



**T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**BRONŞ LAVAJ SIVISI VE SERUMDAN ELDE EDİLEN
TÜMÖR KAYNAKLI EKSOZOMLARDA AKCİĞER
KANSERİ KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİNİN
İNCELENMESİ VE PROGNOTİK ÖNEMİ**

Dr. Nazife BALCI SAYGILI

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin SAYGIDEĞER**

ADANA-2021



**T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**BRONŞ LAVAJ SIVISI VE SERUMDAN ELDE EDİLEN
TÜMÖR KAYNAKLI EKSOZOMLARDA AKCİĞER
KANSERİ KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİNİN
İNCELENMESİ VE PROGNOSTİK ÖNEMİ**

Dr. Nazife BALCI SAYGILI

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin SAYGIDEĞER**

ADANA-2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen başta tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Yasemin SAYGIDEĞER olmak üzere ilgisini ve önerilerini gösteren sayın Prof. Dr. İsmail HANTA, Doç. Dr. Ezgi ÖZYILMAZ, Doç. Dr. Sedat KULECİ, Uzm. Dr. Oya BAYDAR ve Uzm. Dr. Efraim GÜZEL'e;

Klinikte birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, samimiyeti ile iyi kötü her anıma yürekten ortak olan ve dostluklarıyla bana her zaman güç veren değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Gözde YILMAZ, Uzm. Dr. Gülşah ORHAN TIRAŞCI, Uzm. Dr. Gulnura GANBAROVA ve Sevgi ATAŞ'a;

Asistanlık süresi boyunca Göğüs Hastalıkları kliniğinde beraber çalıştığım ve bu zorlu süreci kolaylaştıran tüm asistan arkadaşlarıma, servis sorumlu hemşiresi Tülay ARTIKLAR'a, ve tüm hemşirelerimize, tüm personellerimize, tüm sekreterlerimize, tüm solunum fonksiyon testi ve bronkoskopi ekibine ve emeklerinden dolayı başta Dr. Burcu Saygıdeğer Demir ve moleküler biyolog Eylem Nas olmak üzere tüm ÇÜMERLAB ekibine;

Bugünlere gelmemi sağlayan, eğitim hayatım boyunca her türlü fedakarlıkta bulunup, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım babam Ahmet BALCI, annem Gönül BALCI, kardeşimlerim Derya AÇIK, Mehmet AÇIK, Fulya USTA ve Serkan USTA'ya; Her zaman olduğu gibi bu süreçte de ilgisini, sevgi ve sabrını esirgemeyen, en büyük destekçim, sevgili eşim Serkan SAYGILI'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar LİSTESİ.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Risk Faktörleri	4
2.1.2.1. Sigara	4
2.1.2.2. Mesleki ve Çevresel Karsinojenler	4
2.1.2.3. Diğer Faktörler.....	5
2.1.3. Belirti ve Bulgular	5
2.1.4. Tanı Yöntemleri.....	5
2.1.4.1. Radyolojik Tanı Yöntemleri	5
2.1.4.2. Laboratuvar Tanı Yöntemleri	6
2.1.4.3. Girişimsel Tanı Yöntemleri	6
2.1.5. Akciğer Kanseri Histopatolojik Sınıflandırılması	7
2.1.6. Evreleme	8
2.1.7. Tedavi	10
2.1.7.1. KHAK’de Tedavi.....	10
2.1.7.2. KHDak’de Tedavi.....	11
2.2. Tümör Mikroçevresi	12
2.2.1. Kanser Kök Hücreleri	12
2.2.2. Kanser Kök Hücrelerinin Tümör Progresyonuna Etkileri	14
2.2.2.1. Tümör Başlangıcında Kanser Kök Hücreleri.....	14
2.2.2.2. Metastazda Kanser Kök Hücreleri	14

2.2.2.3. İlaç Direncinde Kanseri Kök Hücreleri	15
2.2.3. Kanseri Kök Hücreleri ve Eksozom Sinyalizasyonu	15
2.3. Eksozom Nedir	16
2.3.1. Tümör Kaynaklı Eksozomların Rollerini.....	17
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	20
3.1. Araştırmanın Genel Özellikleri.....	20
3.2. Araştırmaya Alınan Hasta Özellikleri.....	20
3.3. Materyallerin Toplanması.....	21
3.4. Eksozom İzolasyonu ve Validasyonu	21
3.5. Protein Lizatı Hazırlama ve BCA Yöntemi ile Total Protein Tayini	22
3.6. Likit Kromatografi/Quantitatif Time of Flight-Kitle Spektroskopisi (LC/QTOF-MS) İncelemeleri ile Örneklerde Saptanan Peptidlerin Analizi	22
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. Hasta Özellikleri ile İlgili Bulgular	26
4.2. Protein Analiz Sonuçları	34
4.3. LC/QTOF-MS İncelemeleri İle Örneklerde Saptanan Peptid Sonuçları	35
4.4. Kanseri Kök Hücrelerine Ait Peptidlerin Dağılımı	41
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇLAR.....	49
7. KAYNAKLAR	51

TABLÖLER LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Akciğer kanserinin histolojik sınıflaması.....	8
Tablo 2. KHDAK evrelemesi TNM 8. güncelleme	8
Tablo 3. Evreleme gruplaması	10
Tablo 4. Proteinlerin 20 “standart” monomerik birimi olan amino asitlerin listesi	24
Tablo 5. Fasta sekansları.....	25
Tablo 6. Hastaların demografik özelliklerinin incelenmesi.....	26
Tablo 7. Hastaların ek hastalık bulgularının incelenmesi	27
Tablo 8. Hastaların laboratuvar bulgularının incelenmesi	27
Tablo 9. Hastaların Pet CT taraf, EBL ve patolojik tanı bulgularının incelenmesi.....	28
Tablo 10. Akciğer kanseri tanısı konulan hastaların tanı şekli ve evre bulgularının incelenmesi.....	29
Tablo 11. Hastaların driver mutasyon varlığı bulgularının incelenmesi	29
Tablo 12. Hastaların mortalite bulgularının incelenmesi.....	30
Tablo 13. Hastaların demografik özellikleri ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi	30
Tablo 14. Hastaların ek hastalık varlığı bulguları ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	30
Tablo 15. Hastaların laboratuvar bulguları ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	31
Tablo 16. Hastaların Pet CT taraf, EBL ve patolojik tanı bulgularının incelenmesi.....	32
Tablo 17. Hastaların mortalite bulguları ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi	32
Tablo 18. Mortalite bulgularına etki eden faktörlerin incelenmesi	33
Tablo 19. Proteomik incelemesi yapılan hastaların klinik özellikleri.....	34
Tablo 20. BCA yöntemi ile protein konsantrasyonu ölçüm sonuçları	34
Tablo 21. İleri incelemeye alınan örnekler	35
Tablo 22. Kanser hasta grubunun peptid analiz sonuçları	35
Tablo 23. Kontrol hasta grubunda tespit edilen peptidler	36
Tablo 24. İncelenen örneklerden elde edilen 174 de-nova peptid listesi.....	39
Tablo 25. Örneklerden elde edilen de-nova peptid sayıları.....	39
Tablo 26. LSFPTTK Alignment	40
Tablo 27. CD133 ve ALDH1A’e ait peptid sekansları ve saptanan örnekler	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Serumdan elde edilen eksozomların eppendorf tüpündeki görünümü (çöken yapılar eksozom)	22
Şekil 2. Hastaların WBC değerleri ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi	32
Şekil 3. Hastaların ortalama sağkalım bulgularının incelenmesi	33
Şekil 4. 4L örneğinden elde edilen aminoasit sekanslarının yoğunlukları ve spektroskopik ölçümleri.....	37
Şekil 5. 6L örneğinden elde edilen aminoasit sekanslarının yoğunlukları ve spektroskopik ölçümleri.....	38

KISALTMALAR LİSTESİ

AC CA	: Akciğer Kanseri
ALDH1	: Aldehit Dehidrogenaz 1
AML	: Akut Myelojenöz Lösemi
BCA	: Bicinchoninic Acid Solution
BRAF	: B-Raf proto-onkogen
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
Bx	: Biyopsi
CA	: Kanser
CAVi	: Siklofosamid Doksorubisin Vinkristin Rejimi
CRP	: C Reaktif Protein
CSC	: Kanser Kök Hücre
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBL	: Endobronşial Lezyon
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör
EGFR-TKI	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Tirozin Kinaz İnhibitörü
EML-4/ALK	: Ekinoderm Mikrotübül İlişkili Protein Benzeri 4 /Anaplastik Lenfoma Kinaz
EMT	: Epidermal Mezenkimal Transisyon
EP	: Sisplatin-Etoposid Rejimi
EV	: Ekstraselüler Vezikül
FOB	: Fiber Optik Bronkoskopi
HB	: Hemoglobin
HT	: Hipertansiyon
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
KOAH	: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
MDR	: Multi Drag Resistance

MR	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MVB	: Multiveziküler Body
M/Z	: Kütle/Yük Sayısı
NCBI	: National Center for Biotechnology İnformafion
PEG	: Polietilen Glikol
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PDL-1	: Programmed Death- Ligand 1
PET	: Pozitron Emiston Tomografi
PK	: Protein Konsantrasyonu
PLT	: Platelet
PPM	: Milyondaki Parça Sayısı
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Retansiyon Zamanı
SCID	: Ciddi Kombine İmmün Yetmezlik
TBC	: Tüberküloz Basil Kompleks
TGFB1	: Transforming Growth Factor Beta 1
TGFB2	: Transforming Growth Factor Beta 2
TKİ	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TME	: Tümör Mikro Çevresi
TNM	: Tümör, Nod, Metastaz
TTTCB	: Transtorasik Tru Cut Biyopsi
TTİAB	: Transtorasik İnce İğne Aspirasyon Biyopsi
USG	: Ultrasonografi
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
VALSG	: Veterans Administration Lung Study Group
WBC	: White Blood Cell

ÖZET

Bronş Lavaj Sıvısı ve Serumdan Elde Edilen Tümör Kaynaklı Eksozomlarda Akciğer Kanseri Kök Hücre Belirteçlerinin İncelenmesi ve Prognostik Önemi

Amaç: Akciğer kanseri en sık ölüme neden olan kanserdir. Bu bağlamda hassas moleküler belirteçlerin tespiti hastaların tanı tedavi prognoz ve takibine büyük katkı sağlayacaktır. Tümör kaynaklı eksozomlar; kanser oluşumu, progresyon, tedavi izlemi ve tedaviye direncin saptanması amacıyla giderek artan sıklıkta kullanılan küçük endozom vezikülleridir. Bu çalışmada bronş lavaj sıvısı ve serumdan elde edilen tümör kaynaklı eksozomlarda kanser kök hücre belirteçlerinin incelenmesi ve prognostik öneminin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çukurova Üniversitesi Tıp fakültesi Balcalı Hastanesi Göğüs Hastalıkları kliniğine başvuran akciğer kanseri ön tanılı 104 hastadan eksozom izole etmek için serum ile birlikte bronkoalveolar lavaj sıvısı veya plevral mayi örneği alındı. Hastaların demografik verileri, laboratuvar ve patolojik verileri ve 6 aylık takip verileri kaydedildi. 6 hastada eksozomlardan elde edilen proteinler tripsin ile peptidlere ayrıştırıldı ve kanser kök hücre belirteçleri CD133 ve ALDH1A1 varlığı peptidlerin kütle spektroskopisi ile analizleri ile tespit edildi. Analizler için Peaks-studio yazılım programı kullanıldı.

Bulgular: 104 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalardan 82 (% 78,8)'si erkek, 22 (% 21,2)'si ise kadın idi. Hastaların yaş ortalamaları $64,3 \pm 10,5$ (Med: 66, Min: 33, Maks: 90) yıl idi. Hastalardan 59 (% 56,7)'unun sigara kullandığı gözlenirken; sigara kullananların yılda ortalama $45,8 \pm 22,7$ paket sigara tükettikleri belirlendi. 6 hasta üzerinde yapılan protein analizlerinde kanser hasta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında peptidlerin çoğunun kanser hasta grubundan hatta küçük hücreli akciğer kanseri(KHAK) hastalarının lavaj sıvılarından izole edildiği görüldü. Kanser kök hücre belirteçlerine yönelik yapılan analiz sonuçlarında CD133 varlığına işaret eden toplam 3 adet peptid tespit edilirken ALDH1A1'i işaret eden 1 adet peptide rastlandı. CD133 tespit edilen örneklerden bir tanesi KHAK, bir tanesi küçük hücreli dışı akciğer kanseri(KHDAK) hastasına ait iken bir tanesinin kontrol örnek grubundan olması dikkat çekmekteydi. ALDH1A1'e ait peptid sekansları sadece KHDAK hastasının lavaj sıvısından elde edilen eksozomda izole edilmişti.

Sonuç: Pandemi ve döviz kurunun hızlı artışı nedeni ile kısıtlı sayıda örnekle yapılan araştırmamızda hastaların lavaj ve serumundan elde edilen eksozomal proteinlerde kanser kök hücrelerine ait belirteçlerin varlığını gösterdik. Daha geniş gruplarda yapılacak kapsamlı çalışmaların, eksozomlarda tespit edilen kanser kök hücrelerinin hastalığın seyri ile ilişkisini anlamaya ve prognostik önemini ortaya koymaya katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Eksozom, Kanser kök hücresi, CD133, ALDH1

ABSTRACT

Examination of Lung Cancer Stem Cell Markers in Tumor-Derived Exosomes Obtained from Bronchial Lavage Fluid and Serum and Their Prognostic Importance

Objective: Lung cancer is the most common cause of death in all cancer type. Due to the high mortality and morbidity of the disease and the high side effects of chemotherapy, targeted therapies have come to the fore. In this context, the detection of sensitive molecular markers will contribute greatly to the diagnosis, treatment, prognosis and follow-up of patients. Tumor-derived exosomes are small endosome vesicles that are increasingly used for cancer initiation, progression, monitoring of treatment and detection of resistance to treatment. In this study, it was aimed to examine cancer stem cell markers in tumor-derived exosomes obtained from bronchial lavage fluid and serum and to determine their prognostic importance.

Material and Method: In order to isolate exosomes, bronchoalveolar lavage fluid or pleural fluid samples were taken from 104 patients with pre-diagnosis of lung cancer who applied to Çukurova University Medical Faculty Balcalı Hospital Chest Diseases Clinic. Demographic data, laboratory and pathological data and 6-month follow-up data of the patients were recorded. Proteins obtained from exosomes in 6 patients were separated into peptides by trypsin and the presence of cancer stem cell markers CD133 and ALDH1A1 was detected by mass spectroscopy analysis of peptides. Peaks-studio software program was used for analysis.

Results: 104 patients were included in the study. Of the patients, 82 (78.8%) were male and 22 (21.2%) were female. The mean age of the patients was 64.3 ± 10.5 (Med: 66, Min: 33, Max: 90) years. It was observed that 59 (56.7%) of the patients were smokers; It was determined that smokers consumed an average of 45.8 ± 22.7 packs of cigarettes per year. In the protein analyzes performed on 6 patients, when the cancer patient group was compared with the control group, it was seen that most of the peptides were isolated from the cancer patient group and even from the lavage fluids of the small cell lung cancer (SCLC) patients. In the analysis results for cancer stem cell markers, a total of 3 peptides indicating the presence of CD133 were detected, while 1 peptide indicating ALDH1A1 was found. It was noteworthy that one of the CD133 detected samples belonged to a SCLC patient and one belonged to a patient with non-small cell lung cancer (NSCLC), while one of them was from the control sample group. The peptide sequences of ALDH1A1 were isolated only in the exosome obtained from the lavage fluid of NSCLC patient.

Conclusion: In our study, which was conducted with a limited number of samples due to the pandemic and the rapid increase in the exchange rate, we demonstrated the presence of markers of cancer stem cells in exosomal proteins obtained from the lavage and serum of patients. It is thought that comprehensive studies to be conducted in larger groups will contribute to understanding the relationship of cancer stem cells detected in exosomes with the course of the disease and to revealing their prognostic importance.

Key words: Lung cancer, Exosome, Cancer stemcell, CD133, ALDH1A1

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akciğer kanseri ya da bronkojenik karsinom hava yolları veya akciğer parankimi kaynaklı maligniteler olarak tanımlanmıştır. Dünya çapında en sık tanı konulan kanser tiplerinden biridir ve kanser ilişkili ölümlerin ilk sıradaki sebebidir. Tüm akciğer kanserlerinin %85'ini küçük hücreli dışı akciğer kanseri(KHDAK) oluşturmaktadır. Hastaların yaklaşık %20'si tanı anında lokal ileri (evre-III), yaklaşık yarısı ise metastatik (evre-IV) hastalığa sahiptir. Metastatik evre hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %5'in altındadır.¹ Mortalite ve morbidite oranlarının bu derece yüksek olması sebebi akciğer kanserinin erken tespitin önlenmesi ve tedavisi ile ilgili çalışmalar önemli hale gelmiştir. Tedavilerin çeşitliliği ve yan etkilerinin fazla olması sebebiyle son dönemlerde hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler üzerinde durulmaktadır. Artan hedefe yönelik tedavi ihtiyacı sebebiyle akciğer kanserinin patofizyolojisinin aydınlatılması da önem kazanmaktadır.

Tümör mikroçevresi, yetişkin kök hücreleri, kanser kök hücreleri ve stromal hücreler dahil olmak üzere birçok hücre tipinden oluşur. Kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler dahil olmak üzere, kendini yenileyebilen ve dokuya özgü hücreler haline gelmesi için uyarılabilen uzmanlaşmamış hücreler olarak karakterize edilir.^{2,3} Son çalışmalar, kanser kök hücrelerinin tümör metastazi^{4,5} ve terapötik direnç^{6,7} ile bağlantısını göstermiştir. Tümör mikro çevresi içindeki kök hücre, kanser hücresi ve stromal hücrelerin birbirleriyle iletişim kurdukları ve böylece tümör ilerlemesini düzenledikleri bilinmektedir. Bu iletişimi eksozom adı verilen veziküller aracılığı ile yaparlar.

Eksozomlar; retikülositler,⁸ dendritik hücreler,⁹ lenfositler^{10,11} ve kanser hücreleri¹² gibi birçok hücre tipi tarafından salınabilen küçük endozom vezikülleridir. Dahası, eksozomlar kan, idrar, plevral efüzyonlar, asitler ve bronkoalveolar sıvı gibi birçok vücut sıvısından başarıyla saflaştırılmıştır.¹³ Normal insan kanında, kanser hastalarının kanındaki 4000 trilyon eksozomlara karşı yaklaşık 2000 trilyon eksozomun tespit edilebildiği bildirilmiştir¹⁴ ki bu, tümör hücrelerinin normal muadillerinden daha fazla eksozom ürettiğini ve yararlı bir teşhis biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.¹⁵ Günümüzde, akciğer kanseri tanısı ve tedavisinde eksozomların uygulanması hala başlangıç aşamasındadır.

Tümör kaynaklı eksozomların tespiti, kanser oluşum, progresyon ve tedavi izleminde ki etkileri ve eksozom bileşenlerinin rolleri dahil olmak üzere eksozomlar üzerinde yapılacak daha fazla çalışma, tıbbi tedavi uygulamalarını geliştirebilir ve bu hastalarının sağkalım oranını iyileştirebilir. Tümör kaynaklı eksozomlarda kanser kök hücre belirteçlerinin incelenmesinin bu hastaların takipleri ile ilgili gelişmelere önemli katkı sağlayacağını düşünülmektedir. Bu çalışmada bronş lavaj sıvısı plevral mayi ve serumdan elde edilen tümör kaynaklı eksozomlarda kanser kök hücre belirteçlerinin incelenmesi ve prognostik öneminin saptanması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri veya bronkojenik karsinom terimi, havayolu veya pulmoner parankimden köken alan maligniteleri tanımlar. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %95'ini küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve KHDAK oluşturur. Geri kalan %5'i bu iki alt grup dışındaki diğer hücre tiplerini içerir. Histopatolojik olarak bu ayrımın yapılması tedavi, prognoz ve evreleme için önemlidir.¹⁶

2.1.1. Epidemiyoloji

Dünya çapında, 2020 yılında yaklaşık 2,2 milyon hastada akciğer kanseri meydana geldi ve tahminen 1,8 milyon ölüme neden oldu. Bu sayı kanser ilişkili ölümlerin yaklaşık 5'te biridir. Akciğer kanseri görülme sıklığı olarak erkeklerde %14,5 ile birinci, kadınlarda %8,4 ile meme ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü en sık kanser türüdür. Kanser ilişkili ölümlerde ise erkeklerde en sık, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci en sık sebeptir.¹⁷

KHDAK'den kaynaklanan ölüm oranı, bu alt tipin insidansından daha hızlı azalma göstermiştir ve bu azalma, hedefe yönelik tedavilerin onay zamanlamasına karşılık gelen zaman içinde hayatta kalmada önemli bir iyileşme ile ilişkilendirilmiştir. Erkekler arasında, KHDAK kaynaklı insidansa dayalı mortalite 2013'ten 2016'ya yıllık olarak% 6,3 azalırken, insidans 2008'den 2016'ya yıllık% 3,1 azaldı. 2001 yılında tanı konulan KHDAK'li erkekler arasında% 26 olan akciğer kanserine özgü sağkalım oranı 2014 yılında teşhis konulanlar arasında% 35 olarak tespit edilmiş. Tüm ırklarda etnik gruplarda ve KHDAK'li kadınlar arasında da benzer sonuçlar bulunmuş. Aksine, KHAK kaynaklı ölüm oranı, azalan insidansın bir sonucu olarak tamamen azalmakla birlikte ve hayatta kalma konusunda hiçbir iyileşme olmamış. Bu sonuç, KHAK için sınırlı tedavi ilerlemeleri ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir.¹⁸

2.1.2. Risk Faktörleri

2.1.2.1. Sigara

Sigara dumanının solunmasının akciğer kanserine neden olabileceği olasılığı ilk olarak 1912’de ortaya atıldı.¹⁹ Sigara şeklinde tütün kullanımı, 1900’larda kişi başına yılda 100’den az iken 1960’larda kişi başına yılda 4400 e artmıştır.^{20,21} Akciğer kanseri riski hem günlük içilen sigara sayısı hem de yaşam boyu sigara içme süresi ile artar.²²

Amerika ve Avrupa’da akciğer kanseri tanısı konulan erkek hastaların, yaklaşık %98’inde sigara içme öyküsü var iken, kadınların da %70-90’nında sigara içme öyküsü mevcuttur. Doğu toplumlarında ise bu oran kadınlarda çok daha düşük görülmüştür. Yapılan araştırmalarda doğu toplumunda kadınlarda sigara içme oranı %6-57 oranından görülmüştür. Batılı toplumlarda, genç popülasyonda akciğer kanseri hastalığı daha fazla sigara içen grupta görülmeyenken, Doğu toplumunda, bu durumun aksine bir durum görülmektedir. Bu sebeple, Batı ve Doğu toplumlarında akciğer kanseri epidemiyolojik özelliklerinin farklı olması muhtemeldir. Sigara dışında ki diğer risk faktörleri kadınlarda, özellikle de doğu toplumunda ki kadınlarda daha önemlidir. Hastaların sadece %10’dan azının hiç sigara içmediği tespit edilmiştir.²³ Akciğer kanseri etyolojisinde büyük payı olması nedeni ile; sigaraya başlanmanın engellenmesi, sigara içen kişilerin bırakmaya yönlendirilmesi akciğer kanseri gelişimini önlemede en önemli basamaklardan biri haline gelmiştir. Tütün tüketiminin sonlandırılması ile dünya üzerinde tüm kansere bağlı ölümlerinin yaklaşık %20’sinin önlenebileceği tahmin edilmektedir.²⁴

2.1.2.2. Mesleki ve Çevresel Karsinojenler

Akciğer kanseri riskini artıran çeşitli mesleki ve çevresel karsinojenler vardır. Bunlardan en çok bilinen faktörler asbest ve radondur. Akciğer kanseri ilişkili olduğu düşünülen diğer karsinojenler arsenik, klorometil eter, krom, formaldehit, vinil klorid, iyonizan radyasyon, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve ağır metal tozlarıdır. Bu karsinojenler akciğer kanseri gelişiminde tütün kullanımı ile sinerjistik rol oynarlar ve aynı zamanda sigara kullanmayanlarda da akciğer kanseri gelişimi için bağımsız risk faktörüdürler.²⁵

2.1.2.3. Diğer Faktörler

Epidemiyolojik veriler diyetle eksik A vitamini, C vitamini ve beta-karoten alımının akciğer kanseri riskini arttırdığını ortaya koymuştur. Bol miktarda anti-oksidan içerikli besin tüketimi ise akciğer kanserine karşı koruyucu bir rol oynamaktadır. Bu etkinliğin tam olarak hangi mekanizmayla olduğu bilinmemekle birlikte anti-oksidan içerikli besinlerin DNA hasarını azaltmakta olduğuna dair bilgiler vardır. Diğer kanser türlerine yönelik radyoterapi alan hastalarda ikincil olarak akciğer kanseri görülme riski artmıştır. Bu risk artışı meme kanseri ve Hodgkin lenfomada gösterilmiştir.²⁶

Diğer yandan akciğer kanserine neden olan genetik faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır ancak kanıtlar genetiğin rolü olabileceğini göstermektedir. 25 Birinci derece akrabada akciğer kanseri olması, akciğer kanser gelişim riskini 1.6 kat, kadar arttırdığı gösterilmiştir.²⁷

2.1.3. Belirti ve Bulgular

Akciğer kanserli hastaların çoğunda klinik prezentasyonda ilerlemiş hastalık vardır. Bu, hastalığın agresif biyolojisini ve lokal olarak ilerlemiş veya metastatik hastalık mevcut olana kadar semptomların sıklıkla yokluğunu yansıtabilir. Semptomlar tümörün lokal etkilerinden, bölgesel veya uzak yayılımdan veya metastazlarla ilgili olmayan uzak etkilerden (paraneoplastik sendromlar) kaynaklanabilir. KHKDAK'li 2293 hasta üzerinde yapılan bir çalışma, ortalama tanı yaşının 64 olduğunu ve klinik prezentasyonda en sık görülen semptomların öksürük (%55), nefes darlığı (%45), ağrı (%38) ve kilo kaybı (%36) olduğunu göstermiştir.²⁸

2.1.4. Tanı Yöntemleri

2.1.4.1. Radyolojik Tanı Yöntemleri

Biyopsi öncesi en yüksek tanısal radyografik aşamanın belirlenmesi, tanı için doku örneklemesini optimize eden bir modalitenin seçimini kolaylaştırır.²⁹ Tanıda ilk seçilecek radyolojik yöntem posteroanterior akciğer grafisidir. Çekilen yan grafi iki yönlü grafiye üçüncü boyutu, yani derinliği eklemektedir. Genel ilke olarak her akciğer filmi, eğer varsa, eski filmlerle karşılaştırılarak okunmalıdır.³⁰

Bilgisayarlı tomografi (BT) ve bazı durumlarda pozitron emisyon tomografisi (PET), tümör boyutunun (T), mediastinal düğüm genişlemesinin (N) ve potansiyel intra veya ekstra torasik metastazların (M) invazif olmayan bir değerlendirmesini sağlar. Doku biyopsisi ile doğrulama yapılması gerekmesine rağmen, bu görüntüleme testleri hastalığın TNM evresinin ilk değerlendirmesi için temel sağlar ve doku örnekleme için en uygun yer(ler)i seçmede klinisyene rehberlik etmeye yardımcı olur.^{29,31}

Yüksek yumuşak doku kontrastı elde edilmesi, damarsal yapıları ayrıntılı gösterebilmesi ve multiplanar görüntüleme özellikleri sayesinde manyetik rezonans görüntüleme (MR) bazı durumlarda BT'ye tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Göğüs duvarı invazyonu belirlemede de MR, bir çalışmaya göre %90 sensitivite ve %86 spesifite ile BT'ye göre üstün bulunmuştur.³²

Toraks ultrasonografi (USG) maliyetinin düşük olması, radyasyon içermemesi, yatak başı uygulanabilir olması ve kolay ulaşılabilir olması nedeniyle son zamanlarda kullanımında artış olan bir görüntüleme yöntemidir. Fakat torakstaki kemik yapının ve akciğerlerdeki havanın kullanımını sınırlandırdığı bir gerçektir. Yine de toraks USG ile plevral efüzyonlar değerlendirilebilir, gerçek zamanlı görüntüleme eşliğinde ya da işaretleme ile torasentez yapılabilir. Plevral kalınlaşma veya plevral kitle durumunda trucut biyopsi ile değerlendirme yapılabilir.³³

2.1.4.2. Laboratuvar Tanı Yöntemleri

Laboratuvar testleri akciğer kanserli hastalarda, özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanserinde metastaz olasılığını tahmin edebilir.³⁴ Sırtta, göğüste veya ekstremitelerde ağrı ve yüksek serum alkalın fosfataz seviyeleri genellikle kemik metastazı olan hastalarda mevcuttur. Kapsamlı kemik hastalığına bağlı olarak serum kalsiyumu yükselebilir. KHDAK'lı hastaların yaklaşık yüzde 20'sinde başvuru sırasında kemik metastazı vardır.³⁵ Semptomatik hepatik metastazlar hastalığın erken evrelerinde nadirdir. Asemptomatik karaciğer metastazları, karaciğer enzim anormallikleri ile tespit edilebilir.³⁶

2.1.4.3. Girişimsel Tanı Yöntemleri

Bronkoskopi akciğer kanseri tanısında sık kullanılan yöntemlerden biridir. Tanının yanısıra evreleme, tedavi ve tedavi takibinde de kullanılan bir yöntemdir.

Santral tümörlerde işlemin tanısal değeri artmaktadır. Bronşiyal yıkama, fırçalama, bronkoskopik biyopsi ve bronkoskopik iğne aspirasyonu bronkoskopik tanısal işlemlerdir. Santral tümör varlığında yapılmış bir meta-analizde bronkoskopik tanısal işlemlerden endobronşial biyopsinin, fırçalamanın ve bronşiyal yıkamanın sensitivite değerlerinin sırasıyla; %74, %59 ve %48 olduğu bulunmuştur. Tüm bu işlemler kombine edildiğinde bronkoskopinin tanı değeri %89'a kadar yükselir.³⁷ Periferik tümörlerde BT veya ultrasonografi eşliğinde yapılan ince iğne aspirasyon biyopsisi de son dönemde önemli bir tanı aracı olarak kullanılmaktadır.³⁸

Mediastinoskopi/mediastinotomi yöntemi ile iki akciğer arasında kalan bölümü değerlendirmek için sol 2-3. kostalar arasına yaklaşık 5 cm kesi açılarak bu alana ulaşılmaktadır. Mediastinal lezyonları lenf ve damarsal yapıları değerlendirerek gerektiğinde biyopsi alma imkanı da sağlamaktadır.

Diğer bir tanısal yöntem olan torakoskopi yönteminde toraks duvarı direkt geçilerek her iki plevrayı da görüntülemenin yanında biyopsi alma imkanı sunar. Bazı vakalarda tedavi aracı olarak da kullanılmaktadır.³⁹

2.1.5. Akciğer Kanseri Histopatolojik Sınıflandırılması

Akciğer kanseri, solunum yolları epitel hücrelerinden ortaya çıkan, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere 2 ana gruptan oluşan bir kanser türüdür. KHAK akciğer kanseri vakalarının %15'ini oluşturmaktadır. Nöroendokrin özellikler sergileyen hücrelerden oluşur ve oldukça agresif seyirlidir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ise hastaların %85'ini oluşturmaktadır ve adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç ana patolojik gruba ayrılmaktadır. Bunlardan en sık görüleni adenokarsinom olup vakaların %38,5'inde saptanırken, skuamöz hücreli karsinom vakaların %20'sinde, büyük hücreli karsinom ise %9'unda saptanmıştır 40 . 2015 DSÖ Akciğer Tümörleri Sınıflandırmasında önemli güncellemeler yapılmıştır. Son güncel sınıflama Tablo 1'de özetlenmiştir.⁴¹

Tablo 1. Akciğer kanserinin histolojik sınıflaması

TÜMÖR TİPİ	VARYANT
Adenokarsinom	* Lepidik * Asiner * Papiller * Mikropapiller * Solit * İnvaziv musinöz (mix invaziv müsinöz ve non-musinöz) * Kolloid * Fetal * Enterik * Minimal invaziv * Preinvaziv (atipik adenomatöz hiperplazi, adenokarsinoma in situ non-musinöz ve musinöz)
Skumöz Hücreli Karsinom	* Keratinize * Non- Keratinize * Bazaloid
Büyük Hücreli Karsinom	
Adenoskuamöz Karsinom	
Sarkomatoid Karsinom	* Plemorfik karsinom * İğ hücreli karsinom * Dev hücreli karsinom * Karsinosarkom * Pulmoner blastom
Nöroendokrin karsinom	* Küçük hücreli karsinom * Büyük hücreli nöroendokrin karsinom * Karsinoid (tipik, atipik I) * Preinvaziv Lezyon (Diffüz Pulmoner Nöroendokrin Hücre Hiperplazisi)
Diğer ve Sınıflandırılmayan Karsinomlar	* Lenfoepitelyoma Benzeri Karsinom * NUT karsinom

2.1.6. Evreleme

Evreleme KHDAK uygun tedaviyi belirler ve hastanın klinik özellikleriyle birleştirildiğinde değerli prognostik bilgiler sağlar.

Tablo 2. KHDAK evrelemesi TNM 8. güncelleme⁴²

T: Primer tümör	
Tx	Primer tümör değerlendirilemez veya malign hücreler balgam ya da bronşial sıvıda görülür ancak bronkoskopi ya da görüntüleme yöntemleriyle saptanamaz.
T0	Primer tümör kanıtı yok.
Tis	Karsinoma in situ I
T1	Tümörün en geniş çapı <3 cm, akciğer veya viseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lobar bronştan daha proksimalde invazyonun gözlenmediği tümör 2
T1a (mi)	Minimal invaziv adenokarsinom3
T1a	En geniş tümör çapı ≤1 cm2
T1b	En geniş tümör çapı >1 cm, ≤2 cm
T1c	En geniş tümör çapı >2 cm, ≤3 cm

Tablo 2'nin devamı

T2	Aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör veya en geniş çapı >3 cm, ≤5 cm olan tümör ⁴ -Karinaya uzaklığına bakılmaksızın karinayı invaze etmeden ana bronşu tutan tümör -Visseral plevra invazyonu olan tümör -Obstrüktif pnömoni veya hiler bölgeye uzanan atelektazi (kısmi veya total pnömoni/atelektazi)
T2a	En geniş tümör çapı >3 cm, ≤4 cm
T2b	En geniş tümör çapı >4 cm, ≤5 cm
T3	Primer tümörle aynı lobda metastatik nodül/ nodüller olması Tümörün en geniş çapı >5 ve ≤7 cm olması veya göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir ya da parietal perikarddan birine direkt invazyon varlığı
T4	Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül/nodüller olması Tümörün en geniş çapı >7 cm veya diyafragma, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra korpusu ya da karina yapılarından birine invazyon varlığı
N: Bölgesel Lenf Nodu İnvazyonu	
NX	Değerlendirilemeyen bölgesel lenf bezleri
N0	Bölgesel lenf bezlerine metastaz yok
N1	İntrapulmoner lenf bezlerine ve/veya ipsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf bezlerine metastaz
M: Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
M1a	Plevral veya perikardiyal metastatik nodüller, karşı akciğerde metastatik nodüller, veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon ⁵
M1b	Tek bir ekstratorasik organda ve tek metastaz ⁶
M1c	Bir veya birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz

1. Adenokarsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinoma in situyu kapsar.
2. Ana bronş proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı da olsa invazyon gösteren büyüklükten bağımsız nadir yüzeyel tümör yayılımı da T1a olarak sınıflandırılır.
3. 3 cm'den daha büyük boyutta olmayan soliter adenokarsinom, lepidik baskın paternli ve herhangi bir odakta 5 mm'den daha büyük boyutta invazyona sahip olmayan.
4. Bu özellikleri ile T2 tümör; eğer ≤4 cm veya büyüklüğü belirlenemiyor ise T2a; eğer >4 cm fakat ≤5 cm ise T2b olarak sınıflandırılır.
5. Akciğer kanseri varlığında plevral efüzyonlar genellikle tümöre bağlı gelişir. Ancak klinik değerlendirme efüzyonun tümöre bağlı olduğunu göstermiyorsa efüzyon klinik evrelemede kullanılmamalıdır.
6. Bölgesel olmayan uzak lenf nodu metastazı da bu gruptadır.

Tablo 3. Evreleme gruplaması

Evre Gruplaması			
Okkült karsinom	TX	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	
Evre IA1	T1a(mi)	N0	M0
Evre IA2	T1a	N0	M0
Evre IA3	T1b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T2b	N0	M0
Evre IIB	T1a,T1b veya T2a	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1a,T1b veya T2a	N2	M0
	T2a veya T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Evre IIIB	T1a,T1b veya T2a	N3	M0
	T2a veya T2b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
Evre IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b
Evre IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

KHAK evrelemesi ilk olarak 1950 yıllarında “theVeterans Administration Lung Study Group (VALSG)” tarafından “sınırlı evre” ve “yaygın evre” olarak iki ana gruba ayrılmıştır. Tek bir hemitoraksa sınırlı ipsilateral supraklavikuler lenf nodu metastazı dışında ekstratorasik metastazı olmayan ve primer tümör ile tek radyolojik alana girebilenler “sınırlı evre” olarak, bunun ötesindekiler ise “yaygın evre” olarak tanımlanmıştır.^{43,44}

2.1.7. Tedavi

2.1.7.1. KHAK’de Tedavi

Sınırlı evre KHAK hastalarında esas tedavi kemoterapi ve radyoterapi kombinasyonudur. Radyoterapi konusunda bir çok randomize çalışma yapılmış olup kemoterapi alan hastaların incelendiği kapsamlı bir araştırmada radyoterapi tedavisi alan hastalarda 2 yıllık sağ kalımda %5.4’lük artış olduğu gösterildi.⁴⁵ 1980’li yıllarda preklinik modellerde sinerjistik bir etki gösteren sisplatin ve etoposid kombinasyonu (EP rejimi) KHAK tedavisinde giderek daha fazla kullanılmaya başlandı.⁴⁶ Geçen sürede

ve çalışmalara bağı olarak EP rejimi KHAK tedavisinde en sık kullanılan kemoterapi rejimi haline geldi ve birinci seri tedavide siklofosamid, Doksorubisin, Vinkristin kombinasyonunun (CAVi rejimi) yerini aldı.^{46,47}

Yaygın evre KHAK hastalarında standart tedavi kemoterapidir ve tedavi palyatif amaçla verilmektedir.⁴⁸ Bu hastalarda en sık kullanılan rejimler EP rejimi veya sisplatin uygun olmayan hastalarda karboplatin ve etoposid kombinasyonu, CAVi rejimi ve monoterapi topotekandır.⁴⁹

2.1.7.2. KHD AK'de Tedavi

KHD AK'de tedavi evreye göre değişmekte olup Evre I ve II KHD AK'li vakalar mümkün olduğunca komplet cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilmelidir. Postoperatif adjuvan kemoterapi, patolojik evre II hastalığı olan hastalarda sağkalımı artırır ve evre IB hastalığı olanlarda da tedavide rol oynayabilir Evre I veya II olup cerrahi rezeksiyona uygun olmayan ya da cerrahi reddeden hastalara cerrahi olmayan lokal tedaviler uygulanabilir. Sterotaktik teknikler veya konvansiyonel yöntemlerle radyoterapi uygulanabilir. Radyofrekans ablasyon ve kriyoablasyon radyoterapiye alternatif yöntemlerdir. Fotodinamik tedavi de süperfisiyal hava yolu lezyonu olup seçilmiş hastalarda primer tedavi modalitesi olarak kullanılabilir. Patolojik olarak evre III hastalığı olduğu kanıtlanmış vakalarda kombine eşzamanlı kemoradyoterapi kullanımı, definitif tedaviye daha üstündür ve immünoterapi ile birlikte daha çok tercih edilmektedir. Kemoradyoterapi sonrası cerrahi ile ilgili aktif çalışmalar devam etmektedir.¹⁶

Klinik evresi I-II olup cerrahi sonrası patolojik evresi IIIA olarak saptanan hastalarda adjuvan kemoterapi sağkalımı artırmaktadır. Evre IV hastalara genellikle sistemik veya palyatif tedaviler uygulanır. Seçilmiş hastalarda kemoterapi ve immünoterapi hayat kalitesini düşürmeden sağkalımı uzatmaya yarayabilir. Bu durumda tümörün mutasyon durumu değerlendirilmeli ve buna yönelik tedaviler verilmelidir. Radyoterapi ve cerrahi bazı hastalarda semptom palyasyonu için kullanılabilir. Evre IV olup izole metastazları olan (beyin, adrenal vb.) hastalarda primer tümörün agresif tedavisi yapılırken metastazında rezeksiyonu fayda sağlayabilmektedir.¹⁶

KHD AK'nin moleküler patogenezinin anlaşılmasındaki hızlı gelişmeler, KHD AK'nin heterojen bir hastalık grubu olduğunu göstermiştir. Lokalize hastalığın ilk

tedavisi aynı olmasına rağmen, KHDAK'lı hastalarda tümör dokusunun moleküler karakterizasyonu, hem metastatik hastalık ile başvuranlarda hem de primer tedaviden sonra nüks edenlerde tedaviye kılavuzluk eder. Halihazırda spesifik hedefli tedavilerin standart tedavi olduğu KHDAK alt tipleri, epidermal growth faktör reseptör (EGFR) mutasyonu olanlar, B-Raf proto-onkogen (BRAF) mutasyonu olanlar, ekinoderm mikrotübül ilişkili protein benzeri 4 (EML4)- anaplastik lenfoma kinaz (ALK) füzyon onkogeni olanlar ve c-ROS onkogen 1 (ROS1) füzyonu olanlardır. Tanımlanmış diğer driver mutasyonlar da mevcuttur ve spesifik tedaviler geliştirilme aşamasındadır. Programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1) ekspresyonunun gözlendiği driver mutasyonun olmadığı vakalar için birinci basamak tedavi olarak immünoterapi kullanılabilir. Düşük PD-L1 ekspresyonunun gözlendiği vakalar için immünoterapi ve kemoterapi kombinasyonları mevcuttur.¹⁶ Özellikle metastatik hastaların sağkalımına ciddi etkisi olması ve yan etki profilinin az olması nedeni ile çalışmalar hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hedefe yönelik tedavi ihtiyacının artması nedeniyle akciğer kanserinin patofizyolojisinin aydınlatılması kanser oluşum ve progresyon süreçlerinin moleküler düzeyde anlaşılması önem kazanmaktadır.

2.2. Tümör Mikroçevresi

2.2.1. Kanser Kök Hücreleri

Tümör mikroçevresi, yetişkin kök hücreleri, kanser kök hücreleri ve stromal hücreler dahil olmak üzere birçok hücre tipinden oluşur. Kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler dahil olmak üzere, kendini yenileyebilen ve dokuya özgü hücreler haline gelmesi için uyarılabilen uzmanlaşmamış hücreler olarak karakterize edilir.^{2,3} Kanser kök hücreleri şu anda kendini yenileme, proliferasyon, tümör başlatma ve yayılma özelliklerine sahip kanser hücreleri olarak tanımlanmaktadır. Son çalışmalar, kanser kök hücrelerinin tümör metastazı^{4,5} ve terapötik direnç^{6,7} ile bağlantısını göstermiştir.

Zorlu bir şekilde, geleneksel kanser tedavileri, tümörün büyük kısmını hedefler ve yüksek dirençli yapıları nedeniyle kanser kök hücreleri (CSC) hedefleyemez, bu da metastaz ve tümör nüksetmesine yol açar. Kanserler büyük olasılıkla cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilerle erken aşamada teşhis edildiklerinde tedavi edilebilirler. Bununla birlikte, birçok kanser, kanserin ilerleyici

hale geldiği ve diğer organlara metastaz yaptığı daha sonraki bir aşamada da teşhis edilir. Kanser erken evrede teşhis edilip tedavi edilse bile, bazı kalıntı hücreler hala kalır ve bir süre sonra tümör nüksetmesine neden olabilir ve kanser sıklıkla daha agresif hale gelir ve bu da metastaza yol açar. Artan kanıtlar, terapötik direnç neden olmaktan sorumlu olan kanser ilerlemesinin herhangi bir aşamasında bulunabilen bu kalıntı hücrelerin, kanser kök hücreleri olarak bilinen kök benzeri özelliklere / fonksiyonlara sahip olduğunu ima etmektedir. Bu nedenle, bu hücre popülasyonu, etkili terapi gibi görünen ve tümör saldırganlığına yol açan şeylerden sonra bile, tümörün devam ettirilmesinde tümör kütlesi içindeki kritik alt kümeyi temsil eder. CSC'ler, tümörün büyük kısmını oluşturan heterojen, farklılaşmış kanser hücrelerine yol açan kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği de dahil olmak üzere normal kök hücrelerle benzer özellikleri paylaşır. Bu benzerlik nedeniyle, CSC'ler yaygın olarak, CD133, CD44, CD90 ve yan popülasyon hücreleri gibi kök hücrelerle ilişkili yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile karakterize edilir ve bunlar tarafından zenginleştirilmiş ve in vitro ve in vivo olarak izole edilebilir.^{50,51}

Promin-1 olarak da bilinen hücre yüzey belirteci CD133, lösemi, akciğer kanseri, kolon kanseri ve beyin kanseri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde bir CSC belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.⁵²⁻⁵⁷ Ayrıca, yukarıda bahsedilen kanserlerdeki prognostik ve klinikopatolojik değerleri geniş çapta çalışılmıştır.^{54,58-60} Bugüne kadar, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserisi ile ilgili olarak CD133 ile prognostik değer arasındaki korelasyon hakkında tartışmalar mevcuttur.^{61,62} Bazı çalışmalar, CD133'ün yüksek ekspresyonunun olumsuz prognozla korele olduğunu bildirmiştir,^{58,61} ancak başka çalışmalar tarafından tam tersi sonuçlar elde edilmiştir.^{63,64}

ALDH1, hücre içi aldehitleri oksitleyen ve böylece erken kök hücre farklılaşması sırasında retinolün retinoik aside oksidasyonunu destekleyen bir sitozolik izoenzim ailesidir.⁶⁵ Buna karşılık, majör mitokondriyal izozim ALDH2 ve mide sitozolik enzimi ALDH3'ün böyle bir aktivitesi yoktur.⁶⁶ ALDH1 ailesi, kanserlerin başlaması ve ilerlemesinde çok önemli düzenleyici roller oynayan altı enzimden oluşur.⁶⁵ ALDH1A1, etanolden türetilen reaktif aldehitlerin metabolizmasında önemli bir rol oynar. Etanol türevli reaktif aldehitler, kök hücre hasarını destekleyebilir. ALDH1A1, reaktif asetaldehitin metabolizasyonundaki rolü nedeniyle kök hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese edilir ve kök hücre fonksiyonunu düzenler.⁶⁶ ALDH1A1 aktivitesi multipl

miyelom, akut miyeloid lösemi ve beyin ve meme kanserlerinde kök hücre popülasyonlarında arttığından,⁶⁷⁻⁷¹ malign kök hücre popülasyonlarının bir belirtici olabilir.⁷² ALDH1A1 aktivitesi, malign epitelyal tümörlerdeki ve kanser hücre dizilerindeki kök hücre popülasyonlarında da artar; bu konudaki çalışmalar genellikle akciğer kanseri, kolorektal kanser ve meme kanserine odaklanmıştır.⁷³⁻⁷⁵ Bununla birlikte, ALDH1A1 ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki tartışmalıdır.⁷⁵⁻⁷⁹

2.2.2. Kanser Kök Hücrelerinin Tümör Progresyonuna Etkileri

2.2.2.1. Tümör Başlangıcında Kanser Kök Hücreleri

Normal fizyolojik koşullar altında, normal kök hücreler genellikle özel bir niş tarafından sürdürülen hareketsiz bir durumda bulunur. Sadece uyarıcı bir sinyal alındığında, kök hücreler bölünmek ve çoğalmak için aktive olurlar. Kök hücrelerin büyüme sinyallerinden bağımsız hale gelmesine veya büyüme karşıtı sinyallere direnmesine neden olan herhangi bir genetik mutasyon, kök hücrelerin kontrolsüz çoğalma ve olası tümör oluşumuna uğramasına neden olacaktır.⁸⁰ CSC'nin kanser başlatıcısındaki rollerine ilişkin doğrudan kanıtlar, kök hücre belirteçlerinin pozitif ekspresyonu ile karakterize edilen izole Csc'lerin, çok düşük sayılarda bile immün yetmezlikli farede ebeveyn tümörünü yeniden doldurma kapasitesini gösteren birçok çalışmadan elde edilirken, negatif, CSC olmayan karşı kısımları benzer tümörijenite oluşturmadığını gösterdi.⁸¹ Dick grubu tarafından 1994 yılında yapılan çalışmalar, akut miyelojenöz lösemi (AML) hastalarında bulunan lösemi başlatan kök hücrelerin, ciddi kombine immün yetmezlikli (SCID) farelere nakledildiğinde AML'yi indükleyebileceğini göstermiştir.⁸²

2.2.2.2. Metastazda Kanser Kök Hücreleri

Metastaz, birincil tümör bölgesinden uzak bir organ veya dokularda ikincil tümör büyümesinin gelişmesidir ve kansere bağlı ölümlerin %90'dan fazla nedeninden sorumludur.⁸³ Dirençli yapıları nedeniyle, CSC'ler bu nedenle doğal olarak metastaz yapma yeteneğine sahiptir; bu popülasyon metastatik CSC olarak bilinir.⁸³⁻⁸⁵ Metastaza bağlı kötü prognozu öngören primer tümörün moleküler imzaları birçok tümör tipinde tanımlanmıştır, bu da metastatik gen imzalarının primer tümörlerdeki kanser hücreleri

arasında paylaşılan bir özellik olduğunu düşündürür.⁸⁶⁻⁸⁹ Gerçekten de, primer tümördeki kök benzeri gen ekspresyonu imzalarının, metastaz ve hayatta kalma sonuçları ile korele olduğu gösterilmiştir, bu da bu metastatik hücrelerin CSC kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

2.2.2.3. İlaç Direncinde Kanser Kök Hücreleri

Tümör nüksü, kanser hastalarının yönetimi için en büyük zorluk olmaya devam ediyor, çünkü buna sıklıkla daha agresif kanserler ve metastaz eşlik ediyor. Kemoterapi, ana tedavi yöntemlerinden biri olmaya devam etmektedir; bununla birlikte, etkinlik kemorezistans ile sınırlıdır.⁹⁰ Hücrelerin terapötik baskıları takiben kaldığı varsayımı, tedaviye yanıt vermeyen hücrelerin varlığını düşündürür, bu sayede kalıntı hücreler, tümörün nüksetmesine ve metastaza neden olan kök benzeri özelliklerle zenginleştirilir ve bu da CSC'nin rolünü düşündürür.⁹¹⁻⁹³ CSC'lerin varlığı, kemorezistansın dahil edildiği mekanizma olarak tanımlanmıştır, ancak birçok paralelliğin de yukarıda bahsedilen mekanizmalarla ilişkili olduğu bulunmuştur. Örneğin, CSC'ler, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinlerin yüksek ekspresyonu,⁹⁴⁻⁹⁶ arttırılmış aldehit dehidrojenaz (ALDH) aktivitesi,⁹⁷ anti-apoptotik proteinlerin artmış ekspresyonu nedeniyle geleneksel kemoterapilere doğal olarak dirençlidir. Bcl-2 ve Bcl-XL,⁹⁸ CHK1 ve CHK2⁹⁹ gibi DNA hasar kontrol noktalarının aktivasyonu ve hayatta kalma yanlısı sinyal moleküllerinin,^{4,100} aktivasyonu ile DNA hasar onarımını güçlendirdi. Bunlar, kök özelliklerinin kazanılmasının kanserde dirençli veya tepkisiz özelliklerle güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.

2.2.3.Kanser Kök Hücreleri ve Eksozom Sinyalizasyonu

Kanser kök hücrelerinin mikro çevre ile etkileşiminin, kanser ilerlemesi için kritik olduğu kanıtlanmıştır 101, 102 . Kanser kök hücrelerinin çevresindeki hücrelerle nasıl etkileşime girdiğine dair hücresel ve moleküler mekanizmalar böylece tümör anjiyogenezini ve metastazını daha da açıklığa kavuşturmaya devam ederken, mevcut literatür hücre dışı olduğunu gösteren kanıtlar sağlamıştır. Mikroveziküller, özellikle eksozomlar, kanser kök hücreleri, yetişkin kök hücreleri ve çevreleyen kanser hücreleri veya stromal hücreler arasında transfer edilir. Kanser kök hücrelerinin mikrovezikülleri ve eksozomları, çevreleyen stromal hücrelerle etkileşime giren mikroçevrelerine

gizledikleri düşünülmektedir.¹⁰³ Doğrudan kanıtlar, meme kanseri kök hücrelerinin, kanser hücresi kaynaklı eksozomların özelliklerine sahip eksozomlar salgıladığını göstermiştir.¹⁰⁴ Prostat ve meme kanseri kök hücrelerinden salınan eksozomların moleküler analizi, bu eksozomlarda CD9, CD63, CD81, Alix ve TSG101 gibi birkaç eksozom markerinin varlığını göstermesine rağmen, kanser kök hücre eksozomlarının benzersiz bir özelliği tarif edilmemiştir.¹⁰⁴ Son yıllarda kanser kök hücreleri tarafından salınan eksozomların farklı model sistemlerde kanser ilerlemesine aracılık ettiğini gösteren daha fazla kanıt sağlanmıştır. Bir böbrek kanseri modelinde, insan böbrek kanseri kök hücrelerinden salınan mikro-taneciklerin akciğerlerde anjiyogenezi ve premetastatik bir niş oluşumunu uyardığı bildirilmiştir.¹⁰⁵ Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, kanser kök hücrelerinin, çevre hücrelerle etkileşen ve böylece kanser ilerlemesine aracılık eden eksozomları salgıladığını açıkça göstermektedir. Eksozomlar yoluyla kanser kök hücrelerinin çevredeki hücrelerle etkileşiminin tek taraflı olmadığı, yetişkin kök hücrelerin eksozom salgıladığını ve kanseri teşvik eden faktörleri çevreleyen hücrelere aktarabildiğini,¹⁰⁶ yine kanser hücreleri ve stromal hücrelerin de kanser kök hücreleri tarafından alınan eksozomları salgıladığı¹⁰⁷ çalışmalar ile gösterilmiştir.

2.3. Eksozom Nedir

Eksozomlar koyun retikülosit olgunlaşması sürecinde ilk defa bildirilmiş olup çapı 40 ila 100 nm arasında değişmektedir. Kriyo-elektron mikroskobu ile karakteristik fincan şeklinde bir morfoloji (negatif boyamadan sonra) veya yuvarlak, iyi sınırlanmış veziküllerdir şeklinde görülürler.^{8,108} Eksozomlar; retikülositler,⁸ dendritik hücreler,⁹ lenfositler^{10,11} ve kanser hücreleri¹² gibi birçok hücre tipi tarafından salınabilen küçük endozom vezikülleridir. Dahası, eksozomlar kan, idrar, plevral efüzyonlar, asitler ve bronkoalveolar sıvı gibi birçok vücut sıvısından başarıyla saflaştırılmıştır.¹³ Normal insan kanında, kanser hastalarının kanındaki 4000 trilyon eksozomlara karşı yaklaşık 2000 trilyon eksozomun tespit edilebildiği bildirilmiştir.¹⁴ ki bu, tümör hücrelerinin normal muadillerinden daha fazla eksozom ürettiğini ve yararlı bir teşhis biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.¹⁵ Eksozomlar, DNA, RNA ve proteinler dahil bilgiyi, plazma membranı ile füzyon, fagositik mekanizmayla endositoz veya hücre ile reseptör-ligand etkileşimi yoluyla reseptör hücrelerine

aktarabilir¹⁰⁹ ve eksozomlar farklı hücre statüsüne sahip farklı sekretuar hücre tipleri nedeniyle heterojen biyolojik davranışlara sahip olabilirler.¹¹⁰

2.3.1. Tümör Kaynaklı Eksozomların Roller

Akciğer kanseri oluşumu ve gelişimi, uzun vadeli ve karmaşık bir süreç olan birçok faktör ve mekanizmadan etkilenir. Akciğer kanseri hücreleri tarafından salgılanan eksozomlar, hücreler arası iletişimin aracıları olarak bu süreçte hayati bir rol oynar.

Anjiyogenez, tümör büyümesi için hayati öneme sahiptir çünkü tümör damarları, tümör hücrelerindeki önemli besin maddeleri kaynaklarıdır.¹¹¹ Tümör kaynaklı eksozomlar, fibroblastları tümörü teşvik eden stromal miyofibroblastlara farklılaşmak üzere uyarmak için Transforming Growth Factor Beta 1(TGFβ1) bağımlı bir yolda anjiyogenezi ve tümör büyümesini hızlandırabilir.¹¹²

Diğer yandan eksozomlar, tümör hücrelerinin invazivliğini arttırmak için akciğer kanseri mikro ortamının oluşumunu teşvik edebilir.¹¹³ Onkojenlerin kararsızlığı nedeniyle, hipoksi, asidoz ve inflamatuvar immün yanıt, tümör hücrelerinin tümör mikroçevresini oluşturmak için daha fazla eksozom salmasını teşvik edebilir,^{114,115} bu da tümör hücrelerinin hızlı büyümesine yardımcı olur ve invazyon yeteneklerini artırır. Tümör kaynaklı eksozomlar, hücre dışı matriksin degradasyonu yoluyla invazyonu başlatan invadopodia ile de ilişkilidir.¹¹⁶ Bu yolla eksozomlar tümör invazyonunda rol oynarlar.

Eksozomal içerikler metastazı teşvik edebilir ve metastatik potansiyeli alıcı hücelere aktarabilirler.¹¹⁷ Tümörden türetilen eksozomların, gelecekteki metastaz bölgesinde oluşan ve dissemine tümör hücrelerinin büyümesini teşvik eden¹¹⁸ pre-metastatik niş oluşumu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Tümör kaynaklı eksozomların ilişkili olduğu diğer bir konu ilaca karşı gelişen direnç mekanizmalarıdır. Eksozomlar ilişkili doku faktörleri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve Transforming Growth Factor Beta 2 (TGF2β) ederek epitelyal mezenkimal transisyona (EMT) aracılık eder ve bu sayede tümör hücreleri apoptoza direnebilir ve bu da genellikle ilaç direnci ile sonuçlanır.^{119,120} Tümör mikro ortamındaki tümör hücreleri ve stromal hücreler, ilaca dirençli moleküller (miRNA'lar, proteinler) taşıyan eksozomlar salgılayabilir bu moleküller tümör mikroçevresinde

(TME) eksozomların etkileşimi yoluyla tümör hücrelerinin ilaca toleransını arttırmak için transfer edilir.¹²¹⁻¹²³ Birçok malign tümörün gelişiminde, ilacı intrasellülerden ekstrasellülere yönlendirmek için MDR (multi drug resistance) ile ilişkili ATP-bağlayıcı kaset transporter (MDR-ABC) olan özel bir transporter sistemi aktive edilir.¹²⁴ MDR-ABC, aynı transmembran alanına sahip olan ve genellikle eksozomların ve multiveziküler bodylerin (MVB'ler) membranında bulunan bir hücre içi taşıyıcı protein türüdür. Kemoterapötik veya hedefe yönelik tedavi ilaçlar ve hücredeki metabolitler, MVB'ler oluşturmak üzere bir araya gelerek iç gövdeye aktarılabilir. MVB'ler hücre zarı ile kaynaştığında, iç gövde eksozomlar şeklinde hücre dışı matrikse salınır ve ilaç akışını tamamlar böylece ilaç etkinliğini etkileyebilir.¹²⁵⁻¹²⁹

Giderek artan bir şekilde, çalışmalar eksozomal miRNA'ların ve proteinlerin tümör progresyonunun evresi ve derecesi ile pozitif bir şekilde ilişkili olduğunu ileri sürmektedir.¹³⁰ Liu ve ark. akciğer adenokarsinom hastalarında ve sağlıklı kontrollerde 84 plazma eksozomal miRNA'yı analiz ederek, artmış eksozomal miR-10b-5p, miR-23b-3p ve miR-21-5p düzeylerinin kötü genel sağkalımla(OS) ilişkili olduğunu bulmuşlardır.¹³¹ Bunların tümü, eksozomların invaziv olmayan prognostik biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bir başka çalışmada, Sandfeld-Paulsen ve ark. Ekstraselüler Vezikül dizisi (extraselüler vesicle array) kullanılarak fenotiplendirilen 276 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastasının plazmasından eksozomları araştırdı. Sonuç olarak, NY-ESO-1, PLAP, EGFR, Alix ve EpCam'in genel hayatta kalma (OS) ile ilişkili olduğunu buldular; bu, eksozomal membrana bağlı proteinlerin KHDAK'de güçlü prognostik biyobelirteçler olduğunu gösterdi.¹³²

Yine çalışmalar eksozomların akciğer kanseri teşhisi için biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini gösterdi. Örneğin, Birgitte ve ark. KHDAK dokularındaki ve normal dokulardaki eksozomal proteinleri saptamak için EV dizisini (extraselüler vesicle array) kullandı ve CD151, CD171 ve tetraspanin 8 belirteçlerinin tüm histolojik alt tiplerde kanserli hastalarda kansersiz hastalara göre daha yüksek olduğunu buldu.¹³³

Tümör kaynaklı eksozomlar, kanser teşhisinde progresyon tahmininde biyobelirteç olarak kullanılmanın yanında ilaç direncini tahmin etmede de biyobelirteç olarak kullanılabileceği çalışmalarla gösterildi. T790 M mutasyonu, EGFR-TKI'ler ile tedavi edilen hastalarda¹³⁴ bulunur ve erlotinib veya gefitinibe karşı kazanılmış direncin

yaklaşık% 50-60'ını oluşturur.^{134,135} Osimertib'i içeren üçüncü nesil EGFR-TKI'ler, EGFR-TKI'lere karşı T790 M aracılı direncin üstesinden gelir, ancak yine de hedefe yönelik tedavi ilaç direncinden kaçamaz ve bazı hastalarda yeni bir ilaç direnci mutasyonu C797S¹³⁶ gelişir. Eksozomal RNA'nın EGFR T790 M'yi saptamak ve EGFR mutasyonlarını aktive etmek için kullanıldığı ve duyarlılığın sırasıyla % 90 ve % 98 olduğu bildirilmiştir.¹³⁷ Bu nedenle, tümör kaynaklı eksozomlarda hedefe yönelik tedavilerde ilaç direncini belirlemek mümkündür.

Tüm bu bilgiler tümör oluşumu, tespiti, tedavi ve takip süreçlerinin tamamında rol oynayan eksozomların çok yönlü doğasını KHAK ve KHDAK'nin tedavisinde potansiyel değerini ortaya koymaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda CSC'lerden salınan eksozomların DNA fragmanları içerdiğini gösterildi. Bu sonuç, CSC'lerden salınan eksozomların, tümör oluşumunu, ilerlemesini ve metastatik özelliklerini anlamaya yardımcı olabilecek birkaç hücrel bilgi taşıdığını göstermektedir.¹⁰⁴

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Genel Özellikleri

Çalışmamız Aralık 2019- Mart 2021 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs hastalıkları bilim dalında yapıldı. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi girişimsel olmayan etik kurulundan 102/34 sayılı kurul kararı ile izin alınarak katılan hastalardan aydınlatılmış yazılı onamları alındı ve araştırma bütçesi için Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine başvuruldu ve çalışmamız TTU-2020-13200 proje kodu ile desteklendi. Araştırmanın laboratuvar ayağı, Çukurova Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı (ÇÜMERLAB) bünyesinde yer alan Göğüs Hastalıkları Moleküler Araştırma Laboratuvarında yürütüldü.

3.2. Araştırmaya Alınan Hasta Özellikleri

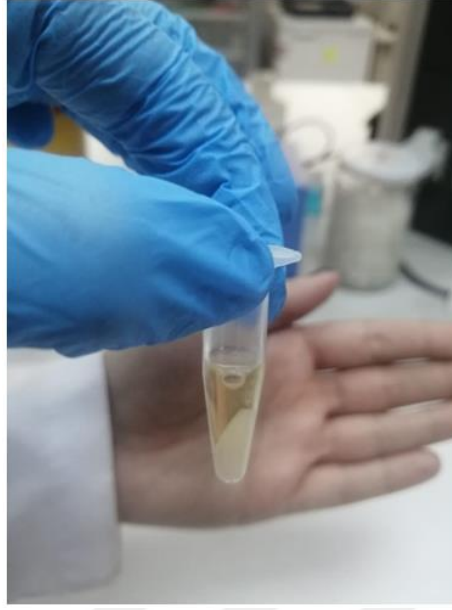
Araştırmaya, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalına başvurmuş, daha önce histopatolojik olarak malignite tanısı bulunmayan ve akciğer kanseri şüphesi ile fiberoptik bronkoskopi (FOB) veya torosentez yapılan ve araştırmaya dahil olmak için onam veren hastalar, hasta veri formu doldurularak dahil edildi. Hastaların tanısı kesinleştikten sonra histopatolojik tanılarına göre küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve kontrol grubu olarak 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu hastaları akciğer kanseri ön tanısı ile bronkoskopi yapılmış fakat malignite dışı tanı almış hastalar (tbc, sarkoidoz atalektazi vs.) olarak belirlendi. Radyolojik görüntülemelerle yüksek olasılıklı akciğer kanseri düşünülen fakat histopatolojik tanısı konulamayan veya başka bir malignitenin akciğer metastazı şeklinde tanı alan hastalar gruplar arası istatistiklerde çalışma dışı bırakıldı. Hastaların yaş, cinsiyet, sigara içme durumları komorbiditeler gibi demografik verilerinin yanısıra laboratuvar verileri, tümör patolojileri ve tümör evreleri de hasta veri kayıt formuna kaydedildi. Hastaların 6 ay boyunca tedavi, prognoz ve sağkalım açısından takipleri yapıldı.

3.3. Materyallerin Toplanması

Akciğer kanseri ön tanısı ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında tetkik edilen ve araştırmaya katılmaya onay veren, başka bir kanser tanısı bulunmayan ve henüz tedavi almamış hastalardan bronkoskopi veya torosentez işlemi öncesi biyokimya tüpüne 5mL kan örneği alındı. Hastaların Lavaj veya plevral mayi örnekleri için jelsiz tüpler kullanıldı. serum, bronş lavaj sıvısı ve plevral sıvı örnekleri alındıktan sonra yaklaşık 30 dakika oda ısısında dikey pozisyonda tutularak hücrelerin çökmesi beklendikten sonra üstte ayrılan serum örnekleri toplamda en geç 1 saat içinde -80 derecede dondurularak saklandı

3.4. Eksozom İzolasyonu ve Validasyonu

Hastalardan elde edilen Serum örnekleri “S” harfi, lavaj örnekleri “L” harfi ile kodlandı. Örneğin 1. Hastanın lavaj örneği 1L olarak kodlandı. Eksozom izolasyonu için serum ve diğer vücut sıvılarından eksozom izolasyon kiti (Machery-Nagel, katalog no:740398), kit protokolüne uygun olarak kullanıldı. Eksozom Presipitasyon Solüsyonu önce çözülmesi için 45°C’ye ısıtıldı kullanma hazır olması için ısıtıldıktan sonra solüsyon oda sıcaklığına soğutuldu. -80’de saklanan serum ve lavaj örnekleri buz üzerinde çözüldükten sonra numaralandırılarak 12.000 xg’de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüjleme ile eksozom dışı maddelerin pelet olarak çöktürülmesi sağlandı ve eksozomlar süpernatantta kaldı. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantların 500 µL’si örnek etiketlemelerine göre etiketlenen mikrosantrifüj tüplerine alındı. Mikrosantrifüj tüplerine 200’er µL Eksozom Precipitation Solüsyonu eklendi ve örneklerin iyice karışmaları için 10’ar saniye vortekslendiler. Ardından örnekler 4°C’de 30 dakika inkübe edildi. Örnekler 800 xg’de 7 dakika santrifüjlendi ve eksozom örnekleri pelet olarak çöktürüldü (Şekil 1). Takibinde üstte kalan sıvı atılarak eksozomlar deneylerin devamında kullanıldı.



Şekil 1. Serumdan elde edilen eksozomların eppendorf tüpündeki görünümü (çöken yapılar eksozom)

3.5. Protein Lizatı Hazırlama ve BCA Yöntemi ile Total Protein Tayini

Eksozomlar izole edildikten sonra eksozom lizisi için serumdan elde edilen eksozomlara 250'şer μL , lavaj peletlerine 100'er μL Ripa Buffer eklendi ve vortekslendi. Buz üzerinde 5'er dakika arayla vortekslenerek 1 saat inkübe edildi. Inkübasyondan sonra tüpler 4°C 'de maximum devirde 20 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantlardan protein konsantrasyonu için 5'er μL alındı ve BCA kitiyle protein konsantrasyonları ölçüldü.

3.6. Likit Kromatografi/Quantitatif Time of Flight-Kitle Spektroskopisi (LC/QTOF-MS) İncelemeleri ile Örneklerde Saptanan Peptidlerin Analizi

Elektromagnetik ışımanın belli bir alanında, örneğin farklı dalga boylarında verdiği etkileşimlerle ilgilenen alana spektroskopi denir. Günümüzde kütle spektrometreleri polipeptitlerin, proteinlerin ve diğer yüksek molekül kütleli biyopolimerlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Kütle spektrometresi, manyetik veya elektriksel alanda hareket eden iyonik yapıları kütle/yük oranlarına göre ayıran spektroskopik bir cihazdır. Modern kütle spektroskopisi, yüksek kütle dağılımı ve doğru analize imkan tanır. LC/MS sistemleri, sıvı kromatografinin fiziksel ayırma gücü ile kütle spektrometresinin kütle analiz gücünün kombinasyonundan oluşmuş

sistemlerdir. LC/QTOF-MS sisteminde, örnek, fiziksel özelliklerine göre ayrılır, iyonlaştırılarak hem quadropol hem de uçuş zamanlı dedektörler ile çok küçük derişimlerdeki örneklerin bile teşhis ve miktar tayini yapılabilir. Proteomik ve metabolomik çalışmalarda kullanılabilmektedir.¹³⁸

Eksozomal protein miktarı yeterli olan örnekler ile LC/QTOF-MS analizlerine devam edildi. Örneklerden elde edilen protein çözeltilerine tripsin eklerek proteinler peptidlere parçalandı. Peptidlere ayırma işleminin ardından örnekler ÇÜMERLAB’da bulunan Agilent marka LC/QTOF-MS cihazı ile tanımlandı.

Eksozom muhtevası 1 gece tripsin ile 37°C’de inkübe edildikten sonra, 1:1 hacim oranında metanol :su karışımında çözülerek Poroshell 120 EC-C18 (3.0X50 mm, parçacık boyutu 2.7 µm) kolon (Agilent Technologies) dan su içerisinde % 0.1 formik asit (A) ve asetronitril içerisinde %0.1 formik asit içeren (B) hareketli fazlar kullanılarak 25 °C’de aşağıdaki zaman aralıklarında toplam 33 dakika süreyle 0.3 mL/dakika akış hızında gradient elüsyon gerçekleştirildi.

- 0–3 dakika, 10% B;
- 3–25 dakika, 100% B;
- 25–28 dakika, 100% B;
- 28– 30 dakika, 10% B

MS analizleri pozitif iyon kullanılarak aşağıdaki koşullarda Agilent 6545 Accurate- Mass QTOF-MS cihazıyla gerçekleştirildi:

- Kurutma gaz akışı: 11.0 L/dk;
- Nebulize etme basıncı: 45 psi;
- Gaz kurutma sıcaklığı: 300 °C;
- Kılıf gaz sıcaklığı: 400 °C;
- Kılıf gaz akışı: 12 L Azot /dk.
- Collision energy 20 V.
- The scan range: m/z 100 to 1600

LC/QTOF-MS sonrası elde edilen ham data PEAKS-STUDIO yazılımı ile biyoinformatik incelemelere alındı. Buna göre her örnekten elde edilen pikler, ISI ve National Center for Biotechnology İnfomafion (NBCI) veritabanlarındaki peptidlerle karşılaştırılarak belirlendi ve yine veritabanı karşılaştırmaları yapılarak olası proteinlerle eşleştirmeleri yapıldı.

Protein eşleştirmelerinde verilen protein isimleri proteinlerin 20 “standart” monomerik birimi olan amino asitlerin tablosuna göre verilmiştir (Tablo 4).¹³⁹ Bu maddelerden proteinler sentezlenir.

Tablo 4. Proteinlerin 20 “standart” monomerik birimi olan amino asitlerin listesi

Amino acid	One-letter symbol ^a
Alanine	A
Arginine	R
Asparagine	N
Aspartic acid	D
Cysteine	C
Glutamic acid	E
Glutamine	Q
Glycine	G
Histidine	H
Isoleucine	I
Leucine	L
Lysine	K
Methionine	M
Phenylalanine	F
Proline	P
Serine	S
Threonine	T
Tryptophan	W
Tyrosine	Y
Valine	V

Tarif edilen yöntemlerde elde edilen peptidlerin yanında saptanan küçük peptidler için yine NCBI Protein Blast programında inceleme yapıldı.¹⁴⁰

Analizlerin son aşamasında elde edilen kanser ve kontrol örneklerin tamamında yine Peaks-Studio programı kullanarak CD133 ve ALDH1A1 proteinlerine ait peptidlerin varlığı araştırıldı. Her iki proteinin aminoasit sekansları UniProt/Swissprot online veri tabanından indirildi ve Peaks-Studio Fasta penceresine aktarıldı. Aktarılan Fasta sekansları aşağıda verilmiştir:

Tablo 5. Fasta sekansları

```
CD133 (Prom 1)
CD133 (PROM-1)
>sp|O43490|PROM1_HUMAN Prominin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROM1 PE=1 SV=1
MALVLGSLLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKAGPIGILFELVH
IFLYVVQPRDFPEDTLRKFLQKAYESKIDYDKPETVILGLKIVYYEAGIILCCVLGLLFI
ILMPLVGYYFFCMCRCCNCKGGEMHQRQKENGPFRLKCFASILLVICIIISIGIFYGFVAN
HQVRTRIKRSRKLADSNFKDLRTLLNETPEQIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGGG
ILDRLRPNIIPVLDEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKS LHQQSTQLSSSLTSVKTSLSRS
SLNDPLCLVHPSSSETCNSIRLSLSQLNSNPELRQLPPVDAELDNVNNVLRDLDGLVQQG
YQSLNDIPDRVQRQTTTTVVAGIKRVLNSIGSDIDNVTQRLPIQDILSAFSVYVNNTESYI
HRNLP TLEEYDSYW WLGLVICSLLTLIVIFYLGLLCGVCGYDRHATPTTRGCVSNTGG
VFLMVGVLGSLFCLWILMIIVLTFVFGANVEKLICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWEY
YLSGKLFNKSKMKLTFEQVYSDCKKNRGTYGTLHLQNSFNISEHLNINEHTGSSISELES
LKVNLNIFLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMNYDSYLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANS
LPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVLPIEQSLSTLYQSVKILQRTGNGLLERVTRILASL
DFAQNFITNNTSSVIEETKKYGRTHGYFEHYLQWIEFSISEKVASCKPVATALD TAVD
VFLCSYIIDPLNLFWFGIGKATVFLPALIFAVKLAKYYRRMDS EDVYDDVETIPMKNME
NGNNGYHKDHVYGIHNPVMTSPSQH

ALDH1A1

ALDH1A1
>sp|P00352|AL1A1_HUMAN Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1
PE=1 SV=2
MSSSGTPDLPVLLTDLKIQYTKIFINNEWHDSVSGKKFPVFNPA TEEELCQVEEGDKEDV
DKAVKAARQAFQIGSPWRTMDASERGRLLYKLADLIERDRLLLATMESMNGGKLYSNAYL
NDLAGCIKTLRYCAGWADKIQGR TIPIDGNFFTYTRHEPIGVCGQIIPWNFPLVMLIWKI
GPALSCGNTVVVKPAEQ TPLTALHVASLIKEAGFP PGVVNIVPGYGP TAGAAISSHMDID
KVAFTGSTEVGKLIKEAAGKSNLKRVTLELGGKSPCIVLADADLDNAVEFAHHGVFYHQG
QCCIAASRIFVEESYDEFVRRSVERAKKYILGNPLTPGVTQGPQIDKEQYDKILDIES
GKKEGAKLECGGGPWGNKGYFVQPTVFSNVTDEMRIA KEEIFGPVQQIMKFKSLDDVIKR
ANNTFYGLSAGVFTKDIDKAITISSALQAGTVWVNCYGVVSAQCPFGGFKMSGNGRELGE
YGFHEYTEVKT VTKISQKNS
```

İnceleme sonunda uyumlu bulunan ve bulunmayan örnekler kaydedildi.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 23.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama, sapma ve minimum - maksimum olarak özetlendi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kullanılarak incelendi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmalarında Ki kare testi ve Fischer'in Kesinlik Testine başvuruldu. Normal dağılıma uyan gruplarda Oneway ANOVA testi, normal dağılıma uymayan gruplarda ise Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Sağkalım analizlerinde Kaplan-Meier analizi ve Log Rank testleri kullanıldı. Mortaliteye etki eden faktörlerin incelenmesinde Çoklu lojistik regresyon analizine başvuruldu. Tüm testlerde istatistiksel önemlilik düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Özellikleri ile İlgili Bulgular

Çalışmaya Aralık 2019 ve Mart 2021 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi'ne başvuran akciğer kanseri ön tanısı ile fiberoptik bronkoskopi veya torosentez yapılan 104 hasta alındı. Hastaların demografik bilgileri ile birlikte tanı sonrası tedavi ve prognoz açısından 6 ay izlem yapıldı. Onam alınarak hastalardan alınan kan, lavaj ve plevral sıvılarda küçük bir popülasyonda tümör kaynaklı eksozomlarda protein izolasyonu yapıldı. Tümör kaynaklı eksozomlardaki kanser kök hücre belirteçlerin terapötik ve prognostik önemi saptanmaya çalışıldı.

Hastalardan 82 (% 78,8)'si erkek, 22 (% 21,2)'si ise kadın idi. Hastaların yaş ortalamaları $64,3 \pm 10,5$ (Med: 66, Min: 33, Maks: 90) yıl iken; kadın ($64,5 \pm 12,5$) ve erkeklerin ($64,2 \pm 9,9$) yaş ortalamalarının benzer olduğu saptandı ($p=0,992$). Hastalardan 59 (% 56,7)'unun sigara kullandığı gözlenirken; 24 tanesinin sigara içme öyküsüne ulaşılamadı. Sigara kullananların ortalama $45,8 \pm 22,7$ paket/yıl sigara tükettikleri belirlendi (Tablo 6).

Tablo 6. Hastaların demografik özelliklerinin incelenmesi

	Frekans (n)	Yüzde (%)
Cinsiyet		
Erkek	82	78,8
Kadın	22	21,2
Sigara kullanımı		
Yok	21	26,3
Var	59	73,7
	Ort$\pm$ss	Med (Min-Maks)
Yaş	$64,3 \pm 10,5$	66 (33-90)
Sigara paket/yıl	$45,8 \pm 22,7$	40 (10-100)
Cinsiyet&Yaş*		
Erkek	$64,2 \pm 9,9$	66 (33-80)
Kadın	$64,5 \pm 12,5$	63,5 (44-90)

* $p=0,992$

Hastaların 64 (% 61,5)'ünde ek hastalık tespit edilirken; ek hastalık gözlenen hastaların 25 (% 39,0)'inde tekil, 39 (% 61,0)'unda ise birden fazla ek hastalık varlığı gözlemlendi. Hastalarda en sık karşılaşılan ek hastalıklar 16 (% 15,4) hastada diabetes mellitus (DM); 23 (% 22,1) hastada hipertansiyon (HT); 18 (% 17,3) hastada kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH); 23 (% 22,1) hastada koroner arter hastalığı

(KAH); 31 (% 29,8) hastada ise diğer ek hastalık varlığı bulgularına rastlanıldı. Çalışmada yer alan hastaların 63 (% 60,6)'ünde komorbiditeler sebebi ile ilaç kullandığı tespit edildi. Hastalardan kan ile birlikte bal veya plevral mayi alındı. Numune şekli hastaların 97 (% 93,3)'sinde bal, 7 (% 6,7)'sinde ise plevral mayi şeklinde idi (Tablo 7).

Tablo 7. Hastaların ek hastalık bulgularının incelenmesi

	Frekans (n)	Yüzde (%)
Ek hastalık		
Yok	40	38,5
Var	64	61,5
Ek hastalık varlığı olanlarda		
Tekil	25	39,0
Birden fazla	39	61,0
DM	16	15,4
HT	23	22,1
KOAH	18	17,3
KAH	23	22,1
Diğer	31	29,8
Numune şekli		
Bal	97	93,3
Plevral mayi	7	6,7

Hastaların işlem öncesi alınan rutin kanlarının laboratuvar bulguları Tablo 8'de özetlendi.

Tablo 8. Hastaların laboratuvar bulgularının incelenmesi

	Ort±ss	Med (Min-Maks)
WBC ¹	9,45±3,7	8,8 (4,2-26)
HB ²	12,5±2,2	12,65 (5-18)
PLT ³	291,8±121,2	267 (22-790)
SEDİM	41,3±21,9	37 (2-83)
CRP ⁴	56,9±76,3	20 (0,3-336)

1: white blood cell, 2: hemoglobin, 3: platelet, 4: C reaktif protein

Çalışmada yer alan hastaların Pet CT bulguları ile değerlendirildiğinde 61 (% 58,7)'inde sağ, 35 (% 33,7)'inde sol hemitoraksta, 8 (% 7,7)'sinde ise bilateral lezyon varlığı gözlendi (Tablo 9). Endobronşial lezyon (EBL) bulgularına hastaların 50 (% 48,1)'sinde rastlanıldı.

Patolojik açıdan hastalar gruplandırıldığında küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak 2 ana grup oluştu. Hastalarımızdan 13 tanesinde radyolojik olarak malignite düşünülmesine rağmen fiberoptik bronkoskopi ile tanı konulamamış, hastalar cerrahiye yönlendirilmiş fakat işlem riski nedeni ile veya

hasta onanı olmaması nedeni ile hastalara histopatolojik olarak malignite tanısı konulamamıştır. Bu süreçte yine akciğer kanseri ön tanısı ile FOB yapılmış fakat başka organ malignitesinin akciğer metastazı tanısı alan hastalarda tanı alamayan hasta grubu içerine dahil edilmiştir. Hastalarımızdan 14 tanesi malignite dışı tanı(tbc sarkoidoz pnömoni vs.) almıştır. Sonuç olarak hastalarımızın 24 (% 23,1)'ünde küçük hücreli AC CA, 53 (% 51,0)'ünde küçük hücreli dışı AC CA, 14 (% 13,5)'ünde CA dışı tanı şeklinde tanı aldıkları gözlenirken; 13 (% 12,5) hastanın tanı almadığı tespit edildi (Tablo 9).

Tablo 9. Hastaların Pet CT taraf, EBL ve patolojik tanı bulgularının incelenmesi

	Frekans (n)	Yüzde (%)
Pet CT Taraf		
Sağ	61	58,7
Sol	35	33,7
Bilateral	8	7,7
EBL		
Yok	54	51,9
Var	50	48,1
Patolojik Tanı		
Tanı almamış	13	12,5
Küçük hücreli AC CA	24	23,1
Küçük hücreli dışı AC CA	53	51,0
CA dışı tanı	14	13,5
	Ort±ss	Med (Min-Maks)
Pet CT (mm)	49,1±28,2	49 (1-146)

Hastalara FOB veya torosentez sonrası tanısal sonuç elde edilemez ise plevra biyopsisi transtorasik tru cut biyopsi (TTTCB), transtorasik ince iğne aspirasyon biyopsisi(TTİAB) ve cerrahi gibi ileri inceleme yöntemleri uygulandı. Ve bu uygulamalarla 77 hastaya akciğer kanseri tanısı konuldu. 77 hastanın 51 tanesine (%66,0) FOB ile tanı konulduğu saptandı. Akciğer kanseri tanısı konulan hastaların evre bulguları incelendiğinde KHDAK hastalarının %31,9'unun, KHAK hastalarının ise %87,5'inin metastatik evrede tanı aldığı görüldü (Tablo 10).

Tablo 10. Akciğer kanseri tanısı konulan hastaların tanı şekli ve evre bulgularının incelenmesi

	Frekans (n)	Yüzde (%)
Tanı şekli		
Cerrahi	18	23,3
FOB	51	66,2
Torosentez	1	1,2
TTTCB	5	6,4
TTİAB	2	2,5
Evre		
KHDAK hastaların evresi		
1A2	2	3,7
1A3	2	3,7
1B	2	3,7
2A	2	3,7
2B	6	11,3
3A	10	18,8
3B	8	15,0
3C	4	7,5
4A	10	18,8
4B	5	9,4
4C	2	3,7
KHAK hastaların evresi		
Sınırlı Evre	3	12,5
Yaygın Evre	21	87,5

Hastaların 11 (% 10,6)'inde Liquid biyopsi (bx) ve immünohistokimya incelemesi yapıldı. Bu 11 hastadan 2 (%18,2)'sinde EML-4/ALK 2P23 translokasyonu bakıldı 1 (%9,1)'inde pozitif sonuç saptanırken 1 (%9,1)'inde negatif sonuç saptandı. Hastaların 9 tanesinde PDL-1 bakılmış olup %10 pozitiflik yakalanan hastanın sonucu dahil 4(%36,4)'ünde negatif sonuç alınırken 5 (%45,5)'inde pozitif sonuç alınmıştır. Liquid biyopsi ve immünohistokimya çalışması için örnek alınan hastalarda gözlenen bulgular Tablo 11'de özetlendi.

Tablo 11. Hastaların driver mutasyon varlığı bulgularının incelenmesi

	Frekans (n)	Yüzde (%)
Liquid bx veya immünohistokimya		
Yok	93	89,4
Var	11	10,6
Driver mutasyon bakılmış olanlarda		
EML-4/ALK 2P23 translokasyonu %2 negatif	1	9,1
EML-4/ALK 2P23 translokasyonu %26 Pozitif	1	9,1
PDL-1 %0 Negatif	3	27,3
PDL-1 %10 Negatif	1	9,1
PDL-1 %100 Pozitif	1	9,1
PDL-1 %80 Pozitif	1	9,1
PDL-1 %94 Pozitif	1	9,1
PDL-1 %40 Pozitif	1	9,1
PDL-1 %85 Pozitif	1	9,1

Çalışmada yer alan hastalardan 76 (% 73,1)'sının sağ olduğu gözlenirken, 28 (% 26,9) hastanın ise ex olduğu tespit edildi (Tablo 12).

Tablo 12. Hastaların mortalite bulgularının incelenmesi

	Frekans (n)	Yüzde (%)
Mortalite		
Ex	28	26,9
Sağ	76	73,1

Hastaların cinsiyet ($p=0,150$), ve yaş bulguları ($p=0,050$) ile gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0,05$). Sigara kullanım sıklığı ise Küçük hücreli AC CA grubunda olan hastalarda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,027$; $p<0,05$) (Tablo 13).

Tablo 13. Hastaların demografik özellikleri ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi

	Küçük Hücreli AC CA (n=24) n(%)	Küçük Hücreli Dışı AC CA (n=53) n(%)	CA Dışı tanı (n=14) n(%)	p
Cinsiyet				
Erkek	19 (79,2)	46 (86,8)	9 (64,3)	0,150
Kadın	5 (20,8)	7 (13,2)	5 (35,7)	
Sigara kullanımı				
Yok	1 (5,6)	8 (21,6)	7 (46,2)	0,027
Var	17 (94,4)	29 (78,4)	7 (53,8)	
Yaş (Ort±ss)	61,6±9,0	65,8±7,7	59,4±16,4	0,050

* $p<0,05$, ki-kare testi

Hastaların ek hastalık ($p=0,874$) bulguları ile gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Ek hastalık bulgusu tespit edilen hastalarda da gruplar arasında bir farklılık gözlenmedi ($p=0,599$). Hastaların DM ($p=0,276$), HT ($p=0,791$), KOAH ($p=0,307$), KAH ($p=0,798$) ve Diğer ($p=0,111$) varlığı bulguları ile gruplar arasında istatistiksel açıdan bir farklılık tespit edilemedi ($p>0,05$) (Tablo 14).

Tablo 14. Hastaların ek hastalık varlığı bulguları ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi

	Küçük Hücreli AC CA (n=24) n(%)	Küçük Hücreli Dışı AC CA (n=53) n(%)	CA Dışı tanı (n=14) n(%)	p
Ek hastalık				
Yok	10 (41,7)	23 (43,4)	5 (35,7)	0,874
Var	14 (58,3)	30 (56,6)	9 (64,3)	

Tablo 14'ün devamı

Ek hastalık varlığı olanlarda				
Tekil	3 (21,4)	11 (36,7)	3 (33,3)	0,599
Birden fazla	11 (78,6)	19 (63,3)	6 (66,7)	
DM	4 (16,7)	6 (11,3)	4 (28,6)	0,276
HT	5 (20,8)	12 (22,6)	2 (14,3)	0,791
KOAH	7 (29,2)	8 (15,1)	2 (14,3)	0,307
KAH	7 (29,2)	12 (22,6)	3 (21,4)	0,798
Diğer	3 (12,5)	14 (26,4)	6 (42,9)	0,111

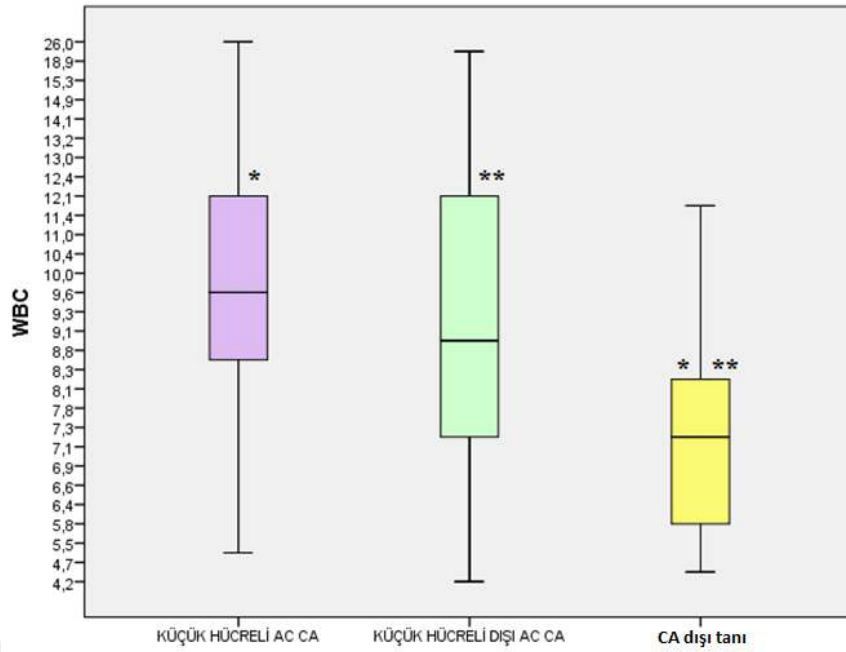
* p<0,05, ki-kare testi

Hastaların HB (p=0,680), PLT (p=0,321), Sedim (p=0,361) ve CRP (p=0,124) değerleri ile gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmezken (p>0,05); WBC değeri ile gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi (p=0,020; p<0,05) (Tablo 11). Gruplar arasındaki farklılığın kaynağını belirlemek amacıyla yapılan Post Hoc Tamhane's T2 testine göre CA dışı tanı grubunda olan hastalarda WBC değeri, küçük hücreli AC CA (p=0,019) ile küçük hücreli dışı AC CA (p=0,018) grubunda yer alan hastalara göre daha düşük olmasından kaynaklandığı gözlemlendi (p<0,05).

Tablo 15. Hastaların laboratuvar bulguları ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi

	Küçük Hücreli AC CA (n=24)	Küçük Hücreli Dışı AC CA (n=53)	CA Dışı tanı (n=14)	p*
WBC ^b	9,7 (5,4-26)	8,95 (4,2-25)	7,2 (4,5-12)	0,020**
HB ^a	12,5±2,9	12,4±1,9	13,0±2,1	0,680
PLT ^b	281 (22-593)	267 (138-790)	240 (153-439)	0,321
SEDİM ^b	26 (11-79)	40,5 (2-83)	29 (2-80)	0,361
CRP ^b	30 (1-225)	26 (1-336)	7,5 (0,3-189)	0,124

* p<0,05, a: Oneway ANOVA, b: Kruskal wallis testi, Post hoc Tamhane's T2



* Küçük hücreli AC CA-CA değil p=0,019; ** Küçük hücreli dışı AC CA-CA değil p=0,018
Şekil 2. Hastaların WBC değerleri ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi

Küçük hücreli AC CA ve küçük hücreli dışı AC CA grubunda olan hastalarda Pet CT’de lezyon varlığının sağ tarafta daha sık gözlemlendiği tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 16)

Tablo 16. Hastaların Pet CT taraf, EBL ve patolojik tanı bulgularının incelenmesi

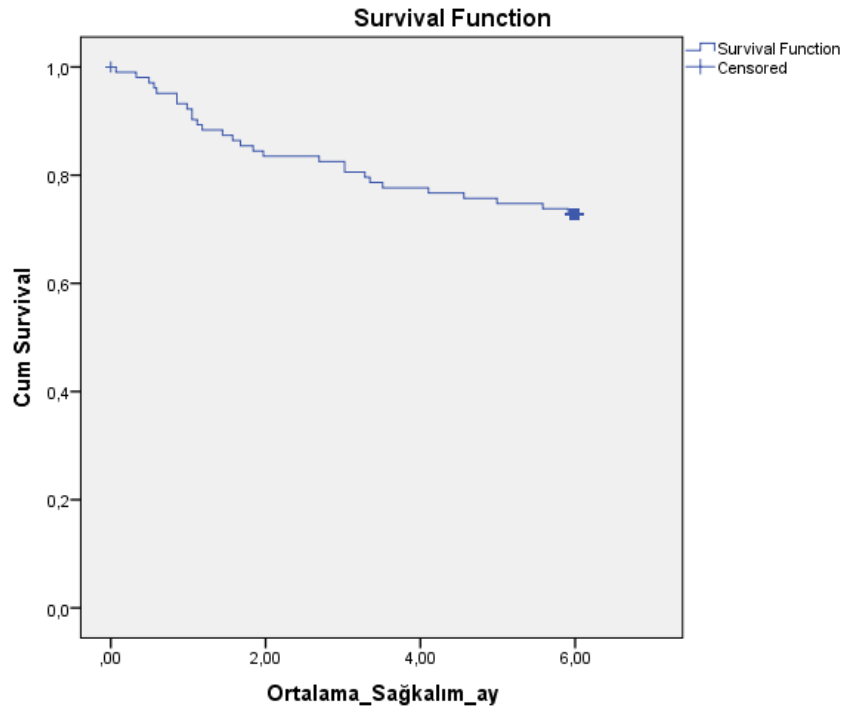
	Küçük Hücreli AC CA (n=24)	Küçük Hücreli Dışı AC CA (n=53)	CA Dışı tanı (n=14)	p
	n(%)	n(%)	n(%)	
Pet CT Taraf				
Sağ	16 (66,7)	32 (60,4)	4 (28,6)	<0,001
Sol	7 (29,2)	21 (39,6)	5 (35,7)	
Bilateral	1 (4,2)	0 (0)	5 (35,7)	

* $p<0,05$, Fisher exact testi

Mortalite sıklığı Küçük hücreli AC CA grupta olan hastalarda, diğer gruplarda yer alan hastalara göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,011$; $p<0,05$) (Tablo 17).

Tablo 17. Hastaların mortalite bulguları ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi

	Küçük Hücreli AC CA (n=24)	Küçük Hücreli Dışı AC CA (n=53)	CA Dışı tanı (n=14)	p
	n(%)	n(%)	n(%)	
Mortalite				
Ex	11 (45,8)	15 (28,3)	0 (0)	0,011**
Sağ	13 (54,2)	38 (71,7)	14 (100)	



Şekil 3. Hastaların ortalama sağkalım bulgularının incelenmesi

6 aylık mortaliteye etki eden faktörler Tablo 14’de incelendi. Yapılan incelemeye göre hastaların sigara kullanımının 2,9 (OR=2,968) kat, EBL varlığının ise 0,2 (OR=0,246) kat mortaliteye etkisi olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 14).

Tablo 18. Mortalite bulgularına etki eden faktörlerin incelenmesi

	B	S.E.	Wald	df	P	Odd Ratio	95% C.I.for EXP(B)	
							En Düşük	En Yüksek
Cinsiyet (1)	0,464	0,701	0,437	1	0,509	1,590	0,402	6,288
Sigara Kullanımı(1)	1,325	0,357	3,568	1	0,031*	2,968	1,025	6,587
Ek hastalık(1)	-0,665	1,015	0,429	1	0,512	,514	0,070	3,760
DM(1)	-0,300	0,907	0,109	1	0,741	,741	0,125	4,381
HT(1)	0,412	0,864	0,227	1	0,634	1,509	0,277	8,212
KOAH(1)	0,898	0,999	0,807	1	0,369	2,454	0,346	17,387
KAH(1)	0,690	0,766	0,811	1	0,368	1,994	0,444	8,953
Diğer(1)	1,303	0,942	1,914	1	0,167	3,681	0,581	23,316
Nunume Şekli(1)	-1,863	1,020	3,336	1	0,068	,155	0,021	1,146
Pet Ct Taraf			1,696	2	0,428			
Pet Ct Taraf(1)	0,139	0,551	0,063	1	0,801	1,149	0,390	3,383
Pet Ct Taraf(2)	1,920	1,474	1,696	1	0,193	6,822	0,379	122,687
EBL(1)	-1,402	0,637	4,843	1	0,028*	0,246	0,071	0,858
Liquidbx1(1)	0,332	0,821	0,164	1	0,686	1,394	0,279	6,966
Onkoloji Tedavi Bulgusu(1)	1,023	0,634	2,607	1	0,106	2,783	0,803	9,637
Sabit	1,782	1,136	2,460	1	0,117	5,943		

a. Variable(s) entered on step 1: Cinsiyet, SigaraKullanımı, Ek hastalık, DM, HT, KOAH, KAH, Diğer, Numune Şekli, Pet Ct Taraf, EBL, Liquidbx1, Onkoloji Tedavi Bulgusu. * $p<0,05$, Çoklu lojistik regresyon testi

4.2. Protein Analiz Sonuçları

Tüm hasta lavaj, plevra ve serum sıvılarından eksozom izole ederek kanser kök hücrelerinin varlığını western blot ile incelemek, artan döviz kurları nedeni ile araştırma bütçesinin sınırları dışına çıktığından incelemelere B planı ile yani kütle spektroskopi yöntemleri ile proteinlerin tayin edilmesi ile devam edildi. Bu deneyler için benzer cinsiyet, yaş ve sigara içme profiline sahip 2 KHDAK, 2 KHAK ve 2 Kanser dışı tanı alan, tamamı sigara içicisi 6 erkek hasta proteomiks incelemelerine dahil edildi, bu örneklerden kanser tanısı alan hastaların tamamında bronkoskopide endobronşial lezyon mevcuttu. 6. Ay kontrollerinde kanser hastalarından sadece 1 tanesi hayatta olup 3 tanesi exitus iken, kontrol hastaların 2'si de hayatta idi (Tablo 19).

Tablo 19. Proteomik incelemesi yapılan hastaların klinik özellikleri

Hasta no	Yaş	Cinsiyet	Sigara kullanımı	Histopatolojik tanı	EBL	6. AY KONTROL
1	70	Erkek	50 paket yıl	KHDAK	Var	yaşıyor
2	52	Erkek	45 paket yıl	KHDAK	Var	exitus
3	75	Erkek	50 paket yıl	KHAK	Var	exitus
4	47	Erkek	30 paket yıl	KHAK	Var	exitus
5	56	Erkek	40paket yıl	CA dışı tanı	Yok	yaşıyor
6	76	Erkek	30 paket yıl	CA dışı tanı	Yok	yaşıyor

Hastaların bronş lavaj ve serum örneklerinden yöntemlerde anlatıldığı şekilde eksozom izolasyonu yapıldı ve eksozomlarda protein miktarı tayini yapıldı. Elde edilen eksozomal protein konsantrasyonları (PK) Tablo 20'de verildi.

Tablo 20. BCA yöntemi ile protein konsantrasyonu ölçüm sonuçları

	1L	1S	2L	2S	3L	3S
	0,117	2,386	1,358	3,316	0,452	1,849
	0,123	2,277	1,311	3,096	0,432	1,699
	0,120	2,332	1,335	3,206	0,442	1,774
	5,714285714	3165	1740,714286	4414,285714	465,7142857	2368,571429
PK	28,57142857	15825	8703,571429	22071,42857	2328,571429	11842,85714
	4L	4S	5L	5S	6L	6S
	0,712	1,694	0,153	2,118	0,161	2,483
	0,168	1,628	0,150	2,156	0,155	2,406
	0,170	1,661	0,152	2,137	0,158	2,445
	77,14285714	2207,142857	50,71428571	2887,142857	60	3326,428571
PK	385,7142857	11035,71429	253,5714286	14435,71429	300	16632,14286

Çalışılan 6 hastanın toplam 12 örneği ile yapılan protein miktar tayini sonucunda 1, 5 ve 6 numaralı hastaların lavaj örneklerinden elde edilen eksozomlarda protein miktarının çok düşük olması nedeni ile kromatografik incelemelere dahil edilemedi.

Yeterli protein konsantrasyonuna sahip 9 örnek ile ileri incelemelere devam edildi (Tablo 21).

Tablo 21. İleri incelemeye alınan örnekler

Hasta örnekler						Kontrol örnekler		
1S	2L	2S	3L	3S	4L	4S	5S	6S

Bu aşamadan sonra çalışılacak protein çözeltilerine tripsin eklerken proteinler tripsin enzimi ile peptidlere parçalandı. Peptidlere ayırma işleminin ardından örnekler ÇÜMERLAB’da bulunan LC/QTOF-MS cihazı ile çalışıldı.

4.3. LC/QTOF-MS İncelemeleri İle Örneklerde Saptanan Peptid Sonuçları

Analizler sonucunda elde peptidler ve ilişkili proteinler, örnekler 2 gruba ayrılarak incelendi. Kanser hasta grubu ve kontrol hasta grubu şeklinde ayrı ayrı değerlendirme yapıldı. Kontrol hasta grubu ile kanser hasta grubu karşılaştırıldığında örneklerde saptanan peptidlerin özellikle lavaj sıvısında ve küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında saptanması dikkati çekmekteydi. Kanser hasta grubunda 19 adet peptid izole edilirken kontrol hastalarında sadece 2 adet peptid tespit edilmişti. Kanser hastalarındaki peptidlerin 2 tanesi KHDAK hastalarının serumuna ait olup geri kalanların tamamı KHAK’li hastaların lavaj sıvılarından izole edilmişti ki bu örneklerin büyük bir oranını kapsıyordu. Örneklerden izole edilen peptidlerin listesi Tablo 22 ve Tablo 23’de özetlendi.

Tablo 22. Kanser hasta grubunun peptid analiz sonuçları

PEPTİD SEKANSI	-10LogP(P-DEĞERİ)	AĞIRLIK	UZUNLUK	MİLYONDAKİ PARÇA SAYISI (PPM)	KÜTLE/YÜK SAYISI(M/Z)	RETANSİYON ZAMANI (RT)	FRAKSİYON	TARAMA	KAYNAK
TYFPHFDLSHGSAQVK	98.97	1832.8845	16	0.4	459.2286	8.25	6	F6:614	4L
VNVDEVGGEALGR	88.70	313.6575	13	-0.8	657.8355	7.44	6	F6:554	4L
LLVVYPWTQR	69.92	1273.7183	10	1.0	637.8671	9.64	6	F6:714	4L
AAWGKVGGAHAGEYGAEALER	57.86	2041.9969	20	3.7	511.5084	7.50	4	F4:554	3L
VVAGVANALAHK	49.71	1148.6665	12	-0.3	575.3403	6.59	6	F6:487	4L
AGEYGAEALER	48.90	1164.5410	11	-0.4	583.2775	6.42	6	F6:480	4L
VDPVNFK	45.67	817.4333	7	-2.3	409.7230	6.59	6	F6:480	4L
LVVYPWTQR	44.46	1160.6342	9	-0.8	581.3239	8.83	6	F6:663	4L
MFLSFPTTK	34.53	1070.5470	9	0.4	536.2810	9.31	4	F4:696	3L
SAVTALWGK	33.19	931.5127	9	-1.4	466.7630	8.46	6	F6:630	4L
LHVDPENFR	32.31	1125.5566	9	-0.3	563.7854	7.10	6	F6:528	4L

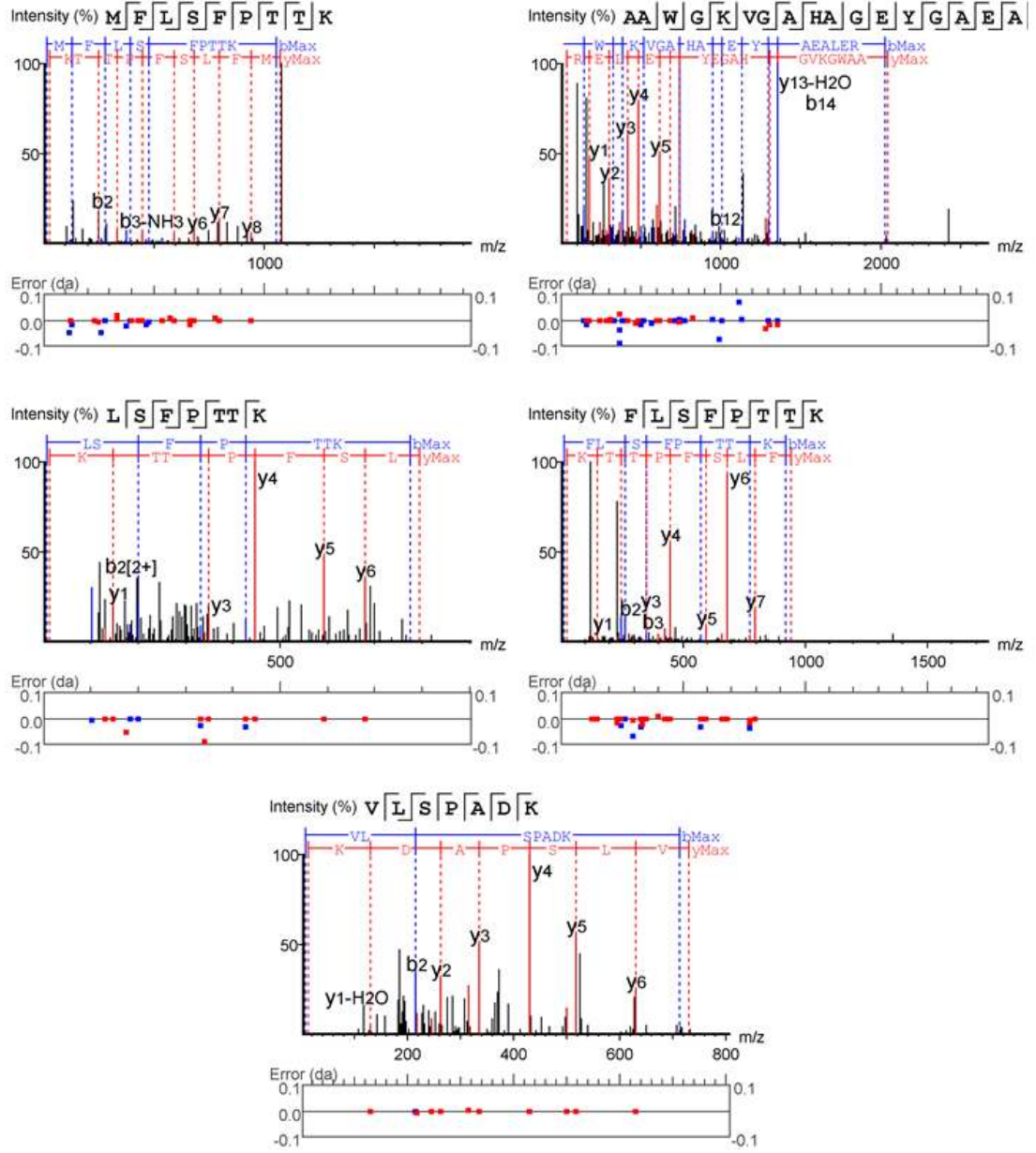
Tablo 22'nin devamı

FLSFPTTK	30.46	939.5065	8	-0.2	470.7604	8.46	4	F4:631	3L
VLSPADK	21.38	728.4068	7	-1.2	365.2102	1.39	4	F4:103	3L
FSAPPSR	18.88	760.3867	7	-11.4	381.1963	8.58	4	F4:638	3L
LSFPTTK	18.26	792.4381	7	1.0	397.2267	7.12	4	F4:526	3L
FVLSCSLLSHQRSHLGPKPF GCDVCGKEFA RGS DLVK	17.09	4017.0176	37	-30.1	503.1194	20.71	3	F3:155 0	2S
GSTPAKPTVEK	16.95	1113.6029	11	43.1	557.8327	9.17	1	F1:680	1S
ILAPYVGG	16.70	788.4432	8	-7.5	395.2259	8.67	6	F6:652	4L
TLRQLTANTGHTIHHVHYPG NR	16.47	2385.2415	21	87.3	1193.7322	11.03	6	F6:882	4L

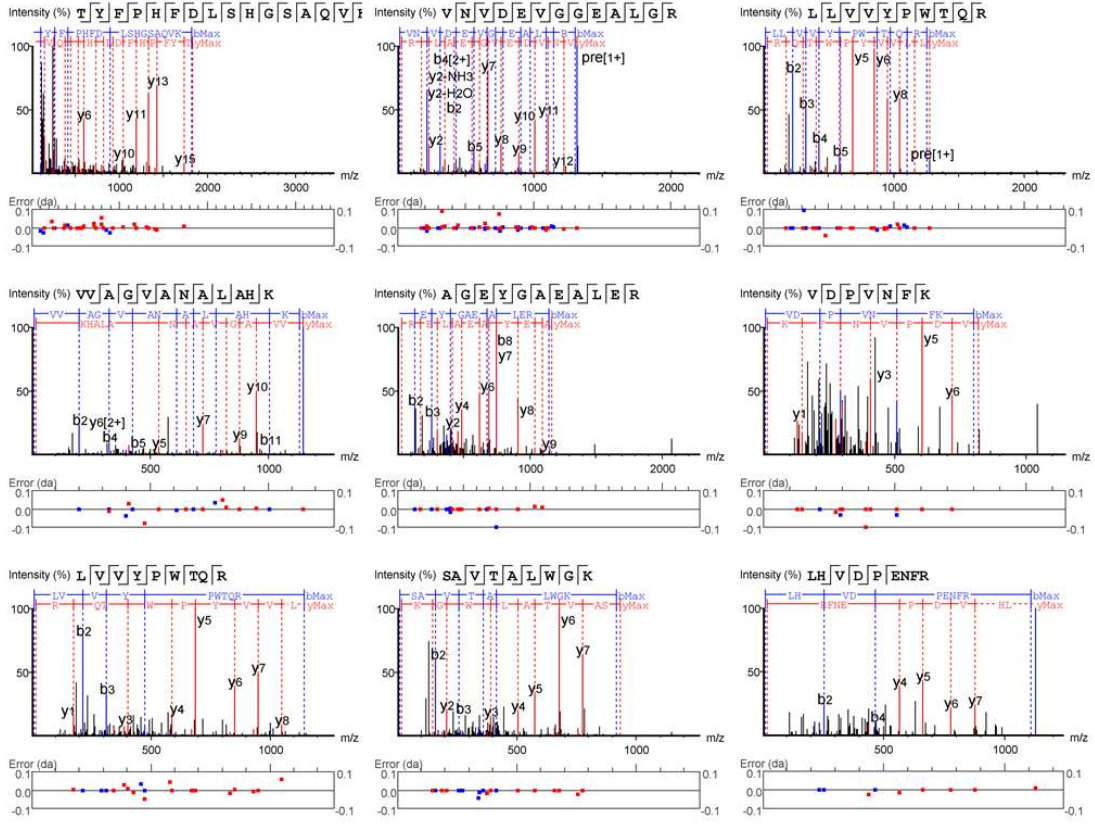
Tablo 23. Kontrol hasta grubunda tespit edilen peptidler

PEPTİD SEKANSI	-10LogP(P- DEĞERİ)	AĞIRLIK	UZUNLUK	MİLYONDAK İ PARÇA SAYISI(PPM)	KÜTLE/YÜK SAYISI(M/Z)	RETANSİYON ZAMANI(RT)	FRAKSİYON	TARAMA	KAYNAK
NFSGGKSGGNK	17.04	1051.5046	11	151.8	526.8394	17.73	5	F5:1316	6S
SGAASQTKGSK	15.87	1021.5200	11	119.4	511.3282	9.32	5	F5:692	6S

Bu peptidlerin hesaplanması sırasında hastaların lavaj örneklerinde Peaks-studio programı ile yapılan doğrulama analizleri yapılmıştır. 4L örneğinden yapılan doğrulama analizi Şekil 4'de 6L örneğine ait doğrulama analizi Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 4. 4L örneğinden elde edilen aminoasit sekanslarının yoğunlukları ve spektroskopik ölçümleri



Şekil 5. 6L örneğinden elde edilen aminoasit sekanslarının yoğunlukları ve spektroskopik ölçümleri

İncelenen örneklerde tablo ve grafiklerde verilen peptidlerin yanı sıra 174 adet küçük peptid saptandı ve bunlar veritabanı incelemelerinde tipik olarak herhangi bir proteini işaret etmeyen “de-novo” peptidler olarak sınıflandı. (Tablo 24). Peptidlerin tamamı kanser hasta grubundan izole edilmişti. Ve yine peptidlerin büyük bir oranının KHAK hastalarının lavaj örneklerinden elde edildiği dikkat çekmekteydi. (Tablo 25). Bu küçük peptidlerin tipik bir proteine ait olmadığı, NCBI Protein Blast programında birden fazla çeşitte proteine ait amino asit sekansına ait olabileceği görüldü. LSFPTTK peptidi için NCBI Protein Blast programında yapılan örnek incelemede bu peptidin ait olabileceği proteinlerin listesi Tablo 26’da özetlendi.

Tablo 24. İncelenen örneklerden elde edilen 174 de-nova peptid listesi

DE-NOVA PEPTİDLER			
VNVDEVGGEALGR	SKELATYRTR	HLVDPQVYR	TSHKSQVVRR
FLSFPTTK	TFPLTFVGR	HVKQPSAAMKVT R	RNNATGARR
VDPVNFK	TSVALLVGR	TSHSKELKSGKK	LPNKHGVGR
LLVVYPDATQR	VMRVPK	HVKKFFKPVTGR	TYSKQPKER
VLSPADK	LPNKVNLVGR	GYDYR	KKSSTFGVGR
AGEYGAEALER	FEATNKRR	LPNKPGR	HVKHLKQVPGGR
TYFPHFDLSHGSAQV K	TLVLALHGRR	TNLGK	LPAGYSLVPGGVR
MFLSFAGGNK	VHKHSHGKVTR	MQPGQVVVGR	ECVKAKALK
FLSFVVTK	HVAVLLATGK	TSNKKTPASPVR	RPAKQPTVTR
NPSADK	LPASKQPGVGR	RHSGPQGSK	APAVK
CLNLLNK	FTSMFPKVTR	GYDYR	LYKAGLALGR
NYGAEALER	LAPNKHTLMR	LPAVFMSR	GSSSRKRR
LSFPVCK	HTMSSSR	AVKAGSAQASPVR	VLLPRVNGTK
SAVTAGELGK	AAPVNPPVGR	HDKKAPKVGR	STHKKANGRR
LVVYPWTQR	TSAQLEVGR	LPASQYK	TSLLPAR
LLVSSRAFPTTR	VTTTKNKRR	VHPLQHLK	TSRTRPKALLTR
HLMGECNRR	WKVLKHGRR	FGRKLGKHVTGR	LMSRVALR
YLHSHKVYVPTTR	TMFLALKRR	SRLTGPKSLR	KHNGKNRKGYR
LSFTPTK	TFVVQFKRR	SGHSHKLGKLPGR	LPASKPDGGGVR
WRAMKKPRTR	LKLASFSSR	TNPPVGR	VHKKRTGPGR
LPALKQSLPGR	LPATLMPPGGR	MKQNKSAK	VSRAFLGPSKNTTK
LWNKPTVEK	HVGVTVHLK	GSSRNSAVRKTVR	MKHGHSKSLR
LPAGNQGGKRR	THVSFVK	QPRSAVHR	HLLAQRPGR
NGHVVR	LPASKHGRR	VVVKSHKHSKGAP GVTR	RPAKVFNK
FRSGWKRR	FGPTKGGAFR	EDVVKRR	TAAWHK
GSHSKKATNRR	SQSAVLVGR	ALPLGHESGK	MCLKSAMLR
LPASKQANGRR	LLK	VYTPKNAK	LPASKQFVKRR
LPNKVHFVR	TNAHLR	HAAPKRPGR	QDAR
LFVALTHAVRKVGR	YLHSHKKTFAVVGR	RPLERSKHMPVR	LPASPPKVGR
YRSSHLELAAGGK	LQGALLVPGR	LTVVLDGR	LLVYNK
TSHSKPPSLR	GYVVYTTALGPK	LPAVAHKHGGVR	APSSAKVGR
TSWVHK	FTSGWKRR	LPASTCMK	EAKRRGGK
FSAVLASVNNR	TPQSQVVSAAFR	LWAVGPAAVTR	LPATNKANGRR
GAKVKSVS	GYCAK	HVKQEHR	GSHKERKVGR
YGSKVVHGAPAAAR	YLSGPHK	LPAFAK	LYKPLKHGRR
ATFSPVVGR	LPKAVPAAMVR	TSHSKPGKVGR	WLNKHPRR
RAVGPPEPNPVR	SSVPLSR	TSSRSPAGPLK	GHVTYGR
QSHTVGR	YLAPNVGR	EKSMTFK	

Tablo 25. Örneklerden elde edilen de-nova peptid sayıları

ÖRNEK	Hasta örnekler						Kontrol örnekler		
	1S	2L	2S	3L	3S	4L	4S	5S	6S
PEPTİD SAYISI	19	18	24	32	27	40	14	0	0

Tablo 26. LSFPTTK Alignment

1.	>XP_011516723.1:679-685 cytosolic carboxypeptidase 1 isoform X10 LSFPTTK
2.	>IO1M_A:34-40 Deoxy hemoglobin(A-GLYGLYGLY-C:V1M,L29F,H58Q B,D:V1M,V67W) LSFPTTK
3.	>IO1M_A:178-184 Deoxy hemoglobin(A-GLYGLYGLY-C:V1M,L29F,H58Q B,D:V1M,V67W) LSFPTTK
4.	>IO1N_A:34-40 Deoxy hemoglobin (A-GLYGLYGLY-C:V1M,L29W; B,D:V1M)LSFPTTK
5.	>IO1N_A:178-184 Deoxy hemoglobin (A-GLYGLYGLY-C:V1M,L29W; B,D:V1M) LSFPTTK
6.	>IC7D_A:34-40Deoxy Rhb1.2(recombinant Hemoglobin)LSFPTTK
7.	>IC7D_A:177-183Deoxy Rhb1.2(recombinant Hemoglobin)LSFPTTK
8.	>IO1J_A:34-40 Deoxy hemoglobin (A-GLY-C:V1M,L29F,H58Q;B,D:V1M,L106W) LSFPTTK
9.	>IO1J_A:176-182 Deoxy hemoglobin (A-GLY-C:V1M,L29F,H58Q;B,D:V1M,L106W) LSFPTTK
10.	>1ABW_A:34-40Deoxy Rhb1.1 (Recombinant Hemoglobin)LSFPTTK
11.	>1ABW_A:176-182Deoxy Rhb1.1 (Recombinant Hemoglobin)LSFPTTK
12.	>IO1L_A:34-40 Deoxy hemoglobin (A-GLY-C:V1M,L29W,H58Q;B,D:V1M)LSFPTTK
13.	>IO1L_A:176-182 Deoxy hemoglobin (A-GLY-C:V1M,L29W,H58Q; B,D:V1M)LSFPTTK
14.	>AQN67653.1:35-41 Hemoglobin subunit alpha LSFPTTK
15.	>AQN67653.1:80-86Hemoglobin subunit alpha LSFPTTK
16.	>SAI82135.1:70-76TPA: globin C1 LSFPTTK
17.	>3IA3_B:38-44 A cis-proline in alpha-hemoglobin stabilizing Protein directs the structural reorganization of alpha-hemoglobin LSFPTTK
18.	>1BAB_A:36-42 Hemoglobin Thionville: An Alpha-Chain Variant With A Substitution Of A Glutamate For Valine At Na-1 And Having An Acetylated Methionine Nh2 Terminus LSFPTTK
19.	>AAK37554.1:35-41 hemoglobin alpha-1 globin chain LSFPTTK
20.	>AXY55003.1:35-41 mutant hemoglobin subunit alpha 2 LSFPTTK
21.	>BAD97112.1:35-41 alpha 2 globin variant, partial
22.	>AAK15770.1:35-41 hemoglobin alpha 1 globin chain, partial LSFPTTK
23.	>AAAY30253.1:35-41 hemoglobin alpha-2 globin mutant, partial LSFPTTK
24.	>AAK50822.1:11-17hemoglobin alpha 2, partial LSFPTTK
25.	>AAA52631.1:6-12alpha-globin, partial LSFPTTK
26.	>AGW82425.1:35-41 alpha globin chain, partial LSFPTTK
27.	>QRG33891.1:53-58immunoglobulin variable region, partial SFPTTK
28.	>1XY0_A:34-39T-to-THigh Transitions in Human Hemoglobin: alphaK40G deoxy low-salt LSFPTT
29.	>EAW92720.1:74-79hCG2039071, partial LSFPTT
30.	>ADM45275.1:35-41 hemoglobin alpha-1 globin chain variant, partial LPFPTTK
31.	>AHW56452.1:86-92contactin associated protein-like 2 isoform G, partial LSFSTTK
32.	>SPT35726.1:1429-1435 ARHGEF17, partial LSFPPPTK
33.	>NP_055601.2:1429-1435 rho guanine nucleotide exchange factor 17 LSFPPPTK
34.	>BAA20795.2:975-981 KIAA0337, partial LSFPPPTK
35.	>EAW79518.1:18-27hCG2038569, partial LSFPTYTVTK
36.	>NP_001380991.1:7176-7180microtubule-actin cross-linking factor 1 isoform 2 FPTTK
37.	>Q9UPN3.4:7075-7079 RecName: Full=Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5; AltName: Full=620 kDa actin-binding protein; Short=ABP620; AltName: Full=Actin cross-linking family protein 7; AltName: Full=Macrophin-1; AltName: Full=Trabeculin-alpha FPTTK
38.	>AAL09459.1:5619-5623 macrophin 1 isoform 4 FPTTK
39.	>EAX07280.1:5616-5620microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_g FPTTK
40.	>EAX07279.1:5114-5118microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_f FPTTK

Tablo 26'nın devamı

41.	>BAA83821.1:5117-5121 actin binding protein ABP620
42.	>NP_036222.3:5117-5121 microtubule-actin cross-linking factor 1 isoform 1 FPTTK
43.	>EAX07282.1:5114-5118 microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_i FPTTK
44.	>EAX07278.1:5093-5097 microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_e FPTTK
45.	>AAF06360.1:5060-5064 trabeculin-alpha FPTTK
46.	>EAX07274.1:5022-5026 microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_a FPTTK
47.	>BAA32310.3:4120-4124 KIAA0465 protein, partial FPTTK
48.	>NP_001161707.1:1996-2000 FRAS1-related extracellular matrix protein 3 precursor FPTTK
49.	>EAX07276.1:1182-1186 microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_c FPTTK
50.	>BAC87532.1:1059-1063 unnamed protein product FPTTK
51.	>EAW70563.1:572-576 X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa), isoform CRA_b FPTTK
52.	>BAD96323.1:477-481 ATP-dependent DNA helicase II variant, partial FPTTK
53.	>BAF83429.1:477-481 unnamed protein product FPTTK
54.	>NP_066964.1:477-481 X-ray repair cross-complementing protein 5 FPTTK
55.	>CAA40736.1:373-377 nuclear factor IV, partial FPTTK
56.	>XP_011527916.1:543-548 glucose-6-phosphate exchanger SLC37A1 isoform X1 LNFPPT
57.	>6ERF_B:494-498 Chain B, X-ray repair cross-complementing protein 5 FPTTK
58.	>AA24231.1:313-317 unknown, partial FPTTK
59.	>1JEQ_B:477-481 Crystal Structure of the Ku Heterodimer FPTTK
60.	>5Y3R_B:472-476 Cryo-EM structure of Human DNA-PK Holoenzyme FPTTK
61.	>AAH71925.1:18-22 MACF1 protein, partial
62.	>AAK61252.1:118-122 unknown FPTTK
63.	>5VE9_A:58-62 Structure of hACF7 EF1-EF2-GAR domains FPTTK
64.	>MCA43156.1:6-10 immunoglobulin light chain junction region SFPTT
65.	>MCA43159.1:6-10 immunoglobulin light chain junction region SFPTT

4.4. Kanser Kök Hücrelerine Ait Peptidlerin Dağılımı

Analizlerin son aşamasında elde edilen kanser ve kontrol örneklerin tamamında yine Peaks-Studio programı kullanarak CD133 ve ALDH1A1 proteinlerine ait peptidlerin varlığı araştırıldı. Her iki proteinin aminoasit sekansları UniProt/Swissprot online veri tabanından indirildi ve Peaks-Studio Fasta penceresine aktarıldı. Yapılan analiz sonuçlarında CD133 varlığına işaret eden toplam 3 adet peptid tespit edilirken ALDH1A1'i işaret eden 1 adet peptid rastlandı. CD133 tespit edilen örneklerin 2 tanesi serum 1 tanesi lavaj örneğinden elde edilmişti. Yine elde edilen örneklerden bir tanesi KHAK bir tanesi KHDAK hastasına ait iken bir tanesinin kontrol örnek grubundan olması dikkat çekmekteydi. ALDH1A1'e ait peptid sekansları sadece KHDAK hastasının lavaj sıvısından elde edilen eksozomda izole edilmişti (Tablo 27)

Tablo 27. CD133 ve ALDH1A'e ait peptid sekansları ve saptanan örnekler

CD 133'e ait peptid sekansları									
PEPTİD SEKANSI	-10LogP(P- DEĞERİ)	AĞIRLIK	UZUNLUK	MİLYONDAK İ PARÇA SAYISI(PPM)	KÜTLE/YÜK SAYISI(M/Z)	RETANSİYON ZAMANI(RT)	FRAKSİYON	TARAMA	KAYNAK
LAKYYRRMDSSEDVYDDVETI PMK	15.94	2836.3411	23	63.1	946.5139	19.51	4	F4:1455	3L
MKLTFEQVYSDCKKNR	15.46	1988.9812	16	-148.7	663.9024	18.96	9	F9:1415	6S
LGGLVICSLTLIVIFYLGLL CGVCGYDR	15.35	3248.7415	30	-27.4	465.1005	27.53	1	F1:2035	1S
ALDH1A1'e ait peptid sekansları									
GYFVQPTVFSNVTDEMR	17.09	1988.9302	17	-146.7	663.8867	18.91	2	F2:1410	2L

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamıza dahil edilen 104 hastanın 77 tanesine histopatolojik olarak akciğer kanseri tanısı konuldu. Bunlardan 24 tanesi KHAK tanısı alırken 53 tanesi KHDAK tanısı aldı. KHAK grubu hastaların yaş ortalaması $61,6 \pm 9$, KHDAK hasta grubunun yaş ortalaması ise $65,8 \pm 7,7$ idi. Arınç ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada akciğer kanseri tanılı hastaların yaş ortalamasının $57,72 \pm 9,05$ olduğu görülmüştür. Vakaların yaş aralığı 32-82 arasında değişmekte olup %9,8'i (n=96) kırk beş yaş ve altı %74,1'ü (n=720) 45-65 yaş aralığında, %15,9'u (n=155) 65 yaş ve üzerinde bulunmuştur.⁸¹ Çalışmamızdaki bulgular literatür ile uyumlu bulundu.¹⁴¹

Birçok çalışmada erkeklerde kadınlara göre daha fazla akciğer kanseri tespit edildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda KHAK hastalarının %79'u, KHDAK hastalarının ise %86'sı erkek hastalardan oluşturmaktaydı. KHDAK tanılı alan 65 yaş ve üstü olguların analiz edildiği bir çalışmada hastaların %83,0'ünün erkek, %16,0'sının ise kadın olduğu bildirilmiştir.¹⁴² Yine başka bir çalışmada akciğer kanseri tanısı alan olgular retrospektif olarak incelenmiş çalışmada hastaların %77,7'sinin erkek, %22,0'ünün kadın olduğu, belirtilmiştir.¹⁴³ Çalışmamızın cinsiyet dağılımı ile ilgili bulguları literatürü destekler nitelikteydi.

Akciğer kanseri gelişimi için birincil risk faktörü, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık yüzde 90'ını oluşturduğu tahmin edilen sigara içimidir.¹⁴⁴ Ömür boyu sigara içmeyenlere kıyasla uzun süre sigara içenlerde akciğer kanserine ilişkin nispi risk tahminleri 10 ila 30 kat arasında değişmektedir. Hiç sigara içmeyenlerde yaşam boyu akciğer kanseri riski yüzde 1 veya daha az iken, ağır sigara içenler arasında kümülatif akciğer kanseri riski yüzde 30 kadar yüksek olabilir.^{145,146} Tüm akciğer kanserlerinin gelişiminin birincil risk faktörü sigara içilmesi iken KHAK tanısı konulan hastaların %90'dan fazlası aktif sigara içen veya geçmişte sigara içmiş hastalardır. KHAK sigara içimi ile tipik olarak ilişkili olup sigara içme sıklığı ve süresi arttıkça risk artmaktadır.^{26,147} Çalışmamız verilerinde sigara içimi KHAK grubunda %94,4 iken KHDAK grubunda %78,4 ve kontrol grubunda %53,8 oranındaydı. Kanser hasta gruplarında sigara kullanım öyküsünün kontrol grubuna göre daha fazla olması dikkat çekmekle birlikte sigara kullanım sıklığı ise KHAK grubunda diğer gruplara göre

istatistiksel olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu verilerin mevcut literatürü desteklediği görüldü.

Günbatır ve arkadaşlarının akciğer kanseri tanısı alan olguları incelediği çalışmada en sık tanı koyma yöntemi olarak bronkoskopik forceps biyopsinin (%72,8) kullanıldığı belirtilmiştir.¹⁴³ Çalışmamızda akciğer kanseri tanısı alan hastaların tanı yöntemleri incelendiğinde bizim çalışmamızda da en sık FOB ile tanı konulduğunu ve FOB ile tanı konulanların oranının %66,2 olduğu görülmüş olup benzer bu oran ile literatür ile uyumlu bulundu.

KHAK, 1980’li yıllarda tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %17’sini oluştururken, bu oran 2000’li yılların başına gelindiğinde neredeyse %12 seviyesine kadar geriledi. Bu gerilemenin en önemli nedeni olarak sigara kullanımının giderek azalması gösterilmektedir.¹⁴⁸ KHAK santral yerleşimli hızlı ilerleyen özellikte olduğu için genellikle obstruksiyon bulguları görülür. Bundan dolayı çoğu hastanın lokal semptomları olan öksürük, göğüs ağrısı, nefes darlığı tanı anında mevcuttur.^{149,150} Çalışmamızda 77 hastanın 24 tanesi (%33) KHAK tanısı alırken, 53 tanesi (%68) KHDAK tanısı almıştır. Verilerimizde KHAK tespitinin literatür verilerinin üzerinde olduğu görülmektedir. Bu durum çalışmamızın hedef kitle hasta popülasyonunun FOB yapılan akciğer kanseri ön tanıli hastalar içinden seçilmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Santral yerleşimli kitlesel lezyonlar için öncelikli tanısal amaçlı FOB planlanırken, periferik yerleşimli lezyonlar için öncelikli TTİAB, TTTCB gibi tanısal değeri daha yüksek olacağı düşünülen işlemler planlanmaktadır. KHAK’nin yüksek santral yerleşimli seyretmesi ve çalışmamızda santral lezyonlara yönelik yüksek tanısal değeri olan FOB işlemi öncesi hasta popülasyonundan seçim yapılması nedeni ile KHAK hasta yüzdesinin göreceli yüksek saptandığı düşünüldü.

KHAK hastalarımızın tanı anında önemli bir kısmının yaygın evrede olduğu, çoğunluğunda da birden fazla organ sisteminde metastazların gelişmiş olduğu belirlendi. Literatürde de benzer şekilde KHAK hastalarının çoğunluğunun tanı anında aşikar metastatik olduğu vurgulanmaktadır. Hastaların yaklaşık yüzde 70’i metastatik hastalıkla başvurur; KHAK’nin karaciğere, adrenallere, kemiğe, kemik iliğine ve beyne yayılma eğilimi vardır.¹⁵¹ Sınırlı ve yaygın hastalık için tanı anından itibaren medyan sağkalım aralıkları sırasıyla 15 ila 20 ay ve 8 ila 13 aydır. Sınırlı evredeki hastaların yaklaşık yüzde 20 ila 40’ı ve geniş evredeki hastaların yüzde 5’inden azı iki yıl hayatta

kalır.^{152,153} Beş yıllık sağkalım için ilgili değerler sırasıyla yüzde 10 ila 13 ve yüzde 1 ila 2'dir.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Hastalarımızın 21 tanesi (%87,5) tanı anında yaygın evrede olup, sadece 6 aylık takipte bakılan mortalite verilerinde 11 tanesinin(%45,8) ex olduğu gözlemlendi. Çalışmamızın bulgularının KHAK hastalarının tanı anındaki evre ve prognozu açısından literatür bulgularını desteklediği düşünüldü.

KHDAK hastalarının yaklaşık %20'si tanı anında lokal ileri (evre-III), yaklaşık yarısı ise metastatik (evre-IV) hastalığa sahiptir. Metastatik evre hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %5'in altındadır.¹ KHDAK için TNM evreleme sistemine göre 5-yıllık sağkalım oranları IA %50, IB %46, IIA %36, IIB %26, IIIA %19, IIIB %7 ve IV %2 şeklindedir.¹⁵⁷ Çalışmamızda tespit edilen 53 KHDAK hastasının %41,5'i lokal ileri %32'si metastatik evrede tespit edilmiştir. Bunların 6 aylık mortalite verilerine bakıldığında hastaların %28'inin ex olduğu saptanmıştır. KHDAK hastalarının prognoz ve mortalite verilerin de hastaların tanı anında %70'den fazlasında ilerlemiş hastalığa sahip olması ile literatürü desteklemekle birlikte mortalite verilerini değerlendirmek için hastamızın daha uzun süre takip verilerine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Hastalık patolojisinde eksozom ve multiveziküler bodyler gibi ekstraselüler veziküllerin (EV) düzenleyici rollerine yönelik artan ilgi ve araştırmaya rağmen, EV lerin toplanması, izolasyonu ve analizi için metodolojideki tutarsızlık, alanın daha da geliştirilmesinde büyük bir engel teşkil etmiştir.¹⁵⁸ Carnino ve arkadaşlarının yaptıkları EV izolasyon yöntemleri ile ilgili derlemede anlatıldığı gibi EV izole etmenin birden farklı yöntemi vardır. Bunlar diferansiyel santrifüj, yoğunluk gradyan santrifüjü, boyut dışlama kromatografisi, polimer çöktürme için ticari kitler, kimyasallarla çöktürme, immünopresipitasyon, ultrafiltrasyon ve mikroakışkan teknolojileri gibi birbirinden farklı avantaj ve dezavantajlara sahip teknikler olup izolasyon tekniği konusunda standart bir yöntemin olmadığını göstermektedir. Bronkoalveolar lavaj sıvısından eksozom izolasyonu için ana konu sınırlı miktarda numunedir. Bu nedenle, büyük hacim gerektiren bazı teknikler, eksozomları BAL'den izole etmek için kullanılamaz. Bronkoalveolar lavaj sıvısından türetilen EV'lerin izolasyonu ve tanımlanması hala ilk aşamasındadır ve protokoller henüz tam olarak oluşturulmamıştır.¹⁵⁹

Polietilen glikol (PEG) çöktürme ile eksozom izolasyonu için yaygın ticari kitler eksozomların çözünürlüğünü azaltmak ve bir pelet çöktürmesi oluşturmak için süper hidrofilik polimerlerin veya PEG'lerin çözeltilerinin kullanıldığı bir tekniktir. Ticari

kitler nispeten hızlıdır ve takip edilmesi kolay protokollere sahiptir. Her kit biraz farklıdır, ancak çoğu PEG tabanlı bir çözüm içerir ve santrifüjlemeyi de kullanır. Bu yöntemin avantajları basit bir işlem olması ve ek ekipmana gerek olmamasıdır 160 . Bununla birlikte, kitlerin genellikle maliyetli olması, büyük boyutlu EV örnekleri için iyi olmayabilmesi ve bu kitlerle izolasyondan kaynaklanan yüksek konsantrasyonda safsızlıklar olması gibi dezavantajlar da vardır.¹⁶¹

Çalışmamızda kullanılan PEG çöktürme izolasyon yöntemi ile ilgili yaşanmış olan en büyük kısıtlılıklardan birisi kitlerin yüksek maliyetli olması nedeni ile tüm hastalardan numune alınmış olmasına rağmen bütçe yetersizliği sebebi ile örneklerin az bir kısmında eksozom izolasyonu yapılabilmiş olmasıdır. Bronkoalveolar lavaj sıvı analizi, akciğer hastalıkları ve etiyolojisini araştırmak için yaygın bir yöntemdir. BAL sıvısından eksozom izolasyonu için altın standart bir yöntem oluşturulması için daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Eksozomlar proteinler, lipitler, nükleik asitler içerirler. İçeriklerinin hücre tipine büyük ölçüde bağımlı olmasından dolayı parental hücrelerin küçük versiyonları olarak kabul edilmişlerdir. Yaklaşık 4400 protein, 194 lipit, 1639 mRNA ve 764 miRNA dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinden eksozomlarda çok çeşitli yapısal elementler tanımlanmıştır.¹⁶² Eksozomlar türetildiği doku/hücre tipine ait parmak izlerine sahiptir ve eksozomların proteinler dahil moleküler içeriği, türetildiği doku/hücre tipine büyük ölçüde bağlıdır.¹⁶³ Eksozom hücre tipi özgüllüğünü belirlemek için idrar, mast hücreleri ve kolon kansinomu hücrelerinden türetilen eksozomal proteomları, idrar, mast hücreleri ve kolorektal kansinomdaki protein ekspresyon paternleri ile karşılaştırılmış. Ön analiz, birçok proteinin yalnızca kolorektal kanserde ve eksozomunda eksprese edildiğini, ancak idrar veya mast hücrelerinde eksprese edilip edilmediğinin belirlenemediğini ve bunların her ikisinin de ilgili eksozomlarında tespit edilmediğini ortaya koydu.¹⁶⁴ Çalışmamızda sınırlı sayıda akciğer kanseri hastası ile yaptığımız serum ve lavaj sıvısından elde edilen eksozomların proteom içeriklerinin kontrol hastaları ile karşılaştırılmasında kanser hastalarından kontrol hastalarına göre çok daha fazla proteom içeriğinin elde edildiği saptandı. Spesifik bir proteine işaret etmeyen de-nova peptidlerin tamamının kanser hastalarından elde edildiği görüldü. Elde edilen proteomların özellikle KHAK ve lavaj örneklerinden elde edilmiş olması KHAK'nin hızlı doubling time özellikli ve buna bağlı olarak yüksek metabolizması ile ilişkili

olabileceği düşündürmüştür. Lavaj sıvılarından proteom eldesinin fazlalığının kanser mikro çevresi içerisinde yoğun iletişim ağının kanser alanına lokal yansıması olabileceği ve özellikle KHAK yüksek santral seyirli olması nedeni ile BAL'da ilişkili hücrelerin daha fazla bulunabileceği düşündürmekle birlikte bu bulguların daha fazla hasta sayılı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bulgularımız eksozomal içeriklerin salındıkları doku ve hücre tipine ait parmak izi taşıdıkları görüşünü desteklemekle birlikte geniş kapsamlı çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Bugüne kadar yapılan eksozom proteom çalışmalarından, endozomal kökenlerini yansıtan bir protein bileşimini sergilemeye ek olarak, eksozomların hücrel kökenlerini, ayrıca olası fizyolojik rol ve hedefleme özelliklerini yansıtan benzersiz bir protein parmak izi içerdiği görülmektedir.^{165,166} Aldehit dehidrojenaz 1 (ALDH1), akciğer kanserinde varsayılan bir kanser kök hücresi (CSC) belirteci olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, akciğer kanseri hastalarında bu proteinin klinikopatolojik ve prognostik değeri tartışmalıdır. Dong ve arkadaşlarının yaptığı 14 yayın ve 1926 hastadan oluşan meta analizde akciğer kanserinde ALDH1 ekspresyonunun genel ve hastalısız sağkalımın azalması ile bağlantılı olduğu ve bu nedenle daha kötü bir prognoza işaret ettiği sonucunu bulunmuştur.¹⁶⁷ Bir diğer kanser kök hücre belirteci olarak tanımlanan CD133 ile ilgili Weimin ve arkadaşlarının yaptığı 23 çalışma ve 2538 hastalı meta analizde KHDAK hastalarında yüksek CD133 ekspresyon düzeyinin daha kötü prognoz ve daha yüksek lenf nodu metastazı oranı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.¹⁶⁸ Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda 3 hastanın serum ve lavajından elde edilen eksozomlarda CD133'e ait, 1 hastanın lavajından izole edilen eksozomda ALDH1A1'e ait peptid sekansı bulundu. CD133 saptanan örneklerden biri KHDAK hastasının serumuna, biri KHAK hastasının lavajına, biri ise kontrol hasta grubunun serumuna aitti. ALDH1A1 saptanan örnek ise KHDAK hastasının lavajına aitti. Çalışmamızda az hasta sayısı ve sınırlı bütçe ile serum ve lavaj sıvılarından türetilen eksozomlarda kanser kök hücre varlığını gösterdik. En büyük kısıtlılıklarımızdan birisi bütçe yetersizliği nedeni ile az hasta sayısı üzerinde çalışmış olmamızdı. Çalışmamızın diğer bir kısıtlılığı hastaların progresyonunu değerlendirmek için daha uzun süre izlenememiş olmasıydı. Hastaların sadece 6 aylık izlemleri yapılabildi. Eksozomlarda elde edilen kanser kök hücrelerinin hastaların prognozu ile ilişkisi değerlendirilemedi. Kontrol hastasının serumundan elde edilen kanser kök hücre

belirtecinin klinik önemi saptanamadı. Çalışmamızda kullanılan metodoloji ile daha fazla hasta sayısı ve daha uzun süre izlem yapılarak elde edilecek sonuçlarda bu verilerin elde edileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇLAR

1. Akciğer tanısı konulan 77 hastadan KHAK tanılı hastalarda %79,2'si erkek, %20,8'i kadındı. KHDAK tanılı hastalarda %86,8'i erkek, %13,2'sinin kadın olduğu tespit edildi. Hastaların tanı anında ki yaş ortalamasının KHAK hastalarında $61,6 \pm 9,0$ KHDAK hastalarında $65,8 \pm 7,7$ olduğu saptandı. KHAK hastalarının %94'ünde, KHDAK hastalarının %78,4 ünde sigara kullanım öyküsü mevcuttu. Bu oran kontrol hasta grubunda %53,8 olarak saptandı. KHAK, KHDAK ve kontrol grubu hastaları arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir fark saptanmazken sigara kullanım öyküsünün KHAK grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğu saptandı ($p=0,027$; $p<0,05$).
2. Hastaların %66,2'sine FOB ile tanı konulduğu tespit edildi. KHAK hastalarının %87,5'i yaygın evre de tespit edilirken, KHDAK hastalarının % 73,5'i lokal ileri ve metastatik evrede (EVRE 3A ve üzeri) tespit edildi. 6 aylık izlemde bakılan mortalite oranlarında KHAK grubunda hastaların %45,8'inin, KHDAK grubunda %28,3'ünün ex olduğu gözlenirken kontrol hastalarının tamamının hayatta olduğu saptandı. Mortalite sıklığı 6 aylık izlemde Küçük hücreli AC CA grubunda olan hastalarda, diğer gruplarda yer alan hastalara göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,011$; $p<0,05$).
3. 6 aylık mortalite verilerine etki eden faktörler incelendiğinde hastaların sigara kullanımının 2,9 (OR=2,968/ $p:0,031$) kat, EBL varlığının ise 0,2 (OR=0,246/ $p:0,028$) kat mortaliteye etkisi olduğu tespit edildi.
4. Hastaların serum ve lavaj sıvısında ki eksozomlardan elde edilen protein analizlerinde kanser hasta grubunda 19 adet peptid izole edilirken kontrol hasta grubunda sadece 2 adet peptid tespit edildi. Kanser hastalarındaki peptidlerin 2 tanesi KHDAK hastalarının serumuna ait olup geri kalanların tamamı KHAK'li hastaların lavaj sıvılarından izole edilmişti ki bu örneklerin büyük bir oranını kapsıyordu.
5. İncelenen örneklerden elde edilen 174 adet de-novo" peptidin tamamı kanser hasta grubundan izole edildi. Ve yine peptidlerin büyük bir oranının KHAK hastalarının lavaj örneklerinden elde edildiği saptandı.

6. Yapılan analiz sonuçlarında CD133 varlığına işaret eden toplam 3 adet peptid tespit edilirken ALDH1A1'i işaret eden 1 adet peptide rastlandı. CD133 tespit edilen örneklerin 2 tanesi serum 1 tanesi lavaj örneğinden elde edildi. Yine elde edilen örneklerden bir tanesi KHAK bir tanesi KHDAK hastasına ait iken bir tanesinin kontrol örnek grubundan olması dikkat çekmekteydi. ALDH1A1'e ait peptid sekansları sadece KHDAK hastasının lavaj sıvısından elde edilen eksozomda izole edildi.
7. Çalışmamızda kısıtlı bütçe ve az sayıda hasta ile serum ve lavaj sıvısından eksozom izolasyonu yapıldı. Eksozomlardan elde edilen proteinlerde kanser kök hücre belirteçleri gösterildi. Çalışmamızın bütçe yetersizliği nedeni ile az sayısı hastada yapılmış olması saptanan kök hücre belirteçlerinin prognostik önemini belirlelemizde yetersizliğe sebep olmuştur. Ancak bu hastalardan elde edilen veriler kullanılarak daha büyük bütçeli proje desteği alabilmek olanak dahilindedir. Bu sayede kapsamlı, geniş hasta sayılı ve uzun süre izlemle yapılacak çalışmalarla tümör kaynaklı eksozomlarda kanser kök hücre belirteçlerinin prognostik öneminin bu hastaların prognoz ve tedavi konusuna ışık tutacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Howlader N NAM, Krapcho M.** SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2019. 2019: Bethesda MD: National Cancer Institute. **2019.**
2. **Sylvester KG, Longaker MT.** Stem cells: review and update. *Archives of Surgery.* **2004;** 139(1):93-9.
3. **Hastreiter S, Schroeder T.** Nanog dynamics in single embryonic stem cells. *Cell Cycle.* **2016;** 15(6):770-1.
4. **Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F, Biffoni M, et al.** CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell.* **2014;** 14(3):342-56.
5. **Sinkevicius KW, Kriegel C, Bellaria KJ, Lee J, Lau AN, Leeman KT, et al.** Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2014;** 111(28):10299-304.
6. **Mao P, Joshi K, Li J, Kim S-H, Li P, Santana-Santos L, et al.** Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2013;** 110(21):8644-9.
7. **Qin J, Liu X, Laffin B, Chen X, Choy G, Jeter CR, et al.** The PSA-/lo prostate cancer cell population harbors self-renewing long-term tumor-propagating cells that resist castration. *Cell Stem Cell.* **2012;** 10(5):556-69.
8. **Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM.** Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology.* **1985;** 101(3):942-8.
9. **Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, et al.** Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of Cell Biology.* **1999;** 147(3):599-610.
10. **Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, et al.** TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/ ζ complex. *The Journal of Immunology.* **2002;** 168(7):3235-41.

11. **Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief C, et al.** B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*. **1996**; 183(3):1161-72.
12. **Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, et al.** Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*. **2001**; 7(3):297-303.
13. **Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, et al.** Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of Proteome Research*. **2008**; 7(12):5157-66.
14. **Kalluri R.** The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. **2016**; 126(4):1208-15.
15. **Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M, Yasar S, Dworacki G.** Exosomes-structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*. **2015**; 81(1):2-10.
16. **Midthun DE (Author) LRSe, Vora SR (Deputy editor).** Overview of the risk factors, pathology and clinical manifestations of lung cancer. [Internet]. Wolters Kluwer; **2019**.
17. **Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al.** Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*. **2021**; 71(3):209-49.
18. **Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, et al.** The effect of advances in lung-cancer treatment on population mortality. *New England Journal of Medicine*. **2020**; 383(7):640-9.
19. **Adler I.** Primary malignant growths of the lungs and bronchi: A pathological and clinical study: Longmans, Green; **1912**.
20. Wynder EL. Ernst Wynder.
21. **Warner KE, Mendez D.** Tobacco control policy in developed countries: yesterday, today, and tomorrow. *Nicotine & Tobacco Research*. **2010**; 12(9):876-87.
22. **Mattson ME, Pollack ES, Cullen JW.** What are the odds that smoking will kill you? *American Journal of Public Health*. **1987**; 77(4):425-31.

23. **Toh CK, Lim WT.** Lung cancer in never-smokers. *Journal of Clinical Pathology*. **2007**; 60(4):337-40.
24. **Pisani P, Bray F, Parkin DM.** Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *International Journal of Cancer*. **2002**; 97(1):72-81.
25. **Mannino DM, Midthun DE, Vora SR.** Cigarette smoking and other possible risk factors for lung cancer. [Internet]. Wolters Kluwer, **2019**.
26. **Alberg AJ, Samet JM.** Epidemiology of lung cancer. *Chest*. **2003**; 123(1):21-49.
27. **Lissowska J, Foretova L, Dąbek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al.** Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes & Control*. **2010**; 21(7):1091-104.
28. **Kocher F, Hilbe W, Seeber A, Pircher A, Schmid T, Greil R, et al.** Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer*. **2015**; 87(2):193-200.
29. **Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al.** Methods for staging non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. **2013**; 143(5):211-50.
30. 2. AeKTvTRTDAuE.
31. **De Leyn P, Lardinois D, Van Schil P, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M, et al.** European trends in preoperative and intraoperative nodal staging: ESTS guidelines. *Journal of Thoracic Oncology*. **2007**; 2(4):357-61.
32. **Hatabu H, Stock KW, Sher S, Edinburgh KJ, Levin DL, Garpestad E, et al.** Magnetic resonance imaging of the thorax: past, present, and future. *Clinics in Chest Medicine*. **1999**; 20(4):775-803.
33. **Heilo A, Stenwig AE, Solheim ØP.** Malignant pleural mesothelioma: US-guided histologic core-needle biopsy. *Radiology*. **1999**; 211(3):657-9.
34. **Silvestri GA, Littenberg B, Colice GL.** The clinical evaluation for detecting metastatic lung cancer. A meta-analysis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1995**; 152(1):225-30.

35. **Toloza EM, Harpole L, McCrory DC.** Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest*. **2003**; 123(1):137-46.
36. **Hillers TK, Sauve MD, Guyatt GH.** Analysis of published studies on the detection of extrathoracic metastases in patients presumed to have operable non-small cell lung cancer. *Thorax*. **1994**; 49(1):14-9.
37. Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. *Toraks Dergisi*; **2006**; 7(2): 1-37.
38. **Dahlstrom JE, Langdale-Smith GM, James DT.** Fine needle aspiration cytology of pulmonary lesions: a reliable diagnostic test. *Pathology*. **2001**; 33(1):13-6.
39. **Rodriguez-Panadero F, Janssen J, Astoul P.** Thoracoscopy: general overview and place in the diagnosis and management of pleural effusion. *European Respiratory Journal*. **2006**; 28(2):409-22.
40. **Fong CJ, Murphy KM, Westbrook JD, Markle MM.** Psychological interventions to facilitate employment outcomes for cancer survivors: A systematic review and meta-analysis. *Research on Social Work Practice*. **2018**; 28(1):84-98.
41. **Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al.** The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of Thoracic Oncology*. **2015**; 10(9):1243-60.
42. **Asamura H, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Rusch VW, Vansteenkiste JF, et al.** 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*. **2015**; 10(12):1675-84.
43. **Argiris A, Murren JR.** Staging and clinical prognostic factors for small-cell lung cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass)*. **2001**; 7(5):437-47.
44. **Chae YK, Pan A, Davis AA, Mohindra N, Matsangou M, Villafior V, et al.** Recent advances and future strategies for immune-checkpoint inhibition in small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*. **2017**; 18(2):132-40.
45. **Warde P, Payne D.** Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell carcinoma of the lung? A meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*. **1992**; 10(6):890-5.

46. **Johnson DH.** Management of small cell lung cancer: current state of the art. *Chest.* **1999**; 116:525-30.
47. **Sierocki JS, Hilaris BS, Hopfan S, Martini N, Barton D, Golbey RB, et al.** cis-Dichlorodiammineplatinum (II) and VP-16-213: an active induction regimen for small cell carcinoma of the lung. *Cancer Treat Rep.* **1979**; 63(9-10):1593-7.
48. **Pignon JP, Arriagada R, Ihde DC, Johnson DH, Perry MC, Souhami RL, et al.** A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine.* **1992**; 327(23):1618-24.
49. **Thatcher N, Girling DJ, Hopwood P, Sambrook RJ, Qian W, Stephens RJ, et al.** Improving survival without reducing quality of life in small-cell lung cancer patients by increasing the dose-intensity of chemotherapy with granulocyte colony-stimulating factor support: results of a British Medical Research Council Multicenter Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology.* **2000**; 18(2):395.
50. **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* **2001**; 414(6859):105-11.
51. **Beck B, Blanpain C.** Unravelling cancer stem cell potential. *Nature Reviews Cancer.* **2013**; 13(10):727-38.
52. **Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T.** Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* **2011**; 4(1):32.
53. **Wang K, Xu J, Zhang J, Huang J.** Prognostic role of CD133 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* **2012**; 12(1):1-6.
54. **Wen L, Chen XZ, Yang K, Chen ZX, Zhang B, Chen JP, et al.** Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in gastric cancer: a systematic review. *PloS One.* **2013**; 8(3):591-54.
55. **Alamgeer M, Ganju V, Szczepny A, Russell PA, Prodanovic Z, Kumar B, et al.** The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax.* **2013**; 68(12):1095-104.
56. **Janikova M, Skarda J, Dziechciarkova M, Radova L, Chmelova J, Krejci V, et al.** Identification of CD133+/nestin+ putative cancer stem cells in non-small cell lung cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **2010**; 154(4):321-6.

57. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical Cancer Research*. **2008**; 14(1):123-9.
58. Qu H, Li R, Liu Z, Zhang J, Luo R. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. **2013**; 6(11):2644.
59. Chen S, Song X, Chen Z, Li X, Li M, Liu H, et al. CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. **2013**; 8(2):563-80.
60. Yang K, Chen XZ, Zhang B, Yang C, Chen HN, Chen ZX, et al. Is CD133 a biomarker for cancer stem cells of colorectal cancer and brain tumors? A meta-analysis. *The International Journal of Biological Markers*. **2011**; 26(3):173-80.
61. Mizugaki H, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi J, Moriya J, Hatanaka KC, Kikuchi E, et al. CD133 expression: a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *International Journal of Clinical Oncology*. **2014**; 19(2):254-9.
62. Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *International Journal of Cancer*. **2010**; 126(4):950-8.
63. Gottschling S, Jensen K, Herth FJ, Thomas M, Schnabel PA, Herpel E. Lack of prognostic significance of neuroendocrine differentiation and stem cell antigen co-expression in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*. **2013**; 33(3):981-90.
64. Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. **2009**; 36(3):446-53.
65. Bocker C, Vasiliou M, Carpenter S, Carpenter C, Zhang Y, Wang X, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*. **2013**; 237(1):189-210.
66. Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, et al. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological Reviews*. **2012**; 64(3):520-39.
67. Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. **2005**; 23(6):752-60.

68. **Smith C, Gasparetto M, Humphries K, Pollyea DA, Vasiliou V, Jordan CT.** Aldehyde dehydrogenases in acute myeloid leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **2014;** 1310(1):58-68.
69. **Balicki D.** Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. *Cell Stem Cell.* **2007;** 1(5):485-7.
70. **Choi SA, Lee JY, Phi JH, Wang KC, Park CK, Park SH, et al.** Identification of brain tumour initiating cells using the stem cell marker aldehyde dehydrogenase. *European Journal of Cancer.* **2014;** 50(1):137-49.
71. **Morgenroth A, Vogg AT, Zlatopolskiy BD, Siluschek M, Oedekoven C, Mottaghy FM.** Breaking the invulnerability of cancer stem cells: two-step strategy to kill the stem-like cell subpopulation of multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics.* **2014;** 13(1):144-53.
72. **Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al.** ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* **2007;** 1(5):555-67.
73. **Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, Raso MG, Behrens C, Gao B, et al.** Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Research.* **2010;** 70(23):9937-48.
74. **Carpentino JE, Hynes MJ, Appelman HD, Zheng T, Steindler DA, Scott EW, et al.** Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer research.* **2009;** 69(20):8208-15.
75. **Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al.** Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Molecular Cancer Research.* **2009;** 7(3):330-8.
76. **Goossens-Beumer I, Zeestraten E, Benard A, Christen T, Reimers M, Keijzer R, et al.** Clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin, and EpCAM expression in colorectal cancer. *British Journal of Cancer.* **2014;** 110(12):2935-44.
77. **Zhou F, Mu YD, Liang J, Liu ZX, Chen HS, Zhang JF.** Expression and prognostic value of tumor stem cell markers ALDH1 and CD133 in colorectal carcinoma. *Oncology Letters.* **2014;** 7(2):507-12.
78. **Yoshioka T, Umekita Y, Ohi Y, Souda M, Sagara Y, Sagara Y, et al.** Aldehyde dehydrogenase 1 expression is a predictor of poor prognosis in node-positive breast cancers: a long-term follow-up study. *Histopathology.* **2011;** 58(4):608-16.

79. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-Positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clinical Cancer Research*. **2010**; 16(1):45-55.
80. Sell S. On the stem cell origin of cancer. *The American Journal of Pathology*. **2010**; 176(6):2584-94.
81. Zhou B-BS, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2009**; 8(10):806-23.
82. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. **1994**; 367(6464):645-8.
83. Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Research*. **2007**; 17(1):3-14.
84. Pang R, Law WL, Chu AC, Poon JT, Lam CS, Chow AK, et al. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*. **2010**; 6(6):603-15.
85. Dieter SM, Ball CR, Hoffmann CM, Nowrouzi A, Herbst F, Zavidij O, et al. Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell*. **2011**; 9(4):357-65.
86. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics*. **2003**; 33(1):49-54.
87. Hunter K, Welch DR, Liu ET. Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nature Genetics*. **2003**; 34(1):23-4.
88. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. **2005**; 436(7050):518-24.
89. Hanniford D, Zhong J, Koetz L, Gaziel-Sovran A, Lackaye DJ, Shang S, et al. A miRNA-based signature detected in primary melanoma tissue predicts development of brain metastasis. *Clinical Cancer Research*. **2015**; 21(21):4903-12.

90. **Dean M, Fojo T, Bates S.** Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*. **2005**; 5(4):275-84.
91. **Chen X, Liao R, Li D, Sun J.** Induced cancer stem cells generated by radiochemotherapy and their therapeutic implications. *Oncotarget*. **2017**; 8(10):17301.
92. **Dylla SJ, Beviglia L, Park I-K, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al.** Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS one*. **2008**; 3(6):24-28.
93. **Abubaker K, Latifi A, Luwor R, Nazaretian S, Zhu H, Quinn MA, et al.** Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Molecular Cancer*. **2013**; 12(1):1-15.
94. **Dean M.** ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. **2009**; 14(1):3-9.
95. **Xu F, Wang F, Yang T, Sheng Y, Zhong T, Chen Y.** Differential drug resistance acquisition to doxorubicin and paclitaxel in breast cancer cells. *Cancer Cell International*. **2014**; 14(1):1-13.
96. **An Y, Ongkeko WM.** ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. **2009**; 5(12):1529-42.
97. **Xu X, Chai S, Wang P, Zhang C, Yang Y, Yang Y, et al.** Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Letters*. **2015**; 369(1):50-7.
98. **Wang YH, Scadden DT.** Harnessing the apoptotic programs in cancer stem-like cells. *EMBO Reports*. **2015**; 16(9):1084-98.
99. **Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al.** Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. **2006**; 444(7120):756-60.
100. **Ramasamy TS, Ayob AZ, Myint HHL, Thiagarajah S, Amini F.** Targeting colorectal cancer stem cells using curcumin and curcumin analogues: insights into the mechanism of the therapeutic efficacy. *Cancer Cell International*. **2015**; 15(1):1-15.
101. **Nakano I, Garnier D, Minata M, Rak J.** Extracellular vesicles in the biology of brain tumour stem cells—Implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker development. *Seminars in cell & developmental biology*, **2015**.

102. Mimeault M, Batra SK. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. **2014**; 23(2):234-54.
103. Marzesco AM. Prominin-1-containing membrane vesicles: origins, formation, and utility. Prominin-1 (CD133): New Insights on Stem & Cancer Stem Cell Biology: Springer; **2013**:41-54.
104. Kumar D, Gupta D, Shankar S, Srivastava RK. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: possible implications for biomarker and treatment of cancer. *Oncotarget*. **2015**; 6(5):3280.
105. Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Research*. **2011**; 71(15):5346-56.
106. Lin R, Wang S, Zhao RC. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **2013**; 383(1):13-20.
107. Shimoda M, Principe S, Jackson HW, Luga V, Fang H, Molyneux SD, et al. Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. *Nature Cell Biology*. **2014**; 16(9):889-901.
108. Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion In Cell Biology*. **2009**; 21(4):575-81.
109. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2012**; 13(5):328-35.
110. Zhou J, Li XL, Chen ZR, Chng WJ. Tumor-derived exosomes in colorectal cancer progression and their clinical applications. *Oncotarget*. **2017**; 8(59):100-81.
111. Eldridge L, Moldobaeva A, Zhong Q, Jenkins J, Snyder M, Brown RH, et al. Bronchial artery angiogenesis drives lung tumor growth. *Cancer Research*. **2016**; 76(20):5962-9.
112. Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. **2015**; 34(3):290-302.

113. Fujita Y, Kosaka N, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. *Trends in Molecular Medicine*. **2015**; 21(9):533-42.
114. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*. **2012**; 12(1):1-10.
115. Wang Y, Yi J, Chen X, Zhang Y, Xu M, Yang Z. The regulation of cancer cell migration by lung cancer cell-derived exosomes through TGF- β and IL-10. *Oncology Letters*. **2016**; 11(2):1527-30.
116. Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, et al. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Reports*. **2013**; 5(5):1159-68.
117. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*. **2015**; 219:278-94.
118. Alderton GK. Exosomes drive premetastatic niche formation. *Nature Reviews Cancer*. **2012**; 12(7):447.
119. Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT: meeting on the epithelial–mesenchymal transition. John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK, **2008**.
120. Andarawewa KL, Erickson AC, Chou WS, Costes SV, Gascard P, Mott JD, et al. Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Research*. **2007**; 67(18):8662-70.
121. Choi DY, You S, Jung JH, Lee JC, Rho JK, Lee KY, et al. Extracellular vesicles shed from gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer regulate the tumor microenvironment. *Proteomics*. **2014**; 14(16):1845-56.
122. Jung JH, Lee MY, Choi DY, Lee JW, You S, Lee KY, et al. Phospholipids of tumor extracellular vesicles stratify gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer cells from gefitinib-sensitive cells. *Proteomics*. **2015**; 15(4):824-35.
123. Li XQ, Liu JT, Fan LL, Liu Y, Cheng L, Wang F, et al. Exosomes derived from gefitinib-treated EGFR-mutant lung cancer cells alter cisplatin sensitivity via up-regulating autophagy. *Oncotarget*. **2016**; 7(17):24585.

124. **Jones P, George A.** The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. **2004**; 61(6):682-99.
125. **Vogelgesang S, Jedlitschky G, Brenn A, C Walker L.** The role of the ATP-binding cassette transporter P-glycoprotein in the transport of β -amyloid across the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*. **2011**; 17(26):2778-86.
126. **Krishna R, Mayer LD.** Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2000**; 11(4):265-83.
127. **Hegedus C, Ozvegy-Laczka C, Szakacs G, Sarkadi B.** Interaction of ABC multidrug transporters with anticancer protein kinase inhibitors: substrates and/or inhibitors? *Current Cancer Drug Targets*. **2009**; 9(3):252-72.
128. **Raposo G, Stoorvogel W.** Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. **2013**; 200(4):373-83.
129. **Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, Venturelli E, Bianchi F, Campiglio M, et al.** Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *Journal of Cellular Physiology*. **2012**; 227(2):658-67.
130. **Wang Z, Chen J-Q, Liu J-L, Tian L.** Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *Journal of Translational Medicine*. **2016**; 14(1):1-9.
131. **Liu Q, Yu Z, Yuan S, Xie W, Li C, Hu Z, et al.** Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. **2017**; 8(8):13048.
132. **Sandfeld-Paulsen B, Aggerholm-Pedersen N, Baek R, Jakobsen K, Meldgaard P, Folkersen B, et al.** Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Molecular Oncology*. **2016**; 10(10):1595-602.
133. **Sandfeld-Paulsen B, Jakobsen KR, Bæk R, Folkersen BH, Rasmussen TR, Meldgaard P, et al.** Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. **2016**; 11(10):1701-10.
134. **Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al.** EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*. **2005**; 352(8):786-92.

135. Wu SG, Liu YN, Tsai MF, Chang YL, Yu CJ, Yang PC, et al. The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget*. **2016**; 7(11):12404.
136. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature Medicine*. **2015**; 21(6):560-2.
137. Krug A, Enderle D, Karlovich C, Priewasser T, Bentink S, Spiel A, et al. Improved EGFR mutation detection using combined exosomal RNA and circulating tumor DNA in NSCLC patient plasma. *Annals of Oncology*. **2018**; 29(3):700-6.
138. <https://egematal.ege.edu.tr/files/egematal/icerik/LC-MS1.pdf> LQ-TMSK-UZKS.
139. Lesk AM. Introduction to protein architecture: the structural biology of proteins: Oxford university press Oxford, **2001**.
140. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. **1997**; 25(17):3389-402.
141. Arınç S, Özvaran M, Güngör N, Çelik O, Soğukpınar Ö, Çolak F, et al. Hastanemizde tanı alan akciğer kanserli olguların epidemiyolojik ve histolojik özellikleri. *Akciğer Arşivi*. **2005**; 6:149-52.
142. Ünal D, Oğuz A, Sezgin Göksu S, Taşdemir A, Kurtul N, Eroğlu C, et al. Effect of prognostic factors on survival in elderly patients with non-small cell lung cancer. *Turkish Journal of Geriatrics/Türk Geriatri Dergisi*. **2014**; 17(2).
143. Günbatar H, Sertoğullarından B, Özbay B, Sünnetçioğlu A, Ekin S. Akciğer kanserli olguların değerlendirilmesi; 3 yıllık analiz. *Van Tıp Dergisi*. **2012**; 19(1):13-20.
144. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. **2007**; 132(3):29-55.
145. Samet JM. Health benefits of smoking cessation. *Clin Chest Med*. **1991**; 12(4):669-79.
146. Samet JM, Wiggins CL, Humble CG, Pathak DR. Cigarette Smoking and Lung Cancer in New Mexico1-3. *Am Rev Respir Dis*. **1988**; 137:1110-3.

- 147. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM.** International lung cancer trends by histologic type: male: female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International Journal of Cancer*. **2005**; 117(2):294-9.
- 148. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, et al.** Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *Journal of Clinical Oncology*. **2006**; 24(28):4539-44.
- 149. Ettinger DS, Aisner J.** Changing face of small-cell lung cancer: real and artifact. *American Society of Clinical Oncology*, **2006**.
- 150. Grippi MA.** Clinical aspects of lung cancer. *Seminars in roentgenology*, Elsevier, **1990**.
- 151. Glisson BS, Byers LA, Nicholson A.** Pathobiology and staging of small cell carcinoma of the lung. *UpToDate com May*. **2013**.
- 152. Seifter E, Ihde D.** Therapy of small cell lung cancer: a perspective on two decades of clinical research. *Seminars in Oncology*, **1988**.
- 153. Osterlind K, Hansen HH, Hansen M, Dombernowsky P, Andersen PK.** Long-term disease-free survival in small-cell carcinoma of the lung: a study of clinical determinants. *Journal of Clinical Oncology*. **1986**; 4(9):1307-13.
- 154. Albain KS, Crowley JJ, Livingston RB.** Long-term survival and toxicity in small cell lung cancer: expanded Southwest Oncology Group experience. *Chest*. **1991**; 99(6):1425-32.
- 155. Lassen U, Osterlind K, Hansen M, Dombernowsky P, Bergman B, Hansen HH.** Long-term survival in small-cell lung cancer: posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years--an analysis of 1,714 consecutive patients. *Journal of Clinical Oncology*. **1995**; 13(5):1215-20.
- 156. Tai P, Tonita J, Yu E, Skarsgard D.** Twenty-year follow-up study of long-term survival of limited-stage small-cell lung cancer and overview of prognostic and treatment factors. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. **2003**; 56(3):626-33.
- 157. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P.** Review the revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. **2009**; 15(1):5.

158. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*. **2013**; 2(1):20360.
159. Carnino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respiratory Research*. **2019**; 20(1):1-11.
160. Sunkara V, Woo HK, Cho YK. Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics. *Analyst*. **2016**; 141(2):371-81.
161. Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*. **1970**; 40(3):734-44.
162. Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. **2013**; 2(1):20384.
163. Couzin J. The ins and outs of exosomes: cells spit out these mysterious vesicles, but what they do and whether they boast medical uses, such as in cancer vaccines, is up in the air. *Science*. **2005**; 308(5730):1862-4.
164. Mathivanan S SR, Yayınlanmamış data.
165. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*. **2008**; 8(19):4083-99.
166. Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of Biochemistry*. **2006**; 140(1):13-21.
167. Wei D, Peng JJ, Gao H, Zhang T, Tan Y, Hu YH. ALDH1 expression and the prognosis of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Heart, Lung and Circulation*. **2015**; 24(8):780-8.
168. Wu H, Qi XW, Yan GN, Zhang QB, Xu C, Bian XW. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PloS one*. **2014**; 9(6):100-168.