

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ İLE İLİŞKİLİ MİRNA EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

DİLEK ÇEKER

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

TEMMUZ 2024

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ İLE İLİŞKİLİ MiRNA
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

DİLEK ÇEKER

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY
2. DANIŞMAN: DOÇ.DR. ABDULLAH KARADAĞ

TEMMUZ 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**DETERMINATION OF MiRNA EXPRESSION
PROFILES RELATED TO LUNG CANCER**

DİLEK ÇEKER

**A THESIS OF DOCTORATE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS**

ADVISOR: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY
Co- ADVISOR: ASSOC. PROF. DR.ABDULLAH KARADAĞ

JULY 2024

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 01/07/2024 tarih ve 2024/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 04/07/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Dilek ÇEKER'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Kazım YALÇIN ARGA

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Prof. Dr. Betül KARADEMİR YILMAZ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Kanser, hem dünya genelinde hem de ülkemizde ölüm oranlarında ikinci sırayı alarak büyük bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Teknolojik ilerlemelerin artmasıyla birlikte kanser teşhisleri de hızla artmaktadır. Erken evre kanser teşhisi, tedavi başarısını etkileyen önemli bir faktördür ve bu amaçla çeşitli kanser tarama programları geliştirilmiştir. Çeşitli yöntemler arasında biyokimyasal, genetik, histolojik ve görüntüleme tabanlı testler bulunmaktadır. Kanser, heterojen bir hastalık olduğundan alt tiplerin doğru belirlenmesi, moleküler anormalliklerin ve biyobelirteçlerin anlaşılmasını gerektirir. Bu bağlamda, çalışmamızda Akciğer kanserinin %85'ini oluşturan KHDAK alt tipine yönelik miRNA profilleri, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi kullanılarak incelenmiştir. Aynı hastadan elde edilen KHDAK tümör, reaktif stroma, normal akciğer dokusu ve lenf dokusu örneklerinin small RNA profilleri arasındaki farklılıklar ve bu miRNA'ların kana yansımaları NGS ve biyoinformatik analizlerle değerlendirilmiş, akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiş miRNA yapıları tespit edilmiştir. Elde edilen yeni miRNA profilleri klinik, evreleme, farklılaşma, histoloji, yaş, cinsiyet gibi faktörlerle ilişkilendirilmiş ve mevcut sınıflandırma protokolleri ile karşılaştırılmıştır. Yapılan informatik analizler sonucunda 51 hastanın 255 örneğinde çeşitli miRNA'lar tanımlanmış, tümör ve kan örneklerinde ortak bulunan miRNA'lar belirlenmiştir. Farklı ifade düzeyine sahip miRNA'lar üzerine yapılan analizler ise anlamlı ifade farklılıklarını ortaya koymuştur. Bu çalışma, Akciğer Kanseri'nin bir alt tipi olan KHDAK'ın T, N, R, M dokularının ve kanların detaylı miRNA dizilemesini gerçekleştiren ve NGS teknolojisinden yararlanan bir çalışma olarak öncüdür. Bu nedenle, hastalıkla ilişkili miRNA profillerini belirlemek için yapılan ilk büyük çaplı çalışmadır. Informatik analizler ile elde edilen bu yeni miRNA profilleri, kanserin erken evrelerinin tespiti için özgül biyobelirteçlerin geliştirilmesine yardımcı olabilir ve tedavi takibi için de önemli bir panel sunabilir. Bu şekilde, hedeflenen miRNA'lar kanser tedavisine olumlu etkiler sağlayabilir.

Bu çalışma, TÜBİTAK ARDEB 1003 projesi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 115S113/ 215S091

Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), MikroRNA (miRNA), Biyobelirteç, Transkriptom.

ABSTRACT

Cancer, ranking as the second leading cause of death both globally and in our country, has emerged as a significant public health concern. With the surge in technological advancements, cancer diagnoses are rapidly increasing. Early-stage cancer diagnosis stands as a crucial factor influencing treatment success, leading to the development of various cancer screening programs. Among these, a range of methods including biochemical, genetic, histological, and imaging-based tests have been devised. Given the heterogeneous nature of cancer, accurate identification of subtypes requires an understanding of molecular abnormalities and biomarkers, vital for predicting treatment efficacy and clinical prognosis. In this context, our study focuses on miRNA profiles specific to the KHDAK subtype, accounting for 85% of Lung cancer cases, utilizing Next-Generation Sequencing (NGS) technology. First, alterations in small RNA profiles among KHDAK tumor samples, reactive stromal tissue, normal lung tissue, and lymph tissue, along with their bloodstream reflections, have been assessed through bioinformatics-supported analysis. miRNA structures associated with lung cancer have been identified. Subsequently, the novel miRNA profiles have been correlated with clinical parameters such as staging, differentiation (grade), histology, smoking habits, age, gender, and compared against existing classification protocols. As a result of comprehensive bioinformatics analyses, diverse miRNAs have been identified in 255 patient samples, with miRNAs shared between tumor tissues and blood samples. Analyses focusing on miRNAs with different expression levels in both blood and tissue have revealed significant expression variations. This study pioneers the detailed miRNA sequencing of T, N, R, M tissues and blood of KHDAK, a subtype of Lung cancer, utilizing NGS technology, thus representing the first large-scale effort to delineate disease-related miRNA profiles. The novel miRNA profiles identified may facilitate the development of specific biomarkers for early-stage cancer detection and enhance treatment monitoring. Consequently, these targeted miRNAs could positively impact lung cancer management.

Keywords: Nonsmall Cell Lung Cancer (NSCLC), microRNA (miRNA), Biomarker, Transcriptome.

TEŞEKKÜR

Başta, doktora yapmama fırsat tanıyan ve tezimin tamamlanması için yoğun destek veren değerli hocam Prof. Dr. Uygur Halis TAZEYAY'a

Doktora eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan tez danışmanım değerli hocam Doç.Dr. Abdullah KARADAĞ'a,

Tezin analizlerinin yapılmasına yardımcı olan, tezim süresince desteği ve olumlu fikirleri ile daima yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Kazım Yalçın ARĞA'a,

Tez izleme sürecine katılarak kritik noktalarda yapıcı eleştiriler getirerek tezin son şeklini almasını sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya,

Yine, tezin analizleri kısmında tüm desteği ile yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşlarım Gizem GÜLFİDAN ve Mehmet Arif BİÇAKÇI'ya,

Tez çalışmamda psikolojik olarak beni motive eden değerli arkadaşım Bushra TAJ'a,

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde tüm alt yapısı ile destek ve katkılarından dolayı TÜBİTAK-MAM'a ve Gebze Teknik Üniversitesi'ne,

Her zaman bana inanan ve beni büyüten aile üyelerim babam; Mehmet DEMİRCAN, annem; Emine DEMİRCAN, kardeşlerim; Erdem DEMİRCAN ve Kaan DEMİRCAN'a,

Son olarak göstermiş olduğu yoğun sabır ve tüm süreçte bana katlandığı için sevgili eşim ve hayat arkadaşım Engin ÇEKER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi	6
2.2.1. Sigara	6
2.2.2. Hava Kirliliği, Mesleki ve Çevresel Karsinojenlere Maruziyet	7
2.2.3. Genetik Yatkınlık	7
2.2.4. Beslenme	8
2.2.5. Yaş	8
2.2.6. Fiziksel Aktivite	8
2.3. Akciğer Kanserinin Patolojik Sınıflandırması	9
2.3.2. Skuamöz hücreli karsinomlar	13
2.3.3. Büyük hücreli karsinomlar	13
2.3.4. Adenoskuamöz karsinomlar	13
2.3.5. Sarkomatoid karsinomlar	14
2.3.6. Prekürsör glandüler lezyonlar	14
2.3.7. Küçük Hücreli Karsinom	14
2.4. Akciğer Kanserinde Evreleme Sistemi	14
2.4.1. KHDak'de TNM Evreleme Sistemi	15
2.4.2. KHDak'de Klinik Evreleme Sistemi	18
2.4.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) için Evreleme	19
2.5 Akciğer Kanseri için Derecelendirme	20
2.6 Akciğer Kanseri Patogenezi ve Moleküler Değişiklikler	20
2.6.1. Kanser Hücresinin Temel Özellikleri	20
2.6.2. Akciğer Kanseri Karsinogenezi	21
2.6.3. Akciğer Kanseri Tümör Mikroçevresi (TME)	22
2.6.4. Akciğer Kanserinde Önemli Bazı Sinyal Yolakları	25
2.6.5. Akciğer Kanserinde Yaygın Genetik Değişiklikler	28
2.6.6. Akciğer Kanserinin RNA Aracılı Regülasyonu	33
2.6.6.1. Kodlama Yapmayan RNA'lar (ncRNA)	33
2.6.6.2. Kodlama Yapmayan mikroRNA (miRNA)'nın Akciğer Kanserinde Önemi	36
2.7. RNA Dizileme (Transkriptom) Teknolojisinin Kanser Çalışmalarındaki Yeri	39

2.7.1. MiRNA İfade Profillemesinde Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Rolü ve Geleceği	42
2.8. KHD AK Odaklı Biyobelirteç Çalışmaları	44
2.8.1. KHD AK Hastalığında Tanı, Prognoz ve Tedavi Potansiyeli Taşıyan MikroRNA Biyobelirteçleri	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1. GEREÇ	52
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeler ve Cihazlar	52
3.2. Yöntem	57
3.2.1. Biyobankanın Oluşturulmasında İlk Aşama	57
3.2.2. KHD AK Hasta Daveti ve Biyolojik Örnek Seçimi	59
3.2.3. KHD AK Alt Tiplerinin Belirlenmesinde Histolojik Analiz	61
3.2.3.1. Dokuların Immunohistokimyasal Analiz Yöntemi	62
3.2.3.2. Dokuların Histolojik Analiz Yöntemi	62
3.2.4. Biyobanka Oluşumunda Örnek Toplama Süreci	65
3.2.4.1. Doku Örneklerin Toplanması	67
3.2.4.2. Biyolojik Sıvıların Toplanması	68
3.2.5. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Evreleme Bilgileri	72
3.2.6. Hasta Örneklerinin Karakterizasyonu	75
3.2.6.2. Total RNA İzolasyonu Ve Kalite Parametrelerinin Ölçülmesi	76
3.2.7. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Transkriptom Dizilenmesi	83
3.2.7.1. RNA Seq Kütüphane Hazırlık Protokolü	85
3.2.7.2. Bioanalyzer Cihazında RNA Seq Kütüphanesinin Kalite Kontrolü Protokolü	88
3.2.7.3. RNA Seq Kütüphanesinin Miktar Tayini	88
3.2.7.4. RNA Seq Kütüphanesinin Havuzlanması	90
3.2.7.5. RNA Seq Kütüphanesinin Dizilenmesi	96
3.2.8. Transkriptom Datasının Kalite Kontrolü	97
3.2.8.1. RNASeq Ham Datasının Kalite Kontrolü	97
3.2.9. Transkriptom Datasının Biyoenformatik Analizi	98
3.2.9.1. RNA-seq veri ön analizi	98
3.2.9.2. miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı analizi	98
3.2.9.3. TCGA Verilerinin Analizi	99
4. SONUÇLAR	100
4.1. Biyobanka Oluşumu	100
4.1.1. Veritabanı (LUNGBASE/AKBASE)	101
4.1.2. Yazılımı (LUNGSOFT /AKSOFT)	102
4.2. Hastaların H&E Boyama Sonrası Histolojik görüntüleri	103
4.3. Hastaların Demografik Bilgileri	108
4.4. Hasta Örneklerinin Karakterizasyon Deneyi Sonuçları	114
4.5. Hasta Örneklerinden Hazırlanan Kütüphanenin Kalite Kontrolü	122
4.6. Hasta Örneklerinden Hazırlanan Kütüphanenin Miktar Tayini	123
4.7. Dizilenen Hasta Örneklerinin RNA-Seq Ham Datasının Kalite Kontrolü	128
4.8. Hasta Örneklerine Ait Dizi Bilgilerinin Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları	129
4.8.1 Skuamöz Hücreli Karsinom İçin Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları	130
4.8.2 Adenokarsinom için karşılaştırmalı analiz sonuçları	133
4.8.3 Büyük hücreli karsinom için karşılaştırmalı analiz sonuçları	136

4.9. SHK, AK ve BHK Tümör Dokularında Ekspresyon Düzeyleri Değişen miRNA'lar	138
4.10. SHK, AK ve BHK Kanlarında Ekspresyon Düzeyleri Değişen miRNA'lar	141
4.11. SHK, AK ve BHK Lenf Nodlarında Ekspresyon Düzeyleri Değişen miRNA'lar	143
4.12. TCGA verilerinin analiz Sonuçları	143
5. TARTIŞMA	149
KAYNAKLAR	162
ÖZGEÇMİŞ	186
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR	187
EKLER	188



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAH	: Atipik Adenomatöz Hiperplazi
AJCC	:Amerikan Kanser Komitesi
AK	:Adenokarsinom
BALF	:Bronkoalveoler Lavaj Sıvısı
BHK	:Büyük Hücreli Karsinom
CAF	:Kanserle İlişkili Fibroblastlar
CDK	:Sikline Bağımlı Kinaz
CEA	:Karsinoembriyonik Antijen
CT	:Bilgisayarlı Tomografi
DH	:Dentritik Hücre
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DNBS	:DNA Nanoball Dizileme
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
ECM	:Hücre dışı Matriks
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ES	:Genişlemiş Aşama
ETS	:Çevresel Tütün Dumanı
FISSEQ	:Floresan İn Situ RNA Dizileme
FFPE	:Formalinle Sabitlenmiş-Parafine Gömülü
GLOBOCAN	:Küresel Kanser Gözlem Verisi
IASLC	:Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği
IHC	:İmmünohistokimyasal
KHAK	:Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	:Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KOAH	:Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LCM	:Lazer Yakalama Mikrodiseksiyon
LS	:Sınırlı Aşama
miRNA	:Mikro Ribonükleik Asit
MLPA	:Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu
MMP	:Matriks Metalloproteinaz
MOPS	:3-(N-Morpholino)propane sulfonic acid
MRI	:Manyetik Rezonans Görüntüleme
NGS	:Yeni Nesil Dizileme
NK	:Doğal Öldürücü
ONCG	:Onkogen
ONT	:Oxford Nanopore Technologies
PacBio	:Pacific Biosciences
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PET	:Pozitron Emisyon Tomografisi
PM	:Partikül Madde
RCA	:Yuvarlanan Daire Amplifikasyonu
RNA	:Ribonükleik Asit
RT-qPCR	:Ters Transkriptaz Kalitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SHK	:Skvamöz Hücreli Karsinoma

SMRT	:Tek Moleküllü Gerçek Zamanlı Dizileme
SOLID	:Oligonükleotit Ligasyonu ve Tespiti ile Dizileme
SPLIT-Seq	:Bölünmüş Havuz Ligasyonuna Dayalı Transkriptom Dizilimi
TAM	:Tümörle İlişkili Makrofajlar
TCGA	:Kanser Genom Atlası
TE	:Transpozon Elementler
TK	:Tam Kan
TLS	:Üçüncül Lenfoid Yapılar
TME	:Tümör Mikroçevresi
TNM	:Tümör Lenf nodu Metastaz Evreleme Sistemi
TSG	:Tümör Baskılayıcı Gen
tSMS	:Gerçek Tek Molekül Dizileme
TTF-1	:Tiroid Transkripsiyon Faktör-1
VALSG	:Veterans Affairs Lung Study Group
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: 2020 Yılı Verilerine Göre Dünya Genelindeki Kanser Vakalarının Sayısı.	3
Şekil 2.2: 2020 Yılı Verilerine Göre Dünya Genelindeki Kanser Ölümünün Sayısı.	4
Şekil 2.3: Türkiye'deki Akciğer Kanseri Evrelerinin Yüzdesel Dağılımları.	5
Şekil 2.4: Akciğer Kanseri Evrelerinin Yüzdesel Dağılımları.	5
Şekil 2.5: Akciğer Kanseri 5 Yıllık Sağ Kalım Oranı, 2012-2018.	6
Şekil 2.6: Akciğer Kanseri Khdak Üç Temel Alt Tipleri; Skuamöz Hücreli Karsinom, Adenokarsinom Ve Büyük Hücreli Karsinom, Ve Khak İçin Yüzdesel Dağılım.	10
Şekil 2.7: Çok Basamaklı Kimyasal Karsinojenez.	22
Şekil 2.8: Tümör Mikroçevresindeki Ana Bileşenler Ve İlişkili Hücreler.	23
Şekil 2.9: Akciğer Kanseri Tumor Tarafından Yeniden Programlanan Stromal Hücreler.	24
Şekil 2.10: Akciğer Kanseri Ras/Raf/Mek/Mapk Yolağı.	26
Şekil 2.11: Akciğer Kanseri P53 Sinyal Yolağı.	28
Şekil 2.12: Rna Dizileme Teknolojilerinin Zaman İçerisindeki Gelişim Çizelgesi.	39
Şekil 3.1: Veritabanı (Lungbase)'ın İçerik Bilgisi.	57
Şekil 3.2: Khdak Hastalarının Daveti Ve Örnek Seçimi	59
Şekil 3.3: Çalışmaya Dahil Edilen Khdak Histolojik Grupları Ve Dahil Edilmeyen Khak.	61
Şekil 3.4: Dokuların Histolojik Analiz Yöntemi İle Doğrulanması.	62
Şekil 3.5: Biyobanka Oluşumunda Örnek Toplama Süreci.	66
Şekil 3.6: Doku Örneklerinin Toplanma İş Akışı.	67
Şekil 3.7: Serum Örneklerinin Toplanma İş Akışı.	69
Şekil 3.8: Plazma Örneklerinin Toplanma İş Akışı.	69
Şekil 3.9: Tam Kan Örneklerinin Toplanma İş Akışı.	70
Şekil 3.10: İdrar Örneklerinin Toplanma İş Akışı.	70
Şekil 3.11: Tükürük Örneklerinin Toplanma İş Akışı.	71
Şekil 3.12: Bronkoalveolar Lavaj Sıvısının Toplanma İş Akışı.	72
Şekil 3.13: Dışkı Örneklerinin Toplanma İş Akışı.	72
Şekil 3.14: Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları Ve Örnek Sayıları.	73
Şekil 3.15: Doku Örneklerinin Rnase-Free Ortam Koşulları Altında Sıvı Nitrojen İçerisinde Toz Haline Getirilmesi.	76
Şekil 3.16: Dondurulmuş Toz Formundaki Dokudan Ve Dondurulmuş Kandan Rna Eldesi.	77
Şekil 3.17: Dondurulmuş Toz Formundaki Dokudan Rna İzolasyon Aşamaları.	79
Şekil 3.18: Dondurulmuş Tam Kandan Rna İzolasyon Aşamaları.	80
Şekil 3.19: Kütüphanenin Miktar Tayininde Kullanılan Güvenirlik Eğrisi	90
Şekil 3.20: Hiseq 2500 Output Mode Ve Novaseq 6000 S1 Mode Flowcell.	91
Şekil 3.21: Hiseq 2500 Platformunda Okuma Derinliğinin Hesaplanması.	92
Şekil 3.22: Novaseq 6000 Platformunda Okuma Derinliğinin Hesaplanması.	93
Şekil 3.23: Cbot Cihazında Cluster Oluşumu.	94
Şekil 3.24: Kütüphanelerin Tek Bir Tüpte Birleştirilmesi (2nm Konsantrasyon).	95

Şekil 3.25: Hiseq V4 Sbs Kitleri İle Örneklerin 150x2 Pe Olarak Hiseq 2500 Platformunda Dizilenmesi.	96
Şekil 3.26: Sequencing Analysis Viewer Software (Sav) Dizileme Analizi Görüntüleyici.	97
Şekil 3.27: Phred Quality Score (Q Score) Ölçüm Monitörü.	98
Şekil 4.1: Sol Tarafta Bulunan Grafikler Tüm Hastalara Ait Demografik Bilgileri İçerirken, Sağ Tarafta Bulunan Grafikler Nihai Hastalara Ait Demografik Verileri İçermektedir.	100
Şekil 4.2: Sol Tarafta Bulunan Grafikler Tüm Hastalara Ait Histolojik Bilgileri İçerirken, Sağ Tarafta Bulunan Grafikler Nihai Hastalara Ait Histolojik Verileri İçermektedir.	101
Şekil 4.3: Lungbase Veri Tabanı Güncel Ana Sayfa Ekran Görüntüsü.	102
Şekil 4.4: 2t Ve 2r Dokusundan Elde Edilen Rna'nın Nanodrop İle Ölçümünün Ekran Görüntüsü.	115
Şekil 4.5: 2 Numaralı Hastaya Ait T, N, R, M Ve Tk Materyallerinden İzole Edilen Rna Örneklerinin Jel Görüntüsü.	116
Şekil 4.6: 90 Nolu Hastanın T,N,R,M Ve Tk Örneklerine Ait Bioanalyzer Jel Görüntüsü Ve Rın Değerleri.	117
Şekil 4.7: Kütüphane Hazırlığı Tamamlanan Hasta Doku Ve Kan Örneklerinden Rastgele Seçilen Örneklerden Elde Edilen Baz Uzunluklarının Bioanalyzer Jel Görüntüsü.	122
Şekil 4.8: Kütüphane Hazırlığı Tamamlanan Hasta Doku Ve Kan Örneklerinden Rastgele Seçilen Örneklerden Elde Edilen Baz Uzunluklarının Bioanalyzer Grafik Görüntüsü.	123
Şekil 4.9: Tümör Örneklerinin Ve Normal Örneklerin Okuma Skorlarının Monitörlenmesi.	129
Şekil 4.10: Skuamöz Hücre Karsinom Hastalarına Ait Transkriptom Verilerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalarına Ait Volkan Çizgeleri.	131
Şekil 4.11: Adenokarsinom Hastalarına Ait Transkriptom Verilerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalarına Ait Volkan Çizgeleri.	134
Şekil 4.12: Büyük Hücreli Karsinom Hastalarına Ait Transkriptom Verilerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalarına Ait Volkan Çizgeleri.	136
Şekil 4.13: Shk, Ak Ve Bhk Gruplarındaki Altıtipi Özgün Ve Özgün Olmayan Mirna'ların Venn Diyagramıyla Gösterimi.	139
Şekil 4.14: Shk, Ak Ve Bhk Kanlarında Ekspresyon Düzeyleri Değişen Mirna'ların Venn Diyagramıyla Gösterimi.	141
Şekil 4.15: Shk, Ak Ve Bhk Lenf Nodlarında Ekspresyon Düzeyleri Değişen Mirna'ların Venn Diyagramıyla Gösterimi.	143
Şekil 4.16: Skuamöz Hücreli Karsinom Hastalarına Ait Transkriptom Verilerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalarına Ait Volkan Çizgesi	144
Şekil 4.17: Adenokarsinom Hastalarına Ait Transkriptom Verilerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalarına Ait Volkan Çizgesi	146
Şekil 4.18: Shk İçin Tcga Datası Ve Çalışmaya Ait Mirna Datalarının Karşılaştırılması Sonucu Ekspresyon Düzeyleri Değişen Mirna'lar.	147
Şekil 4.19: Ak İçin Tcga Datası Ve Çalışmaya Ait Mirna Datalarının Karşılaştırılması Sonucu Ekspresyon Düzeyleri Değişen Mirna'lar.	148

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması.	11
Tablo 2.2: Akciğer Tümörlerinin 2021 Dünya Sağlık Örgütü (Who) Sınıflandırma Sistemi.	12
Tablo 2.3: Tnm 8. Baskı Göğüs Ct Görünümü İçin T Sınıflandırması.	15
Tablo 2.4: Tnm 8. Baskı Göğüs Ct Görünümü İçin N Sınıflandırması.	17
Tablo 2.5: Tnm 8. Baskı Göğüs Ct Görünümü İçin M Sınıflandırması.	17
Tablo 2.6: Khdak İçin Tümör Nod Metastaz (Tnm) Evrelemesi.	18
Tablo 2.7: Khdak İçin Derecelendirme.	20
Tablo 2.8: Akciğer Kanserinde Bulunan Yaygın Genetik Değişiklikler.	29
Tablo 2.9: Ncrna'ların Sınıflandırılması.	34
Tablo 2.10: Khdak'de En Yaygın Olan Mirna'ların Listesi Ve Biyolojik Deneylerde Karşılık Gelen Hedeflerinden Bazıları.	38
Tablo 2.11: Dizileme Platformları.	41
Tablo 3.1: Kullanılan Cihazlar.	52
Tablo 3.2: Kullanılan Kit, Enzim Ve Kimyasallar.	53
Tablo 3.3: Kullanılan Diğer Sarf Malzemeler.	55
Tablo 3.4: Kan Örneklerinin Toplanmasında Uygulanan Protokol.	68
Tablo 3.5: Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Histolojik Ve Evreleme Bilgisi.	73
Tablo 3.6: Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Örneklerinin Karakterizasyonundaki İş Akışı.	75
Tablo 3.7: 10x Mops İçin Gerekli Malzeme Miktarları.	82
Tablo 3.8: Her Rna Tüpü İçin Tüpe Eklenmesi Gereken Malzeme Miktarları.	82
Tablo 3.9: Rna-Seq Kütüphane Hazırlığındaki İş Akışı.	84
Tablo 4. 1: Hastalara Ait Bilgiler.	108
Tablo 4. 2: Tüm Hastaların 4 Tip Doku (T,N,R,M) Ve Tamkan (Tk) Örneklerinden Elde Edilen Rna'lara Ait Nanodrop, Qubit Ölçümleri Ve Rın Değerleri.	118
Tablo 4. 3: Kütüphane Örneklerinin Adaptör Ve Konsantrasyon Bilgileri.	124
Tablo 4. 4: Tümör Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	131
Tablo 4. 5: Kandaki Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	132
Tablo 4. 6: Metastaz Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	132
Tablo 4. 7: Reaktif Stromadaki Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi Değişen 2 Mirna.	133
Tablo 4. 8: Tümör Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	134
Tablo 4. 9: Kandaki Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	135

Tablo 4. 10: Metastaz Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	135
Tablo 4. 11: Reaktif Stromadaki Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi Değişen 2 Mirna.	136
Tablo 4. 12: Tümör Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	137
Tablo 4. 13: Kandaki Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	137
Tablo 4. 14: Metastaz Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	138
Tablo 4. 15: Shk'ye Özgü Tümör Dokusu Mirna'ları.	140
Tablo 4. 16: Ak'ye Özgü Tümör Dokusu Mirna'ları.	140
Tablo 4. 17: Bhk'ye Özgü Tümör Dokusu Mirna'ları.	141
Tablo 4. 18: Khdk'nin 3 Alt Tipinin Kanında Bulunan Ortak Mirna Paneli.	142
Tablo 4. 19: Tcga - Skuamöz Hücre Karsinom Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	145
Tablo 4. 20: Tcga - Adenokarsinom Dokularına Ait Ekspresyon Düzeyleri, Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri İle Karşılaştırıldığında, Ekspresyon Düzeyi En Çok Değişen 10 Mirna.	146

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Akciğer Kanseri en sık teşhis edilen malignitelerden biri olup, düşük seyreden 5 yıllık sağkalım oranlarıyla birlikte dünya çapında kansere bağlı tüm ölümlerin yaklaşık %20'sinden sorumludur [Cykowiak & Krajka-Kuźniak, 2022]. Histolojik olarak, bu malignite küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki gruba ayrılır. Tüm akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %85'ini KHDAK alt tipi oluşturmaktadır [Basumallik & Agarwal, 2022]. Akciğer kanseri için erken teşhis ve tedavide ilerlemeler olmasına rağmen Amerikan Kanser Topluluğu'nun 2012-2018 verilerine göre 5 yıllık sağkalım oranı, KHDAK için lokalizasyonu ve evresine göre değişkenlik gösterip halen lokalize kanser için 65% uzak metastaz için 9% civarındadır.

Onkolojide kanser tarama ve tanısında çeşitli görüntüleme teknikleri ve moleküler teknikler uygulanmaktadır. Kanser teşhisinde kullanılan görüntüleme teknikleri (ultrason, mamografi, MRI, CT, PET, magnetik rezonans spektroskopisi, vb.) günümüzde yeterli görülmemektedir [Farber & Illig, 2015]. Kanser yönetiminde moleküler temelli teknikler gittikçe artan bir sıklıkta klinikte kullanılmaktadır. Kalıtsal kanser hastaları için de yapılan testler artık hem risk altındaki kişilerin belirlenmesi, hem de sistemik tedavinin kişiselleştirilmesi için rutin olarak kullanılmaktadır. Burada kullanılan testler; PCR, tek gen analizi (Sanger dizileme, MLPA), çoklu gen panelleri (NGS), tüm ekzom dizileme, vb. Bununla birlikte, antikanser ilaçların seçimine yardımcı olan, bireysel ilaç hedeflerinin belirlenmesi veya spesifik tümör fenotiplerinin tanımlanmasını içeren bir dizi öngörücü testler de mevcuttur. Kötü huylu (malignant) tümörlerin izlenmesi, rezidüel tümör fragmanlarının moleküler tabanlı tespiti ile gerçekleştirilebilir. Buna ilave olarak sıvı biyopsinin gelecekte erken kanser teşhisi ve taraması için bir araç olarak hizmet edeceği tahmin edilmektedir. Mutasyon testi ve RNA analizindeki son gelişmeler ise primer bölgesi bilinmeyen kanserlerin teşhisi için yeni araçlar sunmaktadır [Sokolenko & Imyanitov, 2018].

Kanser hücreleri normal hücrelere göre çeşitli moleküler, genetik ve epigenetik anormalliklerin peş peşe birikimi ile birden fazla genin yapısında meydana gelen değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Aynı şekilde bu değişim değişik RNA'larda ekspresyon farklılıkları şeklinde de kendini gösterebilir. Dolaşımda bulunan ve small RNA sınıfında yer alan miRNA'lar, fiziksel veya patolojik koşullar altında kanser hastalarının biyolojik sıvılarında tanınabilen ve belirli koşullar altında onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak da işlev gören yapılar olduğu gösterilmiştir [K. Zhou et al., 2017]. Bugüne kadar yapılan sınırlı sayıdaki araştırmalarda hastalıktaki değişiklikler ya genom, ya da proteom düzeyinde ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonucu olarak hastalık ile ilişkilendirilen bazı moleküller tespit edilmesine rağmen bu farklılıklar özgünlük ve hassaslık açısından sınırlı kalmışlardır. Bu problemi çözebilmek ve hastalığa özgün bir moleküler profil ortaya çıkarabilmek için farklı yaklaşımlar gerekmektedir [Villalobos & Wistuba, 2017; Baran & Brzezińska-Lasota, 2021].

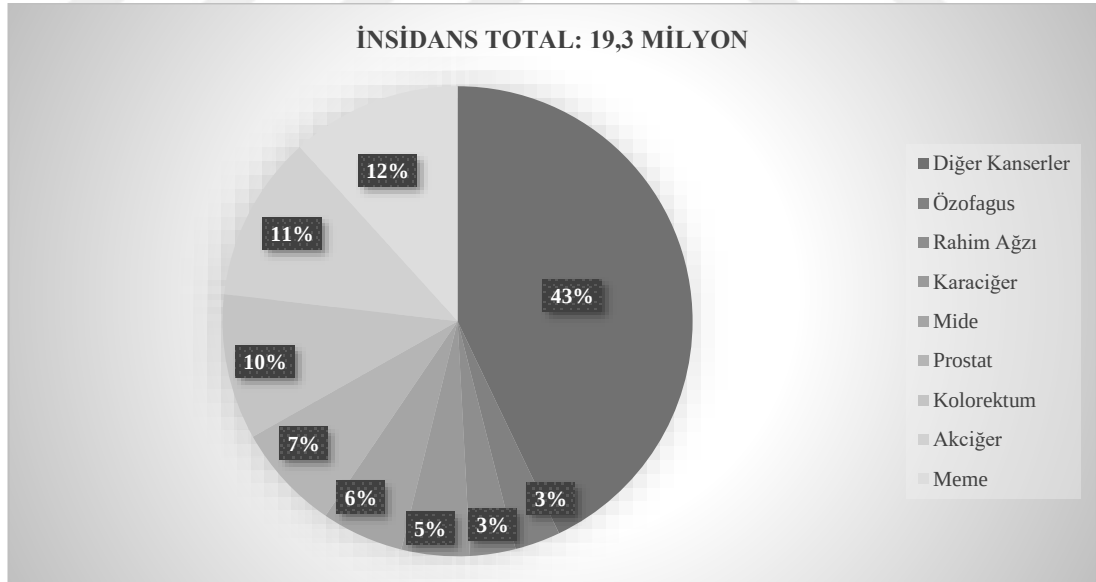
Günümüze kadar KHDAK oluşum ve gelişiminde rol oynayan birçok miRNA özetlenmiştir [Petrek & Yu, 2019; Zhong et al., 2021]. Moleküler hedefli tedavilerin geliştirilmesindeki önemli ilerlemelere rağmen, terapötik yanıtın ve tedaviye bağlı toksisitenin tahmini hala yetersiz kalmaktadır. Mevcut sınırlamaların üstesinden gelmek için miRNA'ların tespiti ve analizi için standartlaştırılmış yöntemlere ihtiyaç vardır [Zhong et al., 2021]. Sirkülayonda yer alan miRNA'lar, fiziksel veya patolojik koşullar altında biyolojik sıvılarda tanınabilen tipik bir miRNA alt grubudur ve karmaşık hastalıklar için biyobelirteç potansiyeline sahiptir [Florczuk et al., 2017].

Bu çalışma, yeni-nesil dizileme platformları ile en gelişmiş biyoinformatik algoritmaları birlikte uygulayarak heterojen bir profil gösteren ve son derece karmaşık bir hastalık olan KHDAK hastalarının tümör dokuları, tümörün etkilediği mikroçevre dokuları, metastatik dokular ve normal doku örneklerinin small RNA analizlerini yaparak hastalığa özgül miRNA'ların tespiti ve bunun vücut sıvısı olan kana yansıyan profilini ortaya koymaktadır. Ardından ortaya çıkarılan yeni miRNA profillerinin hastaların klinik bilgileri ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen veriler ile erken tanı, tarama ve izleme sistemleri için hastalığa en özgül hedef miRNA'ların tespit edilerek test geliştirilmesi sürecine önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

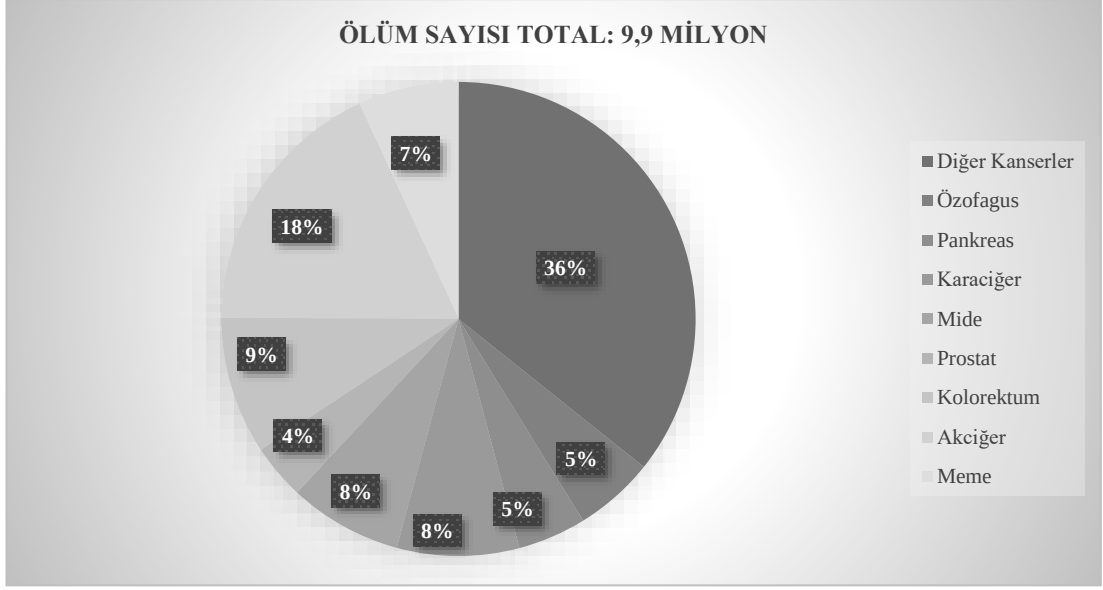
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Kanser günümüzün en önemli halk sağlığı sorunlarından biri olup en ölümcül hastalıkların başında gelir [Bray et al., 2021]. GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünya çapında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir (Şekil 2.1-2.2). Kanser vakalarının 10,1 milyonu erkeklerde, 9,2 milyonu kadınlarda tespit edilmiştir. [Sung et al., 2021;GLOBOCAN, 2020] Akciğer kanseri 2,2 milyon vaka (%11,4) ile en sık teşhis edilen ikinci kanser türü olup 1,8 milyon ölümle (%18) kanser ölümlerinin en önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir [GLOBOCAN, 2020]. Genel insidans nüfusa oranla gelişmiş ülkelerde gelişmemişlere göre kanser oranları açısından 2-3 kat daha yüksektir. Küresel çapta kanser sayısının 2020'ye göre 2040'da %47 artışla 28,4 milyon vaka olması beklenmektedir. Bu oranın gelişmiş ülkelerde %64'den %95'e ve gelişmekte olan ülkelerde %32'den %56'ya yükselmesi beklenmektedir [Sung et al., 2021].



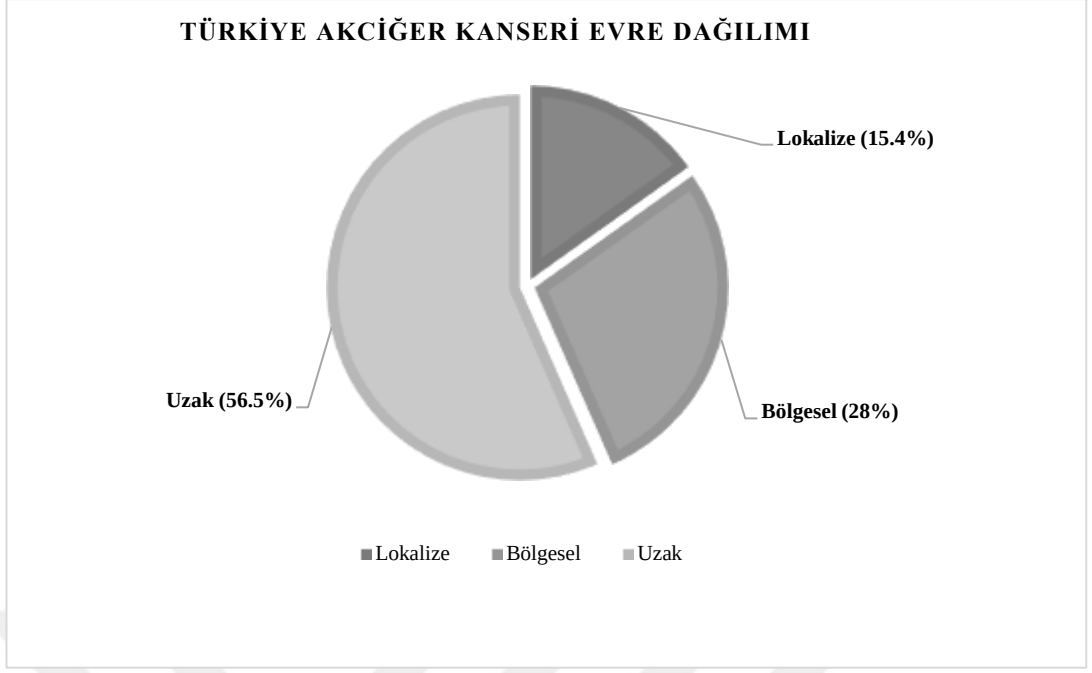
Şekil 2. 1: 2020 yılı verilerine göre dünya genelindeki kanser vakalarının sayısı [GLOBOCAN 2020].



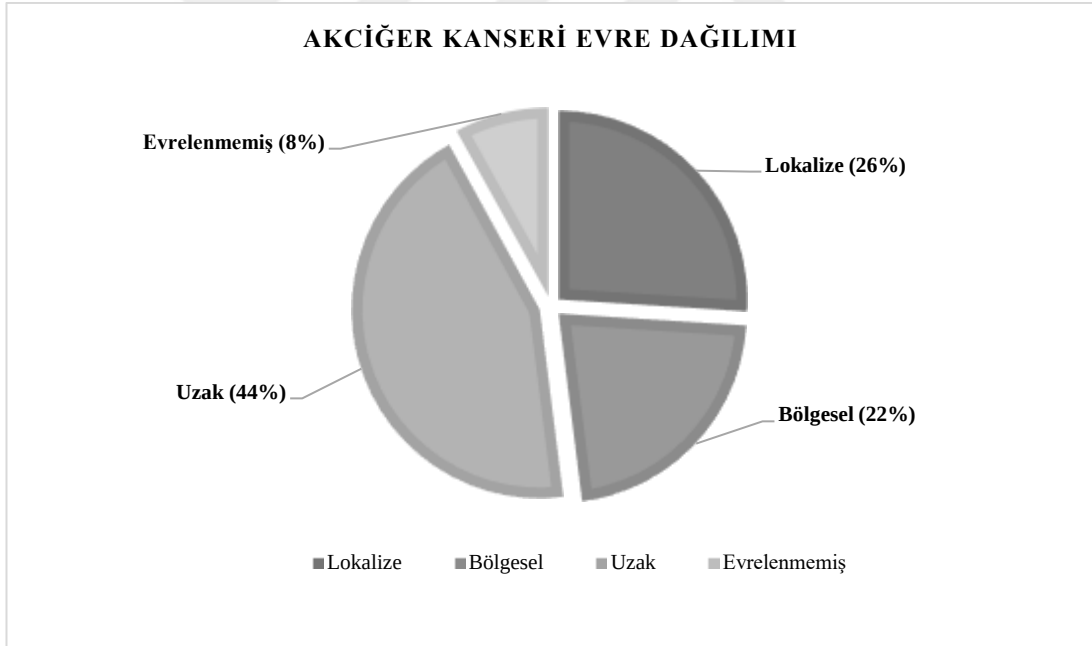
Şekil 2.2: 2020 yılı verilerine göre dünya genelindeki kanser ölümlerinin sayısı [GLOBOCAN 2020].

Türkiye’de de kanser sıklığı Dünya ve Dünya’nın geliştirmekte olan ülkeleriyle benzerlikler göstermektedir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan son verilere göre 2017 yılında görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş insidans oranı 100.000 kişide kadınlarda 187,0, erkeklerde ise 259,2 olarak bildirilmiştir. Toplamda bu rakam 100.000 kişide 223,1’dir. Son 5 yılın verileri incelendiğinde, erkek ve kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı görülmektedir [Türkyılmaz et al., 2021].

GLOBOCAN 2020 dünya verileri ile Türkiye 2017 kanser verileri karşılaştırıldığında, Türkiye kanser insidansının dünya insidansının üzerinde olduğu görülmektedir. Ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri iken kadınlarda meme kanseridir. Akciğer kanserinin erkeklerde sık görülmesinin tütün kullanımına bağlı olduğu tahmin edilmekte olup bu etken önemini korumaya devam etmektedir. Ayrıca akciğer kanserinde hastaların evreleri incelendiğinde %56,5’inin uzak metastaz yaptığı ve ileri evrede geç teşhis edilebildiği görülmektedir [Türkyılmaz et al., 2021] (Şekil 2.3). Amerika Kanser Derneği verilerine göre de uzak metastaz oranı %44 olarak belirtilmektedir (Şekil 2.4). Veriler kanserden ölümlerin büyük bir çoğunluğunun metastaz denilen kanserin bölgesel veya uzak dokulara yayılmasından dolayı meydana geldiğini göstermektedir [Fares et al., 2020].



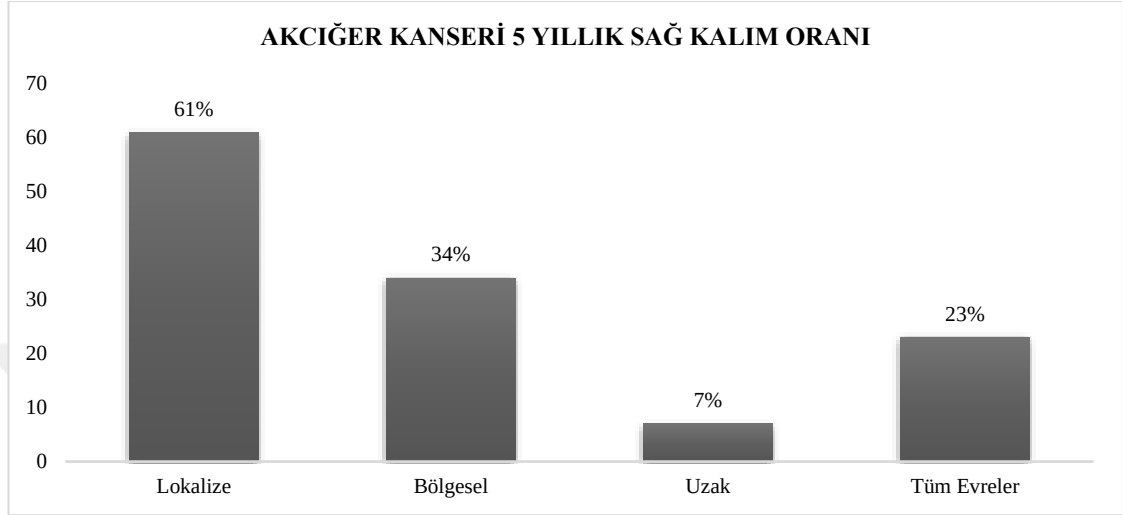
Şekil 2.3: Türkiye’deki Akciğer Kanseri Evrelerinin Yüzdesel Dağılımları [TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2017].



Şekil 2.4 : Akciğer Kanseri Evrelerinin Yüzdesel Dağılımları [CANCER STATISTICS, 2023].

Amerikan Kanser Derneği 2023 verilerine göre, akciğer kanserinin tüm evreleri için 3 yıllık sağkalım oranı, 2004-2006 için %22 iken 2016-2018 için bu oranın %33'e yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca bu oranın küçük hücreli dışı akciğer kanserinde %25'ten %38'e, küçük hücreli akciğer kanserinde de %9'dan %12'ye ulaştığı

belirtilmiştir [Siegel et al., 2023]. Amerikan Kanser Derneği 2012-2018 verilerini kullanarak akciğer kanseri 5 yıllık sağ kalım oranlarını evre bazında incelediğinde uzak dokulara metastaz yapan vakaların halen %7 olduğunu göstermektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Akciğer Kanseri 5 yıllık Sağ Kalım Oranı, 2012-2018 [CANCER STATISTICS, 2023].

2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

2.2.1. Sigara

Akciğer kanserinin etiyolojisi çok faktörlü olmasına rağmen, tütün kullanımı en önemli risk faktörü olmaya devam etmektedir. ABD'de akciğer kanseri insidans oranlarındaki azalmanın sigara içme prevalansındaki azalmayla ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Pasif içicilik olarak tanımlanan kişilerin sigara dumanına maruz kalması da önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir [“Approach to Lung Cancer,” 2016]. Sigara dumanı, gaz ve partikül bileşikleri içeren karmaşık bir aerosoldür ve ana akım dumanı ile yan akım dumanından oluşmaktadır. Ana akım dumanı, sigara içen kişinin etrafa nefesiyle verdiği dumandır ve sigara içen kişinin dumana maruziyetinin birincil kaynağıdır. Yan akım dumanı, sigara kendi kendine yanarken sigaranın kağıdından ve filtresinden çıkan dumandır ve çevresel tütün dumanının (ETS) ana kaynağıdır. Tütün bağımlılığının ana belirleyicisi nikotin maddesidir, katran ise

nikotin ve su uzaklaştırıldıktan sonra sigara dumanının toplam partikül maddesi olarak adlandırılır. Katrana kümülatif maruziyet, akciğer kanseri riskinin önemli bir unsurudur. Uzun süreli sigara içenlerde göreceli akciğer kanseri riskinin, ömür boyu sigara içmeyenlere kıyasla 10 ila 30 kat olduğu tahmin edilmektedir. Sigara içen her 6 kişiden biri sonunda akciğer kanserine yakalanmaktadır [Bade & Dela Cruz, 2020].

2.2.2. Hava Kirliliği, Mesleki ve Çevresel Karsinojenlere Maruziyet

Akciğer kanseri için diğer bir risk faktörü hava kirliliği, mesleki ve çevresel karsinojenlere maruziyettir. Hava kirliliği, iklim değişikliği ve hızlı sanayileşme nedeniyle dünya çapında birçok büyük nüfuslu şehirde ciddi bir küresel sorun haline gelmiştir. Epidemiyolojik araştırmalar, hava kirliliğinin, özellikle havadaki partikül madde (PM) maruziyetinin sigaradan bağımsız olarak artan akciğer kanseri riski ve ölümle ilişkili olduğunu göstermektedir [Jinghong Li et al., 2020]. Akciğer karsinojenleri olarak öne sürülen veya kanıtlanan mesleki maruziyetler arasında arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterler, krom, nikel, radon, silika ve vinil klorür bulunur. Dünya çapında erkekler arasında akciğer kanseri ölümlerinin %10'unun ve kadınlar arasında %5'inin asbest, arsenik, berilyum, kadmiyum, krom, nikel, silika ve dizel dumanları gibi mesleki ve çevresel karsinojenlere maruz kalmaya atfedilebileceği tahmin edilmektedir [Fingerhut et al., 2005].

2.2.3. Genetik Yatkınlık

Akciğer kanserinin patogenezinde genetik bileşenler de söz konusudur. Özellikle erken başlangıçlı akciğer kanseri olan aile üyeleri için ailede kanser öyküsünün önemi, çeşitli akciğer kanseri risk tahmin algoritmalarına dahil edilerek vurgulanmıştır [Bade & Dela Cruz, 2020]. Nadir BRCA2 ve CHEK2 varyantları ile skuamöz akciğer kanseri için genom çapında ilişkilendirme bir Avrupa kohortunda tanımlanmıştır [Manuscript, 2015]. Son 20 yılda akciğer kanserinde genetik yatkınlıkla ilgili 1000'den fazla aday gen ilişkilendirme çalışması yapılmıştır, ancak net bir fikir birliği yoktur. Bir çalışma, 21 genden 22 varyant için [APEX1 rs1130409 ve rs1760944, ATM rs664677, AXIN2 rs2240308, CHRNA3 rs6495309, CHRNA5 rs16969968, CLPTM1L rs402710, CXCR2 rs1126579, CYP1A1 rs4646903, CYP2E1 rs6413432, ERCC1 rs11615,

ERCC2 rs13181, FGFR4 rs351855, HYKK rs931794, MIR146A rs2910164, MIR196A2 rs11614913, OGG1 rs1052133, PON1 rs662, REV3L rs462779, SOD2 rs4880, TERT rs2736098, ve TP53 rs1042522] güçlü kümülatif epidemiyolojik kanıtlarla birlikte akciğer kanseri duyarlılığı ile önemli ilişki sergilediğini bildirmiştir [J. Wang et al., 2017]. Tümör baskılayıcı genler p53 ve p73 ve apoptoz genleri FAS ve FASL dahil olmak üzere hücre döngüsü ile ilgili birkaç gen akciğer kanseri duyarlılığında rol oynamaktadır [Bade & Dela Cruz, 2020]. Sonuç olarak akciğer kanseri duyarlılığı kısmen konakçı genetik faktörler tarafından belirlenmektedir.

2.2.4. Beslenme

Kırmızı et, süt ürünleri, doymuş yağlar ve lipitler gibi bazı diyet öğelerinin akciğer kanseri riskini artırdığı öne sürülmüştür [Gnagnarella et al., 2018]. Bununla birlikte, karotenoidler ve diğer antioksidanları içeren meyve ve sebzelerin akciğer kanseri riskini azalttığı varsayılmıştır [Vieira et al., 2016].

2.2.5. Yaş

Akciğer kanseri en çok 70 yaş ve üzerindeki kadın ve erkeklerde görülür. Akciğer kanseri tanısında ortalanca yaş 70'tir ve ölümden ortalanca yaş 72'dir. Genel olarak, akciğer kanseri mortalitesi yaklaşık 80 ila 85 yaşlarına kadar yaşla birlikte artmaktadır [Torre et al., 2016] [Siegel et al., 2019].

2.2.6. Fiziksel Aktivite

Son zamanlarda değiştirilebilir risk faktörleri arasında fiziksel aktivite eksikliği ve hareketsiz davranışlar da yer almaktadır [Rana et al., 2020].

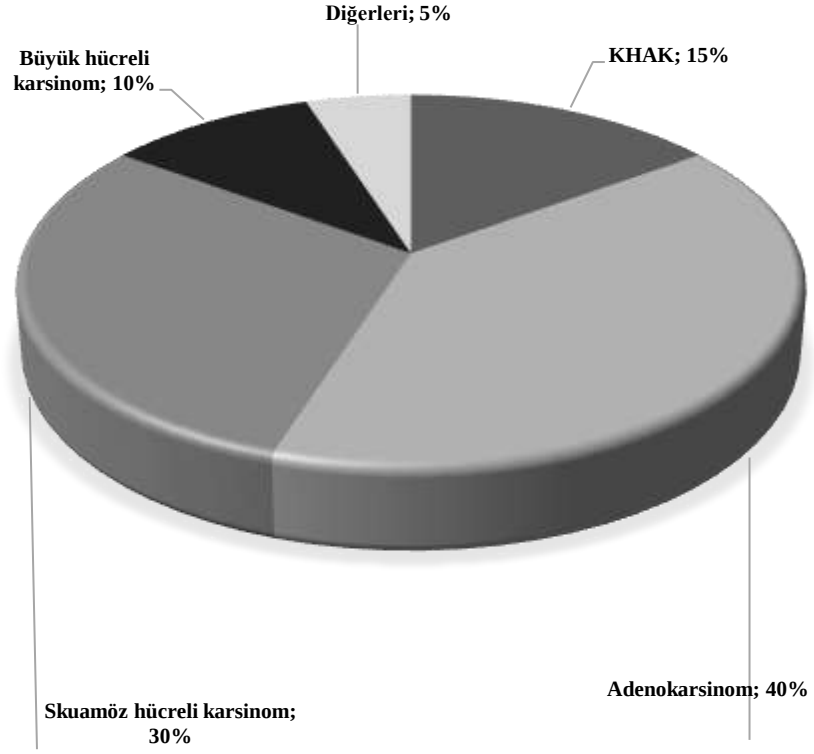
Yukarıda kısaca belirtilen risk faktörleri göz önünde bulundurularak akciğer kanserinin önlenmesi hususunda bilinen bu faktörlere maruz kalmanın önlenmesi veya azaltılmasına odaklanılmalıdır [Bade & Dela Cruz, 2020].

2.3. Akciğer Kanserin Patolojik Sınıflandırması

Akciğer kanseri, geniş kapsamlı klinikopatolojik özelliklere sahip heterojen bir hastalıktır [William D. Travis, 2015]. Akciğer kanserinin patolojik sınıflandırması, kanser hücrelerinin morfolojik özelliklerine, büyüme örüntülerine ve diğer özelliklere dayalı olarak yapılan bir sınıflandırmadır. Bu sınıflandırma, kanserin tipini ve özelliklerini belirlemek için kullanılır. Ayrıca, akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırması, bu kanserin teşhis ve yönetiminin önemli bir parçası olan hücresel ve moleküler alt tiplere dayanmaktadır. Büyük ölçüde morfoloji ile belirlenen primer akciğer kanserleri, histolojik olarak küçük hücreli akciğer kanserleri (KHAK) (toplam tanıların %15'i) ve küçük hücreli dışı akciğer kanserleri (KHDAK) (toplam tanıların %85'i) olarak sınıflandırılır [Thai et al., 2021] KHDAK ana histolojik alt tipler olarak adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomu içermektedir (şekil 2.6) [M. Tang et al., 2021] [Lim et al., 2018]. KHDAK sınıflandırmalarında, adenokarsinomlar akciğer kanserinin en yaygın alt tipidir ve bunu skuamöz hücreli karsinomlar takip eder [Thai et al., 2021].

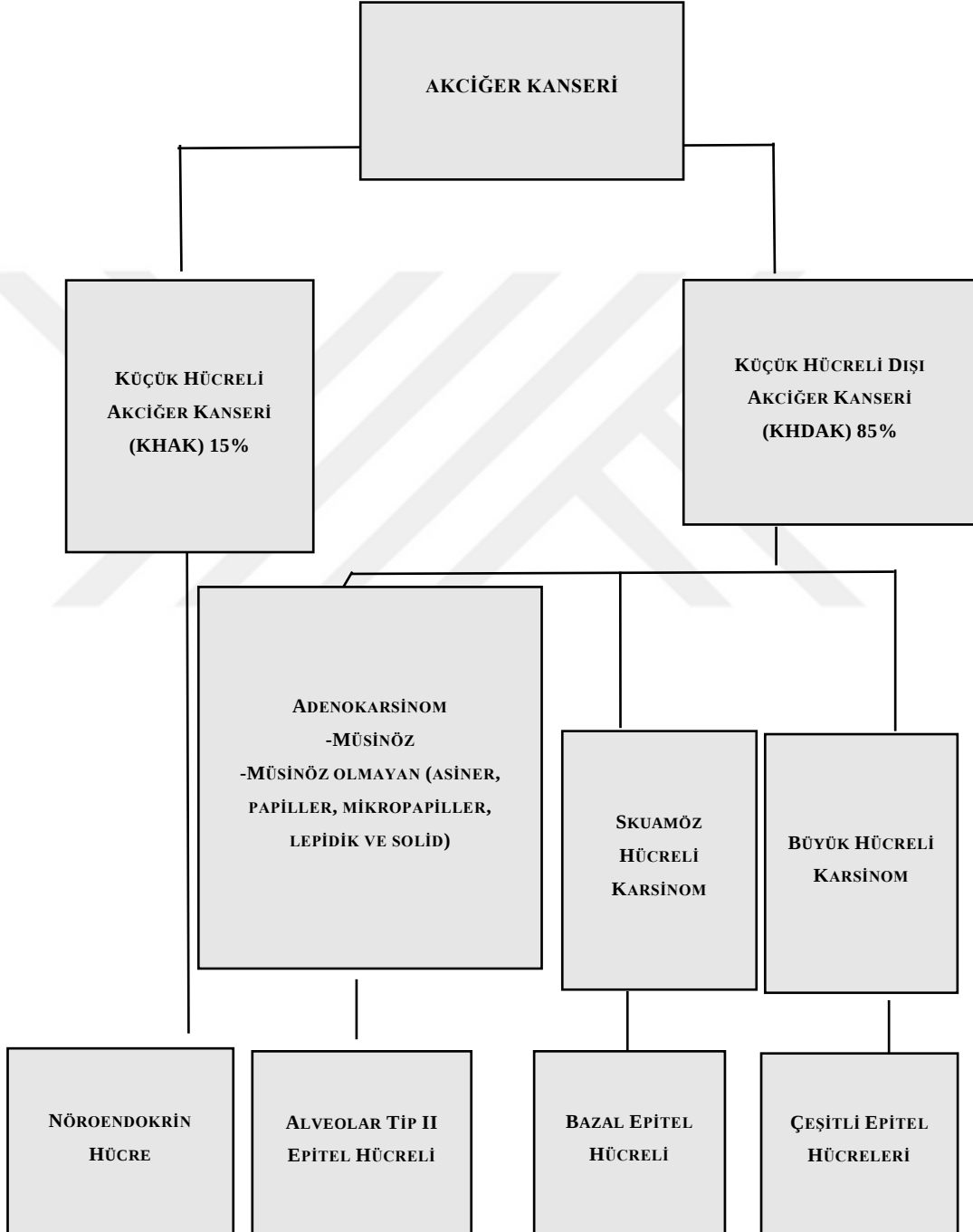
Akciğer kanserlerinin büyük çoğunluğu karsinomdur (epitel hücrelerinden köken alan tümör). Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının tek bir grupta toplanmasının nedeni, bu gruptaki karsinom tiplerinin prognozları ve tedavi yaklaşımlarının benzer olmasıdır. Buna rağmen biriken kanıtlar, akciğer kanserinin aynı histolojik alt tip içinde bile histolojik ve moleküler olarak heterojen bir hastalık grubunu temsil ettiğini göstermektedir [Inamura, 2017]. KHDAK hastalarının yaklaşık %25-30'u, en heterojen tümör grupları olarak temsil edilir ve rezektabilite (tümörün teknik olarak çıkarılabilme) kriterlerinin tanımlanması zordur ve bu nedenle cerrahinin kullanımı ve optimal tedaviler tartışma alanıdır [Pöttgen et al., 2017].

AKCİĞER KANSERİNİN PATOLOJİK SINIFLANDIRMASI



Şekil 2.6: Akciğer Kanseri KHDAK üç temel alt tipleri; skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom, ve KHAK için yüzdesel dağılım [Lukeman, 2015;Pass et al., 2018].

Tablo 2. 1: Akciğer kanserinin sınıflandırılması. Akciğer tümörleri iki ana gruba ayrılır: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK; vakaların $\approx$ %15'i) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK; vakaların $\approx$ %85'i). Bir KHAK tümörü, nöroendokrin hücre soyundan türer. Bununla birlikte, KHDAK'de, tümör orijin hücresi farklıdır ve üç farklı alt tipte sınıflandırılır: Adenokarsinom (alveolar tip II epitel hücreli), Skuamöz hücreli Karsinom (bazal epitel hücreli) ve Büyük Hücreli Karsinom (çeşitli epitel hücreleri) [Cykowiak & Krajka-Kuźniak, 2022].



Akciğer tümörlerinin 2021 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırma sistemi, akciğer kanserlerini Tablo 2.1'deki gibi ayırır [Siddiqui et al., 2022]. Bu sınıflandırma sistemi, tedaviyi daha iyi yönlendirmek ve prognostik bir seyir belirlemek için immünohistokimya ve ışık mikroskobu analizlerine dayanır. Tablo 2.2'de belirtilen histolojik sınıflandırmada sık görülen türlere detaylı olarak aşağıda değinilmektedir.

Tablo 2. 2: Akciğer tümörlerinin 2021 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırma sistemi [Siddiqui et al., 2022].

PREKÜRSÖR GLANDÜLER LEZYONLAR	ADENOKARSİNOMLAR	ADENOSKUAMÖZ KARSİNOMLAR
SKUAMÖZ PREKÜRSÖR LEZYONLAR	SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLAR	BÜYÜK HÜCRELİ KARSİNOMLAR
SARKOMATOİD KARSİNOMLAR	AKCİĞER NÖROENDOKRİN NEOPLAZMALARI	TÜKÜRÜK BEZİ TİPİ TÜMÖRLER
NÖROENDOKRİN TÜMÖRLER	NÖROENDOKRİN KARSİNOMLAR	DİĞER EPİTEL TÜMÖRLERİ

2.3.1 Adenokarsinomlar

Adenokarsinom, hücrelerin akciğerlerde mukus salgılayan bez hücrelerine benzediği küçük hücreli olmayan bir akciğer kanseri türüdür. Adenokarsinom patolojisi, neoplastik bez oluşumu, pnömosit marker ekspresyonu (tiroid transkripsiyon faktörü 1 (TTF-1), napsin ekspresyonu olan veya olmayan) veya intrasitoplazmik müsinden oluşur. Neoplastik bez oluşumunun boyutuna ve yapısına göre müsinoz veya müsinoz olmayan olarak iki başlık altında sınıflandırılır. Müsinoz olmayan tipleri; asiner,

papiller, mikropapiller, lepidik ve solid olarak adlandırılan alttiplerdir. Bu alt tiplerin patolojik olarak tanımlanması prognoz için önemlidir. Solid, mikropapiller ve kribriform (asiner müsinöz olmayan adenokarsinomun bir alt tipi) paternlerin olumsuz prognostik önemi vardır [Kadota et al., 2014;Siddiqui et al., 2022].

2.3.2 Skuamöz hücreli karsinomlar

Skuamöz hücre patolojisi, sitolojide keratin ve/veya hücreler arası desmozomların varlığı veya p40, p63, CK5, CK5/6 veya desmoglein ekspresyonunun immünohistokimyasal (IHC) kanıtı ile tanımlanır. Skuamöz hücreli karsinomun alt tipleri arasında nonkeratinize, keratinize ve bazaloid bulunur. Skuamöz hücreli karsinomlar, kavitasyonla sonuçlanan yaygın merkezi nekroz gösterir. Skuamöz hücreli kanserler, Pancoast tümörleri ve hiperkalsemi olarak ortaya çıkabilir. Bir Pancoast tümörü, akciğerin üst oluğundaki bir tümördür. Beyin, Pancoast tümörlerinde ameliyat sonrası en yaygın nüks bölgesidir [Siddiqui et al., 2022].

2.3.3 Büyük hücreli karsinomlar

Büyük hücreli karsinom (BHC), glandüler, skuamöz veya nöroendokrin kanserlerle uyumlu sitolojik özelliklere sahip olmayan malign bir epitelyal neoplazmdır. İmmünohistokimyada p40 ve TTF-1 ifade etmezler ve küçük hücreli karsinomun sitolojik özelliklerinden yoksundurlar. Tipik olarak BHC, belirgin nükleollere sahip yuvarlak ile çokgen hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler, herhangi bir tanımlayıcı özelliği olmayan bol miktarda sitoplazmadan oluşur. BHC bir dışlama teşhisidir [Rajdev et al., 2018].

2.3.4 Adenoskuamöz karsinomlar

Adenoskuamöz karsinomlar, %10'dan fazla glandüler ve skuamöz bileşen içeren akciğer tümörleridir. Bu, nadir görülen ve oldukça agresif bir akciğer tümörüdür [Filosso et al., 2011].

2.3.5 Sarkomatoid karsinomlar

Bunlar, malign epitel bileşenleri ve sarkomları düşündüren özellikler sergileyen nadir karsinomlardır. Alt tipler arasında pleomorfik karsinom, karsinosarkom ve pulmoner blastoma bulunur [Siddiqui et al., 2022].

2.3.6 Prekürsör glandüler lezyonlar

Bunlar arasında atipik adenomatöz hiperplazi (AAH) ve in situ adenokarsinom bulunur. AAH, akciğer adenokarsinomu için preinvaziv bir lezyondur ve genellikle 5 mm veya daha küçüktür. Adenokarsinom in situ müsinöz veya müsinöz olmayabilir ve genellikle 3 cm'ye eşit veya daha küçük lokalize bir lezyondur. Alveoler yapılar boyunca büyüme kısıtlı olarak tanımlanan "lepidik" bir büyüme modeli gösterir. Noninvazivdir ve bozulmamış alveolar septaları gösterir [Siddiqui et al., 2022].

2.3.7 Küçük Hücreli Karsinom

Küçük hücreli karsinom (KHAK), az miktarda sitoplazmaya ve kabaca dinlenme halindeki bir lenfosit büyüklüğünde yuvarlak, oval veya köşeli hücrelerden oluşur. Belirgin bir nükleol görülmez. KHAK'lar yaygın olarak nekrotiktir. Genellikle kromogranin veya sinaptofizin ile pozitif boyanırlar. DSÖ daha önce KHAK'yi üç hücre alt tipine ayırdı: yulaf hücresi, ara hücre ve kombine hücre (KHDAK bileşenli KHAK, skuamöz veya adenokarsinom). Ancak çalışmalar, bu sınıflandırmanın çok fazla klinik önemi veya prognostik değeri olmadığını göstermiştir [Aisner et al., 1990; Siddiqui et al., 2022].

2.4. Akciğer Kanserinde Evreleme Sistemi

Akciğer kanseri teşhisi konulduktan sonra, en önemli adım hastalığın evrelendirilmesidir çünkü durum tedavi seçeneklerini, morbiditeyi ve sağkalımı belirler. Bunun dikkatli bir şekilde yapılması çok önemlidir. Evreleme öncelikle KHDAK için TNM sınıflandırması kullanılarak yapılır. Tümör (T), nod (N) ve metastaz (M), KHDAK'yi evrelemenin uluslararası kabul görmüş yoludur. Klinisyenlerin en iyi tedaviyi uygulamasına, gereksiz ameliyatlardan kaçınmasına ve

tedavi bir seçenek değilse zamanında palyatif bakıma sevk etmesine yardımcı olan, tümörün boyutunu ve kapsamını, yerini ve uzak yayılımını tanımlamada kullanılmaktadır [Siddiqui et al., 2022]. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği (IASLC) ve Amerikan Kanseri Komitesi (AJCC) tarafından akciğer kanserini evrelemek için onaylanan tümör, nod, metastaz (TNM) evreleme sistemi yakın zamanda revize edilmiş ve en son revizyon, Ocak 2017'de yayınlanan 8. baskıdır. TNM akciğer evreleme sisteminin 8. baskısı, her bir TNM tanımlayıcısının prognostik analizine dayalı olarak bize daha kesin sınıflandırma sağlasa da, görüntüleme yoluyla klinik evreleme açısından henüz netleştirilmemiş bazı potansiyel sınırlamalar ve klinik durumlar vardır. Akciğer kanserinin klinik evresini tam olarak sınıflandırmak için radyologların TNM evrelemesinin 8. baskısında tanıtilen ana değişiklikleri anlamaları ve görüntüleme yorumunun olası tuzaklarını ve sınırlamalarını tanımları önemlidir [Feng & Yang, 2019].

2.4.1. KHDAK'de TNM Evreleme Sistemi

T (tümör) tanımlayıcısı

Yeni 8. TNM evreleme sisteminin T tanımlayıcısı, tümör boyutu, tümör invazyonu ve primer tümöre göre ayrı bir tümörün konumundan oluşur. 8. baskı için, tümör boyutu 1 cm'lik artışlarla daha kesin olarak sınıflandırılmıştır, metastazı olmayan küçük hücreli dışı akciğer tümörü boyutları olduğu bilinen toplam 33115 hasta üzerinde doğrulanmış prognostik farklılaşmaya dayalıdır (Rami-Porta et al., 2015). Bir primer tümör beş kategoriye ayrılır ve daha sonra her bir kategori, tümörün çevredeki yapıların boyutuna, konumuna ve istilasına bağlı olarak alt bölümlere ayrılır (Tablo 2.3) [Eberhardt et al., 2015; Siddiqui et al., 2022].

Tablo 2. 3: TNM 8. baskı göğüs CT görünümü için T sınıflandırması.

T Sınıflandırması	CT'de T Bileşeni
T0	• Primer tümör yok • T Karsinom in situ (CIS)

Tablo 2. 3: TNM 8. baskı göğüs CT görünümü için T sınıflandırması (devamı).

T1 (3 cm'den az)	• T1mi: minimal invaziv tümör • T1a: merkezi hava yollarıyla (trakeal veya bronş duvarı) sınırlı yüzeysel tümör • T1a: 1 cm'den az • T1b: 1 cm'den büyük ancak 2 cm'den küçük • T1C: 2 cm'den büyük ancak 3 cm'den küçük
T2	• T2: 3 cm'den büyük ama 5 cm'den küçük • T2a: 3 cm'den büyük ancak 4 cm'den küçük • T2b: 4 cm'den büyük ama 5 cm'den küçük • Ayrıca ana bronşu tutuyor fakat karina, visseral plevrayı tutmuyorsa veya hilumda atelektaziye neden oluyorsa T2 tümörü olarak kabul edilir
T3	• T3: 5 cm'den büyük 7 cm'den küçük) • T3 Inv: göğüs duvarı, perikard veya frenik sinirin invazyonu • T3 Satel: aynı lobda ayrı tümör nodülleri • Aynı lobda perikard, frenik sinir, göğüs duvarı veya ayrı tümör nodüllerini içeriyorsa T3 tümörü olarak da kabul edilir
T4	• T4: 7 cm'den büyük • T4inv: Yukarıdaki yapıları istila etme • T4Ipsi düğümü: İpsilateral lobda nodüller • Kalp, özofagus, trakea, karina, mediasten, büyük damarlar, rekürren laringeal sinir, omurga veya farklı ipsilateral lobda tümör nodüllerini tutuyorsa T4 tümörü olarak kabul edilir. • Diyafram invazyonu, TNM sınıflandırmasının yedinci baskısında T3 tümörü ile karşılaştırıldığında artık bir T4 tümörü olarak kabul edilmektedir.

N (lenf nodu) tanımlayıcısı

7. baskının N tanımlayıcı sınıflandırması, 8. baskı için aynı kaldı çünkü çalışmalar, sınıflandırmanın prognozla açıkça ayrıldığını buldu [Asamura et al., 2015]. Metastatik düğüm sınıflandırması, diğer kanser evrelemesinde sıklıkla kullanılan metastatik düğümlerin sayısı yerine ilgili lenf düğümlerinin yapısal yerleşimine dayanır. N tanımlayıcıları, metastatik düğümlerin konumuna göre dört ana kategoride sınıflandırılır (Tablo 2.4) [Feng & Yang, 2019; Bugalho et al., 2017].

Tablo 2. 4: TNM 8. baskı göğüs CT görünümü için N sınıflandırması.

N Sınıflandırması	CT’de N Bileşeni
N0	• Lenf nodu tutulumu yok
N1	• N1: İpsilateral hiler düğümlerin tutulumu • N1a: tek istasyonlu N1 düğümleri • N1b: çok istasyonlu N1 düğümleri
N2	• N2: Mediastinal nodların tutulumu • N2a1: N1 tutulumu olmayan tek istasyonlu N2 nodları (metastazı atlar) • N2a2: N1 tutulumu olan tek istasyonlu N2 nodları • N2b: Çoklu istasyon N2 katılımı
N3	• N3: Kontralateral mediastinal veya hiler lenf nodlarının tutulumu

M (Metastaz) tanımlayıcısı

7. baskı M tanımlayıcı sınıflandırmasının prognozu analiz edildi ve M1a intratorasik metastaz tanımlayıcıları için anlamlı bir fark bulunmadı. Bununla birlikte, 7. baskıda M1b olarak sınıflandırılan ekstratorasik metastazda tek bir organda tek bir metastazı olanlar için, bir organda birden çok metastatik lezyonu veya birden çok organda birden çok metastazı olanlardan önemli ölçüde daha üstün bir prognozu olduğu görüldü. Böylece, 8. baskı ekstratorasik metastazları yukarıdaki iki gruba dayalı olarak M1b ve M1c olarak ayırır (Tablo 2.5) [El-Sherief et al., 2014; Feng & Yang, 2019].

Tablo 2. 5: TNM 8. baskı göğüs CT görünümü için M sınıflandırması.

M Sınıflandırması	CT’de M Bileşeni
M0	Uzak metastaz yok
M1	M1a: Malign plevral / perikardiyal efüzyon veya nodüller M1b: Tek bir organda tek ekstratorasik metastaz M1c: Çoklu ekstratorasik metastaz

2.4.2. KHDAK'de Klinik Evreleme Sistemi

Akciğer kanserinde kullanılan I'den V'e kadar olan evreleme sistemi, kanserin yayılma derecesini ve ilerlemesini belirlemek için kullanılır. Bu sistem genellikle TNM sınıflandırma sistemi ile ilişkilendirilir ve kanserin evresini belirlerken çeşitli faktörleri dikkate alır. İşte akciğer kanserinde kullanılan I-V evreleme sistemi: T ve M tanımlayıcılarındaki değişiklikler nedeniyle, 8. baskı için mevcut aşama grupları yeniden oluşturulmuştur. Aşama IA, sırasıyla N0 ve M0 kategorileriyle ilişkilendirildiğinde T1a, T1b ve T1c'yi barındırmak üzere IA1, IA2 ve IA3'e bölünür [Goldstraw et al., 2016]. T2a ve T2b kategorilerine sahip N0M0 tümörler artık sırasıyla evre IB ve IIA olarak sınıflandırılırlar. Tüm T1-2N1M0 tümörleri, T3N0M0 ile birlikte evre IIB kategorisine eklendi [Rami-Porta et al., 2017]. T1-2N2M0 tümörleri ve T3-4N1M0 dahil olmak üzere metastazı olmayan diğer lokal olarak ilerlemiş tümörler için evre IIIA kabul edilir. Karşılaştırıldığında, T1-2N3M0 tümörleri ve T3-4N2M0 tümörleri, evre IIIB olarak sınıflandırılır. IVA tümörleriyle benzer prognozlara sahip olduklarından, N3 hastalığı ile ilişkili ancak metastatik lezyonları olmayan en lokal ileri lezyonlar olan T3 ve T4 için yeni bir evre grubu olan IIIC verilir [Carter et al., 2016]. Son olarak, metastazlı ilerlemiş hastalığı temsil eden evre IV, artık metastazın yeri ve yaygınlığına göre grup IVA ve IVB'ye ayrılmıştır. M tanımlayıcısı M1a veya M1b olan akciğer tümörleri, T veya N sınıflandırmasına bakılmaksızın evre IVA olarak sınıflandırılır. M1c olarak sınıflandırılan çoklu uzak metastazlı vakalar artık IVB olarak evrelendirilmektedir [Goldstraw et al., 2016]. Evrelemede yukarıda tanımlanan değişiklikler Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

Tablo 2. 6: KHDAK için Tümör Nod Metastaz (TNM) Evrelemesi.

	Klinik Evreleme	Patolojik Evreleme
Gizli (Occult) Kanser*		TX N0 M0
Aşama (Stage) 0		T is N 0 M 0
Aşama (Stage) I	IA1	T1mi N 0 M 0 T1a N 0 M 0
	IA2	T1b N 0 M 0
	IA3	T1c N 0 M 0

Tablo 2. 6: KHDAAK için Tümör Nod Metastaz (TNM) Evrelemesi (devamı).

	IB	T2a N 0 M 0
Aşama (Stage) II	IIA	T2b N 0 M 0
	IIB	T1a / T1b / T1c N 1 M 0
		T2a / T2b N 1 M 0
		T3 N 0 M 0
Aşama (Stage) III	IIIA	T1a / T2b / T2c N 2 M 0
		T2a / T2b N2 M 0
		T3 N 1 M 0
		T4 N 0 / N 1 M0
	IIIB	T1a / T1b / T1c N 3 M 0
		T2a / T2b N 3 M0
		T3 N 2 M 0
		T4 N 2 M 0
	IIIC	T3 N 3 M 0
		T4 N 3 M 0
Aşama (Stage) IV	IVA	Any T / Any N M1a veya M1b
	IV B	Any T / Any N M1c

*Gizli (Occult) Kanseri : Primer kanser bulunamadı; lenf nodu veya uzak metastaz yok.

2.4.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) için Evreleme

KHAK evrelemesi TNM sistemi kullanılarak yapılabilir, ancak KHAK sistemik bir hastalık olarak kabul edildiğinden, 1950'lerden beri daha basit bir sınıflandırma kullanılmaktadır. TNM derecelendirmesinin KHAK'yi daha iyi tanımlayabileceğine dair artan sayıda kanıt vardır, ancak bu yaklaşım konusunda henüz bir fikir birliği yoktur. KHAK, Veterans Affairs Lung Study Group (VALSG) sınıflandırmasına göre LS (limited stage)-KHAK ve ES (extensive stage)-KHAK olarak sınıflandırılır. LS-KHAK ipsilateral hemitoraks ve lokal lenf nodlarıyla sınırlıdır, hem mediastinal hem de hiler ve supraklaviküler nodlar tek bir tolere edilebilir radyoterapi portuna dahil edilebilir (TNM evre I ila IIIB'ye karşılık gelir). ES-KHAK, uzak metastazlar, malign perikardiyal veya plevral efüzyonlar, kontralateral supraklaviküler ve kontralateral hiler tutulum gibi hastalık sınırlarının ötesinde tümörlere sahiptir [Lindeman et al., 2018; Siddiqui et al., 2022].

2.5 Akciğer Kanseri için Derecelendirme

Akciğer kanserinde derecelendirme, kanser hücrelerinin görünümünün ve özelliklerinin incelenerek tümörün ne kadar agresif veya yayılma eğilimli olduğunu değerlendiren bir sınıflandırma sistemidir. Derecelendirme, nükleer ve sitoloji özellikleri ve mitotik sayımlarla bağlantılı olarak tümör büyümesinin bir modeline veya modellerine (tübüler oluşumdaki farklılaşma derecesi) dayanır. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında hücrelerin nasıl görüldüğüne ve davrandığına bağlı olarak tümöre bir derece (farklılaşma) atanır. Bu, kanserin ne kadar hızlı büyüdüğü ve yayılıp yayılmayacağı hakkında bir fikir verir. İki ana akciğer kanseri türlerinden olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri için derecelendirme kullanılırken küçük hücreli akciğer kanseri için kullanılmaz. Tablo 2.7, KHDAK için dereceleri göstermektedir (Travis et al., 2016).

Tablo 2. 7: KHDAK için Derecelendirme.

Derece	Tanım
1. derece	Hücreler normal hücrelere çok benziyor. Yavaş büyüme eğilimindedirler ve yüksek dereceli kanser hücrelerine göre yayılma olasılıkları daha düşüktür. Düşük dereceli denir.
2. derece	Hücreler daha anormal görünür ve yayılma olasılığı daha yüksektir. Bu derece aynı zamanda orta derecede iyi diferansiye veya orta derece olarak da adlandırılır.
3. derece	Hücreler çok anormal görünüyor ve normal hücrelere benzemiyor. Hızlı büyüme eğilimindedirler ve yayılma olasılıkları daha yüksektir. Kötü diferansiye veya yüksek dereceli olarak adlandırılırlar.

2.6 Akciğer Kanseri Patogenezi ve Moleküler Değişiklikler

2.6.1. Kanser Hücresinin Temel Özellikleri

Bilim insanları hücrenin kanser hücresi olarak tanımlanması için birleşerek bir takım temel özellikler tanımlamıştır. Kanserleşmenin 6 temel özelliği olan ve ilk olarak 2000

yılında yayınlanan “Hallmarks of Cancer Cells” daha sonra 2011 yılında 4 yeni özellikle güncellenmiştir. En son 2022 yılında 4 yeni özellik eklenerek nihai olarak kanserin 14 temel özelliği aşağıda belirtildiği gibi tanımlanmıştır [Hanahan, 2022].

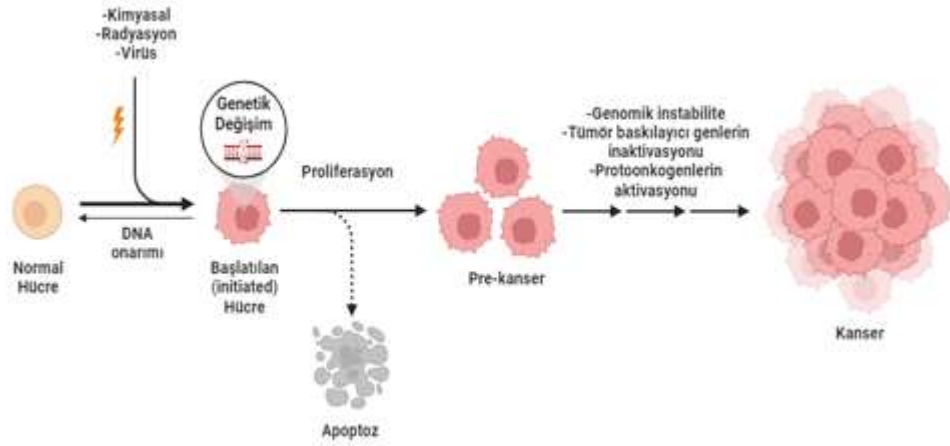
- Kanser hücresi kendi çoğalma sinyallerini kendisi oluşturur (otokrin stimülasyon)
- Büyümeyi baskılayan sinyallere karşı duyarsızdır
- Sınırsız çoğalma potansiyeli vardır
- Programlanmış hücre ölümüne karşı direnç geliştirme
- Doku invazyonu ve metastaz yapar
- Kendisine yeni damar oluşturur (anjyogenez)
- Enerji metabolizmasının yeniden programlanması
- Bağışıklık sisteminden kaçma
- Kanser kronik enflamasyonun eşlik ettiği bir mikroçevrede gelişir
- Genomik kararsızlık ve biriken mutasyonlar
- Fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma
- Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama
- Mikrobiyom
- Yaşlanmış hücreler

2.6.2. Akciğer Kanseri Karsinogenezi

Akciğer kanseri karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Bu kanser çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin gelişimini, özellikle büyümeyi teşvik eden (onkogenlerin) yolların aktivasyonu ve tümör baskılayıcı (tümör baskılayıcı genler) yolların inhibisyonunu içeren çok adımlı bir süreçle gelişir. Akciğer kanserinin moleküler patogenezinde yer alan çoklu biyokimyasal yolların iyi anlaşılması, moleküler sapmaları ve bunların aşağı akışta aktive olan yollarını hedef alabilen tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için çok önemlidir [Larsen & Minna, 2011].

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenen sinyal yolları karsinogeneizde yer alan yollar arasındaki sinyalleşme ile birbirine bağlıdır. Karsinogenez kavramsal olarak dört aşamaya ayrılabilir: tümörün inisiyasyonu (tumor initiation), promosyon (tumor promotion), habis dönüşüm (malignant conversion) ve

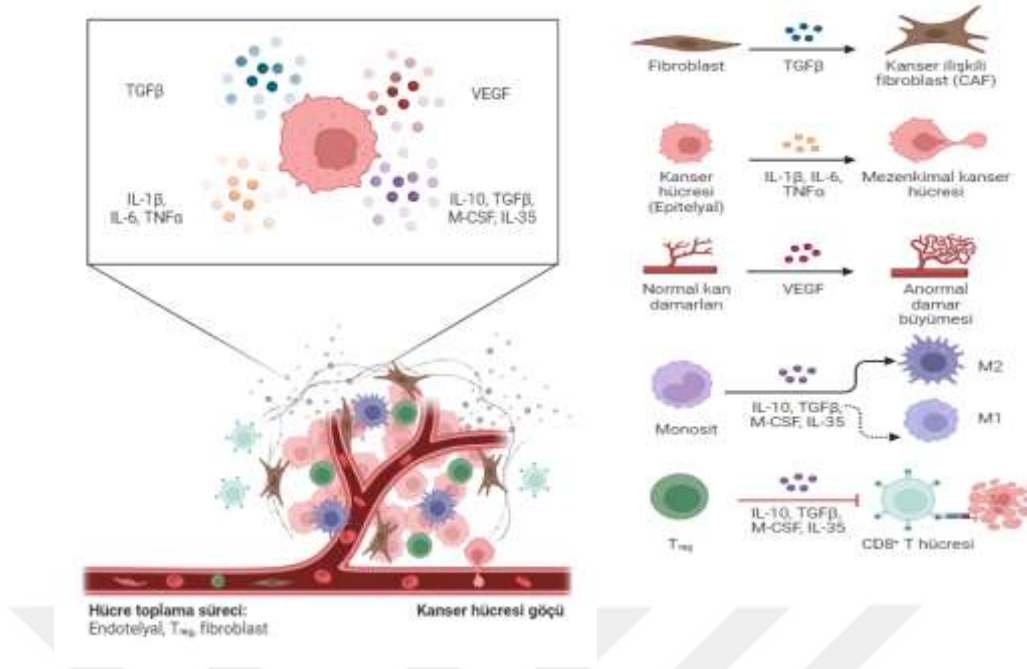
progresyonu (tumor progression) (Şekil 2.7). Karsinogenez, iyi huylu hiperplastik hücrelerin kötü huylu bir duruma dönüşmesini gerektirir ve sonuç olarak gerçekleşen invazyon ve metastaz, ileri genetik ve epigenetik değişikliklerin belirtileridir [Cairns, 1975; Jones & Baylin, 2002].



Şekil 2. 7: Çok basamaklı kimyasal karsinogenez. Kavramsal olarak dört aşamaya ayrılır: tümörün inisiyasyonu, promosyonu, habis dönüşüm ve tümörün progresyonu. Protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, kimyasal maruziyetlerin neden olduğu DNA'daki kovalent hasardan kaynaklanan mutasyon olaylarıdır. Mutasyonların birikmesi çok aşamalı karsinogenezi oluşturmaktadır [Holland-Frei Cancer Medicine, 6th Edition].

2.6.3. Akciğer Kanseri Tümör Mikroçevresi (TME)

Kanser mekanizmalarına ilişkin daha derin araştırmalar ve kanser gelişimi ile habis dönüşümün tam olarak anlaşılmasıyla, kanserin temel özellikleri entegre bir bilim haline gelmektedir [Hanahan, 2022]. Başka bir deyişle, tümör oluşumunun altında yatan ilerleme ve kanser gelişiminin kaderi, "tümör mikroçevresinin" kontrolünde olmaktadır. Tümör mikro ortamı yalnızca kanser hücrelerini ve hali hazırda değiştirilmiş hücresel yapıları içermez, aynı zamanda tümör mikro ortamının işlevini sürdürmek için normal hücreleri toplama ve sitokinleri salma yeteneğine de sahiptir. Tümör mikroçevresinde yer alan bileşenler kanser hücrelerinin yanı sıra lenfositler, sitokinler, extrasellüler matrix, miyeloid hücreler, fibroblastlar ve kanser assosiyе fibroblastlardır (Şekil 2.8) [Wanlu Zhang et al., 2022 ;Malkani & Rashid, 2021].



Şekil 2. 8: Tümör mikroçevresindeki ana bileşenler ve ilişkili hücreler [Wanlu Zhang et al., 2022].

Akciğer kanserinin gelişiminde görev alan bu tümör mikroçevresi (TME) bileşenleri, tümör büyümesini destekler, sinyaller salgılar ve tümör hücrelerinin proliferasyonunu, büyümesini, göçünü, invazyonunu ve stabilizasyonunu kolaylaştıran basamakları başlatır. Ayrıca bağışıklık tepkilerini bastırırlar ve ilaç direnci sağlarlar [Malkani & Rashid, 2021].

Normal akciğerin anatomik ve hücresel özellikleri, yabancı patojenlere ve partiküllere karşı koruyucu bir bariyer görevi göstermektedir. Bununla birlikte, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi inflamatuvar durumlarda, akciğer mikroçevresi karsinogenezi destekleyebilecek özellikler gösterir [Houghton, 2013]. İnsan akciğer adenokarsinomları, belirgin hücresel ve mutasyonel heterojeniteye sahiptirler [Z. Chen et al., 2014]. Daha da önemlisi, bu heterojenite sadece tümör epitel hücreleri ile sınırlı değildir, aynı zamanda vaskülatürü, kanserle ilişkili fibroblastları (CAF'ler), hücre dışı matrisi (ECM) ve sızan bağışıklık hücrelerini içeren TME'yi de kapsar [Altorki et al., 2019]. Akciğer TME'sinde, kötü huylu kanser hücreleri, stromal hücrelere sızan tümörü yeniden programlayabilir, bu da karsinogeneze katkıda bulunur [Hanahan & Coussens, 2012; Quail & Joyce, 2013].

inhibe etmektedir. Nötrofiller, sitokinlerin (interleukin-1 β (IL-1 β) ve IL-6) salgılanması yoluyla tümörün ilerlemesini etkiledikleri için akciğer TME'sinde önemli rol üstlenmektedirler. Tümörler, gelişmiş glikosilasyon son ürünü (sRAGE) için çözünebilir reseptör salgılar; bu reseptör, tümöre sızan sialik asit bağlayıcı immünoglobülin benzeri lektin F (SiglecF) nötrofilleri üretmek için kemik iliğindeki osteoblastları sistemik olarak aktive eder, böylece anjiyogenezi, miyeloid hücre farklılaşmasını, T hücresi baskılanmasını ve tümör hücresi proliferasyonunu artırarak tümör büyümesini teşvik eder. Endotel hücreleri, anjiyogenezi indüklemek için tümör hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) yanıt verir. Anjiyogenezi desteklemeye ek olarak, TAM'ler ayrıca IL-6, COX2, matris metaloproteinaz 9 (MMP9) ve MMP14 dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin salgılanması yoluyla invazyon ve metastazı teşvik etmek için başka yolları da aktive etmektedir. NK hücreleri ayrıca, anjiyogenezi indüklemenin yanı sıra, NK reseptörlerinin aşağı regülasyonu, degranülasyon potansiyelinin kaybı ve azalmış interferon- γ (IFN γ) ekspresyonu ile karakterize edilen işlevsiz fenotiplere maruz kalarak immün baskılamaya aracılık eder. Üçüncül lenfoid yapılarıdaki (TLS) B hücreleri, tümöre özgü antikorlar üretebilir veya Treg hücrelerini indükleyen işlevsiz bir duruma geçer (Şekil 2.9) [Altorki et al., 2019].

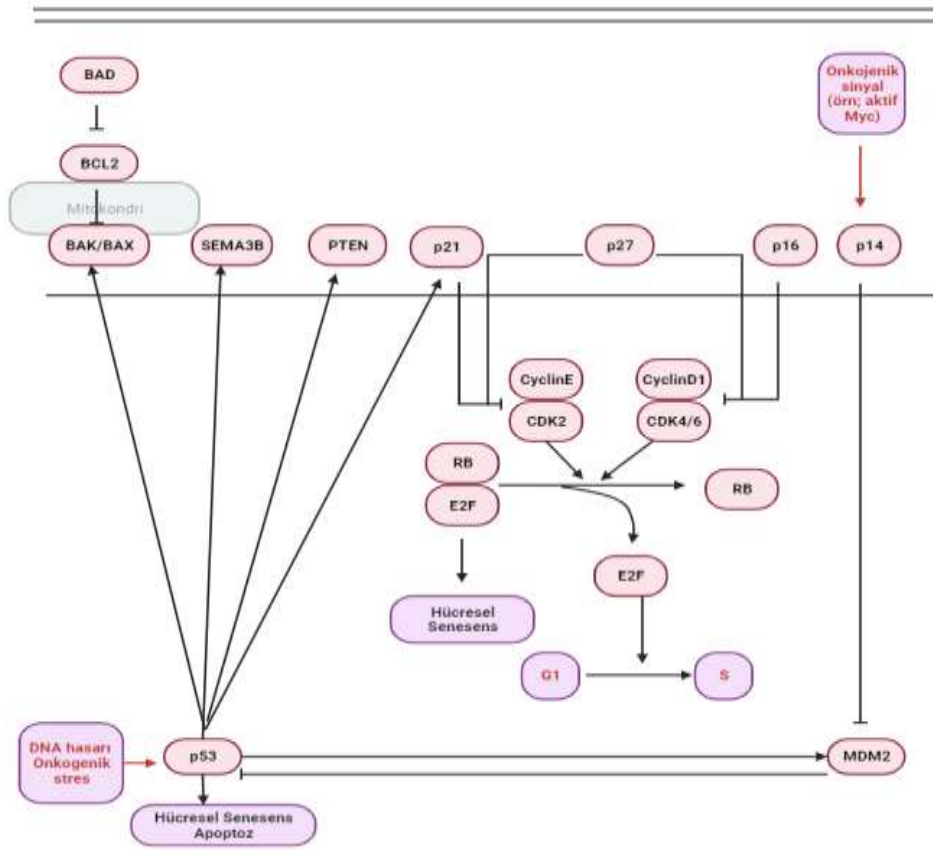
2.6.4. Akciğer Kanseri Önemli Bazı Sinyal Yolları

Akciğer kanserinde epidermal büyüme faktörü reseptör sinyali Tirozin kinaz reseptörlerinin ErbB ailesi (EGFR, ErbB-2 (HER2), ErbB-3 ve ErbB-4), homo- ve heterodimerler oluşturma ve reseptör aktivasyonuna yol açan farklı ligandları bağlama yeteneğine sahip dört üye içerir [Normanno et al., 2005]. EGFR, KHDAK'lerin %50-90'ında aşırı ekspresyon veya anormal aktivasyon sergiler; bu nedenle, bu molekül için hedeflenen inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik çok çalışma sarf edilmiştir [Hirsch et al., 2003]. Mutant EGFR'ler (ekson 19 delesyonu veya ekson 21 L858R mutasyonu), vahşi tip reseptörlere kıyasla artan miktarda ve sürede EGFR aktivasyonu gösterir [Lynch et al., 2004] ve RAS/RAF/MEK/MAPK yolu yerine PI3K/AKT ve STAT3/STAT5 yollarının tercihli aktivasyonuna sahiptir [Sordella et al., 2004]. Akciğer Kanseri RAS/RAF/MEK/MAPK yolağı Şekil 2.10'da özetlenmiştir

fazında tutulmasına neden olur ve DNA onarımına veya apoptoza izin verir [Breuer et al., 2005] (Şekil 2.11) . p53'ün regülasyonu MDM2 onkogeni aracılığı ile gerçekleşir.

MDM2 onkogeni, ubiquitinasyon aracılı bozunma yoluyla p53 seviyelerini azaltır. MDM2, CDKN2A'nın bir izoformu olan tümör baskılayıcı p14ARF tarafından inhibe edilebilir. MDM2 ve p14ARF'yi kodlayan genler, sırasıyla amplifikasyon ve ekspresyon kaybı yoluyla akciğer kanserinde yaygın olarak değişmektedir [Higashiyama et al., 1997] [Vonlanthen et al., 1998]. CDKN2A/RB1 yolu, G1'den S fazına hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eder. RB, G1-S faz geçişi için gerekli genlerin transkripsiyonunu baskılamak için E2F proteinleri ile birlikte hareket ederek bir tümör baskılayıcı görevi görür. RB, CDK-CCND1 kompleksleri (CDK4 veya CDK6 ve CCND1 arasındaki kompleksler) tarafından hiperfosforilasyon ile inhibe edilir ve buna karşılık CDK-CCND1 komplekslerinin oluşumu, CDKN2A395'in p16 izoformu tarafından inhibe edilebilir [Ohtani et al., 2004]. CDKN2A/RB yolağının neredeyse tüm bileşenlerinin akciğer kanserinde mutasyonlar (CDK4 ve CDKN2A), delesyonlar (RB1 ve CDKN2A), amplifikasyonlar (CDK4 ve CCND1), metilasyon ile susturma (CDKN2A ve RB1) ve fosforilasyon (RB) yoluyla değiştiği gösterilmiştir [Reissmann et al., 1993; Kotake et al., 2007].

Akciğer kanserinde, p53 inaktive edici mutasyonlar, sıklıkla 17p13'ün hemizigot delesyonu ve kalan alelde mutasyonel inaktivasyon olarak kendini gösteren en yaygın değişikliklerdir [Takahashi et al., 1989; Greenblatt et al., 1994]. TP53'teki bazı nokta mutasyonları, akciğer kanserinin saldırganlığının artmasına yol açan bir fonksiyon sağlar [van Oijen & Slootweg, 2000]. İnsan kanserlerinde p53'ü inaktive eden mutasyonların prevalansı nedeniyle normal p53 işlevini yeniden kazanıp eski haline getirmek için terapötik stratejilere odaklanılmıştır. Bunlar, gen tedavisi kullanılarak vahşi tip p53'ün yeniden kazanımını, mutant p53'ün küçük molekül ajanlar ve peptidlerle farmakolojik olarak kurtarılmasını, MDM2 ekspresyonunun bloke edilmesini, MDM2 ubiquitin ligaz aktivitesinin inhibe edilmesini ve küçük molekül inhibitörleri ile p53-MDM2 etkileşiminin hedeflenmesini içermektedir. Tümör hücrelerinin bir alt popülasyonunda p53 ekspresyonunun in vivo restorasyonu, akciğer kanseri hastalarında p53 gen terapisi ile başarılmıştır [Ventura et al., 2007].



Şekil 2. 11: Akciğer Kanseri p53 sinyal yolağı. [Larsen & Minna, 2011].

2.6.5. Akciğer Kanseri Yaygın Genetik Değişiklikler

Diğer malignitelerde olduğu gibi akciğer kanserinde de tümör oluşumu, büyümeyi teşvik eden proteinlerin aktivasyonu (örn; KRAS, EGFR, BRAF, MEK-1, HER2, MET, ALK ve RET) ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu (örn; p53, PTEN, LKB-1) ile gerçekleşir [Larsen & Minna, 2011]. Hücre büyümesini teşvik eden onkogenlerin aktivasyonu, gen amplifikasyonu veya nokta mutasyonları, yapısal yeniden düzenlemelerin dahil olduğu diğer genetik değişikliklerle onkogenik yolaklarda kontrolsüz sinyalleşme sonucu olmaktadır. “Onkogen bağımlılığı” olarak adlandırılan hücrenin hayatta kalmasında anormal sinyallenmenin devam eden aktivasyonu olan bu durum onları hedefli tedaviler için ideal adaylar haline getirir ve buna yol açan mutasyonlara da sürücü (driver) mutasyon denmektedir. [Lynch et al., 2004; Weinstein, 2002].

Akciğer kanserinde büyük bir genetik çeşitlilik vardır ve tüm tümörler arasında en fazla sayıda genetik anormallikleri barındırırlar [Larsen & Minna, 2011]. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisinin anlaşılması tüm kanser genomlarında veya ekzomlarında somatik değişiklikleri tanımlamanın kapsamlı bir yolunu sağlayan yeni nesil dizileme teknolojileri ile başarılmaktadır [P. Liu et al., 2012]. KHDAK alt tipleri arasındaki ve KHDAK ile KHAK arasındaki yaygın moleküler farklılıklar ; onkojenik mutasyonlar, gen amplifikasyonu, artmış protein ekspresyonu, mutasyonları barındıran tümör baskılayıcı değişiklikler, heterozigotluğun silinmesi ve kaybı (LOH), protein ekspresyonu kaybı, tümör kaynaklı DNA metilasyonu, kromozomal anormallikler ve telomeraz aktivitesinin varlığıdır. Bu genetik değişiklikler, hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, hayatta kalması, programlanmış hücre ölümü, invazyonu, metastazı vb. gibi hücre fonksiyonlarında yer alan çeşitli hücresel sinyal yollarında görev alan çeşitli onkogenleri (ONCG) ve tümör baskılayıcı genleri (TSG) içerir [Larsen & Minna, 2011]. KHDAK'nın major alt tipleri arasındaki ve KHDAK ile KHAK arasındaki yaygın moleküler farklılıklar Tablo 2.8'de özetlenmiştir.

Tablo 2.8: Akciğer kanserinde bulunan yaygın genetik değişiklikler [Larsen & Minna, 2011].

Gen	KHAK (%) ^a	KHDAK (%) ^a		
		Tümü	AK	SHK
Onkogenik Değişimler				
Mutasyon				
BRAF	Nadir	1-3	1-5	Nadir
EGFR	Nadir	~20	10-40	Nadir
ErbB2 (HER2)	Nadir	2	4	Nadir
KRAS	Nadir	10-30	15-35	<5
MET	13	21	14	12
PIK3CA	Nadir	1-5	<5	<5
Amplifikasyon				
EGFR	Nadir	20-30	15	30
ErbB2 (HER2)	5-30	2-23	6	2
MDM2		6-24	14	22

Tablo 2. 8: Akciğer kanserinde bulunan yaygın genetik değişiklikler (devamı).

MET		7-21	20	21
MYC	18-30	8-22		
NKX2-1 (TITF1)	Nadir	12-30	10-15	3-15
PIK3CA	~5	9-17	6	33-36
Protein Ekspresyonunda Artış				
CRK		8-30	8-30	
BCL2	75-95	10-35		
CCND1	0	43	35-55	30-35
CD44	Nadir	Yaygın	3	48
c-KIT	46-91	Nadir		
EGFR	Nadir	50-90	40-65	60-85
ErbB2 (HER2)	<10	20-35	16-38	6-16
MYC	10-45	<10		
PDGFRA	65	2-100	100	89
Tümör baskılayıcı değişiklikler				
Mutasyon				
CDKN2A (p16)	<1	10-40		
LKB1	Nadir	30-40	30-60	5-30
p53	75-90	50-60	50-70	60-70
PTEN	15-20	<10		
Rb	80-100	20-40		
Delesyon/LOH^b				
CDKN2A (p16)	37	75-80		
FHIT	100	55-75		
p53	86-93	74-86		
Rb	93	62		
Protein Ekspresyonu Kaybı				
CAV1	95	24		
CDKN2A (p14ARF)	65	40-50		

Tablo 2. 8: Akciğer kanserinde bulunan yaygın genetik değişiklikler (devamı).

CDKN2A (p16)	3-37	30-79	~55	60-75
FHIT	80-95	40-70		
PTEN		25-74	77	70
Rb	90	15-60	23-57	6-14
TUSC2 (FUS1)	100	82	79	87
Tümör Kaynaklı DNA Metilasyonu				
APC	15-26	24-96		
CAV1	93	9		
CDH1	60 40	20-35		
CDH13	15-20	45		
CDKN2A (p14ARF)	ndb	6-8		
CDKN2A (p16)	5, 0	15-41	21-36	24-33
DAPK1	nd	16-45		
FHIT	64	37		
GSTP1	16	7-15		
MGMT	16	10-30		
PTEN		26	24	30
RARβ	45-70	40-43		
RASSF1A	72-85	15-45	31	43
SEMA3B	nd	41-50	46	47
TIMP3	nd	19-26		
Telomerler				
Telomeraz Aktivitesi	75-100	50-80	65-85	80-90
Kromozomal Anormallikler				
EML4-ALK füzyonu		2-13		

Tablo 2.8: Akciğer kanserinde bulunan yaygın genetik değişiklikler (devamı).

Büyük ölçekli kayıp	1p, 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17p	3p, 5q, 8p, 9p, 13q, 17p, 18q, 19p, 19q, 21q, 22q	2q, 3p, 4q, 8p, 9p, 9q, 10p, 10q, 13q, 15q, 18, 20	3p, 4q, 9p, 10p, 10q, 18, 20
Fokal delesyonlar		2q22.1, 3p14.2, 3q25.1, 5q11.2, 7q11.22, 7q34, 9p23, 9p21.3, 10q23.31, 11q11, 13q12.11, 13q14.2, 13q32.2, 18q23, 21p11.2		
Büyük ölçekli artma	3q, 5p, 8q, 18q	1q, 3q, 5p, 6p, 7p, 7q, 8q, 20p, 20q	5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 19, 20q	2q, 3q, 5p, 7, 8q, 11q, 13q, 19, 20q
Fokal Amplifikasyonlar		1p36.32, 1p34.3, 1q32.2, 1q21.2, 2p24.3, 2q11.2, 2q31.1, 3q26.31, 5p15.33, 5p15.31, 5p14.3, 5q31.3, 6p21.1, 7p11.2, 8p12, 8q21.13, 8q24.21, 10q24.1, 10q26.3, 11q13.3, 12p12.1, 12q13.2, 12q14.1, 12q15, 14q13.3, 14q32.13, 16q22.2, 17q12, 18q12.1, 19q12, 19q13.33, 20q13.32, 22q11.21		
^a nd, belirlenmemiş				
^b LOH, heterozigotluk kaybı				
AK: Adenokarsinoma				
SHK: Skuamöz hücreli karsinoma				

Onkogen aktivasyonu, muhtemelen tüm akciğer kanserlerinde meydana gelir (tipik olarak gen amplifikasyonu, aşırı ekspresyon, nokta mutasyonu veya DNA yeniden düzenlemeleri) ve hücre büyümesini indükleyen mitojenik büyüme sinyallerinin sürekli yukarı regülasyonu ve ayrıca hücrenin hayatta kalmak için bu anormal onkogenik sinyallemeyle bağımlı hale geldiği "onkogen bağımlılığı" ile sonuçlanabilir. Akciğer kanserinde yaygın olarak aktive olan onkogenler arasında EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, MET, EML4-ALK füzyonu ve BCL2 bulunur. Bu "sürücü" onkogenler veya onkogen "bağımlılıklar", akciğer kanseri hücrelerinde kazanılmış koşullu (onkogen üzerinde) güvenlik açıklarını temsil eder ve normal hücreleri değil, tümörü öldürme özgülüğü sunarak önemli terapötik hedefler olarak sunulur [Larsen & Minna, 2011].

2.6.6. Akciğer Kanserinin RNA Aracılı Regülasyonu

Canlı organizmaların ve virüslerin çoğunda bulunan RNA, DNA'dan transkripsiyon sonucu oluşan bir moleküldür. Ayrıca, bazı RNA molekülleri gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alarak insan hastalıklarında terapötik ajanlar olarak hizmet etme potansiyeline sahiptir [D. Wang & Farhana, 2023]. Son yıllarda yapılan moleküler ve genetik bazı çalışmalar, RNA modifikasyonlarının ve işlenmesinden sorumlu enzimlerin, farklı kanser türlerinde önemli roller oynadığını göstermektedir. Bu yaklaşım, RNA modifikasyonlarının kanser metabolizması üzerindeki etkisini anlamak için iyi bir potansiyele sahiptir [Barbieri & Kouzarides, 2020].

Yapılan çalışmalara göre, insan genomunun 21,306'sı protein kodlayan ve 21,856'sı protein kodlamayan toplamda 43,162 gen ve 323,824 transkript içerdiği bilinmektedir [Pertea et al., 2018]. Bununla birlikte, genomik ve transkriptomik teknolojilerin gelişimi ile insan genomunun yaklaşık % 87'sinin aktif olarak transkribe edildiğini ve bu transkriptlerin %70'inin kodlamayan RNA'ya (ncRNA) karşılık geldiğini çalışmalar ortaya koymuştur. Böylece kodlama yapmayan ncRNA'ların gelişim ve hastalıkta önemli rolleri olduğu anlaşılmıştır [Peinado et al., 2018].

2.6.6.1. Kodlama Yapmayan RNA'lar (ncRNA)

Farklı genomik bölgelerden ökaryotik transkripsiyon ve RNA işlenmesi sonucu çeşitli kodlama yapmayan RNA (ncRNA) türleri üretilir. Protein kodlayan gen bölgeleri, güçlendirici (enhancer) bölgeler veya transpozon elemanları gibi DNA'ların çeşitli parçası ncRNA'lara kopyalanabilir. Düzenleyici rolleri göz önüne alındığında, ncRNA iki kategoriye ayrılabilir (Tablo 2.9) [P. Zhang, 2019]. Housekeeping ncRNA'ları, hücrelerde bol miktarda ve her yerde eksprese edilir, genel hücresel fonksiyonları düzenler. Regülatör ncRNA'lar genellikle düzenleyici RNA molekülleri olarak kabul edilirken, epigenetik, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonunun düzenleyicileri olarak işlev görürler [Cech & Steitz, 2014; Peschansky & Wahlestedt, 2014; Ponjavic et al., 2007].

Tablo 2. 9: ncRNA'ların sınıflandırılması [P. Zhang, 2019].

TÜR	KISALTMA	TAM AD	BOYUT
HOUSEKEEPİNG ncRNA'LAR	rRNA	ribosomal RNA	120–4,500 nt
	tRNA	tansfer RNA	76–90 nt
	snRNA	small nuclear RNA	100–300 nt
	snoRNA	small nucleolar RNA	60–400
	TERC	telomerase RNA	/
	tRF	tRNA-Derived Fragments	16–28 nt
	tiRNA	tRNA halves	29–50 nt
REGÜLATÖR ncRNA'LAR	miRNA	microRNA	21–23 nt
	siRNA	small interfering RNA	20–25 nt
	piRNA	piwi-interacting RNA	26–32 nt
	eRNA	enhancer RNA	50–2,000 nt
	lncRNA	long non-coding RNAs	>200 nt
	circRNA	circular RNA	100–10,000 nt
	Y RNA	Y RNA	/

RNA boyutlarına bağlı olarak regülatör ncRNA'lar, 200 nt'den az transkript içeren küçük kodlayıcı olmayan RNA'lar (sncRNA'lar) ve 200 nt'den büyük lncRNA'lar olarak sınıflandırılabilir. Küçük ncRNA'ların ana sınıfları, mikroRNA (miRNA), small interfering RNA'lar (siRNA'lar), piwi etkileşimli RNA'lardır (piRNA'lar). Bununla birlikte, değişken uzunluktaki bazı ncRNA'lar aynı anda iki sınıflandırmaya ait olabilir, bunlar; promotörle ilişkili transkriptler (PAT'ler), güçlendirici RNA'lar (eRNA'lar) ve dairesel RNA'lar (circRNA'lar)'dır [P. Zhang, 2019]. Kodlama yapmayan RNA'ları kısaca özetlemek gerekirse;

mikroRNA(miRNA)

miRNA'lar, transkripsiyon ile oluşan saç tokası halka yapılarından üretilen küçük

ncRNA'ların en bol sınıfıdır [Lagos-Quintana et al., 2001; R. C. Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000]. Farklı mekanizmalar yoluyla hem sitoplazmada hem de çekirdekte gen ekspresyonunu düzenlerler ve transkripsiyon sonrası seviyede gen susturulmasına aracılık ederler [Lagos-Quintana et al., 2001]. Çeşitli RNA türleri arasındaki karmaşık etkileşimde kilit oyuncular olarak, miRNA'lar son yıllarda önemli bir araştırma alanı olarak kabul ediliyor. En son miRBase sürümü (v22) 48 yeni tür eklenerek içerisinde hayvanlar, bitkiler, tek hücreli algler ve virüsler dahil 271 organizmadan 38.589 saç tokası öncüsü (hairpin precursors) ve 48.860 olgun miRNA içermektedir [Kozomara et al., 2019].

Küçük Enterferans RNA (siRNA)

siRNA'lar, çift sarmallı RNA moleküllerinin bir sınıfı olup RNA enterferansı (RNAi) yolağında temel rol oynar. Kökenlerine göre siRNA'lar iki alt kategoriye ayrılabilir; eksojen siRNA (ekzo-siRNA), yapay ekleme veya virüs enfeksiyonlarından kaynaklanan eksojen nükleik asit ürünlerinden oluşurken, endojen genomik lokustan kaynaklanan endojen siRNA'lar (endo-siRNA) çoğunlukla transpozon elementlerinden (TE'ler) kopyalanmaktadır [Hamilton & Baulcombe, 1999; Waterhouse et al., 1998].

Piwi Etkileşimli RNA (piRNA)

Adını PIWI proteinlerinden alan piRNA'lar, hayvana özgü küçük ncRNA'ların bir sınıfıdır. Olgun piRNA'lar iki ana yoldan türetilir, öncüller piRNA kümelerinden kopyalanır ve birincil yolda PIWI proteinleri tarafından bölünür ve ardından ikincisinde "ping-pong" döngüsü yoluyla modifiye edilir [Aravin et al., 2007; J. K. Kim et al., 2005].

Uzun Kodlama Yapmayan RNA (lncRNA)

lncRNA'lar, 200 nt'den uzun ve protein kodlama yeteneği olmayan transkriptler olarak tanımlanır. Protein kodlayan genlerle ilgili olarak konumlarına göre, lncRNA beş alt kategoriye ayrılabilir [Ma et al., 2013]. Uzun intergenik ncRNA'lar (lincRNA'lar), intergenik bölgelerdeki her iki iplikten kopyalanır. Uzun intronik ncRNA'lar tamamen protein kodlayan genlerin intronlarından kopyalanır. Sense lncRNA'lar, sens iplikçikten kopyalanır ve protein kodlayan genlerin ekzonlarını içerir. Sens lncRNA'ların aksine, antisens lncRNA'lar, eksonik veya intronik

bölgelerle örtüşen veya bir intron kapsayan protein kodlama dizisinden antisens sarmaldan kopyalanır, çift yönlü lncRNA'lar ise karşı zincirde bir kodlama transkriptinin yakınında lokalize yerden kopyalanır [Bhan & Mandal, 2014].

Arttırıcı (Enhancer) RNA (eRNA)

eRNA'lar, transkripsiyonel arttırıcılardan kopyalanan bir ncRNA grubu olarak ortaya çıkmaktadır. Benzer uzunluk ve protein kodlama potansiyelinin yanı sıra eRNA'lar, çift yönlü transkripsiyon yoluyla hem sens hem de antisens transkriptlere sahip olmak gibi bazı transkripsiyonel özellikleri lncRNA'larla paylaşır [Moghe et al., 2013; T.-K. Kim et al., 2010; Lafontaine, 2015].

Sirküler RNA (circRNA)

CircRNA'lar, kovalent olarak kapalı döngü yapıları oluşturan benzersiz bir endojen ncRNA sınıfıdır. Onlarca yıldır keşfedilmiş olmasına rağmen, gelişmiş derin dizileme teknolojileri ve biyoinformatik analiz, circRNA'nın son zamanlarda daha fazla ilgi görmesini sağladı [Salzman et al., 2012].

2.6.6.2. Kodlama Yapmayan mikroRNA (miRNA)'nın Akciğer Kanseri Önemli

ncRNA'lar birçok nedenle kanser biyobelirteçleri olarak çekici özellikler sunarlar. Bazı lncRNA'lar, tümör oluşum sürecinde yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahipken bazı lncRNA'lar göreceli stabilite ile vücut sıvılarında örneklenebilir. Bazıları da hayatta kalma süresi, metastaz riski ve nüksün belirleyicileri olarak davrandıkları için onkolojide tanısal ve/veya prognostik araçlar olarak faydalıdır [W. Lin et al., 2020; Peinado et al., 2018]. Diğer yandan, ncRNA'ların çeşitli kanser türünde düzensiz ekspresyon göstermesi ve vücut sıvılarındaki stabiliteleri sebebiyle, teşhis veya prognozda kullanılabilecek kanser biyobelirteci olma potansiyellerinin olduğu çalışmalara dayalı olarak bilinmektedir [Slack & Chinnaiyan, 2019].

20. yüzyılın son 10 yılında tanımlanan miRNA yaklaşık 19-25 ribonükleotid içeren ve kodlama yapmayan özgül bir RNA molekülü olup RNA seviyesinde ekspresyona müdahale ederek gen fonksiyonlarında düzenleyici rol almaktadır [Si et al., 2019; Florczuk et al., 2017]. miRNA'lar, hücre döngüsü, farklılaşma, proliferasyon, apoptoz, stres toleransı, enerji metabolizması ve bağışıklık tepkisi gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar [Si et al., 2019]. Kanser gelişiminde; miRNA

genlerinin amplifikasyonu veya silinmesi, miRNA'ların anormal düzeyde transkripsiyonel kontrolü, epigenetik değişiklikler ve miRNA biyogenez mekanizmasındaki kusurları etkili olmaktadır [Peng & Croce, 2016].

MiRNA'lar, belirli koşullar altında onkojen veya tümör baskılayıcı olarak da işlev görmektedir [Si et al., 2019]. Sirkülayonda yer alan miRNA'lar, fiziksel veya patolojik koşullar altında biyolojik sıvılarda tanınabilen tipik bir miRNA alt grubudur ve karmaşık hastalıklar için biyobelirteç potansiyeline sahiptir [Florczuk et al., 2017]. Bu bilgiye dayanarak, hesaplamalı bir yaklaşımla akciğer kanseri hastaları ve kontrol numuneleri verisi kullanarak miRNA'ların ekspresyon profilleri analiz edilmiş ve dolaşımdaki beş miRNA için (miR-92a, miR-140-5p, miR-331-3p, miR-223, miR-374a) akciğer kanseri patogeneze katıldıkları doğrulanmıştır. Bu da akciğer kanserinde önemli prognostik güçlerini göstermektedir [Y. Zhang et al., 2020]. Tablo 2.10'da günümüze kadar KHDAK oluşum ve gelişiminde rol oynayan birçok miRNA özetlenmiştir [Petrek & Ming, 2019]. Tümör baskılayıcı p53 ile sinerjistik etkisinden dolayı miRNA-34 ailesi tümör baskılayıcı olarak çeşitli insan kanserinde rapor edilmiştir. KHDAK hastalarında hem plazma hem de tümör dokularında yüksek miR-34a ve miR-34c ekspresyonu, uzun süreli genel hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar miR-34a ve miR-34c'yi KHDAK'de potansiyel prognostik biyobelirteçler olarak göstermiş ve miR-34a'yı kanser tedavisi için aday olarak sunmuştur [L. Zhang et al., 2019]. Başka bir çalışma ise, akciğer kanseri olasılığını tespit etmek için 13 adet miRNA (miR-92a-3p, miR30b-5p, miR-191-5p, miR-484, miR-328-3p, miR-30c-5p, miR-374a-5p, let-7d-5p, miR-331-3p, miR-29a-3p, miR148a-3p, miR-223-3p, and miR-140-5p) ölçümü yapan bir setten oluşan serum bazlı bir test yapılmıştır ve sırasıyla % 74.9,% 77.8 ve% 74.8 tanısal doğruluk, duyarlılık ve özgüllük sergilemiştir [K. Wu et al., 2019]. Bir diğer çalışmada ise, KHDAK tanısı için iki balgam miRNA'sından (miRs-31-5p ve 210-3p) ve bir plazma miRNA'dan (miR-21-5p) oluşan entegre bir biyobelirteç paneli optimize edilmiş ve üç miRNA'nın entegre kullanımı,% 85 duyarlılık ve % 91 özgüllükte sonuç vermesine rağmen akciğer kanserinin erken teşhisi için klinik uygulamaya henüz girememiştir[J. Liao et al., 2020]. Bir kohort çalışmasında 3046 kişinin kan örneklerinden genom çapında mikroRNA profilleri kullanılarak %91,4 doğruluk, %82,8 duyarlılık ve %93,5 özgüllük ile akciğer kanseri olan hastalarla ilişkili 15-miRNA ve 14-miRNA profilleri tanımlanmıştır [Fehlmann et al., 2020]. Bütün bu çalışmalar göstermektedir ki, bazı

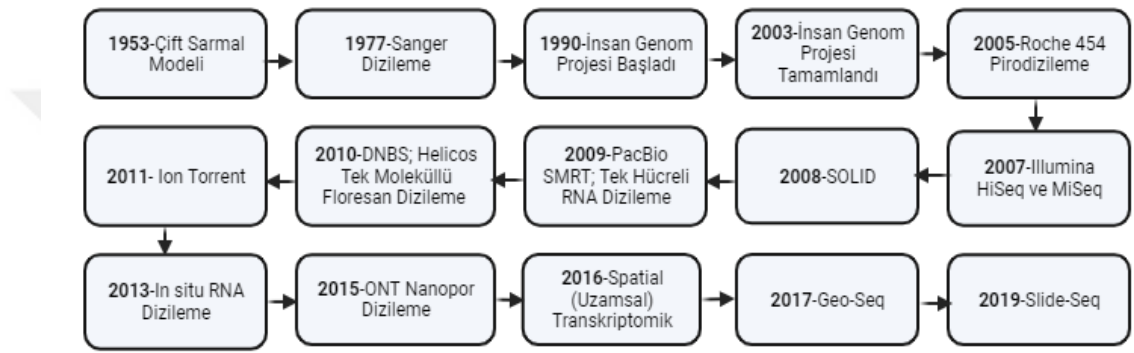
önemli miRNA'lar akciğer kanseri için gizli biyobelirteç olabilir ve miRNA'ların tanımlanan modellerinin minimal invaziv bir akciğer kanseri testinin, tamamlayıcı görüntülemenin, balgam sitolojisinin ve biyopsi testlerinin bir bileşeni olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir [Fehlmann et al., 2020]. Ancak hem dokularda, hem de vücut sıvılarında stabil bir yapıları olan miRNA'ların biyobelirteç olarak erken tanı, tarama ve izleme testlerinde kullanılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [Castro et al., 2017; Y. Zhang et al., 2020].

Tablo 2. 10: KHDAK'de en yaygın olan miRNA'ların listesi ve biyolojik deneylerde karşılık gelen hedeflerinden bazıları [Petrek & Ming, 2019].

miRNA	Ekspresyon değişikliği	Doğrulan Hedefler
miR-124-3p	Azalmış	STAT-3, MYO10, SMAD4
miR-126-3p	Azalmış	PIK3R2, VEGF-A, Crk
miR-143-3p	Azalmış	KRAS, NRAS, BCL2, HK2, PKCε, Limk1, ATG2B
miR-34a-5p	Azalmış	TGFβR2, Cyclin E1, PEBP4, Notch-1, Axl
let-7c-5p	Azalmış	N/K-RAS, ABCC2, Bcl-XL, ITGB3, MAP4K3, HOXA1
miR-101-3p	Azalmış	ZEB1, ROCK2, MALAT-1, EZH2
miR-100-5p	Azalmış	FGFR3, PLK1
miR-181a-5p	Azalmış	BCL2, KRAS, VCAM-1, CDK1
miR-145-5p	Azalmış	c-Myc, SMAD3, AEG/MTDH, OCT4, SOX2, Fascin1
miR-486-5p	Azalmış	PIM-1, ARHGAP5, IGF1, IGFR, p85α, CDK4
miR-451a-5p	Azalmış	PSMB8, RAB14
miR-21-5p	Artmış	PTEN
miR-210-3p	Artmış	E2F3, NDUFA4, SDHD
miR-205-5p	Artmış	PTEN, PHLPP2, ITGα5
miR-31-5p	Artmış	ABCB9, hMLH1
miR-200b-5p	Artmış	FOXF2, IL-8, CXCL1, FSCN1
miR-182-5p	Artmış	PDCD4, RGS17
miR-183-5p	Artmış	FOXO1, VIL2

2.7. RNA Dizileme (Transkriptom) Teknolojisinin Kanser Çalışmalarındaki Yeri

Watson ve Crick'in çift sarmal yapısını öne sürdükleri 1953 yılında, insanlar yaşamın özünün gen etkileşimlerinin bir sonucu olduğunu moleküler düzeyde fark edebildiler [WATSON & CRICK, 1953]. RNA dizilemesindeki sürekli gelişim sayesinde, transkriptom analizi daha yüksek verimlilik ve daha düşük maliyetle yeni bir çağa taşındı. RNA dizileme teknolojilerinin zaman çizelgesi, Şekil 2.12'de gösterilmektedir [Hong et al., 2020].



Şekil 2. 12: RNA dizileme teknolojilerinin zaman içerisindeki gelişim çizelgesi [Honet al., 2020].

Birinci nesil dizileme teknolojisi aynı zamanda Sanger dizileme olarak da adlandırılır. Zincir sonlandırma yöntemi 1977'de Sanger tarafından başlatıldı, ardından Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilen kimyasal bozunma yöntemi geldi [Sanger, Nicklen, et al., 1977; Maxam & Gilbert, 1977]. Aynı yıl Sanger, sekanslanan ilk DNA genomu olan faj ϕ X174'ün 5368 bç'lik genomunu belirledi [Sanger, Air, et al., 1977]. DNA mikroarray ilk tanıtıldığından bu yana birçok alanda önemli ilerlemelere yardımcı oldu. Fakat, mikroarrayler gen dizileri hakkında ön bilgi gerektirir ve yeni gen ekspresyonunu tanımlayamaz [Russo et al., 2003]. İlk yüksek verimli dizileme platformunun 2005'te ortaya çıkmasının ardından, bunu birden çok yeni nesil dizileme platformu takip etti. Farklı platformlar arasındaki doğruluk ve tekrarlanabilirlik birkaç faktöre bağlıydı, bunlar platformun mevcut özellikleri ve ilgili analiz pipelineleri [S. Li et al., 2014]. 2016'dan sonra artık desteklenmeyen Pyrosequencing, 454 Life Sciences tarafından geliştirilmiş, "sentez yoluyla dizileme" yöntemi kullanılmıştır [Shendure & Ji, 2008]. İyon torrent dizileme platformu hassasiyet açısından piro

dizilemeden daha iyi performans gösteren "sentez yoluyla dizileme" yöntemine dayanmaktadır. SOLiD (Oligonükleotit Ligasyonu ve Tespiti ile Dizileme), her baz iki kez dizilendiğinden yüksek doğruluk sergiler, ancak okuma uzunluğu kısadır [Mardis, 2008; Shendure & Ji, 2008; Mardis, 2013]. DNBS (DNA nanoball dizileme), eş zamanlı dizileme için geniş DNA nanotopları koleksiyonu kullanır. Bunun yanında, Illumina tabanlı dizileme teknolojisi, "tersine çevrilebilir sonlandırıcı dizileme" yöntemini temsil eder. Yeni nesil dizileme (NGS) olarak bilinen bu teknoloji yüksek hacimli dizileme, hızlı, düşük dizileme maliyeti ve yüksek doğruluk avantajına sahiptir. Mikroarray ile karşılaştırıldığında, bu teknoloji bilinmeyen gen ifade dizilerini tespit edebilir ancak zaman alıcıdır [Marioni et al., 2008]. NGS'ye ek olarak, tek tek RNA moleküllerinin uzun okumalı dizilimine izin veren üçüncü nesil dizileme vardır [Schadt et al., 2010]. Tek molekülli RNA dizileme, klonal amplifikasyon veya transkript eklemeleri olmadan tam uzunlukta cDNA transkriptlerinin üretilmesini sağlar. Bu nedenle, üçüncü nesil dizileme, PCR amplifikasyonu ve haritalama tarafından üretilen eksikliklerden muaftır. Splice "birleşme" bölgelerinin yanlış pozitif oranını büyük ölçüde azaltabilir ve transkript izoformlarının çeşitliliğini yakalayabilir [Schadt et al., 2010]. Tek molekülli dizileme platformları, Pacific Biosciences (PacBio) tek molekülli gerçek zamanlı (SMRT) dizileme [Eid et al., 2009], Helicos tek molekülli floresan dizileme [Hart et al., 2010] ve Oxford Nanopore Technologies (ONT) nano gözenek dizileme [Bayley, 2015] platformlarını içermektedir (Şekil 2.11). Ayrıca, RNA-seq son zamanlarda toplu dizilemeden tek hücreli dizilemeye doğru gelişti. Tek hücreli RNA dizilimi, transkriptomu tek hücreli çözünürlükte profilemek için ilk olarak 2009'da yayınlandı [F. Tang et al., 2009]. Drop-Seq ve InDrop ilk olarak 2015 yılında fare retina hücresi ve embriyonik kök hücre transkriptomlarını analiz ederek yeni hücre tiplerini tanımlayarak rapor edildi. Sci-RNA-seq, tek hücreli kombinatorial indeksleme RNA dizilimi, 2017'de geliştirildi ve SPLiT-seq (bölünmüş havuz ligasyonuna dayalı transkriptom dizilimi) ilk olarak 2018'de bildirildi. Her iki yaklaşım da, RNA'ların hücresel kökenlerini gösteren barkodlarla etiketlendiği bir kombinatorial indeksleme stratejisi kullanır [Cao et al., 2017; Rosenberg et al., 2018]. Tek hücreli veriler, tek hücreli transkriptomikleri mümkün kılarsa da, tek hücre izolasyonu sırasında spasyal (uzamsal) bilgileri kaybedebilir. Bu sorunu çözmek için uzamsal transkriptomik ortaya çıktı. Uzamsal transkriptomikler, doku bölümlerinin RNA dizilişindeki RNA dağılımlarını görselleştirmek için benzersiz konumsal

barkodlar kullanılmaktadır ve ilk olarak 2016 yılında yayınlandı [Ståhl et al., 2016]. 2019'da bildirilen Slide-seq, belirli konum bilgileriyle DNA barkod boncukları kullanır [Rodrigues et al., 2019]. Geo-seq, 2017'de tanıtıldı ve tek tek hücreleri izole edebilen lazer yakalama mikrodiseksiyon (LCM) ile scRNA-seq'i entegre etti [J. Chen et al., 2017]. Yerinde dizileme, morfolojik olarak korunmuş dokularda veya hücrelerde RNA fragmanlarının RNA ekstraksiyonu olmadan hedeflenen dizilişini ifade eder ve bu platforma padlock problemleri ile in situ cDNA sentezi veya floresan in situ RNA dizilemede (FISSEQ) stabil çapraz bağlı cDNA ampliconları ve yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA) ile in situ amplifikasyonları da dahil edilmektedir [Ke et al., 2013; J. H. Lee et al., 2014]. Ayrıca, belirli uygulamalar için RNA-seq tabanlı çeşitli yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Örneğin, bir tür hedeflenmiş RNA dizilimi olan CaptureSeq, biyotinlenmiş oligonükleotit problemleri kullanır ve gen füzyonunu tanımlamak için belirli transkriptlerin zenginleştirilmesiyle sonuçlanır [Mercer et al., 2011; Heyer et al., 2019].

Tablo 2. 11: Dizileme platformları [Hong et al., 2020].

Platform	Şirket	Okuma Uzunluğu (baz çifti)	Cihazın Dizileme Süresi	Okuma Hacmi	Şablon Hazırlama	Dizilemede Kullanılan Kimyasal
Birinci Nesil Dizileme						
Sanger	Life sciences	800 bç	2 saat	1 read	Bacterial cloning	Dideoxynucleosides terminator
Yeni Nesil Dizileme						
Roche 454 pirodizileme	454 Life sciences	700 bç	< 24 saat	0.7 Gb	Emulsion PCR	Sequencing by synthesis, pyrosequencing
Illumina HiSeq	Illumina	100 bç	3–10 gün	120–1500 Gb	Bridge PCR	Reversible terminator sequencing

Tablo 2. 11: Dizileme platformları (devamı).

Illumina MiSeq	Illumina	100 bç	1–2 gün	0.3–15 Gb	Bridge PCR	Reversible terminator sequencing
SOLiD	Applied biosystems instruments (ABI)	50–75 bç	7–14 gün	30 Gb	Emulsion PCR	Sequencing by ligation
DNA nanoball dizileme	Complete genomics	440–500 bç	9 gün	20–60 Gb	Rolling circle replication	Hybridization and ligation
Ion torrent	454 Life sciences	200–500 bç	4–5 saat	660 Mb; 11 Mb	Emulsion PCR	Sequencing by synthesis
Üçüncü Nesil Dizileme						
SMRT	Pacific biosciences	> 900 bç	1-2 saat	0.5–1 Gb	No need	Sequencing by synthesis
Helicos dizileme	Helicos biosciences	25–60 bç	8 gün	21–35 Gb	No need	Sequencing by synthesis
Nanopore dizileme	Oxford nanopore technologies	Up to 98 kç	48/72 saat	Up to 30 Gb	No need	Sequencing by synthesis

RNA-seq, yüksek verimli sıralama teknolojisinin (yüksek paralel dizileme) popüleritesi nedeniyle genomik verileri yaygın olarak elde etmek için kullanılan önemli bir yöntemdir. RNA-seq, transkriptomik (gen ifade profilinin belirlenmesi) çalışmalarda kullanılarak hücrelerdeki veya dokulardaki gen ifadesi hakkında ayrıntılı bilgiler sağlar. Bu yöntem, geleneksel mikroarray tabanlı gen ifadesi analizine göre daha hassas, kapsamlı ve esnek bir yaklaşım sunar. RNA-seq, tıbbi araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle hastalık mekanizmalarının anlaşılması, ilaç geliştirme süreçleri, biyomarker keşfi, gen ifadesi analizleri ve biyolojik süreçlerin anlaşılması gibi birçok alanda önemli bilgiler sağlamaktadır.

2.7.1. MiRNA İfade Profillemesinde Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Rolü ve Geleceği

miRNA'lar, gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA molekülleridir ve biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Bu sebeple, MikroRNA (miRNA) ifade profillemesi,

gen düzenlemesini ve çeşitli biyolojik süreçlerdeki rolünü anlamak için oldukça önemlidir. MiRNA ifade profillerini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır; bunlar arasında ters transkriptaz kalitatif PCR (RT-qPCR), mikroarray (hibridizasyon tabanlı tespit) ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri bulunmaktadır [Willenbrock et al., 2009].

2009 yılında Hanni Willenbrock ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, mikroarray ifade profillemeye yöntemi ile NGS teknolojileri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, mikroarray'in yüksek hassasiyet sergilediğini ve NGS ile nicelik ve tekrarlanabilirlik açısından benzer performans gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak NGS'nin miRNA dizisi varyantlarını tespit etme gibi belirgin avantajları olduğu görülmüştür [Willenbrock et al., 2009]. Bunu takiben, Anna Git ve meslektaşları 2010 yılında mikroarray ve NGS'nin farklı miRNA ifade profillerini araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Ayrıca, gerçek zamanlı RT-PCR'nin miRNA ifade profillemeye çalışmaları için bir kıstas olarak sorgulanmasına yönelik bir meydan okuma yapılmış ve bu yöntemlerin göreceli performans karşılaştırması ilk defa gerçekleştirilmiştir [Git et al., 2010]. 2014 yılında, Pieter Mestdagh ve ekibi, miRNA ifade profillemeye için 12 farklı ticari platformu değerlendirmişlerdir. Her yöntemin kendi avantajları ve dezavantajları olduğu ve yöntem seçiminin çalışmanın özel amaçlarına bağlı olduğu bulunmuştur [Mestdagh et al., 2014]. Son zamanlarda, üçüncü nesil dizileme yöntemleri umut veren bir gelecek vaat etmektedir. Bu yöntemler arasında tek molekül Gerçek Zamanlı (SMRT) dizileme, gerçek tek molekül dizileme (tSMS) ve Nanopore dizileme bulunmaktadır. SMRT dizileme, tek molekül floresan teknolojisi kullanır ve sıfır kipli dalga kılavuzu (ZMW) ile nükleotit eklemesini tespit eder, bu da dizileme yöntemleri arasında en uzun dizileme uzunluklarını sağlar ve genom montajı için uygundur. tSMS, Illumina sistemi gibi görünse de PCR amplifikasyon adımı olmadan çalışır ve diziyi belirlemek için floresanla işaretlenmiş tersine çevrilebilir terminasyonlu dNTP'ler ekler. Diğer yandan, Nanopore dizileme, DNA veya RNA molekülünü nanopor üzerinden geçirerek, her nükleotidin indüklediği gerilim değişikliklerini tespit ederek diziyi belirler [Eid et al., 2009; T. D. Harris et al., 2008; Clarke et al., 2009].

Sonuç olarak, miRNA ifade profillemesi farklı yöntemlerle elde edilebilirken, NGS teknolojileri özellikle yüksek hassasiyeti, mikroarray'e kıyasla benzer performansı ve

miRNA dizisi varyantlarını tespit etme avantajları nedeniyle tercih edilmektedir. Yöntem seçimi, özel araştırma amaçlarına dayanmalıdır ve SMRT, tSMS ve Nanopore gibi üçüncü nesil dizileme yöntemleri gibi NGS platformları, genomik çalışmaların ilerlemesi için umut vaat etmektedir [Hu et al., 2017].

Böylece yeni nesil dizileme tabanlı miRNA çalışmaları; miRNA sekanslaması, miRNA ekspresyon profil analizleri, miRNA hedeflerinin belirlenmesi ve miRNA ile ilgili regülasyon mekanizmalarının araştırılması gibi alanlarda önemli katkılar sağlayarak, miRNA biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve potansiyel terapötik hedeflerin keşfedilmesine yönelik bilim ve tıp alanlarında önemli ilerlemelere yol açabilir. Ancak, bu alandaki çalışmaların hala devam ettiğini ve ilerleyen zamanlarda daha da gelişeceğini unutmamak son derece önemlidir.

2.8. KHDAK Odaklı Biyobelirteç Çalışmaları

Transkriptomik çalışmalar, hastalıkların moleküler düzeyde anlaşılması ve tanısında önemli bilgiler sağlayan güçlü bir araçtır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), akciğer kanserinin en yaygın tipidir ve genellikle kanserin yüzde 80-85'ini oluşturur [Santarpia et al., 2015]. KHDAK'de gen ifadesinin analizi, hastalığın tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik önemli bir adımdır.

Moleküler biyobelirteçler, akciğer kanseri yönetiminde önemli rol oynar. Özellikle Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) için prognoz ve tedavi yanıtının tahmin edilmesinde değerli araçlardır. Bu nedenle, akciğer tümörlerinin klinik yönetiminde kullanılan biyobelirteçleri, teşhis sürecinden prognoza kadar ele almak önemlidir.

Klinik uygulamada akciğer kanseri histolojisinin teşhisi ve sınıflandırılmasında temel yöntem olan immunohistokimya (IHC) ile KHDAK alt tiplerini belirlemek için en iyi biyobelirteçler adenokarsinom için TTF-1 (Tiroid Transkripsiyon Faktörü 1), Napsin A iken ve skuamöz hücreli karsinom için p40 'dır [Califf, 2018; Osmani et al., 2018]. Klinik ortamlarda daha kolay elde edilen kan/serum örnekleri, biyopsi veya rezeksiyonla alınan tümör örneklerine göre daha kullanışlıdır. CYFRA 21-1, CEA, SCCA ve CA125, akciğer kanserinin tespiti için yaygın olarak kullanılan ve iyi bilinen kan/serum biyobelirteçleridir. Ayrıca, yeni biyobelirteçlerin eklenmesiyle, özellikle panel şeklinde kullanıldığında, duyarlılık ve özgüllüğün arttığı bildirilmiştir [Rastel et

al., 1994;Okamura et al., 2013;F. Chen et al., 2015; Doseeva et al., 2015;Fang et al., 2018;Patz et al., 2007;Jiang et al., 2018;Zang et al., 2019;Yang et al., 2019;Chapman et al., 2008]. Öngörücü biyobelirteçlerin tespiti, tedavi seçiminde büyük öneme sahiptir. EGFR mutasyonları, ALK ve ROS1 değişimleri, RET, MET, Her2, KRAS ve BRAF gibi genlerin test edilmesi rutin olarak önerilmektedir. Ayrıca, PD-L1 immünohistokimyası da immünoterapiye yanıtı öngörmek için kullanılan bir biyobelirteçtir[Pennell et al., 2019;Garrido et al., 2020;Lindeman et al., 2018;Y.-L. Wu et al., 2019;Popper et al., 2020].

Prognostik biyobelirteçler için ise mevcut literatür şu şekildedir; TP53 geni, p53 tümör baskılayıcı proteinini kodlar ve p53 mutasyonları, akciğer kanseri türlerinde kötü prognoz ve tedavi direnci ile ilişkilidir. VEGF aşırı ifadesi, akciğer kanserinde tümör nüksü ve metastazı ile ilişkilidir ve kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilir. TUBB3 yüksek ifadesi, akciğer kanserinde kötü prognoz ve anti-tübülin bazlı kemoterapiye düşük yanıtla ilişkilidir. Ki-67 yüksek ifadesi, akciğer kanseri dahil birçok kanser türünde kötü prognoz ile bağlantılıdır. ERCC1 düşük ifadesi, akciğer kanserinde kötü sağkalım ile ilişkilidir ve özellikle skuamöz karsinomlarda daha yaygındır. TGF- β aşırı ifadesi, akciğer kanserinde kötü prognoz göstergesi olarak düşünülmektedir, ancak daha fazla çalışma gereklidir. LAG-3 yüksek ifadesi, bazı durumlarda kötü sağkalım ile ilişkilendirilebilir ve potansiyel bir prognostik belirteç olarak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. KIAA1522 yüksek ifadesi, akciğer kanserinde kötü sağkalımla ilişkilidir ve platin bazlı kemoterapiyle tedavi edilenlerde daha kötü sonuçlar gözlemlenir. NLR ve PLR düzeyleri, sistemik inflamasyon yanıtının akciğer kanseri için prognostik belirteçleri olarak kullanılabilir ve tedaviye yanıtı etkileyebilir [Šutić et al., 2021].

MikroRNA'lar (miRNA'lar), akciğer kanseri gibi çeşitli hastalıklar için invaziv olmayan teşhis biyobelirteçleri olarak potansiyele sahip küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır. MiR-33a-5p ve miR-128-3p gibi belirli miRNA'lar, akciğer kanseri dokusunda normal dokuyla karşılaştırıldığında değiştirilmiş ifade düzeylerine sahiptir ve teşhis işaretçileri olarak kullanılabilir. Ayrıca, miR-205 ve miR-375, sırasıyla skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom için özgüdür. MiR-324-3p ve miR-1285 gibi bazı miRNA'lar, erken evre KHK'nin dolaşan teşhis biyobelirteçleri olarak umut vaat etmektedir. Birden fazla miRNA'yı panellerde birleştirmek, teşhis

doğruluğunu önemli ölçüde artırabilir, ancak bunların klinik uygulamaya çevrilmesi için daha fazla doğrulama ve standartlaştırma gereklidir [Šutić et al., 2021].

Transkriptomik çalışmalarda elde edilen bu tür biyobelirteçler, hastalığın tanısı, prognozu ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bilgiler sağlar. Ancak, her hasta ve hastalık durumu benzersizdir, bu nedenle belirli biyobelirteçlerin kullanımı her zaman bireyselleştirilmiş tıbbi yaklaşımlar ve klinik değerlendirmelerle birleştirilmelidir.

2.8.1. KHD AK Hastalığında Tanı, Prognoz ve Tedavi Potansiyeli Taşıyan MikroRNA Biyobelirteçleri

Çeşitli kodlama yapmayan RNA tipleri arasında, mikroRNA'lar 21-23 nükleotitten oluşan kısa non-kodlayan RNA sınıfını oluşturur ve genlerin yaklaşık %30'unun post-transkripsiyonel seviyede ifadesini baskırlar. Hedef mRNA'nın 3' untranslated region (3'-UTR) bölgelerine kendi seed dizileri ile bağlanarak mRNA'yı düzenlerler ve bunun sonucunda mRNA'nın translasyon inhibisyonu ve/veya destabilizasyonu yoluyla baskılanmasına neden olurlar. Bu sayede, miRNA'lar hücrel enflamasyon, hücre döngüsü düzenlemesi, stres cevabı, hücre farklılaşması, apoptoz, metastaz, migrasyon ve hematopoez üzerinde etki yaparlar. Şu anda, 2656'dan fazla olgun miRNA tanımlanmış olup, bunlardan birçoğu hastalıklarda düzensizleşmiş veya mutasyona uğramıştır [Pal et al., 2021]. Karsinogenez, malign dönüşüm ve metastazla ilişkili miRNA'lar, onkomir olarak adlandırılır ve birçok insan kanseri türünde önemli gelişim düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır ve kapsamlı bir şekilde araştırılmışlardır [Szczyrek et al., 2022]. Mevcut veriler, miRNA'ların hem tümör baskılayıcıları hem de onkomirler olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir ve bunlar tanısal belirteçler olarak kullanılabilir. Vücut sıvılarında çeşitli miRNA'ların tespiti, KHD AK hastalarında invaziv olmayan bir tanısal, öngörüs el ve prognostik araç olarak hizmet edebilir [Xiance Jin et al., 2017; Gilad et al., 2008; Huang et al., 2021; Tie et al., 2009].

KHD AK hastalarında kullanılan miRNA biyobelirteçleri, hastalığın tanısı, prognozu ve tedavisine yönelik olarak araştırılmaktadır. Bu miRNA'lar, kanserle ilişkili gen ifadesi değişikliklerini yansıtan ve hastalığın tanı ve takibinde potansiyel olarak faydalı olabilecek moleküllerdir. İşte KHD AK hastalarında çalışılan bazı miRNA

biyobelirteçleri: MiR-20, diğer akciğer hastalıkları olan hastalara kıyasla KHDAK hastalarında yükselmiş olarak bulunmuştur. TGF-beta ve VEGF ifadeleri ile ilişkilendirilmiştir. Kanser ilerlemesindeki rolü hakkındaki veriler kısmen çelişkilidir ve farklı araştırma yöntemlerinin ve materyal seçim kriterlerinin sonucu olabilir [Chaniad et al., 2020]. MiR-21, akciğer kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde bulunmuş ve onkomir olarak işlev görmüştür. Tümör hücrelerinin artmış proliferasyonu, invazyonu, metastazı ve azalmış apoptozu ile ilişkilendirilmiştir. MiR-21 ifadesi, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla KHDAK hastalarının plazma ve dokularında artmış olarak bulunmuştur. MiR-21'in yüksek ifadesi kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, adenokarsinom histolojisinde, skuamöz hücreli karsinomdan daha fazla ifade edilmiştir [Landi et al., 2010]. MiR-25, KHDAK hastalarından elde edilen doku ve plazma örneklerinde artmıştır, özellikle ileri evre tümörlerde yüksek ifade gösterir; ayrıca, KHDAK'nin radyosensitivitesi ile ilişkilendirilmiş ve sisplatin dirençli KHDAK'de aşırı ifade edilmiştir [He et al., 2015; T. Wu et al., 2019; J Li et al., 2019; B. Sun et al., 2021]. MiR-26a, hem AK hem de SHK doku örneklerinde artmış ifadeye sahiptir ve özellikle evre I ve evre II vakalarında histolojik örnekler arasında büyük farklılık gösterirken, ileri evre örneklerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir [Landi et al., 2010]. Yüksek miR-31 ifadesi aynı zamanda kötü KHDAK prognozu ile ilişkilendirilmiştir. MiR-31-5p'nin, KHDAK'de sisplatinle indüklenen apoptozu inhibe ettiği ve olası olarak tümör hücre invazyonunu teşvik edebileceği bulunmuştur [F. Song et al., 2020]. MiR-141'ün aşırı ifadesinin rolü kaynaklara bağlı olarak değişti; bazıları onu pro-angiyojenik bir faktör olarak gördü, bazıları ise anti-angiyojenik özelliklere sahip olduğunu belirtti [Tirpe et al., 2020]. MiR-155, bağışıklık sistemi aktivasyonunda önemli bir rol oynar ve tümöre bağlı bağışıklık hücrelerini inhibe ederek tümörün kaçmasını ve büyümesini teşvik edebilir. CD8 T-hücrelerinde apoptozu indüklediği ve fonksiyonlarını engellediği gösterilmiştir. [Han et al., 2020]. MiR-182, miR-183 ailesine aittir ve kanserlerde, özellikle KHDAK'de sıkça aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir [Gao et al., 2020]. MiR-191 ifadesi, KHDAK hastalarının doku örneklerinde artmıştır ve onkomir olarak işlev gördüğü bulunmuştur [F. Li et al., 2019]. MiR-210, pro-angiyojenik bir miRNA olarak, tedavi edilmemiş KHDAK hastalarından elde edilen serum eksozomlarında aşırı ifade edildiği belirlenmiştir [Tirpe et al., 2020]. MiR-221/222 kümesi, KHDAK'de aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir [Tirpe et al., 2020; Di Paolo et al.,

2021]. MiR-486 ifadesi plazma kökenli eksozomlarda, evre 1 akciğer kanseri hastalarının dokularındaki seviyeye benzerlik göstermiştir [Xiance Jin et al., 2017]. MiR-494 ifadesi, KHDAC tümör dokularında aşırı ifade edilmiştir [Q. Zhang et al., 2019]. MiR-556-5p ifadesindeki artış, KHDAC hastalarının dokularında ve hücrelerinde sisplatin direnci yaygınlığı ile korelasyon göstermiştir [B. Sun et al., 2021]. Zhou ve arkadaşları, miR-601 ve miR-942'nin birleşik serum seviyelerinin KHDAC vakalarında erken tümör tespiti ve prognostik tahminlerde kullanılabileceğini bulmuşlardır [B. Sun et al., 2021]. MiR-629 serum ifadesi, benign akciğer hastalığına sahip hastalar ve sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında KHDAC hastalarında anlamlı derecede artmıştır [F. Liu et al., 2021]. MiR-15, KHDAC dahil çeşitli kanser türlerinde onkomir olarak belirlenmiştir. MiR-15b aşırı ifadesi sisplatin direnci ile ilişkilendirilmiş ve anti-miR-15b, KHDAC hücrelerinde sisplatin duyarlılığını önemli ölçüde geri getirmiştir [T. Lu et al., 2021]. MiR-23a, normal ve hipoksik ortamlarda akciğer tümörünün anjiyogenezini teşvik ettiği bulunmuştur [Tirpe et al., 2020]. Song ve arkadaşları, cisplatin direncine sahip KHDAC hastalarının doku kaynaklı eksozomlarında miR-4443 ifadesinin, tedaviye yanıt veren KHDAC hastalarından elde edilenlere göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. MiR-4443'ün cisplatin direncini ve tümör büyümesini teşvik ettiği belirlenmiştir [Z. Song et al., 2021]. MiR-9, akciğer kanserinde onkomir rolü oynayabilir ve KHDAC hastalarında kötü bir prognostik belirteç olabilir, ancak tümör gelişimindeki rolü kısmen çelişkili ve kesin olmamıştır [Xiang Jin et al., 2020; X. Chen et al., 2015]. Skuamöz hücreli karsinomlu hastalarında düşük miR-29a ifadesi, tümör baskılayıcı rolünü ve tümör gelişimindeki önemini göstermiştir [Landi et al., 2010]. MiR-30a ifadesi, KHDAC dokularında komşu normal akciğer dokularına göre daha düşük olarak raporlandı ve neoadjuvan kemoterapi sonrası belirgin şekilde arttığı bildirildi [Xiao Lin et al., 2021]. MiR-33a, akciğer tümörü büyümesini inhibe edebilir [Kang et al., 2018]. MiR-34 ailesi üyelerinin, hücre migrasyonunu, invazyonunu, proliferasyonunu ve yaşamını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, tümör hücrelerinin EMT (epitel-mezenkimal geçiş), kök hücre benzerliği ve ilaç direncini azaltırlar [Travis et al., 2015]. Xu ve arkadaşlarının çalışmasında miR-99b ifadesi, KHDAC dokularında ve hücrelerinde düşüktü. MiR-99b'nin KHDAC vakalarında hücre invazyonunu ve migrasyonunu inhibe etme potansiyelini gösterdiler [Xu et al., 2021]. MiR-126, KHDAC tanısında ve tedavisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilir

[Xiance Jin et al., 2017;M. Li et al., 2020]. MiR-146'nın tümör baskılayıcı özellikleri vardır. EGFR genini hedef alır, bu gen akciğer adenokarsinom hastalarında mutasyona uğrayabilir [Wani et al., 2021]. Zhou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, miR-129-2 ifadesinin, komşu dokularla karşılaştırıldığında KHDAK dokularında ve hücre hatlarında azaldığı görülmüştür. Araştırmacılar, artmış miR-129-2 ifadesinin KHDAK'de kemoduyarlılığı teşvik ettiğini ve hücre apoptozunu indüklediğini bulmuşlardır [W. Zhou et al., 2022]. MiR-200 ailesinin, epitel-mezenkimal geçişin baskılanmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [C. Liu et al., 2018]. MiR-206 ifadesi KHDAK'de azalmıştır [M. Liao & Peng, 2020;Jia et al., 2020]. Akciğer kanserinde anjiyogenez, proliferasyon, migrasyon, invazyon ve metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir [Tirpe et al., 2020;M. Liao & Peng, 2020]. MiR-375'nin tümör baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir [Ying et al., 2020,Cheng et al., 2017]. Hashemi ve arkadaşları, miR-377 ifadesinin insan KHDAK dokularında ve hücre hatlarında, tümör dışı doku örneklerine kıyasla önemli ölçüde düşük olduğunu bulmuşlardır ve ayrıca miR-377 aşırı ifadesinin kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ve apoptozlarını artırdığını bildirmişlerdir, bu nedenle potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini belirtmişlerdir [Hashemi et al., 2022]. MiR-451'nin tümör büyümesini engelleme özellikleri olduğu bulunmuştur [Y. Liu et al., 2019]. MiR-451a, KHDAK'de hücre migrasyonunu ve invazyonunu baskılayıcı olarak belirlenmiştir [F. Song et al., 2020]. Artmış miR-497 ifadesi, KHDAK hücrelerinin anjiyogenezini, büyümesini ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir, bunun tersine miR-567 ifadesinin azalması, hücre invazyonunu ve tümör büyümesini teşvik etmiştir [Tirpe et al., 2020]. MiR-567 aşırı ifadesi ayrıca KHDAK hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir, ayrıca miR-567'nin KHDAK hastalarında malin tümör ilerlemesini CDK2'yi düzenleyerek baskılayabileceği öne sürülmüştür [D.-J. Yu et al., 2020]. İn vitro olarak, artmış miR-638 ifadesi, KHDAK hücrelerinin invazif yeteneklerini inhibe etmiştir [Xia et al., 2014]. Bazı çalışmalara göre miR-708'nin yüksek ifadesi, daha uzun bir sağkalım ile ilişkilendirilmiştir [Garinet et al., 2021]. Wu ve arkadaşları, miR-4782-3p'nin KHDAK'de hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve artmış miR-4782-3p seviyelerinin KHDAK hastalarında pozitif bir prognostik faktör olarak tanımlandığını göstermişlerdir [N. Wu et al., 2014]. Wang ve arkadaşları, miR-320a ve miR-622 ifadesinin KHDAK hastalarının plazma kökenli eksozomlarında, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında azaldığını ve metastaz için iyi bir teşhis yeteneği olduğunu

bulmuşlardır [N. Wang et al., 2020]. Bazı çalışmalarda belirli miR-17 ailesi üyelerinin akciğer kanserinde değişiklik gösterdiği gösterilmiştir [Migdalska-Sęk et al., 2021; Weihua Zhang et al., 2017; Gong et al., 2017]. Chaniad ve arkadaşları, miR-20a ve miR-223'ün tümörü destekleyen sitokinleri modüle etmeleri nedeniyle akciğer kanseri tedavisinde kullanılmasını önermişlerdir [Chaniad et al., 2020].

Yukarıda sıralanan miRNA'lar, KHDAK hastalarında potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir. Bu miRNA'lar, hastalığın tanısı, prognozu ve tedavisinin belirlenmesine yönelik araştırmalarda kullanılmaktadır. Ancak, her miRNA'nın belirli bir hastalık durumuyla ilişkili olması, hastaların heterojen yapısını göz önünde bulundurmamak önemlidir. Dolayısıyla, miRNA biyobelirteçlerinin klinik uygulaması için daha fazla araştırma ve doğrulama gereklidir.

Sonuç olarak bu tez çalışması, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi ve gelişmiş biyoinformatik algoritmaların birleşimini kullanarak, karmaşık bir hastalık olan KHDAK'ın small RNA analizleri üzerinde odaklanmaktadır. Heterojen bir profil gösteren KHDAK'tan elde edilen tümör hücresi ve çevre dokularındaki small RNA'ların analizi, hastalığa özgü miRNA'ların ve mekanizmalarının anlaşılmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmanın yenilikçi yönü, hastalığın genetik veya proteomik seviyede değil, miRNA düzeyinde de ele alınmasıdır. Hastalığın belli evrelerinde ortaya çıkabilen ve vücut sıvılarına yansıyabilen bu miRNA'lar, daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilen sonuçları aşmayı hedeflemektedir. Aynı hastadan alınan KHDAK tümör dokuları, reaktif stroma, tümöre sınır normal dokular ve normal akciğer dokuları arasındaki small RNA profillerindeki değişimler biyoinformatik destekli analizlerle ortaya konulmuştur. Bu, akciğer kanserinin oluşumu ve ilerlemesinde rol oynayan miRNA yapılarını belirleyerek klinik, tümör-nod-metastaz (TNM) evrelemesi, farklılaşma (grade) ve histoloji ile ilişkilendirmeyi mümkün kılmıştır.

Çalışmanın sonuçları, erken tanı ve tarama amacıyla kullanılabilecek aday miRNA yapılarından oluşan bir panelin oluşturulmasına katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Bu panel, daha özgül ve duyarlı biyobelirteçlerin geliştirilmesine olanak tanıyarak, kanser tanı testlerinin etkinliğini artırabilir ve hastalığın erken safhada tespitini kolaylaştırabilir. Böylece akciğer kanseri araştırmalarında ve klinik uygulamalarda

önemli bir ilerleme sağlayabilir, ayrıca gelecekteki benzer çalışmalara ilham kaynağı olabilir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de, kit, enzim ve kimyasallar Tablo 3.2’de, diğer sarf malzemeler Tablo 3.3’de belirtilmiştir.

Tablo 3. 1: Kullanılan Cihazlar.

Kullanılan Gereçler	Marka
-80 derin dondurucu	Haier
-20 buzdolabı	Panasonic
+4 buzdolabı	Panasonic
Mikrosantrüfj	Hitachi
Mikrospin santrüfj	Isolab
Laminer Flow Kabin	Esco
Vorteks	Isolab
Pipet Takımı	Eppendorf
Qubit 2.0 fluorometer	İnvitrogen
HiSeq 2500 platformu	Illumina
Novaseq 6000 platformu	Illumina
PCR cihazı	Bio-Rad
Nanodrop spektrofotometre	Thermo Scientific
Bioanalyzer 2000	Agilent
RT-qPCR	Bio-Rad
Hassas terazi	Sartorius
Heat-block	Eppendorf
pH metre	Hanna

Tablo 3. 1: Kullanılan Cihazlar (devamı).

cBot cihazı	Illumina
Jel elektroforez cihazı	Bio-Rad
PCR kabin	Delta laboratuvar
Mikrodalga fırın	Arçelik
Mikroskop	Zeiss

Tablo 3.2: Kullanılan Kit, Enzim ve Kimyasallar.

Kullanılan Kit, Enzim, Kimyasal Adı	Marka / Katolog No
PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen™ #12183018A
Quick-RNA Whole Blood	Zymo research # R1201
Agilent RNA 6000 Nano Reagents	Agilent # 5067-1511
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent #5067-4626
Qubit RNA BR (Broad-Range) Assay Kiti	Invitrogen™ #1809490
TruSeq® Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Rat Kiti	Illumina ##20020597
RNA Clean XP	BeckmanCoulter #A63987
AMPure XP	BeckmanCoulter # A63881
TruSeqStranded RNA HT Kit 96 Samples CDNA Synthesis-PCR	Illumina #15032621
PCRMasterMix	Illumina #15026785
PCR PrimerCocktail	Illumina #15031748
FSA 1st strandsynthesisMixActD	Illumina #15031094
SMM 2nd strandMarkingMix	Illumina #15031098
SuperScript II (reversetranscriptase)	Invitrogen #18064-014
TruSeqStranded RNA HT Kit 96 Samples Ribo-Zero H/M/R (Box 2 of 2)	Illumina #15032626
ELB(ElutionBuffer)	Illumina #15026780
EPH (Elute Prime Fragment)(High concentration mix)	Illumina #15029211
RBB (RRNAbindingbuffer)	Illumina #15031737
RRM (RRNAreoval mix)	Illumina #15031738
TruSeqStranded RNA HT Kit 96 samples Ribo-zero (Box 1 of 2)	Illumina #15032625

Tablo 3.2: Kullanılan Kit, Enzim ve Kimyasallar (devamı).

RRB (RRNA removalbeads)	Illumina #15031727
TruSeqStranded RNA HT Kit (96 SamplesCore Box)	Illumina #15032620
PhIX Control v3	Illumina # 15017666
Agilent RNA Ladder 6000 Nano Reagents Part II	Agilent # 1716
ResuspensionBuffer (RSB)	Illumina #15026770
A TailingMix	Illumina #15012495
LigationMix	Illumina #15026773
Ligation Control	Illumina #15026776
A Tailing Control	Illumina #15026775
EndRepair Control	Illumina #15026774
Stop LigationBuffer	Illumina #15012546
TruSeq RNA CD Indexes (96 Indexes -96 samples)	Illumina #15032622
KAPA Library Quant Kit ABI Prism Qpcr Mix	Roche #07960204001
EB (Elution Buffer)	Qiagen #19086
UltraPure Agarose	Invitrogen # 16500
Tween 20	Sigma # P2287
Sodium acetate	Sigma # S2889
Diethyl pyrocarbonate approx. 97% NMR	Sigma # D5758
Bromophenol Blue, pure, indicator	Acros # 151340250
Formaldehit	Merck #F8775
EtBr	Sigma #E1510
2-Mercaptoethanol	Sigma # M3148
Kloroform	Merck #528722
TrRIzol Reagent	Ambion # 15596026
Nucleasefreewater (50ml)	Ambion #AM9932
Ethylenediaminetetraacetic acid solution	Sigma #03690
Rnase ZAP	Sigma #R2020
Çamaşır Suyu	Domestos

Tablo 3.2: Kullanılan Kit, Enzim ve Kimyasallar (devamı).

RNAlater (Stabilize and protect RNA with immediate Rnase inactivation)	Sigma # R0901
Hematoksilen	Merck #517-28-2
Eozin	Merck #548-24-3
HCl	Merck #320331
Amonyum	Merck #1336-21-6
Cıva oksit	Oksilab #ZK.100154.1000
Ksilen	Merck #1330-20-7
MOPS	Sigma #69947
Ethanol Absolute	Isolab # 9200262500

Tablo 3.3: Kullanılan diğer sarf malzemeler.

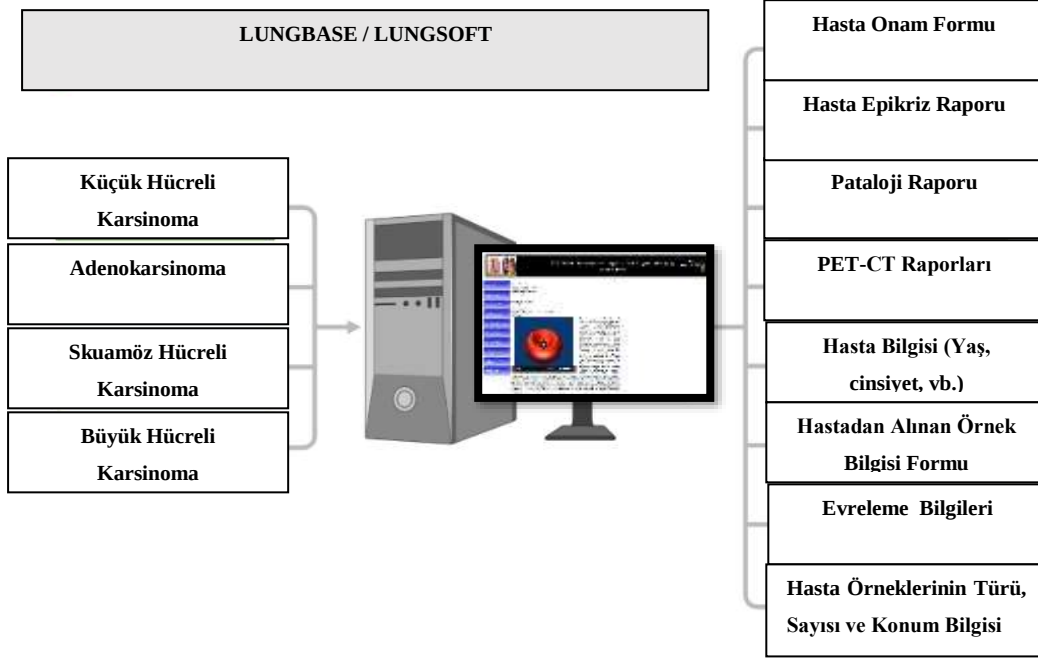
Kullanılan Malzeme Adı	Marka
Hard-Shell PCR Plates 96-well, thin-wall	Bio-Rad # HSP9601
Microseal B sealSeals	Bio-Rad # MSB1001
Micro Amp , Optical adhesive film	AB Aplied Biosystems
PCR TUBES PCR-05-C 0.5ml thin wall, clear	Axygen #321-05-051
DNA Lobind Tube 0,5 ml	Eppendorf # 022.431005
DNA Lobind Tube 2,0 ml	Eppendorf # 022431102
pipet ucu 200 ul-filtreli-şeffaf-kutu-low retantion-steril	Isolab # TF-R-S-200
pipet ucu 1000 ul-filtreli-şeffaf-kutu-low retantion-steril	Isolab # TF-R-S-1000
pipet ucu 10 ul-filtreli-şeffaf-kutu-low retantion-steril	Isolab # TF-R-S-010
pipet ucu 20 ul-filtreli-şeffaf-kutu-low retantion-steril	Isolab # TF-R-S-021
Collection tubes (1,5 ml)	Qiagen # 154037850
Eppendorf tube (microcentrifuge tubes) 1,5 ml DNA/RNA free	Isolab # 078.05.022.500
Eppendorf tube (microcentrifuge tubes) 0,5 ml flat cap neutral	Isolab # 078.03.021.500
MicroAmp fast 96 well Reaction Plate (0,1ml) PCR Compatible DNA/RNA/Rnase free	Applied Biosystems # 13757-Q612
İndividual PCR tubes 8 tube strip, no cap	Bio-Rad # TBS0201

Tablo 3. 3: Kullanılan diğer sarf malzemeler (devamı).

15 ml santrifüj tüpü-steril- tekli paket	Isolab # 078.02.002
50 ml santrifüj tüpü-steril-tekli paket	Isolab # 078.02.004
Tek kullanımlık steril kaşık	Isolab # LB.IS.037.28.001
Eldiven	Isolab # 080.15.001
Havan/tokmak	Isolab # 038.08.125
Vacutainer (EDTA)	BD #367525
Vacutainer (CAT)	BD #367896
Steril idrar kabı	Isolab # 087.01.002
Steril gaita kabı	Isolab # 087.03.002
Bags sterile	Isolab # 039.21.005.250
Dewar Kabı Kulplu	Pluslab
Cryotube	Nunc # 375418PK
Cryo tüp kutusu 10x10	Isolab #092.22.101W
Maşa-çelik	Isolab #080.04.002
Pensler	Isolab #048.01.105
Torba standı	Isolab #062.30.002
Lam- lamel slaytları	Isolab #075.00.001
Torba mandalları	Isolab #039.35.145
Atık kutuları	Isolab #062.80.903
Koruyucu gözlük	Isolab #080.40.007
Soğuğa dayanıklı eldiven	Isolab #080.10.201
Bunsen beki	Isolab #050.01.004
Bistüri	Isolab #048.51.021

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyobankanın Oluşturulmasında İlk Aşama



Şekil 3. 1: Veritabanı (Lungbase)'in içerik bilgisi.

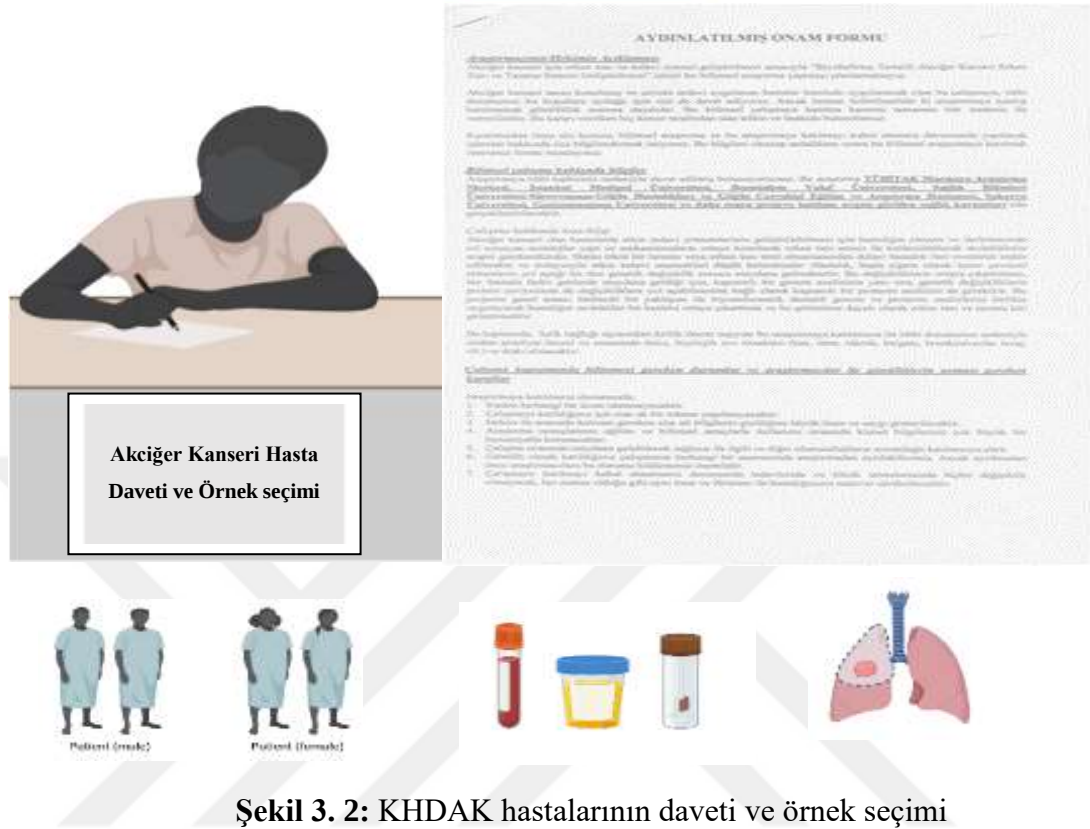
Bu çalışma, geleneksel patoloji birimlerinin sınırlamalarını aşmak ve özellikle bütünlük çoklu-omik analiz ile kişiselleştirilmiş tıp alanında örneklerin modern bir biyorepozituar sistemine toplanması, işlenmesi ve depolanmasını amaçlamaktadır. Bu amaçla, yüksek hacimli teknolojilerden elde edilen bilgileri NGS ve LC-MS/MS gibi yöntemlerle klinik, laboratuvar ve görüntüleme verileriyle ilişkilendirerek hastalara daha fazla fayda sağlanması hedeflenmektedir. Bu düşünceyle tasarlanmış biyorepozituar sistemi, ileri düzey analizler için yüksek kaliteli örneklerin temin edilmesini amaçlamakta ve araştırma sonuçlarının laboratuvar bulgularından hastaların tedavisine dönüştürülmesini kolaylaştırmaktadır. Sistem, akciğer kanseri hastalarından çeşitli örneklerin bir klinik ekibi ile birlikte toplanmasını ve standartlaştırılmış işleme ile depolamasını içermektedir. Bu amaca yönelik olarak, LUNGBASE adlı kendi veritabanımız kullanılmaktadır. Bu veritabanı, LUNGSOFT adlı kendimizin geliştirdiği yazılım tarafından yönetilen açık kaynaklı bir platform aracılığıyla örnek detaylarının hasta verileriyle kaydedilmesini ve ilişkilendirilmesini

kolaylaştırmaktadır. Genel olarak, bu çalışma, bütünleşik çoklu-omik analizi destekleyen ve geleneksel histolojik değerlendirmeyi birleştiren yeni bir yaklaşım sunarak biyomedikal araştırmayı ilerletebilme ve hasta bakımını geliştirme potansiyeline sahiptir.

LUNGBANK biyobanka altyapısı, özellikle KHDAK (küçük hücreli-dışı akciğer kanseri) ile ilgili araştırmalar ve tıbbi ilerlemeler için tasarlanmıştır. Bu kanser türü ile ilgili biyolojik örneklerin toplanması, işlenmesi ve depolanması aşamaları gerçekleştirilmiştir. Öte yandan, 96 terabaytlık büyük bir kapasiteye sahip kapsamlı ve sofistike bir depolama sistemi olan LUNGBASE, özellikle kritik hasta bilgilerini güvenli bir şekilde barındırmak üzere tasarlanmıştır. Böylece veri yönetimi ve gizliliğin en yüksek standartlarını sağlamaktadır. Veritabanı, hasta onam formu, epikriz, patoloji bilgileri, PET-CT taramalarıyla elde edilen görüntü verileri, hastaya ait (yaş, cinsiyet vb.) bilgi, hastadan alınan örnek bilgi formları, evreleme bilgisi gibi verileri içerir (Şekil 3.1). Ayrıca, çeşitli biyolojik örneklerin türü, miktarı ve konumu hakkında ayrıntılı bilgi sağlamaktadır, bu da araştırmacılar ve sağlık profesyonelleri için izlenebilirlik ve erişilebilirlik sağlar. Ayrıca, LUNGBASE hem ham hem de analiz edilmiş omiks verilerini barındırır ve karmaşık moleküler ve genomik bilgiyi depolama yeteneğini sergileyerek kişiselleştirilmiş tıp ve araştırma çabalarını önemli ölçüde ilerletmektedir.

Bu geniş veritabanını etkili bir şekilde yönetmek için sistemle entegre edilmiş olan LUNGSOFT-V3 yazılımı, bir veri yönetim platformu olarak tasarlanmıştır. Kullanıcı dostu bir arayüze ve sorunsuz veri alımı, analizi ve güncellemeleri için sağlam işlevselliğe sahiptir; aynı zamanda hasta gizliliğini korumak için en yüksek veri güvenliği protokollerini sağlamaktadır. LUNGBASE Yazılımı, bir Apache web sunucusunda çalışan MySQL ve PHP 7 kullanılarak geliştirilmiş bir web uygulamasıdır. Ana menü, hasta bilgileri, hasta örnekleri, bilgi paylaşım portalı ve hasta görüntü verilerini yönetme seçenekleri sunar. Bu kullanıcı dostu yazılım, etkili ve düzenli veri yönetimi sağlar ve araştırmacıların küçük hücreli olmayan akciğer kanseri araştırmaları ve tedavisi için değerli verilere erişmelerini ve bunları kullanmalarını sağlar.

3.2.2. KHDAK Hasta Daveti ve Biyolojik Örnek Seçimi



Şekil 3. 2: KHDAK hastalarının daveti ve örnek seçimi

KHDAK hastası daveti, KHDAK teşhisi konmuş kişilere tıbbi araştırmalara veya klinik çalışmalara katılmaları için davet etmeyi içerir. Hastanın tıbbi geçmişi, tedavi özet, klinik bilgiler ve takip verileri toplanır böylece hastanın durumu ve hastalık ilerlemesi hakkında geniş bir görüş elde edilir. Ayrıca davet etmeye karar verilen hastalara Kurumsal İnceleme Kurulu (IRB) tarafından gözden geçirilen ve onaylanan bilgilendirilmiş onam formu (Ek C) imzalatılır (Şekil 3.2). Bu form, hastaların çalışmanın amacı, prosedürleri, olası riskler ve faydalar hakkında tam olarak bilgi sahibi olmalarını ve gönüllü olarak katılmayı kabul ettiklerini sağlamak için gereklidir. Bu bilgilendirilmiş onam süreci, etik standartları korumak ve araştırmaya katılan hastaların haklarını ve iyiliklerini korumak için önemlidir.

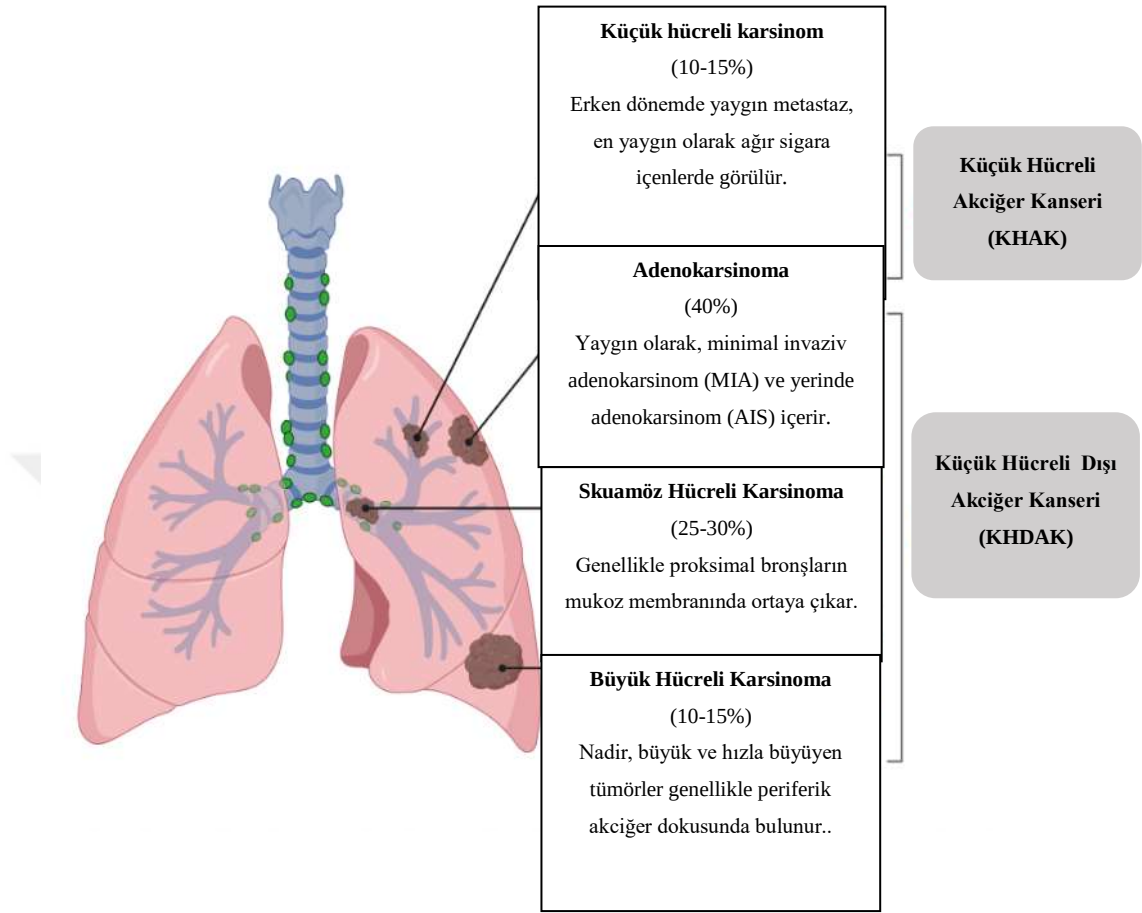
Biyobankacılık sürecinin bir sonraki adımı, biyolojik örneklerin özenle toplanmasına ayrılmıştır. Bu adım, doktorlar, cerrahlar, hemşireler ve sağlık görevlileri arasında sorunsuz işbirliği gerektiren önemli bir çalışmadır. Bu amaçla, her bir örnek türünün özel ihtiyaçları göz önünde bulundurularak standart protokoller dikkatlice

oluşturulmuş ve uygulanmıştır. Biyolojik örnek toplama sırasında, takip eden analizler için özel olarak tasarlanmış toplama kitleri kullanıldı. Bu kitler, örnek bütünlüğünün korunmasını sağlar ve olası bozulmayı minimize eder. Etiketleme yöntemleri, her hastanın biyolojik örnekleri ile doğru ve güvenilir veri ilişkilendirmesini kolaylaştırmak için dikkatlice kullanıldı. Bu adım, gelecekteki araştırmalar, tıbbi buluşlar ve kişiselleştirilmiş tıp alanındaki gelişmeler için temel rol oynayan biyobankacılık altyapısının temelini oluşturmaktadır.

Biyolojik örneklerin nasıl elde edildiği, işlendiği ve transfer ve depolama sırasındaki koşulları, bu örneklerle yapılacak gelecekteki çalışmaların kalitesi ve güvenilirliği açısından çok önemlidir. Bu nedenle, elde edilen biyolojik örnekleri bozulmadan korumak için kullanılacak koruyucuların seçimi önceden dikkatlice düşünüldü. Bu yönergeler doğrultusunda, toplanan biyolojik örnekler arasında kan, doku, tükürük, idrar, dışkı ve bronkoalveolar lavaj sıvısı bulunmaktadır. Ayrıca, bilgilendirilmiş onam alınmış bireylerden elde edilen bilgileri içeren hasta formları (Ek C) da toplanmıştır.

Biyobanka, KHDAK hastalığı için özel olarak kurulmuştur. 30 ila 70 yaşları arasında değişen, hem erkek hem de kadın gönüllülerden elde edilen kan, doku, tükürük, idrar, dışkı ve bronkoalveolar lavaj sıvısından oluşan bir biyobanka oluşturulmuştur. Alınan tüm doku parçaları (tümör dokusu, normal doku, reaktif stroma ve lenf nodu dokusu) soğuk zincir korunarak labratuvar ortamına getirilmiş ve homojenize edilerek muhafaza edilmiştir. Aynı zamanda, bu örneklerden DNA ve RNA izolasyonları yapılmıştır. Bu, biyomedikal araştırmalar için yeterli sayıda yüksek kaliteli örnek elde edilmesini sağlamakla birlikte aynı örneğe tekrar ihtiyaç duyulmadan birden çok test yapılmasına olanak tanır. Bu tez çalışmasında ise KHDAK hastalarının seçimi yapılarak, seçilen hastaların kan ve dokularından izole edilen RNA örnekleri ile dizileme çalışması yapılmıştır. Bu örnek toplama süreci bir sonraki kısımda detaylı olarak anlatılmaktadır.

3.2.3. KHDAK Alt Tiplerinin Belirlenmesinde Histolojik Analiz



Şekil 3. 3: Çalışmaya dahil edilen KHDAK histolojik grupları ve dahil edilmeyen KHAK.

Akciğer kanserinin yaklaşık %85'ini oluşturan KHDAK kategorisindeki hasta örnekleri ameliyat esnasında alınarak patoloji tarafından hücrelerin büyüklüğü ve şekline göre değerlendirilmiştir (Şekil 3.3). Alt tip tanısında histolojik değerlendirme önemlidir. Protokoller, mikroskop altında yapılan incelemeler, immünohistokimya testleri (IHC) ve moleküler analizleri içermektedir. Genellikle kanserin alt tipini belirlemek, tedavi stratejilerini yönlendirmek ve hastaların prognozunu tahmin etmek için bu yaklaşımlar bir arada kullanılır. Cerrahi işlem esnasında alınan doku kesitleri parafine gömülü kesitler üzerinde IHC ve H&E boyama yapılarak patologlar tarafından onaylanmıştır.

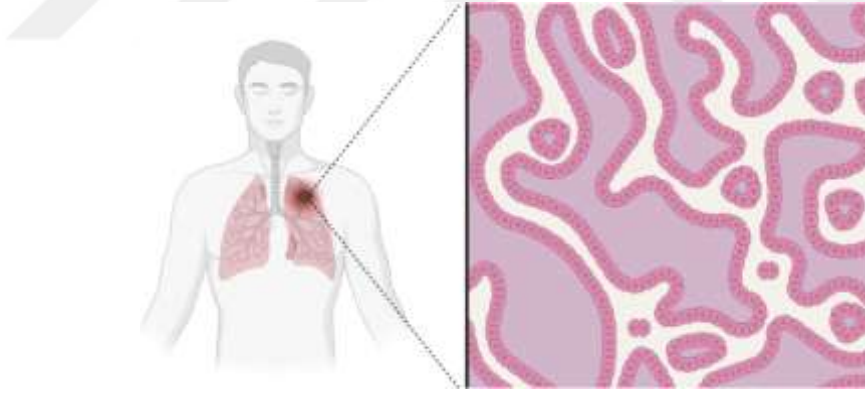
3.2.3.1. Dokuların Immunohistokimyasal Analiz Yöntemi

Adenokarsinom: Mikroskop altında hücrelerin yapılarına, bez oluşumlarına ve belirli özelliklere bakıldı. Ayrıca, IHC (immünhistokimya) testleri ile belirli protein ifadeleri değerlendirildi. Tanısı için neoplastik bez oluşumu ve TTF-1 ve napsin gibi pnömosit belirteçlerinin bulunması gerekmektedir.

Skumöz Hücreli Karsinom: Hücrelerin skumöz (yassı) özelliklerini değerlendirmek için inceleme yapıldı. Hücrelerin diferansiyasyon derecesi ve belirli protein ifadeleri mikroskop altında gözlemlendi. Teşhisi, p40, p63, CK5 veya desmoglein gibi belirteçlerin kullanımıyla keratin üretiminin tespitine dayanmaktadır.

Büyük Hücreli Karsinom: Bu tür, KHDAK'nin diğer alt tiplerine benzemeyen hücrelerden oluşur. Mikroskop altında yapıları değerlendirdi ve hücrelerin büyüklüğü ve şekli incelenerek dışlama durumuyla teşhis edildi.

3.2.3.2. Dokuların Histolojik Analiz Yöntemi



Şekil 3. 4: Dokuların histolojik analiz yöntemi ile doğrulanması.

Hematoksilen ve eozin (H&E), histopatolojide yaygın olarak kullanılan bir boya kombinasyonudur. Bu boya yöntemi, dokuları mikroskop altında incelemek ve yapısal özelliklerini belirlemek için kullanılır. Hematoksilen, bazofilik bileşenleri (genellikle nükleusları) mavi-mor renkte boyarken, eozin, asidofilik bileşenleri (sitoplazma ve bazı fibröz dokular) pembe-kırmızı renkte boyar (Şekil 3.4).

3.2.3.2.1.Parafin kesit alma ve H&E ile boyama

Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyalarının Hazırlanışı

Harri'nin Hematoksilen boyası hazırlanışı;

Hematoksilen Bileşiği (A): 1 ml etanol içinde 10 g hematoksinin çözülür.

Amonyum Şap Bileşiği (B): 20 gm amonyum şapı sıcak damıtılmış suya eklenir.

Karıştırma ve Kaynatma: Hematoksilen (A) ile amonyum şap (B) karışımını iyice karıştırılır ve karışım kaynatılır.

Cıva Oksit Eklenmesi: 0.5 g cıva oksiti kaynar karışıma eklenir ve iyice karıştırılır.

Süzme: Hazırlanan karışım süzülerek temiz bir kapta toplanır.

Eozin solüsyonu hazırlanışı;

Eozin Bileşiği: 1 gm sarı eozini damıtılmış suda çözülür.

Çözeltilinin Hazırlanması: Çözölmüş eozin çözeltilisine 320 ml etanol ve 80 ml damıtılmış su eklenir. 2 damla buzlu asetik asit eklenir.

Bu çözeltileri dikkatlice hazırladıktan sonra, %0.5 HCl ile seyreltilmiş amonyak suyu gibi diğer bileşenleri kullanarak boyama işlemleri gerçekleştirilir.

Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyama Prosedürü

1. Slayt bir alevle yakılır ve ksilen içine yerleştirilir. Balmumu ortadan kaldırmak için prosedür tekrarlanır.
2. Ksilen boşaltılır ve doku dilimini azalan konsantrasyon (%100, %90, %80, %70) ve su içeren alkol banyolarından geçirilerek nemlendirilir.
3. 3 ila 5 dakika hematoksin boyası içinde bekletilir.
4. En fazla 5 dakika boyunca porsiyonlar “mavi” olana kadar akan suda yıkanır.
5. %1 asit alkolde (%1 HCl %70 alkol) birkaç saniye bekletilir.
6. Akan musluk suyuyla durulanır. Porsiyonlar mavileşene kadar amonyak suyuna batırdıktan sonra musluk suyuyla durulanır.
7. %10 Eosin boya içinde 1 dakika bekletilir.
8. Musluk suyu kullanarak 1 ila 5 dakika yıkanır.
9. Yükselen alkol içeriğinde kurutulur.
10. Slaytları temizlemek için ksilen banyosuna yerleştirilir.

11. Mikroskop altında gözlemlenir.

Cerrahi prosedürlerle elde edilen doku örnekleri hastanede parafin kesitlerle onaylandıktan sonra laboratuvar ortamında işleme tabi tutulmuş ve kriyo kesitleri elde edilmiş ve onaylanmıştır.

3.2.3.2.2. Kriyo kesit alma ve H&E ile boyama

Kriyo kesit, biyolojik örneklerin dondurulduktan sonra ince kesitler halinde kesilmesi işlemidir. Bu işlem, genellikle histolojik veya mikroskobik incelemeler için kullanılır. Kriyo kesitler, özellikle tıp ve biyoloji alanlarında doku örneklerinin veya hücrelerin yapılarını incelemek için önemlidir. Her bir kriyo kesit alındıktan sonra H&E ile boyanarak laboratuvar ortamında onaylanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 51 hastanın her birinden tümör doku, normal doku, tümör mikroçevresinden reaktif stroma ve lenf nodu dokusundan olmak üzere toplam 204 örnekten 50şer adet kriyo kesiti alınmıştır. Bu kesitlerden 35er tanesi IHC, 15er tanesi de ISH çalışmaları için hazırlanmıştır. Bu kriyo kesitleri örnek bütünlüğünü korumak amacıyla biyobankada özenle saklanmıştır. Bu yaklaşım, örneklerin gelecekteki analizler ve araştırmalar için doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamakla birlikte akciğer kanseri alanında gelecekte yapılacak çalışmaların ve incelemelerin örnek bütünlüğünü korumasına da katkı sağlayacaktır. Uygulanan kryokesit uygulaması ve histolojik boyama protokolü şu şekildedir:

1. Akciğer doku örnekleri, Leica CM1100 kriyostat makinesi kullanılarak 5 µm kalınlığında kesildi.
2. Kesilen doku kesitleri, iki farklı amaç için ayrıldı. İmmünohistokimya (IHC) analizi için olanlar mikroskop slaytlarına yerleştirildi. In situ hibridizasyon (ISH) analizi için olanlar, RNazeden arındırılmış superfrost slaytlarına (Thermo Fisher Scientific, USA) yerleştirildi.
3. İmmünohistokimya (IHC) için kullanılacak olan kriyo kesitler, -20°C'de aseton içinde 5 dakika boyunca sabitlendi.
4. In situ hibridizasyon (ISH) için amaçlanan diğer kriyo kesitler ise formalin içinde bir dakika boyunca sabitlendikten sonra üç kez salin-sodyum sitrat (SSC) tamponuna batırıldı.
5. Tüm doku kesitleri, işleme kadar korunması için hemen -80°C'de donduruldu.

6. Hematoksilen-eosin (H&E), İmmünohistokimya (IHC) veya In situ hibridizasyon (ISH) analizleri yapabilmek için, tüm kriyo kesitler standart bir rehidrasyon işleminden geçti. Bu işlem, sırasıyla %100, %95 ve %70 oranlarında etanolde yüzdürülerek gerçekleştirildi.
7. Kanseri tiplerini değerlendirmek için H&E boyaması yapıldı:
8. Slayt rehidrasyonunun ardından slaytlar musluk suyu ile yıkandı.
9. Slaytlar bir dakika boyunca hematoksilen boyasına batırıldı, ardından musluk suyu banyosunda 10 kez daldırıldı.
10. Sonrasında slaytlar 30 saniye boyunca eosine maruz bırakıldı ve tekrar 10 kez musluk suyuna batırıldı.
11. Bu işlemlerin ardından slaytlar sırasıyla %96 etanol, aseton ve xilen içinde yıkanarak hazırlandı.
12. Son olarak, sabitleme ortamı kriyo kesitlerine uygulandı ve slaytlar tırnak cilası ile kapatılarak mühürlendi.

3.2.4. Biyobanka Oluşumunda Örnek Toplama Süreci

Biyobanka oluşturma'nın temel bir parçası, örnek toplama sürecidir ve bu aşama oldukça kritiktir. Örnek toplama süreci, biyobankaların başarısının ve bilimsel araştırmaların güvenilirliğinin temel bir bileşenidir. Bu süreç, örneklerin kalitesini ve güvenliğini sağlayarak bilim ve tıbbi araştırmalara önemli katkılarda bulunur. Bu sebeple hastalardan alınan biyolojik örneklerin toplanma, transfer ve saklama süreçlerinin ayrıntılı metodolojisi şekil 3.5'deki gibidir.



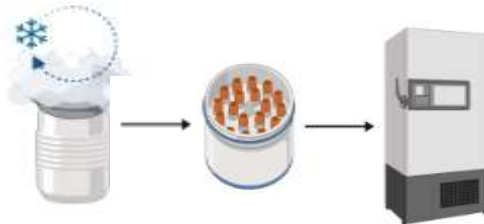
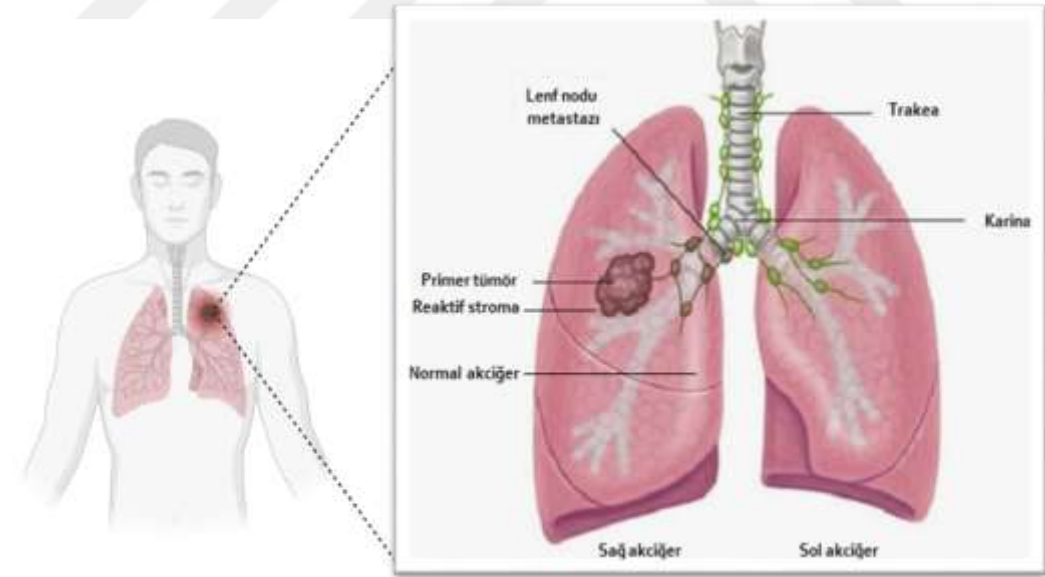
Hasta Belirleme (KHDAK hastaları)

- Skuamöz Hücreli Karsinom
- Adenokarsinom
- Büyük Hücreli Karsinom

Ameliyattan birgün önce hastadan kan, tükürük, idrar ve dışkı alınır. Santrüfler, alıkotlanır ve -80° derin dondurucuda depolanır.



Ameliyat Esnasında hastanın ; Tümör dokusu, normal dokusu, reaktif stroması ve lenf nodu dokusu alınır. Ayrıca bronkoalveolar lavaj sıvısı (BALF) da alınır.

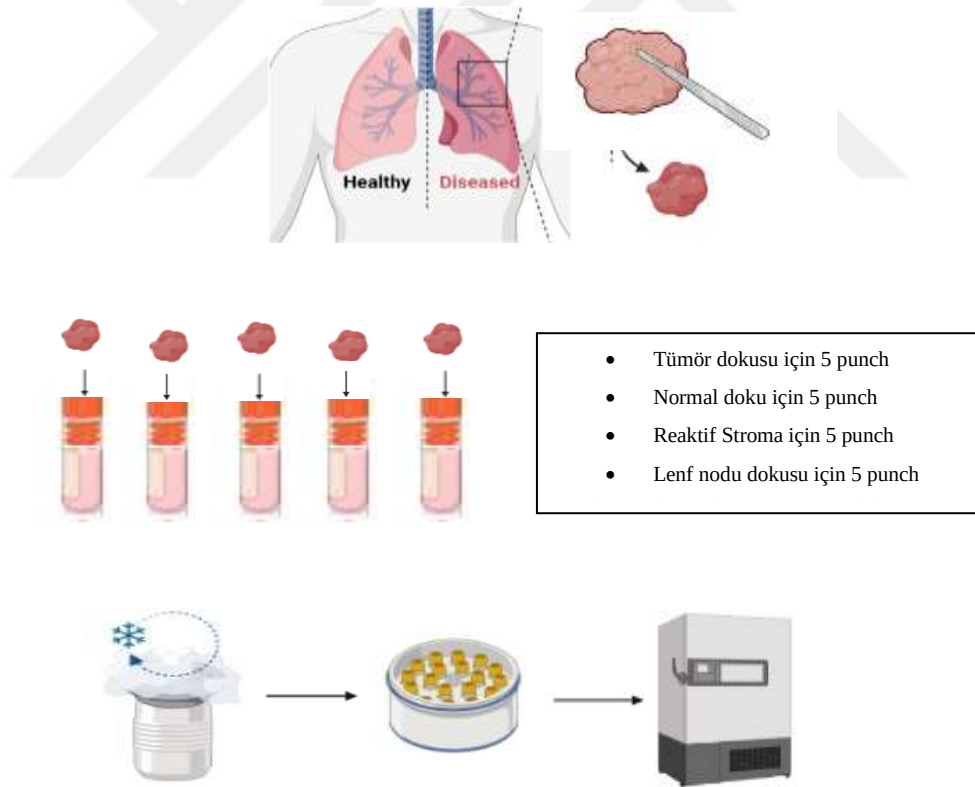


Dokular direkt sıvı nitrojen (-196) ile hızlı bir şekilde dondurulur ve soğuk zincir yolu ile -80° derin dondurucuya depolanır.

Şekil 3. 5: Biyobanka oluşumunda örnek toplama süreci.

3.2.4.1. Doku Örneklerin Toplanması

Cerrahi prosedür sırasında (Şekil 3.6) tümör dokusu, normal doku, reaktif stroma ve lenf nodlarından doku örnekleri her bir doku tipi için 5 ayrı nohut parçası olarak ayrı ayrı toplandı. Bu örnekler hemen etiketli kriyotüplere yerleştirildi ve sıvı azot içinde hızlı dondurma yöntemiyle anında donduruldu. Bu işlem, dokunun moleküler ve biyokimyasal durumunun hızlı bir şekilde korunmasını sağlar, böylece sonraki analizlerin yüksek doğruluk ve güvenilirlikle yapılmasına olanak tanır. Örneklerin histolojik karakterizasyonu patalog tarafından yapıldı ve örnekler uzun süreli koruma sağlamak amacıyla -80°C derin dondurucuda depolandı. Örnek bütünlüğünü korumak için depolama sırasında donma-çözünme döngülerinden kesinlikle kaçınıldı. Bu arada in vitro ve in vivo çalışmalar için hücre izolasyonu amacıyla kullanılanlar steril ortamda alındı ve eğer hemen kullanılmadıysa uygun dondurma solüsyonunda (%90 FBS + %10 DMSO) sıvı nitrojen tankında saklandı.



Şekil 3. 6: Doku örneklerinin toplanma iş akışı.

3.2.4.2. Biyolojik Sıvıların Toplanması

Biyobanka için kan örnekleri, Tablo 3.4'deki programa göre toplanmakta ve vakumlu tüplere alınmaktadır. Ayrıca, örneklerin işleme merkezine taşınırken depolandığı sıcaklık belirtilmiştir.

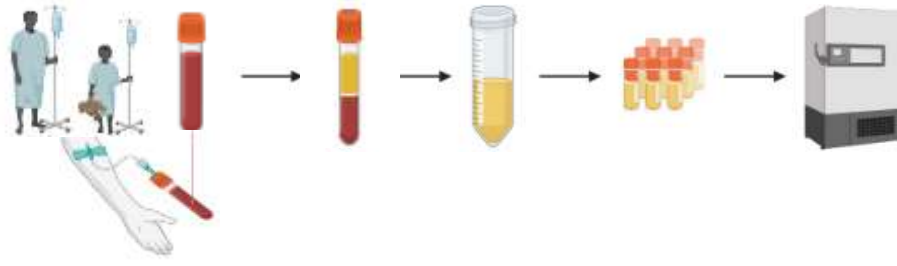
Tablo 3.4: Kan örneklerinin toplanmasında uygulanan protokol.

Örnek Tipi	Toplanan Hacim (ml)	Taşıma Sıcaklığı (°C)	Tüp Tipi
Tam Kan	10	-20	1.8 mg/mL K2E (EDTA)
Serum	10	-20	CAT (Clot Activator Tube)
Plazma	10	-20	1.8 mg/mL K2E (EDTA)

Kanın tamamını veya plazma örneklerini toplamak için antikoagülan/koruyucu madde içeren EDTA içeren vakutainer tüpleri kullanılır. Pıhtılaşmayı önlemek için tüpler nazikçe ters çevrilir ve on kez döndürülerek antikoagülanın tam kanla iyi karışması sağlanır. K2 Potasyum Tuzu içeren EDTA katkısı, vakutainerin iç yüzeyine stratejik olarak kaplanır ve pıhtılaşma sürecini etkili bir şekilde engeller. Öte yandan, serum örnekleri için CAT içeren Vakutainer Tüpleri özel olarak tasarlanmıştır. Bu tüpler silikon ve mikronize silika partikülleri ile kaplanmıştır, bu da pıhtılaşma sürecini kolaylaştırır ve hızlandırır. Tüpler ters çevrildiğinde ve karıştırıldığında, bu kaplamaların varlığı pıhtılaşmayı aktive eder ve serumun kandan ayrılmasını sağlar.

Serum

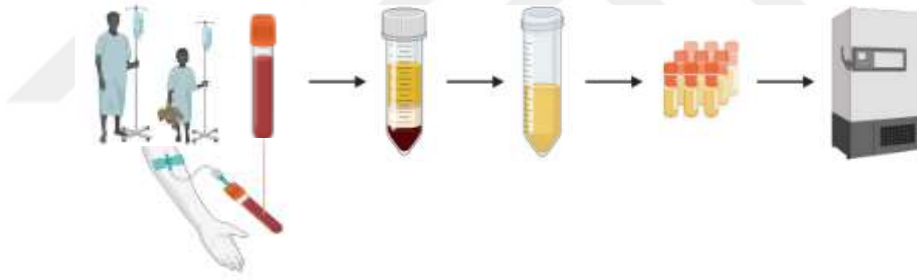
Kan örnekleri aç karnına serum ayrıştırıcı tüplere toplanır ve ardından buzda pıhtılaşma için 30 dakika, 60 dakikayı aşmamak üzere inkübe edilir, çünkü bu rezidüel metabolik aktiviteyi en aza indirir. Pıhtılaşma süresinden sonra, tüp 20 dakika boyunca 1100-1300 g hızında ve oda sıcaklığında santrifüjlenir. Üst tabakada görünen serum süpernatant olarak dikkatlice alıktılır ve bütünlüğünü korumak için -80°C'de saklanır, donma-çözünme döngülerini önleyerek (Şekil 3.7). Özel koleksiyon kitlerinin kullanımı, RNA veya DNA analizi gibi sonraki analiz gereksinimlerine bağlıdır.



Şekil 3. 7: Serum örneklerinin toplanma iş akışı.

Plazma

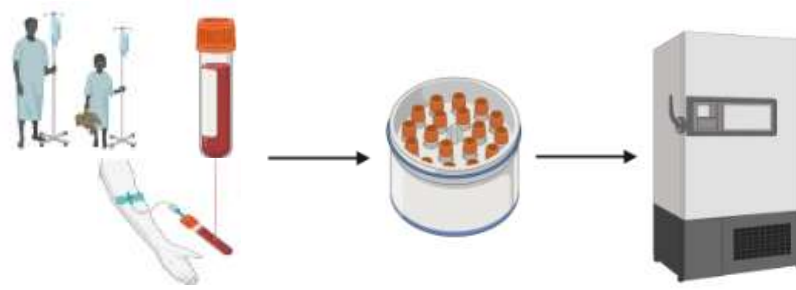
Plazma örnekleri için kan aç karnına EDTA içeren tüplere toplanmalıdır. Toplama sonrasında tüp 4°C'de 15 dakika boyunca $13,000 \times g$ hızında santrifüjlenerek süpernatant izole edilir. Süpernatant daha sonra alikotlanır. Serum örnekleri gibi, özel koleksiyon kitlerinin kullanımı amaçlanan sonraki analize göre değişir. Plazma kalitesini korumak için -80°C'de saklanır ve örnek bütünlüğünü korumak için donma-çözünme döngüleri önlenir (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8: Plazma örneklerinin toplanma iş akışı.

Tam Kan

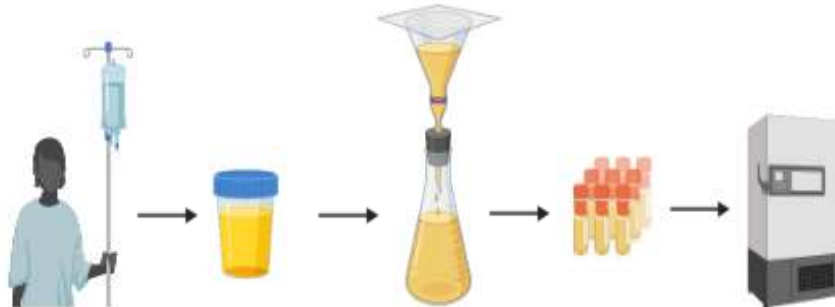
Tam kan biyobankacılığı için kan örnekleri aç karnına EDTA içeren tüplere toplanmalıdır. Toplama sonrasında kan alikotlanır ve örnek bütünlüğünü sağlamak, donma-çözünme döngülerini önlemek için -80°C'de saklanır (Şekil 3.9). Diğer kan bileşenleri gibi, özel koleksiyon kitlerinin seçimi RNA veya DNA analizi gibi belirli sonraki analiz gereksinimlerine bağlıdır.



Şekil 3. 9: Tam kan örneklerinin toplanma iş akışı.

İdrar

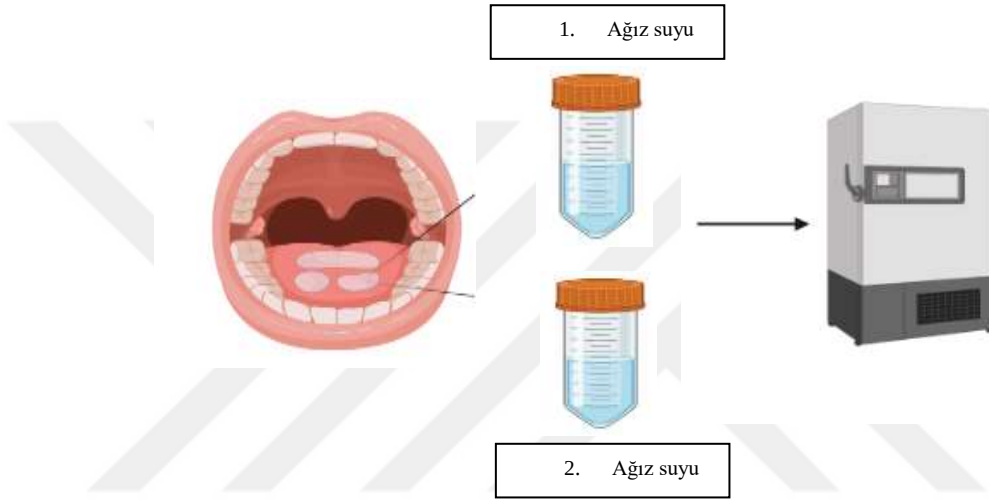
Biyobanka için, toplanan idrar örneklerinin tutarlılığını sağlamak amacıyla sabah idrar örneklerinin uygun olacağı kararlaştırılmıştır. Daha yoğun bir doğaya sahip idrar örnekleri için steril şeffaf idrar kapları tercih edilmiştir. İdrarı çoğu analiz için korumak amacıyla soğuk depolama kullanılmış, taşıma ise buz paketleri kullanılarak kolaylaştırılmıştır. Örnek depolama sırasında bakteriyostatik bir ajan olarak sodyum azid eklemesi yapılabilir. Özel koleksiyon kitlerinin seçimi, RNA, DNA veya diğer bileşenlerin dahil olup olmamasına bakılmaksızın amaçlanan sonraki analizlere dayalı olarak yapılmıştır. Her örnek, herhangi bir partikülü önlemek için 0.2 µm filtrasyondan geçirilmiştir. Ardından, örnekler 5 dakika boyunca 1000-3000 rcf hızında santrifüjlenmiş ve süpernatant dikkatlice alınmıştır. İşlenmiş örnekler ardından alikotlanarak -80°C'de saklanabilir, bütünlüklerini korumak için (Şekil 3.10). Örnek kalitesini korumak için donma-çözünme döngülerine maruz bırakmaktan kaçınılması önemlidir.



Şekil 3. 10: İdrar örneklerinin toplanma iş akışı.

Tükürük

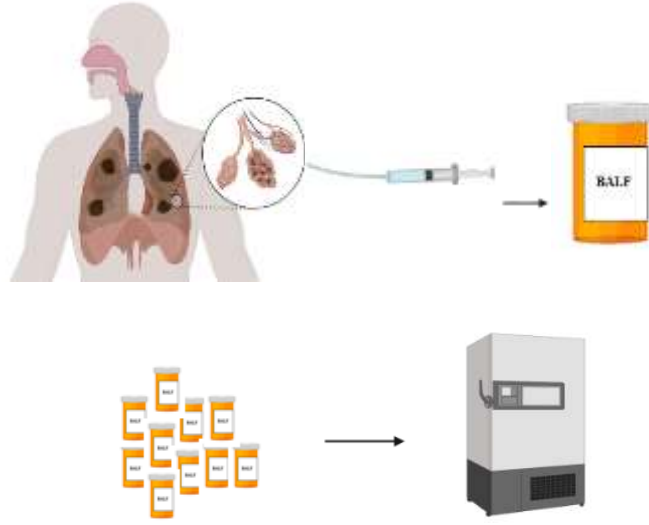
Tükürük örnekleri aç veya sigara içmeme koşullarında örnek tüplerine toplanır. Tükürük örnekleri her hastadan iki kez toplanmıştır. İlk örnek, ağız suyla çalkalanmadan önce alındı ve bu ilerde çalışılacak mikrobiyota analizi için depolandı. İkinci örnek, ağız suyla çalkalandıktan sonra toplandı ve doğrudan kanser çalışmaları için toplandı. Toplandıktan sonra örnekler -80°C derin dondurucuda, gelecekteki araştırma veya tanı amaçları için muhafaza edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11: Tükürük örneklerinin toplanma iş akışı.

Bronşiyal Alveoler Lavaj Sıvısı (BALF)

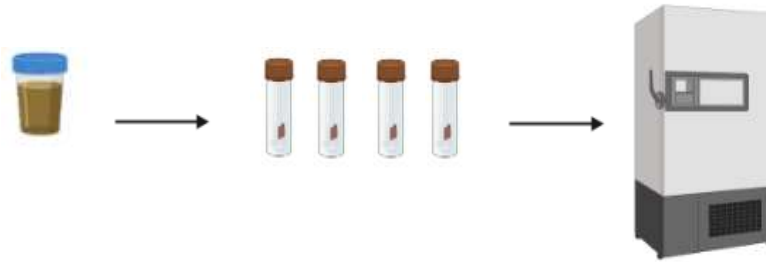
Bronşiyal alveoler lavaj sıvısı (BALF), steril tuzlu suyun her loba enjekte edilmesiyle akciğer loblarından ve dil alanından toplanır. Sıvı daha sonra nazik manuel emiş ile çekilir. Örnekleri korumak için taşıma sırasında kuru buz içinde tutulur. Laboratuvara ulaştığında BALF, gelecekteki analiz için bütünlüğünü korumak için -80°C'de saklanır (Şekil 3.12). Bu iyi korunmuş BALF örnekleri, çeşitli araştırma ve klinik uygulamaları için değerli kaynaklar olarak hizmet eder.



Şekil 3. 12: Bronkoalveolar lavaj sıvısının toplanma iş akışı.

Dışkı

Dışkı örneği toplama işlemi genellikle 1-2 gram tek bir noktadan alınır. Toplandıktan sonra örnek alikotlanır, böylece gelecekteki kullanım için uygun ve verimli şekilde işlenir. Örnek bütünlüğünü korumak ve moleküler bileşenlerini korumak için alikotlanmış dışkı örnekleri -80°C 'de saklanır (Şekil 3.13). Böylece, dışkı malzemesinin kalitesini ve canlılığını korumaya yardımcı olur ve geniş bir araştırma ve tanı uygulamaları yelpazesine uygun hale getirir.

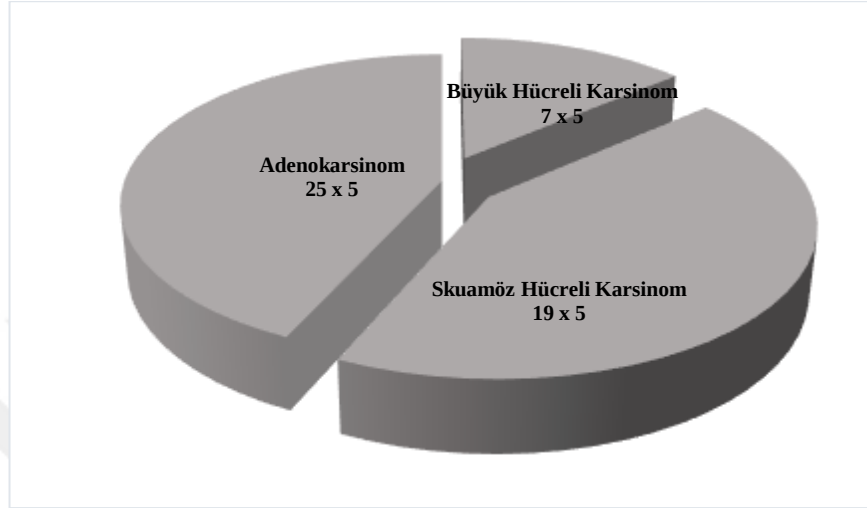


Şekil 3. 13: Dışkı örneklerinin toplanma iş akışı.

3.2.5. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Evreleme Bilgileri

Burada Şekil 3.14’de de belirtildiği gibi hasta örneklerinin histolojik olarak belli bir sınıfı çalışılmıştır. Patologlar tarafından histolojik sınıflandırmaları yapılan KHDAK hastalarının “Adenokarsinoma, Skuamöz Hücreli Karsinoma ve Büyük Hücreli

Karsinoma” olarak adlandırılan alt tipleri bu tez çalışmasında kullanılmaktadır. Burada çalışılması planlanan hasta sayısı adenokarsinoma için 19 hasta (95 örnek), skuamöz hücreli karsinoma için 25 hasta (110 örnek), büyük hücreli karsinoma 7 hasta (35 örnek) toplamda 51 hasta ve bu hastalara ait 255 örnektir (Tablo 3.5).



Şekil 3. 14: Çalışmaya dahil edilen hasta grupları ve örnek sayıları.

Tablo 3.5: Çalışmaya dahil edilen hastaların histolojik ve evreleme bilgisi.

HASTA SAYISI	HASTA NO	DOKU TİPİ	EVRELEME	STAGE - GRADE
1	1	Skuamöz Hücreli Karsinom	T3N0M0	2B-2
2	2	Adenokarsinom	T4N1M0	3A-3
3	4	Skuamöz Hücreli Karsinom	T2AN1M0	2A-2
4	5	Skuamöz Hücreli Karsinom	T2BN1M0	2B-3
5	8	Skuamöz Hücreli Karsinom	T3N0M0	2B-2
6	10	Skuamöz Hücreli Karsinom	T2AN0M0	1B-2
7	13	Adenokarsinom	T1BN0M0	1A-3
8	14	Adenokarsinom	T3N0M0	2B-3
9	16	Skuamöz Hücreli Karsinom	T4N0M0	3A-3
10	17	Skuamöz Hücreli Karsinom	T3N0M0	2B-2
11	21	Büyük Hücreli Karsinom	T4N0M0	3A-3
12	22	Skuamöz Hücreli Karsinom	T3N2M0	3A-3
13	23	Skuamöz Hücreli Karsinom	T2AN1M0	2A-2
14	24	Adenokarsinom	T4N2M0	3B-3
15	25	Skuamöz Hücreli Karsinom	T3N1M0	3A-2

16	26	Adenokarsinom	T1BN0M0	1A-2
----	----	---------------	---------	------

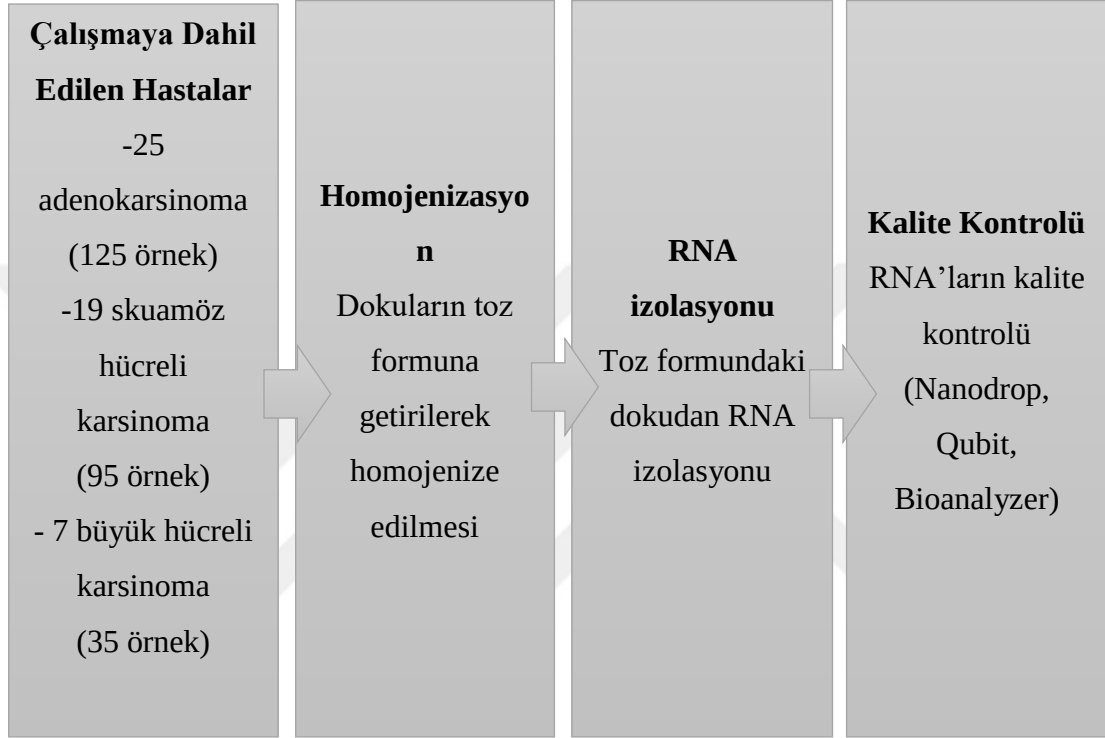
Tablo 3. 5: Çalışmaya dahil edilen hastaların histolojik ve evreleme bilgisi (devamı).

17	27	Adenokarsinom	T2AN0M0	1B-3
18	32	Adenokarsinom	T2AN0M0	1B-3
19	34	Büyük Hücreli Karsinom	T3N0M0	2B-3
20	35	Adenokarsinom	T3N0M0	2B-3
21	37	Skumöz Hücreli Karsinom	T2AN1M0	2A-2
22	38	Skumöz Hücreli Karsinom	T4N1M0	3A-2
23	39	Skumöz Hücreli Karsinom	T2BN1M0	2B-2
24	41	Adenokarsinom	T2BN0M0	2A-3
25	44	Adenokarsinom	T1BN0M0	1A-3
26	47	Adenokarsinom	T2AN0M0	1B-3
27	49	Adenokarsinom	T2AN0M0	1B-3
28	51	Skumöz Hücreli Karsinom	T2BN1M0	2B-2
29	54	Skumöz Hücreli Karsinom	T4N1M0	3A-2
30	55	Adenokarsinom	T3N0M0	2B-3
31	56	Skumöz Hücreli Karsinom	T3N0M0	2B-2
32	61	Adenokarsinom	T4N0M0	3A-3
33	63	Skumöz Hücreli Karsinom	T3N1M0	3A-3
34	68	Skumöz Hücreli Karsinom	T3N0M0	2B-2
35	70	Adenokarsinom	T3N0M0	2B-3
36	71	Skumöz Hücreli Karsinom	T2BN1M0	2B-2
37	78	Büyük Hücreli Karsinom	T3N0M0	2B-3
38	90	Adenokarsinom	T3N1M0	3A-3
39	102	Adenokarsinom	T3N2M0	3A-3
40	105	Adenokarsinom	T3N1M0	3A-3
41	120	Adenokarsinom	T2BN0M0	2A-2
42	121	Büyük Hücreli Karsinom	T2AN1M0	2A-3
43	123	Adenokarsinom	T4N0M0	3A-3
44	125	Adenokarsinom	T3N1M0	3A-3
45	129	Adenokarsinom	T2BN0M0	2A-3
46	133	Adenokarsinom	T2BN1M0	2B-2
47	135	Büyük Hücreli Karsinom	T2BN1M0	2B-3
48	139	Adenokarsinom	T3N0M0	2B-3
49	147	Büyük Hücreli Karsinom	T4N2M0	3B-3
50	168	Büyük Hücreli Karsinom	T2AN0M0	1B-3
51	179	Adenokarsinom	T2AN1M0	2A-2

3.2.6. Hasta Örneklerinin Karakterizasyonu

Hasta örneklerinin karakterizasyon iş akışı Tablo 3.6’da verilmiştir.

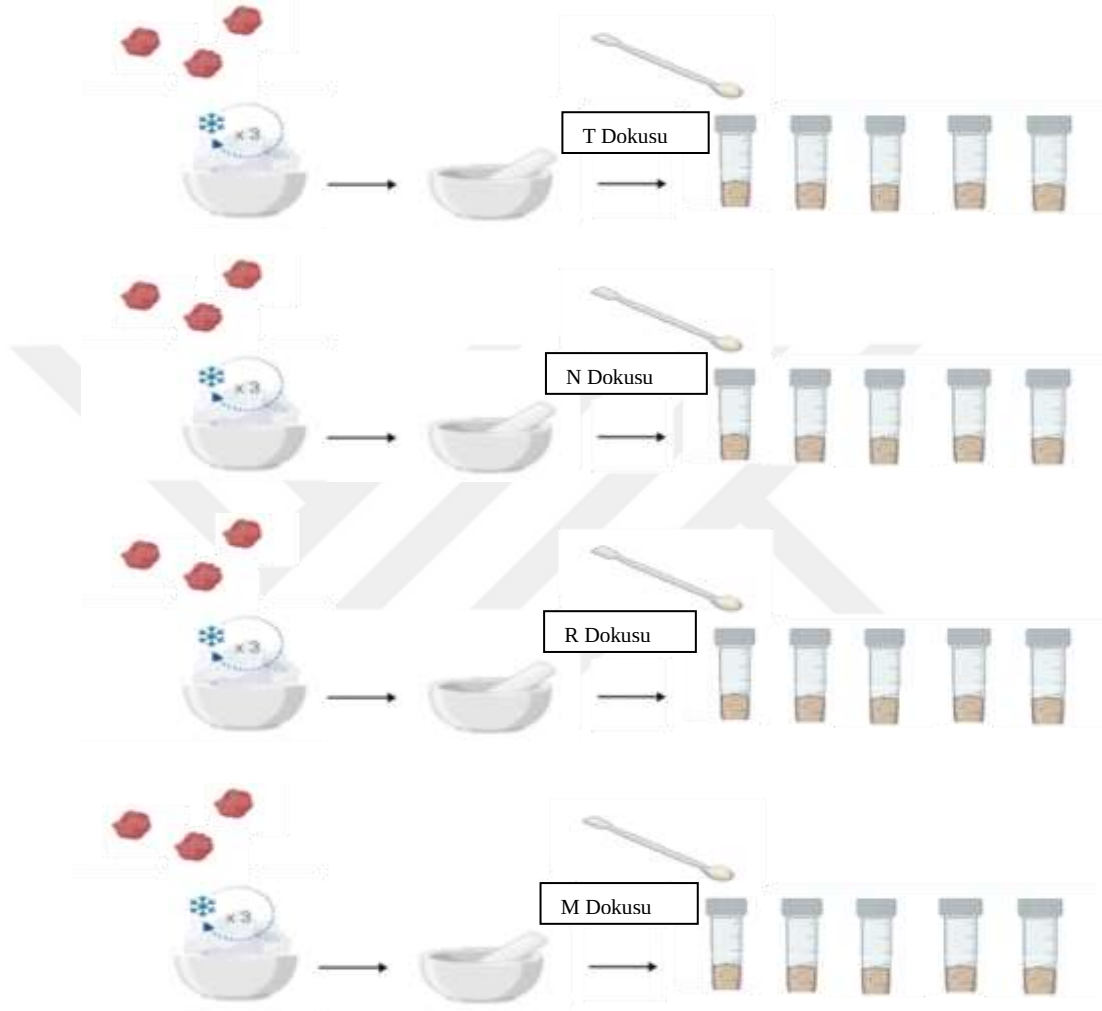
Tablo 3.6: Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerinin karakterizasyonundaki iş akışı.



3.2.6.1. Doku Homejenizasyonu

Biyobankada depolanan hasta örnekleri hastalığa yönelik herhangi bir tedavi almamış hastalardan alınan örneklerdir. Opere olan ve wedge rezeksiyon / segmentektomi / lobektomi / bilobektomi ya da pnömonektomi yapılan olgulardan elde edilen piyesler tümör dokusu, reaktif stroma olarak adlandırılan tümöre sınır doku, normal akciğer dokusu ve lenf dokusu olarak soğuk zincir dahilinde ayrıştırılmış örneklerdir. Her bir örnek ayrı ayrı uygun tüplere transfer edilerek küçük miktarlar halinde soğuk zincir dahilinde biyobankaya ulaştırılmıştır. Doku örnekleri, RNase-free ortam koşulları altında sıvı nitrojen içerisinde toz haline getirilmiştir. Burada steril havan, tokmak, tek kullanımlık malzemeler kullanılmaktadır. Örnekler arası çapraz kontaminasyonun önüne geçebilmek adına işlemlerin hepsi laminar flow kabin altında yapılmıştır. Her bir doku toz haline getirildikten sonra tüm malzemeler dışarı alınarak, kabin çamaşır

suyu ve zap ile silenerek ardından diğ er örnek  alışılımlış ve işlem gün içinde maksimum 4 örnek (aynı hastaya ait örnekler) için tekrarlanmıştır. Böylelikle hastalar arası çapraz kontaminasyon da  nlenmiřtir (şekil 3.15).



şekil 3. 15: Doku  rneklerinin Rnase-free ortam koşulları altında sıvı nitrojen içerisinde toz haline getirilmesi.

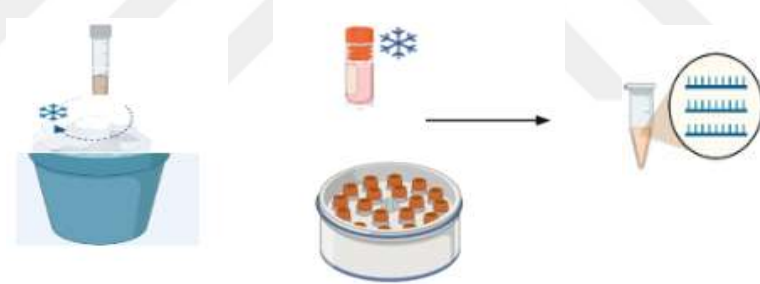
3.2.6.2. Total RNA  zolasyonu Ve Kalite Parametrelerinin  l  lmesi

Dondurulmuş tümör dokularından (KHDAK tümör doku, reaktif stroma olarak adlandırılan tümöre sınır doku, normal akciğ r dokusu ve lenf dokusu) ve dondurulmuş tam kan örneklerinden RNA izolasyonu için sırasıyla PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™) #12183018A, Quick-RNA Whole Blood (Zymo research)

#R1201 kitleri kullanıldı. RNA izolasyonu laminar flow kabin içerisinde ve doku toz forma getirildikten hemen sonra yapıldı. Kandan RNA izolasyonu da laminar flow kabin içerisinde tüm doku çalışmaları bittikten sonra aynı hastalara ait frozen kanlar kullanılarak yapıldı. Total RNA'nın kalitesi Agilent RNA 6000 Nano Reagents #5067-1511 kiti ile, Bioanalyzer 2000 (Agilent) cihazında, RNA çip kullanılarak kontrol edildi. RIN (RNA Integration Number) değerinin 7 veya üzeri olmasına, RNA sağlamlığı açısından dikkat edildi. Kalitesinden emin olunan total RNA örneklerinden öncelikle, Qubit RNA BR (Broad-Range) Assay Kiti #Q10210 kullanılarak Qubit cihazı ile miktar tayini yapıldı, A260/280 ve A260/230 değerleri spektrometre ile ölçülerek kalite parametrelerine bakıldı.

3.2.6.2.1. Ezilmiş Dokudan Ve Tam Kandan RNA İzolasyonu

Toz formuna getirilen dokulardan ve dondurulmuş tam kan örneklerinden RNA izolasyonu için sırasıyla PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™) #12183018A, Quick-RNA Whole Blood (Zymo research) #R1201 kitleri kullanılmıştır (Şekil 3.16).

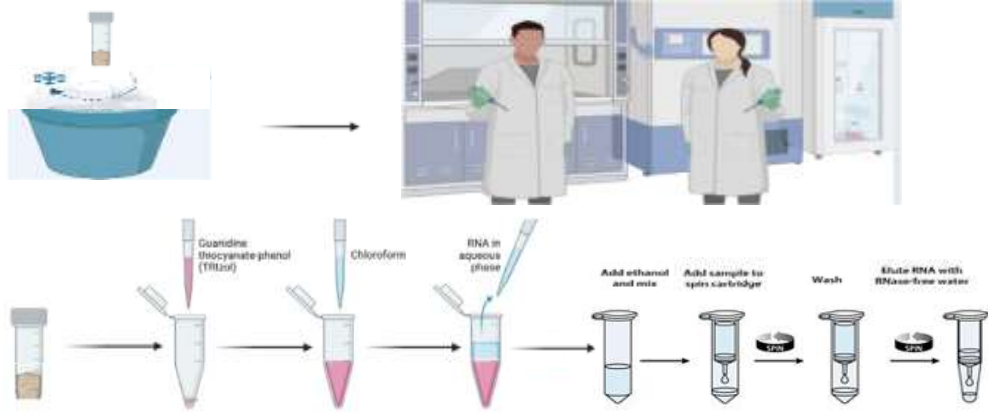


Şekil 3. 16: Dondurulmuş toz formundaki dokudan ve dondurulmuş kandan RNA eldesi.

Dokudan RNA İzolasyonu

1. Ezilen dokuya ait tozun bulunduğu cryotüp sıvı nitrojen içerisinde laboratuvara RNA izolasyonu yapılacak kabin içersine getirilir.
2. Ortam ve kullanılacak pipetler Zap ile temizlenir. Pipet uçları steril ve filtrelidir.
3. Cryotüp sıvı nitrojen içersinden alınır ve içersine 1 mL Trizol Reagent eklenir. 1 mL'lik pipet yardımı ile 6 dakika boyunca pipetleme yapılır. Burada yeterli pipetlemeyi yapmak önemlidir.

4. 6 dk'lık pipetlemenin ardından üzerine 0.2 mL kloroform eklenir. 3 dk boyunca elimizde çok yavaş bir şekilde tüp alt üst yapılır. Kesinlikle pipetleme ya da vortex yapılmaz. Fazla karıştırılırsa DNA kontaminasyonuna sebep olmaktadır.
5. 3 dk ardından 4 derecede 12.500xg de 15 dk santrüfjüj edilir.
6. Santrüfjüj sonrası üst faz (renksiz faz) RNase-free tüp içersine aktarılır. Bu yaklaşık 600 µL kadardır.
7. Bu tüp üzerine eşit hacimde 70% EtoH eklenir. Vortexlenir.
8. Total 1200 µL olan örnek 600 µL + 600 µL olarak iki kerede kolona aktarılır ve oda sıcaklığında 12.500xg de 15 saniye santrüfjüj edilir.
9. Kolondan geçen sıvı kısım atılır.
10. Kolon üzerine 700 µL Wash 1 buffer eklenir. 12.500xg de 15 saniye santrüfjüj edilir. Kolondan geçen sıvı kısım atılır.
11. Kolon üzerine 500 µL Wash 2 buffer eklenir. 12.500xg de 15 saniye santrüfjüj edilir. Kolondan geçen sıvı kısım atılır.
12. En son basamak tekrar edilir.
13. Filtreli kolon RNase-free tüp içersine alınmalıdır.
14. RNase-free sudan 40 µL kolona eklenerek 8-10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmelidir.
15. Oda sıcaklığında 12.500xg de 2 dk santrüfjüj edilmelidir.
16. Tüp içersine saflaştırılan RNA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere “3 adet 10 µL”ve “1 adet 5 µL” olarak alikotlanmalıdır. RNA kullanılıncaya kadar -80°C’de muhafaza edilir.
17. RNA, miktar ve kalite ölçümü için nanodrop, gel elektroforez, bioanalyzer uygulamalarında kullanılır (Şekil 3.17).

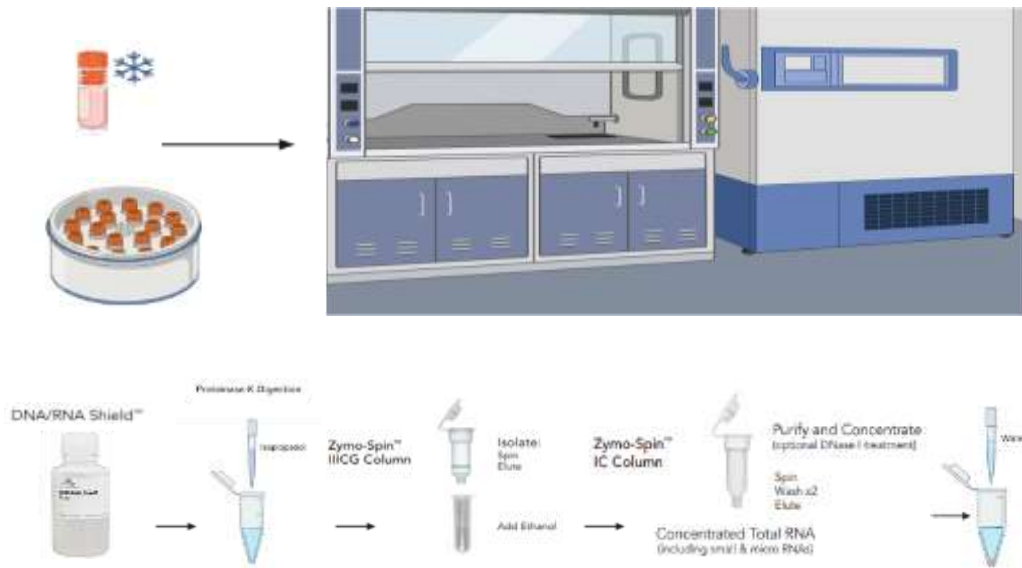


Şekil 3. 17: Dondurulmuş toz formundaki dokudan RNA izolasyon aşamaları.

Tam Kandan RNA İzolasyonu

1. Tam kan örneği hastanede soğuk zincir korunarak alınır ve -80°C 'de muhafaza edilir.
2. 200ul'lik alikotlu tüpler Quick-RNA Whole Blood (Zymo research) #R1201 kiti için uygundur.
3. Tam Kan'ın bulunduğu cryotüp buz içersinde laboratuvara RNA izolasyonu yapılacak kabin içersine getirilir.
4. Ortam ve kullanılacak pipetler Zap ile temizlenir. Pipet uçları steril ve filtrelidir.
5. Kan çözülmeden üzerine eşit miktarda DNA/RNA shield eklenir. Tamamen karıştırılır.
6. Üzerine 8 μL Proteinaz K eklenir ve vortexlenir. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir.
7. Son hacim kadar isopropanol eklenir ve vorteklenir.
8. Karışım Zymo-Spin IIICG Column içersine alınır ve $15.000\times g$ 'de 30 saniye santrüfjü edilir. Kolon RNase-free tüp içersine alınır.
9. 200 μL RNA Recovery Buffer kolon içersine eklenir ve $15.000\times g$ 'de 30 saniye santrüfjü edilir.
10. Tüp içersinde toplanan örnek üzerine 200 μL Ethanol (%100) eklenir ve vortekslenir.

11. Karışım Zymo-Spin IC Column içersine alınır ve 15.000xg'de 30 saniye santrüfuj edilir.
12. Alt kısımda toplanan sıvı atılır.
13. 400 µL RNA Prep Buffer kolona eklenir ve 15.000xg'de 30 saniye santrüfuj edilir.
14. Alt kısımda toplanan sıvı atılır.
15. 700 µL RNA Wash Buffer kolona eklenir ve 15.000xg'de 30 saniye santrüfuj edilir.
16. Alt kısımda toplanan sıvı atılır.
17. 400 µL RNA Wash Buffer kolona eklenir ve 15.000xg'de 2 dk santrüfuj edilir.
18. Boş olarak son bir kez 15.000xg'de 2 dk santrüfuj edilir.
19. Kolon RNase-free bir tüp içersine yerleştirilir ve üzerine 15 µL DNase/RNase-free su eklenir. 8-10 dk oda sıcaklığında bekletilir. 15.000xg'de 2 dk santrüfuj edilir.
20. Tüp içersine saflaştırılan RNA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere "1 adet 10 µL"ve "1 adet 5 µL" olarak alikotlanmalıdır. RNA kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilir.
21. RNA, miktar ve kalite ölçümü için nanodrop, gel elektroforez, bioanalizer uygulamalarında kullanılır (Şekil 3.18).



Şekil 3. 18: Dondurulmuş tam kandan RNA izolasyon aşamaları.

3.2.6.2.2. Elde edilen RNA'ların Kalite Kontrolü (Saflık ve Bütünlük Kontrolü)

Nanodrop (Mikro) Spektrofotometre Ölçümü

Nanodrop cihazında ölçüm yaparken öncelikle cihazın probu distile su ile temizlenir.

260/280 ve 260/230 için ölçüm sırası;

-1µL dH₂O

-1µL Blank

-1µL RNA örneği ile ölçüm yapılır.

Qubit Florometrik Ölçümü

- Nükleik asitlerin florometrik ölçümünde kullanılan boya 1X olarak hazırlanır.
- Her bir RNA örneği için boya ilave edilen tüpler hazırlanır.
- Kitin İçindeki standartlar kullanılarak floresans ölçüme dayalı değerler RNA için saptanır. Standartlar referans noktası vermektedir.

Hesaplama;

(RNA ve DNA'nın boyası ayrıdır)

- Boya 200X'dir. 1X olarak kullanılır.
- Boya + mix solüsyonundan herbir tüpe 199 µL koyulur.
- Standart tüplerine 190 µL bufferlı karışımdan koyulur.
- Standartlar 10 µL, örnekler 1 µL kullanılır.

Florometrik ölçüm alınır.

Formaldehitli RNA jeli Hazırlama

- DEPC su otoklavlandıktan sonra mezür yardımı ile 36 mL olarak ayarlanır.
- Küçük bir erlen içersinde 500mg Ultra-Pure Agarose tartılır. Üzerine 36 mL DEPC su eklenir.
- Mikrodalga fırın içersinde eritilir.
- Elle tutulacak kadar soğuduğunda üzerine 9ml %37 Formaldehit ve 5 mL 10X MOBS eklenir. Kaset içersine dökülür ve tarak yerleştirilir.
- Buffer olarak 1X MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) kullanılır (9X DEPC su + 1X kadar 10X MOBS) (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: 10X MOPS için gerekli malzeme miktarları.

Malzemenin Molaritesi	Malzemenin Adı	Miktarı
0,4 M	MOPS	8,37g
0,1 M	Sodium acetate	1,36 g
0,01 M	EDTA	0,37g
80 mL DEPC (Diethyl pyrocarbonate),su eklenir. NaOH kullanılarak pH:7'ye ayarlanır. Daha sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır. +4°C'de muhafaza edilir.		

RNA örneklerinin Hazırlanması

- Isıtıcı blok kullanılarak 70°C'de 10 dk denatüre edilir.
- Bir dk buzda bekletilerek örnekler (Tablo 3.8) jel elektroforezinde yürütülür ve incelenir.

Tablo 3.8: Her RNA tüpü için tüpe eklenmesi gereken malzeme miktarları.

RNA	2 µL
Loading Dye	1 µL
1X MOPS	4 µL
EtBR (0,1 mg/mL)	1 µL
Formaldehit	3 µL
DEPC su	4 µL

Bioanalizer Sistemi

RNA'nın bütünlük kontrolü için kullanılan RNA boyutlarının ölçüldüğü bir kalite kontrol analiz sistemidir. Burada kullanılan kit Agilent RNA 6000 Nano kiti kullanılır. Örnekler 1 µL kullanıldığı için 1,5 µL alikotlama yapılır. Ladder alikotlama için RNase-free tüp kullanılır. Önce tüm tüp içindeki Ladder bir ependorf tüpe aktarılır. Kullanmadan önce 70°C'de 2 dk denatüre edilir. Alikotlanır ve -80°C'de denatüre halde saklanır! Ladder için totalde 20 adet tüp yazılır ve 1,5 µL tüplere alikotlanır. Ölçüm için konsantrasyon aralığı 25-500 ng olacak şekilde örnekler dilüe edilir. Örnekler kullanılmadan önce stoklarından 2 µL alınarak tüplere aktarılır. Yoğun olanlarda dilüe edilerek 2 µL alınarak tüplere aktarılır. Bu örnekler 70°C'de 2 dk denatüre edilir.

Çip için Jel Hazırlama

Kit içersinden çıkan kırmızı başlıklı tüp 550 µL filtreden geçirilir. 1.500xg'de 10 dk santrüfjüj edilir. 65 µL tüplere dağıtılır. Totalde 7 adet çıkar. Mavi kapaklı Dye 1 µL (karanlıkta tutulur) jelin içine eklenir ve vortexlenir. 13.000xg de 10 dk santrüfjüj edilir. Bu esnada cihaz açılır. Cihazın yıkama işlemi yapılır. Bunun için 3 adet yıkama çipleri kullanılır. 1. yıkama çipine 350 µL alt köşeden dH₂O verilir, cihaza koyup kapatılır. 1 dk beklenir. 2. yıkama çipine 350 µL ZAP alt köşeden verilir, cihaza koyup kapatılır. 1 dk beklenir. 3. yıkama çipine 350 µL alt köşeden dH₂O verilir, cihaza koyup kapatılır, 1 dk beklenir. Çipler kullandıktan sonra silkelenir ve kaldırılır. Deneye başlamadan önce ve bittikten sonra kesinlikle yıkama işlemi yapılmalıdır, yoksa cihaz işlem sırasında hata verir. Yıkama yapıldıktan sonra cihazın kapağı kuruması için açık bırakılır. Çip yükleme şırıngası RNA için en üst kısma getirilir. Nükleik asit için ise şırınganın taban kısmı C'de olmalıdır. Bilgisayar üzerinden 2100 Expert Programı açılır.

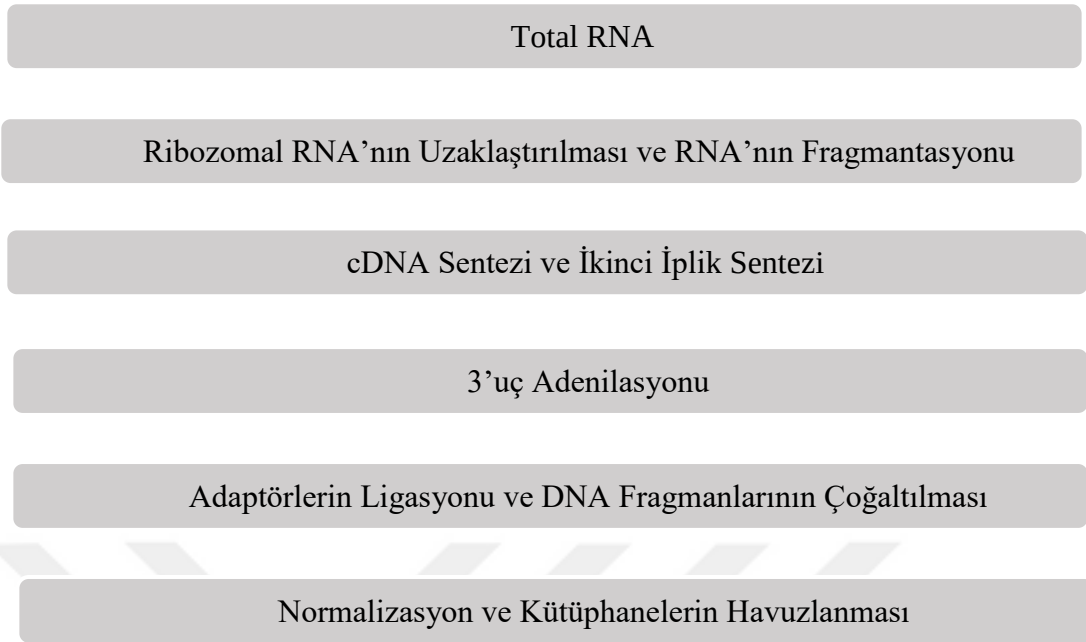
Örnekleri Cihaza Yükleme İşlemi

Jel-dye mix 9 µL olarak çip üzerinde G yazan kuyuya yüklenir. Şırınga 1 mL'deyken kapatılır ve mandalın altına kadar bastırılır. 30 saniye tutulur ardından mandal açılır. 1 yazan kısma gelmesi beklenir. 0,7'nin üstüne geldikten sonra elimizle 1'e doğru çekilir. 9 µL gel-dye mix diğer 2 adet G kuyularına sırasıyla koyulur. Her bir kuyuya 5 µL referans koyulur. Bu marker başlangıç ve bitiş belirteçleri için kullanılır. Merdiven de dahil olmak üzere 13 kuyu doldurulur. Merdive 1 µL ladder koyulur. Ardından örnekler 1 µL yüklenir. 1.200xg de 2 dk vortexlenir. Bilgisayar üzerinden 2100 Expert Programı açılır. Assay olarak RNA, çip tipi olarak ökaryot Total RNA Nano programı seçilir. Çip cihaza yerleştirilir ve program başlatılır.

3.2.7. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Transkriptom Dizilenmesi

RNASeq dizileme kütüphanesinin hazırlanması: TruSeq® Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Rat #20020597 Kiti (Illumina), kütüphanelerin hazırlanmasında kullanıldı. Tablo 3.9'da iş akışı verilmiştir.

Tablo 3.9: RNA-Seq kütüphane hazırlığındaki iş akışı.



RNA Seq kütüphane hazırlığında kullanılan kitler, kodlama yapan ve kodlama yapmayan RNA'ların analizine olanak sağladığı için seçilmiştir. Yeterli kalite parametrelerini tutturarak ve sağlamlığı doğrulanan total RNA örneklerinin her biri 1 µg/10 µL olacak şekilde RNASeq kütüphane hazırlığı için kullanıldı. Hem sitoplazmik hem de mitokondriyal ribozomal RNA'ları uzaklaştırıp, mRNA ile small RNA kısmını ayırtmak için hedef-spesifik oligolarla etiketli streptavidin boncukları kullanıldı. Ayırıştırılan RNA, enzimatik yöntemle (yaklaşık 300 nt) kesildi. Kesilen RNA parçaları, random hexamerler kullanılarak SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) enzimi ile cDNA'ya çevrilecek ve ardından DNA Polimeraz I ve RNase H kullanılarak, dUTP'nin ikinci zincir sentezine dahil edilmesiyle ikinci sarmal cDNA sentezi tamamlandı. Fragmanların 3' ucuna tek bir "A" nükleotidi eklenerek adenilasyonu sağlandı. Böylece adaptörün 3' ucunda bulunan tek bir "T" nükleotidi için tamamlayıcı bir çıkıntı sağlandı ve adaptör bağlanması gerçekleştirildi. İndekslenmiş ve adaptör eklenmiş parçalar, AgentCourt Ampure XP (Beckman Coulter) boncukları kullanılarak büyüklük ve adaptör temizliğine tabi tutuldular. PCR amplifikasyonu ile DNA fragmanları her iki uçtaki adaptör molekülleri ile seçici olarak zenginleştirildi. Metodolojisi kısaca özetlenen bu kütüphane hazırlık çalışması için takip edilen yöntemin teknik ayrıntıları aşağıda detaylı olarak belirtilmiştir.

3.2.7.1. RNA Seq Kütüphane Hazırlık Protokolü

rRNA'nın Uzaklaştırılması Ve cDNA Sentezi

1. RRM (rRNAremoval mix), EPH (Elute, Prime, Fragment High Mix), RBB (rRNAbindingbuffer), RRB (RRNA removalbeads), PCR plakları, RNA Clean XP, AMPure XP, EB (Elutionbuffer) oda sıcaklığına getirilir.
2. Total RNA örneklerinin her biri 1 µg/10 µL olacak şekilde 96 kuyulu PCR plağına aktarılır.
3. 5 µL RBB (rRNAbindingbuffer) her bir kuyu üzerine eklenir.
4. 5 µL RRM (rRNAremoval mix) her bir kuyu üzerine eklenir.
5. Totalde 20 µL olan her bir kuyunun karışması için 6 kere pipetleme yapılır ve plak seal ile kapatılır.
6. PCR cihazında 68°C'de 5 dk inkübe edilir.
7. Ardından 1 dk oda sıcaklığında bekletilir.
8. 35 µL RRB (RRNA removalbeads) her bir kuyu üzerine eklenir.
9. Totalde 55 µL olan her bir kuyunun karışması için 6 kere pipetleme yapılır.
10. Plak magnetik stand üzerine alınır ve 5 dk bekletilir.
11. Şeffaf renk olan 50 µL'lik süpernatant kısmı yeni plak üzerine aktarılır ve bu beadler ile ribozomal RNA'lar uzaklaştırılmış olur.
12. 99 µL RNA Clean XP her bir kuyu üzerine eklenir ve kuyunun karışması için 6 kere pipetleme yapılır. 10 dk bekletilmelidir.
13. Ardından magnetik stand üzerine alınarak 5 dk bekletilir.
14. 150 µL supernatant çekilip atılır.
15. Üzerine yıkama işlemi için %70 alkol ekleyip 30 saniye bekletilir ve 200 µL çekilip atılır. Bu işlem iki kere tekrarlanır. 5 dk kuruması için bekletilir.
16. 11 µL EB (Elution buffer) her bir kuyu üzerine eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.
17. Ardından magnetik stand üzerine alınır. 8,5 µL supernatantlar yeni bir PCR plak üzerine aktarılır.

18. 8,5 µL EPH (Elute, Prime, Fragment High Mix) her bir kuyu üzerine eklenir. 6 kere pipetleme yapılır ve plak seal ile kapatılır.

19. 94°C’de 2 dk inkübe edilir.

20. Plak üzerindeki seal kaldırılır ve her bir kuyuya Superscript II Transcriptase + Buffer karışımından 8 µL dağıtılır. cDNA sentezi için PCR reaksiyonu başlatılır.

İkinci Zincir cDNA Sentezi

1. PCR sonrasında 5 µL RSB (Resuspension buffer) her bir kuyu üzerine eklenir.
2. Ardından 20 µL SMM 2nd strandMarkingMix eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır ve plak seal ile kapatılır, ikinci zincir cDNA sentezi için PCR reaksiyonu başlatılır.
3. Reaksiyon sonrası 90 µL Ampure XP beads her bir kuyuya eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.
4. Magnetik stand üzerine alınır ve 10 dk bekletilir. Ardından 135 µL supernatan çekilip atılır.
5. Yıkama işlemi için her bir kuyuya 200 µL %80 EtOH (Ethanol) eklenir. 30 saniye sonra çekilir ve atılır. Bu işlem iki kere tekrarlanır.
6. 5 dk kuruması için bekletilir. Kuyuların her biri 17,5 µL RSB (Resuspension buffer) ile çözülür.
7. Magnetik stand üzerine alınır. 5 dk beklenir. 15 µL supernatan yani cdna yeni bir 96 kuyulu PCR plağına aktarılır.
8. -20°C’de muhafaza edilebilir.

A-tailing Sentezi

1. Plak 280 xg’de kısa bir şekilde spin edilir.
2. 12,5 µL A-tailing mix her bir kuyuya eklenir.
3. 2,5 µL RSB (Resuspension buffer) her bir kuyuya eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.
4. A-tailing sentezi için PCR reaksiyonu başlatılır.

Adaptörlerin Bağlanması

1. Örneklerin bulunduğu 96 kuyulu plağın her bir kuyusuna 2,5 µL RSB (Resuspension buffer) eklenir.
2. Farklı barkodlara sahip adaptörlerin bulunduğu plaktan 2,5 µL alarak örneklerin üzerine aktarılır.
3. 2,5 µL Ligationmix her bir kuyu üzerine eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.

4. PCR cihazında 30°C’de 10 dk inkübe edilir.

DNA Fragmanlarının Çoğaltılması

1. 5 µL Stop Ligation Buffer her bir kuyuya eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.
2. 42 µL AMPurebead her bir kuyuya eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.
3. Magnetik stand üzerine alınır ve 10 dk bekletilir. Ardından 79,5 µL supernatan çekilir ve atılır.
4. Yıkama işlemi için her bir kuyuya 200 µL %80 EtOH eklenir. 30 saniye sonra çekilir ve atılır. Bu işlem iki kere tekrarlanır.
5. 5 dk kuruması için bekletilir. Kuyuların her biri 52,5 µL RSB (Resuspension buffer) ile çözülür.
6. Magnetik stand üzerine alınır. 5 dk beklenir. 50 µL supernatan yeni bir 96 kuyulu PCR plağına aktarılır.
7. 50 µL AMPurebead her bir kuyuya eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.
8. Magnetik stand üzerine alınır. 5 dk beklenir. 95 µL supernatan çekilir ve atılır.
9. Yıkama işlemi için her bir kuyuya 200 µL %80 EtOH eklenir. 30 saniye sonra çekilir ve atılır. Bu işlem iki kere tekrarlanır.
10. 5 dk kuruması için bekletilir. Kuyuların her biri 22,5 µL RSB (Resuspension buffer) ile çözülür.
11. Magnetik stand üzerine alınır. 5 dk beklenir. 20 µL supernatan yani örnekleri yeni bir 96 kuyulu PCR plağına aktarılır.
12. 25 µL PCR master mix ve 5 µL PCR Primercocktail her bir kuyuya eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır. DNA fragmanlarının çoğaltılması için PCR reaksiyonu ile başlatılır.
13. Reaksiyon sonrası 47,5 µL AMPure XP bead her bir kuyuya eklenir ve 6 kere pipetleme yapılır.
14. Magnetik stand üzerine alınır ve 10 dk bekletilir. Ardından 95 µL supernatan çekilip atılır.
15. Yıkama işlemi için her bir kuyuya 200 µL %80 EtOH eklenir. 30 saniye sonra çekilir ve atılır. Bu işlem iki kere tekrarlanır.
16. 5 dk kuruması için bekletilir. Kuyuların her biri 32,5 µL RSB (Resuspension buffer) ile çözülür.
17. Magnetik stand üzerine alınır. 5 dk beklenir. 30 µL supernatan yeni bir 96 kuyulu PCR plağına aktarılır.

18. +4°C’de muhafaza edilebilir.

Kütüphanenin nihai kalite kontrol analizi, Agilent High Sensitivity DNA Kiti #5067-4626 kullanılarak Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer cihazında kontrol edilerek yapıldı. Burada beklenen parça büyüklüğü ortalama 420 nt (300 nt DNA parçası + adaptör + index) civarındadır. Cluster hesaplaması için, kütüphanelerin KAPA Biosystems Library Quantification Kiti ile, RT-PCR (ABI) cihazında miktarları tayin edildi.

3.2.7.2. Bioanalyzer Cihazında RNA Seq Kütüphanesinin Kalite Kontrolü Protokolü

1. Agilent High Sensitivity DNA Kiti #5067-4626 kullanıldı. High sensitivity DNA için kütüphane örneklerinin 1:5 dilusyon oranı kullanılır. İstenilen konsantrasyon aralığı 10 pg-5 ng arasında olmalıdır.
2. Gel-Dye mix hazırlığı için kit içerisinde bulunan mavi tüpten 15 µL kırmızı tüpe aktarılır ve vortekslenir. 2.250xg’de 15 dk santrüfjü edilir ve 50 µL alikotlar halinde kullanılır.
3. Jel-dye mix 9 µL çekilerek çip üzerindeki G kuyusuna yüklenir.
4. Çip şırınga içerisine yerleştirilir ve 1 mL’deyken kapatılarak bastırılır. 60 saniye bekletilir ve ardından şırınganın mandalı serbest bırakılır.
5. 9 µL gel-dye mix diğer 3 adet G kuyularına sırasıyla koyulur.
6. Her bir kuyuya 5 µL referans koyulur. Bu marker başlangıç ve bitiş belirteçleri için kullanılır. Merdiven de dahil 13 kuyuya eklenir.
7. Merdiven 1 µL ladder koyulur. Ardından kütüphane örneklerinin her biri 1 µL olarak kuyulara yüklenir.
8. 1.200 xg’de 2 dk vortexlenir.
9. Bilgisayar üzerinden 2100 Expert Programı açılır. Assay olarak DNA, çip tipi olarak High sensitivity DNA seçilir. Çip cihaza yerleştirilir ve program başlatılır.

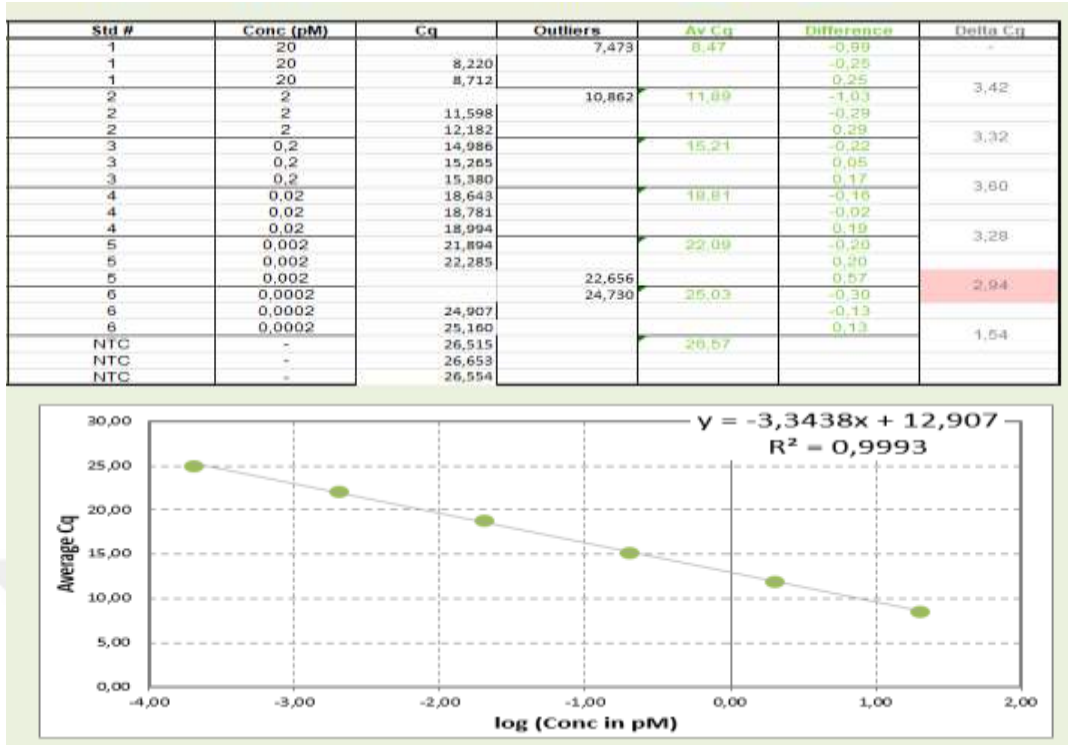
3.2.7.3. RNA Seq Kütüphanesinin Miktar Tayini

Cluster hesaplaması için, kütüphanelerin KAPA Biosystems Library Quantification Kiti ile, RT-PCR (ABI) cihazında miktarları tayin edildi. Illumina bağlanma

adaptörlerine tanımlı universal probe kullanılıyor. Dolayısıyla fragmanların ucuna sağlıklı bir şekilde takılan adaptörleri amplifiye edebilmektedir.

RT-PCR Reaksiyonu Hazırlama Protokolü

1. Kütüphane örneklerinin dilüsyonu için EB (Elution Buffer) + % 0,05 Tween karışımı kullanılır.
2. RNase-Dnase free 96 kuyulu plak içerisine kütüphane örneklerinin 1:20, 1:40, 1:400, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 oranlarında dilüsyonları hazırlanır.
3. KAPA Biosystems Library Quantification Kiti içerisinden çıkan KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix ve Library quantification Primer Premix tüpleri birleştirilerek karıştırılır.
4. 96 kuyulu reaksiyon plağına 16 µL master mix karışımı, 4 µL örnek dağıtılır.
5. Her bir örnek triplike çalışılır. Kitin içerisinde yer alan 6 adet standart ve negatif kontrol piklerin ve konsantrasyonun yerini belirlemek için kullanılır.
6. Applied Biosystems® ViiA 7 Software v1.2 ile Real-time PCR çalıştırılır.
7. Hazırlanan tüm RNA-Seq kütüphanesinin konsantrasyon tayini bu yöntem ile yapılmıştır.
8. Örneklerin KAPA kütüphane hazırlama excell data sheeti kullanılarak nM cinsinden miktarları tayin edildi. Kullanılan excell data sheetinde öncelikle standart hesaplaması ve testin güvenilirliği her seferinde Şekil 3.19'daki gibi test edilmiştir.



Şekil 3. 19: Kütüphanenin miktar tayininde kullanılan güvenilirlik eğrisi

3.2.7.4. RNA Seq Kütüphanesinin Havuzlanması

RNASeq kütüphanelerinin havuzlanması: RNAseq kütüphanelerinin okuma derinliklerinin hesaplanarak havuzlanması gerekir. Burada örnek başı hedeflenen okuma derinliği 50 milyondur. Hiseq 2500 ve Novaseq 6000 cihazlarında kullanılan flowcell kapasitesine uygun olarak hesaplama yapılmıştır. Hiseq 2500 cihazında high output mode için kullanılan flowcell ve Novaseq 6000 cihazı için kullanılan S1 tipi flowcell Şekil 3.20’de belirtilmiştir.



Şekil 3. 20: HiSeq 2500 Output mode ve Novaseq 6000 S1 Mode flowcell.

Illumina'nın kendi yazılımı olan "Sequencing Coverage Calculator" kullanılarak hedeflenen okuma derinliklerine uygun biçimde flowcell'e yüklenmesigereken örnek sayısı hesaplanmıştır. Hesaplama pencereleri Şekil 3.21 ve Şekil 3.22'de belirtilmiştir.

Application or product: Total RNA-seq

Minimum number of clusters/reads (on target, human): explain this 50 million clusters

Total read length (e.g. 200 for 2x100): recommendation 150 cycles

Benchtop Sequencers

☐ iSeq

☐ MiniSeq

☐ MiSeq / MiSeq Dx in RUO mode

☐ NextSeq 500/550

Production-Scale Sequencers

☐ NextSeq 500/550

☐ NovaSeq 6000

☐ HiSeq 3000/4000

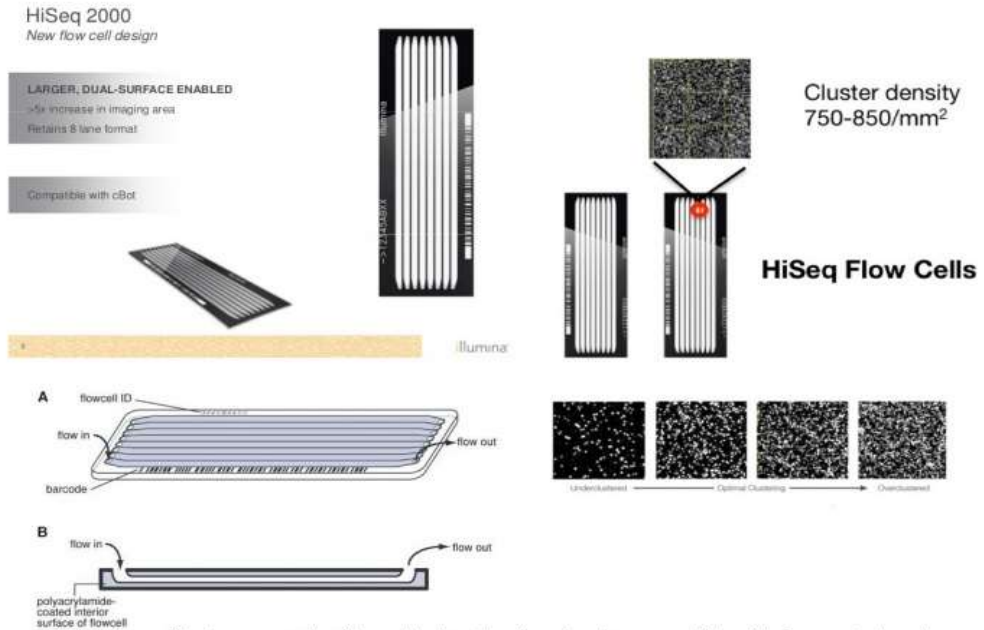
☐ HiSeq 1500/2500 Rapid Run

☒ HiSeq 1500/2500 High Output

☐ NextSeq 1000 Sequencing System

☐ NextSeq 2000 Sequencing System

Application or product:	Total RNA-seq	
Read length:	150	
Recommended number of reads:	50,000,000	
Notes:	The recommended number of reads can vary depending on the scientific question and/or model organism	
	HiSeq 1500/2500	HiSeq 1500/2500
Run type	High Output v4 Reagents	High Output v3 Reagents
Clusters	250,000,000 per lane	18,750,000 per lane
Exceeds maximum read length?	Does not exceed maximum (2x125)	Does not exceed maximum (2x100)
Number of units per sample (flow cell or lane)	0.200 lanes	2.667 lanes
Samples per unit (flow cell or lane)	5/lane	-0/lane
Comments	One flow cell (8 lanes). HiSeq v4 Reagents	One flow cell (8 lanes). TruSeq v3 Reagents
Products	HiSeq SR Cluster Kit v4 cBot HiSeq PE Cluster Kit v4 cBot HiSeq SBS Kit V4	TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS TruSeq SBS Kit v3-HS



Illumina uses a glass 'flowcell', about the size of a microscope slide, with 8 separate 'lanes'.
The HiSeq instrument scans both upper and lower surfaces of each flowcell lane.

Şekil 3. 21: HiSeq 2500 platformunda okuma derinliğinin hesaplanması.

Application or product: **Total RNA-seq**

Minimum number of clusters/reads (on target, human): **50** million clusters

Total read length (e.g. 200 for 2x100): **150** cycles

Benchtop Sequencers

- ☐ iSeq
- ☐ MiniSeq
- ☐ MiSeq / MiSeq Dx in RUO mode
- ☐ NextSeq 500/550

Production-Scale Sequencers

- ☐ NextSeq 500/550
- ☒ NovaSeq 6000
- ☐ HiSeq 3000/4000
- ☐ HiSeq 1500/2500 Rapid Run
- ☐ HiSeq 1500/2500 High Output
- ☐ NextSeq 1000 Sequencing System
- ☐ NextSeq 2000 Sequencing System

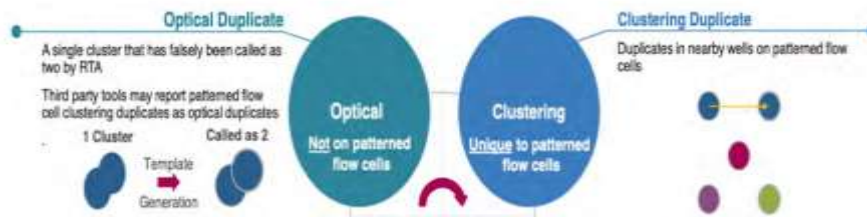
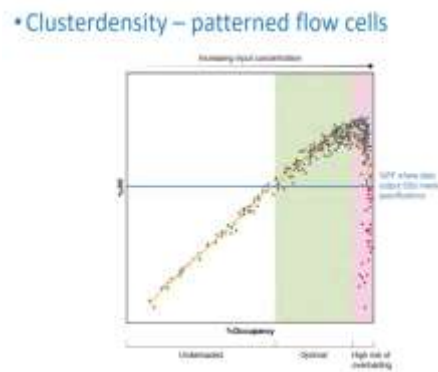
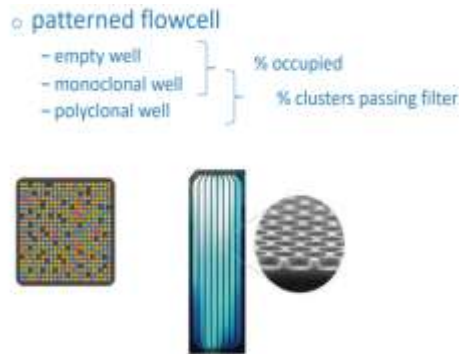
Application or product: Total RNA-seq

Read length: 150

Recommended number of reads: 50,000,000

Notes: The recommended number of reads can vary depending on the scientific question and/or model organism

	NovaSeq	NovaSeq	NovaSeq	NovaSeq
Run type	SP Reagent Kit	S1 Reagent Kit	S2 Reagent Kit	S4 Reagent Kit
Clusters per flow cell	800,000,000	1,600,000,000	4,100,000,000	10,000,000,000
Exceeds maximum read length?	Does not exceed maximum (2x250)	Does not exceed maximum (2x150)	Does not exceed maximum (2x150)	Does not exceed maximum (2x150)
Number of units per sample (flow cell or lane)	0.063 flow cells	0.031 flow cells	0.012 flow cells	0.010 flow cells
Samples per unit (flow cell or lane)	16 flow cell	32 flow cell	32 flow cell	96 / flow cell Calculated number 290 exceeds maximum number of samples per flow cell for this application, due to index availability. Consider using a system with lower data output.
Products	NovaSeq 6000 SP Reagent Kit	NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit	NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit	NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit

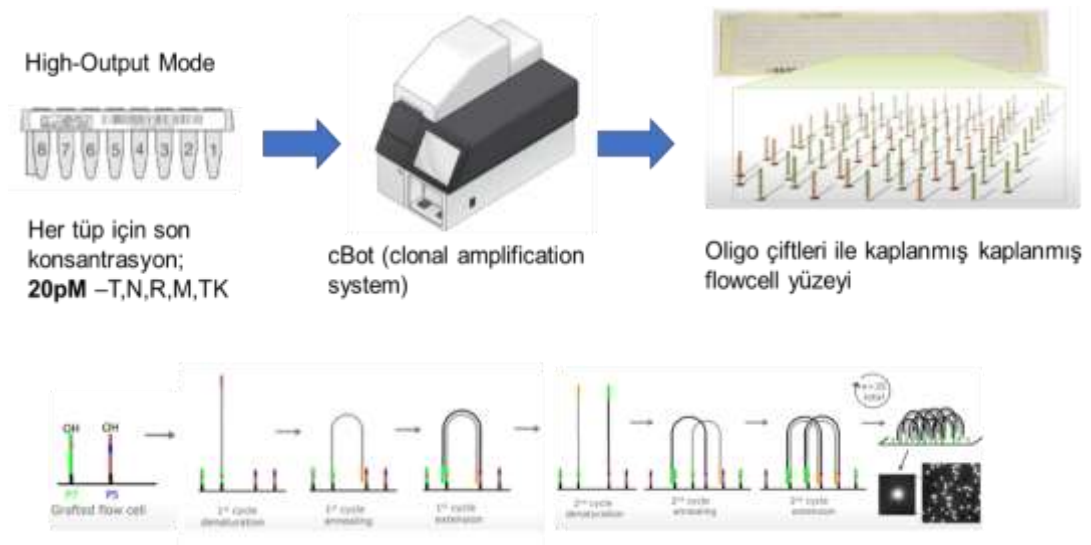


Şekil 3. 22: Novaseq 6000 platformunda okuma derinliğinin hesaplanması.

Bu hesaplama göre high output mode flowcell için birbirinden bağımsız 8 lane olduğundan ve lane başına 250 Milyon okuma için 5 örnek önermektedir. Novaseq 6000 ile uyumlu S1 flowcell'i tek bir pool oluşturmaya imkan verdiğinden maximum 30 örnek için multiplex yapılabilmektedir.

RNASeq cluster oluşumu

HiSeq 2500 platformu Illumina Flowcell'lerinin üzerinde cluster oluşumu için, cBOT cihazı kullanılır. HiSeq v4 kimyasının özelliklerine göre, RNA Seq kütüphane havuzları (5 örnek her havuzda) 0.1N NaOH kullanılarak denatüre edilir. Gerekli SBS dizileme primeri kullanılarak, cBOT aracılığıyla Flowcell yüzeyinde cluster oluşumu ve okumanın başlatılması gerçekleştirilir. Flowcell'in her şeridinde cluster yoğunluklarını optimize etmek, kaliteli veri elde etmek için kritik öneme sahiptir. Optimum cluster yoğunluğu elde etmek için kütüphanelerin doğru bir şekilde ölçülmesi gerekmektedir. cBot cihazında doğru clusterları oluşturmak (Şekil 3.23) için kütüphaneler HiSeq Systems Denature and Dilute Libraries Guide'ında (#15050107) belirtildiği gibi 20pM'lık son DNA konsantrasyonlarına denatüre edilir ve seyreltilir. DNA kütüphane örnekleri flowcell üzerindeki tamamlayıcı adaptör oligolarına bağlanır. DNA şablonları yüksek kaliteli bir DNA polimeraz kullanılarak 3' ucundan sentezlenerek kopyalanır. Kopyalar HiSeq sistemlerinde dizilemeye hazır her biri yaklaşık 1000 kopyadan oluşan klonal kümeler oluşturmak üzere izotermal olarak güçlendirilir.



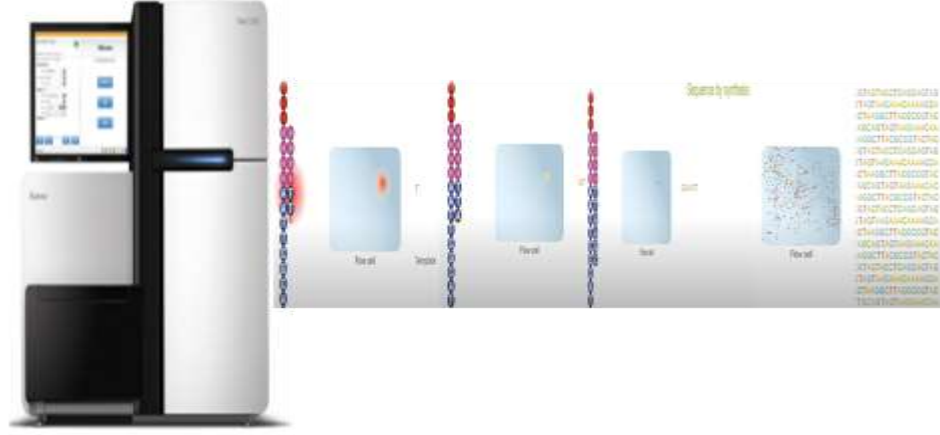
Şekil 3. 23: cBot cihazında cluster oluşumu.

Novaseq 6000 platformunda her bir RNA-Seq kütüphanesinin miktarı tayin edildikten sonra, cihazın reaktif kartuşuna yüklemeden önce denatüre edilir ve seyreltilir. Kütüphaneler tek bir tüpte eşit konsantrasyonda, toplam konsantrasyon 100µl'de 2 nM olacak şekilde (Şekil 3.24) karıştırılmaktadır. Yüklenecek DNA miktarı cluster oluşumunu etkilediği için dizilemenin önemli bir parçasıdır. Çok az DNA yüklenir ise, flow cell kapasitesinin altında cluster oluşur. Genellikle veri kalitesini korur, ancak daha düşük veri çıktısı ile sonuçlanır. Çok fazla DNA yüklenir ise, clusterlar birbirine çok yakın olacağından bu da zayıf görüntü çözünürlüğü ve analiz sorunlarına neden olacaktır. Aynı zamanda fazla yükleme sonucu daha düşük Q30 puanlarına (düşük veri kalitesi) ve daha az veri çıkışına sahiptir.



Şekil 3. 24: Kütüphanelerin tek bir tüpte birleştirilmesi (2nM konsantrasyon).

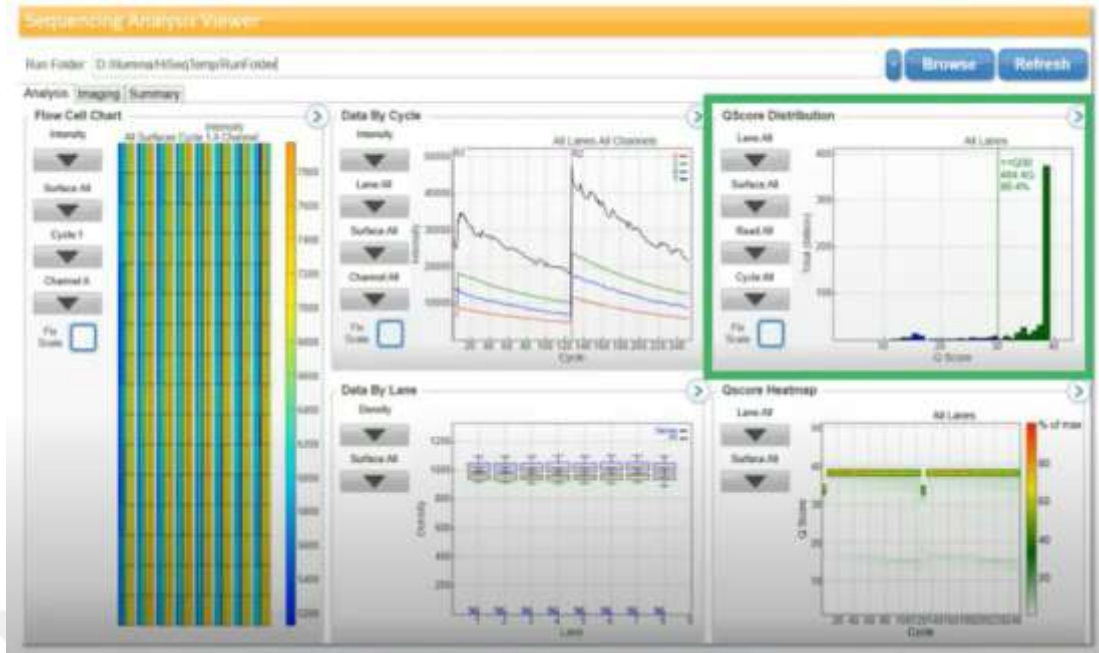
3.2.7.5. RNA Seq Kütüphanesinin Dizilenmesi



Şekil 3. 25: HiSeq v4 SBS kitleri ile örneklerin 150x2 PE olarak HiSeq 2500 platformunda dizilenmesi.

RNASeq kütüphane havuz dizilemeleri için, HiSeq v4 SBS kitleri kullanılmaktadır. Dizilemeler, 150X2 PE olacak şekilde HiSeq 2500 platformu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.25). Herbir RNASeq havuzu için 250 milyon okuma (örnek başı 50 milyon) olacak şekilde dizileme yapıldı. Dizilemelerde, örnek başı tek indeks okundu. Dizi kalitesi RTA yazılımı ile gerçek zamanlı olarak kontrol edildi, ve .bcl dosyaları için fiber optik kablo ile GENAM bioinformatik ünitesindeki sunuculara aktarılmıştır.

Novaseq 6000 S1 Reagent (300 cycle) kitleri kullanıldı. Dizilemeler, 150x2 PE (paired end) olacak şekilde Novaseq 6000 platformu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek bir S1 flowcell ile RNA-seq havuzu için örnek başına yaklaşık 50 milyon okuma içeren dizileme yapıldı. Dizilemelerde örnek başı tek indeks okunmaktadır. Dizi kalitesi (Şekil 3.26) RTA3 yazılımı ile gerçek zamanlı olarak kontrol edilerek, .bcl dosyaları daha ileri analiz için fiber optik kablo ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi'ndeki sunuculara aktarılmıştır.



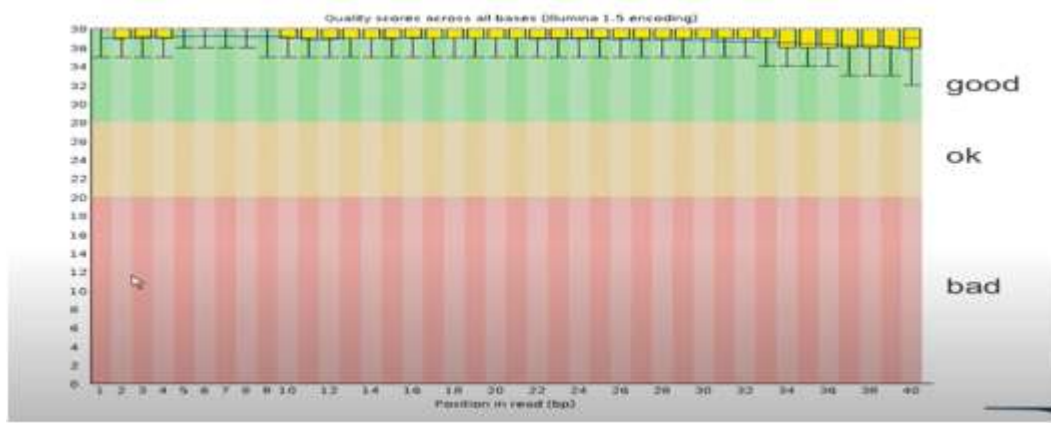
Şekil 3.26: Sequencing Analysis Viewer Software (SAV) Dizileme Analizi Görüntüleyici.

Dizileme sırasında ve sonrasında gerçek zamanlı analiz yazılımı (RTA) tarafından oluşturulan önemli kalite parametrelerinin görüntülenmesine olanak tanır. İmajların bazlara dönüştürülmesi RTA yazılımı ile gerçekleştirilir ve .bcl (basecalling) dosyaları üretilir.

3.2.8. Transkriptom Datasının Kalite Kontrolü

3.2.8.1. RNASeq Ham Datasının Kalite Kontrolü

Base calling doğruluğu, Phred quality score (Q score) tarafından ölçülen, dizileme platformunun doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan en yaygın ölçümdür. Okuma skorlarının monitörlenmesi downstream analizler için önemlidir. Şekil 3.27’de belirtilen ölçüm kullanılmıştır.



Şekil 3. 27: Phred quality score (Q score) ölçüm monitörü.

3.2.9. Transkriptom Datasının Biyoenformatik Analizi

3.2.9.1. RNA-seq veri ön analizi

HiSeq ve NovaSeq platformları tarafından üretilen dizileme verilerinin ön analizi tamamlanmıştır. Skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinomlu toplam 51 hastadan elde edilen total RNA-seq verilerine ait FASTQ ham dosyaları Trim Galore! (v.0.39, <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) kullanılarak kalitelerine göre temizlenmiş, kullanılan dizileme adaptörleri ve indeksleri ayrılmış, eşlenmemiş diziler uzaklaştırılmıştır ve FASTQC kullanılarak kalite kontrolleri yapılmıştır. Temizlenen okumalar insan referans genomuna (hg38, GRCh38, <https://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg38/bigZips/analysisSet/>) STAR hizalama algoritması (v.2.7.10) kullanılarak hizalanmıştır. Gen başına düşen okuma sayılarının hesaplanması GENCODE hg38 (v.42 gtf) kullanılarak yine STAR programı ile yapılmıştır.

3.2.9.2. miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı analizi

Analizler üç alt-tip (skuamöz hücre karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom) için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. 19 skuamöz hücre karsinom, 25 adenokarsinom ve 7 büyük hücreli karsinom hastasına ait tümör, lenf (metastaz), reaktif stroma, tam kan ve sağlıklı kontrol (normal) dokularına ait veriler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Her alt-tip için tümör, metastaz, reaktif stroma ve tam kan örneklerine ait veriler normal (kontrol) grubuna ait verilerle karşılaştırılmıştır. Gruplar arası ekspresyonu farklılaşmış miRNA'lar R programı kullanılarak DESeq2 paketi (v.1.38.2) ile tespit edilmiştir. Elde edilen p-değerleri, Benjamini-Hochberg yöntemiyle düzeltilmiş olup, düzeltilmiş p-değeri 0.05'ten küçük ve en az 2 kat değişim gösteren miRNA'lar ekspresyon düzeyi farklılaşan miRNA'lar olarak belirlenmiştir.

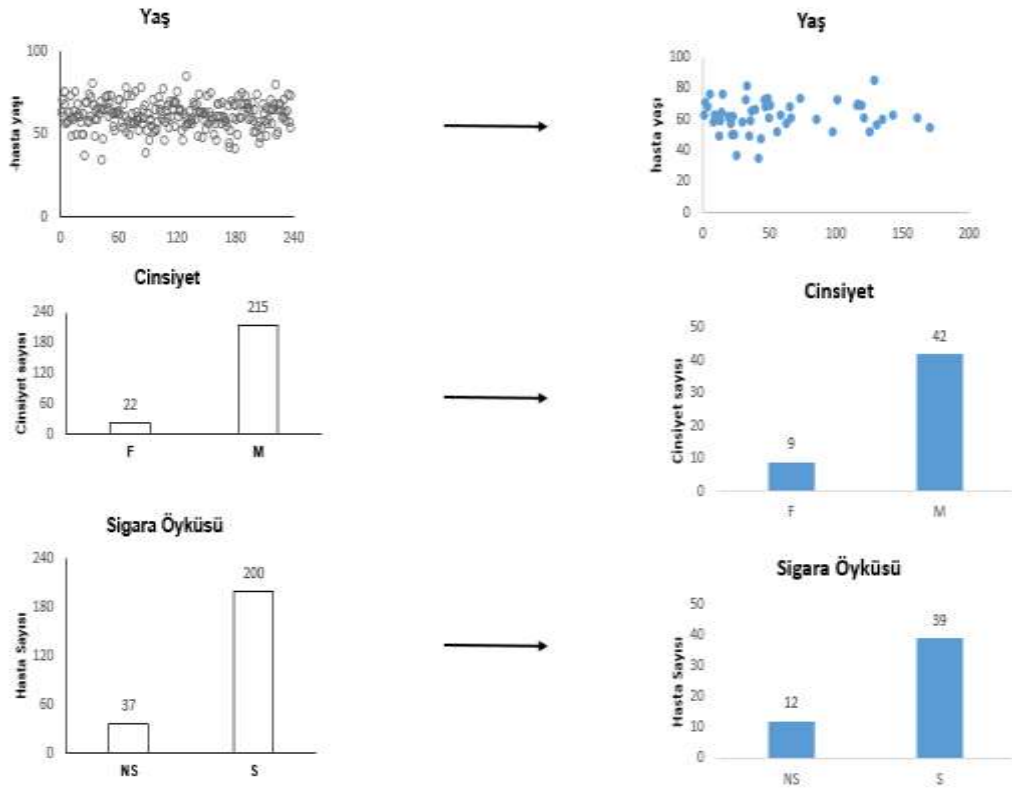
3.2.9.3. TCGA Verilerinin Analizi

Kanser araştırmalarında The Cancer Genome Atlas (TCGA) veri analizi, büyük bir öneme sahiptir. TCGA, farklı kanser türlerinde genetik ve genomik değişikliklerin detaylı olarak analiz edildiği bir projedir. TCGA analizi, kanser alt tiplerini ve bu alt tiplerdeki genetik özellikleri tanımlamamıza olanak tanır, bu da kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yol açabilir. Ayrıca, bu analizler kanserin erken teşhisinde, prognoz tahminlerinde ve ilaç geliştirmede daha etkili yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlar. Sonuç olarak, TCGA veri analizi kanser araştırmalarında devrim niteliğinde bir kaynaktır. Bu verilerin analizi, kanserle ilgili yeni bilgilerin ortaya çıkmasına, daha iyi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve kanserin moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunur. Bu sebeple hasta örneklerimizin yanı sıra TCGA verileri aynı metodoloji altında analiz edilerek karşılaştırmalı sonuçlar elde edildi.

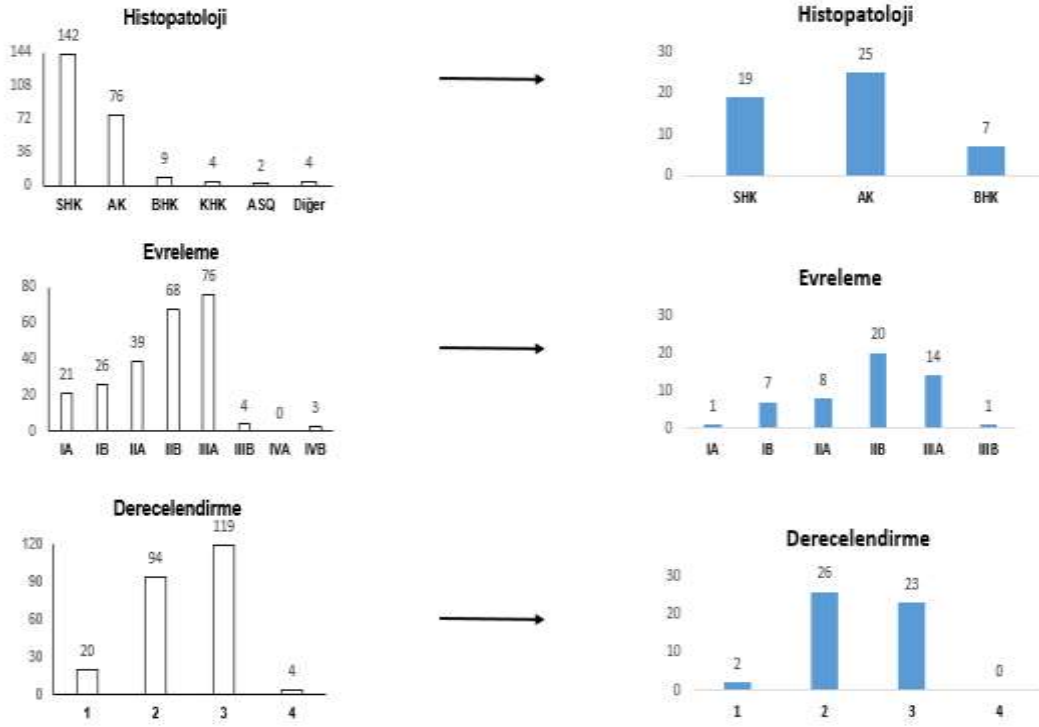
4. SONUÇLAR

4.1. Biyobanka Oluşumu

Çalışma kapsamında küçük hücreli-dışı akciğer kanseri (KHDAK) tanısıyla ameliyata alınan hasta örnekleri TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Moleküler Onkoloji Araştırma Laboratuvarı (MOAL) bünyesinde kurulan LUNGBİYO adlı bir biyobankada saklanmaktadır. Çalışmaya dahil edilen bütün hasta ve örnek bilgileri, klinik ve laboratuvar bilgileri, ham verileri, analiz verileri, hasta onam formları, vb. ilgili bütün bilgiler buradan kontrol edilerek çalışılmıştır. LUNGBİYO, 5 tane -80°C derin dondurucu, 1 sıvı nitrojen tankı, LUNGBASE veritabanı ve sistemi kontrol eden LUNGSOFT yazılımından oluşmaktadır. Biyobanka için toplanan ve tez çalışmasına dahil edilen hastaların demografik ve histolojik bilgileri Şekil 4.1 ve 4.2'deki gibidir.



Şekil 4. 1: Sol tarafta bulunan grafikler tüm hastalara ait demografik bilgileri içerirken, sağ tarafta bulunan grafikler nihai hastalara ait demografik verileri içermektedir.



Şekil 4. 2: Sol tarafta bulunan grafikler tüm hastalara ait histolojik bilgileri içerirken, sağ tarafta bulunan grafikler nihai hastalara ait histolojik verileri içermektedir.

4.1.1. Veritabanı (LUNGBASE/AKBASE)

LUNGBASE/AKBASE üzerinde multiomik (genomik, transkriptomik, proteomik, fosfoproteomik, metabolomik ve lipidomik) verileri alınarak gerekli analizler yapılmak üzere kaydedilmektedir. Ayrıca alınan hasta onam formları, hasta genel bilgileri, klinik bilgiler, biyokimya bilgileri, patoloji bilgileri, başta PET-CT olmak üzere hasta radyoloji görüntü ve bilgileri, evreleme ve grading bilgileri, vb. bütün bilgiler de veritabanında tutulmaktadır. Sistem aktif ve güncel olarak alınan örnek bilgilerini de sayı, miktar ve lokasyon olarak bulundurarak LUNGBİYO'nun kontrolü ve etkin olarak kullanımına imkân vermiştir.

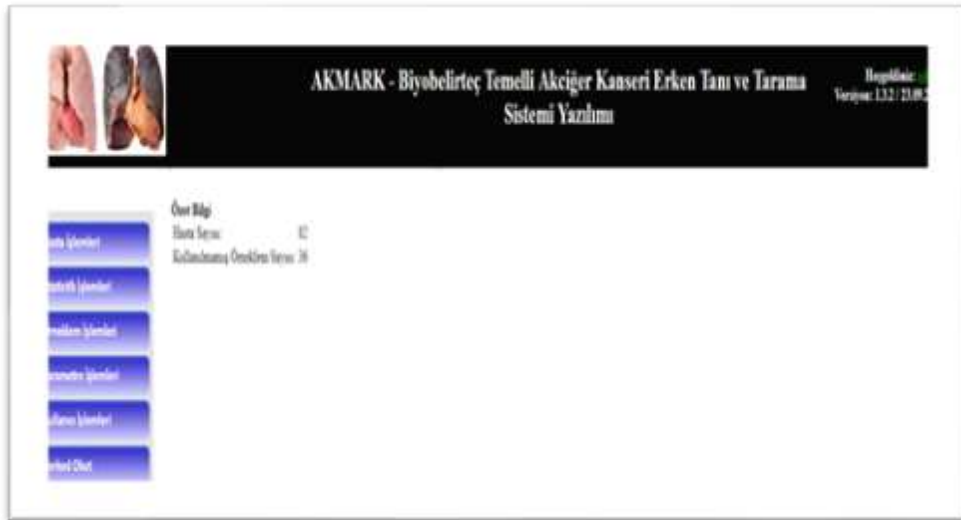
Python kullanılarak geliştirilen uygulama sayesinde giriş (login) yapan personel yetkili olduğu projeler için bir arayüz üzerinden sürükleyip bırakarak veri yükleyebilmektedir. Yüklelediği veri Swift Client kullanılarak doğrudan AKBASE içerisindeki OpenStack Swift sunucusuna yüklenecektir. Bant genişliği (bandwidth)

kullanımının en az olduğu saatler olan 02.00-06.00 arasında ise diğerk sunuculara kopyalama işlemi yapılmaktadır.

Sonuç olarak OpenStack Swift kullanılarak, üç ayrı coğrafi bölgede güvenli ve yedekli bir dosya depolama sunucusu kurulmuştur. Bu sunucu yatayda sınırsız genişleme özelliğine sahip olduğu için yeni depolama ihtiyaçları uygun maliyetli x86 sunucular yardımı ile kolay bir şekilde genişletilebilecektir. Proje ihtiyaçları doğrultusunda kopyalama (replikasyon) problemi geliştirilen bir betik yardımıyla çözülmüştür. Kurulan sistem sayesinde veri bütünlüğü ve güvenliği sağlanarak verinin farklı lokasyonlarda farklı ortamlar üzerinde (hem nesne, hem de blok depolama sunucuları) yedeklenmesi sağlanmıştır. Biyoenformatik analiz çalışmaları için gerekli yazılımlarının bulunduğu platform ile entegrasyonu sağlanmıştır.

4.1.2. Yazılımı (LUNGSOFT /AKSOFT)

Sistemin kontrolünü sağlayan yazılım programı sürekli olarak ihtiyaca göre güncellenmektedir. Hasta ve örnek bilgileri veri tabanına kaydedilmiştir (Şekil 4.3). Örnek dokular üzerinde yapılan homojenizasyon, izolasyon ve karakterizasyon bilgileri de veri tabanında güncel olarak tutulmaktadır.



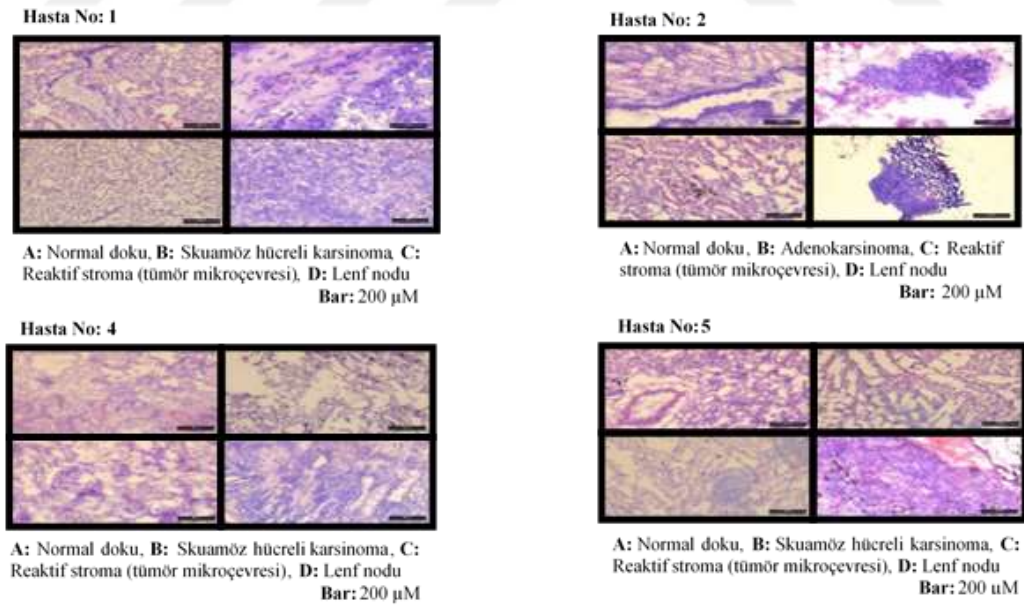
Şekil 4. 3: LUNGBASE veri tabanı güncel ana sayfa ekran görüntüsü.

4.2. Hastaların H&E Boyama Sonrası Histolojik görüntüleri

Çalışmada yer alan 51 hasta için histolojik sınıflandırma, başlangıçta hastanede görevli patologlar tarafından alınan kesitlerin titiz bir değerlendirmesiyle başladı. Daha sonrasında laboratuvarımızda, parafin kesitlerine ek olarak kriyokesitler alındı ve bu kriyokesitler, hücrelerin morfolojik özelliklerine dayalı olarak yeniden ayrımlandı; bu aşama H&E boyama yöntemi ile gerçekleştirildi.

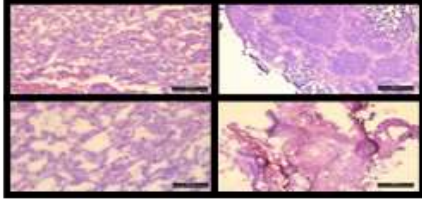
Toplamda 51 hasta için elde edilen histolojik görüntüler, tümör dokusu, normal doku, reaktif stroma dokusu ve lenf nodu dokusu gibi bileşenleri içermektedir. Bu dokular, çalışmamızda yer alan 25 adenokarsinom, 19 skuamöz hücreli karsinom ve 7 büyük hücreli karsinom hastasının örneklerinden elde edilmiştir.

Belirli hastaların lenf nodu dokusundan sınırlı sayıda kesit alınmıştır. Bu karar, akciğer kanserinin heterojen dağılım gösterebileceği göz önünde bulundurularak alınmıştır. Bu küçük lenf nodları, patolojik değerlendirme amaçlı gönderilirken, geri kalan kısmı çalışmamıza dahil edilmiştir. Hastalara ait bu tüm histolojik görüntüler hasta numaraları ile birlikte doku tipleri detayı ile birlikte aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.4).



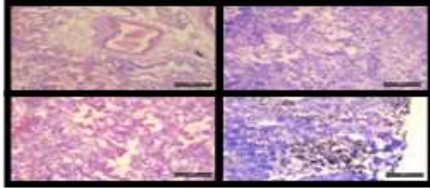
Şekil 4. 4: Çalışmaya dahil edilen hastalara ait histolojik görüntüler.

Hasta No: 8



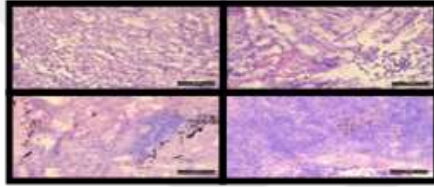
A: Normal doku, B: Skuamöz hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tümör mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 13



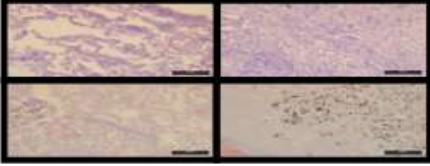
A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tümör mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 16



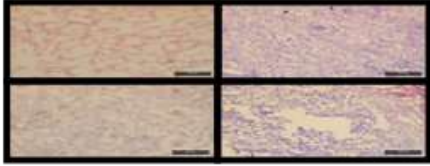
A: Normal doku, B: Skuamöz hücreli karsinom, C: Reaktif stroma (tümör mikroçevresi), D: Lymph node
Bar: 200 µM

Hasta No: 21



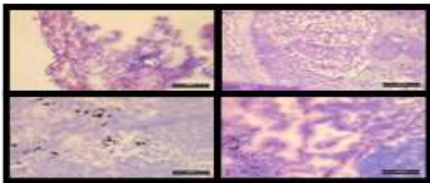
A: Normal doku, B: Büyük hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 23



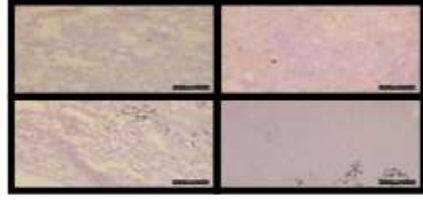
A: Normal doku, B: Skuamöz hücreli karsinom, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 25



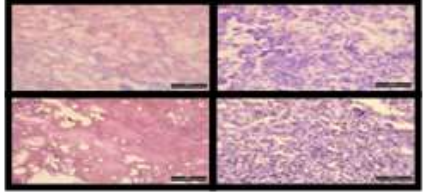
A: Normal doku, B: Skuamöz hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 10



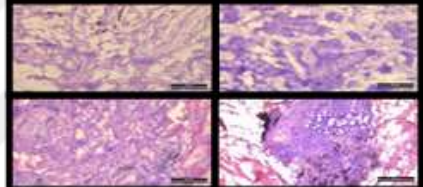
A: Normal doku, B: Skuamöz hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tümör mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 14



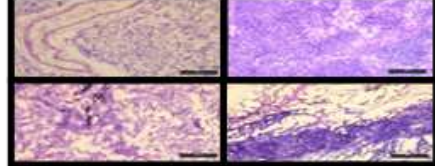
A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 17



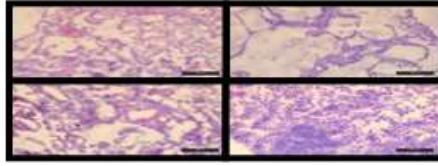
A: Normal doku, B: Skuamöz hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tümör mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 22



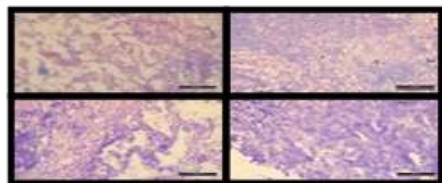
A: Normal doku, B: Skuamöz hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 24



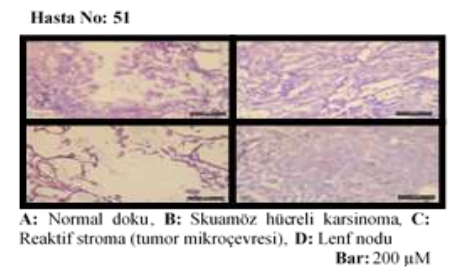
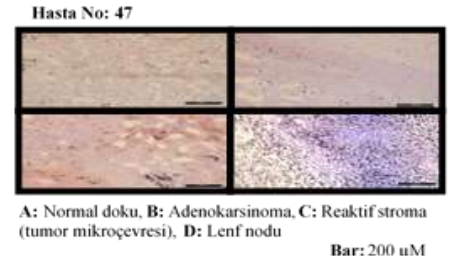
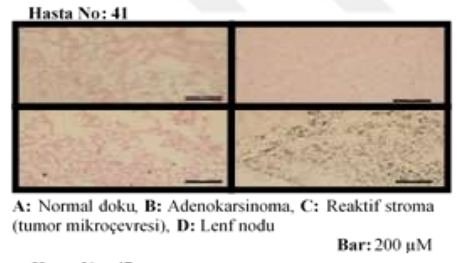
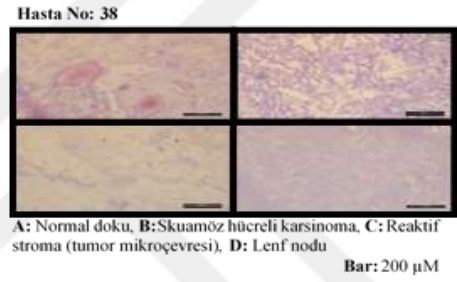
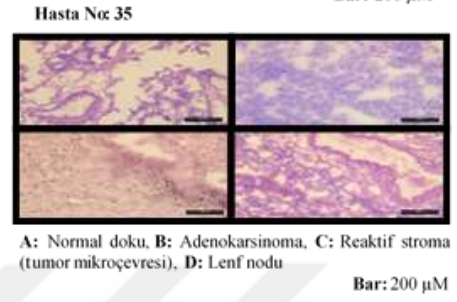
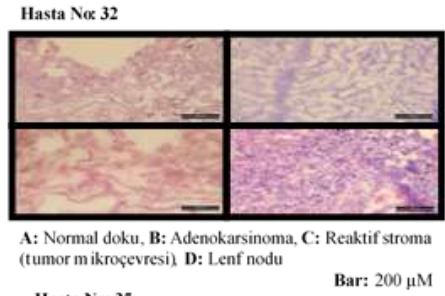
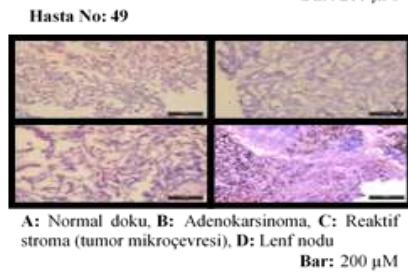
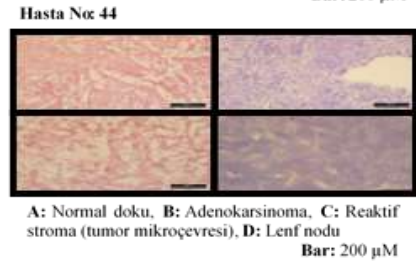
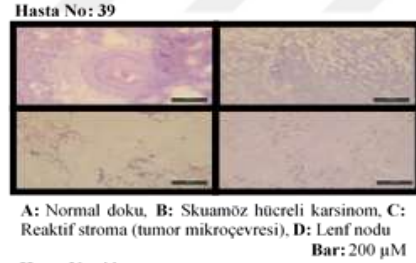
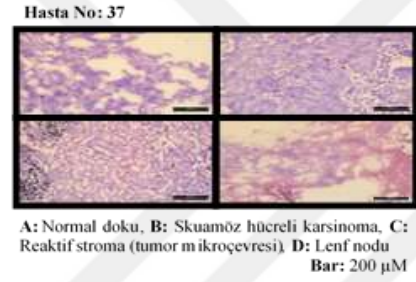
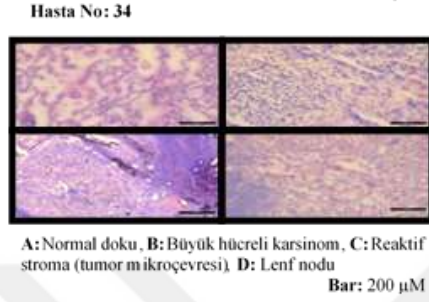
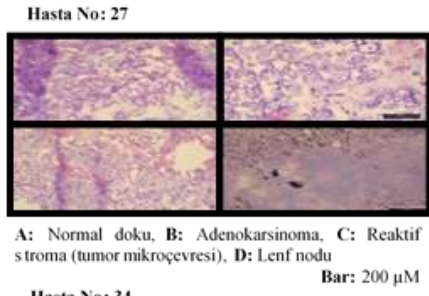
A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Hasta No: 26

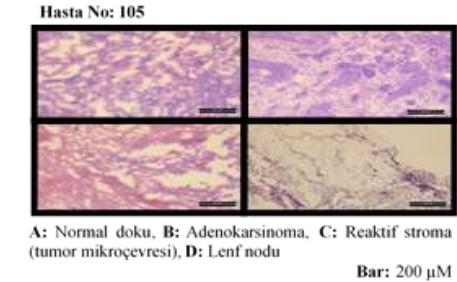
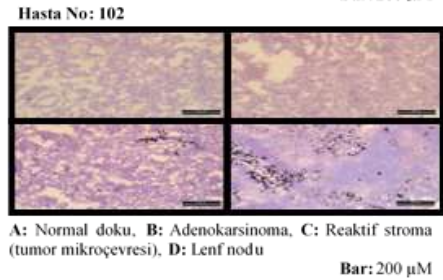
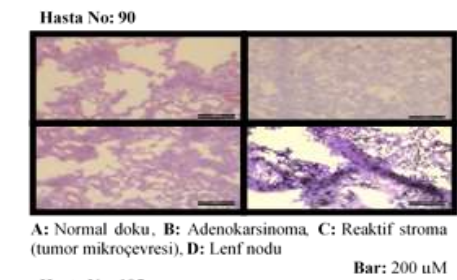
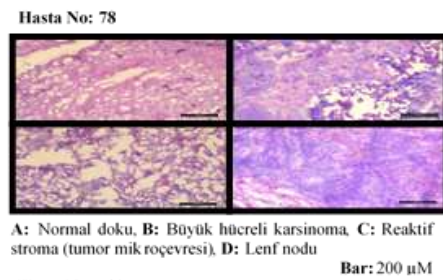
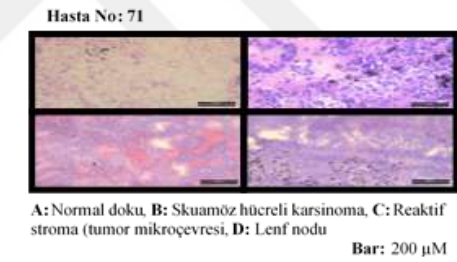
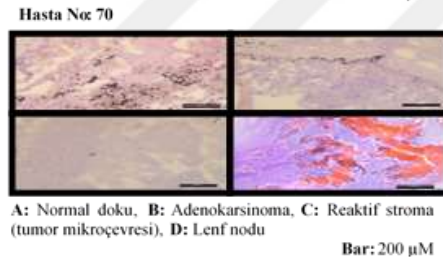
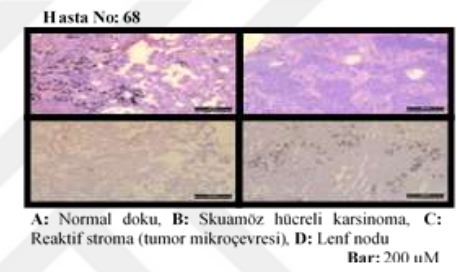
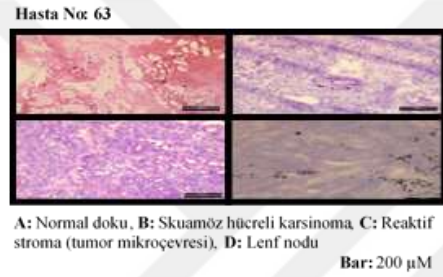
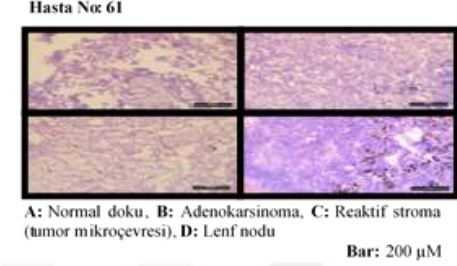
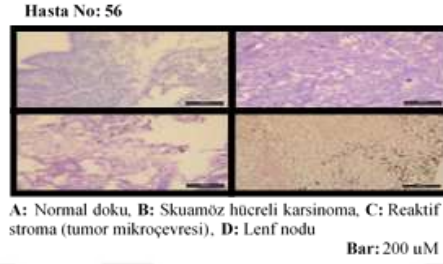
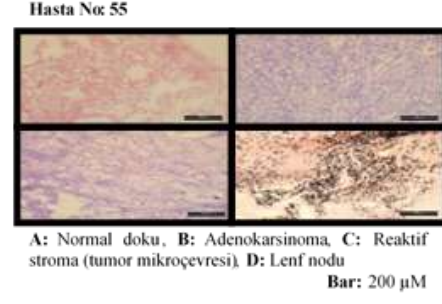
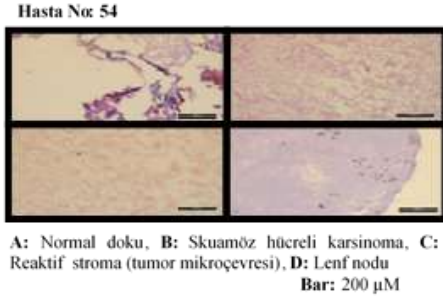


A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu
Bar: 200 µM

Şekil 4. 4: Çalışmaya dahil edilen hastalara ait histolojik görüntüler (devamı).

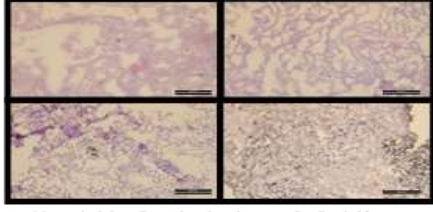


Şekil 4. 4: Çalışmaya dahil edilen hastalara ait histolojik görüntüler (devamı).



Şekil 4. 4: Çalışmaya dahil edilen hastalara ait histolojik görüntüler (devamı).

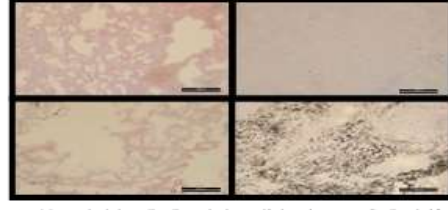
Hasta No: 120



A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

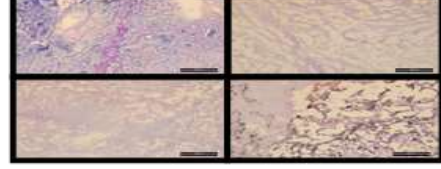
Hasta No: 121



A: Normal doku, B: Büyük hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

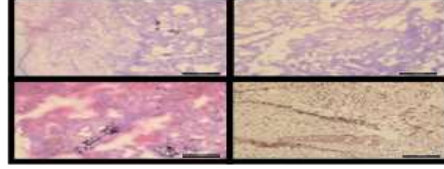
Hasta No: 123



A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

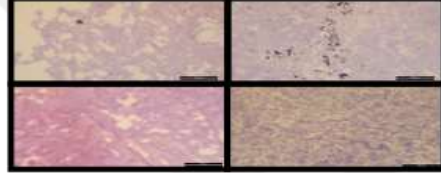
Hasta No: 125



A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

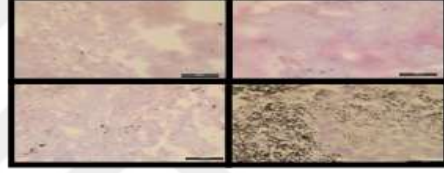
Hasta No: 129



A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

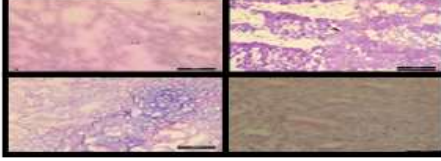
Hasta No: 133



A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

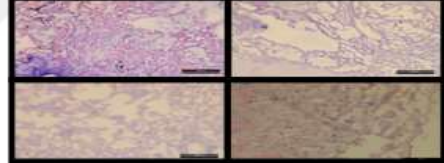
Hasta No: 135



A: Normal doku, B: Büyük hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

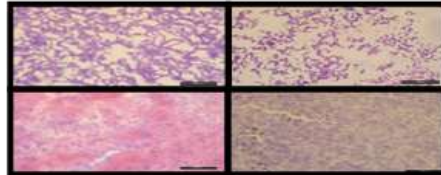
Hasta No: 139



A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

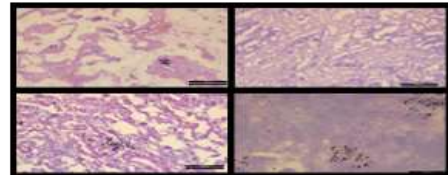
Hasta No: 147



A: Normal doku, B: Büyük hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

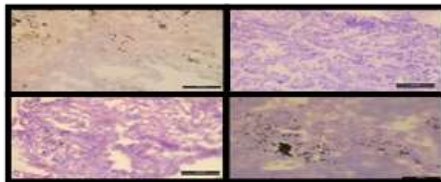
Hasta No: 168



A: Normal doku, B: Büyük hücreli karsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

Hasta No: 179



A: Normal doku, B: Adenokarsinoma, C: Reaktif stroma (tumor mikroçevresi), D: Lenf nodu

Bar: 200 µM

Şekil 4. 4: Çalışmaya dahil edilen hastalara ait histolojik görüntüler (devamı).

4.3. Hastaların Demografik Bilgileri

Çalışmanın kapsamında yer alan 51 adet klinik ve histopatolojik olarak değerlendirilmiş KHDAK hastasının yaş, cinsiyet, tütün kullanımı gibi demografik bilgileri, histolojik sınıflandırma ve evreleme bilgileri ile birlikte toplandı. Bu veriler, hastaların genel profilleri ile kanserin ilerleme durumu hakkında önemli öngörüler sağlayabilmektedir.

Hastaların yaşları, cinsiyetleri ve tütün kullanımı gibi demografik faktörler, kanser vakalarının çeşitli yönlerini anlamamıza yardımcı olurken, histolojik sınıflandırma ve evreleme bilgileri hastalığın türü, yayılımı ve tedaviye yanıt gibi kritik özelliklerini belirlememizde kilit rol oynamaktadır.

Tüm bu değerli bilgiler, analiz ve sonuçların daha kapsamlı ve derinlemesine bir anlayış sağlamasına katkı sağlamaktadır. Bu demografik ve klinik veriler, Tablo 4.1'de özetlenmiş ve sunulmuştur.

Tablo 4. 1: Hastalara ait bilgiler.

HASTA NO	MATERYAL TİPİ	YAŞ	CİNSİYET	TÜTÜN KULLANIMI	HİSTOLOJİK SINIFLANDIRMA	TNM EVRELEME	STAGE-GRADE
24	T	50	K	VAR	AK	T4N2M0	3B-3
24	N	50	K	VAR	AK	T4N2M0	3B-3
24	R	50	K	VAR	AK	T4N2M0	3B-3
24	M	50	K	VAR	AK	T4N2M0	3B-3
24	TK	50	K	VAR	AK	T4N2M0	3B-3
56	T	69	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
56	N	69	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
56	R	69	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
56	M	69	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
56	TK	69	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
4	T	68	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
4	N	68	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
4	R	68	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
4	M	68	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
4	TK	68	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
5	T	76	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-3
5	N	76	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-3
5	R	76	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-3
5	M	76	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-3

Tablo 4. 1: Hastalara ait bilgiler (devamı).

5	TK	76	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-3
8	T	58	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
8	N	58	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
8	R	58	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
8	M	58	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
8	TK	58	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
16	T	64	E	VAR	SHK	T4N0M0	3A-3
16	N	64	E	VAR	SHK	T4N0M0	3A-3
16	R	64	E	VAR	SHK	T4N0M0	3A-3
16	M	64	E	VAR	SHK	T4N0M0	3A-3
16	TK	64	E	VAR	SHK	T4N0M0	3A-3
17	T	76	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
17	N	76	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
17	R	76	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
17	M	76	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
17	TK	76	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
22	T	61	E	VAR	SHK	T3N2M0	3A-3
22	N	61	E	VAR	SHK	T3N2M0	3A-3
22	R	61	E	VAR	SHK	T3N2M0	3A-3
22	M	61	E	VAR	SHK	T3N2M0	3A-3
22	TK	61	E	VAR	SHK	T3N2M0	3A-3
1	T	63	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
1	N	63	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
1	R	63	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
1	M	63	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
1	TK	63	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
25	T	62	K	YOK	SHK	T3N1M0	3A-2
25	N	62	K	YOK	SHK	T3N1M0	3A-2
25	R	62	K	YOK	SHK	T3N1M0	3A-2
25	M	62	K	YOK	SHK	T3N1M0	3A-2
25	TK	62	K	YOK	SHK	T3N1M0	3A-2
27	T	37	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
27	N	37	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
27	R	37	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
27	M	37	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
27	TK	37	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
34	T	72	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
34	N	72	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
34	R	72	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
34	M	72	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
34	TK	72	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3

Tablo 4. 1: Hastalara ait bilgiler (devamı).

38	T	59	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
38	N	59	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
38	R	59	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
38	M	59	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
38	TK	59	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
39	T	65	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
39	N	65	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
39	R	65	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
39	M	65	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
39	TK	65	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
44	T	35	E	YOK	AK	T1BN0M0	1A-3
44	N	35	E	YOK	AK	T1BN0M0	1A-3
44	R	35	E	YOK	AK	T1BN0M0	1A-3
44	M	35	E	YOK	AK	T1BN0M0	1A-3
44	TK	35	E	YOK	AK	T1BN0M0	1A-3
47	T	47	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
47	N	47	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
47	R	47	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
47	M	47	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
47	TK	47	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
13	T	49	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-3
13	N	49	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-3
13	R	49	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-3
13	M	49	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-3
13	TK	49	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-3
14	T	59	K	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
14	N	59	K	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
14	R	59	K	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
14	M	59	K	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
14	TK	59	K	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
23	T	57	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
23	N	57	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
23	R	57	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
23	M	57	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
23	TK	57	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
41	T	66	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-3
41	N	66	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-3
41	R	66	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-3
41	M	66	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-3
41	TK	66	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-3
63	T	63	E	VAR	SHK	T3N1M0	3A-3

Tablo 4.1: Hastalara ait bilgiler (devamı).

63	N	63	E	VAR	SHK	T3N1M0	3A-3
63	R	63	E	VAR	SHK	T3N1M0	3A-3
63	M	63	E	VAR	SHK	T3N1M0	3A-3
63	TK	63	E	VAR	SHK	T3N1M0	3A-3
102	T	52	K	YOK	AK	T3N2M0	3A-3
102	N	52	K	YOK	AK	T3N2M0	3A-3
102	R	52	K	YOK	AK	T3N2M0	3A-3
102	M	52	K	YOK	AK	T3N2M0	3A-3
102	TK	52	K	YOK	AK	T3N2M0	3A-3
26	T	50	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-2
26	N	50	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-2
26	R	50	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-2
26	M	50	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-2
26	TK	50	E	VAR	AK	T1BN0M0	1A-2
37	T	49	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
37	N	49	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
37	R	49	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
37	M	49	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
37	TK	49	E	VAR	SHK	T2AN1M0	2A-2
125	T	61	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
125	N	61	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
125	R	61	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
125	M	61	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
125	TK	61	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
54	T	73	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
54	N	73	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
54	R	73	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
54	M	73	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
54	TK	73	E	VAR	SHK	T4N1M0	3A-2
55	T	61	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
55	N	61	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
55	R	61	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
55	M	61	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
55	TK	61	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
61	T	52	E	YOK	AK	T4N0M0	3A-3
61	N	52	E	YOK	AK	T4N0M0	3A-3
61	R	52	E	YOK	AK	T4N0M0	3A-3
61	M	52	E	YOK	AK	T4N0M0	3A-3
61	TK	52	E	YOK	AK	T4N0M0	3A-3
49	T	72	K	YOK	AK	T2AN0M0	1B-3
49	N	72	K	YOK	AK	T2AN0M0	1B-3

Tablo 4. 1: Hastalara ait bilgiler (devamı).

49	R	72	K	YOK	AK	T2AN0M0	1B-3
49	M	72	K	YOK	AK	T2AN0M0	1B-3
49	TK	72	K	YOK	AK	T2AN0M0	1B-3
68	T	57	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
68	N	57	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
68	R	57	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
68	M	57	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
68	TK	57	E	VAR	SHK	T3N0M0	2B-2
70	T	68	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
70	N	68	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
70	R	68	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
70	M	68	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
70	TK	68	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
71	T	61	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
71	N	61	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
71	R	61	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
71	M	61	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
71	TK	61	E	VAR	SHK	T2BN1M0	2B-2
2	T	71	E	VAR	AK	T4N1M0	3A-3
2	N	71	E	VAR	AK	T4N1M0	3A-3
2	R	71	E	VAR	AK	T4N1M0	3A-3
2	M	71	E	VAR	AK	T4N1M0	3A-3
2	TK	71	E	VAR	AK	T4N1M0	3A-3
78	T	73	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
78	N	73	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
78	R	73	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
78	M	73	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
78	TK	73	E	VAR	BHK	T3N0M0	2B-3
90	T	60	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
90	N	60	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
90	R	60	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
90	M	60	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
90	TK	60	E	VAR	AK	T3N1M0	3A-3
105	T	72	K	YOK	AK	T3N1M0	3A-3
105	N	72	K	YOK	AK	T3N1M0	3A-3
105	R	72	K	YOK	AK	T3N1M0	3A-3
105	M	72	K	YOK	AK	T3N1M0	3A-3
105	TK	72	K	YOK	AK	T3N1M0	3A-3
123	T	69	E	VAR	AK	T4N0M0	3A-3
123	N	69	E	VAR	AK	T4N0M0	3A-3
123	R	69	E	VAR	AK	T4N0M0	3A-3

Tablo 4. 1: Hastalara ait bilgiler (devamı).

123	M	69	E	VAR	AK	T4N0M0	3A-3
123	TK	69	E	VAR	AK	T4N0M0	3A-3
120	T	69	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-2
120	N	69	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-2
120	R	69	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-2
120	M	69	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-2
120	TK	69	E	VAR	AK	T2BN0M0	2A-2
139	T	60	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
139	N	60	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
139	R	60	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
139	M	60	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
139	TK	60	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
147	T	63	K	YOK	BHK	T4N2M0	3B-3
147	N	63	K	YOK	BHK	T4N2M0	3B-3
147	R	63	K	YOK	BHK	T4N2M0	3B-3
147	M	63	K	YOK	BHK	T4N2M0	3B-3
147	TK	63	K	YOK	BHK	T4N2M0	3B-3
51	T	68	E	YOK	SHK	T2BN1M0	2B-2
51	N	68	E	YOK	SHK	T2BN1M0	2B-2
51	R	68	E	YOK	SHK	T2BN1M0	2B-2
51	M	68	E	YOK	SHK	T2BN1M0	2B-2
51	TK	68	E	YOK	SHK	T2BN1M0	2B-2
121	T	70	K	YOK	BHK	T2AN1M0	2A-3
121	N	70	K	YOK	BHK	T2AN1M0	2A-3
121	R	70	K	YOK	BHK	T2AN1M0	2A-3
121	M	70	K	YOK	BHK	T2AN1M0	2A-3
121	TK	70	K	YOK	BHK	T2AN1M0	2A-3
129	T	52	E	YOK	AK	T2BN0M0	2A-3
129	N	52	E	YOK	AK	T2BN0M0	2A-3
129	R	52	E	YOK	AK	T2BN0M0	2A-3
129	M	52	E	YOK	AK	T2BN0M0	2A-3
129	TK	52	E	YOK	AK	T2BN0M0	2A-3
133	T	85	E	VAR	AK	T2BN1M0	2B-2
133	N	85	E	VAR	AK	T2BN1M0	2B-2
133	R	85	E	VAR	AK	T2BN1M0	2B-2
133	M	85	E	VAR	AK	T2BN1M0	2B-2
133	TK	85	E	VAR	AK	T2BN1M0	2B-2
179	T	55	E	VAR	AK	T2AN1M0	2A-2
179	N	55	E	VAR	AK	T2AN1M0	2A-2
179	R	55	E	VAR	AK	T2AN1M0	2A-2
179	M	55	E	VAR	AK	T2AN1M0	2A-2

Tablo 4. 1: Hastalara ait bilgiler (devamı).

179	TK	55	E	VAR	AK	T2AN1M0	2A-2
10	T	63	K	VAR	SHK	T2AN0M0	1B-2
10	N	63	K	VAR	SHK	T2AN0M0	1B-2
10	R	63	K	VAR	SHK	T2AN0M0	1B-2
10	M	63	K	VAR	SHK	T2AN0M0	1B-2
10	TK	63	K	VAR	SHK	T2AN0M0	1B-2
35	T	81	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
35	N	81	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
35	R	81	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
35	M	81	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
35	TK	81	E	VAR	AK	T3N0M0	2B-3
32	T	58	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
32	N	58	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
32	R	58	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
32	M	58	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
32	TK	58	E	VAR	AK	T2AN0M0	1B-3
21	T	62	E	YOK	BHK	T4N0M0	3A-3
21	N	62	E	YOK	BHK	T4N0M0	3A-3
21	R	62	E	YOK	BHK	T4N0M0	3A-3
21	M	62	E	YOK	BHK	T4N0M0	3A-3
21	TK	62	E	YOK	BHK	T4N0M0	3A-3
168	T	61	E	VAR	BHK	T2AN0M0	1B-3
168	N	61	E	VAR	BHK	T2AN0M0	1B-3
168	R	61	E	VAR	BHK	T2AN0M0	1B-3
168	M	61	E	VAR	BHK	T2AN0M0	1B-3
168	TK	61	E	VAR	BHK	T2AN0M0	1B-3
135	T	56	E	YOK	BHK	T2BN1M0	2B-3
135	N	56	E	YOK	BHK	T2BN1M0	2B-3
135	R	56	E	YOK	BHK	T2BN1M0	2B-3
135	M	56	E	YOK	BHK	T2BN1M0	2B-3
135	TK	56	E	YOK	BHK	T2BN1M0	2B-3
SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom, BHK: Büyük Hücreli Karsinom, AK: Adenokarsinom (-) : Sigara kullanmıyor							

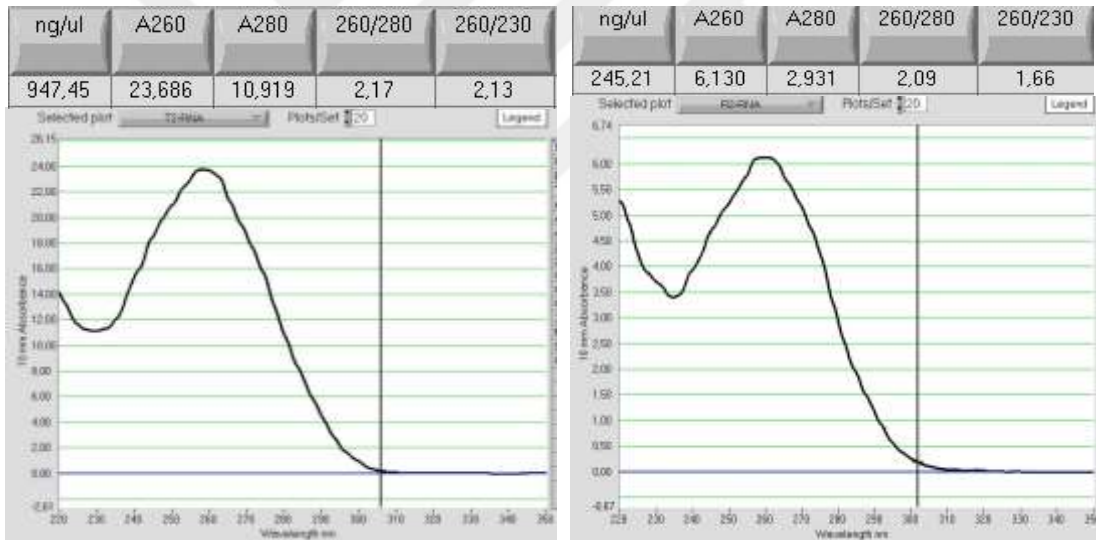
4.4. Hasta Örneklerinin Karakterizasyon Deneyi Sonuçları

Dokuda homojenizasyon, bir dokunun veya örnek içinde bulunan tüm bileşenlerin homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirilen bir işlemdir. Bu işlem, özellikle kanser hücrelerinin heterojen yapısından kaynaklanan analizlerin

doğru bir şekilde gerçekleştirilmesi için hayati bir adımdır. Dokunun içerdiği çeşitli bileşenlerin homojen bir karışımını elde etmek, sonuçların güvenilirliğini ve tutarlılığını artırır.

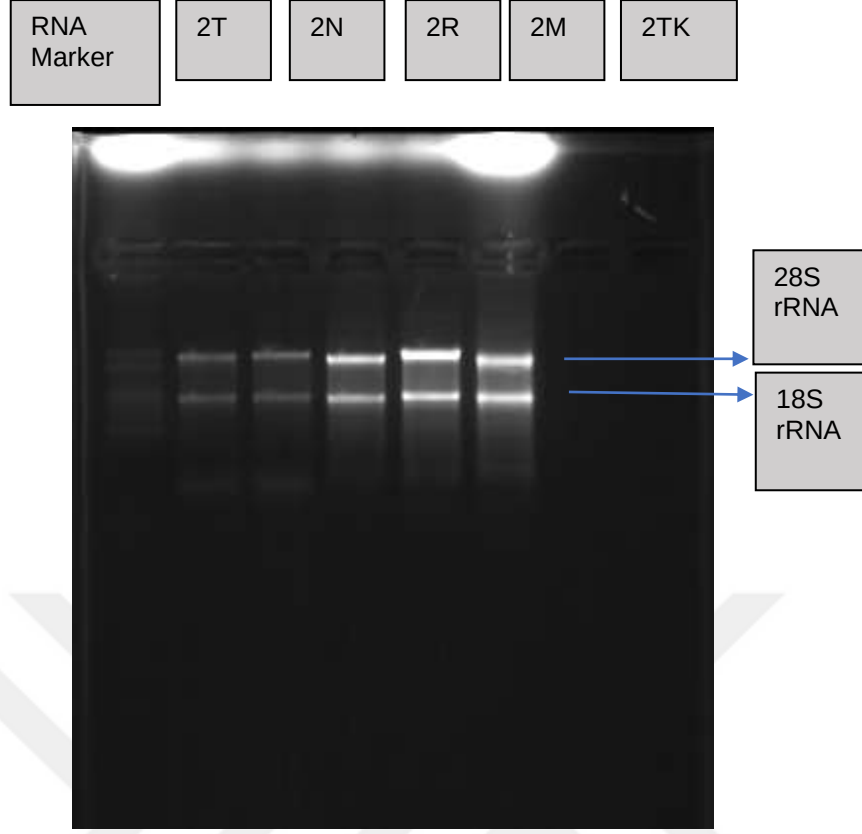
Dokuda gerçekleştirilen homojenizasyon işlemi sonrasında RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen RNA'ların kalite parametreleri, jel elektroforez, nanodrop, bioanalyzer ve qubit gibi hassas cihazlar kullanılarak incelenmiştir. Bu kalite kontrolleri, elde edilen RNA'nın bütünlüğünü ve saflığını değerlendirmek için yapılmıştır.

Sonuçlar, analizlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak amacıyla kayda alınmıştır. Aşağıda, bu kalite kontrol işlemlerinin sonuçlarına ilişkin bilgiler sunulmuştur. Saflık ölçümü yapılan hasta RNA'larının nanodrop ekran görüntüleri Şekil 4.5'de belirtilen iki örnek gibidir.



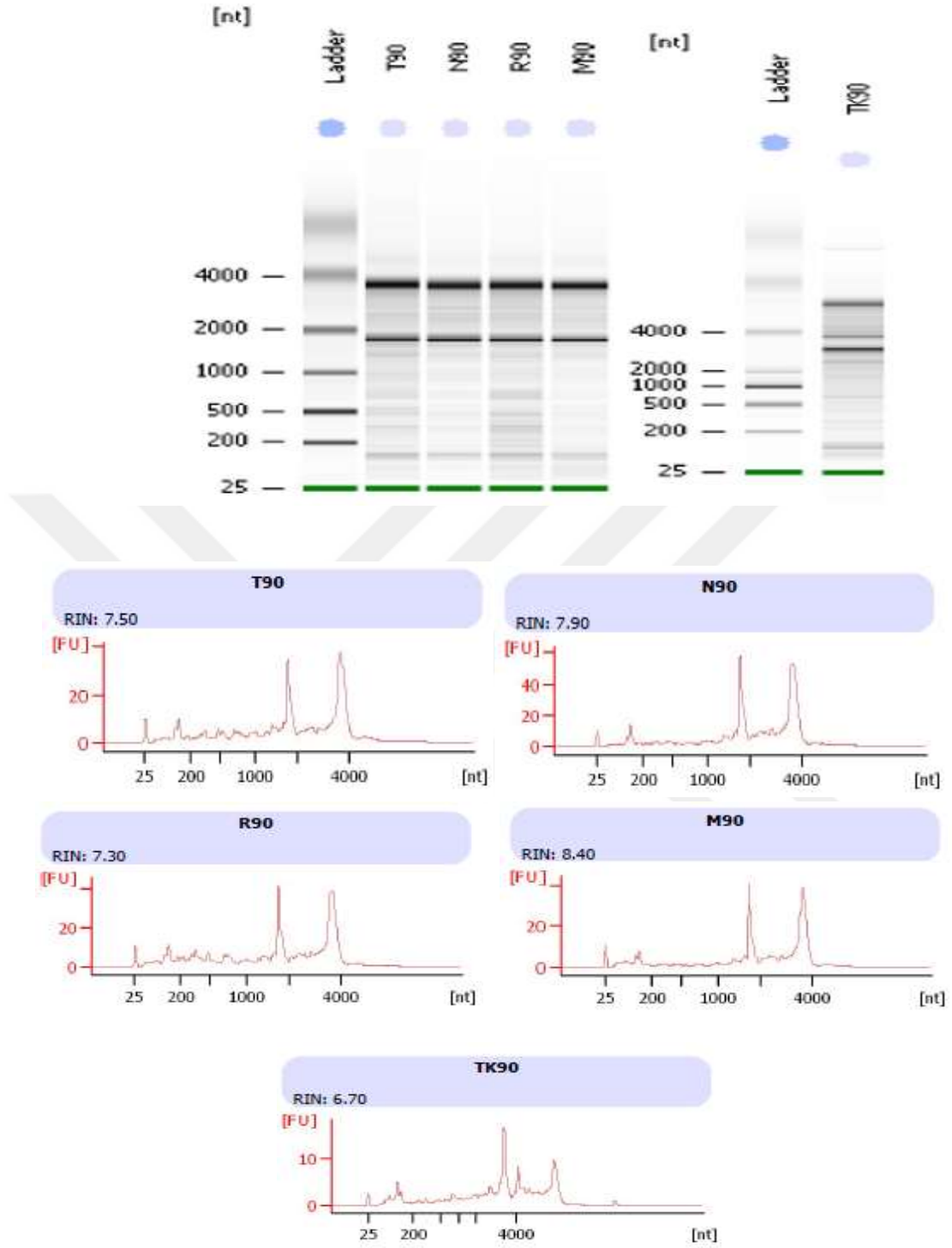
Şekil 4. 4:2T ve 2R dokusundan elde edilen RNA'nın nanodrop ile ölçümünün ekran görüntüsü.

Bütünlük ölçümü yapılan hasta RNA'larının jel görüntüleri şekil 4.6'da belirtilen hasta örnekleri gibidir.



Şekil 4. 5: 2 numaralı hastaya ait T, N, R, M ve TK materyallerinden izole edilen RNA örneklerinin jel görüntüsü.

Seçilen 255 hasta örneğinin kalitesini doğru bir şekilde değerlendirmek amacıyla bazı örneklerin RNA bionalyzer görüntüleri aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.7). Bu görüntüler, örneklerin RNA kalitesini görsel olarak değerlendirmemize yardımcı olurken, analiz sonuçlarını belirleyen RIN (RNA Integrity Number) değerlerinin tümü Tablo 4.2'te özetlenmiştir. Bu tablo, her bir örneğin RNA kalitesini ifade eden RIN değerlerini içermektedir.



Şekil 4. 6: 90 nolu hastanın T,N,R,M ve TK örneklerine ait bioanalyzer jel görüntüsü ve RIN değerleri.

Tablo 4. 2: Tüm hastaların 4 tip doku (T,N,R,M) ve tamkan (TK) örneklerinden elde edilen RNA'lara ait nanodrop, qubit ölçümleri ve RIN değerleri.

ÖRNEK NO	SAMPLE ID	NANODROP (NG/ μ L)	260/280 ORANI	260/230 ORANI	QUBİT (NG/ μ L)	RIN (RNA INTEGRİTY NUMBER)	DOKU SINIFI
1	24T	350	1,8	1,8	222	7,2	AK
2	24N	400	1,9	1,89	358	7,6	AK
3	24R	731	2,13	1,73	534	6,8	AK
4	24M	1550	2,02	1,85	1200	7,1	AK
5	24TK	96	2,01	1,63	89,7	5	AK
6	56T	1327	2,1	1,48	1491	6,8	SHK
7	56N	194	2,11	1,7	168	8,5	SHK
8	56R	1051	2,12	2,12	1060	7,4	SHK
9	56M	892,8	2,1	2,14	978	7,9	SHK
10	56TK	60	2,01	0,81	42,9	7,3	SHK
11	4T	1696	2,13	1,85	1976	7,6	SHK
12	4N	423	2,12	1,35	442	7,2	SHK
13	4R	665	2,13	1,94	944	7,6	SHK
14	4M	2495,31	2,11	2,16	3360	7,6	SHK
15	4TK	192	2,04	1,6	245	6,2	SHK
16	5T	1248,58	2,14	1,8	1620	7,1	SHK
17	5N	734,62	2,14	1,94	944	7,2	SHK
18	5R	1308,44	2,14	2,05	1590	7,2	SHK
19	5M	1314	2,13	2,23	1,156	6,5	SHK
20	5TK	107	2,01	1,8	107	5,3	SHK
21	8T	725,55	2,07	1,93	752	7,3	SHK
22	8N	208,17	2,07	1,84	163	7	SHK
23	8R	575,64	2,05	1,84	572	7,7	SHK
24	8M	643,35	2,1	1,77	636	6,9	SHK
25	8TK	137	2,03	1,91	138	6,3	SHK
26	16T	1911,32	2,15	2,05	1660	6,9	SHK
27	16N	421,48	2,12	1,91	359	7	SHK
28	16R	318	2,13	2,11	318	6,3	SHK
29	M	697,1	2,15	1,41	736	6,6	SHK
30	16TK	176	2,148	2,05	192	6,5	SHK
31	17T	1388,4	2,09	1,82	1491	8,5	SHK
32	17N	853,55	2,09	1,39	804	7,9	SHK
33	17R	864,22	2,08	2,16	797	7,8	SHK
34	17M	1402,18	2,07	2,19	1568	7,7	SHK
35	17TK	128	2,06	1,26	121	5,4	SHK
36	22T	1224,88	2,13	2,13	1404	7,5	SHK
37	22N	611,75	2,1	1,77	628	7,5	SHK
38	22R	324,62	2,11	2,08	292	7,6	SHK
39	22M	281,54	2,12	1,59	261	7,3	SHK
40	22TK	94,48	2,01	1,38	87,4	5,4	SHK
41	1T	2421	2,04	2,09	2421	7	SHK
42	1N	266,73	2,07	1,8	190	8,3	SHK
43	1R	332,73	2,09	1,5	385	7,4	SHK
44	1M	764,49	2,14	1,98	1040	7	SHK
45	1TK	90	2,01	1,8	85	6,1	SHK
46	25T	504	2,14	1,83	491	7	SHK
47	25N	555,94	2,11	2,07	584	6,7	SHK
48	25R	737	2,11	2,09	856	7,1	SHK
49	25M	616,52	2,12	1,79	682	7	SHK
50	25TK	194	2,04	1,71	230	5,1	SHK
51	27T	179,43	2,1	2,11	161	8,1	AK
52	27N	554,04	2,1	2,02	520	7,9	AK
53	27R	263,5	2,14	2,19	240	7,7	AK
54	27M	433,6	2,1	2,14	352	6,7	AK
55	27TK	239	2,05	1,9	121	6	AK
56	34T	1988,51	2,13	2,25	1750	7,4	BHK
57	34N	697	2,12	1,8	532	7,1	BHK
58	34R	256,75	2,11	1,2	224	7,3	BHK
59	34M	277,5	2,02	1,67	229	6,4	BHK
60	34TK	156	2	1,8	144	5,8	BHK
61	38T	1288,9	2,12	2,21	1227	8,3	SHK
62	38N	752,06	2,13	2,19	776	7,2	SHK
63	38R	682,47	2,11	2,18	580	7,6	SHK
64	38M	644,64	2,13	2,12	546	8,2	SHK

Tablo 4. 2: Tüm hastaların 4 tip doku (T,N,R,M) ve tamkan (TK) örneklerinden elde edilen RNA'lara ait nanodrop, qubit ölçümleri ve RIN değerleri (devamı).

65	38TK	579	2,09	1,99	459	5,7	SHK
66	39T	1056,87	2,14	2,02	840	8,2	SHK
67	39N	258,14	2,09	1,71	185	7,9	SHK
68	39R	653,88	2,12	2,17	556	8	SHK
69	39M	473,46	2,11	1,65	378	7,5	SHK
70	39TK	223	2,03	1,92	190	6,2	SHK
71	44T	337,53	2,11	2,1	319	8,8	AK
72	44N	159,78	2,03	1,28	117	8,4	AK
73	44R	299,55	2,08	1,8	130	8,1	AK
74	44M	379,84	2,08	1,89	376	7,6	AK
75	44TK	196	2,03	1,91	181	6,2	AK
76	47T	678,72	2,12	2,13	664	8	AK
77	47N	293,9	2,11	2,09	276	8	AK
78	47R	423,8	2,1	1,95	396	6,8	AK
79	47M	486,8	2,13	1,66	482	7,7	AK
80	47TK	393	2,04	1,92	337	5,7	AK
81	13T	1440,75	2,14	2,12	1110	8,1	AK
82	13N	438,75	2,11	1,03	426	7,6	AK
83	13R	652,75	2,14	1,91	790	6,4	AK
84	13M	877,56	2,15	1,68	792	6,4	AK
85	13TK	269	2,06	1,87	280	6,4	AK
86	14T	916,58	2,12	2,17	934	6,7	AK
87	14N	365,26	2,11	1,96	320	6,7	AK
88	14R	407,44	2,11	1,98	368	7,7	AK
89	14M	607,52	2,12	2,15	588	8,2	AK
90	14TK	85	2,01	1,95	67,7	7	AK
91	23T	1750	2,1	1,95	1500	7,7	SHK
92	23N	605	2,01	1,8	416	8,3	SHK
93	23R	1450	2,15	1,96	1230	9,2	SHK
94	23M	1350	2,02	1,98	1320	8,4	SHK
95	23TK	96	1,9	1,7	88,4	6,3	SHK
96	41T	564,91	2,11	2,04	550	6,8	AK
97	41N	245,91	2,1	1,46	208	7,8	AK
98	41R	727,84	2,12	2,11	742	7,8	AK
99	41M	1244,55	2,12	2,14	1452	7,8	AK
100	41TK	135	2,02	1,98	137	6,5	AK
101	63T	2314	2,08	2,14	2650	7,9	SHK
102	63N	285	2,12	2,11	89	7,9	SHK
103	63R	368	2,08	1,79	128	8	SHK
104	63M	1145	2,12	2,06	378	7,4	SHK
105	63TK	72	2,01	2,01	67,6	6,7	SHK
106	102T	1080	2,08	2,13	1134	7,8	AK
107	102N	804	2,08	2,1	752	7,8	AK
108	102R	588	2,07	1,86	570	6,4	AK
109	102M	509	2,02	1,71	554	7,2	AK
110	102TK	155	2,01	1,65	154	6,5	AK
111	26T	814,51	2,13	1,94	812	6,5	AK
112	26N	981,6	2,12	2,08	1,041	7	AK
113	26R	885,81	2,14	2,2	866	7	AK
114	26M	1457,75	2,14	2,13	1420	7,5	AK
115	26TK	120	1,81	1,56	79,5	5,9	AK
116	37T	492,93	2,12	2,12	382	7,6	SHK
117	37N	234,17	2,1	1,91	300	7,9	SHK
118	37R	352,75	2,12	2,09	188	6,9	SHK
119	37M	454,47	2,11	2,09	312	6,6	SHK
120	37TK	110	2,01	1,91	96	6	SHK
121	125T	1940	2,01	1,69	1695	6,9	AK
122	125N	1660	2,2	1,78	1300	7	AK
123	125R	480	1,96	1,56	414	6,1	AK
124	125M	627	2,02	1,89	574	7,4	AK
125	125TK	86	2,02	2,01	84,7	7,3	AK
126	54T	483,82	2,07	2,08	307	6,6	SHK
127	54N	461,28	2,07	1,79	427	8,3	SHK
128	54R	798,63	2,09	2,17	802	7,3	SHK
129	54M	475,8	2,06	1,64	393	8,4	SHK
130	54TK	62	1,84	1,65	58,8	5,8	SHK
131	55T	2973,78	2,08	2,12	2106	8	AK

Tablo 4. 2: Tüm hastaların 4 tip doku (T,N,R,M) ve tamkan (TK) örneklerinden elde edilen RNA'lara ait nanodrop, qubit ölçümleri ve RIN değerleri (devamı).

132	55N	455,47	2,03	1,67	402	8	AK
133	55R	642,97	2,12	2,17	718	8	AK
134	55M	898,68	2,12	2,13	894	8,2	AK
135	55TK	34	2,01	1,93	27,6	6,3	AK
136	61T	971,67	2,12	2,03	950	7,5	AK
137	61N	732,9	2,1	1,52	700	8,3	AK
138	61R	547,99	2,13	2,13	491	7,7	AK
139	61M	1508,79	2,13	2,21	1398	8	AK
140	61TK	41	2,02	2,01	40,5	7,3	AK
141	49T	1065,55	2,11	2,06	1144	8,2	AK
142	49N	926,7	2,1	2,16	1048	7,5	AK
143	49R	459,63	2,09	1,67	442	8	AK
144	49M	998,21	2,1	2,11	1100	7,9	AK
145	49TK	70	1,8	2,1	68	7,3	AK
146	68T	2156	2,03	1,86	1584	7,9	SHK
147	68N	1085	2,02	2,01	918	7,6	SHK
148	68R	328	2,05	2,02	299	7,3	SHK
149	68M	1788	2,03	2,04	515	7,9	SHK
150	68TK	83	1,78	1,42	78,7	4,9	SHK
151	70T	294	2,11	2,12	93	7,4	AK
152	70N	526	2,1	2,2	236	8,1	AK
153	70R	477	2,11	1,99	174	7,7	AK
154	70M	588	2,03	1,61	232	8,2	AK
155	70TK	78	1,86	1,58	37,4	6,6	AK
156	71T	669	2,04	1,98	708	7,2	SHK
157	71N	604	2,03	1,86	478	7,9	SHK
158	71R	711	1,96	1,98	770	7,6	SHK
159	71M	2974	2,02	2,01	912	8,4	SHK
160	71TK	91	1,96	1,78	83	6,9	SHK
161	2T	947,45	2,17	2,13	960	7,7	AK
162	2N	297,62	2,08	1,27	267	6,9	AK
163	2R	245,21	2,09	1,66	231	7,2	AK
164	2M	225,96	2,02	1,62	232	6,8	AK
165	2TK	40	2,08	0,8	89,5	3,7	AK
166	78T	1364	2,09	2,19	1616	6,1	BHK
167	78N	442	2,07	1,7	442	7	BHK
168	78R	586	2,09	2,01	636	7,3	BHK
169	78M	672	2,08	2,15	700	7,7	BHK
170	78TK	63	1,9	1,61	57,5	6,7	BHK
171	90T	3600	1,87	1,9	4750	7,5	AK
172	90N	737	2,08	1,78	698	7,9	AK
173	90R	923	2,1	2,15	927	7,3	AK
174	90M	3195	1,9	2,02	2538	8,4	AK
175	90TK	125	2	1,72	115	6,7	AK
176	105T	1982	2,14	2,03	414,5	8,4	AK
177	105N	555	2,14	2,06	1030	7,4	AK
178	105R	479	2,09	1,98	400	6,9	AK
179	105M	994	2,13	2,13	1065	7,5	AK
180	105TK	78	1,89	1,65	65	5,9	AK
181	123T	265	2,06	1,64	244	7,8	AK
182	123N	1161	2,14	2,18	1389	7,7	AK
183	123R	616	1,85	1,27	654	8,1	AK
184	123M	616	2,14	2,15	566	7,7	AK
185	123TK	85	2,01	1,78	77,3	5,8	AK
186	120T	1317	1,8	1,8	993	6,3	AK
187	120N	433	1,79	1,81	376	6,2	AK
188	120R	307	1,7	1,68	218	4,8	AK
189	120M	1064	1,85	1,89	964	6,8	AK
190	120TK	68	1,68	1,65	61,2	5,9	AK
191	139T	1660	2,07	2,2	1400	7,7	AK
192	139N	349	2,07	2,17	234	7,4	AK
193	139R	1664	2,08	2,27	766	7,5	AK
194	139M	818	2,1	2,24	600	8,1	AK
195	139TK	280	2,42	0,98	72,5	6,6	AK
196	147T	1105	2,01	2,08	1227	6,8	BHK
197	147N	1054	1,98	2,03	936	6,6	BHK
198	147R	999	2,01	2,1	584	6,8	BHK

Tablo 4. 2: Tüm hastaların 4 tip doku (T,N,R,M) ve tamkan (TK) örneklerinden elde edilen RNA'lara ait nanodrop, qubit ölçümleri ve RIN değerleri (devamı).

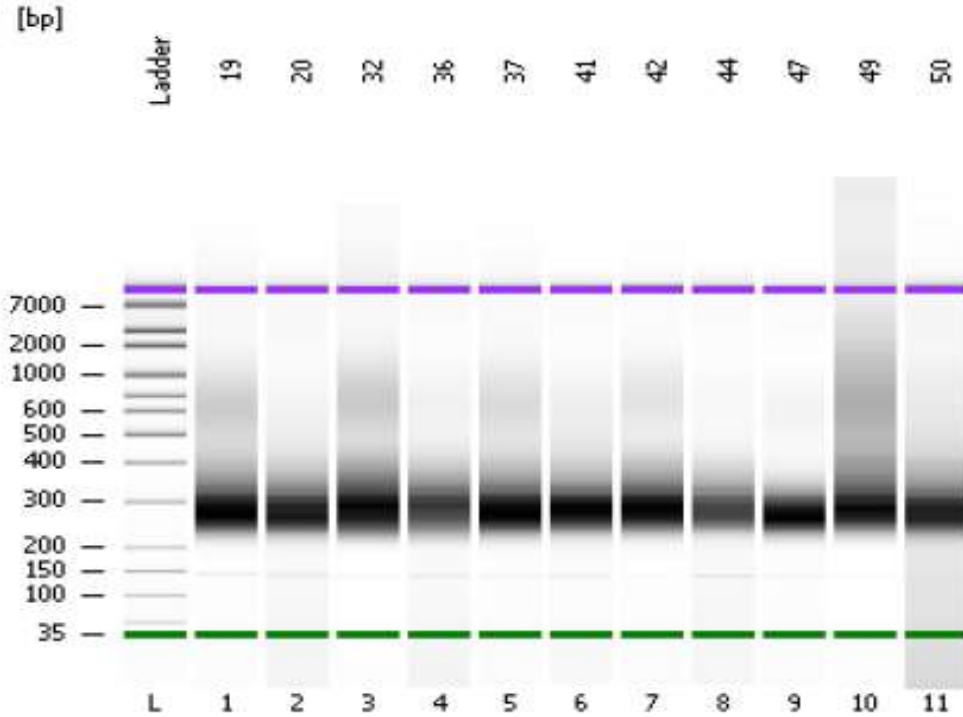
199	147M	292	2,01	1,91	318	6,5	BHK
200	147TK	93	2,03	1,98	85,2	7,7	BHK
201	51T	590,15	1,99	1,54	510	6,6	SHK
202	51N	416,15	2,07	1,6	204	7,3	SHK
203	51R	360,99	1,97	1,46	282	7,4	SHK
204	51M	1080,38	2,09	2,16	498	7,9	SHK
205	51TK	170	2,02	1,9	165	6,8	SHK
206	121T	1610	2,01	1,78	1240	6,5	BHK
207	121N	682,2	2,02	1,85	902	6,8	BHK
208	121R	1142	2,11	2,1	1203	7	BHK
209	121M	943	2,1	2,18	1000	7,1	BHK
210	121TK	536	2,11	1,66	345	6,8	BHK
211	129T	1757	2,1	2,21	1600	6,6	AK
212	129N	534	2,06	2,11	477	7,9	AK
213	129R	475	2,03	1,96	323	7,2	AK
214	129M	907	2,09	2,07	600	6,5	AK
215	129TK	154	2,03	2,01	143	7	AK
216	133T	503	2,01	2,15	453	7,6	AK
217	133N	579	2,02	2,1	510	8,1	AK
218	133R	507	2	2,08	477	7,2	AK
219	133M	1257	2,06	2,22	1030	7,9	AK
220	133TK	139	2,03	1,98	125	7,4	AK
221	179T	1167	2,04	2,14	216	8,3	AK
222	179N	1587	2,08	2,19	952	8,8	AK
223	179R	554,6	1,87	1,73	540	7,9	AK
224	179M	1957	2,03	2,11	895	8,6	AK
225	179TK	129,3	2,04	1,76	120	8,1	AK
226	10T	590,38	2,13	2,18	510	6,7	SHK
227	10N	707,46	2,15	2,26	704	8	SHK
228	10R	886,8	2,14	2,26	896	7,2	SHK
229	10M	1166,07	2,15	2,11	1272	7,7	SHK
230	10TK	69	2,08	1,73	49,2	7	SHK
231	35T	1861,77	2,14	2,09	1764	7	AK
232	35N	540,58	2,1	1,98	500	6	AK
233	35R	361,91	2,09	0,92	205	6,4	AK
234	35M	490,98	2,1	2,07	440	6,4	AK
235	35TK	172	2,04	1,91	136	5,5	AK
236	32T	2082,4	2,12	2,18	535	7,2	AK
237	32N	361,94	2,11	1,52	272	7	AK
238	32R	570,67	2,13	1,44	415	7,3	AK
239	32M	985,83	2,14	2,01	716	7,2	AK
240	32TK	183	2	1,9	175	8,9	AK
241	21T	1030,5	2,15	1,97	1120	7	BHK
242	21N	459,48	2,11	2,05	332	7,2	BHK
243	21R	229,13	2,09	1,72	185	7,5	BHK
244	21M	425,48	2,11	1,96	328	6,5	BHK
245	21TK	66	2,04	1,79	54,7	4,1	BHK
246	135T	1541	2,02	1,98	1576	6,5	BHK
247	135N	472	2	2,03	351	7,4	BHK
248	135R	567	2,06	2,26	458	5,9	BHK
249	135M	1993	2,12	2,14	1900	7,9	BHK
250	135TK	175	2,21	1,98	160	6,7	BHK
251	168T	1017	2,14	2,18	866	6,1	BHK
252	168N	838	2,12	2,19	740	7,5	BHK
253	168R	519	2,06	2,01	491	5,1	BHK
254	168M	575	2,11	2,19	880	6,1	BHK
255	168TK	78,35	2,04	1,87	67,5	7,3	BHK
SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom, BHK: Büyük Hücreli Karsinom, AK: Adenokarsinom							

4.5. Hasta Örneklerinden Hazırlanan Kütüphanenin Kalite Kontrolü

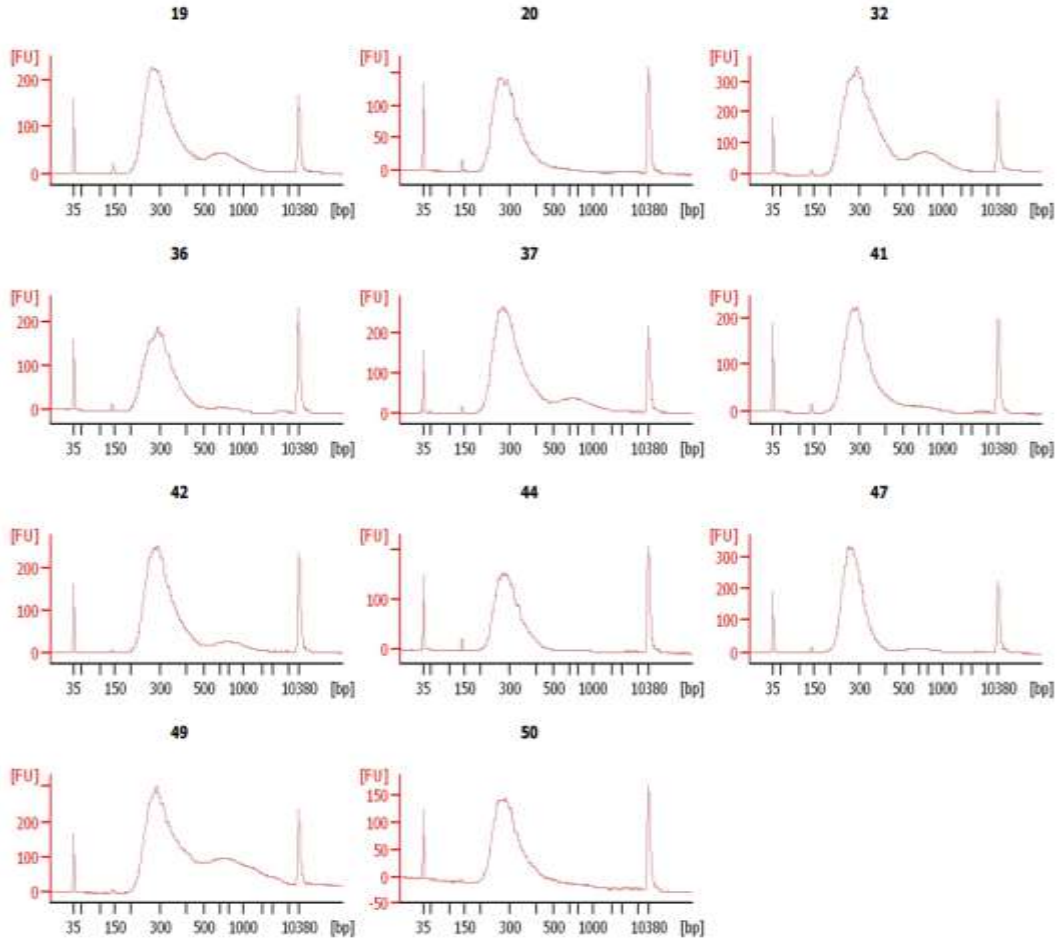
Dizileme öncesi hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrolü, -omiks çalışmalarında vazgeçilmez bir adımdır ve bu aşama, titizlikle planlanmış bir süreçtir ki bu, güvenilir sonuçların elde edilmesine olanak tanır.

Her bir örneğin RNA-seq kütüphane hazırlığı tamamlandıktan sonra, kütüphanenin kalite kontrolü titizlikle gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, elde edilen Bioanalyzer sonuçları, kalite kontrolünün doğru bir şekilde yapıldığını ve güvenilir sonuçlara ulaşmanın sağlandığını göstermek amacıyla rastgele seçilen örnekler üzerinde incelenmiştir. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9, bu kalite kontrolünün sonuçlarını görsel olarak ifade etmektedir ve her bir örneğin kütüphane kalitesini belirlemek için kullanılan verileri içermektedir. Bu özenli kalite kontrol işlemi, analizlerin güvenilirliğini ve sonuçların güvenilirliğini sağlama amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Electrophoresis File Run Summary



Şekil 4. 7: Kütüphane hazırlığı tamamlanan hasta doku ve kan örneklerinden rastgele seçilen örneklerden elde edilen baz uzunluklarının bioanalyzer jel görüntüsü.



Şekil 4. 8: Kütüphane hazırlığı tamamlanan hasta doku ve kan örneklerinden rastgele seçilen örneklerden elde edilen baz uzunluklarının bioanalizer grafik görüntüsü.

4.6. Hasta Örneklerinden Hazırlanan Kütüphanenin Miktar Tayini

Miktar hesaplaması için, kütüphanelerin miktarları belirlemek amacıyla KAPA Biosystems Kütüphane Miktar Tayin Kiti kullanılarak RT-PCR (ABI) cihazında analiz edilmiştir. Bu adım, kütüphanelerin içerdikleri fragmanların miktarını hassas bir şekilde belirlememize olanak tanır. Kütüphaneler, Illumina bağlanma adaptörlerine tanımlı olan evrensel bir prob kullanılarak işlenir. Bu sayede, fragmanların ucunda bulunan adaptörlerin sağlıklı bir şekilde tespit edilmesi ve amplifikasyonu mümkün olur. Her bir örnek için kullanılan adaptör bilgileri ve elde edilen miktarlar, analizin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak amacıyla Tablo 4.3'te ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Bu bilgiler, kütüphane miktarlarının hassas bir şekilde tespit edilmesini

ve verilerin güvenilirliğini sağlama amacı taşır. Bu sayede, analizlerin ve sonuçların güvenilir olması sağlanmıştır.

Tablo 4. 3: Kütüphane örneklerinin adaptör ve konsantrasyon bilgileri.

ÖRNEK NO	SAMPLE ID	ADAPTÖR KODU	KÜTÜPHANE KONSANTRASYONU (NM)
1	24T	701-501	166,6
2	24N	702-501	124,7
3	24R	703-501	170,2
4	24M	704-501	162,2
5	24TK	705-501	244,1
6	56T	706-501	278,4
7	56N	707-501	205,2
8	56R	708-501	215,3
9	56M	709-501	188,2
10	56TK	710-501	108,9
11	4T	701-502	133,2
12	4N	702-502	141
13	4R	703-502	124,1
14	4M	704-502	134,1
15	4TK	705-502	81
16	5T	706-502	126
17	5N	707-502	163,9
18	5R	708-502	167,7
19	5M	709-502	108,9
20	5TK	710-502	98,8
21	8T	701-503	138,6
22	8N	702-503	326,2
23	8R	703-503	78,9
24	8M	704-503	123,4
25	8TK	705-503	147,8
26	16T	706-503	244,3
27	16N	707-503	155
28	16R	708-503	205,3
29	16M	709-503	70,4
30	16TK	710-503	72,5
31	17T	701-504	138,9
32	17N	702-504	483,6
33	17R	703-504	104,7
34	17M	704-504	105,6
35	17TK	705-504	232,6
36	22T	706-504	305,4
37	22N	707-504	411,3
38	22R	708-504	279,7
39	22M	709-504	57,8
40	22TK	710-504	24
41	1T	701-505	346
42	1N	702-505	185,6
43	1R	703-505	254,3
44	1M	704-505	198
45	1TK	705-505	255,7
46	25T	706-505	210
47	25N	707-505	350,8
48	25R	708-505	206
49	25M	709-505	167
50	25TK	710-505	215,8
51	27T	701-505	499,75
52	27N	702-505	395,74
53	27R	703-505	287,11
54	27M	704-505	471,94
55	27TK	705-505	373,07
56	34T	706-505	310,89
57	34N	707-505	440,7

Tablo 4. 3: Kütüphane örneklerinin adaptör ve konsantrasyon bilgileri(devamı).

58	34R	708-505	452,42
59	34M	709-505	484,05
60	34TK	710-505	480,3
61	38T	701-506	109,31
62	38N	702-506	317,9
63	38R	703-506	125,1
64	38M	704-506	219,5
65	38TK	705-506	296,5
66	39T	706-506	155,9
67	39N	707-506	189,1
68	39R	708-506	134,9
69	39M	709-506	632,5
70	39TK	710-506	325,1
71	44T	701-507	359
72	44N	702-507	330
73	44R	703-507	392,2
74	44M	704-507	310,5
75	44TK	705-507	174,3
76	47T	706-507	427,6
77	47N	707-507	348,9
78	47R	708-507	398
79	47M	709-507	334,9
80	47TK	710-507	402
81	13T	708-504	457,7
82	13N	709-504	410,3
83	13R	710-504	430,8
84	13M	711-504	402,4
85	13TK	712-504	438,9
86	14T	701-501	326
87	14N	702-501	698,3
88	14R	703-501	571,4
89	14M	701-502	636,8
90	14TK	702-502	520,7
91	23T	707-501	578,2
92	23N	708-501	359,4
93	23R	709-501	428,4
94	23M	707-502	415,0
95	23TK	708-502	347,4
96	41T	701-503	243,2
97	41N	702-503	143,2
98	41R	703-503	237,9
99	41M	701-504	195,4
100	41TK	702-504	239,5
101	63T	704-503	87,3
102	63N	705-503	283,3
103	63R	706-503	314,3
104	63M	704-504	338,5
105	63TK	705-504	408,1
106	102T	707-503	194,4
107	102N	708-503	587,1
108	102R	709-503	261,9
109	102M	707-504	298,6
110	102TK	708-504	598,9

Tablo 4. 3: Kütüphane örneklerinin adaptör ve konsantrasyon bilgileri(devamı).

111	26T	701-505	244,7
112	26N	702-505	185,9
113	26R	703-505	161,1
114	26M	701-506	202,6
115	26TK	702-506	186,2
116	37T	704-505	136,3
117	37N	705-505	159,6
118	37R	706-505	121,6
119	37M	704-506	199,3
120	37TK	705-506	172,8
121	125T	710-505	143,6
122	125N	711-505	512,5
123	125R	712-505	512,9
124	125M	710-506	642,7
125	125TK	711-506	617,6
126	54T	701-507	822,2
127	54N	701-505	259
128	54R	703-507	719,9
129	54M	701-508	930,3
130	54TK	702-508	771,2
131	55T	704-507	812,9
132	55N	705-507	169,9
133	55R	706-507	703,7
134	55M	704-508	901,6
135	55TK	705-508	846,4
136	61T	707-507	894,9
137	61N	708-507	739,2
138	61R	709-507	970
139	61M	707-508	996
140	61TK	708-508	760
141	49T	710-507	441,4
142	49N	711-507	49,1
143	49R	712-507	266,5
144	49M	710-508	196,8
145	49TK	711-508	246,7
146	68T	701-501	346
147	68N	702-501	302,2
148	68R	703-501	311,5
149	68M	701-502	98,6
150	68TK	702-502	231,3
151	70T	704-501	387,7
152	70N	705-501	388
153	70R	706-501	341,7
154	70M	710-504	195,81
155	70TK	705-502	250,15
156	71T	711-504	40,1
157	71N	708-501	311,2
158	71R	709-501	249,27
159	71M	707-502	326,65
160	71TK	711-503	168,14
161	2T	712-503	190,07
162	2N	711-503	805,1
163	2R	712-503	356,7

Tablo 4. 3: Kütüphane örneklerinin adaptör ve konsantrasyon bilgileri(devamı).

164	2M	710-504	1001,8
165	2TK	711-504	738,5
166	78T	701-501	338,22
167	78N	702-501	257,6
168	78R	703-501	250,44
169	78M	701-502	256,62
170	78TK	702-502	277,94
171	90T	704-501	322,02
172	90N	705-501	267,62
173	90R	706-501	349,58
174	90M	704-502	254,78
175	90TK	705-502	323,09
176	105T	707-501	125,06
177	105N	708-501	219,5
178	105R	709-501	97,81
179	105M	707-502	117,53
180	105TK	708-502	164,3
181	123T	710-501	237,65
182	123N	711-501	51,79
183	123R	712-501	186,32
184	123M	710-502	308,77
185	123TK	711-502	359,27
186	120T	701-503	257,59
187	120N	702-503	135,62
188	120R	703-503	132,9
189	120M	701-504	92,7
190	120TK	702-504	123,1
191	139T	704-503	71,07
192	139N	705-503	129,56
193	139R	706-503	218,78
194	139M	704-504	126,97
195	139TK	705-504	149,41
196	147T	707-503	172,39
197	147N	708-503	206,38
198	147R	709-503	170,26
199	147M	707-504	152,5
200	147TK	708-504	180,4
201	51T	707-505	243,37
202	51N	708-505	265,25
203	51R	709-505	728,7
204	51M	707-506	260,8
205	51TK	710-503	261,49
206	121T	701-505	351,19
207	121N	702-505	382,47
208	121R	703-505	335,56
209	121M	701-506	308,11
210	121TK	702-506	435,75
211	129T	704-505	384,39
212	129N	705-505	399,3
213	129R	706-505	382,55
214	129M	704-506	359,29
215	129TK	705-506	343,32
216	133T	707-505	217,9

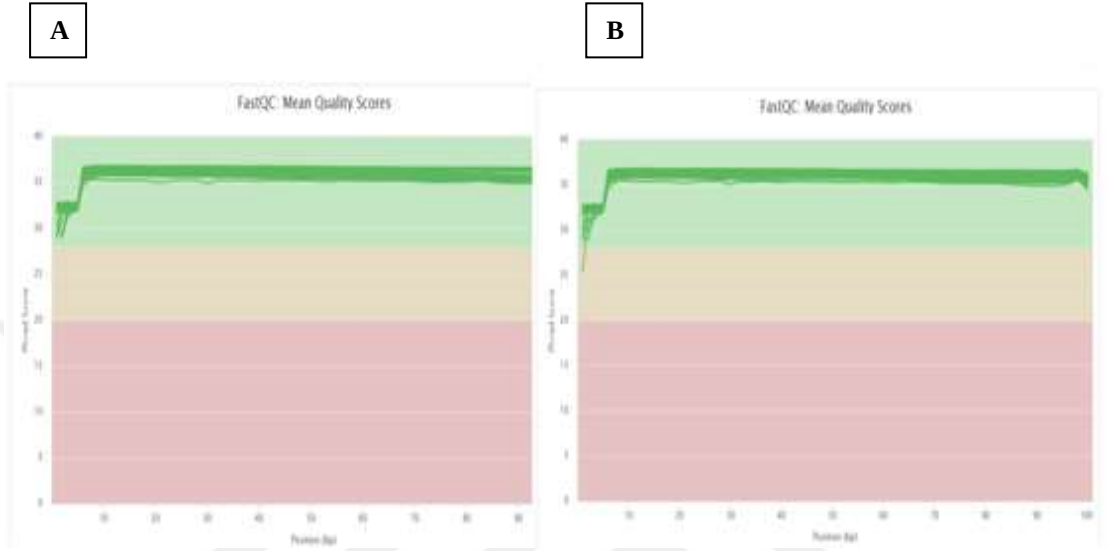
Tablo 4. 3: Kütüphane örneklerinin adaptör ve konsantrasyon bilgileri(devamı).

217	133N	708-505	289,46
218	133R	709-505	256,6
219	133M	707-506	253,33
220	133TK	708-506	277,54
221	179T	704-507	128,1
222	179N	705-507	285,25
223	179R	706-507	298,09
224	179M	704-508	238,28
225	179TK	705-508	284,06
226	10T	707-507	251,49
227	10N	708-507	293,53
228	10R	709-507	271,02
229	10M	707-508	256,32
230	10TK	708-508	294,85
231	35T	710-507	217,49
232	35N	711-507	307,53
233	35R	712-507	240,43
234	35M	710-508	307,56
235	35TK	711-508	233,04
236	32T	701-503	317,47
237	32N	702-503	279,69
238	32R	703-503	251,39
239	32M	701-504	229,1
240	32TK	702-504	170,88
241	21T	704-501	279,9
242	21N	705-501	478,7
243	21R	706-501	692,59
244	21M	704-502	436,49
245	21TK	704-503	180,03
246	135T	UDP0006	1428,57
247	135N	UDP0007	1012,99
248	135R	UDP0008	818,18
249	135M	UDP0009	506,49
250	135TK	UDP0010	275,32
251	168T	UDP0001	792,21
252	168N	UDP0002	489,18
253	168R	UDP0003	1376,62
254	168M	UDP0004	865,8
255	168TK	UDP0005	133,33

4.7. Dizilenen Hasta Örneklerinin RNA-Seq Ham Datasının Kalite Kontrolü

RNA dizilemesinin ham verileri, özellikle kalite kontrolü ve doğruluk sağlama amacıyla "Phred skoru" olarak adlandırılan bir değerlendirme sistemi kullanılarak belirlenir. Phred skoru, her bazın doğruluğunu belirlemek için kullanılan bir sayısal değerdir ve DNA veya RNA dizileme kalitesini ifade eder. Phred skoru, bir bazın doğruluğunu temsil eden $-10 * \log_{10}(\text{hata olasılığı})$ formülüyle hesaplanır. Bu nedenle, daha yüksek bir Phred skoru, daha yüksek bir doğruluk seviyesini ifade eder.

RNA dizilemesinde her bazın ne kadar güvenilir olduğunu gösterir. Yüksek skorlar, bazın dizileme sırasında doğru bir şekilde algılandığını ve raporlandığını gösterirken, düşük skorlar düşük kaliteli bazları işaret eder. Bu sebeple ham verilerin analiz öncesi kalitesi kontrol edilmiş ve Şekil 4.10’da belirtildiği gibi skor ataması yapılmıştır.



Şekil 4. 9: Tümör örneklerinin ve normal örneklerin okuma skorlarının monitörlenmesi. A) Normal dokular. B) Tümör dokuları. Base calling doğruluğu, Phred quality score (Q score) tarafından ölçülen, dizileme platformunun doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan en yaygın ölçümdür.

4.8. Hasta Örneklerine Ait Dizi Bilgilerinin Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları

Dizileme sonrası elde edilen veriler, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç farklı grupta toplanan 51 hastanın incelenmesi amacıyla derinlemesine analiz edilmiştir. Bu analizler, hastaların farklı örnek türlerine (Tümör, Normal, Reaktif Stroma, Lenf Nodu, Tam Kan) ait 5 örneği (T, N, R, M, TK) karşılaştırmalı olarak içermektedir. Analizler aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir.

Skuamöz Hücreli Karsinom Analizi: İlk olarak, skuamöz hücreli karsinom hastalarının tümör dokuları, aynı hastaların normal dokuları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma, her iki dokunun gen ifadesindeki farklılıkları ortaya çıkarmak amacıyla yapılmıştır.

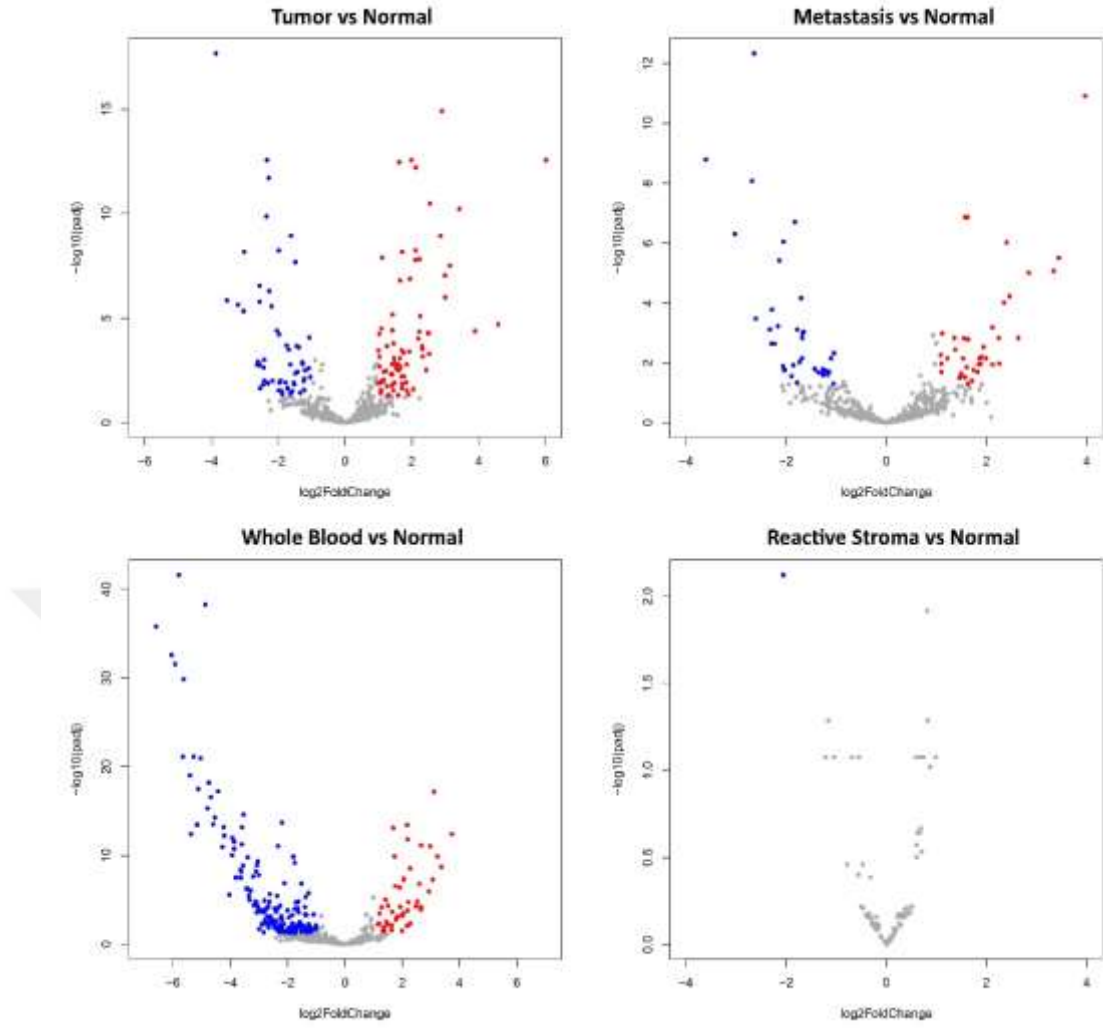
Reaktif Stroma ve Lenf Nodu Analizi: Ardından, reaktif stroma dokuları ile normal dokular, ve lenf nodu dokuları ile normal dokular karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar, belirli dokuların normal dokulara göre gen ifadesindeki farklılıklarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Tam Kan Karşılaştırması: Son olarak, hastaların tam kan örnekleri ile normal dokular karşılaştırılmıştır. Bu analiz, hastaların kan örneklerindeki gen ifadesindeki değişiklikleri tespit etmeyi amaçlamaktadır.

Tüm bu işlemler, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom hastaları için de aynı adımlarla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, farklı kanser türlerinin ve dokuların gen ifadesindeki benzersiz özellikleri ve farklılıkları hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. Bu analizler, kanser alt tiplerinin daha iyi anlaşılmasını ve gelecekteki tanı, tedavi ve prognoz yönetimlerine yönelik yeni perspektiflerin geliştirilmesini desteklemektedir.

4.8.1 Skuamöz Hücreli Karsinom İçin Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları

Karşılaştırmalı analizler kapsamında ekspresyon düzeyi ölçülebilen 1853 miRNA'ya ait değişimler Şekil 4.11'de sunulmuştur. Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 157 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.4'de verilmiştir. MiRNAların kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 239 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.5'de verilmiştir. Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 83 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.6'da verilmiştir. Reaktif stromadaki ekspresyon düzeylerinin, normal dokulardakinden çok farklı olarak değişmediği, sadece 2 miRNA'nın ekspresyon düzeylerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılaştığı görülmüştür (Tablo 4.7).



Şekil 4. 10: Skuamöz hücre karsinom hastalarına ait transkriptom verilerinin gruplar arası karşılaştırmalarına ait volkan çizgeleri (ekspresyonu farklılaşan miRNA'lar kırmızı veya mavi renk ile gösterilmiştir (Kırmızı renk yukarı yönlü düzenlemeyi, mavi renk aşağı yönlü düzenlemeyi göstermektedir).

Tablo 4. 4:Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR4521	-3,86	2,18E-18
MIR3198-1	2,89	1,24E-15
MIR1537	1,98	2,75E-13
MIR205	6,01	2,75E-13
MIR30A	-2,33	2,75E-13

Tablo 4. 4: Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA (devamı).

MIR5194	1,62	3,43E-13
MIR4312	2,11	6,19E-13
MIR511	-2,28	1,99E-12
MIR3161	2,53	3,29E-11
MIR3690	3,42	5,99E-11

Tablo 4. 5: Kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR4521	-5,8004	2,44E-42
MIR27B	-4,87609	5,25E-39
MIR30A	-6,59426	1,56E-36
MIR23B	-6,05461	2,56E-33
MIR511	-5,93243	2,74E-32
MIR548V	-5,63102	1,38E-30
MIR221	-5,65935	7,22E-22
MIR605	-5,28206	7,22E-22
MIR3117	-5,0407	1,08E-21
MIR125B1	-5,41282	9,45E-20

Tablo 4. 6: Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR548V	-2,63893	4,54E-13
MIR5195	3,963986	1,2E-11
MIR548F2	-3,60128	1,6E-09
MIR3117	-2,67927	8,29E-09
MIR342	1,623922	1,34E-07
MIR4451	1,564957	1,34E-07
MIR27B	-1,82569	1,97E-07
MIR3193	-3,02046	4,92E-07
MIR30A	-2,05136	8,84E-07

Tablo 4.6: Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA (devamı).

MIR6774	2,399187	9,46E-07
----------------	-----------------	-----------------

Tablo 4. 7: Reaktif stromadaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi değişen 2 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR3193	-2,05689	0,007547
MIR4802	0,813702	0,012099

4.8.2 Adenokarsinom için karşılaştırmalı analiz sonuçları

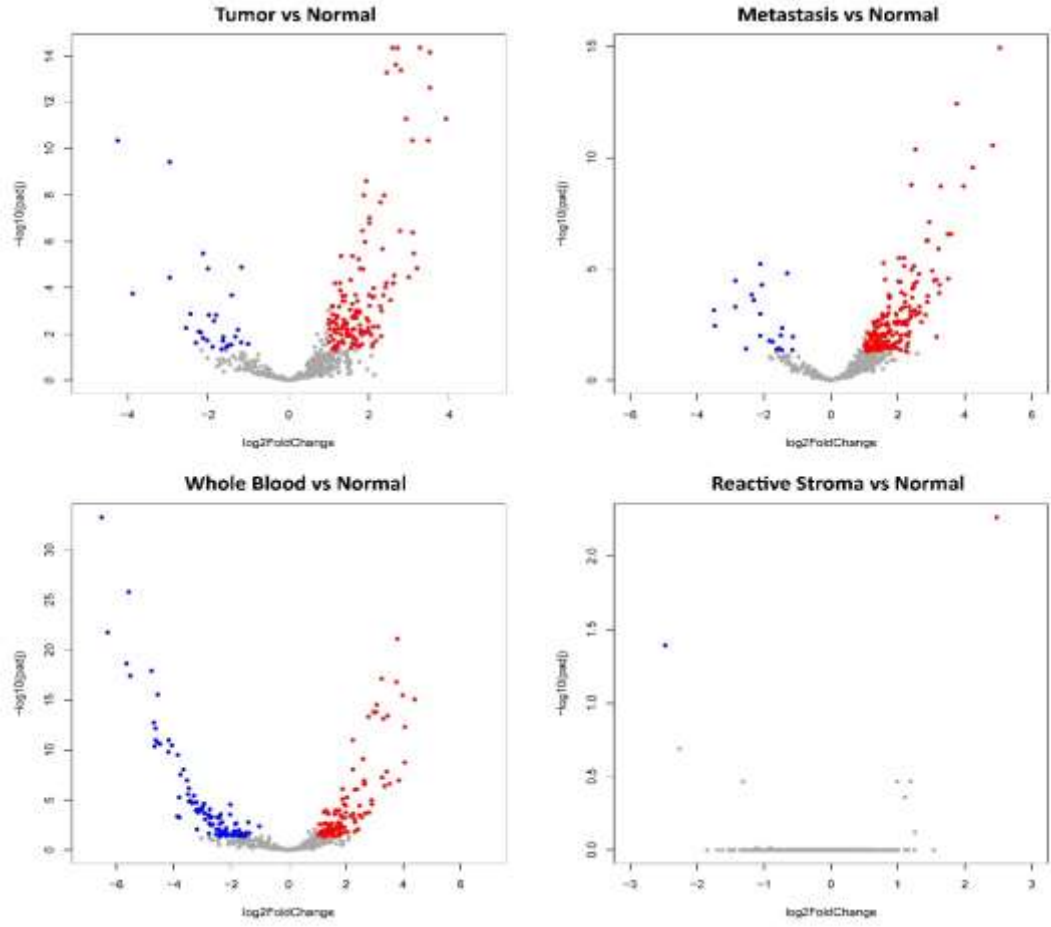
Analizler kapsamında ekspresyon düzeyi ölçülebilen 1853 miRNA'ya ait değişimler Şekil 4.12'de sunulmuştur.

Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 182 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.8'de verilmiştir.

MiRNAların kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 208 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.9'da verilmiştir.

Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 205 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.10'de verilmiştir.

Reaktif stromadaki ekspresyon düzeylerinin, normal dokulardakinden çok farklı olarak değişmediği, sadece 2 miRNA'nın ekspresyon düzeylerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılaştığı görülmüştür (Tablo 4.11).



Şekil 4. 11: Adenokarsinom hastalarına ait transkriptom verilerinin gruplar arası karşılaştırmalarına ait volkan çizgeleri (ekspresyonu farklılaşan miRNA'lar kırmızı veya mavi renk ile gösterilmiştir. Kırmızı renk yukarı yönlü düzenlemeyi, mavi renk aşağı yönlü düzenlemeyi göstermektedir).

Tablo 4. 8: Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR3198-1	3,270368	4,36E-15
MIR5194	2,585768	4,36E-15
MIR7848	2,715751	4,51E-15
MIR3161	3,518629	6,78E-15
MIR4312	2,669518	2,29E-14
MIR4480	2,798894	4,04E-14
MIR4477B	2,441458	5,07E-14

Tablo 4. 8: Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA (devamı).

MIR3690	3,521895	2,36E-13
MIR1250	3,915243	5,1E-12
MIR378E	2,928532	5,1E-12

Tablo 4. 9: Kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR4521	-6,51641	5,48E-34
MIR27B	-5,56124	1,49E-26
MIR30A	-6,30482	1,73E-22
MIR3198-1	3,784339	7,26E-22
MIR548V	-5,63903	2,21E-19
MIR23B	-4,77225	1,17E-18
MIR126	-5,5155	3,73E-18
MIR4480	3,246358	7,07E-18
MIR3161	3,766903	1,62E-17
MIR221	-4,56578	2,76E-16

Tablo 4. 10: Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

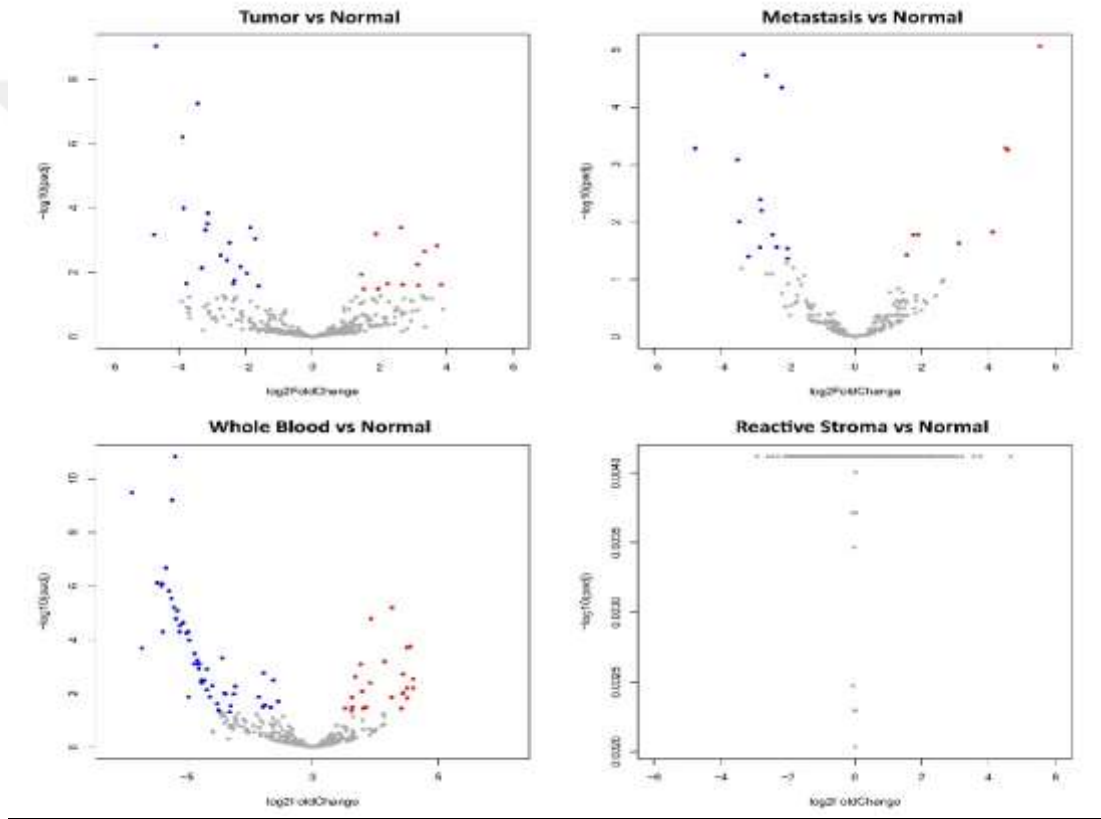
	log2FoldChange	padj
MIR5571	5,046232	1,17E-15
MIR6774	3,7527	3,84E-13
MIR4540	4,836785	2,78E-11
MIR342	2,52275	4,32E-11
MIR5195	4,230812	2,78E-10
MIR4477B	2,401273	1,66E-09
MIR4537	3,283729	1,91E-09
MIR4539	3,965323	1,91E-09
MIR301A	2,936337	7,72E-08
MIR4446	3,487452	2,67E-07

Tablo 4. 11: Reaktif stromadaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi değişen 2 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR3194	2,473438	0,005468
MIR3146	-2,47852	0,040596

4.8.3 Büyük hücreli karsinom için karşılaştırmalı analiz sonuçları

Analizler kapsamında ekspresyon düzeyi ölçülebilen 1853 miRNA'ya ait değişimler Şekil 4.13'de sunulmuştur.



Şekil 4. 12: Büyük hücreli karsinom hastalarına ait transkriptom verilerinin gruplar arası karşılaştırmalarına ait volkan çizgeleri (ekspresyonu farklılaşan miRNA'lar kırmızı veya mavi renk ile gösterilmiştir. Kırmızı renk yukarı yönlü düzenlemeyi, mavi renk aşağı yönlü düzenlemeyi göstermektedir).

Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 32 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.12'da verilmiştir.

Tablo 4. 12: Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR4521	-4,67579	9,35E-10
MIR30A	-3,43305	5,68E-08
MIR221	-3,87973	6,22E-07
MIR511	-3,85064	0,000102
MIR6809	-3,12093	0,000143
MIR222	-3,13839	0,00031
MIR27B	-1,85712	0,000407
MIR3198-1	2,645231	0,000407
MIR605	-3,19243	0,000482
MIR5194	1,894821	0,000643

MiRNAların kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 77 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4. 13: Kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR4521	-5,47328	1,5E-11
MIR30A	-7,19838	3,36E-10
MIR27B	-5,58797	6,23E-10
MIR23B	-5,83118	2,1E-07
MIR125B1	-6,1758	7,52E-07
MIR548V	-5,99852	8,27E-07
MIR126	-6,01411	9,77E-07
MIR6809	-5,71615	1,52E-06
MIR511	-5,61976	2,89E-06

Tablo 4. 13: Kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA (devamı).

MIR3117	-5,51661	6,3E-06
----------------	-----------------	----------------

Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 22 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.14’de verilmiştir.

Tablo 4. 14: Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

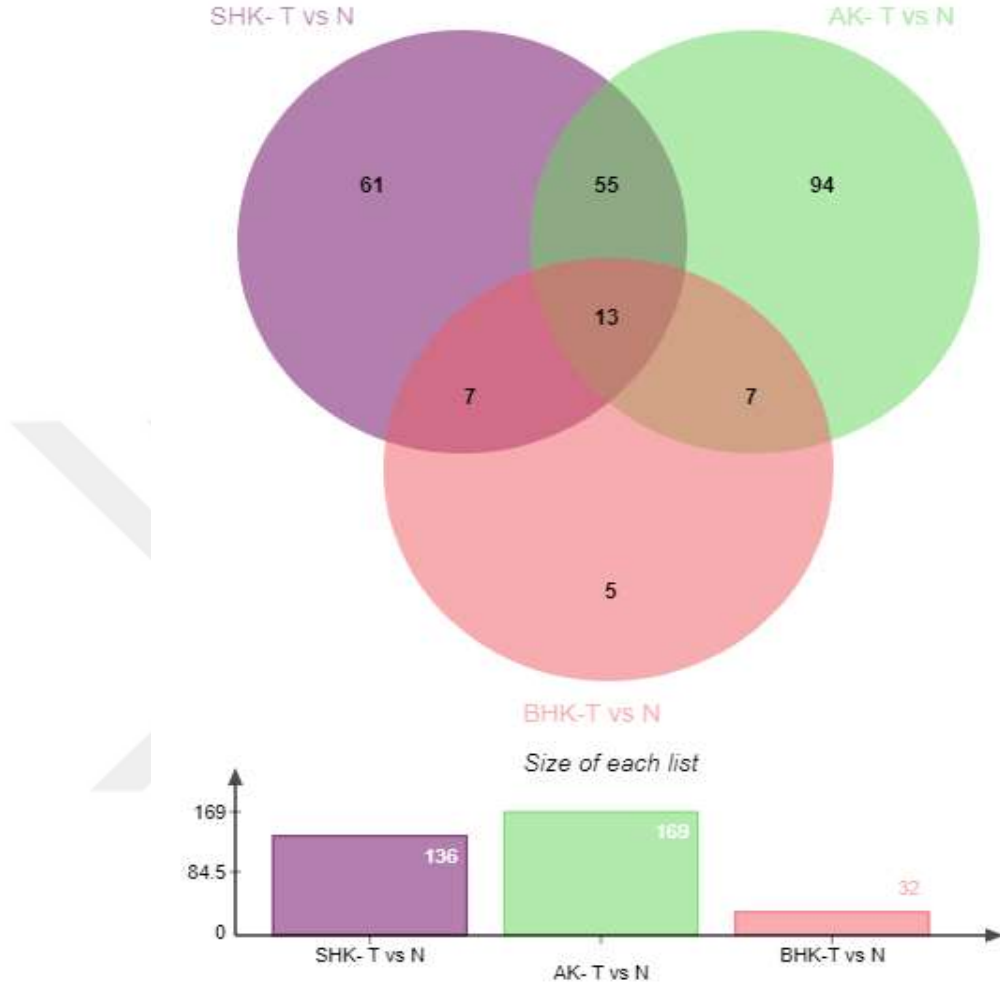
	log2FoldChange	padj
MIR4537	5,524186	8,66E-06
MIR30A	-3,32933	1,23E-05
MIR23B	-2,64024	2,84E-05
MIR27B	-2,17978	4,55E-05
MIR4539	4,502622	0,000521
MIR548F2	-4,77667	0,000521
MIR5195	4,569001	0,000561
MIR6124	-3,51296	0,000828
MIR548V	-2,82034	0,004084
MIR605	-2,7887	0,006308

Reaktif stromadaki ekspresyon düzeylerinin, normal dokulardakinden farklı olarak değişmediği görülmüş, herhangi bir miRNA için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim yakalanamamıştır.

4.9. SHK, AK ve BHK Tümör Dokularında Ekspresyon Düzeyleri Değişen miRNA’lar

Bu çalışmada, KHDAK'ın alt tipleri olan SHK, AK ve BHK tümör gruplarındaki miRNA'ların ekspresyon düzeylerini karşılaştırılmıştır. Her histolojik alt tipte, kendi

içinde değişen miRNA'lar belirlenmiştir. Karşılaştırma sonuçları Şekil 4.14'de ve Tablo 4.15, Tablo 4.16, Tablo 4.17'de belirtildiği gibidir.



Şekil 4. 13 : SHK, AK ve BHK gruplarındaki alttipe özgün ve özgün olmayan miRNA'ların Venn diyagramıyla gösterimi.

Tablo 4. 15: SHK'ye özgü Tümör Dokusu MiRNA'ları.

hsa-mir-146b	hsa-mir-1913	hsa-mir-181b-1	hsa-mir-648	hsa-mir-548c
hsa-mir-4486	hsa-mir-212	hsa-mir-603	hsa-mir-301a	hsa-mir-4433a
hsa-mir-30d	hsa-mir-33a	hsa-mir-30b	hsa-mir-1282	hsa-mir-4652
hsa-mir-548ax	hsa-mir-3188	hsa-mir-32	hsa-mir-1245a	hsa-mir-944
hsa-mir-548b	hsa-mir-3120	hsa-mir-548v	hsa-mir-548u	hsa-mir-205
hsa-mir-490	hsa-mir-3178	hsa-mir-3117	hsa-mir-554	
hsa-mir-889	hsa-mir-100	hsa-mir-1255a	hsa-mir-625	
hsa-mir-376b	hsa-mir-99a	hsa-mir-3155a	hsa-mir-1910	
hsa-mir-4705	hsa-mir-27b	hsa-mir-548j	hsa-mir-580	
hsa-mir-329-2	hsa-mir-654	hsa-mir-548k	hsa-mir-4537	
hsa-mir-30a	hsa-mir-433	hsa-mir-320e	hsa-mir-4477b	
hsa-mir-548as	hsa-mir-5091	hsa-mir-4659a	hsa-mir-548p	
hsa-mir-5008	hsa-mir-1972-1	hsa-mir-548l	hsa-mir-4653	
hsa-mir-4524a	hsa-mir-5188	hsa-mir-378e	hsa-mir-1273h	

Tablo 4. 16: AK'ye özgü Tümör Dokusu MiRNA'ları.

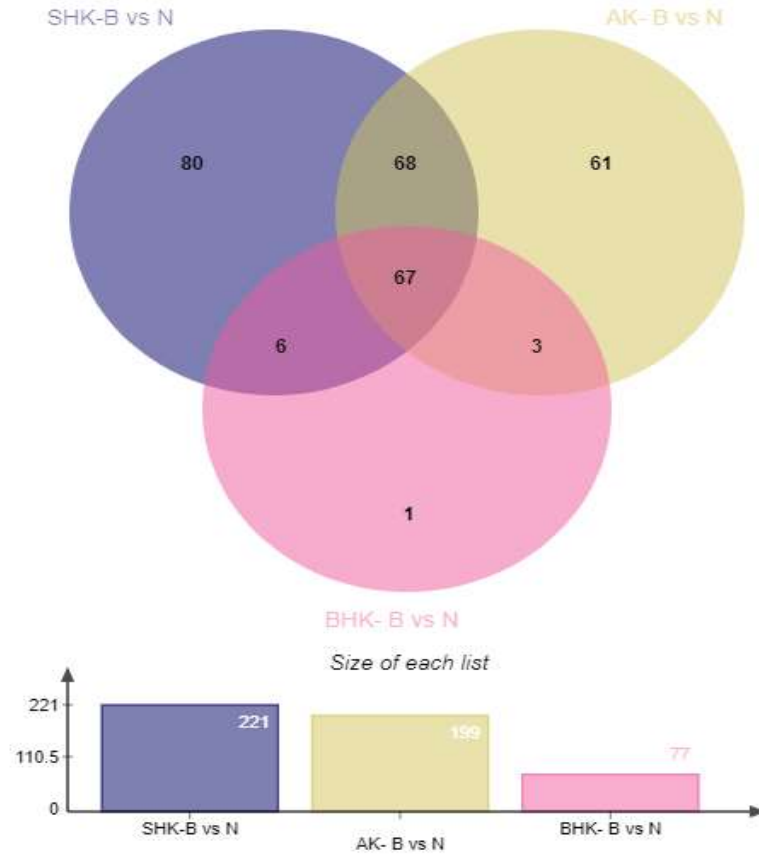
hsa-mir-33A	hsa-mir-3136	hsa-mir-548U	hsa-mir-6504
hsa-mir-548f-3	hsa-mir-1273C	hsa-mir-6769A	hsa-mir-5697
hsa-mir-4769	hsa-mir-604	hsa-mir-320E	hsa-mir-1249
hsa-mir-4699	hsa-mir-1299	hsa-mir-640	hsa-mir-623
hsa-mir-4794	hsa-mir-3605	hsa-mir-6133	hsa-mir-4420
hsa-mir-548AX	hsa-mir-765	hsa-mir-181b-2	hsa-mir-6129
hsa-mir-3065	hsa-mir-593	hsa-mir-4659A	hsa-mir-548P
hsa-mir-99A	hsa-mir-3909	hsa-mir-643	hsa-mir-6750
hsa-mir-548B	hsa-mir-644A	hsa-mir-4326	hsa-mir-4645
hsa-mir-567	hsa-mir-25	hsa-mir-4519	hsa-mir-454
hsa-mir-30B	hsa-mir-1255A	hsa-mir-2909	hsa-mir-8086
hsa-mir-98	hsa-mir-5690	hsa-mir-4637	hsa-mir-7847
hsa-mir-103a-2	hsa-mir-591	hsa-mir-6876	hsa-mir-548O
hsa-mir-4755	hsa-mir-3671	hsa-mir-548aa-2	hsa-mir-1203
hsa-mir-4296	hsa-mir-597	hsa-mir-3183	hsa-mir-613
hsa-mir-7161	hsa-mir-28	hsa-mir-3155A	hsa-mir-626
hsa-mir-548E	hsa-mir-3173	hsa-mir-548K	hsa-mir-548L
hsa-mir-550a-1	hsa-mir-4263	hsa-mir-5586	hsa-mir-4477B
hsa-mir-30E	hsa-mir-505	hsa-mir-1284	hsa-mir-5571
hsa-mir-499B	hsa-mir-4729	hsa-mir-1200	hsa-mir-378E
hsa-mir-3679	hsa-mir-548T	hsa-mir-548J	hsa-mir-1273H
hsa-mir-3657	hsa-mir-4639	hsa-mir-4306	hsa-mir-4433A
hsa-mir-6075	hsa-mir-652	hsa-mir-4295	
hsa-mir-581	hsa-mir-4748	hsa-mir-558	

Tablo 4. 17: BHK'ye özgü Tümör Dokusu MiRNA'ları.

hsa-mir-132
hsa-mir-3145
hsa-mir-145
hsa-mir-3685
hsa-mir-9-1

4.10. SHK, AK ve BHK Kanlarında Ekspresyon Düzeyleri Değişen miRNA'lar

KHDAK'ın alt tipleri olan SHK, AK ve BHK kan gruplarındaki miRNA'ların ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Her histolojik alt tipte, kendi içinde değişen miRNA'lar belirlenmiştir. Karşılaştırma sonuçları Şekil 4.15'de belirtildiği gibidir. Ayrıca, ekspresyon değişimleri ortak olan miRNA'lar tablo 4.18'de verilmiştir.



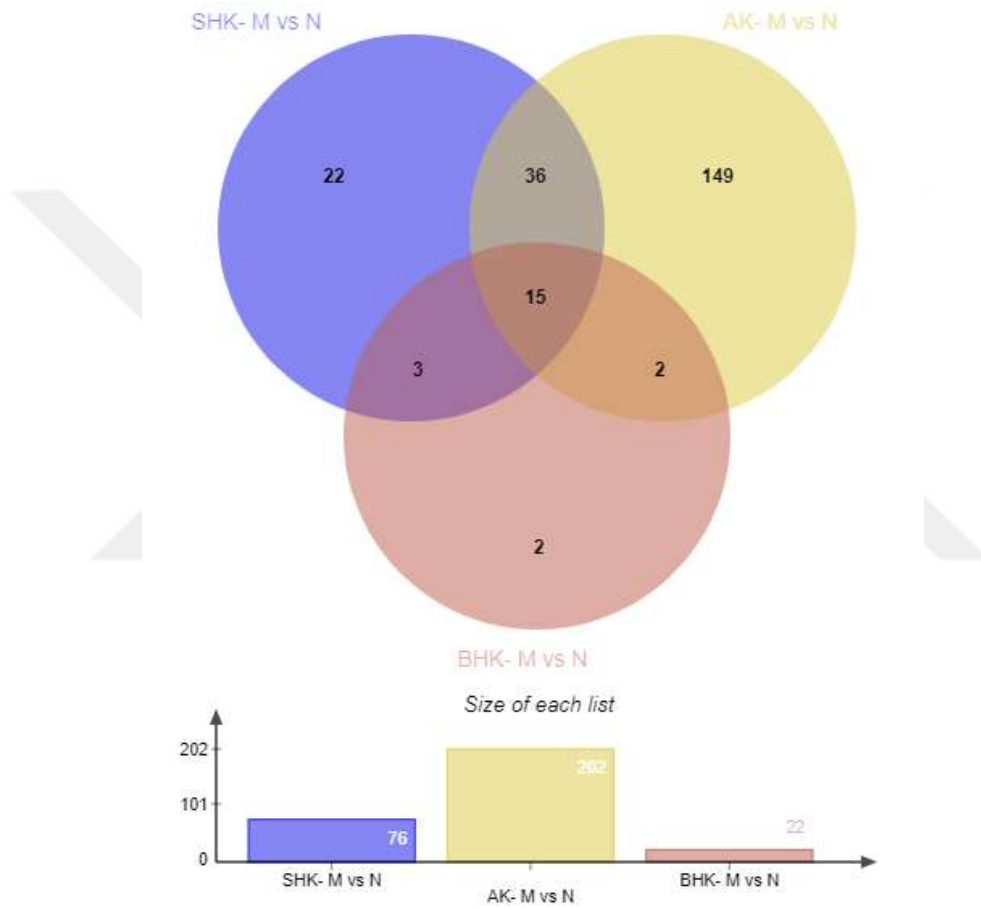
Şekil 4. 14: SHK, AK ve BHK kanlarında ekspresyon düzeyleri değişen miRNA'ların Venn diyagramıyla gösterimi.

Tablo 4. 18: KHDAK'nin 3 alt tipinin kanında bulunan ortak miRNA paneli.

hsa-mir-30A	hsa-mir-3117	hsa-mir-4427	hsa-mir-30B	hsa-mir-1244-2	hsa-mir-1537
hsa-mir-23B	hsa-mir-27B	hsa-mir-151A	hsa-mir-335	hsa-mir-378E	hsa-mir-4312
hsa-mir-511	hsa-mir-145	hsa-mir-4664	hsa-mir-320A	hsa-mir-6753	hsa-mir-628
hsa-mir-4521	hsa-mir-3145	hsa-mir-548AX	hsa-mir-4731	hsa-mir-657	hsa-mir-101-1
hsa-mir-221	hsa-mir-548f-2	hsa-mir-99A	hsa-mir-331	hsa-mir-5194	hsa-mir-1250
hsa-mir-548V	hsa-let-7a-2	hsa-mir-138-1	hsa-mir-3685	hsa-mir-4480	hsa-mir-4673
hsa-mir-125b-1	hsa-mir-3189	hsa-mir-146B	hsa-mir-5687	hsa-mir-4632	hsa-mir-3161
hsa-mir-126	hsa-mir-6081	hsa-mir-5188	hsa-mir-132	hsa-mir-4772	hsa-mir-338
hsa-mir-605	hsa-mir-4524A	hsa-mir-3918	hsa-mir-212	hsa-mir-4477B	hsa-mir-548C
hsa-mir-3193	hsa-mir-222	hsa-mir-548B	hsa-mir-582	hsa-mir-4489	hsa-mir-3198-1
hsa-mir-6809	hsa-mir-218-1	hsa-mir-3134	hsa-mir-4999	hsa-mir-3939	hsa-mir-4433A
hsa-mir-3690-1					

4.11. SHK, AK ve BHK Lenf Nodlarında Ekspresyon Düzeyleri Değişen miRNA'lar

KHDAK'ın alt tipleri olan SHK, AK ve BHK lenf nodları gruplarındaki miRNA'ların ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Her histolojik alt tipte, kendi içinde değişen miRNA'lar belirlenmiştir. Karşılaştırma sonuçları Şekil 4.16'da belirtildiği gibidir.



Şekil 4. 15: SHK, AK ve BHK lenf nodlarında ekspresyon düzeyleri değişen miRNA'ların Venn diyagramıyla gösterimi.

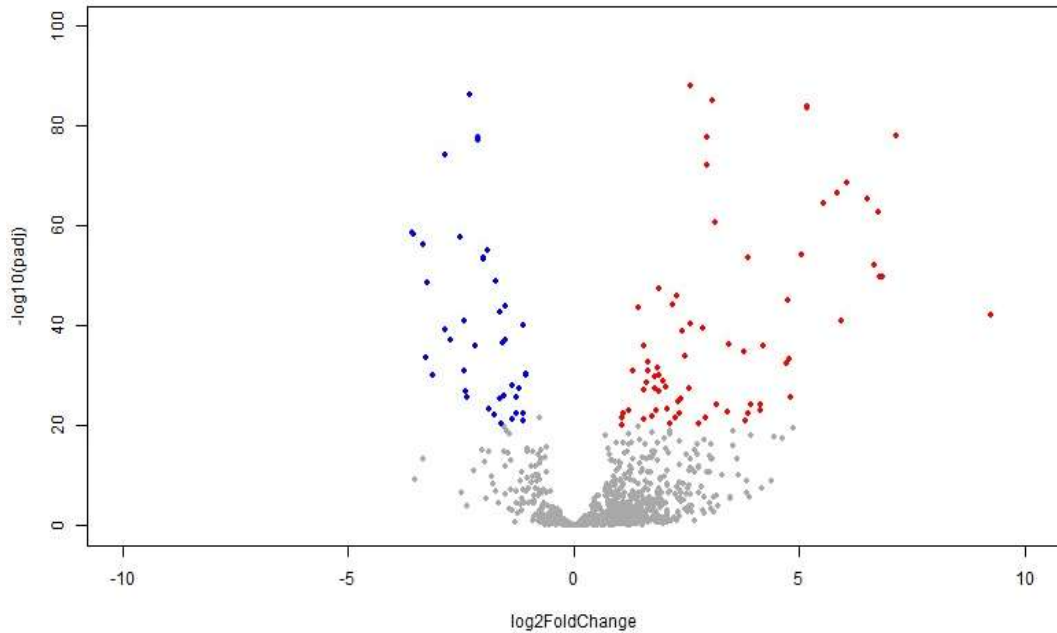
4.12. TCGA verilerinin analiz Sonuçları

Kanser araştırmalarında The Cancer Genome Atlas (TCGA) veri analizi, büyük bir öneme sahiptir. TCGA, farklı kanser türlerinde genetik ve genomik değişikliklerin detaylı olarak analiz edildiği bir projedir. TCGA analizi, kanser alt tiplerini ve bu alt

tiplerdeki genetik özellikleri tanımlamamıza olanak tanır, bu da kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yol açabilir. Ayrıca, bu analizler kanserin erken teşhisinde, prognoz tahminlerinde ve ilaç geliştirmede daha etkili yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlar. Sonuç olarak, TCGA veri analizi kanser araştırmalarında devrim niteliğinde bir kaynaktır. Bu verilerin analizi, kanserle ilgili yeni bilgilerin ortaya çıkmasına, daha iyi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve kanserin moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunur. Bu sebeple hasta örneklerimizin yanı sıra TCGA verileri ile de karşılaştırmalı sonuçlar elde edildi.

Adenokarsinom (LUAD) hastalarına ait 533 tümör dokusu ve 59 sağlıklı doku örneği ile skuamöz hücre karsinom (LUSC) hastalarına ait 502 tümör ve 51 sağlıklı doku örneğine ait RNA-seq verileri Kanser Genom Atlası'ndan (TCGA) alınmış ve aynı metodoloji altında analiz edilmiştir.

Skuamöz hücre karsinom analizleri kapsamında ekspresyon düzeyi ölçülebilen 1881 miRNA'ya ait değişimler Şekil 4.17'de sunulmuştur. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.19'da verilmiştir.

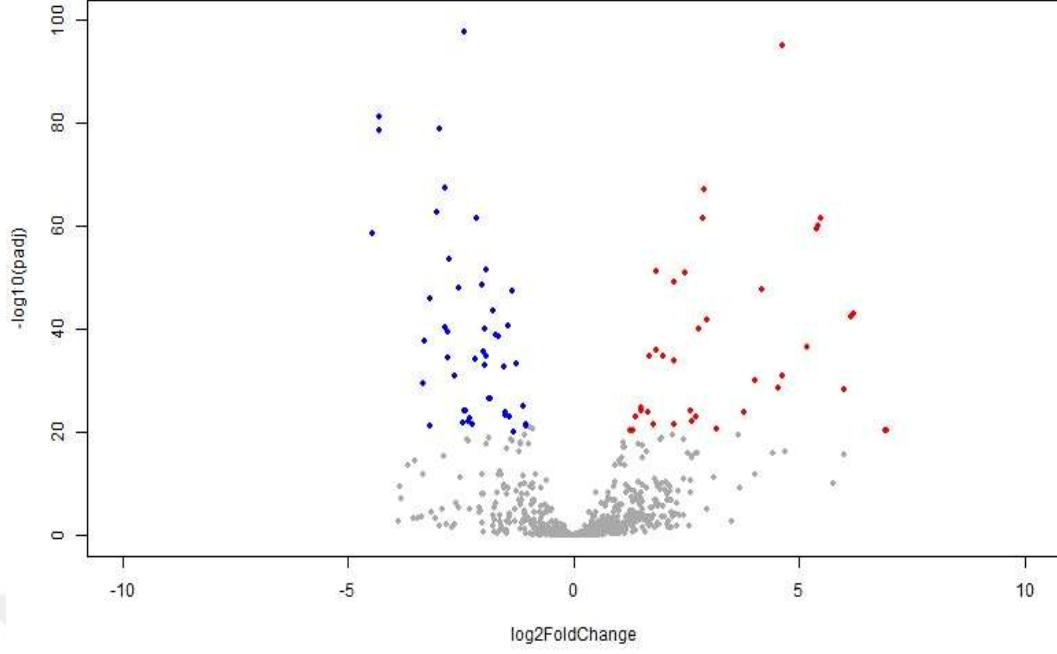


Şekil 4. 16: Skuamöz hücreli karsinom hastalarına ait transkriptom verilerinin gruplar arası karşılaştırmasına ait volkan çizgesi (ekspresyonu farklılaşan miRNA'lar kırmızı veya mavi renk ile gösterilmiştir. Kırmızı renk yukarı yönlü düzenlemeyi, mavi renk aşağı yönlü düzenlemeyi göstermektedir).

Tablo 4. 19: TCGA - skuamöz hücre karsinom dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
MIR210	4,481567687	1,77E-159
MIR944	6,370289063	2,22E-151
MIR196B	5,389055648	1,92E-134
MIR205	5,305056704	2,44E-131
MIR130B	2,590110756	1,06E-88
MIR30D	-2,321378059	4,78E-87
MIR708	3,069137116	9,52E-86
MIR92	5,174312861	1,71E-84
MIR91	5,160146514	3,03E-84
MIR93	5,17065038	3,48E-84

Adenokarsinom analizleri kapsamında ekspresyon düzeyi ölçülebilen 1881 miRNA'ya ait değişimler Şekil 4.18'de sunulmuştur. Ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA Tablo 4.20'de verilmiştir.



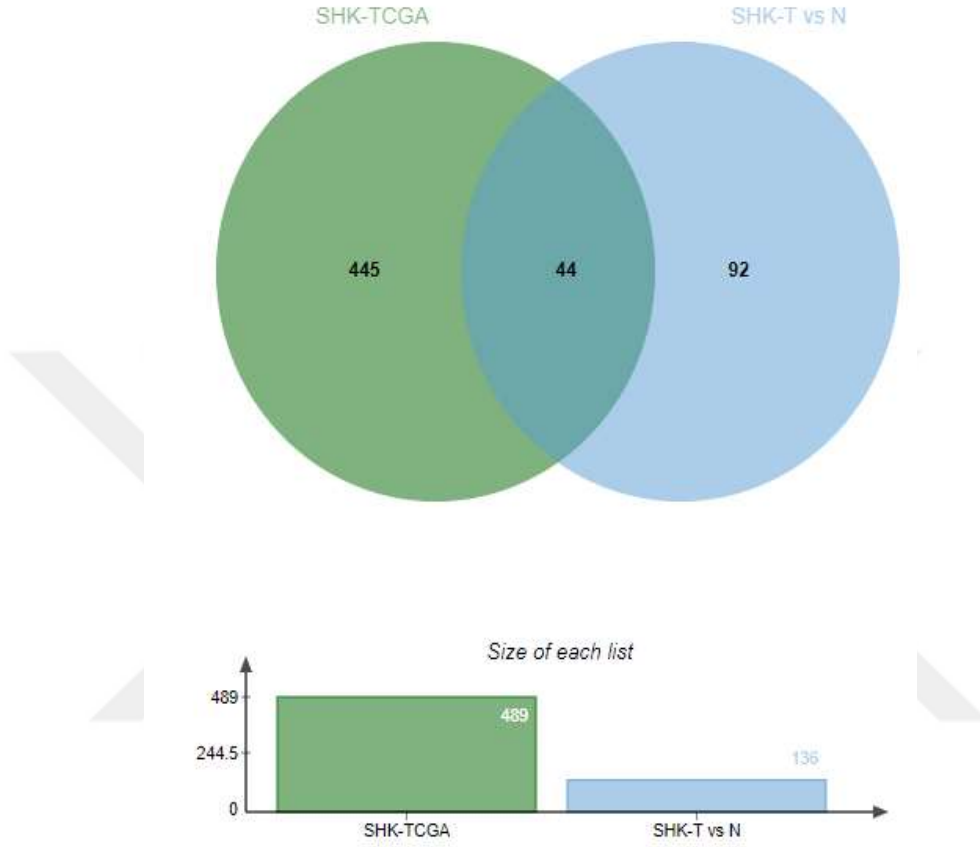
Şekil 4. 17: Adenokarsinom hastalarına ait transkriptom verilerinin gruplar arası karşılaştırmasına ait volkan çizgesi ekspresyonu farklılaşan miRNA'lar kırmızı veya mavi renk ile gösterilmiştir. (Kırmızı renk yukarı yönlü düzenlemeyi, mavi renk aşağı yönlü düzenlemeyi göstermektedir).

Tablo 4. 20: TCGA - adenokarsinom dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA.

	log2FoldChange	padj
LET7D	-2,437	1,73E-98
MIR210	4,613	8,31E-96
MIR4861	-4,318	7,96E-82
MIR197	-2,965	1,56E-79
MIR4862	-4,304	1,86E-79
MIR139	-2,845	4,16E-68
MIR708	2,888	5,70E-68
MIR328	-3,031	2,60E-63
MIR96	2,849	2,10E-62
MIR195	-2,148	3,45E-62

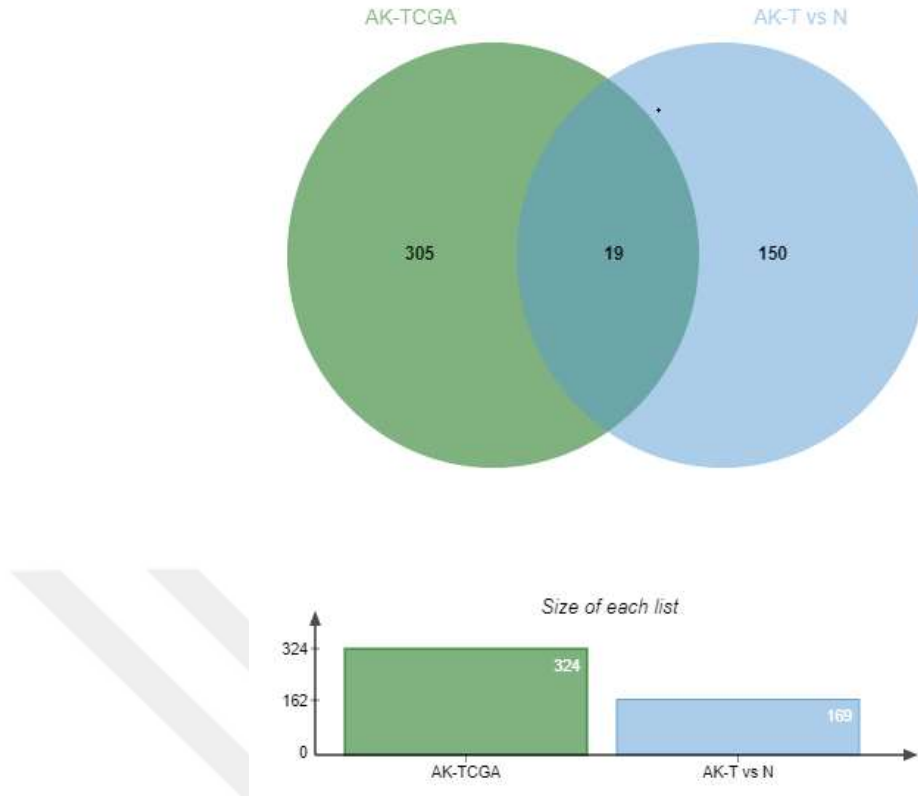
Çalışmada kullanılan SHK ve AK örneklerinin tümör dokularından elde edilen miRNA bilgileri ile TCGA veri setindeki tümör dokusu miRNA bilgileri

karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. SHK için her iki grubun tümör dokusundaki miRNA profili karşılaştırıldığında %92.43'lük bir farklılık (Şekil 4.19) gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 18: SHK için TCGA datası ve çalışmaya ait miRNA datalarının karşılaştırılması sonucu ekspresyon düzeyleri değişen miRNA'lar.

AK için her iki grubun tümör dokusundaki miRNA profili karşılaştırıldığında %95.99'luk bir farklılık (Şekil 4.20) gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 19: AK için TCGA datası ve çalışmaya ait miRNA datalarının karşılaştırılması sonucu ekspresyon düzeyleri değişen miRNA'lar.

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri yatkınlığı olan hastalarda ilk değerlendirme genellikle göğüs X-ışını, BT taraması ve/veya PET-CT taramasıyla yapılır [Latimer & Mott, 2015]. Farklı akciğer kanseri alt tiplerinin yönetim seçeneklerindeki farklılıklar nedeniyle, özgül histolojik alt tiplerin doğru bir şekilde tanımlanması için bronkoskopi, transbronşiyal iğne aspirasyonu, transtorasik ince iğne aspirasyonu, temel biyopsi gibi çeşitli doku örnekleme yöntemleri kullanılır [Planchard et al., 2018]. Akciğer kanseri alt tipleri arasındaki temel fark, tümör örneklerinin hematoksilen ve eozin ile boyanarak morfolojik özelliklerine dayanmaktadır. Keratinizasyon veya hücreler arası köprülerin morfolojik kanıtlarına sahip tümörler skuamöz hücreli karsinom olarak sınıflandırılırken, münin üretimi veya glandüler mimariye sahip tümörler adenokarsinom olarak sınıflandırılır [Cagle et al., 2016]. Ancak, bazı durumlarda morfoloji yetersiz kalabilir, özellikle tümör kötü diferansiye olduğunda veya belirli morfolojik veya fenotipik özellikler eksik olduğunda [Bernardi et al., 2018]. Bu durumda, akciğer kanseri sınıflandırması için immünohistokimya kullanılması önerilir ve öngörücü biyobelirteç testleri için yeterli tümör dokusu saklanmalıdır [Travis et al., 2015; Lindeman et al., 2013].

Ayrıca, tümör dokularının yanı sıra son zamanlarda sıvı biyopsi, teşhis amaçlı değerli bir materyal kaynağı haline gelmiştir. Sıvı biyopsi, akciğer kanseri ve diğer kanser türleri gibi birçok kanserde kullanılan katı olmayan biyolojik materyallerin örnekleme işlemidir. Geleneksel sitolojik örneklerin sıklıkla kapsamlı moleküler incelemeler için yetersiz olması ve çeşitli biyobelirteçlerin analizlerinde artan örnek ihtiyacı, sıvı biyopsinin önemini artırmıştır [Guibert et al., 2020; Castro-Giner et al., 2018]. KHK tanısında en sık incelenen veya kullanılan materyaller, dolaşan tümör hücreleri veya dolaşan tümör DNA'sı olarak bilinir.

Bugüne kadar yapılan sınırlı sayıdaki araştırmalarda, hastalıkta gözlenen değişiklikler ya genom ya da proteom düzeyinde incelenmiştir. Ancak, bu çalışmaların sonuçlarına rağmen, hastalık ile ilişkilendirilen bazı moleküller belirlenmiş olsa da, bu farklılıklar özgünlük ve hassasiyet açısından sınırlı kalmıştır. Bu sorunu çözmek ve hastalığa özgü bir moleküler profil oluşturabilmek için farklı yaklaşımlar gerekmektedir [Abbasian et al., 2022].

Mikro RNA'lar (miRNA'lar) gibi tek zincirli olmayan kodlayıcı olmayan RNA'lar, potansiyel bir teşhis biyobelirteci olarak kullanılabilir. MiRNA'lar, akciğer kanseri gibi kanser oluşumunda rol oynayan hücresel işlemleri post-transkripsiyonel düzenlemesi yoluyla etkileyen küçük çift sarmallı yapılar olarak önem kazanmaktadır. Birçok araştırma, miRNA'ların akciğer kanserinde teşhis, prognoz ve tedaviye yönelik potansiyelini artırdığını göstermektedir. Bu nedenle, akciğer tümörlerinde miRNA ifadesinin ve kansere karşı mücadele stratejilerinin derinlemesine incelenmesi gerekmektedir [Wani et al., 2022].

Son dönemde, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarının kan örnekleri ve biyopsileri için miRNA'ların tam genom profillerindeki yeni gelişmeler, KHDAK'ın tanısı, prognozu, agresifliği, metastazı ve ilaç direnci için yeni biyobelirteçlerin keşfini kolaylaştırmaktadır. Ancak, farklı gruplar arasında tutarsız sonuçlar da bildirilmiştir. Bu farklılıkların, analiz edilen örneklerin evresi ve alınan tedaviyle ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, en iyi sonuçları elde etmek için standartlaştırılmış örnek toplama ve tespit yöntemleri ile yeterli sayıda örnek gerekmektedir [Zhu et al., 2021].

Çalışmamızda özellikle örnek toplama süreci son derece dikkatle yürütülmüştür. Öncelikle, örnekler her gün aynı personel tarafından alınmış ve soğuk zincirde muhafaza edilerek transfer edilmiştir. Ayrıca, yine atanmış personel tarafından homojenizasyon sağlanması için steril kabin içinde gün içinde sadece bir hasta örneği üzerinde çalışılmış ve farklı doku tipleri için farklı tezgahlar ve malzemeler kullanılarak yeniden çalışılmıştır. Bu sayede örnekler arasında çapraz kontaminasyonun önüne geçilmiştir.

Literatürden farklı olarak bu çalışmada, yeni nesil dizileme teknolojisi ve gelişmiş biyoinformatik algoritmalarını bir araya getiren, heterojen bir profil gösteren ve son derece karmaşık bir hastalık olan KHDAK'ın (Akciğer Kanseri Hastalığının Alt Tipi) küçük RNA analizleri ile tümör hücresi veya tümör hücresinin etkilediği mikroçevredeki dokulardan kaynaklanan hastalığa özgü miRNA'lar belirlenmiştir. Bu miRNA'lar hastalığın sadece belirli evrelerinde ortaya çıkabilir ve vücut sıvıları gibi kan gibi diğer vücut sıvılarına da yansiyabilir. Bu sebeple KHDAK hastalarının teşhis edilip cerrahiye alınabilen evreleri yani 3A evresine kadar olan kısmının örnekleri çalışılmıştır. Aynı hastadan alınan KHDAK tümör dokuları, tümöre sınır normal

dokular ve normal akciğer dokuları arasındaki küçük RNA profillerinin değişimleri ve bunun vücut sıvısı olan kana yansması biyoinformatik destekli analizler ile belirlenmiştir, ileride yapılacak farklı kohortlardaki validasyon çalışmaları ile klinik, tümör-nod-metastaz (TNM) evrelemesi, derecelendirme (grade) ve histoloji ile ilişkilendirilebilecektir.

İnsan akciğer kanseri konularında sıkça düzensizlik gösteren ve tanısal ve prognostik potansiyelleri için çok fazla analiz edilen bazı miRNA'lar KHDAK hücre hatlarında ve hayvan modellerinde deneysel olarak şu şekilde belirlenmiştir; miR-146a miR-21, miR34a/b/c, miR-365, miR-486- 5p, miR-361, miR-615- 3p, miR-200 family, miR-221, Let-7a/b, Let-7e , miR-17- 5p, miR19a/b, miR-18a, miR-661, miR-26a5p, miR-128- 3p, miR-378, miR-93, miR-135b, miR-16, miR-15a, miR-7, miR-22 [Wani et al., 2022]. Malign hücrelerin miRNA'larının analiz edilmesi sonucunda, bazı miRNA'lar aşağı regüle edilir. Bu tür miRNA'lar, tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilir. Bunlar, kanser ilerlemesini belirli onkogenlere özellikle hedefleyerek ya da diğer durumlarda hücre farklılaşması veya apoptozda rol oynayan genlere etki ederek önler. Birçok miRNA şu anda tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilmektedir. Bunların en çok çalışılanları şu şekildedir; miR-146, miR-206, miR-34a, miR-32-5p, miR-377, miR-205-5p, miR-571, miR-486-5p, miR-200, Let-7, miR-199a-5p, miR-582, miR-582-5p, miR-320a, miR-584, miR-613 [Wani et al., 2022]. Tümör arttırıcı miRNA düzeyleri, geleneksel onkogenler gibi genellikle tümörlerde yükselir. Bunlar aynı zamanda onkomirler olarak da adlandırılır; çünkü deregülasyonları genellikle aşırı ifadeye yol açar ve bu da tümör baskılayıcı genleri negatif olarak düzenler ve hücre farklılaşması veya apoptoz transkriptomunu etkilese de etmese de, kanser oluşumunu tetikler. Bunlardan en çok çalışılanları şu şekildedir; miR-21, miR-205-5p, miR-9-5p, miR-221, miR-17-92, miR-95, miR-19a, miR-18a, miR-150, miR-619-5p, miR-135b, miRNA-182 [Wani et al., 2022].

Çalışmamız bizzat KHDAK insan örneklerinden yapılmıştır. Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom arasında farklılık gösteren ve üçünde de kana yansıyan miRNA'ları karakterize etmeyi amaçlamıştır. 2023 yılında yapılan bir çalışmada benzer olarak sadece iki histolojik alt tip arasında doğru bir ayırım sağlayan bir miRNA imzası oluşturmak amaçlamaktadır [Charkiewicz et al., 2023]. SHK, AK ve BHK vakalarından elde edilen tümör doku örneklerinin son nesil

dizileme (NGS) analizi kullanılarak, önemli ölçüde farklı ifade edilen miRNA'lar belirlenmiştir. Bu miRNA'lar ile yeni bir moleküler tanı modeli sunmaktadır. Bu yaklaşım, histopatoloji veya immünohistokimya gibi geleneksel yöntemlere kıyasla daha kapsamlı ve kesin bir moleküler karakterizasyon sunmaktadır [Charkiewicz et al., 2023]. Hassasiyet içeren çalışma modelimizde ise KHDAK'nın üç alt tipine yer verirken (SHK, BHK, AK) aynı zamanda sadece tümör dokuları değil normal dokularında bulunan miRNA'ları da tespit ettik. Tüm miRNA'lar hastaların normal dokularına karşı analiz edilmiştir. Dokular arasındaki ayrımı daha anlamlı bir yöntemle elde etmiş olmaktadır.

İlk olarak, skuamöz hücreli karsinom hastalarının tümör dokuları, aynı hastaların normal dokuları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma, her iki dokunun gen ifadesindeki farklılıkları ortaya çıkarmak amacıyla yapılmıştır. Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 136 miRNA tespit edilmiştir. miRNA'ların kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 221 miRNA tespit edilmiştir. Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 76 miRNA tespit edilmiştir. Reaktif stromadaki ekspresyon düzeylerinin, normal dokulardakinden çok farklı olarak değişmediği, sadece 2 miRNA'nın ekspresyon düzeylerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılaştığı görülmüştür. Muhtemelen bitişik doku normaldir ve invazyon yapmış tümör hücreleri içermez, bu da immünohistokimya boyamasıyla desteklenmektedir. Dolayısıyla, bu normal akciğer dokusudur.

İkinci olarak, adenokarsinom hastalarının tümör dokuları, aynı hastaların normal dokuları ile karşılaştırılmıştır. Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 169 miRNA tespit edilmiştir. miRNA'ların kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 199 miRNA tespit edilmiştir. Metastaz dokularına ait ekspresyon

düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 202 miRNA tespit edilmiştir. Reaktif stromadaki ekspresyon düzeylerinin, normal dokulardakinden çok farklı olarak değişmediği, sadece 2 miRNA'nın ekspresyon düzeylerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılaştığı görülmüştür.

Üçüncü olarak, büyük hücreli karsinom hastalarının tümör dokuları, aynı hastaların normal dokuları ile karşılaştırılmıştır. Tümör dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 32 miRNA tespit edilmiştir. miRNAların kandaki ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 77 miRNA tespit edilmiştir. Metastaz dokularına ait ekspresyon düzeyleri, normal dokulardaki ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($\text{adj-p} < 0.05$) ve en az 2 kat değişim gösteren 22 miRNA tespit edilmiştir. Reaktif stromadaki ekspresyon düzeylerinin, normal dokulardakinden farklı olarak değişmediği görülmüş, herhangi bir miRNA için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim yakalanamamıştır.

Çalışmada sonuç olarak üç alt sınıfa ait miRNA'ların hepsinde kana yansıyan 67 adet ortak miRNA tespit edilmiştir. Tüm belirtilen miRNA'ların ekspresyon düzeyleri benzer oranlarda değişmiştir. Literatüre göre, akciğer kanseriyle ilişkilendirilen belirli miRNA'lar bulunmaktadır. Örneğin, hsa-mir-30a, akciğer kanseri teşhisinde rol oynadığı için çalışmalarda tanımlanmıştır. Benzer şekilde, hsa-mir-23b, akciğer kanseri hastalarında düzensiz olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, hsa-mir-145, akciğer kanseri için potansiyel bir biyobelirteç olarak belirtilmiştir. Hsa-mir-221 ise akciğer kanseri tanısında sıkça bahsedilen miRNA'lar arasındadır. Ayrıca, hsa-let-7a, akciğer kanseri baskılanmasında rolü olan ilk tanımlanan miRNA'lardan biridir. Hsa-mir-126, akciğer kanseri hastalarında belirgin bir şekilde düşük olduğu rapor edilmiştir. Hsa-mir-338, akciğer kanseri araştırmalarında önemli bulgular sunmuştur. Hsa-mir-146b ise akciğer kanseri tespiti çalışmalarında sıkça incelenen miRNA'lardandır. Son olarak, hsa-mir-99a, akciğer kanseriyle ilgili birçok çalışmada önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. [H. Yu et al., 2019; Geng et al., 2023; Leddy, 1998; Asakura et al., 2020]. Çeşitli miRNA'lar, akciğer kanseri serum örneklerinde

potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır. Akciğer kanseri serum örneklerinde keşfedilen önemli miRNA'lar şunlardır: hsa-miR-1268b, hsa-miR-6075, hsa-miR-21, hsa-miR-210, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-222, hsa-miR-27b, hsa-miR-182, hsa-miR-183, hsa-miR-31 ve hsa-miR-223 [Asakura et al., 2020;X. Zhang et al., 2022;Asakura et al., 2020;H. Yu et al., 2019]. Bu miRNA'lar, çeşitli çalışmalarda sağlıklı bireylerden akciğer kanseri hastalarını ayırt etme yetenekleriyle umut vaat etmiştir ve genellikle yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermiştir. Örneğin, miR-1268b ve miR-6075'i birleştiren bir tanısal model, bir çalışmada ameliyat edilebilir akciğer kanserini tespit etmede %99 doğruluk oranına ulaşmıştır. [Asakura et al., 2020;H. Yu et al., 2019]. Tüm bu miRNA'lar, kendi elde ettiğimiz kan örneklerinden elde edilen miRNA seti ile karşılaştırıldığında, sadece 10 tanesi ortak bulunmuştur: hsa-mir-30a, hsa-mir-23b, hsa-mir-145, hsa-mir-221, hsa-let-7a, hsa-mir-126, hsa-mir-338, hsa-mir-146b, hsa-mir-99a, hsa-miR-1268b, hsa-miR-6075, hsa-miR-21, hsa-miR-210, hsa-miR-486-5p, hsa-mir-27B, hsa-miR-222, hsa-miR-182, hsa-miR-183, hsa-miR-31, hsa-miR-223. Diğer bir çalışmada serumlardaki miRNA ifade düzeylerinin incelenmesi (30 KHDAK hastası ve 20 sağlıklı kontrol) farklı ifade edilen miRNA'ları tanımlamıştır. Farklı ifade edilen iki miRNA olan miR15b ve miR27b'nin kombinasyonu, eğitim setinde KHDAK'yi sağlıklı kontrol grubundan %100 hassasiyet, özgüllük, pozitif tahmin değeri (PPV) ve negatif tahmin değeri (NPV) ile ayırt edebilmiştir (Hennessey et al., 2012). Bu durum miR27b için sonuçlarımızla konsensus göstermektedir. Başka bir çalışmada, plazma miRNA30a düzeyi, benign kontrol ve sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında KHDAK grubunda önemli ölçüde daha yüksekti ($P<0.01$). KHDAK'de miRNA-30a'nın ifade düzeyi ve çeşitli klinik-patolojik özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (L. Sun et al., 2016). Elde ettiğimiz sonuçta ise miR30a'nın üç alttıpte herbirinde ortalama 5 kat ifade azalması görülmektedir. MiR30a, hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe eder. Hücre proliferasyonunda Wnt/ β -katenin, MTDH/PTEN/Akt ve PI3K sinyal yolunun da içinde olduğu birçok önemli sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir. Benzer şekilde, miR30a doğrudan Eya2, HP1 γ (CBX3), EZH2, IGF1R, RPA1, Notch, IRS2, SOX4, Runx2, DTL, ATF3, MYC, HIF2 α ve SEPT7 gibi hedef genleri de düzenler, bu da hücre proliferasyon sürecini düzenlemektedir (L. Sun et al., 2016). miR-30a ve kanser arasındaki patojenik ilişkiye dayanarak, miR-30a'nın umut vaat eden bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğine inanıyoruz. Ayrıca, kanser tedavisi için bir terapötik hedef

sunacaktır. miR23b, kolorektal kanserde (CRC) epigenetik olarak düşük düzeyde ifade edilmektedir ve mevcut veriler, plazma miR23b düzeylerinin maligniteye sahip hastalar ile sağlıklı bireyler arasında ayırıcı tanıda potansiyel bir değeri olduğunu ve ayrıca CRC'li hastaların genel sağkalımını tahmin etmede de önemli olduğunu öne sürmektedir (Kou et al., 2016). Yaptığımız çalışma ile KHDAK'de de ayırıcı tanıda kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bununla birlikte, bazı araştırmalar farklı örnek türlerinin miRNA ifadeleri arasında uyumsuzluk olduğunu bildirmiştir[Xiance Jin et al., 2017;Q. Wu et al., 2020]. Bu çalışma, belirli bir örnek türündeki miRNA ifadesi sonuçlarının diğer örnek türlerine uyarlanmasının zor olduğunu belirtmektedir. Ayrıca, birçok çalışma sadece belirli hücre hatları üzerinde yapılmıştır ve bazı miRNA'lar başka kanser türlerinde de bulunduğundan KHDAK'ne özgü olmayabilir [R. Liu et al., 2019;Monastirioti et al., 2021;J. Chen et al., 2021;Nie et al., 2020;F. Wang et al., 2015]. Birçok miRNA'nın rolleri hala net değil ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyuyor. Bazı miRNA'ların hem onkomir hem de tümör baskılayıcı olarak işlev görmesi öngörülmektedir [C. Zhou et al., 2020]. Farklı cinsiyetlere sahip hastalar ve sigara içen ve içmeyen hastalar için farklı teşhis panellerine ihtiyaç duyulabileceğini gösteren bazı veriler bulunmaktadır [Landi et al., 2010]. Ayrıca birçok miRNA'nın belirli tümör tiplerine özgü olduğu saptanmıştır [Landi et al., 2010;Monastirioti et al., 2021]. Bu da özellikle erken evre KHDAK tespiti için seçilen miRNA'ların (örneğin miR-21, miR-26 ve miR-29a) ifade değişikliklerinin adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom vakalarında farklılık gösterebileceğini işaret etmektedir [Landi et al., 2010]. Bu nedenle, etkili bir erken evre KHDAK tespit paneli, tüm KHDAK alt tiplerini aynı anda tespit edebilmelidir. Alternatif olarak, farklı KHDAK alt tipleri için özgün paneller kullanılması gerekebilir, ancak bu strateji maliyeti artırabileceğinden alt optimal bir çözüm olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra, bu tür bir panelin tüm hastalık evrelerinde KHDAK'ni tespit edebilmesi gerekmektedir. Ancak birçok çalışma yalnızca belirli bir hastalık evresindeki hastalara odaklanmıştır [Xiance Jin et al., 2017;Landi et al., 2010]. Bu noktada, miRNA'ların (örneğin miR-25, miR-30a, miR-126, miR-154) ifade düzeylerinin evrelere bağlı olarak farklılık gösterdiği birçok çalışmada gözlemlenmiştir [Landi et al., 2010;Soliman et al., 2021;T. Wu et al., 2019;Xiao Lin et al., 2021;Xingyu Lin et al., 2015]. Bu nedenle, belirli bir hastalık evresinde elde

edilen sonuçlar diğer evrelere genelleme yapmak için uygun olmayabilir. İdeal bir KHDAK tespit paneli, aynı zamanda KHDAK'ne özgü miRNA'ları da içermelidir.

Kanser araştırmalarında The Cancer Genome Atlas (TCGA) veri analizi, büyük bir öneme sahiptir. TCGA, farklı kanser türlerinde genetik ve genomik değişikliklerin detaylı olarak analiz edildiği bir projedir. TCGA analizi, kanser alt tiplerini ve bu alt tiplerdeki genetik özellikleri tanımlamamıza olanak tanır, bu da kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yol açabilir. Ayrıca, bu analizler kanserin erken teşhisinde, prognoz tahminlerinde ve ilaç geliştirmede daha etkili yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlar. Sonuç olarak, TCGA veri analizi kanser araştırmalarında devrim niteliğinde bir kaynaktır. Bu verilerin analizi, kanserle ilgili yeni bilgilerin ortaya çıkmasına, daha iyi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve kanserin moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunur. Bu sebeple hasta örneklerimizin yanı sıra TCGA verileri ile de karşılaştırmalı sonuçlar elde edildi.

Adenokarsinom (AK) hastalarına ait 533 tümör dokusu ve 59 sağlıklı doku örneği ile skuamöz hücre karsinom (SHK) hastalarına ait 502 tümör ve 51 sağlıklı doku örneğine ait RNA-seq verileri Kanser Genom Atlası'ndan (TCGA) alınmış ve aynı metodoloji altında analiz edilmiştir.

Skuamöz hücre karsinom analizleri sonucu ekspresyon düzeyi ölçülebilen 1881 miRNA ve adenokarsinom analizleri kapsamında ekspresyon düzeyi ölçülebilen 1881 miRNA tespit edilmiştir. Skuamöz hücreli karsinomda ve adenokarsinomda ekspresyon düzeyi en çok değişen 10 miRNA ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

TCGA data analizleri havuz içerisindeki normal ve tümör dokularının karşılaştırmalarına olanak verirken bu çalışmada hastanın kendi tümör ve normal dokusu karşılaştırması yapılarak daha hassas bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen miRNA'lar hem TCGA datası hemde çalışmadaki hasta örnekleri datası şunu göstermiştir ki miRNA profilleri SHK için % 92.43, AK için %95.99 farklılık göstermektedir. Burada TCGA datası oluşturulurken SHK için 502 hastanın tümör dokusu havuzu 51 hastanın normal doku havuzu ile karşılaştırılırken, AK için 533 hastanın tümör dokusu 59 hastanın normal dokusu ile karşılaştırılmıştır. Tez çalışmasını özgün kılan SHK için 19 hastanın tümör dokusu alınırken aynı 19 hastanın normal dokusu alınmış ve AK için de 25 hastanın hem tümör dokusu hem normal

dokusu alınmıştır. Ardından tümör grupları kendi normalleriyle karşılaştırılmıştır. Bu sebeple profillerin bu kadar yüksek yüzde ile farklı çıkması beklendik bir sonuçtur.

Bunun yanında tez çalışmasında elde edilen miRNA profili şunu göstermektedir ki; tümör dokularında ekspresyon düzeyleri değişen miRNA'ların histopatolojide alttiplerin ayırt edilmesinde kullanılabilecek bir panel sunmasıdır. SHK hasta grubunun tümör dokusunda 136 adet miRNA, AK hasta grubunun tümör dokusunda 169 adet miRNA ve BHK hasta grubunun tümör dokusunda 32 adet miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA setleri sadece histolojik alttiplere özgül olarak gösterilmiştir. 2023 yılında yapılan bir çalışmada, toplamda 59 cerrahi olarak rezekte edilmiş KHDAK vakası dahil edilerek (31 kişi SHK, 28 kişi AK tanısı alan) AK ve SHK vakaları arasında anlamlı farklı ekspresyon gösteren 31 miRNA belirlemişlerdir [Charkiewicz et al., 2023]. Fakat bu çalışmada sadece tümör dokuları karşılaştırılmış ve iki histolojik alt tip arasında doğru bir ayırım sağlayan bir miRNA imzası oluşturmak amaçlanmıştır. KHDAK'nin AK ve SHK alt tiplerini ayırt etmek için yeni nesil dizileme ile elde edilen mikroRNA'ların (miRNA'lar) dokuya özgü ifade profillerini kullanan bir moleküler tanı modeli geliştirilmiştir. Bu model ile AK ve SHK vakaları arasında farklılık gösteren 31 miRNA belirlenmiş ve ardından LASSO/elastik ağ regresyonu ile 17-miRNA imzası oluşturulmuştur. Bu miRNA'ların listesi şu şekildedir; hsa-miR-326, hsa-miR-450a-5p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-4728-3p, hsa-miR-450a-1-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-147b, hsa-miR-7705, and hsa-miR-653-3p, hsa-miR-944, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-205-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-6510-3p [Charkiewicz et al., 2023]. Burada her iki doku tipinde anlamlı ifade farklılığı gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak, tez çalışmasında belirli miRNA'ların belirli histolojik alt tiplerle ilişkilendirilmesi yapılmıştır. Bu sebeple belirtilen miRNA'lar ile çalışmada oluşturulan miRNA setleri kesişmemektedir. Özellikle, hsa-miR-326, hsa-miR-375, hsa-miR-944 ve hsa-miR-205-5p'nin, deneysel çalışmalar ve Kanser Genom Atlası (TCGA) projesinden elde edilen verilere dayanarak, KHDAK alt tiplendirilmesi (SHK ve AK) için önemli ayırt edici potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [Y. Lu et al., 2012; Patnaik et al., 2015]. Tez çalışmasında sadece hsa-miR-944 SHK için ayırt edici miRNA olarak sunulmuştur.

Tez çalışması kapsamında, TCGA veri setinden elde edilen SHK ve AK dokularına ait miRNA setleri incelendi. Her iki alt tipte de özgül olarak 285 adet miRNA SHK için ve 120 adet miRNA AK için belirlendi. Bu miRNA verileri, doku örneklerinden elde edilen ve yalnızca SHK ve AK için özgül olan miRNA setleri ile de karşılaştırıldı. Burada SHK için 14 adet ortak miRNA'lar ; hsa-mir-944, hsa-mir-30d, hsa-mir-30b, hsa-mir-1910, hsa-mir-100, hsa-mir-548b, hsa-mir-99a, hsa-mir-1245a, hsa-mir-5008, hsa-mir-433, hsa-mir-329-2, hsa-mir-4433a, hsa-mir-4659a, hsa-mir-3155a ve AK için 2 adet ortak miRNA'lar; hsa-mir-550a-1, hsa-mir-4645 belirlenmiştir. Buradaki dataların benzerliği SHK ve AK için sırasıyla %4.22 ve %0.94'tür.

Literatürde olmayan ve sadece bu çalışmada olan en özgün kısım hastaların tümörü, kan ve normal dokuları dışında tümör mikroçevresi ve lokal lenf nodlarında alınması olmuştur. Tümörün metastaz yaptığı lenf nodlarındaki miRNA profilleri her üç alt tip için incelendiğinde SHK'de 22, AK'de 149 ve BHK'de 2 adet özgül miRNA profili sunulmuştur. Burada her üç alt tip için ortak olan miRNA'lar şunlardır; hsa-mir-548f-2, hsa-mir-3193, hsa-mir-3117, hsa-mir-548V, hsa-mir-6124, hsa-mir-30A, hsa-mir-27B, hsa-mir-23B, hsa-mir-3679, hsa-mir-3939, hsa-mir-4451, hsa-mir-342, hsa-mir-4539, hsa-mir-4537, hsa-mir-5195. Lenfatik metastaz, kanserin yayılmasında önemli bir rol oynar. Erken evre akciğer kanseri hastalarında, lenf düğümü tutulumu önemli bir prognostik faktördür ve hastalığın evrelemesi ve tedavi planlamasında kritik öneme sahiptir. Geleneksel görüntüleme yöntemleri (göğüs BT) mikro-metastazları tespit etmekte yetersiz kalabilir ve yaklaşık %20 oranında erken evre (T1/T2) akciğer kanseri tümörlerinde gizli lenf düğümü metastazı bulunur. PET taraması ve endobronşiyal ultrason eşliğinde transbronşiyal iğne aspirasyonu, daha yüksek duyarlılık ve özgüllük sağlayarak bu durumu iyileştirebilir. Tümör dokusu veya hasta serumunda bulunan moleküler biyobelirteçlerin tanımlanması, lenf düğümü metastazını öngörmede yardımcıdır. Lenf düğümü metastazı ile ilişkili çeşitli miRNA'lar bu süreçte rol oynar [S.-G. Wu et al., 2019]. Lenf nodu ile ilişkilendirilmiş miRNA'lar şunlardır; hsa-let-7g, hsa-mir-1, hsa-mir-7, hsa-mir-9s, hsa-mir-10a, hsa-mir-10b, hsa-mir-17-5p, hsa-mir-18a, hsa-mir-19a/b, hsa-mir-21, hsa-mir-25, hsa-mir-26a , hsa-mir-29b, hsa-mir-30a, hsa-mir-30b, hsa-mir-31, hsa-mir-32, hsa-mir-33b, hsa-mir-34a, hsa-mir-92a , hsa-mir-96, hsa-mir-98, hsa-mir-99a, hsa-mir-100, hsa-mir-101, hsa-mir-101-3p, hsa-mir-106b, hsa-mir-107, hsa-mir-124, hsa-mir-125a-3p, hsa-mir-125a-5p , hsa-mir-125b, hsa-mir-126-3p/5p, hsa-mir-128, hsa-mir-129-5p, hsa-mir-130, hsa-mir-130a,

hsa-mir-132 , hsa-mir-133a-3p, hsa-mir-133b, hsa-mir-138, hsa-mir-139, hsa-mir-141, hsa-mir-145, hsa-mir-146a, hsa-mir-147, hsa-mir-148a, hsa-mir-148b, hsa-mir-150 , hsa-mir-153, hsa-mir-181a-5p, hsa-mir-181b, hsa-mir-183-3p, hsa-mir-185, hsa-mir-186, hsa-mir-193a-3p, hsa-mir-193a-5p, hsa-mir-195, hsa-mir-198, hsa-mir-200c, hsa-mir-202, hsa-mir-203, hsa-mir-210 , hsa-mir-211-3p , hsa-mir-212, hsa-mir-215, hsa-mir-218, hsa-mir-221, hsa-mir-224, hsa-mir-301a, hsa-mir-302b-3p, hsa-mir-328-3p, hsa-mir-335, hsa-mir-338-3p, hsa-mir-339-5p, hsa-mir-340, hsa-mir-361-3p, hsa-mir-361-5p, hsa-mir-365, hsa-mir-378 , hsa-mir-379, hsa-mir-381, hsa-mir-383, hsa-mir-409-3p, hsa-mir-411, hsa-mir-421, hsa-mir-422a, hsa-mir-433, hsa-mir-448 , hsa-mir-449a, hsa-mir-451, hsa-mir-451a, hsa-mir-452 , hsa-mir-452-5p, hsa-mir-454, hsa-mir-485-5p, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-490-3p, hsa-mir-491-5p, hsa-mir-494, hsa-mir-504, hsa-mir-506-3p, hsa-mir-520b, hsa-mir-548I, hsa-mir-582-5p, hsa-mir-588, hsa-mir-590 , hsa-mir-592 , hsa-mir-598

hsa-mir-638 , hsa-mir-650, hsa-mir-652-3p, hsa-mir-661 , hsa-mir-675-5p , hsa-mir-874, hsa-mir-935 , hsa-mir-1204, hsa-mir-1269, hsa-mir-1290, hsa-mir-4317, hsa-mir-6754-5p [S.-G. Wu et al., 2019]. Bu miRNA seti ile çalışmada her üç alttip için elde edilen miRNA'lar karşılaştırıldı. Bunun sonucunda SHK miRNA'ları ile ortak olanlar hsa-mir-433, hsa-mir-100, hsa-mir-221, AK miRNA'ları ile ortak olanlar hsa-mir-210, hsa-mir-98, hsa-mir-590, hsa-mir-25, hsa-mir-185, hsa-mir-874, hsa-mir-150 ve her ikisinde olup ortak olan miRNA ise hsa-mir-454 olarak belirlenmiştir.

Tümör mikroçevre dokularının miRNA analizleri sadece SHK ve AK için anlamlı sonuç vermiştir. SHK için ekspresyonu anlamlı olarak değişen iki miRNA; miR3193 ve miR4802 iken AK için de iki farklı miRNA; mir3194 ve miR3146 tespit edilmiştir.

Tümör dokusunda bulunup kana yansıyan miRNA profilleri de bu çalışma ile tespit edilmiştir. SHK için 80 adet miRNA, AK için 125 adet miRNA ve BHK için 29 adet miRNA hem dokuda hemde kanda alttipine özgül olarak tespit edilmiştir. Literatürde, tümörle ilişkili tüm miRNA seviyelerinin cerrahiden sonra düşeceği varsayımıyla, tümör çıkarılmadan önce ve sonra SHK hastalarındaki dolaşımdaki miRNA profilleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, cerrahi sonrası hastaların kanında belirgin şekilde azalan bir miRNA paneli (miR-205, -19a, -19b, -30b ve -20a) tespit etmiştir. Ayrıca, akciğer SHK hastalarının plazma fraksiyonlarında bu miRNA'ların tümöre özgül eksozomlarda yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur [Aushev et al., 2013]. Kana

yansıyan datası ile karşılaştırıldığında hsa-mir-19a, hsa-mir-19b ve hsa-mir-20a ortak olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, tümör hücrelerinin dolaşıma miRNA içeren eksozomlar salgıladığını ve eksozomal plazma fraksiyonunun miRNA profillemesinin güçlü kanser biyomarkerlerini ortaya çıkarabileceğini göstermektedir. Bizim çalışma ile elde ettiğimiz doku ve kan miRNA panelleri eksozom çalışmalarına ışık tutacaktır.

Sonuç olarak miRNA imzası, en uygun tedavi yönteminin belirlenmesini hızlandırabilir - özellikle mevcut odaklanmanın preoperatif hedefe yönelik müdahalelere (neoadjuvan tedaviler) verilmesi açısından son derece önemli bir meseledir. Burada alttiplerin tanısına yönelik oluşturulabilecek miRNA profilleri sayesinde terapötik rejimler, cerrahi müdahaleden önce farmakolojik ajanların uygulanmasında ciddi önem arz etmektedir [Cascone et al., 2021;Chaft et al., 2022].

Mevcut kaynakların ve umut verici sonuçların yanı sıra, henüz doldurulması gereken pek çok bilgi boşluğu bulunmaktadır. Cinsiyet farkları, hormonal farklılıkların etkisiyle farklı miRNA seviyelerine neden olabilir [Landi et al., 2010]. Bu, hormonal dengesizlik veya tedavi gören hastalarda miRNA seviyelerinin çalışmalara katılan deneklere göre değişebileceği anlamına gelir. Bu durum, miRNA'ların tanı yeteneklerini etkileyebilir ve yanıltıcı sonuçlara yol açabilir. Ayrıca, hormonal değişiklikler miRNA terapötik etkilerini değiştirebilir. Bu nedenle, çeşitli hormonal değişiklikler ve müdahalelerin dikkate alındığı daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. MiRNA ifade seviyeleri ayrıca deneklerin yaşına bağlı olarak da değişebilir, örneğin, miR21 ifadesi yaşla ters orantılı olabilir [Leonetti et al., 2021]. Birçok çalışma, hastalık ilerlemesine bağlı olarak miRNA ifade seviyelerinin farklılaştığını göstermiştir. Belirli miRNA'lar yalnızca belirli hastalık evrelerinde değişiklik gösterir [N. Wang et al., 2020;Q. Wu et al., 2020]. Örneğin, Ying ve ark. miR-361-5p ifadesinin sadece I ve II evre KHDAK'de arttığını bulmuştur [Ying et al., 2020]. Bu tez çalışmasında hasta havuzu yaş ortalaması 60 olan 35 ila 85 yaş aralığı dahil edilerek, bunlardan %18'si kadın %82'sini erkeklerden oluşmaktadır. Bu profilin %76'sı ise sigara öyküsüne sahiptir. Hastaların histopatolojik durum dağılımı ise SHK;19, AK;25 ve BHK;7 şeklindedir. Bu dağılım oluşturulurken SHK ve AK sayıları birbirine yakın tutulmaya özen gösterildi ve BHK hastalarının hepsi alındı. Ardından kalite parametrelerini sağlayan örnekler nihai olarak seçildi. Bu örneklerde evreleme dağılımı şu şekildedir;

IA; %1,9, IB; %13,7, IIA; %15,6, IIB; %39,2, IIIA; %27,4, IIIB; %1,9. Derecelendirme havuzu ise derece 1,2 ve 3 için sırasıyla %3,9, %50,9, %45'dir.

Literatürde birbiri ile çelişen birçok çalışma bulunmaktadır. İnsanlar farklı örnekler, örnek toplama yöntemleri, örnek saklama koşulları ve ifade analiz teknikleri kullanmaktadır ve bu da tekrarlanabilirlik ve doğruluk üzerinde büyük bir etkiye sahiptir ve dolayısıyla çalışmanın nihai sonuçlarını etkiler. Standart bir protokol geliştirme ihtiyacı bulunmaktadır. Bu sebeple bu tez çalışmasında örnek toplama süreci, karakterizasyonu, örnekleri dizileme süreci en baştan SOP oluşturularak bunun üzerinden gitmiştir.

Sonuç olarak titizlikle yapılan bu tez çalışmasında kanda belirlenen miRNA'lar ile bir panel oluşturup KHDAK tanısında kullanılabilecek minimal invaziv bir yöntem ile kandan hastalığın pozitifliğine bakılabileceği sunulmuştur. Ayrıca KHDAK için histopatolojik yöntemle ek olarak 3 alttipin ayırt edilmesi için kullanılabilecek miRNA paneli sunulmuştur. Bu panelin kana yansıyan kısmı içinde ayrıca profil sunulmuştur. Ortaya çıkan yeni miRNA profilleri ile bundan sonra hasta gruplarında validasyon çalışmaları yapılarak klinik bulgularla eşleştirilip akciğer kanserinin tanısında kullanılabilir. Örneklerin evre bazlı analizleri ayrıca yapılarak yeni miRNA profilleri ile entegre tarama testleri veya erken tanı testleri de oluşturulabilir, böylece hastalığın premalign safhada ve erken tanı testleri ile de daha başlangıç safhasında tespit edilmesi mümkün olabilir. Ayrıca, prognoz ve hastanın tedaviye cevabının takibi için kullanılabilecek bir profil oluşturularak hedef miRNA'ların hastalığın tedavisinde kullanılabilmesine de olumlu katkı sağlayabilir. Çalışmada, erken tanı ve tarama amaçlı kullanılabilecek aday miRNA yapılarından bir panel oluşturulması ve bu panelden seçilecek en özgül biyobelirtecini belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu miRNA'ların akciğer kanseri alt tiplerindeki mekanistik rolünü araştırmak için fonksiyonel çalışmaların yapılması, biyolojik önemlerini ve potansiyel terapötik sonuçlarını daha derinlemesine anlamamıza yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbasian M. H., Ardekani A. M., Sobhani N., & Roudi R., (2022). The Role of Genomics and Proteomics in Lung Cancer Early Detection and Treatment. *Cancers*, 14(20). doi.org/10.3390/cancers14205144.
- Aisner S. C., Finkelstein D. M., Ettinger D. S., Abeloff M. D., Ruckdeschel J. C., & Eggleston, J. C., (1990). The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 8(3), 402–408. doi.org/10.1200/JCO.1990.8.3.402.
- Altorki N. K., Markowitz G. J., Gao D., Port J. L., Saxena, A., Stiles B., McGraw T., & Mittal V., (2019). The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 19(1), 9–31. doi.org/10.1038/s41568-018-0081-9.
- Aravin A. A., Hannon G. J., & Brennecke J., (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5851), 761–764. doi.org/10.1126/science.1146484.
- Asakura K., Kadota T., Matsuzaki J., Yoshida Y., Yamamoto Y., Nakagawa K., Takizawa S., Aoki Y., Nakamura E., Miura J., Sakamoto, H., Kato K., Watanabe S., & Ochiya, T., (2020). A miRNA-based diagnostic model predicts resectable lung cancer in humans with high accuracy. *Communications Biology*, 3(1), 134. doi.org/10.1038/s42003-020-0863-y.
- Asamura H., Chansky K., Crowley J., Goldstraw P., Rusch V. W., Vansteenkiste J. F., Watanabe H., Wu Y.-L., Zielinski M., Ball D., & Rami-Porta R., (2015). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(12), 1675–1684. doi.org/10.1097/JTO.0000000000000678.
- Aushev V. N., Zborovskaya I. B., Laktionov K. K., Girard N., Cros M.-P., Herceg Z., & Krutovskikh V., (2013). Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PloS One*, 8(10), e78649. doi.org/10.1371/journal.pone.0078649.
- Bade B. C., & Dela Cruz C. S., (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 41(1), 1–24. doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001
- Baran K., & Brzezińska-Lasota E., (2021). Proteomic biomarkers of non-small cell lung cancer patients. *Advances in Respiratory Medicine*, 89(4), 419–426. doi.org/10.5603/ARM.a2021.0089.

Barbieri I., & Kouzarides T., (2020). Role of RNA modifications in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 20(6), 303–322. doi.org/10.1038/s41568-020-0253-2.

Basumallik N., & Agarwal M., (2022). *Small Cell Lung Cancer*.

Bayley H., (2015). Nanopore sequencing: from imagination to reality. *Clinical Chemistry*, 61(1), 25–31. doi.org/10.1373/clinchem.2014.223016.

Bernardi F. D. C., Bernardi M. D. C., Takagaki, T., Siqueira S. A. C., & Dolhnikoff M., (2018). Lung cancer biopsy: Can diagnosis be changed after immunohistochemistry when the H&E-Based morphology corresponds to a specific tumor subtype *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 73, e361. doi.org/10.6061/clinics/2018/e361.

Bhan A., & Mandal S. S., (2014). Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. *ChemMedChem*, 9(9), 1932–1956. doi.org/10.1002/cmdc.201300534.

Bray F., Laversanne M., Weiderpass E., & Soerjomataram, I., (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029–3030. doi.org/10.1002/cncr.33587.

Breuer R. H. J., Postmus P. E., & Smit E. F., (2005). Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 72(3), 313–330. doi.org/10.1159/000085376.

Bugalho A., de Santis M., Slubowski A., Rozman A., & Eberhardt R., (2017). Trans-esophageal endobronchial ultrasound-guided needle aspiration (EUS-B-NA): A road map for the chest physician. *Pulmonology*. doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.004.

Cagle P. T., Allen T. C., Bernicker E. H., Ge Y., Haque A., & Barrios R., (2016). Impact of Recent Developments in Lung Cancer on the Practice of Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 140(4), 322–325. doi.org/10.5858/arpa.2015-0535-SA.

Cairns J., (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255(5505), 197–200. doi.org/10.1038/255197a0.

Califf R. M., (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 243(3), 213–221. doi.org/10.1177/1535370217750088.

Cao J., Packer J. S., Ramani V., Cusanovich D. A., Huynh C., Daza R., Qiu X., Lee C., Furlan S. N., Steemers F. J., Adey A., Waterston R. H., Trapnell C., & Shendure J., (2017). Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6352), 661–667. doi.org/10.1126/science.aam8940.

Carter B. W., Godoy M. C. B., Wu C. C., Erasmus J. J., & Truong M. T., (2016). Current Controversies in Lung Cancer Staging. *Journal of Thoracic Imaging*, 31(4),

201–214. doi.org/10.1097/RTI.0000000000000213.

Cascone T., William W. N. J., Weissferdt A., Leun C. H., Lin, H. Y., Pataer A., Godoy M. C. B., Carter B. W., Federico L., Reuben A., Khan M. A. W., Dejima H., Francisco-Cruz A., Parra E. R., Solis L. M., Fujimoto J., Tran H. T., Kalhor N., Fossella F. V., ... Sepesi B., (2021). Neoadjuvant nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in operable non-small cell lung cancer: the phase 2 randomized NEOSTAR trial. *Nature Medicine*, 27(3), 504–514. doi.org/10.1038/s41591-020-01224-2.

Castro-Giner F., Gkountela S., Donato C., Alborelli I., Quagliata L., Ng C. K. Y., Piscuoglio S., & Aceto N., (2018). Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 8(2). doi.org/10.3390/diagnostics8020031.

Castro D., Moreira M., Gouveia A. M., Humberto D., & Mello R. A. De., (2017). *MicroRNAs in lung cancer*. 8(46), 81679–81685.

Cech, T. R., & Steitz J. A., (2014). The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 157(1), 77–94. doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008.

Chaft J. E., Oezkan F., Kris M. G., Bunn P. A., Wistuba I. I., Kwiatkowski D. J., Owen D. H., Tang Y., Johnson B. E., Lee J. M., Lozanski G., Pietrzak M., Seweryn M., Byun W. Y., Schulze K., Nicholas A., Johnson A., Grindheim J., Hilz S., Carbone D. P., (2022). Neoadjuvant atezolizumab for resectable non-small cell lung cancer: an open-label, single-arm phase II trial. *Nature Medicine*, 28(10), 2155–2161. doi.org/10.1038/s41591-022-01962-5.

Chaniad P., Trakunran K., Geater S. L., Keeratichananont W., Thongsuksai P., & Raungrut P., (2020). Serum miRNAs associated with tumor-promoting cytokines in non-small cell lung cancer. *PloS One*, 15(10), e0241593. doi.org/10.1371/journal.pone.0241593.

Chapman C. J., Murray A., McElveen J. E., Sahin U., Luxemburger U., Türeci O., Wiewrodt R., Barnes A. C., & Robertson J. F., (2008). Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax*, 63(3), 228–233. doi.org/10.1136/thx.2007.083592.

Charkiewicz R., Sulewska A., Charkiewicz A., Gyenesi A., Galik B., Ramlau R., Piwkowski C., Stec R., Biecek P., Karabowicz P., Michalska-Falkowska A., Milyk W., & Niklinski J. (2023). miRNA-Seq Tissue Diagnostic Signature: A Novel Model for NSCLC Subtyping. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17). doi.org/10.3390/ijms241713318.

Chen F., Wang X.-Y., Han X.-H., Wang H., & Qi J., (2015). Diagnostic value of Cyfra21-1, SCC and CEA for differentiation of early-stage NSCLC from benign lung disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(7), 11295–11300.

Chen J., Ding C., Yang X., & Zhao J., (2021). BMSCs-Derived Exosomal MiR-126-

3p Inhibits the Viability of NSCLC Cells by Targeting PTPN9. *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 26(5), 1832–1841.

Chen J., Suo S., Tam P. P., Han J.-D. J., Peng G., & Jing N., (2017). Spatial transcriptomic analysis of cryosectioned tissue samples with Geo-seq. *Nature Protocols*, 12(3), 566–580. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.003>.

Chen X., Zhu L., Ma Z., Sun G., Luo X., Li M., Zhai S., Li P., & Wang X., (2015). Oncogenic miR-9 is a target of erlotinib in NSCLCs. *Scientific Reports*, 5, 17031. <https://doi.org/10.1038/srep17031>.

Chen Z., Fillmore C. M., Hammerman P. S., Kim C. F., & Wong K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews. Cancer*, 14(8), 535–546. doi.org/10.1038/nrc3775.

Cheng L., Zhan B., Luo P., & Wang B., (2017). miRNA-375 regulates the cell survival and apoptosis of human non-small cell carcinoma by targeting HER2. *Molecular Medicine Reports*, 15(3), 1387–1392. doi.org/10.3892/mmr.2017.6112.

Clarke J., Wu H.-C., Jayasinghe L., Patel A., Reid S., & Bayley H., (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, 4(4), 265–270. doi.org/10.1038/nnano.2009.12.

Cykowiak M., & Krajka-Kuźniak V., (2022). Role of nrf2 in pancreatic cancer. *Antioxidants*, 11(1). doi.org/10.3390/antiox11010098.

Di Paolo D., Pontis F., Moro M., Centonze G., Bertolini G., Milione M., Mensah M., Segale M., Petraroia I., Borzi C., Suatoni P., Brignole C., Perri P., Ponzoni M., Pastorino U., Sozzi G., & Fortunato O., (2021). Cotargeting of miR-126-3p and miR-221-3p inhibits PIK3R2 and PTEN, reducing lung cancer growth and metastasis by blocking AKT and CXCR4 signalling. *Molecular Oncology*, 15(11), 2969–2988. doi.org/10.1002/1878-0261.13036.

Doseeva V., Colpitts T., Gao G., Woodcock J., & Knezevic V. (2015). Performance of a multiplexed dual analyte immunoassay for the early detection of non-small cell lung cancer. *Journal of Translational Medicine*, 13, 55. doi.org/10.1186/s12967-015-0419-y.

Eberhardt W. E. E., De Ruysscher D., Weder W., Le Péchoux C., De Leyn P., Hoffmann H., Westeel V., Stahel R., Felip E., & Peters S., (2015). 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(8), 1573–1588. doi.org/10.1093/annonc/mdv187.

Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., Dewinter A., Dixon J., Turner S., (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910), 133–138. doi.org/10.1126/science.1162986.

El-Sherief A. H., Lau C. T., Wu C. C., Drake R. L., Abbott G. F., & Rice T. W., (2014). International association for the study of lung cancer (IASLC) lymph node map: radiologic review with CT illustration. *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 34(6), 1680–1691. doi.org/10.1148/rg.346130097.

Fang R., Zhu Y., Khadka V. S., Zhang F., Jiang B., & Deng Y., (2018). The Evaluation of Serum Biomarkers for Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Diagnosis. *Frontiers in Physiology*, 9, 1710. doi.org/10.3389/fphys.2018.01710.

Farber S., & Illig M., (2015). Imaging (Radiology) Tests for Cancer. *American Cancer Society*, 1–5. www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/imaging-radiology-tests-for-cancer.html.

Fares J., Fares M. Y., Khachfe H. H., Salhab H. A., & Fares Y., (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). //doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x.

Fehlmann T., Kahraman M., Ludwig N., Backes C., Galata V., Keller V., Geffers L., Mercaldo N., Hornung D., Weis T., Kayvanpour E., Abu-Halima M., Deuschle C., Schulte C., Suenkel U., von Thaler A.-K., Maetzler W., Herr C., Fähndrich S., ... Keller A., (2020). Evaluating the Use of Circulating MicroRNA Profiles for Lung Cancer Detection in Symptomatic Patients. *JAMA Oncology*, 6(5), 714–723. doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.0001.

Feng S. H., & Yang S.-T., (2019). The new 8th TNM staging system of lung cancer and its potential imaging interpretation pitfalls and limitations with CT image demonstrations. *Diagnostic and Interventional Radiology (Ankara, Turkey)*, 25(4), 270–279. doi.org/10.5152/dir.2019.18458.

Filosso P. L., Ruffini E., Asioli S., Giobbe R., Macri L., Bruna M. C., Sandri A., & Oliaro A., (2011). Adenosquamous lung carcinomas: A histologic subtype with poor prognosis. *Lung Cancer*, 74(1), 25–29. doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.01.030.

Fingerhut M., Driscoll T., Nelson D. I., Concha-Barrientos M., Punnett L., Pruss-Ustin A., Steenland K., Leigh J., & Corvalan C., (2005). Contribution of occupational risk factors to the global burden of disease - A summary of findings. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health, Supplement*, 1, 58–61.

Florczuk M., Szpechcinski A., & Chorostowska-Wynimko J., (2017). miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives. *Targeted Oncology*, 12(2), 179–200. doi.org/10.1007/s11523-017-0478-5.

Gao L., Yan S.-B., Yang J., Kong J.-L., Shi K., Ma F.-C., Huang L.-Z., Luo J., Yin S.-Y., He R.-Q., Hu X.-H., & Chen G., (2020). MiR-182-5p and its target HOXA9 in non-small cell lung cancer: a clinical and in-silico exploration with the combination of RT-qPCR, miRNA-seq and miRNA-chip. *BMC Medical Genomics*, 13(1), 3.

doi.org/10.1186/s12920-019-0648-7.

Garinet S., Didelot A., Denize T., Perrier A., Beinse G., Leclere J.-B., Oudart J.-B., Gibault L., Badoual C., Le Pimpec-Barthes F., Laurent-Puig P., Legras A., & Blons H., (2021). Clinical assessment of the miR-34, miR-200, ZEB1 and SNAIL EMT regulation hub underlines the differential prognostic value of EMT miRs to drive mesenchymal transition and prognosis in resected NSCLC. *British Journal of Cancer*, 125(11), 1544–1551. doi.org/10.1038/s41416-021-01568-7.

Garrido P., Conde E., de Castro J., Gómez-Román J. J., Felip E., Pijuan L., Isla D., Sanz J., Paz-Ares L., & López-Ríos F., (2020). Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 22(7), 989–1003. doi.org/10.1007/s12094-019-02218-4.

Geng X., Ma J., Dhilipkannah P., & Jiang F., (2023). MicroRNA Profiling of Red Blood Cells for Lung Cancer Diagnosis. *Cancers*, 15(22). doi.org/10.3390/cancers15225312.

Gilad S., Meiri E., Yogev Y., Benjamin S., Lebanony D., Yerushalmi N., Benjamin H., Kushnir M., Cholak H., Melamed N., Bentwich Z., Hod M., Goren Y., & Chajut A., (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PloS One*, 3(9), e3148. doi.org/10.1371/journal.pone.0003148.

Git A., Dvinge H., Salmon-Divon M., Osborne M., Kutter C., Hadfield J., Bertone P., & Caldas C., (2010). Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(5), 991–1006. doi.org/10.1261/rna.1947110.

Gnagnarella P., Caini S., Maisonneuve P., & Gandini S., (2018). Carcinogenicity of high consumption of meat and lung cancer risk among non-smokers: A comprehensive meta-analysis. *Nutrition and Cancer*, 70(1), 1–13. doi.org/10.1080/01635581.2017.1374420.

Goldstraw P., Chansky K., Crowley J., Rami-Porta R., Asamura H., Eberhardt W. E. E., Nicholson A. G., Groome P., Mitchell A., & Bolejack V., (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(1), 39–51. doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009.

Gong J., He L., Ma J., Zhang J., Wang L., & Wang J., (2017). The relationship between miR-17-5p, miR-92a, and let-7b expression with non-small cell lung cancer targeted drug resistance. *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 22(2), 454–461.

Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M., & Harris C. C., (1994). Mutations in

the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 54(18), 4855–4878.

Guibert N., Pradines A., Favre G., & Mazieres J., (2020). Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, 29(155). doi.org/10.1183/16000617.0052-2019.

Hamilton A. J., & Baulcombe D. C., (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5441), 950–952. doi.org/10.1126/science.286.5441.950.

Han Y., Liu D., & Li L., (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 727–742.

Hanahan D., (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Hanahan D., & Coussens L. M., (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022.

Harris T. D., Buzby P. R., Babcock H., Beer E., Bowers J., Braslavsky I., Causey M., Colonell J., Dimeo J., Efcavitch J. W., Giladi E., Gill J., Healy J., Jarosz M., Lapen D., Moulton K., Quake S. R., Steinmann K., Thayer E., Xie Z., (2008). Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5872), 106–109. doi.org/10.1126/science.1150427.

Harris T. J. R., & McCormick F., (2010). The molecular pathology of cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(5), 251–265. doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.41.

Hart C., Lipson D., Ozsolak F., Raz T., Steinmann K., Thompson J., & Milos P. M., (2010). Single-molecule sequencing: sequence methods to enable accurate quantitation. *Methods in Enzymology*, 472, 407–430. doi.org/10.1016/S0076-6879(10)72002-4.

Hashemi S., Yari N., Rahimi Jamnani F., Mahdian R., Karimi M., Zeinali S., Rafiee M. H., & Azizi M., (2022). The role of miRNA-377 as a tumor suppressor in lung cancer by negative regulation of genes belonging to ErbB signaling pathway. *Molecular Biology Reports*, 49(1), 85–95. doi.org/10.1007/s11033-021-06844-6.

He Z., Liu Y., Xiao B., & Qian X., (2015). miR-25 modulates NSCLC cell radio-sensitivity through directly inhibiting BTG2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457(3), 235–241. doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.094.

Hennessey P. T., Sanford T., Choudhary A., Mydlarz W. W., Brown D., Adai A. T., Ochs M. F., Ahrendt S. A., Mambo E., & Califano J. A., (2012). Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PloS One*, 7(2), e32307. doi.org/10.1371/journal.pone.0032307.

Herbst R. S., Heymach J. V., & Lippman S. M., (2008). Lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359(13), 1367–1380. doi.org/10.1056/NEJMra0802714.

Heyer E. E., Deveson I. W., Wooi D., Selinger C. I., Lyons R. J., Hayes V. M., O'Toole S. A., Ballinger M. L., Gill D., Thomas D. M., Mercer T. R., & Blackburn J., (2019). Diagnosis of fusion genes using targeted RNA sequencing. *Nature Communications*, 10(1), 1388. doi.org/10.1038/s41467-019-09374-9.

Higashiyama M., Doi O., Kodama K., Yokouchi H., Kasugai T., Ishiguro S., Takami K., Nakayama T., & Nishisho I., (1997). MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *British Journal of Cancer*, 75(9), 1302–1308. doi.org/10.1038/bjc.1997.221.

Hirsch F. R., Varella-Garcia M., Bunn P. A. J., Di Maria M. V., Veve R., Bremmes R. M., Barón A. E., Zeng C., & Franklin W. A., (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(20), 3798–3807. doi.org/10.1200/JCO.2003.11.069.

Hong M., Tao S., Zhang L., Diao L.-T., Huang X., Huang S., Xie S.-J., Xiao Z.-D., & Zhang H., (2020). RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 166. doi.org/10.1186/s13045-020-01005-x.

Houghton A. M., (2013). Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 13(4), 233–245. doi.org/10.1038/nrc3477.

Hu Y., Lan W., & Miller D., (2017). *Next-Generation Sequencing for MicroRNA Expression Profile BT - Bioinformatics in MicroRNA Research* (J. Huang, G. M. Borchert D. Dou J. (Luke) Huan W. Lan M. Tan & B. Wu (Eds.); pp. 169–177). Springer New York. doi.org/10.1007/978-1-4939-7046-9_12.

Huang H., Zhu J., Lin Y., Zhang Z., Liu J., Wang C., Wu H., & Zou T., (2021). The potential diagnostic value of extracellular vesicle miRNA for human non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(8), 823–836. doi.org/10.1080/14737159.2021.1935883.

Inamura K., (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7(AUG), 1–7. doi.org/10.3389/fonc.2017.00193.

Jia K.-G., Feng G., Tong Y.-S., Tao G.-Z., & Xu L., (2020). miR-206 regulates non-small-cell lung cancer cell aerobic glycolysis by targeting hexokinase 2. *Journal of Biochemistry*, 167(4), 365–370. doi.org/10.1093/jb/mvz099.

Jiang Z. F., Wang M., & Xu J. L., (2018). Thymidine kinase 1 combined with CEA,

CYFRA21-1 and NSE improved its diagnostic value for lung cancer. *Life Sciences*, 194, 1–6. doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.020.

Jin Xiance Chen Y., Chen H., Fei S., Chen D., Cai X., Liu L., Lin B., Su H., Zhao L., Su M., Pan H., Shen L., Xie D., & Xie C.. (2017). Evaluation of Tumor-Derived Exosomal miRNA as Potential Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(17), 5311–5319. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0577.

Jin Xiang Guan Y., Zhang Z., & Wang H., (2020). Microarray data analysis on gene and miRNA expression to identify biomarkers in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 20(1), 329. doi.org/10.1186/s12885-020-06829-x.

Jones P. A., & Baylin S. B., (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews. Genetics*, 3(6), 415–428. doi.org/10.1038/nrg816.

Kadota K., Yeh Y. C., Sima C. S., Rusch V. W., Moreira A. L., Adusumilli P. S., & Travis W. D., (2014). The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: A conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Modern Pathology*, 27(5), 690–700. doi.org/10.1038/modpathol.2013.188.

Kang M., Li Y., Zhao Y., He S., & Shi J., (2018). miR-33a inhibits cell proliferation and invasion by targeting CAND1 in lung cancer. *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 20(4), 457–466. doi.org/10.1007/s12094-017-1730-2.

Ke R., Mignardi M., Pacureanu A., Svedlund J., Botling J., Wählby C., & Nilsson M., (2013). In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nature Methods*, 10(9), 857–860. doi.org/10.1038/nmeth.2563.

Kim J. K., Gabel H. W., Kamath R. S., Tewari M., Pasquinelli A., Rual J.-F., Kennedy S., Dybbs M., Bertin N., Kaplan J. M., Vidal M., & Ruvkun G., (2005). Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5725), 1164–1167. doi.org/10.1126/science.1109267.

Kim T.-K., Hemberg M., Gray J. M., Costa A. M., Bear D. M., Wu J., Harmin D. A., Laptewicz M., Barbara-Haley K., Kuersten S., Markenscoff-Papadimitriou E., Kuhl D., Bito H., Worley P. F., Kreiman G., & Greenberg M. E., (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, 465(7295), 182–187. doi.org/10.1038/nature09033.

Kotake Y., Cao R., Viatour P., Sage J., Zhang Y., & Xiong Y., (2007). pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes & Development*, 21(1), 49–54. doi.org/10.1101/gad.1499407.

Kou C., Zhou T., Han X., Zhuang H., & Qian H., (2016). Downregulation of mir-23b in plasma is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*, 12(6), 4838–4844. doi.org/10.3892/ol.2016.5265.

Kozomara A., Birgaoanu M., & Griffiths-Jones S., (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155–D162. doi.org/10.1093/nar/gky1141.

Lafontaine D. L. J., (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), 11–19. doi.org/10.1038/nsmb.2939.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., & Tuschl T., (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 853–858. doi.org/10.1126/science.1064921.

Landi M. T., Zhao Y., Rotunno M., Koshiol J., Liu H., Bergen A. W., Rubagott, M., Goldstein A. M., Linnoila I., Marincola F. M., Tucker M. A., Bertazzi P. A., Pesatori A. C., Caporaso N. E., McShane L. M., & Wang E., (2010). MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(2), 430–441. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1736.

Larsen J. E., & Minna J. D., (2011). Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 703–740. doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.003.

Latimer K. M., & Mott T. F., (2015). Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening. *American Family Physician*, 91(4), 250–256.

Leddy M., (1998). Treatment Outcomes. *Perspectives on Voice and Voice Disorders*, 8(1), 8–9. doi.org/10.1044/vvd8.1.8.

Lee J. H., Daugharthy E. R., Scheiman J., Kalhor R., Yang J. L., Ferrante T. C., Terry R., Jeanty S. S. F., Li C., Amamoto R., Peters D. T., Turczyk B. M., Marblestone A. H., Inverso S. A., Bernar A., Mali, P., Rios X., Aach J., & Church G. M., (2014). Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6177), 1360–1363. doi.org/10.1126/science.1250212.

Lee R. C., Feinbaum R. L., & Ambros V., (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y.

Leonetti A., Capula M., Minari R., Mazzaschi G., Gregori A., El Hassouni B., Papini F., Bordi P., Verzè M., Avan A., Tiseo M., & Giovannetti E., (2021). Dynamic Evaluation of Circulating miRNA Profile in EGFR-Mutated NSCLC Patients Treated with EGFR-TKIs. *Cells*, 10(6). doi.org/10.3390/cells10061520.

Li F., Wen J., Shi J., Wang Y., Yang F., & Liu C., (2019). MicroRNA-191 targets

CCAAT/enhanced binding protein β and functions as an oncogenic molecule in human non-small cell lung carcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(2), 1175–1183. doi.org/10.3892/etm.2019.7668.

Li J, Yu M., Liu Z., & Liu B., (2019). Clinical significance of serum miR-25 in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Biomedical Science*, 76(3), 111–116. doi.org/10.1080/09674845.2019.1592915.

Li Jinghong Li W. X., Bai C., Song Y., Diego S., Jolla L., & Hospital Z., (2020). *HHS Public Access*. 11(5), 539–546. doi.org/10.1111/crj.12389.Particulate.

Li M., Wang Q., Zhang X., Yan N., & Li X., (2020). Exosomal miR-126 blocks the development of non-small cell lung cancer through the inhibition of ITGA6. *Cancer Cell International*, 20(1), 574. doi.org/10.1186/s12935-020-01653-6.

Li S., Tighe S. W., Nicolet C. M., Grove D., Levy S., Farmerie W., Viale A., Wright C., Schweitzer P. A., Gao Y., Kim D., Boland J., Hicks B., Kim R., Chhangawala S., Jafari N., Raghavachari N., Gandara J., Garcia-Reyero N., Mason C. E., (2014). Multi-platform assessment of transcriptome profiling using RNA-seq in the ABRF next-generation sequencing study. *Nature Biotechnology*, 32(9), 915–925. doi.org/10.1038/nbt.2972,

Liao J., Shen J., Leng Q., Qin M., Zhan M., & Jiang F., (2020). MicroRNA-based biomarkers for diagnosis of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thoracic Cancer*, 11(3), 762–768. doi.org/10.1111/1759-7714.13337.

Liao M., & Peng L., (2020). MiR-206 may suppress non-small lung cancer metastasis by targeting CORO1C. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 25, 22. doi.org/10.1186/s11658-020-00216-x.

Lim S. L., Jia Z., Lu Y., Zhang H., Ng C. T., Bay B. H., Shen H. M., & Ong C. N., (2018). Metabolic signatures of four major histological types of lung cancer cells. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*, 14(9), 118. doi.org/10.1007/s11306-018-1417-x.

Lin W., Zhou Q., Wang C., Zhu L., Bi C., Zhang S., & Wang X., (2020). *LncRNAs regulate metabolism in cancer*. 16(1). doi.org/10.7150/ijbs.40769.

Lin Xiao Lai X., Feng W., Yu X., Gu Q., & Zheng X., (2021). MiR-30a sensitized lung cancer against neoadjuvant chemotherapy by depressing autophagy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 51(5), 675–684. doi.org/10.1093/jjco/hyaa272.

Lin Xingyu Yang Z., Zhang P., & Shao G., (2015). miR-154 suppresses non-small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 33(6), 3053–3060. doi.org/10.3892/or.2015.3895.

Lindeman N. I., Cagle P. T., Aisner D. L., Arcila M. E., Beasley M. B., Bernicker E. H., Colasacco C., Dacic S., Hirsch F. R., Kerr K., Kwiatkowski D. J., Ladanyi M., Nowak J. A., Sholl L., Temple-Smolkin R., Solomon B., Souter L. H., Thunnissen E., Tsao M. S., Yatabe Y., (2018). Updated Molecular Testing Guideline for the Selection

of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 20(2), 129–159. doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.004.

Lindeman N. I., Cagle P. T., Beasley M. B., Chitale D. A., Dacic S., Giaccone G., Jenkins R. B., Kwiatkowski D. J., Saldivar J.-S., Squire J., Thunnissen E., & Ladanyi M., (2013). Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Path. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 8(7), 823–859. doi.org/10.1097/JTO.0b013e318290868f.

Liu C., Hu W., Li, L.-L., Wang Y.-X., Zhou Q., Zhang F., Song-Yang Y.-Y., Zhu W., Sun C.-C., & Li D.-J., (2018). Roles of miR-200 family members in lung cancer: more than tumor suppressors. *Future Oncology (London, England)*, 14(27), 2875–2886. doi.org/10.2217/fon-2018-0155.

Liu F., Li T., Hu P., & Dai L., (2021). Upregulation of Serum miR-629 Predicts Poor Prognosis for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Disease Markers*, 2021, 8819934. doi.org/10.1155/2021/8819934.

Liu P., Morrison C., Wang L., Xiong D., Vedell P., Cui P., Hua X., Ding F., Lu Y., James M., Ebben J. D., Xu H., Adjei A. A., Head K., Andrae J. W., Tschannen M. R., Jacob H., Pan J., Zhang Q., You, M., (2012). Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole-exome sequencing. *Carcinogenesis*, 33(7), 1270–1276. doi.org/10.1093/carcin/bgs148.

Liu R., Zhang Y.-S., Zhang S., Cheng, Z.-M., Yu J.-L., Zhou S., & Song J., (2019). MiR-126-3p suppresses the growth, migration and invasion of NSCLC via targeting CCR1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(2), 679–689. doi.org/10.26355/eurev_201901_16881.

Liu Y., Li H., Li L.-H., Tang J.-B., & Sheng Y.-L., (2019). Mir-451 inhibits proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells via targeting LKB1/AMPK. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(3 Suppl), 274–280. doi.org/10.26355/eurev_201908_18657.

Lu T., Lu W., Jia C., Lou S., & Zhang Y., (2021). Knockdown of miR-15b partially reverses the cisplatin resistance of NSCLC through the GSK-3 β /MCL-1 pathway. *Advances in Clinical and Experimental Medicine : Official Organ Wroclaw Medical University*, 30(8), 849–857. doi.org/10.17219/acem/135701.

Lu Y., Govindan R., Wang L., Liu P., Goodgame B., Wen W., Sezhiyan A., Pfeifer J., Li Y., Hua X., Wang Y., Yang P., & You M., (2012). MicroRNA profiling and prediction of recurrence/relapse-free survival in stage I lung cancer. *Carcinogenesis*, 33(5), 1046–1054. doi.org/10.1093/carcin/bgs100.

Lukeman J. M., (2015). What Is Lung Cancer? *Perspectives in Lung Cancer*, 30–40. doi.org/10.1159/000400400.

Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R. A., Brannigan B. W., Harris P. L., Haserlat S. M., Supko J. G., Haluska F. G., Louis D. N., Christiani D. C., Settleman J., & Haber D. A., (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129–2139. doi.org/10.1056/NEJMoa040938.

Ma L., Bajic V. B., & Zhang Z., (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6), 925–933. doi.org/10.4161/rna.24604.

Malkani N., & Rashid M., (2021). SARS-COV-2 infection and lung tumor microenvironment. *Molecular Biology Reports*, 48. doi.org/10.1007/s11033-021-06149-8.

Manuscript A., (2015). *Europe PMC Funders Group Rare variants of large effect in BRCA2 and CHEK2 affect risk of lung cancer*. 46(7), 736–741. doi.org/10.1038/ng.3002.Rare.

Mardis E. R., (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387–402. doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

Mardis E. R., (2013). Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6(1), 287–303. doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628.

Marioni J. C., Mason C. E., Mane S. M., Stephens M., & Gilad Y., (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, 18(9), 1509–1517. doi.org/10.1101/gr.079558.108.

Mascaux C., Iannino N., Martin B., Paesmans M., Berghmans T., Dusart M., Haller A., Lothaire P., Meert A.-P., Noel S., Lafitte J.-J., & Sculier J.-P., (2005). The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 92(1), 131–139. doi.org/10.1038/sj.bjc.6602258.

Maxam A. M., & Gilbert W., (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560–564. doi.org/10.1073/pnas.74.2.560.

Mercer T. R., Gerhardt D. J., Dinger M. E., Crawford J., Trapnell C., Jeddloh J. A., Mattick J. S., & Rinn J. L., (2011). Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nature Biotechnology*, 30(1), 99–104. doi.org/10.1038/nbt.2024.

Mestdagh P., Hartmann N., Baeriswyl L., Andreasen D., Bernard N., Chen C., Cheo

D., D'Andrade P., DeMayo M., Dennis L., Derveaux S., Feng Y., Fulmer-Smentek S., Gerstmayr B., Gouffon J., Grimley C., Lader E., Lee K. Y., Luo S., Vandesompele J., (2014). Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nature Methods*, 11(8), 809–815. doi.org/10.1038/nmeth.3014.

Migdalska-Sęk M., Modrzejewska B., Kordiak J., Pastuszek-Lewandoska D., Kiszalkiewicz J. M., Bielec F., Antczak A., & Brzezińska-Lasota E., (2021). Diagnostic value of PPAR δ and miRNA-17 expression levels in patients with non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 24136. doi.org/10.1038/s41598-021-03312-w

Moghe G. D., Lehti-Shiu M. D., Seddon A. E., Yin S., Chen Y., Juntawong P., Brandizzi F., Bailey-Serres J., & Shiu S.-H., (2013). Characteristics and significance of intergenic polyadenylated RNA transcription in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161(1), 210–224. doi.org/10.1104/pp.112.205245.

Monastirioti A., Papadaki C., Rounis K., Kalapanida D., Mavroudis D., & Agelaki S., (2021). A Prognostic Role for Circulating microRNAs Involved in Macrophage Polarization in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cells*, 10(8). doi.org/10.3390/cells10081988.

Nie H., Xie X., Zhang D., Zhou Y., Li B., Li F., Li F., Cheng Y., Mei H., Meng H., & Jia L., (2020). Use of lung-specific exosomes for miRNA-126 delivery in non-small cell lung cancer. *Nanoscale*, 12(2), 877–887. doi.org/10.1039/c9nr09011h.

Normanno N., Bianco C., Strizzi L., Mancino M., Maiello M. R., De Luca A., Caponigro F., & Salomon D. S., (2005). The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Current Drug Targets*, 6(3), 243–257. doi.org/10.2174/1389450053765879.

Ohtani N., Yamakoshi K., Takahashi A., & Hara E., (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *The Journal of Medical Investigation: JMI*, 51(3–4), 146–153. doi.org/10.2152/jmi.51.146.

Okamura K., Takayama K., Izumi M., Harada T., Furuyama K., & Nakanishi Y., (2013). Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 80(1), 45–49. doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.01.002.

Osmani L., Askin F., Gabrielson E., & Li Q. K., (2018). Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, 52(Pt 1), 103–109. doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.019.

Pal A. S., Bains M., Agredo A., & Kasinski A. L., (2021). Identification of microRNAs that promote erlotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochemical*

Pharmacology, 189, 114154. doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114154.

Pass H. I., Ball D., & Scagliotti G. V., (2018). IASLC Thoracic Oncology. In *IASLC Thoracic Oncology*. doi.org/10.1016/B978-0-323-52357-8.01001-5.

Patnaik S., Mallick R., Kannisto E., Sharma R., Bshara W., Yendamuri S., & Dhillon S. S., (2015). MiR-205 and MiR-375 microRNA assays to distinguish squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung cancer biopsies. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(3), 446–453. doi.org/10.1097/JTO.0000000000000423.

Patz E. F. J., Campa M. J., Gottlin E. B., Kusmartseva I., Guan X. R., & Herndon J. E. 2nd., (2007). Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(35), 5578–5583. doi.org/10.1200/JCO.2007.13.5392.

Peinado P., Herrera A., Baliñas C., Martín-padron J., Boyero L., Cuadros, M., Coira I. F., Rodriguez M. I., Reyes-zurita F. J., Rufino E. E., Lupiáñez J. A., & Medina P. P., (2018). Chapter 6 - Long Noncoding RNAs as Cancer Biomarkers. In *Cancer and Noncoding RNAs*. Elsevier Inc. doi.org/10.1016/B978-0-12-811022-5.00006-1.

Peng Y., & Croce C. M., (2016). *The role of MicroRNAs in human cancer*. November 2015. doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4.

Pennell N. A., Arcila M. E., Gandara D. R., & West H., (2019). Biomarker Testing for Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 39, 531–542. doi.org/10.1200/EDBK_237863.

Pertea M., Shumate A., Pertea G., Varabyou A., & Chang Y., (2018). *Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield a comprehensive new human gene list. and reveal extensive transcriptional noise*.

Peschansky V. J., & Wahlestedt C., (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*, 9(1), 3–12. doi.org/10.4161/epi.27473.

Petrek H., & Ming A., (2019). *MicroRNAs in non - small cell lung cancer : Gene regulation , impact on cancer cellular processes , and therapeutic potential*. September, 1–18. doi.org/10.1002/prp2.528.

Petrek H., & Yu A. M., (2019). MicroRNAs in non-small cell lung cancer: Gene regulation, impact on cancer cellular processes, and therapeutic potential. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6), e00528. doi.org/10.1002/prp2.528.

Planchard D., Popat S., Kerr K., Novello S., Smit E. F., Faivre-Finn C., Mok T. S., Reck M., Van Schil P. E., Hellmann M. D., & Peters S., (2018). Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical*

Oncology, 29(Suppl 4), iv192–iv237. doi.org/10.1093/annonc/mdy275.

Ponjavic J., Ponting C. P., & Lunter G., (2007). Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome Research*, 17(5), 556–565. doi.org/10.1101/gr.6036807.

Popper H. H., Gruber-Mösenbacher U., Pall G., Müllauer L., Hochmair M., Krenbek D., Brcic L., Schmitz K., Lamprecht B., Eckmayr J., Hilbe W., Hutarew G., Errhalt P., Kolb R., Pirker R., Setinek U., Webersinke G., Absenger G., Hernler T., Wasicky R., (2020). The 2020 update of the recommendations of the Austrian working group on lung pathology and oncology for the diagnostic workup of non-small cell lung cancer with focus on predictive biomarkers. *Memo - Magazine of European Medical Oncology*, 13(1), 11–26. doi.org/10.1007/s12254-019-00565-0.

Pöttgen C., Eberhardt W., Stamatis G., & Stuschke M., (2017). Definitive radiochemotherapy versus surgery within multimodality treatment in stage III non-small cell lung cancer (NSCLC) - a cumulative meta-analysis of the randomized evidence. *Oncotarget*, 8(25), 41670–41678. doi.org/10.18632/oncotarget.16471.

Quail D. F., & Joyce J. A., (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423–1437. doi.org/10.1038/nm.3394.

Rajdev K., Siddiqui A. H., Ibrahim U., Patibandla P., Khan T., & El-Sayegh D., (2018). An Unusually Aggressive Large Cell Carcinoma of the Lung: Undiagnosed until Autopsy. In *Cureus* (Vol. 10, Issue 2, p. e2202). doi.org/10.7759/cureus.2202

Rami-Porta R., Asamura H., Travis W. D., & Rusch V. W., (2017). Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 138–155. doi.org/10.3322/caac.21390.

Rami-Porta R., Bolejack V., Crowley J., Ball D., Kim J., Lyons G., Rice T., Suzuki K., Thomas C. F. J., Travis W. D., & Wu Y.-L., (2015). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(7), 990–1003. doi.org/10.1097/JTO.0000000000000559.

Rana B., Hu L., Harper A., Cao C., Peters C., Brenner D., & Yang L., (2020). Occupational Physical Activity and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Medicine*, 50(9), 1637–1651. doi.org/10.1007/s40279-020-01312-w.

Rastel D., Ramaioli A., Cornillie F., & Thirion B., (1994). CYFRA 21-1, a sensitive and specific new tumour marker for squamous cell lung cancer. Report of the first European multicentre evaluation. CYFRA 21-1 Multicentre Study Group. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 30A(5), 601–606. doi.org/10.1016/0959-8049(94)90528-2.

Reinhart B. J., Slack, F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., & Ruvkun G., (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>.

Reissmann P. T., Koga H., Takahash R., Figlin, R. A., Holmes E. C., Piantadosi S., Cordon-Cardo C., & Slamon D. J., (1993). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene*, 8(7), 1913–1919..

Rodrigues S. G., Stickels R. R., Goeva, A., Martin C. A., Murray E., Vanderburg C. R., Welch J., Chen L. M., Che F., & Macosko E. Z., (2019). Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6434), 1463–1467. doi.org/10.1126/science.aaw1219.

Rosenberg A. B., Roco C. M., Muscat R. A., Kuchina A., Sample P., Yao Z., Graybuck L. T., Peeler D. J., Mukherjee S., Chen W., Pun S. H., Sellers D. L., Tasic B., & Seelig G., (2018). Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6385), 176–182. doi.org/10.1126/science.aam8999.

Russo G., Zegar C., & Giordano A., (2003). Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*, 22(42), 6497–6507. doi.org/10.1038/sj.onc.1206865.

Salzman J., Gawad C., Wang P. L., Lacayo N., & Brown P. O., (2012). Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PloS One*, 7(2), e30733. doi.org/10.1371/journal.pone.0030733.

Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson, A. R., Fiddes C. A., Hutchison C. A., Slocombe P. M., & Smith M., (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687–695. doi.org/10.1038/265687a0.

Sanger F., Nicklen S., & Coulson A. R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463.

Santarpia M., González-Cao M., Viteri S., Karachaliou N., Altavilla G., & Rosell R., (2015). Programmed cell death protein-1/programmed cell death ligand-1 pathway inhibition and predictive biomarkers: understanding transforming growth factor-beta role. *Translational Lung Cancer Research*, 4(6), 728–742. doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.12.04.

Schadt E. E., Turner S., & Kasarskis A., (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(R2), R227–40. doi.org/10.1093/hmg/ddq416.

Shendure J., & Ji, H., (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. doi.org/10.1038/nbt1486.

Shields J. M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., & Der, C. J., (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over". *Trends in Cell Biology*, 10(4), 147–154. doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01740-2.

Si W., Shen J., Zheng H., & Fan W.,(2019). *The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance*. 1–24.

Siddiqui F., Vaqar S., & Siddiqui A. H., (2022). *Lung Cancer*.

Siegel R. L., Miller K. D., & Jemal A., (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. doi.org/10.3322/caac.21551.

Siegel R. L., Miller K. D., Wagle N. S., & Jemal A., (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. doi.org/10.3322/caac.21763.

Slack F. J., & Chinnaiyan A. M., (2019). Review The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, 179(5), 1033–1055. doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017.

Sokolenko A. P., & Imyanitov E. N., (2018). Molecular diagnostics in clinical oncology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5(AUG), 1–15. doi.org/10.3389/fmolb.2018.00076.

Soliman S. E.-S., Abdelaleem A. H., Alhanafy A. M., Ibrahim R. A. L., Elhaded, A. S. A., & Assar M. F. A., (2021). Circulating miR-21-5p and miR-126-3p: diagnostic, prognostic value, and multivariate analysis in non-small-cell lung cancer. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2543–2552. doi.org/10.1007/s11033-021-06302-3

Song F., Xuan Z., Yang X., Ye X., Pan Z., & Fang Q., (2020). Identification of key microRNAs and hub genes in non-small-cell lung cancer using integrative bioinformatics and functional analyses. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(3), 2690–2703. doi.org/10.1002/jcb.29489.

Song Z., Jia G., Ma, P., & Cang S., (2021). Exosomal miR-4443 promotes cisplatin resistance in non-small cell lung carcinoma by regulating FSP1 m6A modification-mediated ferroptosis. *Life Sciences*, 276, 119399. doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119399.

Sordella R., Bell D. W., Haber D. A., & Settleman J., (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5687), 1163–1167. doi.org/10.1126/science.1101637.

Ståhl P. L., Salmén F., Vickovic S., Lundmark A., Navarro J. F., Magnusson J., Giacomello S., Asp M., Westholm J. O., Huss M., Mollbrink A., Linnarsson S., Codeluppi S., Borg Å., Pontén F., Costea P. I., Sahlén P., Mulder J., Bergmann O., Frisén J., (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6294), 78–82.

doi.org/10.1126/science.aaf2403.

Sun B., Hu N., Cong D., Chen K., & Li J., (2021). MicroRNA-25-3p promotes cisplatin resistance in Non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) through adjusting PTEN/PI3K/AKT route. *Bioengineered*, 12(1), 3219–3228. doi.org/10.1080/21655979.2021.1939577.

Sun L., Chen Y., Su Q., Tang X., Liang Y., Che G., & Luo F., (2016). Increased Plasma miRNA-30a as a Biomarker for Non-Small Cell Lung Cancer. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 647–655. doi.org/10.12659/msm.897330.

Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., & Bray F., (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. doi.org/10.3322/caac.21660.

Šutić M., Vukić A., Baranašić J., Försti A., Džubur F., Samaržija M., Jakopović M., Brčić L., & Knežević J., (2021). Diagnostic, Predictive, and Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Management. *Journal of Personalized Medicine*, 11(11).doi.org/10.3390/jpm11111102.

Szczyrek M., Bitkowska P., Jutrzenka M., & Milanowski J., (2022). The Role of the Selected miRNAs as Diagnostic, Predictive and Prognostic Markers in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 12(8). doi.org/10.3390/jpm12081227.

Takahashi T., Nau M. M., Chiba I., Birrer M. J., Rosenberg R. K., Vinocour M., Levitt M., Pass H., Gazdar A. F., & Minna J. D., (1989). p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4929), 491–494. doi.org/10.1126/science.2554494.

Tang F., Barbacioru C., Wang Y., Nordman E., Lee C., Xu N., Wang X., Bodeau J., Tuch B. B., Siddiqui A., Lao K., & Surani M. A., (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods*, 6(5), 377–382. doi.org/10.1038/nmeth.1315.

Tang M., Abbas, H. A., Negrao M. V., Ramineni M., Hu X., Hubert S. M., Fujimoto J., Reuben A., Varghese S., Zhang J., Li J., Cho, C. W., Mao X., Song X., Lee W. C., Wu J., Little L., Gumbs C., Behrens C., Zhang J., (2021). The histologic phenotype of lung cancers is associated with transcriptomic features rather than genomic characteristics. *Nature Communications*, 12(1), 1–11. doi.org/10.1038/s41467-021-27341-1.

Thai A. A., Solomon B. J., Sequist L. V., Gainor J. F., & Heist R. S., (2021). Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299), 535–554. doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3.

Tie Y., Liu B., Fu H., & Zheng X., (2009). Circulating miRNA and cancer diagnosis. *Science in China. Series C, Life Sciences*, 52(12), 1117–1122.

doi.org/10.1007/s11427-009-0158-5.

Tirpe A., Gulei D., Tirpe G. R., Nutu A., Irimie A., Campomenosi P., Pop L. A., & Berindan-Neagoe I., (2020). Beyond Conventional: The New Horizon of Anti-Angiogenic microRNAs in Non-Small Cell Lung Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). doi.org/10.3390/ijms21218002.

Torre L. A., Siegel R. L., & Jemal A., (2016). Lung Cancer Statistics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 893, 1–19. doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1.

Travis W. D., Brambilla E., & Geisinger K. R., (2016). Histological grading in lung cancer: One system for all or separate systems for each histological type? *European Respiratory Journal*, 47(3), 720–723. doi.org/10.1183/13993003.00035-2016.

Travis W. D., Brambilla E., Nicholson A. G., Yatabe Y., Austin J. H. M., Beasley M. B., Chirieac L. R., Dacic S., Duhig E., Flieder D. B., Geisinger K., Hirsch F. R., Ishikawa Y., Kerr K. M., Noguchi M., Pelosi G., Powell C. A., Tsao M. S., & Wistuba I., (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. In *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1243–1260). doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630.

Türkyılmaz M., Öztürk M., Dündar S., Ergün A. K., Sevinç A., Tütüncü S., & Seymen, E., (2021). *TÜRKİYE Kanİstatistikleri 2017*. 1–65. https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf.

van Oijen M. G., & Slootweg P. J., (2000). Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(6), 2138–2145.

Ventura A., Kirsch D. G., McLaughlin M. E., Tuveson D. A., Grimm J., Lintault L., Newman J., Reczek E. E., Weissleder R., & Jacks T., (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128), 661–665. doi.org/10.1038/nature05541.

Vieira A. R., Abar L., Vingeliene S., Chan D. S. M., Aune D., Navarro-Rosenblatt D., Stevens C., Greenwood D., & Norat T., (2016). Fruits, vegetables and lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*, 27(1), 81–96. doi.org/10.1093/annonc/mdv381.

Villalobos P., & Wistuba I. I., (2017). Lung Cancer Biomarkers Guideline. *Hematol Oncology Clinic*, 31(1), 13–29. doi.org/10.1016/j.hoc.2016.08.006.Lung.

Vonlanthen S., Heighway J., Tschan M. P., Borner M. M., Altermatt H. J., Kappeler A., Tobler A., Fey M. F., Thatcher N., Yarbrough W. G., & Betticher D. C., (1998). Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-

small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene*, 17(21), 2779–2785. doi.org/10.1038/sj.onc.1202501.

Wang D., & Farhana A., (2023). *Biochemistry, RNA Structure*.

Wang F., Lou J., Cao Y., Shi X., Wang P., Xu J., Xie E., Xu T., Sun R., Rao J., Huang P., Pan S., & Wang H., (2015). miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non-small cell lung cancer patients receiving chemotherapy. *Experimental & Molecular Medicine*, 47(5), e162. doi.org/10.1038/emm.2015.17.

Wang J., Liu Q., Yuan S., Xie W., Liu Y., Xiang Y., Wu N., Wu L., Ma X., Cai T., Zhang Y., Sun Z., & Li Y., (2017). Genetic predisposition to lung cancer: Comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. doi.org/10.1038/s41598-017-07737-0.

Wang N., Guo W., Song X., Liu L., Niu L., Song X., & Xie L., (2020). Tumor-associated exosomal miRNA biomarkers to differentiate metastatic vs. nonmetastatic non-small cell lung cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(9), 1535–1545. doi.org/10.1515/cclm-2019-1329.

Wani J. A., Majid S., Imtiyaz Z., Rehman M. U., Alsaffar R. M., Shah N. N., Alshehri S., Ghoneim M. M., & Imam S. S., (2022). MiRNAs in Lung Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(7). doi.org/10.3390/diagnostics12071610.

Wani J. A., Majid S., Khan A., Arafah A., Ahmad A., Jan B. L., Shah N. N., Kazi M., & Rehman M. U., (2021). Clinico-Pathological Importance of miR-146a in Lung Cancer. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(2). doi.org/10.3390/diagnostics11020274.

Waterhouse P. M., Graham M. W., & Wang M. B., (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13959–13964. doi.org/10.1073/pnas.95.23.13959.

WATSON J. D., & CRICK F. H., (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738. doi.org/10.1038/171737a0.

Weinstein I. B., (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5578), 63–64. doi.org/10.1126/science.1073096.

Willenbrock H., Salomon J., Søkilde R., Barken K. B., Hansen T. N., Nielsen F. C., Møller S., & Litman T., (2009). Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(11), 2028–2034. doi.org/10.1261/rna.1699809.

William D. Travis E. B. A. P. B. A. M. A. G. N., (Eds. (2015). WHO Classification

of Tumours of Lung, Pleura, Thymus and Heart (4th Edition). In *International Agency for Research on Cancer*.

Wu K., Tsai Y., Lien C., & Kuo P., (2019). *The Roles of MicroRNA in Lung Cancer*. 1–25. doi.org/10.3390/ijms20071611.

Wu N., Zhang C., Bai C., Han Y. P., & Li Q., (2014). MiR-4782-3p inhibited non-small cell lung cancer growth via USP14. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 33(2), 457–467. doi.org/10.1159/000358626.

Wu Q., Yu L., Lin X., Zheng Q., Zhang S., Chen D., Pan X., & Huang Y., (2020). Combination of Serum miRNAs with Serum Exosomal miRNAs in Early Diagnosis for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Management and Research*, 12, 485–495. doi.org/10.2147/CMAR.S232383.

Wu S.-G., Chang T.-H., Liu Y.-N., & Shih J.-Y., (2019). MicroRNA in Lung Cancer Metastasis. *Cancers*, 11(2). doi.org/10.3390/cancers11020265.

Wu T., Hu H., Zhang T., Jiang L., Li X., Liu S., Zheng C., Yan G., Chen W., Ning Y., Li Y., & Lu Z., (2019). miR-25 Promotes Cell Proliferation, Migration, and Invasion of Non-Small-Cell Lung Cancer by Targeting the LATS2/YAP Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9719723. doi.org/10.1155/2019/9719723.

Wu Y.-L., Planchard D., Lu S., Sun H., Yamamoto N., Kim D.-W., Tan D. S. W., Yang J. C.-H., Azrif M., Mitsudomi T., Park K., Soo R. A., Chang J. W. C., Alip A., Peters S., & Douillard J.-Y., (2019). Pan-Asian adapted Clinical Practice Guidelines for the management of patients with metastatic non-small-cell lung cancer: a CSCO-ESMO initiative endorsed by JSMO, KSMO, MOS, SSO and TOS. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(2), 171–210. doi.org/10.1093/annonc/mdy554.

Xia Y., Wu Y., Liu B., Wang P., & Chen Y., (2014). Downregulation of miR-638 promotes invasion and proliferation by regulating SOX2 and induces EMT in NSCLC. *FEBS Letters*, 588(14), 2238–2245. doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.002.

Xu J.-X., Liu C.-M., & Ma C.-P., (2021). MicroRNA-99b inhibits NSCLC cell invasion and migration by directly targeting NIPBL. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(4), 1890–1898. doi.org/10.26355/eurrev_202102_25084.

Yang B., Li, X., Ren T., & Yin Y., (2019). Autoantibodies as diagnostic biomarkers for lung cancer: A systematic review. *Cell Death Discovery*, 5, 126. doi.org/10.1038/s41420-019-0207-1.

Ying L., Du L., Zou R., Shi L., Zhang N., Jin J., Xu C., Zhang F., Zhu C., Wu J., Chen, K., Huang M., Wu Y., Zhang Y., Zheng W., Pan X., Chen B., Lin A., Tam J. K. C., Su, D., (2020). Development of a serum miRNA panel for detection of early stage non-

small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(40), 25036–25042. doi.org/10.1073/pnas.2006212117.

Yu D.-J., Li Y.-H., & Zhong M., (2020). MicroRNA-597 inhibits NSCLC progression through negatively regulating CDK2 expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(8), 4288–4297. doi.org/10.26355/eurev_202004_21009.

Yu H., Guan Z., Cuk K., Zhang Y., & Brenner H., (2019). Circulating microRNA biomarkers for lung cancer detection in east Asian populations. *Cancers*, 11(3). doi.org/10.3390/cancers11030415.

Zang R., Li Y., Jin R., Wang X., Lei Y., Che Y., Lu Z., Mao S., Huang J., Liu C., Zheng S., Zhou F., Wu Q., Gao S., Sun N., & He J., (2019). Enhancement of diagnostic performance in lung cancers by combining CEA and CA125 with autoantibodies detection. *Oncoimmunology*, 8(10), e1625689. doi.org/10.1080/2162402X.2019.1625689.

Zhang L., Liao Y., & Tang L., (2019). MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 38(1), 53. doi.org/10.1186/s13046-019-1059-5.

Zhang P., (2019). *Non-Coding RNAs and their Integrated Networks Abstract* : 1–12. doi.org/10.1515/jib-2019-0027.

Zhang Q., Li, Y., Zhao M., Lin H., Wang W., Li D., Cui W., Zhou, C., Zhong J., & Huang C. (2019). MiR-494 acts as a tumor promoter by targeting CASP2 in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 3008. doi.org/10.1038/s41598-019-39453-2.

Zhang Wanlu Li, S., Li C., Li T., & Huang Y., (2022). Remodeling tumor microenvironment with natural products to overcome drug resistance. *Frontiers in Immunology*, 13(November), 1–22. doi.org/10.3389/fimmu.2022.1051998.

Zhang Weihua Lin J., Wang P., & Sun J., (2017). miR-17-5p down-regulation contributes to erlotinib resistance in non-small cell lung cancer cells. *Journal of Drug Targeting*, 25(2), 125–131. doi.org/10.1080/1061186X.2016.1207647.

Zhang X., Tan J., Chen Y., Ma S., Bai W., Peng Y., & Shi G., (2022). Identification of serum MiRNAs as candidate biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis. *BMC Pulmonary Medicine*, 22(1), 479. doi.org/10.1186/s12890-022-02267-6

Zhang Y., Jin M., Li J., & Kong X., (2020). BBA - Molecular Basis of Disease Identifying circulating miRNA biomarkers for early diagnosis and monitoring of lung cancer. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165847. doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165847.

Zhong S., Golpon H., Zardo P., & Borlak J., (2021). miRNAs in lung cancer. A

systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer. *Translational Research*, 230, 164–196. doi.org/10.1016/j.trsl.2020.11.012.

Zhou C., Chen Z., Zhao L., Zhao W., Zhu Y., Liu J., & Zhao X., (2020). A novel circulating miRNA-based signature for the early diagnosis and prognosis prediction of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(11), e23505. doi.org/10.1002/jcla.23505.

Zhou K., Liu M., & Cao Y., (2017). New insight into microRNA functions in cancer: Oncogene-microRNA-tumor suppressor gene network. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4(JUL), 1–7. doi.org/10.3389/fmolb.2017.00046.

Zhou W., Cai C., Lu J., & Fan Q., (2022). miR-129-2 upregulation induces apoptosis and promotes NSCLC chemosensitivity by targeting SOX4. *Thoracic Cancer*, 13(7), 956–964. doi.org/10.1111/1759-7714.14336.

Zhu X., Kudo M., Huang X., Sui H., Tian H., Croce C. M., & Cui R., (2021). Frontiers of MicroRNA Signature in Non-small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. doi.org/10.3389/fcell.2021.643942.

ÖZGEÇMİŞ

Dilek ÇEKER lisans eğitimini 2010-2014 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi, Biyoloji ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümlerinde tamamladıktan sonra Medipol Üniversitesinde 2015-2017 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek lisans programında eğitimine devam etmiştir. Burada yaptığı çalışmalardan sonra Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik dalında 2017 yılında Doktora eğitimine başlamıştır. Doktora çalışmaları devam ederken 2015 yılında girdiği TÜBİTAK' ta çeşitli projelerde yer almıştır. TÜBİTAK MAM 'da uzman araştırmacı olarak bilimsel çalışmalarına devam etmektedir (2015- devam ediyor).



TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Demircan Çeker Dilek; Baysungur Volkan; Evman Serdar; Kolbaş İlker; Gördebil Abdurrahim; Nalbantoğlu Sinem M.; Tambağ Yusuf; Kaçar Ömer; Midi Ahmet; Aslanoğlu Hatice; Kara Nülüfer; Algan Nilgün; Boyacıoğlu Ayberk; Karademir Yılmaz Betül; Şahin Ali; Ülbeği Polat Hivda; Şehitoğulları Abidin; Çıbıkdiken Ali Osman; Büyükyılmaz Mücahit; Aydilek İbrahim Berkan; Eneş Abdulkerim; Küçüker Sevde; Karakaya Fatih; Boyacı İhsan; Gümüş Mahmut; Şenol Onur; Öztuğ Merve; Saban Evren; Soysal Ömer; Büyükpınarbaşılı Nur; Turna Akif; Günlüoğlu Mehmet Zeki; Çakır Aslı; Tekin Şaban; Tazebay Uygur; And Karadağ Abdullah., (2024) "LUNGBANK: A Novel Biorepository Strategy Tailored for Comprehensive Multi-Omics Analysis and P-Medicine Applications in Lung Cancer," *Turkish Journal of Biology*: Vol. 48: No. 3, Article 6. doi.org/10.55730/1300-0152.2696.



EKLER

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri.

		baseMe an	log2FoldCha nge	lfcSE	stat	pvalue	padj	FoldChan ge
MIR4521	hsa-mir-4521	56,97577	-3,86538	0,409387	-9,44188	3,66E-21	2,18E-18	0,068613
MIR1251	hsa-mir-1251	0,927435	-3,53133	0,654585	-5,39476	6,86E-08	1,41E-06	0,086489
MIR135A2	hsa-mir-135a-2	0,943526	-3,19956	0,604148	-5,29598	1,18E-07	2,28E-06	0,108852
MIR146B	hsa-mir-146b	1,604437	-3,03368	0,588627	-5,15383	2,55E-07	4,61E-06	0,122115
MIR3193	hsa-mir-3193	3,316878	-3,01615	0,473424	-6,37094	1,88E-10	6,76E-09	0,123608
MIR4636	hsa-mir-4636	0,560697	-2,63038	0,712642	-3,69103	0,000223	0,001685	0,161501
MIR4486	hsa-mir-4486	0,720081	-2,60061	0,680938	-3,81915	0,000134	0,001191	0,164869
MIR4447	hsa-mir-4447	0,518226	-2,57147	0,693237	-3,70937	0,000208	0,001638	0,168232
MIR30D	hsa-mir-30d	0,640626	-2,55375	0,69603	-3,66902	0,000243	0,001814	0,170312
MIR548AX	hsa-mir-548ax	1,843101	-2,55294	0,448167	-5,6964	1,22E-08	2,8E-07	0,170408
MIR548B	hsa-mir-548b	1,443846	-2,55206	0,476026	-5,36117	8,27E-08	1,64E-06	0,170512
MIR490	hsa-mir-490	0,470867	-2,54021	0,907703	-2,7985	0,005134	0,022499	0,171918
MIR889	hsa-mir-889	0,448829	-2,45056	0,833546	-2,93993	0,003283	0,015167	0,182939
MIR376B	hsa-mir-376b	1,699616	-2,43069	0,675661	-3,5975	0,000321	0,00228	0,185476
MIR4705	hsa-mir-4705	0,708054	-2,41482	0,622832	-3,87716	0,000106	0,000969	0,187529
MIR329-2	hsa-mir-329-2	0,638572	-2,41443	0,772892	-3,12389	0,001785	0,009735	0,187579
MIR3918	hsa-mir-3918	4,071106	-2,35243	0,335935	-7,00263	2,51E-12	1,36E-10	0,195816

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri (devamı).

MIR30A	hsa-mir-30a	10,29783	-2,3349	0,294675	-7,92366	2,31E-15	2,75E-13	0,198209
MIR548AS	hsa-mir-548as	0,525687	-2,304	0,766831	-3,00458	0,00266	0,012992	0,202501
MIR511	hsa-mir-511	6,670223	-2,28088	0,299602	-7,61302	2,68E-14	1,99E-12	0,205773
MIR548F2	hsa-mir-548f-2	2,870304	-2,26853	0,40591	-5,58875	2,29E-08	5,05E-07	0,207541
MIR218-1	hsa-mir-218-1	1,995916	-2,19728	0,418069	-5,2558	1,47E-07	2,75E-06	0,218048
MIR3934	hsa-mir-3934	0,673212	-2,16744	0,695813	-3,11498	0,00184	0,009877	0,222605
MIR126	hsa-mir-126	4,439568	-2,03801	0,433512	-4,70115	2,59E-06	3,95E-05	0,2435
MIR3134	hsa-mir-3134	5,60589	-1,98195	0,309227	-6,40935	1,46E-10	5,81E-09	0,253148
MIR5008	hsa-mir-5008	0,501578	-1,98185	0,734675	-2,69759	0,006984	0,029109	0,253164
MIR4524A	hsa-mir-4524a	2,287735	-1,97279	0,430261	-4,58511	4,54E-06	6,01E-05	0,254759
MIR1913	hsa-mir-1913	0,698856	-1,9604	0,646515	-3,03226	0,002427	0,012258	0,256957
MIR212	hsa-mir-212	0,975697	-1,92863	0,615937	-3,13122	0,001741	0,009607	0,262678
MIR6757	hsa-mir-6757	0,69988	-1,90022	0,712159	-2,66825	0,007625	0,03134	0,267902
MIR33A	hsa-mir-33a	0,439868	-1,87266	0,737891	-2,53786	0,011153	0,043447	0,273069
MIR3188	hsa-mir-3188	0,792364	-1,77598	0,582554	-3,0486	0,002299	0,011915	0,291996
MIR3120	hsa-mir-3120	1,675242	-1,74723	0,405724	-4,30644	1,66E-05	0,000202	0,297873
MIR3178	hsa-mir-3178	0,698176	-1,71615	0,619488	-2,77027	0,005601	0,02419	0,30436
MIR100	hsa-mir-100	1,083756	-1,71594	0,61001	-2,81297	0,004909	0,021671	0,304404

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri (devamı).

MIRLET7A2	hsa-let-7a-2	2,840133	-1,6831	0,403029	-4,17612	2,97E-05	0,000321	0,311413
MIR99A	hsa-mir-99a	1,449099	-1,63572	0,638992	-2,55984	0,010472	0,041061	0,32181
MIR3194	hsa-mir-3194	1,4821	-1,63302	0,441213	-3,7012	0,000215	0,00164	0,322413
MIR27B	hsa-mir-27b	22,32812	-1,6152	0,241548	-6,68684	2,28E-11	1,13E-09	0,326421
MIR654	hsa-mir-654	1,093795	-1,57907	0,592727	-2,66408	0,00772	0,031399	0,334698
MIR433	hsa-mir-433	1,233915	-1,53215	0,505702	-3,02975	0,002448	0,012258	0,345761
MIR5091	hsa-mir-5091	1,145306	-1,51598	0,513703	-2,95109	0,003167	0,01486	0,349658
MIR138-1	hsa-mir-138-1	1,519501	-1,48428	0,437569	-3,3921	0,000694	0,004351	0,357427
MIR645	hsa-mir-645	10,49536	-1,48367	0,240931	-6,15806	7,36E-10	2,09E-08	0,357578
MIR6809	hsa-mir-6809	4,415736	-1,44561	0,338182	-4,27465	1,91E-05	0,00022	0,367137
MIR5087	hsa-mir-5087	1,877707	-1,42147	0,413101	-3,44097	0,00058	0,003675	0,373332
MIR605	hsa-mir-605	4,746032	-1,38098	0,325266	-4,24568	2,18E-05	0,000245	0,383959
MIR1972-1	hsa-mir-1972-1	1,044091	-1,33783	0,515004	-2,5977	0,009385	0,03754	0,395616
MIR5188	hsa-mir-5188	4,716076	-1,28417	0,338453	-3,79422	0,000148	0,001298	0,410608
MIR181B1	hsa-mir-181b-1	2,413209	-1,26089	0,337326	-3,7379	0,000186	0,001558	0,417287
MIR221	hsa-mir-221	9,558763	-1,23904	0,398401	-3,11004	0,001871	0,009954	0,423653
MIR603	hsa-mir-603	1,523524	-1,22127	0,447845	-2,727	0,006391	0,027016	0,428904
MIR222	hsa-mir-222	5,149282	-1,21396	0,378926	-3,20367	0,001357	0,007776	0,431085

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri (devamı).

MIR30B	hsa-mir-30b	3,120103	-1,19874	0,342965	-3,49523	0,000474	0,003154	0,435656
MIR32	hsa-mir-32	2,917711	-1,0843	0,304107	-3,56553	0,000363	0,002511	0,471621
MIR548V	hsa-mir-548v	9,157558	-1,06782	0,236713	-4,511	6,45E-06	8,36E-05	0,477041
MIR3117	hsa-mir-3117	5,195645	-1,03718	0,318103	-3,26053	0,001112	0,006498	0,487277
MIR1255A	hsa-mir-1255a	7,219216	1,004713	0,242504	4,143073	3,43E-05	0,000358	2,006545
MIR4753	hsa-mir-4753	2,596344	1,005456	0,331758	3,030688	0,00244	0,012258	2,007578
MIR7848	hsa-mir-7848	15,75526	1,02411	0,22245	4,603773	4,15E-06	5,62E-05	2,033704
MIR744	hsa-mir-744	3,599291	1,028957	0,283047	3,635281	0,000278	0,002043	2,040548
MIR4451	hsa-mir-4451	5,733766	1,030134	0,259729	3,96619	7,3E-05	0,000702	2,042214
MIR601	hsa-mir-601	2,889915	1,037344	0,343391	3,020879	0,00252	0,012518	2,052445
MIR3155A	hsa-mir-3155a	2,092262	1,068754	0,41257	2,59048	0,009584	0,038081	2,097621
MIR548J	hsa-mir-548j	1,740965	1,077128	0,394514	2,730268	0,006328	0,02694	2,109832
MIR3174	hsa-mir-3174	6,828713	1,093667	0,229915	4,75684	1,97E-06	3,17E-05	2,134158
MIR1256	hsa-mir-1256	2,608218	1,112349	0,356303	3,121923	0,001797	0,009735	2,161974
MIR3140	hsa-mir-3140	14,52443	1,118257	0,178598	6,261295	3,82E-10	1,26E-08	2,170846
MIR548D1	hsa-mir-548d-1	2,367492	1,132448	0,368309	3,074722	0,002107	0,011113	2,192304
MIR548K	hsa-mir-548k	3,002721	1,15723	0,367213	3,151383	0,001625	0,009137	2,230287
MIR320E	hsa-mir-320e	2,942834	1,164167	0,338238	3,441861	0,000578	0,003675	2,241038

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri (devamı).

MIR3978	hsa-mir-3978	4,227619	1,228002	0,353782	3,471073	0,000518	0,003358	2,342424
MIR7854	hsa-mir-7854	4,445836	1,251646	0,292639	4,277099	1,89E-05	0,00022	2,38113
MIR3613	hsa-mir-3613	1,516236	1,253929	0,435772	2,877489	0,004009	0,018099	2,384901
MIR4659A	hsa-mir-4659a	0,971944	1,303168	0,522638	2,493443	0,012651	0,048334	2,467701
MIR4774	hsa-mir-4774	1,979514	1,374097	0,408775	3,3615	0,000775	0,004804	2,592055
MIR766	hsa-mir-766	1,383032	1,404557	0,483928	2,902409	0,003703	0,016847	2,647364
MIR657	hsa-mir-657	2,607971	1,407444	0,379673	3,706996	0,00021	0,001638	2,652669
MIR548L	hsa-mir-548l	1,818969	1,413703	0,42085	3,359161	0,000782	0,004804	2,664202
MIR4714	hsa-mir-4714	7,112368	1,418013	0,300797	4,714179	2,43E-06	3,81E-05	2,672172
MIR378E	hsa-mir-378e	4,106062	1,422751	0,280194	5,077733	3,82E-07	6,7E-06	2,680963
MIR3922	hsa-mir-3922	1,225288	1,426215	0,484951	2,940949	0,003272	0,015167	2,687408
MIR648	hsa-mir-648	1,249365	1,445145	0,536601	2,693145	0,007078	0,029296	2,722902
MIR6753	hsa-mir-6753	3,450722	1,451339	0,332764	4,361464	1,29E-05	0,00016	2,734617
MIR301A	hsa-mir-301a	2,988743	1,468405	0,374811	3,917723	8,94E-05	0,000832	2,767157
MIR1282	hsa-mir-1282	2,871594	1,47981	0,486047	3,04458	0,00233	0,011972	2,78912
MIR1245A	hsa-mir-1245a	4,708069	1,482517	0,393131	3,771047	0,000163	0,001404	2,794358
MIR548U	hsa-mir-548u	2,12463	1,529343	0,429223	3,56305	0,000367	0,002511	2,886543
MIR3688-2	hsa-mir-3688-2	1,843204	1,588826	0,428863	3,704737	0,000212	0,001638	3,008045

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri (devamı).

MIR4446	hsa-mir-4446	0,742209	1,591412	0,63964	2,487981	0,012847	0,04877	3,013441
MIR4632	hsa-mir-4632	1,710721	1,60066	0,459336	3,484727	0,000493	0,003227	3,03282
MIR5194	hsa-mir-5194	15,53884	1,620862	0,205868	7,873321	3,45E-15	3,43E-13	3,075587
MIR554	hsa-mir-554	2,358265	1,639637	0,418373	3,91908	8,89E-05	0,000832	3,115875
MIR4480	hsa-mir-4480	9,437675	1,647075	0,283966	5,800256	6,62E-09	1,58E-07	3,131981
MIR579	hsa-mir-579	1,759165	1,666983	0,461762	3,610047	0,000306	0,002198	3,175498
MIR4772	hsa-mir-4772	6,91348	1,692878	0,516764	3,275922	0,001053	0,006277	3,23301
MIR625	hsa-mir-625	0,533475	1,699939	0,609672	2,788285	0,005299	0,023052	3,248872
MIR620	hsa-mir-620	3,175807	1,702562	0,409836	4,154247	3,26E-05	0,000347	3,254784
MIR4802	hsa-mir-4802	13,4244	1,712462	0,26896	6,366974	1,93E-10	6,76E-09	3,277196
MIR1910	hsa-mir-1910	0,695962	1,715475	0,577535	2,97034	0,002975	0,014133	3,284047
MIR4489	hsa-mir-4489	2,181498	1,752775	0,429604	4,079979	4,5E-05	0,000455	3,370063
MIR1205	hsa-mir-1205	1,588623	1,756116	0,533238	3,293307	0,00099	0,006022	3,377875
MIR580	hsa-mir-580	0,989235	1,764972	0,538218	3,279288	0,001041	0,006265	3,398675
MIR3143	hsa-mir-3143	0,864111	1,832995	0,600156	3,054194	0,002257	0,011798	3,562758
MIR941-1	hsa-mir-941-1	0,552773	1,844461	0,680644	2,709878	0,006731	0,02825	3,591188
MIR4439	hsa-mir-4439	1,351412	1,846537	0,496076	3,72229	0,000197	0,001634	3,596358
MIR7150	hsa-mir-7150	1,281877	1,84976	0,499096	3,706224	0,00021	0,001638	3,604401
MIR4537	hsa-mir-4537	1,611895	1,907016	0,75607	2,522274	0,01166	0,045125	3,750327

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri (devamı).

MIR340	hsa-mir-340	1,882885	1,923096	0,467414	4,114334	3,88E-05	0,000399	3,792361
MIR4441	hsa-mir-4441	4,021103	1,941316	0,332602	5,836761	5,32E-09	1,32E-07	3,840557
MIR1537	hsa-mir-1537	10,419	1,982785	0,249811	7,937148	2,07E-15	2,75E-13	3,952553
MIR6131	hsa-mir-6131	0,6637	2,039332	0,739766	2,756725	0,005838	0,025033	4,110552
MIR3939	hsa-mir-3939	5,462802	2,10361	0,339099	6,203524	5,52E-10	1,65E-08	4,297833
MIR101-1	hsa-mir-101-1	10,2944	2,109042	0,328875	6,412897	1,43E-10	5,81E-09	4,314047
MIR4312	hsa-mir-4312	9,375954	2,118455	0,272304	7,779734	7,27E-15	6,19E-13	4,342286
MIR646	hsa-mir-646	1,677588	2,195605	0,489868	4,482038	7,39E-06	9,38E-05	4,580818
MIR628	hsa-mir-628	2,12527	2,22026	0,475776	4,666604	3,06E-06	4,45E-05	4,659773
MIR4477B	hsa-mir-4477b	10,70105	2,22879	0,35792	6,227055	4,75E-10	1,49E-08	4,687407
MIR1250	hsa-mir-1250	2,898889	2,248732	0,44614	5,04042	4,65E-07	7,91E-06	4,752648
MIR548P	hsa-mir-548p	1,907984	2,304559	0,539185	4,27415	1,92E-05	0,00022	4,940165
MIR629	hsa-mir-629	0,957679	2,316735	0,55186	4,198049	2,69E-05	0,000297	4,982035
MIR4673	hsa-mir-4673	1,339666	2,322578	0,584109	3,976275	7E-05	0,000684	5,002253
MIR4653	hsa-mir-4653	0,76102	2,430397	0,691659	3,513867	0,000442	0,002991	5,390416
MIR1273H	hsa-mir-1273h	1,528596	2,478708	0,536345	4,621481	3,81E-06	5,28E-05	5,573979
MIR338	hsa-mir-338	1,30134	2,498603	0,539338	4,63272	3,61E-06	5,12E-05	5,651378
MIR4518	hsa-mir-4518	1,02146	2,518656	0,621492	4,052596	5,07E-05	0,000503	5,730478
MIR3161	hsa-mir-3161	5,008784	2,537572	0,351156	7,226342	4,96E-13	3,29E-11	5,806109
MIR548C	hsa-mir-548c	4,78765	2,85751	0,428281	6,67204	2,52E-11	1,16E-09	7,247636

Ek Tablo 1: Hastalara ait örneklerin mirna değişimleri (devamı).

MIR3198-1	hsa-mir-3198-1	7,452521	2,896044	0,333857	8,674496	4,15E-18	1,24E-15	7,443825
MIR617	hsa-mir-617	2,606588	2,989613	0,50606	5,907623	3,47E-09	8,99E-08	7,94261
MIR618	hsa-mir-618	2,773187	2,997019	0,548745	5,461585	4,72E-08	1E-06	7,983485
MIR4433A	hsa-mir-4433a	1,436111	3,136337	0,515071	6,089132	1,14E-09	3,08E-08	8,792885
MIR3690	hsa-mir-3690-1	5,871954	3,422449	0,480015	7,129874	1E-12	5,99E-11	10,72161
MIR4652	hsa-mir-4652	1,785227	3,888697	0,829923	4,685614	2,79E-06	4,16E-05	14,81203
MIR944	hsa-mir-944	2,795726	4,577759	0,94276	4,855698	1,2E-06	1,99E-05	23,88047
MIR205	hsa-mir-205	49,06415	6,012305	0,75397	7,974196	1,53E-15	2,75E-13	64,54822

Onam Formu

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Araştırmacının/Hekimin Açıklaması

Akciğer kanseri için erken tanı ve tedavi sistemi geliştirilmesi amacıyla "Biyobelirteç Temelli Akciğer Kanseri Erken Tanı ve Tedavi Sistemi Geliştirilmesi" isimli bir bilimsel araştırma yapmayı planlamaktayız.

Akciğer kanseri tanı ve tedavisi ve cerrahi tedavi uygulanan hastalar üzerinde uygulanacak olan bu çalışmaya, tıbbi durumunuz bu koşulları ayardığı için sizi de davet ediyoruz. Ancak hemen belirtilmelidir ki araştırmaya katılıp katılmamak gönüllülük esasına dayalıdır. Bu bilimsel çalışmaya katılma kararını tamamen hür iradeniz ile vermelisiniz. Bu kararı verirken hiç kimse tarafından size telkin ve baskıda bulunulamaz.

Kararınızdan önce siz konuyu bilimsel araştırma ve bu araştırmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda yapılacak işlemler hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup unladıktan sonra bu bilimsel araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bilimsel çalışma hakkında bilgiler

Araştırmaya tıbbi teşhisiniz nedeniyle davet edilmiş bulunuyorsanız. Bu araştırma TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, İstanbul Medipol Üniversitesi, Bezmialem Vahaf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Sakarya Üniversitesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi ve daha sonra projeye katılması uygun görülen sağlık kurumları’nda gerçekleştirilecektir.

Çalışma hakkında kısa bilgi

Akciğer kanseri olan hastalarda erken tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için hastalığın oluşum ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler yapı ve mekanizmaların ortaya konularak erken tanı amacı ile kullanılabilecek moleküllerin tespiti gerekmektedir. Halen etkin bir tanıya veya erken tanı testi olmamasından dolayı hastalık ileri evrelerde teşhis edilmekte ve dolayısıyla erken tedavi seçenekleri düşük kalmaktadır. Hastalık, birtakım sığınma altına çevresel etmenlerin yol açtığı bir dizi genetik değişiklik sonucu meydana gelmektedir. Bu değişikliklerin ortaya çıkartılması, her hastada farklı genlerde meydana geldiği için, kapsamlı bir genom analizinin yanı sıra, genetik değişikliklerin protein seviyesinde de değişikliklere yol açabilmesine bağlı olarak kapsamlı bir proteom analizini de gerektirir. Bu projenin genel amacı bütüncül bir yaklaşım ile biyoenformatik destekli genom ve proteom analizlerini birlikte uygulayarak hastalığın moleküler bir kesitini ortaya çıkartmak ve bu görünüme dayalı olarak erken tanı ve tanıya kiti geliştirmektir.

Bu kapsamda; halk sağlığı açısından kritik önem taşıyan bu araştırmaya katılmamız ile tıbbi durumunuz nedeniyle sizden ameliyat öncesi ve sonrasında dokü, biyolojik sıvı örnekleri (kan, idrar, tükürük, balgam, bronkoalveolar lavaj, vb.) ve dışkı alınacaktır.

Çalışma kapsamında bilinmesi gereken durumlar ve araştırmacılar ile gönüllülerin uyması gereken kurallar

Araştırmaya katılmamız durumunda;

1. Sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.
2. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.
3. Hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı gösterilecektir.
4. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerinizi çok büyük bir hassasiyetle korunacaktır.
5. Çalışma sırasında meydana gelebilecek sağlığınız ile ilgili ve diğer olumsuzlukların sorumluluğu katılımcıya aittir.
6. Gönüllü olarak katıldığınız çalışmanın herhangi bir aşamasında araştırmadan ayrılabilirsiniz. Ancak ayrılmadan önce araştırmacılara bu durumu bildirmeniz önemlidir.
7. Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda tedavinizde ve klinik izlemimizde hiçbir değişiklik olmayacak, her zaman olduğu gibi aynı özen ve ihtinam ile hastalığınızın tedavisi sürdürülecektir.

Katılımcının (Gönüllü) / Hastanın Beraatı

Sayın tarafından, Dr. Abdullah Karadağ yürütücülüğünde TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Onkoloji Laboratuvarı'nda bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler tarafıma aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken, buna ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı gösterileceği, araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimalla korunacağı kesin ve net bir şekilde belirtilmiştir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Benden herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ve bana da herhangi bir ödeme yapılmayacağı net ve kesin bir şekilde ifade edilmiştir.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğum bildirilmiştir. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını da bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırmaya dışı tutulabilirim. İster doğrudan, ister dolaylı olsun, araştırmaya ile ilgili ortaya çıkabilecek sağlık durumuyla ilgili olumsuzluklarda sorumluluğun bana ait olduğunu biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı herhangi bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersen, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladığımı bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (gönüllü) olarak yer alma kararını tamamen hür iradem ile almış bulunuyorum. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllük içerisinde kabul ediyorum.

Tarih

Katılımcı (Gönüllü)

Adı, Soyadı

Adres

Telefon

İmza

Görüşme Tanısı

Adı, Soyadı

Adres

Telefon

İmza

Katılımcı (Gönüllü) ile Görüşen Araştırmacı

Adı, Soyadı, Unvanı

Adres

Telefon

İmza

Etik Kurul Kararı

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 10840098 – 01
Konu: Etik Kurulu Kararı

07/01/2015

Sayın Dr. Abdullah KARADAĞ

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Biyobelirteç Temelli Akciğer Kanseri Erken Tanı ve Tarama Sistemi Geliştirilmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

EK:
-Karar Formu (2 sayfa)

Tel: (0216)681 51 37
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No: 19,34810
Kavacık/BEYKOZ

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR
FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Biyobelirteç Temelli Akciğer Kanseri Erken Tanı ve Tarama Sistemi Geliştirilmesi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Abdullah KARADAĞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gebze/Kocaeli			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐