05 / 0,012071
CCNH	2,3922	4,4773	>0.05 / 0,032102
CDK7	3,909	15,4192	>0.05 / 0,019161
LIG4	2,2608	13,7822	0,044834 / >0.05
MLH1	2,5581	7,5515	>0.05 / 0,013792
MLH3	5,9579	15,4275	>0.05 / >0.05
MSH3	2,2494	10,2785	>0.05 / >0.05
MSH4	6,5356	12,0767	>0.05 / >0.05
NEIL3	14,3334	80,5092	0,015299 / >0.05
PARP1	0,9019	2,0543	>0.05 / >0.05
PARP2	4,7127	7,4604	0,043874 /0,009579
PARP3	2,3613	8,2119	>0.05 / 0,049911
PMS1	1,8236	7,3582	>0.05 / 0,039034
RAD50	2,6223	10,2765	>0.05 / 0,03758
RAD51	2,6223	10,2765	>0.05 / >0.05
RAD51B	4,3683	16,7622	>0.05 / >0.05
RAD51D	3,2769	7,0688	>0.05 / >0.05
RAD52	2,0126	5,1099	>0.05 / >0.05
RPA3	2,8581	7,9353	>0.05 / >0.05
PRKDC	0,5309	2,9778	>0.05 / >0.05
SMUG1	6,7053	18,0914	>0.05 / >0.05
TREX1	0,5115	4,1669	>0.05 / >0.05
UNG	7,422	26,6752	0,027669 / 0,009662
XPA	2,0485	8,8342	>0.05 / >0.05
XRCC2	5,6758	17,6367	>0.05 / >0.05

Table 2: The genes that fold change values were statistically significant (p <0.05) in MPM and adenocarcinoma tumor cells relative to each other

Gene	MPM / Adenocarcinoma fold change	p
CDK7	4.39	<0.05
MLH1	5.32	<0.05
TREX1	9.29	<0.05
PRKDC	7.64	<0.05
XPA	5.54	<0.05
PMS1	5.19	<0.05
UNG	4.93	<0.05
RPA3	2.97	<0.05

Graphic 1: Fold Changes Of Lung Adenocarcinoma And MPM Tumor Cells Comparing To Control Group



The genes that expressions were statistically significant in MPM and adenocarcinoma tumor cells relative to each other

Conclusion

We showed that adenocarcinoma and MPM tumor cells have different expression profiles of DNA repair genes. Our study suggests that TREX1, PRKDC, PMS1 genes can be significant in support of differential diagnosis between MPM and lung adenocarcinoma.

Discussion

The molecular alterations in MPM and Adenocarcinoma have not yet been clearly determined and we needed to improve new interferences for determining the molecular pathogenetical diffrenences between of MPM and Adenocarcinoma.

ÖZGEÇMİŞ
GÖKÇEN ÖMEROĞLU ŞİMŞEK

Doğum Yılı:	1982
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı İNCİRALTI/İZMİR
Telefon:	02324123801
e-posta:	gokcen.simsek@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji	Doktora	2016
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Göğüs Hastalıkları / Tıpta Uzmanlık Eğitimi	Doktora	2011
TR	Ege Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Tıp Eğitimi	Yüksek Lisans	2006

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	TR	İzmir	Göğüs Hastalıkları A.D.	Göğüs Hastalıkları Uzmanı	2015- (halen devam ediyor)
Kozluk Devlet Hastanesi	TR	Batman	Göğüs Hastalıkları	Göğüs Hastalıkları Uzmanı	2012-2015
İzmir Atatürk Eğitim	TR	İzmir	Göğüs Hastalıkları	Göğüs	2011-2012

ve Araştırma Hastanesi Katip Çelebi Üniversitesi				Hastalıkları Uzmanı	
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	TR	İzmir	Göğüs Hastalıkları A.D.	Uzmanlık Öğrencisi	2006-2011
Şırnak Devlet Hastanesi	TR	Şırnak	Acil Servis	Pratisyen Hekim	2006 (Eylül-Kasım)

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Akciğer ve Plevra Maligniteleri, Moleküler Onkoloji, Pulmonoloji, Genetik, Nutrigenomik, Solunum Fizyolojisi, Mesleksel Akciğer Hastalıkları, Kistik Fibrozis

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam Eden**
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

2012: Phenotype properties and status of corticosteroid resistance among patients with uncontrolled asthma.
JOURNAL NAME: Allergol Immunopathol (Madr).
JOURNAL TYPE: SCI (Science Citation Index)
DOMESTIC/INTERNATIONAL: YURTDIŞI
PUBLISHING MONTH/YEAR: 9/2012
ISSUE/PAGE/YEAR: 2012 Sep 28. pii: S0301-0546(12)00175-9. doi: 10.1016/j.aller.2012.04.009
LANGUAGE: English
ARTICLE TYPE:Araştırma Makale
AUTHORS: Çımrın AH, Akpınar B., Tertemiz KC, Ömeroğlu Şimşek G, Özgen Alpaydın A, Ellidokuz H, Özkaya AB, Koçtürk AS

2013: Effectiveness of thymoquinone in the treatment of experimental asthma
JOURNAL NAME: La Clinica Terapeutica
JOURNAL TYPE: SCI (Science Citation Index)
DOMESTIC/INTERNATIONAL: YURTDIŞI
PUBLISHING MONTH/YEAR: 3/2013
ISSUE/PAGE/YEAR: 164.3.155-158.2013
LANGUAGE: English
ARTICLE TYPE: Araştırma Makale
AUTHORS: S. Kalemci, Cilaker Mıçılı S, Acar T, Senol T, Dirican N, Ömeroğlu Şimşek G, Bağrıyanık HA, Kamacı G, Yılmaz O

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

2012: Düşük Doz Amiodarone Kullanimina İkincil Gelişen Pulmoner Toksisite
JOURNAL NAME: Harran Üniversitesi Tip Fakültesi Dergisi
JOURNAL TYPE: Domestic Refeered Journal
DOMESTIC/INTERNATIONAL: YURTİÇİ
PUBLISHING MONTH/YEAR: 12/2012
ISSUE/PAGE/YEAR: 9/1/36-37/2012
LANGUAGE: Turkish
ARTICLE TYPE: Vaka Takdimi
AUTHORS: S. Kalemci, G. Ömeroğlu Şimşek, C. Sevinç

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Profesyonel Beceriler (Mesleki):

Bronkoskopi
Yoğun bakım uygulamaları
Solunum fonksiyon testleri (Basit SFT, çok nefeste nitrojen yıkama, ekshalasyon havasında nitrik oksit ölçümü)
Astımlı hastalara Omalizumab hazırlama ve uygulaması
Sigara bırakma müdahalesi
Deney hayvanları kullanımı

Dil

Ana Dil: Türkçe
İngilizce ÜDS Puanı: 77.5/100. (Türk Üniversiteleri Merkezi Dil Sınavı puanı 60/100 doktora çalışmaları için başvuru ön koşuludur.)

Bilgisayar

MS Office: Word, Excell, Power Point; SPSS (11, 15 Versiyonları) (çok iyi düzeyde), elektronik iletişimde akıcı

Katıldığı Kurslar ve Sahip Olduğu Sertifikalar

2006: T.C. Sağlık Bakanlığı, Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, Rahim İçi Araç Uygulama Sertifikası, İzmir
2007: Uygulamalı İndükte Balgam Kursu, Türk Toraks Derneği (TTD), İzmir
2008: ASCO – SEMCO, Multidisciplinary Cancer Management Course (MCMC), İzmir
2008 : Mekanik Ventilasyon Kursu, TTD, Antalya
2009: Deney Hayvanları Kullanımı Sertİfikası, DEÜTF, İzmir
2009: Moleküler Biyoloji ve Genetik Kursu, DEÜTF, İzmir
2009: İş Yerinde, Klinikte Meslek Hastalıklarını Tanımak ve Maluliyet Değerlendirilmesi, TTD, Antalya
2010 : Meslek Hastalıkları Kursu, Europen Respİratory Society (ERS), İzmir
2010: Toraks Derneği 9. Kış Okulu, Oturum Başkanlığı, Antalya
2010: Klinik ve Pratik Solunum Fonksiyon Testi Kursu, TTD, Antalya
2011: Temel ve İleri Bronkoskopi Kursu, TTD, İzmir
2011 : Medikal Torakoskopi Kursu, TTD, Eskişehir
2011: Akciğer Kanseri Radyolojisi Kursu, TTD, İzmir
2011: Sigara Bırakma Müdahale Kursu, TTD, İzmir
2011: SPSS Eğitimi ve SPSS Uygulamalı Araştırma Yöntemleri Eğitim Programı (40 Saat) Sertifikası - DEÜTF - DESEM, İzmir
2015: Kanser İmmunolojisi Kursu, 19. Ege Onkoloji Günleri, İzmir
2016: Türk Toraks Derneği XIII. Mesleki Gelişim Kursu, Antalya

Katıldığı Sempozyum ve Kongreler

2007: Akciğer Kanserinde Az Konuşulanlar, 24-27 Mayıs, TAKD, Kayseri
2008: Türk Toraks Derneği 11. Yıllık Kongresi, 23-27 Nisan 2008, Antalya
2009: Türk Toraks Derneği 12. Yıllık Kongresi, 8-12 Nisan 2009, Antalya
2010: Türk Toraks Derneği 13. Yıllık Kongresi, 5-9 Mayıs 2010, İstanbul
2011: Türk Toraks Derneği 14. Yıllık Kongresi, 13-17 Nisan 2011, Antalya
2013: Türk Toraks Derneği 16. Yıllık Kongresi, 3-7 Nisan 2013, Antalya
2015: 19. Ege Onkoloji Günleri, Kanserde Beslenme ve Destek Tedaviler Sempozyumu, 6-7 Nisan 2015, İzmir

Bilimsel Çalışmalar

Poster Sunumları

2008: G. Ömeroğlu, A. Çımrın, KOAH'ta Tedavi Değerlendirilmesi, Türk Toraks Derneği 11. Uluslararası Kongresi, Antalya, Türkiye, Poster Sunumu, No:PS158
2009: G. Ömeroğlu, C. Örçen, E. Yılmaz, D. Gürel, B. Değrmenci, A. Akkoçlu, Akciğer Kanserlerinde Kemik Metastazlarının Saptanmasında Hangi Yöntem Kullanılmalı? **(**Which Method Should Be Used To Determine Bone Metastasis Of Lung Cancer?), European Multidisciplinary Conference in Thoracic Oncology (EMCTO), Lugano ve Türk Toraks Derneği 12. Uluslararası Kongresi, Antalya, Türkiye, Poster Sunumu, Bildiri Kitabı, syf: 145, No: TP047
2009: G. Ömeroğlu , S. Kala , O. Kılınc, Periferik Akciğer Nodullerinde Tanı Amaçlı Konvansiyonel Fiberoptik Bronkoskopi Gerekli Mi?, Türk Toraks Derneği 12. Uluslararası Kongresi, Antalya, Türkiye, Poster Sunumu, Bildiri Kitabı, syf: 235, No: PS222
2010: A. Şanlı, G. Ömeroğlu, A. Arslan, A. Akkoçlu, The Importance Of The Surgery In Metastatic Invasive Thymomas, ATS International Conference - New Orleans, Louisiana, Poster Sunumu, Abs. ID/Title: #6186
2010: K. C. Tertemiz, G. Ömeroğlu, A. Çımrın, Omalizumab Uygulaması Ve Etkinliği: Bir yıllık gözlem sonuçları**,** Türk Toraks Derneği 13. Ulusal Yıllık Kongresi, Poster Sunumu, No: P356
2010: A. Çımrın, B. Akpınar, K. C. Tertemiz, G. Ömeroğlu, S. Koçtürk, Astımı Kontrol Altına Alınamayan Olgularda Klinik Sorunlar Ve Steroid Rezistansı (Ön Çalışma), Türk Toraks Derneği 13. Yıllık Kongresi, Tartışmalı Poster, No: TP619

2013: G. Ömeroğlu Şimşek, İ. Ağababaoğlu, D. Dursun, S. Özekinci, P. Erçetin, S.Aktaş, H. Ellidokuz, D. Gurel, İ. Oztop, A.Akkoclu; Evaluation Of Gene Expression Profiles For The Differential Diagnosis Of Lung Adenocarcinoma And Malignant Pleural Mesothelioma, poster sunumu, 15. World Conference on Lung Cancer (WCLC 2013) Sidney, Avusturalya, Ekim 27 – 30, 2013**.**

Sözlü Sunumlar

2011: G. Ömeroğlu, A. Çımrın, Kızartma Yağı Dumanına Maruz Kalanlarda Solunumsal Etkilenme, Uzmanlık Tezi, Türk Toraks Derneği 14. Ulusal Yıllık Kongresi, Antalya, Türkiye, Sözlü Sunum, No: S-235 (yayın aşamasında)

2011: A. Çımrın, B. Akpınar, K. C. Tertemiz, G. Ömeroğlu Şimşek, Hülya Ellidokuz, Semra Koçtürk' Astımı Kontrol Altına Alınamayan Olgularda Fenotip Özellikleri ve Steroide Direnç Durumu, Türk Toraks Derneği 14. Ulusal Yıllık Kongresi, Antalya, Türkiye, Sözlü Sunum, No:SS284 (yayın aşamasında)

2015: İzmir Şube Kasım Ayı Aylık Eğitim Toplantısı, Konuşmacı, *"Kistik Fibrozis Hastaları Büyüyor",* Kistik fibrozisli erişkin hasta sunumu

Diğer Bilimsel Çalışmalar

2010: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Avrupa Çapında Klinik Uygulama Modellerinin Araştırıldığı Epidemiyolojik Çalışma (Epidemiological Study to Describe NSCLC Clinical Management Patterns in Europe. Lung-EPICLIN), (çalışma tamamlandı, yayınlandı.)

2011: Doktora eğitiminin ilk yılında, iki hafta süreyle "Deneysel Araştırmaların Planlanması, Yürütülmesi ve Değerlendirilmesi" dersine katıldım. Bu ders kapsamında "Kızartma Yağı Dumanının Solunum Sisteminde Oksidatif Stres ve Karsinojenite Üzerine Etkisinin Sıçan Modelinde Araştırılmsı" başlıklı bir proje önerisi hazırlayarak interaktif bir ortamda sözlü olarak sundum.

Üye Olduğu Mesleki Dernekler

Türk Toraks Derneği (TTD) - üye

Türk Akciğer Kanseri Derneği (TAKD) - üye

Europen Respİratory Society (ERS) – üye

Referanslar

Prof. Dr. Atila Akkoçlu Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hatalıkları A.D. / İzmir e-posta: atilla.akkoclu@deu.edu.tr
Prof. Dr. Safiye Aktaş Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji A.B.D İnciraltı / İZMİR e-posta: safiye.aktas@deu.edu.tr
Prof. Dr. Hülya Ellidokuz Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji A.B.D İnciraltı / İZMİR e-posta: hulya.ellidokuz@deu.edu.tr

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 22/07/2016. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Allergol Immunopathol (Madr). 2013;41(5):304–309

Allergologia et immunopathologia

www.elsevier.es/ai

ORIGINAL ARTICLE

Phenotype properties and status of corticosteroid resistance among patients with uncontrolled asthma☆

A.H. Cimrin[a], B. Akpinar[b], K.C. Tertemiz[a], G. Omeroglu[a], A.O. Alpaydin[a,*], H. Ellidokuz[c], A.B. Ozkaya[b], S. Kocturk[b]

[a] *Dokuz Eylul University Medical Faculty, Department of Pulmonary Diseases, Izmir, Turkey*
[b] *Dokuz Eylul University Medical Faculty, Department of Biochemistry, Izmir, Turkey*
[c] *Dokuz Eylul University Medical Faculty, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Izmir, Turkey*

Received 4 February 2012; accepted 20 April 2012
Available online 29 September 2012

KEYWORDS
Glucocorticoid lymphocyte proliferation suppression test;
Glucocorticoid resistance;
Severe asthma;
Asthma phenotype;
Uncontrolled asthma

Abstract
Background: Control cannot be achieved in some asthmatics although optimal monitoring and treatment is administered. Glucocorticoid (GC) resistance is one of the reasons of poor asthma control. We aimed to investigate GC resistance by lymphocyte proliferation suppression test (LPST) in uncontrolled asthmatics.
Methods: After assessing asthma control level of 77 asthmatics their treatment was adjusted upon GINA guidelines. They were followed-up for three to six months and the patients who remained uncontrolled were accepted as uncontrolled patients. Steroid resistance test (SRT) was applied to them (7–14 days oral prednisolone) and the patients who were still uncontrolled and/or had a FEV1 increase <15% after SRT were assessed as the ''case group'' while the remaining composed the ''control group''. Optimal treatment was adjusted and at the end of a follow-up period LPST was performed to both groups.
Results: Fourteen of the case ($n=22$) and four ($n=8$) of the control groups could be evaluated by LPST. Proliferated lymphocytes were observed to be significantly suppressed in all dexamethasone concentrations in the control group ($p=0.001$). However, in the case group LPST was positive only at 10^{-6} and 10^{-4} concentrations although statistically not significant ($p=0.147$). There was no significant relationship between clinically GC resistance and LPST positivity ($p=0.405$).
Conclusion: We determined that in vitro responses to the GCs were significantly declined in the uncontrolled asthma cases. An SRT alone does not seem to be very sensitive for evaluating GC sensitivity, LPST may be performed for demonstrating GC responsiveness in asthmatic patients in addition to SRT.
© 2012 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

☆ The work was performed in Dokuz Eylul University Medical Faculty Pulmonary Diseases and Biochemistry Departments.
* Corresponding author.
E-mail address: aylin.ozgen@yahoo.com (A.O. Alpaydin).

0301-0546/$ - see front matter © 2012 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2012.04.009

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 22/07/2016. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Introduction

Asthma prevalence has been reported between 1 and 18% across the world. Chronic inflammation and bronchial hyperreactivity are two major components of asthma which contribute to the development of the clinical aspects of the disease. Uncontrolled asthma is associated with significant disability and mortality in patients suffering from the disease. Therefore the goal in asthma therapy has been defined as achieving disease control and patients are classified into three groups as ''controlled'', ''partly controlled'' and ''uncontrolled'' according to their control status.[1] Several factors including poor adherence to drug therapy, inadequate treatment and associated comorbidities may have an influence on asthma control. A small number of asthmatic patients could not be controlled even though optimal monitoring and treatment was administered. Approximately 30% of all asthmatic patients are uncontrolled despite high dose steroid therapy and 10% of the asthmatics are classified as severe asthmatics.[2,3]

It has been reported that problems in achieving asthma control might be related with drug bioavailability as well as underlying clinical challenges. Glucocorticoid (GC) resistance might be one of the underlying aetiologies of poor asthma control.[4] GCs are strong anti-inflammatory drugs which activate and suppress many pro and anti inflammatory genes as well as having post-transcriptional effects. They are used both in asthma attacks and in the maintenance treatment.[5] GC resistant (GC-R) cases do not respond to GCs for some duration or dose; they may need high doses of GCs and they are characterised with severe asthma phenotype.[5,6] Two subtypes of GC resistance have been defined as type I and type II. In type I, the resistance is acquired from allergens, infections or chronic high dose beta agonist and/or GC use and the rest of the organism other than immune cells are sensitive to GCs. Type II GC resistance which is observed in 5% of GC-R cases is also known as familial cortisol resistance and affects all cell types in the organism. A genetic mutation has been suggested as being responsible for this irreversible GC resistance.[5]

Different studies have reported that T lymphocyte activation is correlated with the disease severity and GC therapy reduces peripheral blood T lymphocyte activation compatible with the clinical improvement.[7,8] It has been demonstrated that in vitro responses to GC are decreased in circulating T-lymphocytes of GC-R asthmatic patients.[9,10] In GC sensitive (GC-S) asthmatics, phytohaemagglutinin stimulated peripheral blood mononuclear cell proliferation has been found to be suppressed by GCs. However, this GC response could not be achieved in GC-R asthmatics, which supported the hypothesis of GC resistance in T lymphocytes and monocytes. It has been shown that secretion of interleukin (IL)-2 and interferon-γ from phytohaemagglutinin stimulated peripheral blood T lymphocytes are not inhibited in GC-R asthmatics.[11] On the other hand, the degree of inhibition of lymphocyte proliferation has been found to be associated with the binding affinity of dexamethasone to the GC receptors. This finding supports the role of GC receptor activity in GC responses to phytohaemagglutinin stimulated lymphocyte proliferation.[12]

In our country, there is not enough data about the frequency of GC resistance in asthmatic patients who are not controlled even with the optimal asthma treatment. Therefore, we aimed to investigate the GC resistance by lymphocyte proliferation suppression test (LPST) in those asthmatic patients who were not controlled or clinically GC resistant.

Materials and method

Seventy-seven asthmatic patients admitted to our outpatient clinic between January 2008 and 2010 were screened for the study. All the patients with an asthma diagnosis for more than one year were included consecutively regardless of their asthma control level. Having major co morbid diseases, other overlapping pulmonary diseases (bronchiectasis, cord vocal dysfunction, chronic obstructive pulmonary disease), uncontrolled psychiatric disorders, ongoing occupational exposure and active smoking were the exclusion criteria. Local ethics committee approval was obtained and all patients signed informed consent.

All the enrolled patients were evaluated with a standard questionnaire for demonstrating demographical and historical data. Asthma control level was assessed according to GINA 2006 and treatment was adjusted upon the same guidelines for each control level.[1] Comorbidities like allergic rhinitis and gastrooesophageal reflux were treated as needed. They were followed for minimum three, maximum six months. The patients who remained uncontrolled at the end of the treatment period were accepted as uncontrolled patients ($n = 22$). They were receiving inhaled corticosteroids and long acting beta agonists and/or leukotriene receptor antagonists and/or theophylline in general. Steroid resistance test was applied to them (30–40 mg/day per oral prednisolone for 7–14 days).[13] These uncontrolled cases with or without a FEV1 increase <15% after steroid resistance test were assessed as the ''case group'' ($n = 22$). The ''control group'' was composed from randomly selected controlled patients ($n = 50$) and they were adjusted for optimal treatment and followed for three to six months. At the end of the follow up period LPST was performed to the enrolled case ($n = 22$) and control ($n = 8$) groups who approved to participate in the study.

Lymphocyte proliferation suppression test

Isolation of peripheral blood lymphocytes and measurement of cell proliferation

Blood samples were collected between 09.00 and 10.00 a.m. in a heparinised Cell Preparation Tube (BD Vacutainer, TM) and centrifuged at 1800 RCF at room temperature for 15 min in 2 h. Approximately 2 ml of the cloudy part was taken and centrifuged with plasma. Cell pellets were collected with a Pasteur pipette and transferred to 15 ml falcon tubes. After washing procedures with PBS peripheral blood mononuclear cells were separated.

Cell viability was determined by Trypan blue staining (Gibco) and cells were counted on haemocytometer. Isolated lymphocytes were seeded in a 96-well flat bottom (dark) tissue culture plate at a concentration 1×105 cell/well

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 22/07/2016. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

containing 200 ml of RPMI-1640 (supplemented with 10%FCS and %1 Pen/Strep antibiotics). Cells were cultured in the presence of dexamethasone with or without phytohaemagglutinin (PHA, 0.006 μg/μl). Optimal PHA concentration was chosen by titration studies. Appropriate stock solutions of dexamethasone were prepared and added to every well as to 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10} M. Quantitative measurements of cell proliferation were assayed by BrdU ELISA assay (Roche). BrdU is an analogue of the DNA precursor thymidine. In proliferating cells, the DNA has to be replicated before the division takes place. The amount of BrdU in the DNA of cells can be detected with specific ELISA monoclonal antibodies against BrdU. According to the manufacturer's procedures, 10 μl of BrdU solution was added to all the wells and incubated at 37 °C for 24 h for incorporation of BrdU to the newly synthesised DNA. After the incubation period culture medium was removed and all the wells were fixed and DNA was denatured with FixDenat solution of the kit. Anti-BrdU-POD antibody was added to the wells to bind denatured and newly synthesised cellular DNA. Addition of the substrate formed immune complex to quantify of DNA as light units/s (rlu/s) by luminometer (BioTek Instruments). The relative light units/second directly correlates to the amount of DNA synthesis and to the number of proliferating cells in the respective micro cultures.

Statistical analysis

The statistical analyses were done with SPSS 11.0 package. Two groups were compared by Mann–Whitney *U* test. Fisher's exact test was used for categorical analysis. For repeated measures Benferonni adjusted Friedman tests were used. $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

There were 22 patients in the case group and 50 patients in the control group. All the patients in the case ($n = 22/22$) and eight patients in the control group ($n = 8/50$) approved to be involved in the study. Nine patients in the case group were found negative for steroid resistance test. Fourteen patients in the case group (mean age 53.5 ± 12.7) and four patients in the control group (mean age 42.0 ± 14.5) had specimens with lymphocytes having 95% viability and LPST was performed to them. The demographic and functional characteristics of these patients are shown in Table 1. The age, sex, smoking status, atopy, rhinitis and eosinophilia and comorbidity presence were similar in both groups ($p = 0.524$, $p = 0.079$, $p = 1.000$, $p = 0.569$, $p = 0.092$, $p = 1.000$, $p = 1.000$, respectively). Daily short acting beta agonist (SABA) and inhaled corticosteroid (ICS) use and acute exacerbations which needed ICS therapy were observed to be more frequent in the control group (Table 1).

In the control group, different suppression levels were observed in proliferated lymphocytes at 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-4} mol concentrations of dexamethasone and suppression levels were statistically significant when repeated measurements were performed ($p = 0.001$) (Fig. 1). The results of the analyses showed that dexamethasone in 10^{-4} mol concentration suppressed lymphocytes more than other concentrations, while 10^{-6} mol concentration made suppression bigger than 10^{-10}, both statistically significant ($p = 0.04$) (Table 2).

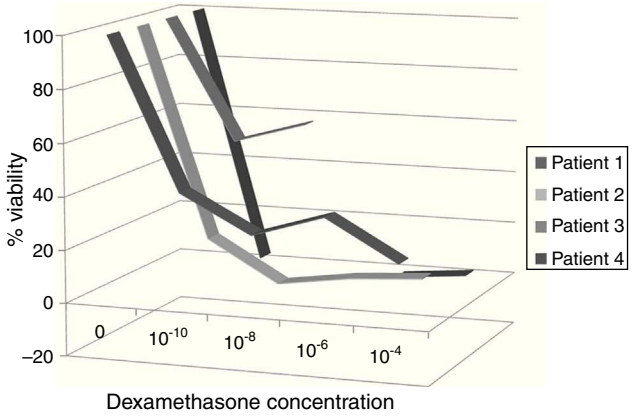


Figure 1 Lymphocyte proliferation suppression test findings of the control group per each case.

In the case group proliferated lymphocytes were observed to be suppressed by 10^{-6} and 10^{-4} dexamethasone concentrations, however suppression level was not statistically significant for these concentrations with respect to other concentrations ($p = 0.147$) (Fig. 2). Furthermore, dexamethasone suppression was significantly lower in the case group for all concentrations with respect to the control group ($p = 0.003$ for 10^{-10}, $p = 0.008$ for other concentrations (Table 2).

It was possible to perform LPST to nine patients among the 13 steroid resistance test positive patients in the case group. In five patients out of these nine; who were positive for steroid resistance test; lymphocyte vitality rate was more than 50% in 10^{-4} mol concentration. The remaining nine patients were negative for steroid resistance test and five underwent LPST. However, among these five steroid resistance test negative patients four had lymphocyte vitality rates lower than 50% in 10^{-4} mol concentration. There was no significant relationship between GC resistance and LPS presence ($p = 0.405$).

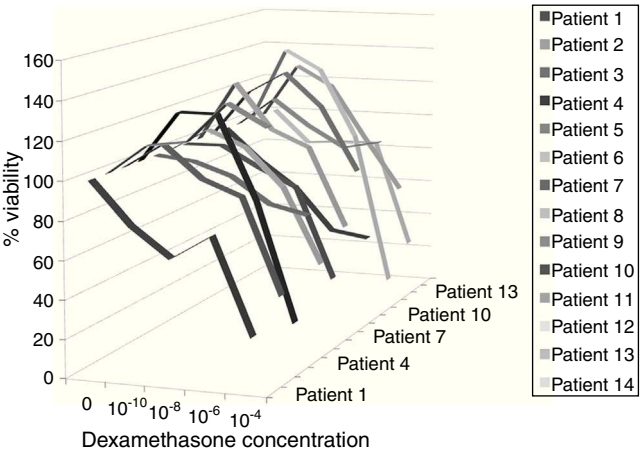


Figure 2 Lymphocyte proliferation suppression test findings of the case group per each case.

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 22/07/2016. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Table 1 Demographic and functional characteristics of the study groups.

	CASE ($n=14$)	Control ($n=4$)
Age (year) (mean ± SD)	53.5 ± 12.7	42.0 ± 14.5
[a]*Gender (female/male)*	10/4	4/0
[a]*Smoking status (smoker/ex-smoker/non-smoker)*	0/5/9	0/1/3
[a]*Atopy history*	10	2
[a]*Rhinitis presence*	8	–
[a]*Peripheral eosinophilia*	8	2
[a]*Comorbidity*	4	1
[a]*FEV1/FVC (≤70%)*	7	0
[a]*FEV1%*		
30–60%	5	0
60–80%	0	0
>80%	9	4
Asthma diagnosis age (mean ± SD)	37.3 ± 13.6	34.0 ± 12.6
Mean duration after asthma diagnosis (mean ± SD)	16.2 ± 10.9	8 ± 2.4
Asthma control test score (mean ± SD)	12.2 ± 4.9	20.2 ± 3.1
Number of exacerbations/year	2.0	0.0
[a]*Combined LABA + ICS therapy*	14	4
[a]*LTA therapy*	13	2
[a]*Theophylline therapy*	9	–
Daily ICS dose (μg/day BUD or equivalent) (mean ± SD)	823.57	312.5
[a]*Regular parenteral CS therapy*	13	–
Daily SABA need (puff/day) (mean ± SD)	3.0	0.0

[a] Values are shown as number of cases unless mentioned.
SD: standard deviation, FEV1/FVC: LABA: long acting beta agonists, ICS: inhaled corticosteroids. LTA: leukotriene antagonists, BUD: budesonide, SABA: short acting beta agonists.

Discussion

Uncontrolled asthma is associated with significant disability and mortality in patients suffering from the disease. Therefore, we aimed to investigate the GC resistance by steroid resistance and lymphocyte proliferation suppression tests in the asthmatic patients who were classified as severe asthmatics or uncontrolled cases. Although we were able to include a small number of patients, we found that steroid resistance test alone was not very sensitive for evaluating GC response and that lymphocyte proliferation suppression test might have a value to demonstrate GC resistance in severe asthmatic patients.

The descriptive features of severe asthmatics include female gender, being over 40 years old and atopy. Occupational exposure, chronic rhinosinusitis, nasal polyposis and persistent eosinophilia despite high dose steroids are the other phenotypic characteristics of these patients.[14–17] They usually present with frequent exacerbations and uncontrolled disease despite high dose ICS use and multiple drug therapies. Irreversible obstruction has been reported to be between 35 and 50% of the adult asthmatics and persistent eosinophilia under treatment might contribute to this procedure.[17,18] In our study, the patients in the case group also had airflow obstruction. They were using high dose ICSs and needed more reliever drugs although their maintenance treatment included multiple drugs. Frequent exacerbations and systemic GC use were also observed in these cases. Therefore, the phenotypic features of our case group were compatible with severe asthmatics. However, as we could not determine GC resistance by steroid resistance test in five patients in the case group, we considered the participants in the case group a heterogeneous combination of different phenotypes. This

Table 2 Lymphocyte viability for different dexamethasone concentrations in case and control groups.

Dexamethasone concentration	CASE ($n=14$)	Control ($n=4$)	p
0 mol	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	1.000
10^{-10} mol	110.6 ± 20.2	29.9 ± 22.8	0.003*
10^{-8} mol	102.2 ± 22.4	31.8 ± 28.3	0.008*
10^{-6} mol	88.5 ± 21.2	15.1 ± 19.8	0.008*
10^{-4} mol	51.9 ± 32.8	9.2 ± 9.5	0.008*

Values are shown as mean ± standard deviation.
* $p < 0.05$.

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 22/07/2016. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

finding supports the prior hypothesis suggesting that GC insensitive asthma should have not been limited with severe asthma.[19] Even milder asthmatics might have GC resistance.[11]

It has been reported that T lymphocytes of clinically GC-R asthmatic patients also showed a relative unresponsiveness to the inhibitory effects of GCs.[9,20,21] Haczku et al. found that dexamethasone addition to phytohaemagglutinin stimulated T lymphocytes in a range to 10^{-10} to 10^{-6} resulted in dose dependent suppression in both clinically GC-R and GC-S patients. They showed that T lymphocytes of GC-S patients were significantly suppressed in 10^{-6}, 10^{-7} and 10^{-8} mol concentrations with respect to GC-R patients.[22] In another study, dose dependent suppression was reported in both GC-R and GC-S patients, albeit GC-R requiring more amount of GCs.[12] In our study, lymphocyte proliferation was suppressed in every dexamethasone concentration we used in the control group. However, a decreased dexamethasone suppression response was observed for only 10^{-6} and 10^{-4} dexamethasone concentrations in the case group which composed from uncontrolled asthmatics. The differences in suppression degrees between the case and control groups were statistically significant. This finding suggests that responsiveness to GCs has been markedly impaired in uncontrolled asthmatics. Despite the fact that we did not start with an intention to demonstrate the possible mechanism of GC insensitivity, we determined that in nearly half of the clinically GC-R patients lymphocyte proliferation suppression was not efficient even with high doses of dexamethasone. We also determined marked lymphocyte proliferation suppression with dexamethasone in patients without GC resistance. Therefore we thought that there was type II GC resistance in some of the GC-R patients in our study group, while the other clinically GC-R patients possibly had type I resistance.

In conclusion, our results showed that in vitro responses to the GCs were significantly declined in the uncontrolled asthma cases. Steroid resistance test alone was not very sensitive for evaluating in vitro GC responses, as there were patients whose steroid resistance test was negative but peripheral blood lymphocyte proliferation was markedly suppressed. Therefore, in some clinically GC-R patients there could be type II GC resistance and LPST might be performed for demonstrating GC responsiveness in asthmatic patients in addition to steroid resistance test.

Ethical disclosures

Patients' data protection. Confidentiality of Data. The authors declare that no patient data appears in this article.

Right to privacy and informed consent. Right to privacy and informed consent. The authors declare that no patient data appears in this article.

Protection of human subjects and animals in research. Protection of human and animal subjects. The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the responsible Clinical Research Ethics Committee and in accordance with those of the World Medical Association and the Helsinki Declaration.

Financial support

Dokuz Eylul University Scientific Research Fund, 200757.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD): Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI); 2006. www.ginasthma.com
2. Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. J Allergy Clin Immunol. 2000;106:1033–42.
3. Bateman ED, Bousquet J, Keech ML, Busse WW, Clark TJ, Pedersen SE. The correlation between asthma control and health status: the GOAL study. Eur Respir J. 2007;291:56–62.
4. Kazuhiro I, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:522–43.
5. Holgate ST. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. Lancet. 2006;368:780–93.
6. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Howarth PH, Haitchi HM, Babu S, et al. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:496–506.
7. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K, Activated T. cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. J Allergy Clin Immunol. 1991;88:935–42.
8. Corrigan Cl, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. Am Rev Respir Dis. 1990;141:970–7.
9. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Szefler SJ, Tsai JJ, Frew AJ, et al. Glucocorticoid resistance in chronic asthma: glucocorticoid pharmacokinetics, glucocorticoid receptor characteristics, and inhibition of peripheral blood T-cell proliferation by glucocorticoids in vitro. Am Rev Respir Dis. 1991;144:1016–25.
10. Poznansky MC, Gordon ACH, Douglas JG, Krajewski AS, Wyllie AH, Grant IWB. Resistance to methylprednisolone in cultures of blood mononuclear cells from corticosteroid-resistant asthmatic patients. Clin Sci. 1984;67:639–45.
11. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. Lancet. 2009;373:1905–17.
12. Spahn JD, Landwehr LP, Nimmagadda S, Wendy Surs W, Leung DYM, Szefler SJ. Effects of glucocorticoids on lymphocyte activation in patients with steroid-sensitive and steroid-resistant asthma. J Allergy Clin Immunol. 1996;98:1073–9.
13. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in airway disease. Proc Am Thorac Soc. 2004;1:264–8.
14. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. Eur Respir J. 2004;24:822–33.
15. Barnes N. Most difficult asthma originates primarily in adult life. Pediatr Respir Rev. 2006;7:141–4.
16. Guilbert T, Krawiec M. Natural history of asthma Pediatr Clin N Am. 2003;50:523–38.

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 22/07/2016. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

17. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160:1001–8.
18. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2003;167:418–24.
19. Kiley J, Smith R, Noel P. Asthma phenotypes. Curr Opin Pulm Med. 2007;13:19–23.
20. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T-lymphocyte activation and a comparison of the T-lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. Am Rev Respir Dis. 1991;144:1026–32.
21. Alvarez J, Surs W, Leung DYM, Ikle D, Gelfand EW, Szefler SJ. Steroid-resistant asthma: immunologic and pharmacologic features. J Allergy Clin Immunol. 1992;89:714–21.
22. Haczku A, Alexander A, Brown P, Assoufi B, Li B, Kay AB, et al. The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation in vitro: comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma. J Allergy Clin Immunol. 1994;93:510–9.

La Clinica Terapeutica

Volume 164 - Anno 2013 - Numero 3

Effectiveness of thymoquinone in the treatment of experimental asthma

doi: 10.7417/CT.2013.1559

di S. Kalemci, S. Cilaker Micili, T. Acar, T. Senol, N. Dirican, G. Omeroglu, A. Bagriyanik, G. Kamaci, O. Yilmaz



Background. *Thymoquinone (TQ), the main active constituent of the volatile oil extracted from Nigella sativa's seeds, is used for the treatment of inflammatory diseases and exhibits a variety of pharmacological effects.*
Methods. *Twenty-eight BALB/c female mice were divided into four groups: I (sham-operated control group), II, III, and IV. All groups except for the sham-operated group were sensitized and challenged with ovalbumin. The sham-operated group received nebulized saline in challenge period. Mice in groups III and IV were administered TQ at a dose of 3 mg/kg and dexamethasone 1 mg/kg, respectively, intraperitoneally once a day for the final 5 days of the challenge period. Animals were sacrificed 24 h after the last drug administration and the airway samples were evaluated histologically by light microscopy.*
Results. *All histological parameters in Group III, similar to Group IV, were improved when compared to Group II. All variables except numbers of goblet cells were found to be significantly better in Group III and Group IV compared to Group II.*
Conclusions. *In our study, we demonstrated that TQ administration alleviates the pathological changes of chronic asthma. TQ might be a promising therapy for asthma in the future. Clin Ter 2013; 164(3):e155- 158. doi: 10.7417/CT.2013.1559*

Visualizza il file PDF

ATTENZIONE: per accedere al servizio di consultazione online dei file pdf occorre essere abbonati alla rivista ed aver abilitato il proprio pin.
Se non siete ancora abbonati potete abbonarvi e ricevere il pin attraverso il nostro online store.
Per l'attivazione del pin ricevuto, contattare ordini@seu-roma.it.

Düşük doz amiodaron kullanımına ikincil gelişen pulmoner toksisite

Pulmonary toxicity due to low dose amiodorone usage

Serdar Kalemci[1], Gökçen Şimşek[2], Can Sevinç[2]

[1]Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Muğla
[2]Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

Yazışma adresi: Serdar KALEMCİ, [1]Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Muğla, Tel: 0 505 698 43 12, E-Mail: skalemci79@mynet.com

Özet

Amiodaron supraventriküler ve ventriküler aritmilerde kullanılan grup III antiaritmiktir. Amiodarona bağlı pulmoner toksisite hayatı tehdit eden önemli bir komplikasyondur. Uzun süreli (ortalama 5 yıl) ve 400 mg/gün üzeri kullanımlarda pulmoner toksisite gelişebilmektedir. Bu yazıda, düşük doz amiodaron kullanımı sonrası gelişen ve başarılı bir şekilde tedavi edilen pulmoner toksisite olgusunu sunmayı amaçladık.

Anahtar kelimeler: amiodoron, granülomatöz enflamasyon, pulmoner toksisite

Abstract

Amiodorone is a group III antiarrhytmic agent, which is used for supraventricular and ventricular arrhythmia. The pulmonary toxicity due to amiodorone is the major complication which threats the life. Long-term usage (more than 5 years) of the amiodorone and the dosages of over 400 mg/day might cause pulmonary toxicity. In this report, we aimed to present a successfully treated pulmonary toxicity which developed after low dose amiodorone usage.

Key words: amiodorone, granulomatous inflammation, pulmonary toxicity

Giriş

Amiodaron supraventriküler ve ventriküler aritmilerde kullanılan grup III antiaritmiktir. Amiodarona bağlı pulmoner toksisite hayatı tehdit eden önemli bir komplikasyondur. Pulmoner toksisite %5-15 oranında ortaya çıkmakta olup mortalitesi %5-10 arasında değişmektedir (1). Pulmoner toksisitenin semptomları dispne, öksürük, göğüs ağrısı, kilo kaybı, subfebril ateş yüksekliği olup interstisyel pnömoni, pulmoner nodül, akut respiratuar distres sendromu (ARDS), pulmoner hemoraji ve ölüm gelişebilmektedir. Direkt akciğer grafileri, bilgisayarlı tomografi ve galyum sintigrafisi pulmoner patolojiyi görüntülemede oldukça faydalıdır. Laboratuar değerlerinde özellikli bir bulgu yoktur. En çok önerilen fonksiyonel test difüzyon kapasitesi ölçümü olup, normal değerlerin %15 altına düşen azalma olması anlamlıdır. Tedavi gerektiren durumlarda ilacın kesilmesi yanında günde 0,5 mg/kg olacak şekilde kortikosteroid kullanılmakta ve tedavi yaklaşık olarak 2 ile 6 ay arasında sürdürülmektedir (2, 3).

Olgu sunumu

Altmış dokuz yaşında erkek hasta öksürük, balgam ve nefes darlığı şikayetleri ile başvurdu. Özgeçmişinde hipertansiyon, atrial fibrilasyon, gut, geçirilmiş bypass operasyonu olan hastanın, soygeçmişinde özellik yoktu. 40 paket-yıl sigara, 40 yıl 70 cc alkol tüketim öyküsü vardı. Muhasebeci olarak memurluk yaptıktan sonra, yaklaşık 15 yıldır emekli olarak yaşamını sürdürmekte idi. Hayvan besleme öyküsü tanımlamıyordu. Dört yıl evvel atrial fibrilasyon nedeni ile 200 mg/gün amiodaron başlanmış olan olgu, nefes darlığı ve öksürük şikayetleri ile dış merkeze başvurmuş. Pnömoni nedeniyle nonspesifik antibiyoterapi başlanmış ancak izleminde şikayetlerinin geçmemesi ve balgam şikayetinin de eklenmesi üzerine hastanemize yönlendirilmiş. İleri tetkik amacı ile Göğüs Hastalıkları Servisine yatırıldı.

Fizik muayenesinde TA: 130/70 mmHg, Nabız: 80/dakika, Ateş: 37,5 C idi. Solunum sistemi muayenesinde solunum seslerinde bilateral azalma ve bibaziler raller saptandı. Ekstremite muayenesinde pretibial ödemleri ve her iki ayak sırtı lokalizasyonunda döküntüleri gözlendi. Diğer sistem muayeneleri olağan idi. Biyokimyasal incelemelerinde; aspartat aminotransferaz: 64 (normal 1-40) U/L, arter kan gazında pH: 7,41, $PaCO_2$: 38,2 mmHg, PaO_2: 59,9 mmHg, HCO_3: 24,9 mmol/lt, Satürasyon: %91 saptandı. Çekilen akciğer grafisinde kardiyotorasik oranda (KTO) artış ve bazallerde retiküler vasıflı dansite artımları izlendi (Şekil 1). İlaca bağlı akciğer hastalığı düşünülerek yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (YÇBT) çekildi. YÇBT' de bilateral buzlu cam alanları, interlobüler septal kalınlaşma, fibrozis ve kardiyomegali izlendi (Şekil 2). Bronkoskopi yapıldı. Gönderilen örneklerde üreme saptanmadı. Bronkoalveoler lavaj (BAL)'da CD4/CD8 oranı: 0,77 olarak saptandı. Sitolojik incelemede maliğnite ile ilişkili bulgu gözlenmedi. Transbronşial akciğer biyopsisi; histiosit hücre topluluklarının gözlendiği granülomatöz iltihap olarak raporlandı. Serum anjio converting enzim (ACE) düzeyi normal sınırlardaydı. Solunum fonksiyon testinde FEV_1: 2,14 L (%63), FVC: 2,52 L (%56), FEV_1/FVC: %85 DLCO: 15,3 (%52), DLCO/VA: 3,35 (%87) saptandı. Romatolojik belirteçleri negatif saptandı. Romatoloji bölümünce değerlendirilen hastada öykü, fizik muayene ve serum değerleri ile ön planda romatolojik

hastalık düşünülmedi. Amiodoron kullanımına bağlı akciğer toksisitesinde histiosit hücre topluluklarının gözlendiği granülomatöz iltihap beklenen bir durumdur. Hastamızda ön planda amiodoron kullanımına bağlı akciğer toksisitesi düşünülerek olgumuza peroral 32 mg/gün dozunda prednizolon başlandı. Bir ay sonra elde edilen kontrol YÇBT (Şekil 3) ve akciğer grafisinde belirgin radyolojik düzelme olduğu izlendi (Şekil 4). Tedaviye doz azaltılarak devam edilen hastanın kontrol solunum fonksiyon testinde FEV_1: 2,94 L (%90), FVC: 3,41 L (%80), FEV_1/FVC: %86, DLCO: 14,4 (%51), DLCO/VA: 3,02 (%78) saptandı. Hastanın steroid dozu kademeli olarak azaltılıp, gün aşırı 4 mg dozda toplam 6 aya tamamlandı. Tedavi kesildikten sonraki birinci yıl kontrolünde radyolojik ve klinik olarak tam düzelme olduğu görüldü.

Tartışma

Amiodaron amfobilik bir ajandır ve yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanır. Lipofilik natüründen dolayı adipoz doku, karaciğer ve akciğer dokusunda birikir. Mekanizması tam olarak bilinmese de akciğer toksisitesini T lenfositleri aracılığı ile direkt akciğer dokusuna zarar vererek veya immünite aracılı hipersensivite mekanizması ile gösterir. Akciğer toksisitesinin semptomları dispne, non-prodüktif öksürük, kilo kaybı, subfebril ateştir. Akciğer toksisitesini arttıran sebepler; 50 yaşından büyük olmak, 400 mg/gün üzeri dozda ilaç kullanımı, yüksek kilolu olmak ve bilinen akciğer hastalığı olması, kardiyotorasik ameliyat geçirmiş olmak sayılabilir (4).

Bilateral yamasal asiner dansite artımları ve buzlu cam dansitesi en sık görülen radyolojik görünümlerdir. Galyum 67 sintigrafisindede tutulum izlenebilir. Laboratuvar bulgular non spesifiktir. Sedimantasyon ve beyaz küre yüksekliği görülebilir (5).

Radyolojik ve klinik bulgulara ilaveten biyopsi materyalinde kronik interstisyel pnömoni ve intraalveoler makrofaj birikimi saptanması ile amiodaron pulmoner toksisite tanısı konulabilir (6). Uzun süreli (ortalama 5 yıl) ve 400 mg/gün üzeri kullanımda pulmoner toksisite riski artmakla beraber düşük dozda kullanımlarda pulmoner toksisite riskinin az olduğu bilinmektedir (7). Ott ve arkadaşları, sekiz hasta ile yaptıkları retrospektif bir çalışmada düşük doz amiodaron kullanımı ile pulmoner toksisite gelişebileceğini göstermişlerdir (8).

Mihalis ve arkadaşları post koroner arter by-pass operasyonu geçiren ve sonrasında atrial fibrilasyon gelişen bir olguda düşük doz amiodaron tedavisi uygulamışlar, ardından olguda pulmoner toksisite geliştiğini göstermişlerdir (9). Bizim olgumuzda da düşük doz amiodaron kullanımı sonrası pulmoner toksisite geliştiğini destekleyen bulgular söz konusudur. BAL'da elde edilen CD4/CD8 oranının ilaca bağlı akciğer hastalıklarında ve hipersensitivite pnömonisinde düşmesi, bağ dokusu hastalığına bağlı akciğer tutulumunda artması beklenir. Bu sonuç ön tanımızı desteklemektedir. Granülomatöz enflamasyonun hipersensitivite pnömonisinde de saptanabilmesi nedeniyle, ilaca bağlı akciğer hastalığının ayırıcı tanısında anamnezde etken maruziyetinin olmaması ve BAL'da eozinofilik yanıtın <%20 den az olmasıdır. Diffüz interstisyel akciğer hastalıkları arasında granülomatöz enflamasyonla seyreden diğer iki hastalık sarkoidoz ve Langerhans Hücreli Histiyositoz'dur. Sarkoidoz için özellikli laboratuvar farklılıklar, Langerhans Hücreli Histiyositoz'dur için radyolojik bulgular ayırıcı niteliktedir.

Sonuç olarak; düşük dozaj amiodaron kullanımı sonrası pulmoner toksisite gelişebileceğini ön görüp ayırıcı tanısının iyi yapılması gerekmektedir. Steroid tedaviye iyi yanıt alınabilmektedir.

Yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular (Conflict of interest statement) : Yok (None)

Referanslar

1. Kennedy J Jr I. Clinical aspects of amiodarone pulmonary toxicity. Clin Chest Med 1990; 11: 119-29
2. Conte SC, Pagan V, Murer B. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia secondary to amiodarone: clinical, radiological and histological pattern. Monaldi Arch Chest Dis 1997; 52: 24-26.
3. Joelson J, Kluger J, Cole S. Conway M. Possible recurrence of amiodarone pulmonary toxicity following corticosteroid therapy. Chest 1984; 85: 284-86.
4. Camus P, Martin WJ, Rosenow EC. Amiodarone pulmonary toxicity. Clin Chest Med 2004; 25: 65-75.
5. Rotmensch HH, Liron M, Tupilski M, et al. Possible association of pneumonitis with amiodarone thearpy. Am Heart J 1980; 100: 412–3.
6. Kennedy, JI, Myers, JL, Plumb, VJ, et al Amiodarone pulmonary toxicity: clinical, radiologic, and pathologic correlations. Arch Intern Med 1987; 147: 50-55
7. Ashrafian, H, Davey, P Is amiodarone an underrecognized cause of acute respiratory failure in the ICU? Chest 2001; 120: 275-282
8. Ott MC, Khoor A, Leventhal JP, Paterick TE, Burger CD. Pulmonary toxicity in patients receiving low-dose amiodarone. Chest 2003; 123: 646–51.
9. Mihalis A, Panagiotis HO, Nicolaos A, Maria M. Acute fatal post CABG Low dose amiodarone lung toxicity. Asian cardiovasc thorac ann 2007; 15: 66-68