



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKCİĞER ADENOKARSİNOMLARINDA
EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ
(EGFR) EXON 19, EXON 21 VE K-RAS
MUTASYONUNUN POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE, EGFR GEN
AMPLİFİKASYONUNUN FLORESAN İNSUTU
HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE BİYOPSİ VE
LOBEKTOMİ MATERYALLERİNDE
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ZELİHA ÇETİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. MUHAN ERKUŞ
AYDIN-2011

T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ ANA BİLİM DALI

**AKCİĞER ADENOKARSİNOMLARINDA
EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖR (EGFR)
RESEPTÖRÜ EXON 19, EXON 21 VE K-RAS
MUTASYONUNUN POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU (PCR) İLE, EGFR GEN
AMPLİFİKASYONUNUN FLORESAN İNSUTU
HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE BİYOPSİ VE
LOBEKTOMİ MATERYALLERİNDE
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ZELİHA ÇETİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Muhan ERKUŞ
AYDIN-2011

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-10038** nolu proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bugüne gelmemi sağlayan, tez hazırlığı sırasında bana her konuda destek olan tez danışmanım, sevgili hocam Prof.Dr.Muhan ERKUŞ'a ;

Eğitimimde büyük emeği geçen, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Nil ÇULHACI, Doç. Dr. Füzuan KACAR DÖGER, yine uzmanlık eğitimimdeki emekleri ve tez hazırlığı sırasındaki desteklerinden dolayı Doç. Dr. Canten TATAROĞLU ve Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU hocalarıma;

Bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bu çalışmayı gerçekleştirmemi sağlayarak tezimi tamamlamamda büyük katkıları olan, bana moleküler patolojiyi sevdiren GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Tbp. Kd. Alb. Hüseyin BALOĞLU'na;

Laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı personeli olan Sv1. Me. Bahtınur AKKOYUN ve Dz. Sağ. Kd. Ucv. Gökhan Burçin KUBAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgi ve destekleri ile her zaman yanımda olan, bu günlere gelmemi sağlayan sevgili anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	36
BULGULAR.....	50
TARTIŞMA.....	54
SONUÇLAR.....	58
ÖZET.....	59
SUMMARY.....	60
KAYNAKLAR.....	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
I. Akciğer Tümörleri Sınıflaması (2004, WHO)	14
II. Teksaslı cerrah Clifton Mountain tarafından tedavi ve prognozda benzerlikler temel alınarak yapılan klinik evreleme	22
III. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde evrelere göre prognoz	24
IV. FISH’da dokuların hazırlık süreleri	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
1. Gradyent özellikli Thermal Cyclers, 96 Vakalılık, marka Apollo, model ATC401, Seri No: 000634)	40
2. Agaroz jel düzeneği	42
3. Akciğer adenokarsinomunda EGFR Exon 19'un agaroz jel görüntüsü	43
4. Akciğer adenokarsinomunda EGFR Exon 21'in agaroz jel görüntüsü	44
5. EGFR gen amplifikasyonunun FISH ile saptanması	48
6. EGFR gen amplifikasyonunun FISH ile gösterilmesi	49
7. Adenokarsinom tanılı lobektomi örneğinde EGFR Exon 19 mutasyonu	50
8. Adenokarsinom tanılı lobektomi örneğinde EGFR Exon 19 mutasyonu	51
9. Adenokarsinom tanılı lobektomi örneğinde EGFR Exon 21 mutasyonu	52

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

EGFR:	Epidermal Growth Factor Reseptör (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü)
PCR:	Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
FISH:	Floresan InSutu Hibridizasyon
RTK:	Reseptör Tirozin Kinaz
KHDAK:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu
KHAK:	Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu
WHO:	World Health Organization Classification of Tumors (Dünya Sağlık Örgütü)
TNM:	Tumor, Lenf Nodu, Metastaz
AHH:	Aril Hidrokarbon Hidroksilaz
NSE:	Nöron Spesifik Enolaz
NCAM:	Nöral Hücre Adezyon Molekülü
CK:	Sitokeratin
LCA:	Lökosit Ortak Antijeni
İHK:	İmmünohistokimya
BAC:	Bronkoalveoler karsinom
UICC:	Union International Cancer Control
AJCC:	American Joint Comitte on Cancer
tRNA:	Taşıyıcı Ribonükleik asit
HGFR:	Hepatosit Büyüme Faktör Reseptörü
HGF:	Hepatosit Büyüme Faktörü
FHIT:	Fragile Histidine Triad
VEGF:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
COX-2:	Siklooksijenaz 2
EGF:	Epidermal Growth Faktör (Epidermal Büyüme Faktörü)

TGF: Transforme Edici Büyüme Faktörü

AR: Amphiregulin

HB-EGF: Heparin Bağlayan Epidermal Büyüme Faktörü

β -cel: Betasellülin

GTP: Guanosine Triphosphate

GDP: Guanosine Diphosphate

GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

rRNA: Ribozomal Ribonükleik asit

HCl: Hidroklorik asit

CISH: Kromojen İnSutu Hibridizasyon

NPCR: Nested Polimerase Chain Reaction

Rb: Retinoblastom

GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri bugün dünyada en sık görülen kanser tipidir. Kanser ölümlerinin %17,8'ini tüm kanserlerin %12,6'sını oluştururlar. K:E oranı 2,7'dir. Vakaların en sık izlenen tipleri skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomlar olup %20'si küçük hücreli karsinom, %9'u büyük hücreli/undiferansiye karsinomlardır. Histolojik tipler cinsiyete göre farklılık gösterir (Erkeklerde akciğer kanserlerinin %44'ü, kadınlarda %25'i skuamöz hücreli karsinomdur. Erkeklerde vakaların %28'i, kadınlarda %42'si adenokarsinomlardır). Asya ve Kuzey Amerikalı erkekler arasında adenokarsinomun insidansı skuamöz hücreli karsinomdan daha fazladır. Kadınlarda Polonya ve İngiltere dışında adenokarsinom her yerde baskın histolojik tiptir. Akciğer kanserlerinde major risk faktörü sigaradır. Akciğer kanserli olguların erkeklerde %85'i, kadınlarda %47'si sigara içicisidir.

Sigara içimi sırasıyla skuamöz hücreli karsinom, küçük hücreli karsinom, adenokarsinom riskini artırır. Ayrıca asbestos, silika kristalleri, radon, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve ağır metaller akciğer karsinogenezinde önemlidir (1).

Moleküler patoloji, tanıyı optimize etmek, tedaviyi ve prognozu belirlemek için standart patolojik parametrelere ek olarak genetik verilerin kullanımı olarak tanımlanabilir. Moleküler biyoloji, son dekatlarda patolojide, özellikle onkolojik patolojide ana temel bilimlerden biri haline gelmiştir (2).

Moleküler teknikler hastalık fenotipini değerlendirmeksizin doku analizine ve tanıya ulaşmayı sağlayan güçlü tekniklerdir. RNA veya DNA düzeyindeki anormallikleri tespit ettikleri için sensitif ve spesifiktir. Şu an birçok hastalığın doğuştan veya sonradan kazanılmış olsun, genetik bir temeli vardır. Dolayısı ile bu teknikler neoplastik hastalıkların, enfeksiyöz hastalıkların, kalıtsal hastalıkların tanılarında ve kimlik tayini gibi birçok alanda kullanılırlar (2).

Rekombinant DNA teknolojisinin tıp alanındaki uygulamalarında oldukça büyük yol alınmıştır. İnsan genom projesinin tamamlanması ile birlikte DNA problemleri hem genetik hem edinsel insan hastalıklarının tanısı için faydalı araçlar haline gelmiştir. Moleküler tanı tekniklerine tıbbın hemen tüm alanlarında başvurulabilir. Bu alanlar şunlardır:

- Genetik hastalıklarının gelişiminin temelindeki kalıtsal olarak aktarılan mutasyonları, doğum öncesi veya doğum sonrasında saptamak
- Neoplazilerin gelişiminin temelinde yer alan edinilmiş mutasyonları saptamak

- Özellikle hematopoetik sistemden kaynaklanan neoplazmların doğru tanısı ve sınıflandırılması
- HIV hastalığı dahil olmak üzere enfeksiyöz hastalıkların tanısı
- Organ nakli, babalık testi ve adli tıp uygulamalarında akrabalık ilişkileri ve kimliğin belirlenmesi (3).

Çalışmamızda akciğer adenokarsinomlarında hedefe yönelik tedaviyi belirlemede önemli olan EGFR exon 19 ve exon 21 ile K-ras gen mutasyonlarının biyopsiler ile rezeksiyon materyallerinde karşılaştırmalı durumu değerlendirilmiştir. Ayrıca EGFR gen amplifikasyonu FISH yöntemi ile biyopsiler ile rezeksiyon materyallerinde karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

GENEL BİLGİLER

AKCİĞERLERİN EMBRİYOLOJİSİ

Alt solunum sistemi, dördüncü haftanın ortalarında primordial farinksin zeminindeki laringotrakeal oluktan gelişmeye başlar. Oluk derinleşerek bir laringotrakeal divertikül oluşturur ve bu divertikül de, trakeözefageal katlantılar ile ön barsaktan ayrılarak trakeözefageal septum oluşturur. Bu bölme özofagus ve laringotrakeal tübün oluşumu ile sonuçlanır. Laringotrakeal tübün endodermi alt solunum organlarının epitelini ve trakebronkiyal salgı bezlerini oluşturur. Tübü çevreleyen splanknik mezenkim, bu organların bağ dokusunu, kıkırdak, kas, kan ve lenf damarlarını oluşturur. Laringotrakeal tübün distal ucunda, dördüncü haftada bir akciğer tomurcuğu gelişerek beşinci haftanın başlarında iki bronşial tomurcuğa bölünür. Bronşial tomurcuklar büyüyerek birer “primer” veya “ana bronş” oluşturur. Her bir primer bronştan da sekonder bronşları oluşturmak üzere iki yeni bronş tomurcuğu meydana gelir. Sağ alt sekonder bronş iki bronşa ayrılır. Sekonder bronşlar, gelişmekte olan akciğerlerin loblarını desteklerler. Bronşlar dallanmaya devam ederek “segmental bronşları” oluşturur. Her bir segmental bronş, kendisini çevreleyen mezenkimle birlikte bronkopulmoner segmentin başlangıç halini oluşturur. Onyedinci sıra boyunca dallanma işlemi devam ederek, doğumdan sonra dallanma 24 sıra oluncaya dek ek hava yolları oluşur.

Akciğer gelişimi dört evreye bölünür. Psödoglandüler evre (5-17. haftalar arası) bronşlar ve terminal bronşiollelerin oluşumunu kapsar. İkinci evre Kanaliküler evre (16-25. haftalar arası) olup, bronşların ve terminal bronşiollelerin lümenleri büyür, respiratuvar bronşiolle ve alveoler kanallar gelişerek akciğer dokusu yüksek oranda damarlı hale gelir. Terminal kese evresi (24. haftadan doğuma kadar) alveolar kanallardan terminal keselerin

(primordial alveoller) oluşumunu içerir. Başlangıçta kübik epitel ile kaplı olan terminal keseler yirmialtıcı hafta civarında epitelin incilmesi ile yassı epitele dönüşür. Geç fetal dönemden akciğerlerin olgunlaştığı sekizinci yaşa kadar süren “alveolar evre” ise akciğer gelişiminin son evresidir. Bu evrede respiratuar bronşiollelerin ve ilkel alveollerin sayısı artar (4).

ANATOMİ

Akciğerler toraks boşluğu içinde yerleşmiş, inspirasyon havası ile kan arasındaki gaz değişiminin yapıldığı asıl solunum organlarıdır. Mediastinum ile birbirinden ayrılmış iki akciğer vardır. Sağ akciğer yaklaşık 625 gr, sol akciğer yaklaşık 565 gr. ağırlıktadır. Akciğerler hilus pulmonalis dışında tamamen visseral plevra ile sarılmışlardır ve her bir akciğer hareket edebildiği bir plevra boşluğu içine yerleşmiştir. Akciğerler koni şeklindedir. Apeks, basis, üç kenar ve iki yüz içerirler. Apeks pulmonalis: 1. kostal kırkırdan 3-4 cm yukarı, boyun köküne doğru yükselir ve bu bölümünü plevra servikalis örter. Apeksin komşulukları plevra aracılığı ile dir. Ön yüzü; a. subklavia, arka yüzü; ganglion servikalis inferior, 1. torakal sinirin ventral ramusu ve a. interkostalis superior, dış yüzü; m. skalenius medius, iç yüzü; sağda trunkus brakiosefhalikus, sağda v. brakhiosefhalika ve trakea, solda a. subklavia sinistra ve sol v. brakhiosefhalika ile komşudur. Basis pulmonalis: Akciğerlerin alt yüzleri karaciğerden dolayı sağda daha fazla olmak üzere konkavdır ve diyafragmanın üstüne otururlar. Kostal yüz: Toraks boşluğu duvarlarının iç yüzüne uyan bir konveksitesi vardır. İç yüz: Arkada vertebral ve önde mediastinal olmak üzere iki kısımdan oluşur. Mediastinal yüzün ortasında, içinde kalbin yer aldığı impressio kardiaka denilen çukur bulunur. Bunun üst arka kısmında ise, radiks pulmonalisin yer aldığı hilus vardır. Mediastinal plevranın radiks pulmonalisi sardıktan sonra, iki akciğer arasında enine olarak diyafragmaya doğru sarkan bu uzantılarına ligamentum pulmonale denir. Bu oluşumlar dışında, mediastinal yüzde her iki akciğerde farklı olmak üzere bazı çukur ve izler vardır. Alt kenar: Tabanı kostal yüzden ayıran keskin bir kenardır. Alt kenarlar recessus kostodiafragmatikus içine girerler. Resessusun kostal kenarından 10 cm. yukardadır. Ön kenar: En keskin kenarlardır. Solda, kalbin ön yüzünde geniş bir çentik bırakır. Kalbin matite alanının bulunduğu bu çentiğe insisura kardiaka denir. Fissur ve loblar: Akciğerler radiks pulmonalise kadar giden derin fissurlarla loblara ayrılmıştır. Visseral plevra fissurların dibine kadar uzanarak, lobları birbirinden ayırır.

Sağ akciğer: İki fissurla üç loba ayrılmıştır. Fissura obliqua, orta ve alt lobları ayırır. Akciğer arka kenarını 4. torakal vertebra düzeyinde keser, mediastinal yüzü çaprazlayıp, hilusun altında sonlanır. Fissura horizontalis, üst ve orta lobları birbirinden ayırır, mid-aksiller hatta fissura oblikadan başlar, 4. kosta kıkırdağın sternal uç noktasında sonlanır.

Sol akciğer: Fissura obliqua ile alt ve üst olmak üzere iki loba ayrılır. Fissur hilusun üst ve arka kısmından başlar, mediastinal yüzü önden arkaya çaprazlayarak hilusun altında sonlanır. Üst lob fissurun üst ve önünde, alt lob alt ve arkasında bulunur. Üst lobun insisura kardiakanın altında kalan ön bölümüne “lingula” denir. Radiks pulmonis: Hilustan akciğere giren ve çıkan yapıların tamamına verilen addır. Bu oluşumların heriki akciğerdeki dizilimleri farklıdır. Sağ akciğer; bronkus lobaris superior, a.pulmonalis, bronkus lobaris medius, vv. pulmonalis. Sol akciğer; a.pulmonalis, bronchus principalis sinister, vv. pulmonalis.

Akciğerin damarları: Akciğere hem akciğeri beslemek için (vasa privata), hem de vücuttaki kirli kanı temizlemek için (vasa publica) kan gelir. A. pulmonalis: Venöz kanı akciğerlere getirir, segmental bronkuslarla birlikte dağılır ve akciğeri besler. Bunların kapillerleri ile alveol havası arasında oksijen-karbondioksit değişimi gerçekleşir. Aa. bronchiales: trakeobronkial ağaç, akciğerin kendi dokusu, plevra ve pulmoner damarların duvarlarını beslerler. Sağda bir, solda iki tane bronkial arter vardır. Sağdaki çoğunlukla interkostal arterden çıkar, soldakiler aorta desendensden doğarlar. Vv. pulmonales: oksijenli kanı akciğerden sol atriuma taşırlar. Her bronkopulmoner segment içinde bir ven oluşur. Bu ven bronkusun önündedir. Akciğerlerden sağda ve solda ikişer Vv. Pulmonales çıkar. Pulmoner venler intersegmental karakterdedir. Vv. bronchiales: Bronkusların büyük dallarından başlarlar. Sağ bronkial ven v. azigosa, sol bronkial ven v. hemiazigos aksesoryusa dökülür.

Akciğerlerin innervasyonu: Akciğer ve visseral plevranın duyu lifleri n. vagus içinde giderler. Ağrı duyusu yoktur. Solunumun refleks kontrolü, öksürük refleksi ve kan basıncı ayarlanmasında rol oynarlar. Parasempatikler n. vagusdan, sempatikler ise torakal 1-5. segmentlerden gelir. Akciğerin lenf yolları yüzeyel ve derin iki pleksusdan dökülür. Akciğer içinde küçük pulmoner nodlardan geçerek hilusa doğru yönelir. Bronkusların çevresindeki nodi lenfatiki bronkopulmonaleyi geçerek trakeabronkial nodlara ulaşır. Alveollerin duvarında lenf kanalcıkları yoktur.

Plevra: Her bir akciğeri ayrı ayrı saran seröz bir zardır. Toraks duvarı, mediasten ve diyafragmanın üst yüzünü örten kısmına parietal plevra, akciğerlerin dış yüzünü saran kısmına visseral plevra denir. İkisi arasındaki boşluğa kavum plevralis denir. Parietal plevranın değişik kısımları vardır. Kostal plevra, mediastinal plevra, servikal plevra, diyafragmatik plevra gibi isimler alırlar. Plevranın arter ve venleri: Parietal plevrayı, a.interkostalis, a.torasika interna, ve a.frenika superiordan çıkan dallar besler. Venleri aynı isimli venlere dökülür. Visseral plevrayı a.bronkialis dalları besler. Venleri pulmoner venlere dökülür. Plevranın sinirleri: N.interkostalisler, n.torakoabdominalis, n.subkostalis ve n.frenikus dalları parietal plevranın duyusunu taşırlar. Dokunma ve ısı uyarıları parietal plevrada ağrı oluşturur. Visseral plevranın sinirleri plexus pulmonalisden gelir. Ağrı duyusu yoktur (5).

AKCİĞERLERİN HİSTOLOJİSİ

Akciğerler loblara bölünmüş intratorasik organlardır. Sağ akciğer, üst, orta ve alt olmak üzere 3 lobdan, sol akciğer, üst ve alt olmak üzere 2 lobdan oluşur. Loblar bronkopulmoner segmentlere bölünür. Sağ akciğer 10, sol akciğer ise 9 bronkopulmoner segmentten oluşur.

Loblar fissurlarla ayrılır ve plevra bu fissurların içine doğru uzanım gösterir. Segmentler ise bölünmez. Havayolları trakeadan respiratuvar bronşiole kadar yaklaşık 20 kez fissurlarla dallanma gösterir. Havayolları, duvarında kas ve döşeyici epitel bulunan tübüler yapılar şeklindedir. Bronşlar, çapı 1 mm'den büyük, duvarında kıkırdak bulunan hava yollarıdır. Kıkırdak, bronşların kollabe olmasını önler. Bronşiooller ise 1 mm'den küçük hava yollarıdır ve duvarında kıkırdak bulunmaz. Terminal bronşiooller, respiratuvar olmayan bronşioollerdir, respiratuvar bronşioollerin proksimalinde yer alırlar. Respiratuvar bronşiooller alveol kesecikleri ile devam ederler. Hava yollarını döşeyen hücreler şunlardır; bazal hücreler, Kulchitsky's hücreleri, silialı hücreler, seröz hücreler, Klara hücreleri, goblet hücreleri, intermediate hücreler ve fırçamsı hücreler. Terminal bronşiole yaklaştıkça, goblet hücreleri ve silialı hücrelerin sayısı azalır, Klara hücreleri ise artar, mukoza daha az kolumnar, daha kuboidal bir görünüm kazanır. Klara hücrelerinin sekretuar fonksiyonları vardır, bronşiooller hasardan sonra progenitör hücre gibi hareket ederler. Kulchitsky's hücreleri, nöroendokrin sistemin bir parçasıdır, daha çok dallanma alanlarında görülür. Submukozal glandlar, seröz ve muköz hücrelerden oluşup, geniş bronşlarda bulunurlar. Geniş hava yollarının duvarlarında, ganglia, sinir ve bronşial arterler bulunur. Lambert's kanalları, bronşiooller ve komşu alveoler

parankim arasında ilişki sağlar, histolojik kesitlerde nadiren görülür. Lobül ve asinus: Akciğer lobülleri makroskobik olarak gözle görülebilir ve akciğerin küçük anatomik subünitleridir. Bağ dokusundan oluşan interlobüler septalarla ayrılır. Lobüllerin çapı yaklaşık 2 cm kadardır. Bir akciğer lobülü 3-5 asinusdan oluşur. Terminal bronşiollerin distali asinus olarak adlandırılır. Asinuslar; respiratuvar bronşiol, alveoler kanal ve alveoler keseciklerden oluşur. Akciğerin fonksiyonel subünitleri olan asinuslar, gaz alışverişinin yapıldığı yerlerdir. Alveoller, skuamöz (tip 1 pnömosit) ve kuboidal (tip 2 veya granüler pnömosit) epitelyal hücreler ile döşeli olup, gaz alışverişi tip 1 hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir. Tip 2 hücreler, tip 1 hücreler için progenitördür, sürfaktan üretir ve travmadan sonra sayıları artar. Makrofajlar alveol yüzeyinde sıklıkla görülür. Alveoler duvar (septa); kapiller damar endoteli, bazal membran ve çevre interstisyel alan ile alveoler epitel ve alveoler makrofajlardan oluşur. Alveoler duvarda çok sayıda Kohn porları bulunur. İnterstisyel alan, kollajen, elastik lifler, mezenkimal hücreler ve birkaç inflamatuvar hücre içerir. Yetişkinlerde bu alan normalde belirgin değildir. Çocuklarda interstisyel genişleme ve artmış sellülarite normal histolojik bulgudur (3,5,6).

AKCİĞERLERİN FİZYOLOJİSİ

Solunumun asıl amacı, dokulara oksijen sağlayıp, karbondioksiti dokulardan almaktır. Solunum dört bölümde incelenebilir. 1) “Pulmoner ventilasyon”; atmosfer ve alveoller arasında hava alışverişidir. 2) Alveol ve kan arasında oksijen ve karbondioksit değişimi “difüzyon” olarak adlandırılır. 3) Oksijen ve karbondioksitin kan ve vücut sıvıları ile dokulara taşınması “transport”tur. 4) Solunumun düzenlenmesini içerir (7).

Ventilasyon: Ventilasyon kapasitesi akciğer volümüne, akıma karşı havayolları direncine, göğüs duvarı ve akciğerlerin kompliyansına bağlıdır. Akım olmadığı zaman, ağız basıncı ve alveolar basınç eşittir. İnspirasyon sırasında, diyafragma aşağıya inerek, toraks genişler, böylece, göğüs kafesi volümü ve akciğerlerin volümü artar. Ekspirasyon ise pasif bir olay olup, göğüs duvarı ve akciğerlerin elastik geri dönüşüne bağlıdır. Plevral boşluk basıncı negatiftir ve inspirasyon sırasında akciğerlerin genişlemesine neden olur. İntraplevral basınç, apekten tabana doğru artar. Bu fark bölgesel ventilasyon ve perfüzyon üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Pulmoner perfüzyon ise, dik pozisyonda tabandan tepeye doğru artar. Alveol epitelindeki tip 2 pnömositlerden salgılanan sürfaktan alveol yüzeyini örten sıvının yüzey gerilimini azaltır. Alveollerin çapları küçüldükçe yüzey geriliminin kollabe edici etkisi artar. Alveolar çap küçüldükçe, alveolü genişlemiş durumda tutmak için gereken basınç artar.

Sümfaktan, alveolleri stabilize edici etkisi ile, alveoller küçüldükçe, yüzeydeki sümfaktan yoğunluğu artarak, yüzey gerilimini azaltır. Alveol genişledikçe yüzeyindeki sümfaktan tabakası incelerek, yüzey gerilimi büyür. Bu etki, akciğerlerin her yerinde alveol çapının hemen hemen aynı olmasını sağlar. Ayrıca sümfaktanın, alveollerde ödem sıvısı birikimini önleyici rolü vardır. Difüzyon: Normal solunumda, inspire edilen hava solunum yollarını doldurarak, terminal bronşiollele kadar iner. Solunan havanın çok küçük bir bölümü alveollere ulaşabilir. Alınan hava terminal bronşiollelerden alveollere kadar difüzyon ile ulaşır.

Difüzyon, moleküllerin kinetik hareketleri ile, gaz moleküllerinin hızlı yer değıştirmesinden doğar. Gaz moleküllerinin hareket hızları çok yüksek olduğundan, terminal bronşiollelele alveoller arasındaki mesafeyi saniyenin çok kısa bir bölümü içinde alırlar. Alveollere gelen hava içindeki oksijenin kana karbondioksitin pulmoner kandan alveol içine geçişı de yine difüzyonla olmaktadır. Solunum fizyolojisininde oksijen, nitrojen ve karbondioksitten oluşan gaz karışımı söz konusudur. Bu gazların her birinin difüzyon hızı, parsiyel basınçları ile doğru orantılıdır. Difüzyon için, solunum gazlarının alveollerdeki gaz fazından, pulmoner arterdeki erimiş faza geçmeleri gerekir. Her gazın parsiyel basıncı moleküllerini eriyik içine girmeye zorlar. Pulmoner sıvılardaki erimiş moleküller de, sıvı ile gaz fazı arasındaki yüzeye çarparak alveole geri döner. Oksijen alveollerden pulmoner kana geçerek bütün vücuda yayılır. Karbondioksit difüzyonu ile oksijen difüzyonu arasında önemli bir fark vardır. Karbondioksitin difüzyon hızı oksijenden 20 kat daha fazladır. Bu yüzden, karbondioksitin difüzyonu için gerekli basınç farkı, oksijene göre daha azdır. Difüzyon hızı oksijenden 20 kat daha fazladır. Bu yüzden, karbondioksitin difüzyonu için gerekli basınç farkı, oksijene göre daha azdır. Difüzyon hızını etkileyen bazı parametreler vardır; 1) solunum membranının kalınlığı, 2) membranın yüzeyi, 3) membranın içinde yani, suda gazın difüzyon katsayısı, 4) membranın iki yanı arasındaki basınç farkıdır.

Transport: Alveollerden pulmoner kana difüzyon ile geçen oksijenin % 97'si eritrositlerde hemoglobin ile kimyasal bileşik halinde, % 3'ü ise plazmada erimiş halde taşınır. Oksijen molekülü gevşek ve reversibl olarak hemoglobinin hem kısmına bağlanır. Pulmoner kapillerde, yüksek oksijen basıncında oksijen hemoglobine bağlanır. Doku kapillerinde ise, oksijen basıncı düşük olduğundan oksijen hemoglobinden ayrılır. Bu olay, oksijenin akciğerlerden dokuya taşınmasının temelini oluşturur. Doku hücrelerinde oksijen çeşitli maddelerle reaksiyona girerek büyük miktarda karbondioksit oluşturur. Karbondioksitin doku hücrelerinden difüzyonu gaz halinde olur. Kana geçen karbondioksit,

kimyasal maddelerle birleşerek taşınır. Bu, karbondioksit taşınmasını 15-20 kat artırır. Karbondioksitin küçük bir kısmı ise erimiş halde taşınır. Karbondioksit, kanda karbonik anhidraz enzimi etkisi ile su ile reaksiyona girerek karbonik asit oluşturur. Bu olay, eritrositlerde saniyenin çok kısa bir bölümünde oluşarak dengeye ulaşır. Karbonik asit, kısa süre içerisinde hidrojen ve bikarbonat iyonlarına ayrışır. Hidrojen iyonlarının büyük bir bölümü eritrositlerde hemoglobin ile birleşir. Eritrosit membranındaki özel bir taşıyıcı protein yardımı ile, klor iyonları eritrosite, bikarbonat iyonları da plazmaya geçer. Bu reaksiyon karbondioksit taşınmasında en önemli rolü oluşturur. Karbondioksit, hemoglobin ile de direk reaksiyona girerek karbaminohemoglobin bileşiğini oluşturur. Bu reaksiyon zayıf bağlarla gelişen reversibl bir reaksiyondur. Karbondioksit bu yüzden, parsiyel basıncının daha düşük olduğu alveollerde serbestlenir. Karbondioksitin çok küçük bir miktarı, aynı şekilde plazma proteinleri ile de birleşir.

Solunum regülasyonu: Alveolar ventilasyon hızı, sinir sistemi tarafından vücudun ihtiyaçlarına göre ayarlanır. Solunum merkezi, medulla oblongata ve ponsda dağınık ve iki taraflı olarak yerleşim gösteren nöron gruplarından oluşur. Bu merkez 3 büyük alandan oluşur; dorsal solunum grubu, ventral solunum grubu ve pnömotaksik merkezdir. Solunumun denetlenmesinde esas rolü dorsal solunum grubu nöronları oynar (7,8).

AKCİĞER TÜMÖRLERİ

İnsidans ve Epidemiyoloji

Akciğer kanseri günümüzde en yaygın görülen kanserdir ve batı ülkelerinde 20.yy boyunca insidansı giderek artmıştır. Çoğunlukla 50-70 yaşları arasında görülmektedir (9).

Akciğer kanserinin prognozu kötüdür. Hastaların sadece %10-15'i 5 yıl veya daha uzun bir süre yaşamaktadır. Prognoz, kanserin hücre tipine ve klinik evreye bağlıdır (10). Genel ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır(9).

Kanser ölümlerinin %17,8'ini tüm kanserlerin %12,6'sını oluştururlar. K:E oranı 2,7'dir. Kadınlarda da insidansı giderek artmaktadır. Vakaların en sık gözlenen tipleri adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom olup %20'si küçük hücreli karsinom, %9'u büyük hücreli/undiferansiye karsinomlardır. Erkeklerde akciğer kanserlerinin %44'ü, kadınlarda %25'i skuamöz hücreli karsinomdur. Kadınlarda akciğer kanserlerinin %42'si, erkeklerde %28'i adenokanserlerdir.

Asya ve Kuzey Amerikalı erkekler arasında adenokarsinomun insidansı skuamöz hücreli karsinomdan daha fazladır. Kadınlarda Polonya ve İngiltere dışında adenokarsinom

her yerde baskın histolojik tiptir. Kemoterapi, radyasyon tedavisi, cerrahi girişimler ve uygulamalardaki tüm gelişmelere rağmen, akciğer kanserli bireyler için en uzun yaşam süresi 5 yıldır. Bu düşük yaşam oranı için en önemli neden, pek çok akciğer kanserinin ileri evrede saptanmasıdır. Düşük yaşam oranının diğer bir nedeni; primer akciğer tümörünün eksik tedavi edildiği bireylerde yüksek sıklıkta ikincil tümörlerin ortaya çıkmasıdır (Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu olan bireylerde %2, küçük hücreli akciğer karsinomu olan bireylerde %4-%6) (11).

Akciğer kanserinin, karsinojenlere maruz kalma sonucunda oluşan, çok basamaklı tümörögenез sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Metastaz, invazyon, sürekli anjiogenez, hücre ölümünden kaçış, immortalizasyon ve hücre büyümesinde etkili düzenleyici genler, tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki genetik-epigenetik değişiklikler, akciğer kanseri gelişimi ile ilgili moleküler olaylardır.

Akciğer kanseri gelişimi, akciğerin özellikle genomik kararsızlığa neden olan karsinojenlere maruz kalması ile tetiklenir. Akciğer dokusundaki bu değişikliklerin direk ölçümü ve akciğer tümörögenез yolları ile ilgili bilgiler, karsinojenlere maruz kalan bireylerde kanser riskini değerlendirmeye, erken teşhise, bireyler için en uygun tedavi yaklaşımını tanımlamaya yarar. Akciğer tümörlerinin moleküler özellikleri hakkındaki bilgiler, aynı zamanda hasar görmüş hücresel yollara yönlendirilerek tedaviye olanak sağlamaktadır (11).

EGFR büyüme faktör reseptörüdür. Birçok kanserde EGFR (Her 1/neu) gen amplifikasyonu ya da protein aşırı ekspresyonu bulunmuştur. Günümüzde bazı tümörlerde EGFR reseptör bölgelerinin bloke edilmesinin klinik faydası gösterilmiştir. Akciğer kanserlerinde de hedefe yönelik tedavi uygulamaları yaygınlaşmaktadır. Akciğer adenokarsinomlarında EGFR mutasyonunun görülmesi tümörün EGFR kinaz inhibitörleri olan Gefitinib, Erlotinib tedavisine duyarlı olduğunu göstermektedir (12-14).

Etiyoloji

Sigaraya maruz kalma, hava kirliliği, radon, asbestos, arsenik, vinil klorid, hardal gazı, krom, nikel, metaller ve organik kimyasallara maruz kalma akciğer kanserinin temel etyolojik faktörleridir. Sigara içmeyenlerde asbeste maruz kalımı akciğer kanserini 5 kat arttırmaktadır. Ağır sigara içimi olan ve asbeste maruz kalanlarda akciğer kanseri riski sigara içmeyen ve asbeste maruz kalmayanlara göre 55 kat artmaktadır (3,11).

Sigara akciğer kanserini tetikleyen en önemli faktördür. Sigara, hem gaz hem de katran fazda akciğerlerde dağılan 4000' den fazla kimyasal bileşiği içerir. Bu bileşiklerin 40'ından fazlası karsinojen olarak tanımlanmıştır. Sigara içimine kronik maruz kalmanın, akciğer kanseri olgularının %90'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sigara içiminin süresi ve yoğunluğu akciğer kanseri riski ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin 20 yıl kadar sigara içen bireylerin akciğer kanserine yakalanma riski yaklaşık %10'dur. Sigaraya ara vermenin akciğer kanseri riskini azalttığı düşünülmektedir. Üstelik sigaraya ara verme kanser riskinin sadece yarısını azaltabilir. Bu nedenle; yeni akciğer kanseri olgularının %50'sinden fazlası daha eski sigara içicilerinde ortaya çıkmaktadır. Skuamöz hücreli kanserlerin %90'ı ve küçük hücreli kanserlerin büyük bir kısmında sigara çok önemli bir faktör iken; adenokarsinomlarda bu oran %40 kadardır (9). Uranyumun parçalanma ürünleri ve radon radyasyon etkisi ile akciğer kanserini tetikleyen faktörler arasında yer almaktadır. Tüberküloz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akciğer infarktı, silikozis, fibrozis gibi akciğer hastalıkları ve viral infeksiyon geçirmiş kişilerin kansere yakalanma olasılığı oldukça yüksektir. P-450 sisteminde bulunan Aril Hidrokarbon Hidroksilaz (AHH) enziminin yüksek aktivite gösterdiği kişilerde, akciğer kanser riski 8 kat kadar artmaktadır (9).

AKCİĞER KANSERİ GELİŞİMİNİN MOLEKÜLER YOLAKLARI

Akciğer karsinomları diğer anatomik bölgelerdeki pek çok kanser gibi aşamalı gelişen genetik değişiklikler sonucu benign bronşial epitelin neoplastik dokuya transformasyonu ile meydana gelir. Moleküler değişikliklerin sırası gelişigüzel değildir. Kansere doğru histolojik ilerleme ile paralel olan ve önceden tahmin edilebilen bir sıra izler. Kromozom 3p de olduğu varsayılan tümör supressör gen inaktivasyonu çok erken bir olay iken, p53 mutasyonu ya da K-ras onkogen aktivasyonu nispeten daha geç meydana gelir. Kromozom 3p materyal kaybı gibi genetik değişiklikler akciğer kanseri olan kişilerin kanserli alan dışı benign bronş epitellerinde görülebildiği gibi akciğer kanseri olamayan sigara içicilerinin respiratuar epitellerinde de görülür. Bu durum karsinojene maruz kalma sonucunda respiratuar epitelde geniş alanların mutasyona uğradığını göstermektedir. Özellikle sigara içmeyen uzak doğulu kadınlarda görülen adenokarsinomun bir alt tipinde EGFR mutasyonunun aktivasyonu izlenir. Özellikle bu tümörler EGFR-mutant kanser hücrelerinin aktive onkojenlere bağımlı olmaları nedeni ile EGFR sinyalizasyonunu inhibe eden bir grup ajandan son derece kolay etkilenirler (3).

Akciğer kanserleri uzun zaman içerisinde geliştiği için, tek bir olguda karşılaşılan genetik değişiklik sayısı son derece fazladır. Ayrıca büyüme faktörü ve reseptörlerini (HER2/neu, EGFR, MET, insülin büyüme faktörü reseptör genleri vb.) kodlayan genlerde, BCL-2 ve telomeraz genlerinde, epigenetik değişikliklere rastlanmaktadır. Hanahan ve Weinberg, akciğer tümör gelişimi sırasında etkili 6 temel yolağın olduğunu ileri sürmüştür (2000). Bunlar; büyüme sinyallerindeki kendi kendine yeterliliği artırma (büyüme faktörü reseptöründeki değişiklikler vb.), antibüyüme sinyallerine duyarsızlık (Rb kontrol yolağındaki defektler vb.), apoptozdan kaçma (p53 veya Bcl-2'deki değişiklikler vb.), çoğalma potansiyelindeki sınırsızlık (sürekli telomeraz ekspresyonu vb.) , sürekli anjiyogenez (vasküler endotelial büyüme faktörünün upregülasyonu vb.), doku invazyonu ve metastazdır (integrin ekspresyonundaki değişiklikler vb.) (11).

Klinik

Bütün tiplerin sigara içimi ile ilişkisi olmakla birlikte, skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom ile sigara arasındaki ilişki daha kuvvetlidir. Adenokarsinom ise, kadınlarda ve sigara içmeyenlerde en sık görülen tipdir. Akciğer kanserleri, agresif davranış gösteren, lokal invazyon ve metastaz yapabilen tümörlerdir. Küçük hücreli karsinom en sık metastaz yapan tipdir. Başta karaciğer, adrenaller, beyin ve kemik olmak üzere hemen her organa metastaz yapabilirler.

Klinik olarak, öksürük, kilo kaybı, göğüs ağrısı ve dispne en sık görülen semptomlardır. Ayrıca, tümör yayılımına bağlı lokal etkiler görülebilir. Bunlar; pnömoni, abse, plevral efüzyon, disfaji, diyafragma paralizisi, kostalarda destrüksiyon, superior vena kava sendromu, Horner sendromu, perikardit ve perikardial tamponatdır. Başta küçük hücreli olmak üzere bütün tipler, sentez ettikleri biyoaktif maddeler ile paraneoplastik sendroma neden olabilirler. Bunlar arasında hiponatremi, Cushing sendromu, hiperkalsemi, hipokalsemi, jinekomasti ve karsinoid sendrom sayılabilir. Bunlara ek olarak, bazı sistemik bulgular karşımıza çıkabilir. Bunlar ise, Lambert-Eaton myastenik sendromu, periferik nöropati, akantozis nigrikans gibi dermatolojik anormallikler, lökomoid reaksiyon ve hipertrofik pulmoner osteoartropatidir (3).

TANISAL BELİRTEÇLER

Nöroendokrin belirteçler: Nöroendokrin hücrelerinin hiperplastik veya neoplastik proliferasyonu, lezyonlara/tümörlere neden olur. Nöroendokrin fenotipi olan tümörler, Nöron Spesifik Enolaz (NSE), Kromogranin, Synaptophysin ve Nöral Hücre Adezyon Molekülü (NCAM/CD56) gibi belirteçler ile tanımlanır (15).

Sitokeratinler : Sitokeratinler (CK), epitel hücrelerde karakteristik olarak bulunan intermediate filamentlerin bir ailesidir. CK özellikle karsinomanın teşhisini doğrulamada önemlidir. CK7/CK20 immünohistokimya paneli; akciğerde metastatik adenokarsinomayı ayırt etmek için kullanılır (15) .

Tiroid transkripsiyon faktörü-1 (TTF-1) : TTF-1, akciğerin bronkoalveoler hücrelerinde ve tiroidin foliküler ve parafoliküler C hücrelerinde, doğumdan sonra eksprese edilen nükleer bir proteindir. Akciğer neoplazmlarında; TTF-1 ekspresyonu adenokarsinomalarda %80'in üzerinde; skuamöz hücreli karsinomalarda ise % 5-40 oranında gözlenir (15).

AKCİĞER TÜMÖRLERİNİN KLASİFİKASYONU

Tümör klasifikasyonu tedavi yönetimi açısından çok önemlidir. Akciğer tümörlerinin en son sınıflaması 2004 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılmıştır. Bu klasifikasyonda, akciğer tümörleri malign epitelyal tümörler, benign epitelyal tümörler, lenfoproliferatif tümörler, diğer tümörler ve metastatik tümörler olmak üzere 5 ana gruba ayrılmıştır. Ayrıca bu tümör tiplerinin çeşitli subgrupları da tanımlanmıştır.(Tablo I) (16).

Tablo I: Akciğer Tümörleri Sınıflaması (2004, WHO)

MALİGN EPİTELYAL TÜMÖRLER	BENİGN EPİTELYAL TÜMÖTLER	LENFOPROLİFERATİF TÜMÖRLER	DİĞER TÜMÖRLER	METASTATİK TÜMÖRLER
Skumöz hücreli karsinom	Papillomlar	MALT tipi marginal zon B hücreli lenfoma	Hamartom	
KHK	Adenomlar	Diffüz büyük B hücreli lenfoma	Sklerozan hemanjiom	
Adenokarsinom		Lenfomatoid granulomatosis	Şeffaf hücreli tümör	
Musin üreten solid adenokarsinom		Langerhans hücreli histiositozis	Germ hücreli tümörler	
Büyük hücreli karsinom			İntrapulmoner timoma	
Adenoskuamöz karsinom			Melanoma	
Sarkomatoid karsinom				
Karsinoid				
Tükrük bezi tümörleri				
Preinvaziv lezyonlar				
Mezenkimal tümörler				

Akciğer karsinomlarının 4 majör tipini skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom oluşturur. Akciğer karsinomları klinik olarak, metastaz yetenekleri ve terapiye verdikleri cevaba göre 2 grupta incelenir. Küçük hücreli karsinom (yüksek oranda metastatik ve kemoterapiye iyi cevap verir), küçük hücre dışı akciğer karsinomları (daha az metastaz yapar, kemoterapiye daha az cevap verir) (3, 9, 17). Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %25-40'ı skuamöz hücre grubundandır. Bunlar merkezi olarak yerleşmiştir ve çapı 4 cm'den büyüktür. Kavitasyon %82 üzerindedir. Merkezi yerleşimleri nedeni ile lobar veya segmental çöküntü yaygındır (9).

Adenokarsinomalar; çapı 4cm'den daha az olan periferik tümörlerdir ve tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %25-40'ını oluştururlar. Küçük hücreli akciğer kanseri tüm akciğer kanserlerinin %18'ini oluşturur. Büyük hacimli hilar ve mediastinal lenfadenopati

yaygın olarak bulunur (9). Adenokarsinomanın bir alt tipi olan bronkoalveoler karsinoma ise tüm akciğer kanserlerinin %2-10'unu oluşturur (9).

Büyük hücreli karsinoma küçük hücreli karsinomanın görünümüne sahip olmayan farklılaşmış tümörlerdir. Tüm akciğer kanserlerinin %5-10'unu oluşturur (9).

Adenoskuamöz karsinoma tüm akciğer kanserlerinin %1-2'sini içerir. Genellikle soliter periferik nodül olarak bulunur, %50'si 1-3 cm büyüklüğündedir ve %13 oranında kaviterdir (10).

Tedavi ve prognozlarındaki dikkate değer farklılık nedeni ile küçük hücreli karsinom ve küçük hücreli dışı karsinom (adeno, skuamöz hücreli ve büyük hücreli karsinom) ayırımının yapılması uygun tedavinin planlanması yönünden oldukça önemlidir (9).

KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KARSİNOMLARININ HİSTOPATOLOJİSİ

Küçük Hücreli Karsinomları (KHK), Küçük Hücreli Dışı Karsinomlardan (KHDK) ayıran belli morfolojik özellikler vardır. KHK hücrelerini KHDK hücrelerinden ayıran asıl özellik; boyut değil, kromatin yapısıdır. KHK hücrelerinin bir diğer belirgin özelliği de, tümör hücrelerinin kolay zedelenebilmesi nedeni ile oluşan ezilme artefaktıdır. Fakat doğru tanı koyabilmek için biyopsi örneklerinde, az da olsa iyi korunmuş tümör hücresi aranmalıdır. Bu gibi durumlarda, "Lökosit Ortak Antijeni" (LCA) ile immünohistokimyasal boyama; ezilmiş hücrelerin doğru değerlendirilmesi için uygulanabilir (9).

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLERİNİN ALT TİPLERİNİN ÖZELLİKLERİ

Skuamöz hücreli karsinom : Erkeklerde daha sık rastlanır. Büyük bronşların santralinden çıkmaya eğilimlidir. Lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır; fakat toraks dışına diğer tiplerden daha geç yayılır (3). Skuamöz hücreli karsinoma, bronş epitelinde yıllar öncesinde başlayan metaplazi veya displaziyi izleyen in-situ karsinomdan sonra ortaya çıkar. Mukozada 1-2 cm çapında kalınlaşma ve irregüler nodül şeklinde kabarıklık oluşmaya başlar. Bu safhada klinik açıdan bir bulguya rastlanmamasına rağmen; balgamda atipik epitel hücrelere rastlanır. Kısa süre içerisinde tümör; bronş lümenini kapatacak şekilde bir kitle haline gelir, akciğerin diğer kısımlarına invaze olur. Histolojik olarak, keratin inciler ve intersellüler köprüler oluşturan iyi diferansiye tip ya da az derecede skuamöz özelliğe sahip andiferansiye tip şeklinde görülebilir. Skuamöz hücreli karsinomlar metastaz yapmadan önce

büyük ve bronşları tıkayan bir kitle oluşturdıkları için diğer tiplerden daha iyi bir prognoza sahiptir (3).

Adenokarsinom : Kadınlarda ve sigara içmeyenlerde en yaygın görülen tiptir (3). Genellikle akciğerdeki mukus üreten hücrelerden kaynaklanır. Adenokarsinomada tümör hücreleri tarafından müsin üretimi gerçekleşir ya da glandular farklılaşma olur (3). Çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Yavaş büyür ve daha küçük kitle oluşturmalar. Diğer alt tiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Tipik olarak tubuler, asiner ya da papiller yapılar oluşturmalar (3). Yoğun müsin sekresyonu olduğunda mukoid görünümde (3, 18). Solid, gri-beyaz renkli alanlar içerdiğinde pnömoni benzeri bir görünüm oluşturabilir (3). Kaviteasyon oldukça az görülür. Periferik skar veya bal peteği görünümü de sıklıkla karşımıza çıkar. Rezeksiyon sırasında, %77 oranında plevral fibrozis şeklinde visseral plevra tutulumu saptanır (18). Akciğerin periferinde yerleşip, diffüz olarak plevrayı tutan tümörlere psödomezotelyomatöz karsinom denir (17, 18). Solid, gri-beyaz renkli Psödomezotelyomatöz Karsinom tanısı için, akciğer alanlarında kitle bulunmaması ve başka bir primerin olmaması şarttır. Mesane, böbrek, pankreas, parotis ve prostatdan kaynaklanan tümörler de psödomezotelyomatöz görünüm yapabilirler. Psödomezotelyomatöz karsinomların %70'ini adenokarsinomlar oluşturur. Mezotelyomadan ayrımı immünohistokimyasal boyama ile yapılır (17).

WHO 2004 klasifikasyonunda adenokarsinom subtipleri şu şekilde belirtilmiştir; asiner, papiller, bronkoalveoler, müsin içeren solid tip, mikst tip ve varyantlardır. Bronkoalveoler tip müsinöz, non-müsinöz ve mikst olmak üzere alt gruplara ayrılır. Varyantlar ise, fetal adenokarsinom, müsinöz (kolloid) adenokarsinom, müsinöz kistadenokarsinom, taşlı yüzük hücreli adenokarsinom ve şeffaf hücreli karsinomdan ibarettir. Rezekte edilen akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %80'i mikst subtipdedir. Mikst histolojik subtipler farklı derecelerde differansiyasyon ve atipi gösterirler. Histolojik subtiplerden herhangi birinin tek başına görülmesi oldukça nadirdir. Bronkoalveoler tip orta veya iyi diferansiye olarak bilinir (16).

Atipik adenomatöz hiperplazinin progresyonu ile bronkoalveoler karsinom oluşur. İnvaziv adenokarsinom ise, bronkoalveoler karsinomun transformasyonu ile oluşabilir (3). Bronkoalveoler karsinom, vasküler, stromal ve plevral invazyonun olmaması ile karakterize edilmiştir. Bu "lepidik" büyüme paterni olarak adlandırılır (3, 16, 17). Bu yüzden tümör evre 1 kategorisinde olup, bazı otörler tarafından preinvaziv lezyon olarak değerlendirilmesi

gerektiği düşünülmektedir. Metastatik tümörler de lepidik patern yaparak müsinöz tip bronkoalveoler karsinomla karışabilir. Benzer şekilde bronkoalveoler karsinomun makroskobik görünümü zaman zaman metastatik tümörleri anımsatabilir.

İmmünohistokimya bu noktada yardımcıdır. Ancak, primer akciğer adenokarsinomlarında pozitif reaksiyon veren TTF-1 ve CK7 (Sitokeratin 7), müsinöz bronkoalveoler karsinomlarda negatif olabilir. Müsin yapan adenokarsinom tanısı için, asini, tübül ve papiller yapılar olmaksızın, en az iki büyük büyütme alanında 5 ya da daha fazla müsin içeren hücre bulunmalıdır. Az diferansiye adenokarsinom ve solid tipte adenokarsinom tanısı için müsin boyası yapılmalıdır. Adenokarsinom çoğunlukla birden fazla subtipin bulunduğu mikst tiptedir (17). İmmünohistokimyasal özellikler, histolojik subtip ve differansiyasyon derecesine göre değişiklik göstermektedir. Epitelyal markerlar (EMA, CEA, AE1/AE3, CAM 5.2) tipik olarak pozitifdir. TTF-1 boyanması özellikle iyi diferansiye tümörlerde görülür. CK7 pozitifliği CK20 pozitifliğinden daha sıktır (16). Müsinöz adenokarsinom ve müsinöz kistadenokarsinomlar, diğer organlardaki tümörlere benzer görünümündedir. Goblet hücresi ve taşlı yüzük hücresi içerebilirler. Akciğerin primer taşlı yüzük hücreli karsinomu %2'den düşük oranda görülür. Düşük bir oran da olsa bu, metastazlardan ayırt edilmelidir. TTF-1 ekspresyonu tanıda yardımcıdır. Ayrıca, akciğer ve meme kökenli taşlı yüzük hücreli karsinomlar CK7+ / CK20- iken, kolon kökenli olanlar CK7 -/ CK20 +'dir. CK20 negatif iken, CK18 pozitifliği meme, prostat adenokarsinomu metastazını, CK18 negatifliği ise, gastrik adenokarsinom metastazını düşündürür. CK5 ise, metastatik akciğer karsinomlarında boyanmaktadır.

İyi diferansiye fetal tip adenokarsinom tek başına olabildiği gibi, pulmoner blastomun bir komponenti de olabilir. Subnükleer ya da supranükleer glikojen vakuolleri içeren hücrelerden oluşur. Endometrioid görünümündedir ve prognozu iyidir.

Adenokarsinomlar, çoğunlukla ileri evrede tanı aldığından prognozu kötüdür. Mikropapiller komponent kötü prognoz belirtisidir. Mikropapiller paternin hakim olduğu vakalarda, visseral plevra metastazı, intrapulmoner metastaz ve lenf nodu metastazı daha fazla görülür. Santral fibrovasküler kor içermeyen papiller yapılar, mikropapiller yapı olarak değerlendirilir. Bazı otörler, Evre 1 lezyonlarda izlenen hafif derecedeki desmoplazinin düşük malign potansiyel gösteren invaziv kanser ya da erken invaziv kanser olarak adlandırılması gerektiğini düşünmektedir (17).

Histolojik grade: Asiner ve papiller adenokarsinomlarda iyi, orta ve kötü diferansiye olmak üzere 3 grade kullanılır. Bronkoalveoler tip genellikle iyi veya orta diferansiye, solid tip ise kötü diferansiye olarak adlandırılır (16).

Bronkoalveoler karsinoma (BAC): Özel bir adenokarsinoma tipidir (3). Bronkoalveoler karsinoma terminal bronkoalveoler bölgelerdeki pulmoner parankimada oluşur. Tüm akciğer kanserlerinin %1-9’unda çeşitli şekillerde bronkoalveoler karsinomaya rastlanır (3).

İki çeşidi vardır; müsin salgılayan çeşidinde; tümörler multifokal müsinözdir. Çoğunlukla oluşturdıkları kitle bir lobda sınırlı kalır, bazen ise birden fazla loba tutanabilirler. Histolojik olarak bu kitleler yüksek kolumnar hücrelerin iyi korunmuş alveolar septalar üzerinde sıralanan yapılar oluşturur. Mitoz nadirdir. Diğer çeşidi 10 cm çapına kadar olabilen gri-beyaz renkli tek bir nodül şeklindedir ve yerleşimi perifere yakındır. Multifokal tipin aksine neoplastik hücreler müsin salgılamazlar. Alçak kolumnar ya da küboidal şekildedirler. Alveolar septalar yerine tümörün fibrovasküler stroması üzerinde irregüler sıralanırlar, papiller yapılar belirgindir. Nukleuslar büyük, santral yerleşimlidir ve mitoz gözlenir. Bronkoalveoler karsinomanın prognozu diğer akciğer karsinomlarına oranla daha iyidir. Multifokal tipte 5 yıllık yaşam %20-25 oranında gözlenirken; lokalize tek kitle yapan tipte bu oran %100 civarlarındadır (3).

Büyük hücreli karsinoma : Sitolojik diferansiyasyon göstermez. Hücreler genellikle anaplastiktir ve büyük veziküler nukleusları vardır. Çoğunlukla periferik yerleşimli olup büyük hacimlidirler. Erken fazda metastaz görülür; bu nedenle kötü prognoza sahiptir. Tanı konulan hastaların çoğunda beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşam oranı %2-3’dür (3).

EVRELEME

Kanserli hastaların tedavilerini planlayabilmek için; hastaların prognoz özelliklerine göre gruplandırılmasına gerek duyulmuştur ve bunun sonucunda da bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. 1946’da ilk kez Denoix tarafından önerilen TNM sistemi, 1966’da “International Union Cancer Control” (UICC) ve 1973’ de “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) tarafından akciğer kanserlerine de uyarlanmıştır. Bu farklı yaklaşımlar 1986’da AJCC ve UICC’nin yıllık toplantılarında yeniden gözden geçirilerek; “Uluslararası Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi” adı altında tek bir sistem haline getirilmiştir Bu evreleme sisteminde Evre I, II ve IIIA içindeki TNM alt gruplarının prognoz açısından oldukça heterojen olduğu gözlenmiştir. Evreleme sisteminin daha özgül olması için AJCC ve

UICC'nin 1996' da yıllık toplantılarında kabul edilen yeni bir düzenleme yapılmıştır (9).

TNM SINIFLAMASI

TNM sınıflandırmasını öneren ilk kişi Denoix'dir (1946). TNM sistemi en son 2009'da modifiye edilmekle beraber; temel prensipleri aynı kalmıştır. Küçük hücreli, küçük hücreli dışı ve karsinoidleri içerir. TNM sınıflandırılmasının en son düzenlenmiş şekli 2009' da Union International Cancer Control(UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından düzenlenmiştir (10, 20).

Anterior mediastinotomi ve mediastinoskopi gibi invazif işlemler ile saptanan hastalığın anatomik derecesi; primer tümör (T), bölgesel lenf nodu (N), uzak metastaz (M)'a göre tarif edilir. Sınıflandırmanın T komponenti; primer tümörün hem büyüklük hem de lokal invazyon derecesini, N komponenti bölgesel lenf nodu içeriğini belirtir. M komponenti ise metastazın varlığını veya yokluğunu belirtir (10).

TNM 2009 EVRELEMESİ

PRİMER TÜMÖR (T)

Tx : Primer tümörün belirlenememesi veya balgam ya da bronş lavajında malign hücrelerin tespit edilip görüntüleme teknikleri ya da bronkoskopi ile tümörün gösterilememesi.

T0 : Primer tümör belirtisi yok.

Tis : Karsinoma in situ .

T1 : En geniş çapı 3 cm ya da daha küçük, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon göstermeyen tümör (örneğin: ana bronşda olmayan).

T1a : Tümör çapı 2 cm veya daha küçük

T1b: Tümör çapı 2-3 cm

T2 : Tümörün aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması:

-Ana bronş invaze ancak ana karinaya uzaklık 2 cm veya daha fazla

-Visseral plevra invazyonu

-Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni

-Tümör çapı: T2a: Tümör çapı >3-5 cm

T2b: Tümör çapı >5cm -7 cm

T3 : Tümör çapının > 7 cm olması; herhangi bir büyüklükte olup; göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diafragma, mediastinal plevra, pariyetal perikard gibi yapılardan herhangi birine direkt invazyon göstermesi; veya karinaya 2 cm'den daha yakın ancak

karinayı tutmayan ana bronştaki tümör; ya da bütün akciğeri kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile birlikte görülen tümör, aynı lobda ayrı nodül ya da nodüller olması

T4 : Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özofagus, vertebral kolon, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi; ya da tümörle aynı taraf farklı lob içinde ayrı tümör nodül ya da nodüllerinin olması (20).

BÖLGESEL LENF NODU (N)

Nx : Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi.

N0 : Bölgesel lenf bezi metastazı yok.

N1 : Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması.

N2 : Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz .

N3 : Karşı taraf mediastinal veya hiler; aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen lenf bezi metastazı (9, 20).

UZAK METASTAZ (M)

Mx : Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi.

M0 : Uzak metastaz yok

M1a : Karşı lobda ayrı tümör nodül ya da nodüllerinin olması; Plevral nodüller veya plevral veya perikardiyal sıvıda malign hücrelerin olması (9).

M1b: Uzak metastaz

TNM' ye göre evreleme (9).

Tablo II: Teksaslı cerrah Clifton Mountain tarafından tedavi ve prognozda benzerlikler temel alınarak yapılan klinik evreleme

Küçük hücreli dışı (Non-small cell) akciğer kanserinde evrelendirme	
Grouping	TNM staging
Occult carcinoma	TX N0 M0
Evre 0	Tis N0 M0
Evre IA	T1 N0 M0
Evre IB	T2 N0 M0
Evre IIA	T1 N1 M0
Evre IIB	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
Evre IIIA	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N1 M0
	T3 N2 M0
Evre IIIB	Herhangibir T N3 M0
	T4 herhangibir T N M0
Evre IV	Herhangibir T Herhangibir N M1

Evre 0 »»»»» TisN0M0

Evre IA »»»»» T1N0M0

Evre IB »»»»» T2N0M0

Evre IIA »»»»» T1N1M0

Evre IIB »»»»» T2N1M0 ya da T3N0M0

Evre IIIA »»»»» T3N1M0 ya da T1-2-3 N2M0

Evre IIIB »»»»» T1-4 N3M0 ya da T4 N1-4M0

Evre IV »»»»» T1-4 N0-3 M1 (30,31).

PROGNOZ

Akciğer kanseri kötü bir prognoza sahiptir; hastaların sadece %10-15 kadarı 5 yıl veya daha uzun süre yaşar. Prognoz; klinik faktörler kadar tümörün histolojik sınıflandırılmasına ve evreye bağlıdır. Akciğer kanserinin histolojik tipi; prognoz ve tümör davranışı ile korelasyon gösterir. Bu durum KHAK ve KHDAK karşılaştırıldığında açıkça görülmektedir. Tablo III 'de KHDAK'larda evre ve prognoz ilişkisi verilmiştir. Skuamöz hücreli karsinoma diğer küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarından daha iyi bir prognoza sahiptir. Skuamöz tipten sonra en iyi prognoza sahip olan alt tip, adenokarsinomadır. Bronkoalveolar karsinomlarda (özellikle nodular form, %75-100), en yüksek yaşama oranı gözlenir. Adenoskuamöz karsinomanın prognozu, diğer küçük hücreli dışı akciğer karsinomalarına benzer. Büyük hücreli karsinomanın prognozu genellikle kötüdür. Akciğer kanserleri bir dizi semptoma neden olur ve hastanın performansını kötü yönde etkiler. Bunlar önemli prognostik değere sahip olabilir (10).

Tablo III: Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde evrelere göre prognoz

Küçük hücreli dışı (Non-small cell) akciğer kanserinde evrelere göre sağ kalım					
Evre	Hayatta kalma oranları (yüzde)				
	Bir yıl	İki yıl	Üç yıl	Dört yıl	Beş yıl
IA	91%	79%	71%	67%	61%
IB	72%	54%	46%	41%	38%
IIA	79%	49%	38%	34%	34%
IIB	59%	41%	33%	26%	24%
IIIA	50%	25%	18%	14%	13%
IIIB	34%	13%	7%	6%	5%
IV	19%	6%	2%	2%	1%

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri olan hastalar; hastalığı sınırlı ve ilerlemiş olmak üzere iki gruba ayrılır. Sınırlı hastalık, radyoterapi bölgesi sınırlı karsinoma olarak tanımlanır.

İleri karsinoma ise, radyoterapi bölgesi oldukça geniş olan karsinomayı ifade eder. Sınırlı hastalığı olan hastalar için radyoterapi ve kemoterapi, ileri hastalığı olanlar için ise palyatif terapi uygulanır. Prognoz metastatik yerleşime bağlıdır. Karaciğer ve kemik iliği

metastazı düşük prognoz taşırken; sadece beyin metastazı ile sınırlı hastalığı olanlarla aynı prognozu taşır (10).

PROGNOSTİK BELİRTEÇLER

Prognostik faktörler; hastanın hayati sonucunu belirleyen tümör faktörleridir. Hücresel fonksiyonlarda düzenleyici rolleri olan yeni genlerin keşfi ile birlikte; pek çok biyolojik ve moleküler değişiklik; potansiyel moleküler prognostik faktör olarak araştırılmıştır (21).

Ras onkogeni: Ras ailesi genleri ve proteinleri; hücre yüzeyinden nükleusa biyokimyasal sinyalleri ileten, en iyi anlaşılmış moleküllerdendir. H-ras, K-ras ve N-ras olmak üzere ras protoonkogeninin 3 aile üyesi vardır. Bu genler ayrı kromozomlar üzerinde yerleşmiştir; fakat fonksiyonel ve yapısal olarak benzer proteinler üretirler. Ras aktivasyonu; kanser biyolojisinde önemli olan invazyon, metastaz, anjiogenez, apoptoz ve mitojenez ile ilişkilidir. Akciğer kanserinde çoğunlukla K-ras genine ait mutasyonlar gözlenir. Bu mutasyonlar büyük hücreli karsinomaların %20, adenokarsinomaların %35'inde gözlenirken, skuamöz hücreli karsinomlarda (5%) nadir gözlenir (21).

HER/c-erbB (epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi) ve ligandları : Reseptör tirozin kinazlar (RTK); protein tirozin rezidülerini fosforile edebilen intrasellüler tirozin kinaz domaini ve ekstrasellüler ligand bağlayan domaini olan, transmembran proteinleridir. Akciğer kanserinde en çok çalışılan ve en çok rastlanan RTKlar, HER/c-erbB ailesi reseptörlerinin üyeleri olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve HER-2/c-erbB2/neu'dur. KHDAK'de EGFR overekspresyonunun prognostik değeri tartışmalıdır . İkinci önemli c-erbB ailesi geni meme kanserinde çok fazla çalışılmış olan HER-2/cerbB2/neu'dur. HER-2 geninin amplifikasyonu akciğer kanserinde nadiren gözlenir. KHDAK'de ilk kez Kern ve arkadaşları HER-2 ekspresyonunun prognostik önemini ve sıklığını değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında adenokarsinoma ve skuamöz hücreli karsinomada, %36-38 oranında ekspresyon gözlemişlerdir (21).

Hepatosit Büyüme Faktörü ve reseptörü Met/HGFR : Met/Hepatosit Büyüme Faktör Reseptörü (HGFR), insülin reseptörüne yakın homoloji gösteren bir RTK'dır. Met ile ligandı HGF'in etkileşimi; diferansiyasyon, motilite ve hücre proliferasyonu üzerinde pleotropik etkiler oluşturur. Hem Met hem de HGF'in ekspresyonuna, insan kanserlerinde sıklıkla rastlanmaktadır.

Tsao ve arkadaşları insitu hibridizasyon ve immünohistokimya kullanarak; KHDAK'de HGF mRNA'sının çoğunlukla tümör hücreleri tarafından eksprese edildiğini göstermiştir (21).

Retinoblastoma (Rb) ve p16INK4A : Rb gen inaktivasyonu, KHAK 'nin yaklaşık %90'ında, KHDAK'nin %10-30'unda görülür. p16 ekspresyon kaybına ise KHDAK'nin %50-60'ında rastlanır. Rb gen inaktivasyonu; %20 promotör metilasyonu, %5-10 nokta mutasyonları, %20 homozigot delesyonu ile gerçekleşir. Genelde KHDAK'nin yaklaşık %75'inde Rb/p16'yı düzenleyen hücre döngüsü kontrol noktalarının kayıp olduğu düşünülmektedir (21).

Siklin E ve p27 kip1 : KHDAK hastalarının erken safhasında siklin E ekspresyonunun kötü prognozla korele olduğu gösterilmiştir. Hem erken hem de ileri safhadaki KHDAK'de azalan p27kip1 ekspresyonu kötü prognozla korelasyon göstermektedir (21).

p53 : p53 proteini; DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü G1 evresinde durduran ve çeşitli uyarılarla uyarılan, apoptoz için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. KDAK'deki p53 sıklığı immünohistokimya ile %48, Tek İplikli Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) ile %37 olarak saptanmıştır. p53 gen mutasyonları ve protein overekspresyonu skuamöz hücreli karsinomada %49-54, adenokarsinomada %29-36 oranında görülür. Meta-analiz sonuçları; p53 değişikliklerinin prognostik açıdan adenokarsinomalı hastalarda negatif, skuamöz hücreli karsinomalarda ise pozitif etkiye sahip olduğunu göstermiştir (21).

Bcl-2 aile genleri : Normal bronşial epitelin bazal hücrelerinde Bcl-2 pozitifdir. KHDAK' de %20-40 oranında bcl-2 protein ekspresyonu saptanmıştır (21). Diğer belirteçler FHIT (Fragile Histidine Triad) geni, VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü), Siklooksijenaz (COX-2)'ın prognostik değeri akciğer kanseri açısından araştırılmaktadır. Bu belirteçlerin tedavide kullanılabilmesi umut edilmektedir (21).

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR

HER AİLESİ

Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK); protein tirozin rezidülerini fosforile edebilen intrasellüler tirozin kinaz domaini ve ekstrasellüler ligand bağlayan domaine sahip olan transmembran proteinleridir (21).

Erb-B gen ailesi büyüme faktörü tirozin kinaz reseptörlerini kodlar. Aile; ErbB-1 (Her1), ErbB-2 (Her-2/neu), ErbB-3(Her3) ve ErbB-4 (Her 4) olmak üzere hücre membranı üzerinde yerleşim gösteren 4 reseptörden oluşur.(22). Erb-B gen ailesinin 4 reseptörü yapısal

olarak benzerdir. Sisteince zengin domainler, membran spanning bölge ve intrasellüler tirozin kinaz alanı içerirler (23).

HER1'in bağlandığı ligandlar; Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa (TGF), Amphiregulin (AR), Heparin Bağlayan Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF), Betasellülin (β -cel) ve Epiregulin'dir. HER2'nin ligandı yoktur. HER3 ve HER4, pekçok neuroguline veya neu farklılaşma faktörlerine bağlanır (22). Reseptörlere ligandların bağlanması heterodimerizasyon ve dolayısı ile aktivasyona neden olur (23). Epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR),ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) ve ERBB4 (HER4)'ü içeren reseptör tirozin kinaz (RTK) I ailesi; homo-heterodimer şeklinde aktive olarak; çeşitli hücrelerde adhezyon, motilite, farklılaşma ve normal hücre büyümesini kontrol eden sinyal yolları ağı ile etkileşime girer.

EGFR (Her1/neu): EGF, 53 aminoasitlik bir polipeptit olup ilk olarak 1962'de hücre kültürlerinde fibroblastlar üzerinde kuvvetli mitojenik etki gösterdiği bulunmuştur. 1980'li yıllarda EGF'nin tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran reseptörü olan EGFR'ne bağlandığı gösterilmiş ardından güçlü mitojenik aktiviteye sahip pek çok büyüme faktörü ve reseptörleri tanımlanmıştır (28).

EGFR 170 KD ağırlığında tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoprotein olup hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR, üç bölgeden oluşur: Hücre dışı ligandların (EGF, TGF- α , Amfiregulin) bağlandığı N terminali, hidrofobik transmembran bölgesi ve hücre içi yerleşimli tirozin kinaz aktivitesine sahip C terminali (28).

EGFR'nin karsinogeneze olan etkileri:

Mitogenezi artırır, apoptozu inhibe eder,hücre motilitesini artırır, protein sekresyonunu artırır, hücre adezyonunu artırır, hücre invazyonunu artırır, hücre yaşam süresini artırır anjiogenezi uyarır, sitokin salınımını uyarır, ekstrasellüler matriks depozisyonunu uyarır (34).

EGFR ile karsinogenez arasındaki ilişki üç noktada olmaktadır; normal EGFR'nün aşırı ekspresyonu, reseptörde mutasyon gelişimi (EGFRvIII mutasyonu) ile reseptörün sürekli aktivite kazanması, ligandların aşırı yapımına bağlı olarak fizyolojik ligand- reseptör dengesinin bozulması, fosfataz aktivitesindeki azalma ve heterodimerizasyondur (33,35).

EGFR inhibitörlerinin etkileri:

- 1- Hücre siklusunun G1 fazında inhibisyonu
- 2- Tümör hücrelerinde adhezyonun inhibisyonu

- 3- Apoptozis indüksiyonu
- 4- Antiproliferatif aktivite
- 5- Antianjiyogenik, antiinvaziv, antimetastatik etkinlik
- 6- Sitotoksik ajanlarla birlikte kullanımı ile aditif etkileşim ile antitümöral etkinliğin artması (Kemosensitivite ve radyosensitivitenin artması)
- 7- Sitotoksik tedaviye bağlı yan etkilerin azalması
- 8- Diğer: Sağkalım süresinde artış, semptomlarda düzelme, yaşam kalitesinde artış (32).

HER2/erbB-2: İnsanda erbB-2 geni 17q12'de yerleşim gösterir (28- Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. BBA, 1994; 165-184). Diğer HER reseptörleri ile etkileşime girerek hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve hücre yaşamını düzenleyen sinyal yollarında görevlidir (24).

HER3'ün doğal aktivitesi yoktur ve en temel, en iyi dimerizasyon partneri HER2'dir (22). HER-2 sinyalinin VEGF, TGF. ve TSP-1 gibi pro ve antianjiyogenik faktörlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (25).

KHDAK'de HER-2/neu overekspresyonunun sıklığı, yayınlarda %4-27 arasında değişmektedir. Bu heterojenite HER-2/neu ekspresyonunu değerlendirmek için kullanılan metodlardaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (26).

1)İmmünohistokimya : İmmünohistokimyada, HER-2'ye özgül antikor kullanılarak parafin doku boyanır. İmmünohistokimyanın dezavantajları, öznel yorumu ve sonuçların yarı kantitatif olmasıdır (27).

2) FISH : FISH, EGFR (Her 1/neu, Her 2/neu) gen amplifikasyonunu değerlendirmek için kullanılır. İmmünohistokimyadan daha spesifik ve hassastır. FISH kantitatif sonuçlar verir yani, farklı laboratuvarlar arasındaki çeşitliliğe ve öznel yorumlara yer vermez. Ayrıca FISH, prognozu ve Herceptin'e yanıtı immünohistokimyadan daha doğru bir şekilde değerlendirir. Genellikle immünohistokimya ve FISH %80 oranında konkordans gösterir. FDA; Herceptin temelli terapiden yararlanabilecek hastaları değerlendirmek için immünohistokimya ve FISH kullanımını onaylamıştır (27).

3) HER-2 ECD : Hala araştırılmakta olan Diğer bir yöntem; HER-2 ECD serum seviyelerinin ölçülmesidir (29). Bu yöntemin avantajı; kanın kolaylıkla elde edilebilir; ve HER-2 hedefli terapilerde HER-2 durumunun değişikliklerinin kolayca izlenebilir olmasıdır (27).

Yöntemlerin Avantajları, Dezavantajları ve Klinik Uygulamaları: Western Blot: oldukça elverişli, pahalı değil, semikantitatif, tümör ekstraktı gerekli, klinik kullanımı yok

PCR: Hızlı, spesifik, hassas, semikantitatif, klinik kullanımı yok.

İmmünohistokimya: Oldukça elverişli, pahalı değil, semikantitatif, subjektif yorum, FDA onaylı, klinik kullanımda.

FISH: Spesifik, kantitatif, Herceptin'e yanıtta güçlü korelasyon, pahalı, özel araç, gereç gerektirir.

RAS genleri Harvey (Ha- veya H) ras ve Kirsten (Ki- veya K) ras'dır (36-38). Diğer RAS ailesi geni nöroblastom veya N- ras olarak tanımlanır (39,40).

K-ras, K-ras proto-onkogeni ile kodlanan ve normal hücre çoğalması sinyal iletiminde görev alan bir proteindir. Mutasyona uğrayan K-ras güçlü bir onkogen haline gelmektedir. K-ras kendisine GTP (Guanosine TriPhosphate) molekülü bağlayarak aktif ve GDP (Guanosine DiPhosphate) molekülü bağlandığında inaktif olan iki halde bulunur. GTP nin GDP molekülü ile yer değiştirilmesi GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) proteini ile gerçekleşir. K-ras geninin 12. veya 13. DNA kodon dizisinde meydana gelen mutasyonlar, K-ras proteininin GTP ye bağlı kalma halinin uzamasına sebep olur ve hücre içerisinde normalden fazla oranda hücre çoğalma sinyali üretilmiş olur. Bu durum bazı dokularda (kalın barsak, pankreas ve akciğer başta olmak üzere) diğer gen değişikliklerinin de olduğu şartlarda kanser hücrelerinin oluşmasını sağlamaktadır.

Akciğer adenokarsinomlarında RAS mutasyonlarının %90'ı K-ras mutasyonudur (41). KHDAK'daki K-ras mutasyonlarının %97'si kodon 12 veya kodon 13'de lokalizedir. K-ras mutasyonları akciğerin skuamöz hücreli karsinomlarında nadirdir. K-ras mutasyonları KHDAK'da negatif prognostik faktördür (41).

Kanser tedavisinde hücre içi sinyal iletiminin K-ras proteini öncesindeki aşamalarını durduran ilaçların kullanılması, mutasyonlu K-ras genini taşıyan ve K-ras aktivasyonu çok güçlü olan hücrelerde yeterli cevabı sağlayamamakta ve bu hastaların klinik olarak bu tür kanser ilaçlarından yararlanmasına engel olmaktadır. EGFR hücre reseptörünü hedef alan Cetuximab (Erbix) ve Panitumumab (Vectibix) kemoterapi ilaçlarının kullanılmadan önce kanser dokusunda yapılan genetik test ile K-ras geninin mutasyonlu olup olmadığı araştırılmalıdır. Mutasyonlu K-ras geni saptanan hastalarda yukarıdaki ilaçların kullanılmasıyla klinik cevap alınamayacaktır (41).

Risk Tahmini:

Akciğer tümörögenezi çok aşamalı bir genetik süreçtir; bu nedenle akciğer kanser riskini hesaplamak için tek yöntem, akciğer dokusunu, akciğer kanseri ile birlikte yaygın

olarak gözlenen moleküler değişiklikler açısından incelemektir. Akciğer dokusunda yüksek sayıda moleküler değişikliklere sahip bireyler, akciğer kanseri gelişimi açısından yüksek riske sahiptir. Akciğer kanserlerinde en sık gözlenen değişiklikler 3p, 9p ve 17p'deki LOH ve p53 mutasyonlarıdır. Bu değişikliklerin derecesi; histolojik değişikliklerin derecesi ile ilişkilidir (11).

Prognozu Değerlendirmede Moleküler Değişikliklerin Göstergeleri ve Tedaviye

Yanıtı Öngörme :

Akciğer kanserinde, hastanın prognozunu, sadece klinik ve histolojik parametrelerle değerlendirmek zordur. İleri evre, hastalık için kötü prognozu işaret etmesine rağmen; klinik özellikleri benzer olan hastalardaki sonuçlar önemli derecede farklılık göstermektedir. Moleküler analizlerin amacı; tümörün geçmişi, potansiyel hassaslık, radyasyon terapisine veya kemoterapiye direnç hakkında prognostik bilgi veren değişiklikleri tanımlamaktır. Belirli birtakım moleküler değişiklikler, akciğer kanserinde prognostik açıdan önem taşır. Fakat bu değişiklikler ile ilgili farklı çalışma gruplarının yargıları benzer değildir. Akciğer kanseri gelişiminde rol alan belli moleküler yolların tanımlanması, tedavide bu yolların hedeflenmesine yol açmıştır (11).

Değişmiş Sinyal Yollarının Yeniden Düzenlenmesi:

Akciğer kanserinin hedefli tedavisindeki yaklaşım, değişmiş olan sinyal yollarını yeniden düzenlemektir. Onkogenlerin aktiviteleri inhibe edilerek ya da sinyal yolları engellenerek ekspresyonları azaltılıp aktiviteleri engellenebilir. Örneğin, ras mutasyonları akciğer kanserinde yaygın olarak çalışılmaktadır. Klinik deneyler için hedeflenmiş diğer onkogen ürünleri; EGFR ve aile üyeleridir. Hem EGFR hem de HER-2/neu 'nun overekspresyonuna akciğer tümörlerinde rastlanmıştır. EGFR'in primer olarak hücre büyümesini uyardığı düşünülmesine rağmen, son çalışmalar; anjiogenez, invazyon, hücre adezyonu, hücre motilitesi gibi kanserle ilgili diğer basamaklarda da EGFR sinyal yolağının etkili olduğunu göstermiştir. Bu yolakla ilgili olarak; EGFR ekspresyonunu downregüle edebilen ajanlar, EGFR ile ilgili tirozin kinazların küçük peptid inhibitörleri, immünotoksinler, monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. İnsanlaştırılmış anti EGFR monoklonal antikorların, bu membran reseptörlerinin tirozin kinaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Preklinik çalışmalar, radyasyon terapisi ile kemoterapötik ajanlar arasında sinerji göstermiştir. M.D. Anderson'da, anti büyüme faktör reseptörü monoklonal antikor

kullanımı hakkında klinik deneyler yapılmaktadır. Örneğin, metastazı olan hastalarda gemcitabin, cisplatin ve trastuzumab'ın kombinasyonu çalışılmaktadır (11).

Anti-reseptör Terapisi:

HER-2, HER1'in partneri olarak tercih edildiği için; HER1'in aktivasyonunun inhibisyonu HER2 aktivitesini inhibe etmek için önerilmektedir. HER1'in fosforilasyonunu ve fonksiyonunu bloklayan tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı; proliferasyonu HER1 veya HER2'ye bağlı olan tümörlerin terapisi için iyi bir yöntemdir. Böyle tek inhibitör ZD 1839' dur. ZD1839; oral olarak aktif, HER1'in yüksek seviyelerini eksprese eden insan tümör xenograftları ve kanser hücre hatlarının büyümesini geciktiren veya geri dönüşümsüz inhibisyonunu sağlayan HER1'e spesifik tirozin kinaz inhibitörüdür (25).

DNA'NIN YAPISI

Kalıtsal bilginin taşıyıcısı, DNA molekülüdür. DNA'nın temel birimi nükleotittir. Bir nükleotidin üç bileşeni vardır; baz, şeker ve fosfat. Nükleotidlere farklılık kazandıran kısım olan baz, pürin ya da pirimidin yapısındadır. DNA'nın yapısına giren pürinler adenin (A) ve guanin (G), pirimidinler de sitozin (S) ve timindir (T). İkinci bileşen şeker ise halka formunda 5 karbon atomlu, pentozdur. Fosfat grubu bu pentozun 5'inci karbon atomuna bağlıdır.

Watson-Crick Modeli: 1953 yılında tanımlanan bu modelin üç ana unsuru vardır (42);

- 1- Çift sarmal yapı (double heliks): DNA tek bir iplik halinde değil, iki ayrı ipliğin ortak bir eksen etrafında birbirine dolanmış olduğu çift sarmal bir yapı halinde bulunur.
- 2- Antiparalellik: Çift sarmalları oluşturan ipliklerin serbest 3'OH ve 5' fosfat grupları dikkate alındığında birbirlerine göre ters yöne doğru uzanmaktadırlar.

Komplementerlik: Çift sarmal DNA, burkulmuş bir ip merdivenine benzetilebilir. Merdivenin basamakları komplementerlik ilkesine göre karşı karşıya gelmiş olan baz çiftlerini oluşturur. Eşleşme yalnızca adenin ile timin ya da guanin ile sitozin arasında olur.

Replikasyon, Transkripsiyon ve Translasyon: Replikasyon bir hücrenin bölünmesi sırasında DNA'nın bir kopyasının çıkarılması işlemine denir. Replikasyon , çift sarmaldeki ana ipliklerin, yavru iplik sentezinde kalıp görevi gördüğü bir işlemdir. Sentezi yürüten DNA polimeraz yavru ipliği oluştururken, komplementerlik ilkesine bağlı kalır.

Transkripsiyon, çift sarmal DNA'nın kalıp alınarak RNA polimeraz enzimi varlığında RNA sentezlenmesi işlemidir. Burada da komplementerlik ilkesi geçerlidir. Translasyon ise

transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan genetik bilginin bir protein veya polipeptit zinciri haline dönüştürülmesidir. Protein sentezinin üç komponenti mRNA, tRNA ve ribozomlardır.

DNA'nın sınıflandırılması: İnsan haploid genomundaki baz çiftlerinin %75'i aralarında genlerin bulunduğu tek kopyalı DNA dizileridir. "İnsan genomu Projesi"nden elde edilen yeni verilere göre 30-35 bin civarında gen olduğu gösterilmiştir. İnsan genomunun yalnızca %2'si protein kodlamaktadır. Tekrarlanan DNA dizileri ise, genomun %25'ini oluştururlar. Bunlar iki gruba ayrılırlar:

1.Yüksek düzeyde tekrarlanan diziler: Satellit DNA olarak da bilinirler ve bunlar belli kromozomal bölgelerde daha yoğun olarak bulunurlar. Kopya sayıları bireyden bireye göre farklılıklar gösterir. Minisatellit ve mikrosatellit olan diziler 10-60 ve 2-5 baz çifti uzunluğundaki bloklardan oluşmuşlardır.

2.Orta düzeyde tekrarlanan DNA dizileri: Bunlar tek kopyalı diziler arasına dağılmışlardır ve genomun %15'ini oluştururlar. "Line" ve " Sine" diye iki önemli alt gruba ayrılırlar. "Line" dizisinin en önemli bölümü L1 ailesi olarak bilinen dizilerdir. En sık rastlanan "Sine" dizisi ise Alu ailesidir. Bazı genler her hücre için yaşamsal önemi olan temel işlevlerden sorumludurlar. Bunlara "Housekeeping" genler denir. Bir hücrede eksprese olan genlerin yaklaşık %90'ı bu gruptadır. Belirli dokulara özgü işlevleri yürüten genlere ise dokuya özel genler denir. Örneğin yalnızca hepatositte aktif olan albümin kodlayıcı gen gibi.

MİTOKONDRIYAL DNA

Hücrede çekirdek DNA'dan başka mitokondrilerde DNA bulunmaktadır. Mitokondriler hücrenin enerji santralleri olup oksidatif fosforilasyon olarak bilinen bir dizi reaksiyon neticesinde ATP üretirler. Bu reaksiyonlarda rol alan enzimlerin bir kısmı çekirdek DNA'sı, bir kısmı da mitokondrial DNA tarafından kodlanmaktadır. Mitokondrial DNA, oksidatif fosforilasyon ve mitokondrial solunum zincirinde rol alan 13 proteine ilaveten 2 adet rRNA ve 22 adet de tRNA kodlayan gene sahiptir. Yapısı çeşitli yönlerden çekirdek DNA'sından farklılıklar gösterir. Halkasal yapıda olması, intron içermemesi, genetik şifrenin bazı farklılıklar göstermesi gibi. Ayrıca spermdede mitokondrial DNA bulunmamasına karşılık ovum mitokondrial DNA'dan zengindir. Bu nedenle mitokondrial DNA mutasyonlarının yol açtığı hastalıklar yalnızca anne tarafından kalıtılır (43,44).

MUTASYONLAR

İnsan genomundaki DNA'nın baz diziliminde oluşan her türlü değişiklik mutasyon olarak tanımlanabilir. Bu değişiklik yalnızca tek bir bazın değişikliğe uğraması

(nokta mutasyonu) şeklinde olabileceği gibi bir kromozomun tamamını ilgilendirecek kadar büyük de olabilir. Mutasyonlar; gen düzeyinde mutasyonlar, yapısal kromozom anomalileri ve sayısal genomik mutasyonlar olmak üzere üç büyük grupta toplanabilir (45).

1-Gen Düzeyinde Mutasyonlar: Tek ya da birkaç bazlık delesyon ve insersiyonlar bu grup içerisinde değerlendirilen substitüsyonlardır.

A: Nükleotid substitüsyonları: İnsan genomundaki en sık mutasyonlar, bir nükleotidin başka bir nükleotid ile yer değiştirdiği substitüsyonlardır. Nokta mutasyonları olarak da bilinirler. Nükleotid değişiklikleri hem protein kodlayan bölgede ve hem de kodlamayan bölgelerde olabilir (intron, ekzon bölgeleri). Bu nedenle nükleotid değişimleri ile olan mutasyonların üç sonucu olabilir:

a: Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar: Aminoasit değişimine yol açarlar. Örneğin orak hücreli anemide, Beta globin zincirinin 6. aminoasidi olan glutamini kodlayan GAG kodonunda adenin yerini timidin almıştır. (GAG-GTG). Oluşan yeni kodon (GTG) glutamini değil valini kodlamaktadır. Dolayısıyla hastalıktan ve belirti bulgularından bu tek baz değişikliği sorumludur.

b: Anlamsız (nonsense) mutasyonlar: Bu tür mutasyonlar erkenden durdurucu kodon oluşmasına yol açarlar. Bundan dolayı setezlenen protein normalden kısa olur ve proteinin yapısal değişikliği fonksiyonel bozukluğa neden olursa buna bağlı olarak hastalıklar oluşur.

c: Sessiz (silent) mutasyonlar: Genetik kodun önemli bir özelliği bir aminoaside karşılık gelen birden fazla kodon olmasıdır. Bu nedenle bir baz değişikliği neticesinde oluşan yeni kodon aynı aminoasidi kodlamaya devam edebilir. Örneğin hem CGU-CGC mutasyonu kodlanan proteinin aminoasit dizilimini değiştirmez. Ancak bu sessiz mutasyonlar çevresel faktörler ile etkileştiği (radyasyon, oksidatif stres vb.) zaman kodlanan aminoasitlerin hangi yönde, nasıl değişim gösterdikleri henüz tam olarak bilinmemektedir (45).

B- Delesyonlar, İnsersiyonlar: Delesyonlar 5 nükleotidden daha az baz kayıpları olarak bilinir. Kodlanan aminoasit yapısını kısmen değiştirirler. Her delesyonda değişiklik olmaz. İnsersiyonlar ise 20 ya da daha az sayıda nükleotidin araya girmesi ile olan mutasyonlardır, daha nadir görülürler ve aminoasit yapısını dramatik olarak değiştirirler.

C- Trinükleotid tekrar dizilerinin uzaması: Bunlar dinamik mutasyonlar olarak da adlandırılırlar. Hastalıktan sorumlu gende normalde de bulunan ve tekrar sayısı kişiden kişiye değişebilen (yani polimorfik) üçlü tekrar dizileri (CAGCAGCAG.....CAG ya da CGGCGGCGG.....CGG gibi) mevcuttur. Bu diziler bir sonraki kuşağa aktarılırken

kayma ve hatalı eşleşme nedeniyle sayıları artarsa (ekspansiyon) ve tekrar sayısı kritik bir düzeyi geçerse hastalık tablosu oluşur.

2- Yapısal kromozom anomalileri: Bu mutasyonlar kromozomal yeni düzenlemeler olarak da bilinir. Kromozomlar arası karşılıklı parça değişimleri (translokasyon) ve büyük parça kayıpları (kromozomal delesyonlar) sonucu oluşurlar.

3-Sayısal genomik mutasyonlar: Kromozomda sayısal değişim yapan mutasyonlara denir (anöploidi, diploidi gibi). Down Sendromu (Trizomi 21), Turner Sendromu gibi durumlar bu tip mutasyonlar ile oluşurlar.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR ya da polimeraz zincir reaksiyonu moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda hızlı bir şekilde çoğaltılması olarak tanımlanabilir.

PCR, bir çeşit “invitro klonlamadır” PCR, reaksiyonu DNA’nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA’ya bağlanmasına (hibridizasyonu); sonra zincirin uzamasına (polimerizasyonu) (çift iplikçikli DNA’ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlamasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir (Sırasıyla 94 °C-98 °C; 37 °C-65 °C;72 °C). PCR tekniği, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış; birçok durumda radyoaktivite kullanımı gereksiz hale gelmiştir. PCR teknolojisini uygulayıp amplifikasyon yapmak için :

- 1- DNA örneği (FFPE doku, kan vs izole edilmiş), genelde genomik DNA,
- 2- Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer,
- 3- dNTP’ler (A, T,C,G)
- 4- Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi,
- 5- Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg⁺²) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

Dünya genelinde mutasyon taraması için yaygın olarak sekans spesifik PCR, Pyrosekans ve Dideoksisekans (Sanger metod/BigDye) analizi kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda Dideoksisekans analizi kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar her üç yöntemin de analitik doğruluk değerinin yeterli olduğunu göstermiştir. Pyrosekans yöntemin de hedef sadece mutant kodon taraması olduğu için işlem süresi daha kısa ve sonuçların yorumlanması daha kolaydır. Dideoksisekans analizine göre en önemli avantajı ise mutant aleli diğer

kopyalar arasından yakalamadaki yüksek sensitivitedir. (%5'e karşın %20). Mutasyon taramasında dideoksisekans analizinde örnek dokudan izole edilen total DNA'da alel kopyalarının %20'si mutant ise mutasyon yakalanabiliyorken Pyrosekans analizi için bu oran %5'dir. Sekans analizi yöntemlerine ek olarak alternatif mutasyon tarama yöntemleri:

A- Real-time Alel Spesifik PCR

B- PCR-Reverse Dot Blot Yöntemi

C- Alel Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyon

PCR için kullanılan aletler ve cihazlar: PCR cihazı (Gradiyent özellikli Thermal Cycler, 96 Vakalık, marka Apollo, model ATC401, Seri No: 000634), mikrosantrifuj cihazı (CN -180 Brushies mikrosantrifuj, Katalog No: 268481), Vorteks cihazı (Vorteks, FinePCR Katolog No: VX00232), PCR tüpleri (0,2 ml'lik), mikropipet uçları (0,1-10, 10-50, 50-100 mikrolitrelik uçlar), mikropipetler (5,10, 100 ve 1000 mikrolitrelik) ve 12x10 gözenekli rock tablası.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için kullandığımız doku örneklerimiz; İzmir Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Hastanesi Patoloji Laboratuvarında akciğer adenokarsinomu tanısı almış 27 olgunun ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda akciğer adenokarsinomu tanısı almış 2 olgunun biyopsi ve lobektomilerine ait parafin bloklarından elde edilmiştir. Bloklardan 3-4 adet 10 mikrometre kalınlığında kesitler 1,5 ml'lik ependorf tüplere konulmuştur.

DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu için QIAGEN QIAmp DNA FFPE Tissue Kit kullanılmıştır. Parafine gömülü dokudan DNA izolasyonunda uygulanan basamaklar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- 1- Parafine gömülü dokulardan 10 mikrometre kalınlığında 3'er adet kesit alındı ve 1,5 ml'lik ependorf tüpe konuldu.
- 2- Pipetör ile 1 ml. ksilen eklendi. Tüpün kapağı kapatılıp, vorteks ile 10 saniye karıştırıldı.
- 3- Tüp santrifüje dengeleyici ile karşılıklı yerleştirildi. Oda ısısında 2 dakika son hızda (14.000rpm) santrifüj edildi.
- 4- Pipetör ile peleti koruyacak şekilde, dikkatlice, süpernetantı uzaklaştırıldı.

- 5- Pipetör ile tüpe 1 ml. %100 etanol eklendi. Tüpün kapağı kapatıldı. Vorteks ile 10 saniye karıştırıldı.
- 6- Tüp santrifüje dengeleyici ile karşılıklı yerleştirildi. Oda ısısında 2 dakika son hızda (14.000rpm) santrifüj edildi.
- 7- Pipetör ile peleti koruyacak şekilde, dikkatlice, süpernetantı uzaklaştırıldı.
- 8- Tüpün kapağı açıldı. Tüpteki etanol buharlaşmaya bırakıldı.
- 9- 50-200 mikrolitre hacimli pipetör ve uygun uç kullanarak tüpe 180 mikrolitre Buffer ATL ve 20 mikrolitre Proteinaz K eklendi. Vorteks ile 10 saniye karıştırıldı.
- 10- Tüp 56 C 'deki ısı bloğuna yerleştirildi. 1 saat inkübe edildi. (Bitime 5 dakika kala diğer ısı bloğu 90 C' ye ayarlandı.
- 11- Tüp 90 C'deki ısı bloğunda 1 saat inkübe edildi.
- 12- Tüp inkübasyondan alındı. Tüp içeriğini dipten toplama amaçlı kısa bir santrifüj uygulandı (15 saniye süre ile 14.000rpm). Tüp santrifüj cihazından alındı. Kapağı açıldı. 50-200 mikrolitre hacimli pipetör ve uygun uç kullanarak 200 mikrolitre Buffer AL eklendi. 10 saniye vorteksle karıştırıldı.
- 13- Ardından 50-200 mikrolitre hacimli pipetör ve uygun uç kullanarak 200 mikrolitre Etanol eklendi. 10 saniye vorteksle karıştırıldı.
- 14- Uygun pipetör ve uç kullanarak bu karışım tüpten alındı. QIAamp MinElute kolonuna yüklendi. Kolonun kapağı kapatıldı.
- 15- Tüp santrifüje dengeleyici ile karşılıklı yerleştirildi. Oda ısısında 8.000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 16- Tüp santrifüjden alındı. Spin kolonda sıvı kalmayana dek 15. basamak tekrarlandı.
- 17- Filtratı içeren toplayıcı tüpü atıldı. QIAamp MinElute kolonu 2 ml.'lik yeni bir toplayıcı tüpün içine yerleştirildi.
- 18- QIAamp MinElute kolonunun kapağı açıldı. Uygun pipetör ve uç kullanarak 500 mikrolitre Buffer AW1 eklendi. Kolonun kapağı kapatıldı.
- 19- Tüp santrifüje dengeleyici ile karşılıklı yerleştirildi. Oda ısısında 8.000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 20- Tüp santrifüjden alındı. Toplama tüpünde biriken filtratı atıldı. Kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Uygun pipetör ve uç kullanarak 500 mikrolitre Buffer AW2 eklendi. Kolonun kapağı kapatıldı.

- 21- Tüp santrifüje dengeleyici ile karşılıklı olarak yerleştirildi. Oda ısısında 14.000rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- 22- Tüp santrifüjden alındı. Toplama tüpünde biriken filtratı atıldı. Kolonu 2 ml'lik yeni tüpe yerleştirildi. QIAamp MinElute kolonun kapağı açıldı. Uygun pipetör ve uç kullanarak 20-100 mikrolitre Buffer ATE (tam merkeze gelecek şekilde) eklendi.
- 23- Tüp bu hali ile dikey konumda oda ısısında 1 dakika bekletildi.
- 24- Sonra yeniden santrifüje dengeleyici ile karşılıklı yerleştirildi. Oda ısısında dakika son hızda (14.000rpm) santrifüj edildi.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

EGFR exon 19 mutasyonu için;

Hedef EGFR-Ex19-FWD1: 5' GCACCATCTCACAATTGCCAGTTA 3'

EGFR-Ex19-REV1: 5' AAAAGGTGGGCCTGAGGTTCA 3' kullanıldı.

50 Ul PCR reaksiyon miksi

Mastermix plusX2	25
Primer, her biri	15 pmol
Template DNA	> 100ng

Termal döngü:

95 °C, 1dk	X1
95 °C, 30sn	
60 °C, 30sn	X40
72 °C, 30sn	
72 °C, 10dk	X1

PCR ürünü %2 agaroz jelde yürütüldü.

EGFR-Ex21-FWD1: 5'-CCTCACAGCAGGGTCTTCTCTGT-3'

EGFR-Ex21-REV1: 5'Fam-TCAGGAAAATGCTGGCTGACCTA-3'

Dntp mix (dATP+dCTP+dGTP+dUTP)	5ul
Primer (15 pmol/2,5ul)	5ul
10Xbuffer (Qiagen HotStar Taq kit)	5ul
Mg (25 Mm)	1ul
UNG	0,5ul
Taq polimeraz (Qiagen HotStar Taq kit)	0,25ul
Su	28ul

Genomik DNA (100 ng)	5ul
50 °C X 2 dk	
95 °C X 15 dk	
95 °C X 0,5 dk, 60 °C X 0,5 dk, 72 °C X 0,5 dk	40 siklus
72 °C X 10 dk	1 siklus
PCR ürünü %2 agaroz jelde yürütüldü.	
K-ras için;	
K-Ras/E2intFWD1: 5'-GACATAGTTTCTTACCAGGACGTG 3'	
REV1: 5'-CTGTATCAAGAATGGTCCTGCAC3' kullanıldı.	
1. dNTP Mix (dATP+dCTP+dGTP+dUTP)	5ul
Primerler (15 pmol/2,5 ul)	5ul
10Xbuffer (Qiagen HotStar Taq kit)	5ul
Mg (25 Mm)	1ul
UNG	0,50ul
Taq polimeraz (Qiagen HotStar Taq kit)	0,25ul
Su	28,25ul
Genomik DNA (100 ng)	5ul
2.50 °C X 2 dk veya 10 dk oda ısısında	
95 °C X 15 dk	1 siklus
95 °C X 0,5 dk, 60 °C X 0,5 dk, 72 °C X 0,5 dk	40 siklus
72 °C X 10 dk	1 siklus
PCR ürünü %2 agaroz jelde yürütüldü.	

Resim 1: Gradyent özellikli Thermal Cycler, 96 Vakalılık, marka Apollo, model ATC401,SeriNo:000634



ELDE EDİLEN DNA’NIN KANTİTATİF OLARAK ÖLÇÜLMESİ

DNA’nın kantitatif ölçümü için kullanılan cihaz: Nono Drop 1000

Adı: Biofotometre spectrophotometer Mrk ve mdl= eppendorf

BES GERİLİMİ= 2200

Frekansı: 50 HZ

Akımı: 1

Menşei: Almanya

JELDE YÜRÜTME VE GÖRÜNTÜLEME

Sulu bir çözelti içinde, küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir. DNA’nın negatif yüklü olması katottan anota doğru ilerlemesine neden olur. Aynı jele büyüklüğü bilinen bir belirteç DNA (marker) koyulur ve elektroforez sonunda oluşan bantların konumları karşılaştırılarak değerlendirilir (46). Jel olarak genellikle agaroz jel kullanılır.

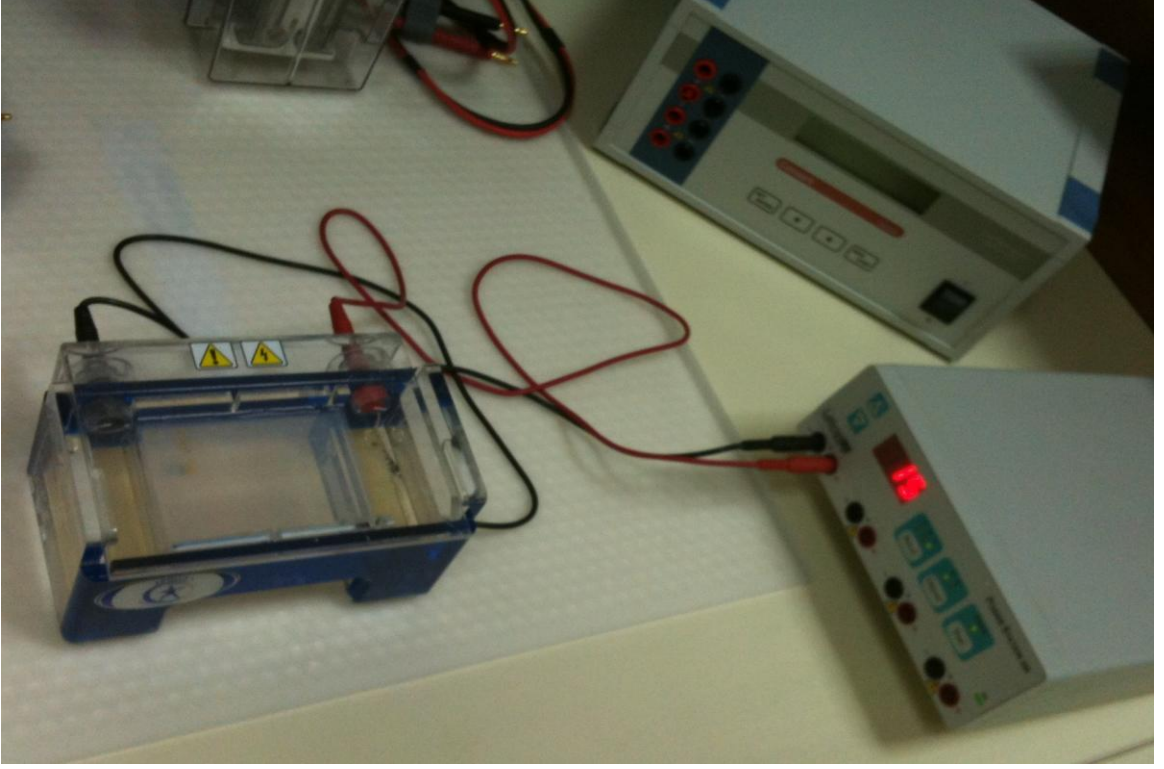
Jelin Hazırlanışı: Biyoemniyet kabininde, %2'lik agaroz çözeltisi soğumadan önce üzerine 5 mikrolitre Etidium Bromid eklenerek karıştırıldı. Bu karışım, tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü ve donması sağlandı.

Kullanılan kimyasal maddeler: %2'lik Agaroz (Prona Basic Agarose), Etidium Bromide (Sigma), Trisma Baz (Sigma, Seri No: T-1503), EDTA (Sigma, Seri No: ED2SS), Borik asit (Sigma, Seri No: B-0252), 100 bp'lik DNA marker (GeneRuler, Fermentas), boya çözeltisi (6X) (loading dye solution) (GeneRuler-Fermentas)

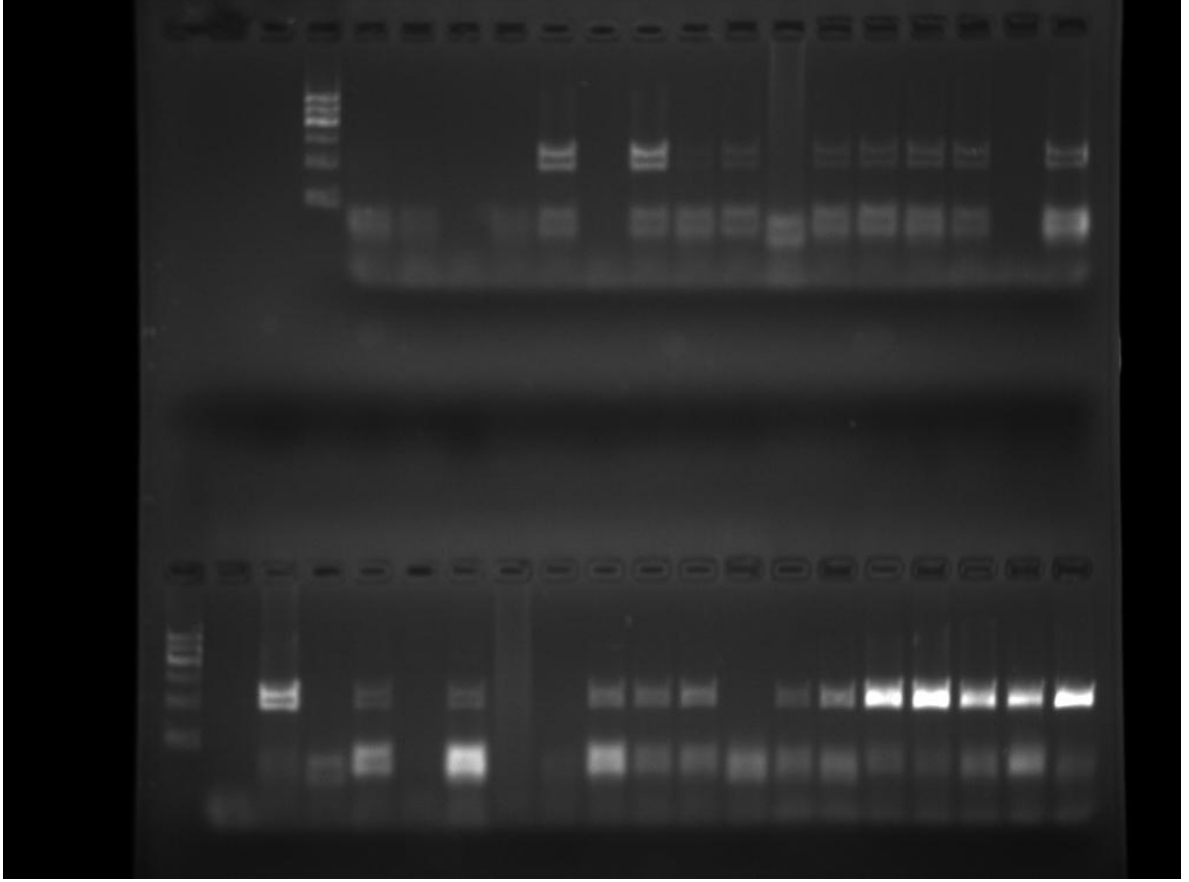
Kullanılan aletler ve cihazlar: Elektroforez güç kaynağı (Consort, EV233, Seri No:83543), Elektroforez tankı (Apollo 731020V, Seri No: 013781), Jel kalıbı, Jel tarakları, Jel maskeleme bandı (Sigma, Seri No: T-6656), UV-transilluminatör (Kodak, Gellogic 200, Seri No: IB5433022), hassas terazi (Schimadzu AW 320), mikropipetler (5, 10, 100 ve 1000 mikrolitrelik) ve mikropipet uçları (0,1-10, 10-50, 50-100 mikrolitrelik uçlar), mikrodalga fırın (Galan, EN025, Seri No:020205) ve Biyoemniyet kabini (Nüve, MN120, Seri No: 02-235).

Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması: TBE tamponu (10X): Trisma bazdan 108 gr, borik asitten 55 gr, EDTA'dan 9,3 gr tartılarak 1 litreye distile su ile tamamlandı. Çözeltinin pH'sı 8,3'e ayarlanarak otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı. TBE tamponu (1X); 100 ml (10X) TBE tampon çözeltisi üzerine 900 ml steril distile su eklenerek oluşturuldu ve oda sıcaklığında saklandı. DNA belirteç (marker) çözeltisi: 10 mikrolitre DNA ladder, 10 µl (6X) yükleme boya çözeltisi ve 40 mikrolitre steril distile su karıştırılarak buzdolabında saklandı. %2'lik agaroz çözeltisi: 1 gr agaroz tartılarak üzerine 50 ml (1X) TBE tamponu ilave edildi. Mikrodalgada kaynatılarak çözünmesi sağlandı. PCR işlemi bitiminde, EGFR exon 19, exon 21 ve Kras mutasyonlarını tespit etmek için PCR ürünleri jelle tatbik edildi. Bunun için; elektroforez tankı (1X) TBE tamponu ile dolduruldu ve jel elektroforez tankına alındı. Jel tarakları ile jelle oluşturulan 20 mikrolitrelik boşluklara, her bir örnek için 5 mikrolitre (6X) boya çözeltisi ve 5 mikrolitre PCR ürünü eklenerek pipetaj yapıldı ve jel yükleme işlemi tamamlandı. Ayrıca bir boşluğa da oluşan ürünün uzunluğunu ölçmek amacıyla DNA (marker) belirteç yüklendi. Elektroforez tankı 120 voltluk, 2 amper akıma 45 dakika süre ile bağlandı. İşlem sonunda, çoğaltılan bantlar "marker" ile karşılaştırılmak üzere UV-transilluminatörde kontrol edildi ve fotoğraf çekildi. Bir jelle en fazla 38 örnek aynı anda yüklenebilmesi ve çalışmamızda 75 PCR ürünü olması nedeniyle, bir ekzon için 3 kez jel döküldü ve yürütüldü.

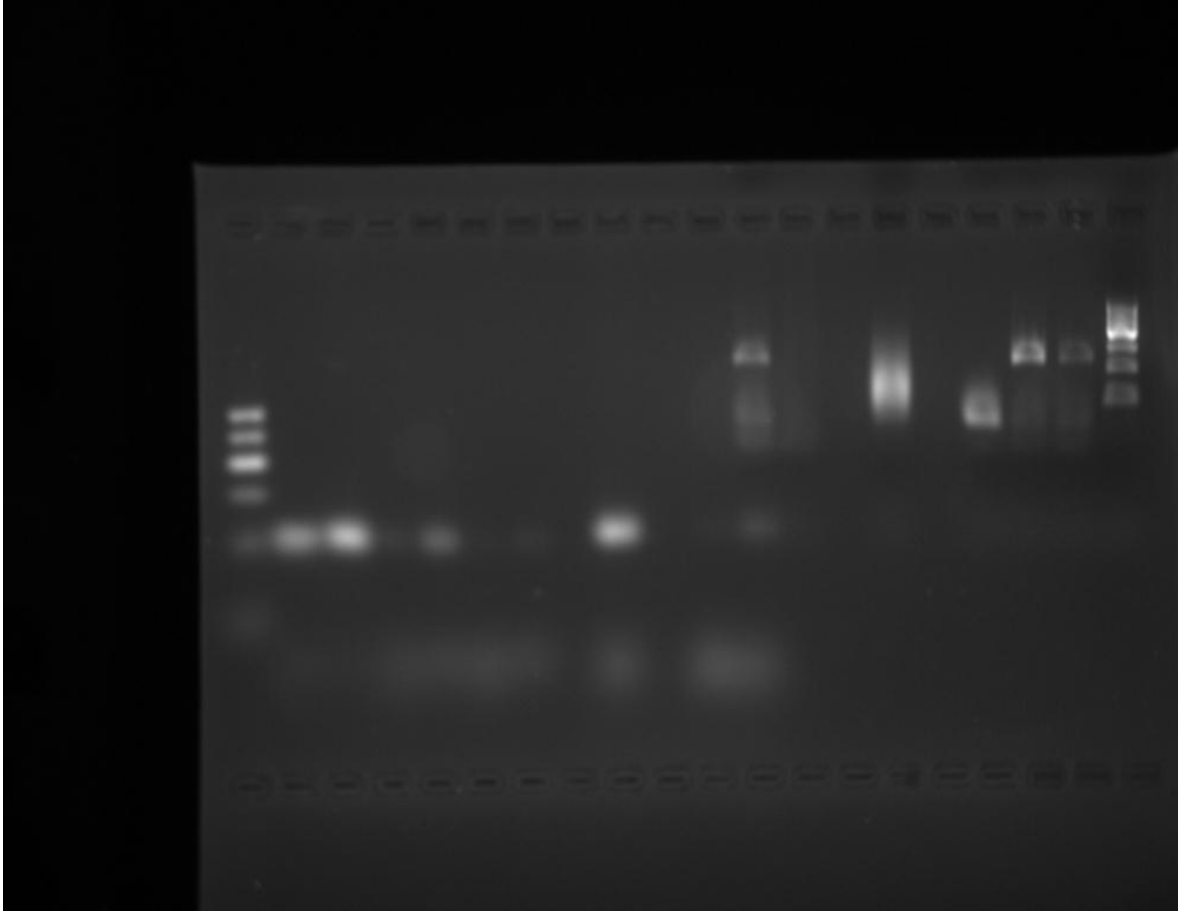
Resim 2: Agaroz jel d zeneg i



Resim 3: Akciğer adenokarsinomunda EGFR Exon 19'un agaroz jel görüntüsü



Resim 4: Akciğer adenokarsinomunda EGFR Exon 21'in agaroz jel görüntüsü



DEĞERLENDİRME

PCR amplifikasyonları başarılı olmuşsa jel elektroforezinde bantlar halinde ampliconlar görülür. Bu durumda mutasyon saptanmasına esas dizi analizi için uygun olduğu söylenir.

FISH İÇİN DOKU HAZIRLAMA PROTOKOLÜ

A-DEPARAFİNİZASYON AŞAMALARI:

- 1- Parafin kesitler 37 °C de bir gece veya 56 °C de 2 saat inkübe edilir.(60 °C de 16 saat)
- 2- Üç ayrı kaptaki %100 ksilenlerde 10'ar dakika bekletilir.
- 3- Rehidratasyon: %100, %85, %75 etanollerden her birinde 5'er dakika olmak üzere geçirilerek hidrate edilir.

B- HİBRİDİZASYON ÖNCESİ AŞAMALAR:

- 1- Distile suda 5 dakika yıkanır
- 2- 0,2 N HCL içinde 15 dakika (tabloya bakınız)
- 3- Distile su içine batırılıp çıkartılarak durulanır
- 4- 2X SSC / 0,05 %Tween 20 içinde 5 dakika yıkanır
- 5- 80 °C de 2X SSC içinde 15 dakika beklet (tabloya bakınız)
- 6- Distile su içinde 1 dakika durula
- 7- 2X SSC / 0,05 %Tween 20 içinde 5 dakika yıka
- 8- İçinde 0,05 mg/ml Proteinaz K bulunduran TEN solusyonu ile 10 dakika 37 °C de beklet (tabloya bakınız)
- 9- 2X SSC /0,05 % Tween 20 içinde 5 dakika yıka
- 10- %4 Formaldehid bulunan PBS solusyonunda 10 dakika beklet
- 11- 2X SSC /0,05 % Tween 20 içinde 5 dakika yıka
- 12- Denatürasyon solusyonu içinde 74 °C de 5 dakika beklet
- 13- 2X SSC /0,05 % Tween 20 içinde 5 dakika yıka
- 14- Sırasıyla %70, %85, %100, etanolde 2'şer dakika bekleterek dehidratasyon (Bu aşamada kesitler kuru olarak nemden uzak birkaç gün saklanabilir.)
- 15- FISH probu kesit üzerine eklenir. (22 X 22 mm lamel kullanılıyorsa 10-12 µl, 24X40 mm lamel kullanılıyorsa 15 µl, 24 X 50 mm lamel kullanılıyorsa 17-20 µl, probe solusyonu kullanılmalıdır.)
- 16- Lamel kenarlarını plastik çimento (rubber cement) ile kapatıp 5-10 dakika 42 °C de kurut
- 17- 90 °C de 6 dakika probe ve hedef DNA denatürasyonu
- 18- Kesitlerin 37 °C de gece boyu hibridizasyon için inkübasyonu

C- HİBRİDİZASYON SONRASI YIKAMALAR:

Plastik çimentonun kaldırılması: 42 °C de 2X SSC içinde 10-20 dakika beklet. Bu işlem sırasında doku kesitlerinin zarar görmemesi için amksimum itina gösterilmelidir. Lamı solusyon içine sokup çıkartarak çimentonun kendiliğinden erimesi ve lamelin kendiliğinden düşmesini bekle !!! Bu nedenle süre 20 dakikadan fazla sürebilir!!! Lamel kesinlikle elle lamın üzerinden kaldırılmaya çalışılmamalıdır.

Lamel kaldırıldıktan sonra:

42 °C de 2X SSC /%50 Formamid yıkama solusyonu içinde 2 x 5 dakika yıka.

42 °C de 2X SSC içinde 5 dakika yıka.

2X SSC /0,03 µg/ml DAPI ile zemin boyaması yap.

Antifade içeren gliserol ile lamel kapat.

Lamel çevresine renksiz oje sürerek kurut. Bu şekilde lameli hareketsiz hale getir.

Artık floresan mikroskopta incelenebilir.

NOT: Kullanılmayan solusyonlar haftada bir kez değiştirilmeli.

Tablo IV: Dokuların hazırlık süreleri

Doku	Asid (2N HCL) dk	80 °C SSC dk	Enzim dk(Proteaz 37 °C)
Deri	10-20 (15)	10-20 (15)	5-10
Barsak	10-20 (15)	10-20 (15)	5-10
Akciğer	10-20 (15)	10-20 (15)	5-10
Tiroid	10-20 (15)	10-20 (15)	5-10
Dalak	20	20	10
Lenf nodülü	20	20	10
Adrenal	20	20	10
Karaciğer	20-30 (25)	20-30 (25)	10-15
Böbrek	20-30 (25)	20-30 (25)	10-15
Pankreas	20-30 (25)	20-30 (25)	10-15
Kalp	20-30 (25)	20-30 (25)	10-15
Meme	20-30 (25)	20-30 (25)	10-15

FISH İÇİN GEREKEN MALZEME SOLUSYONLAR

KSİLEN / ETANOL/ DİSTİLE SU

0,2 N HCL (Hidroklorik asid)

%37 lik saf HCL solusyonu 1/12 sulandırıldığında 1 N elde ediliyor.Bu stok solusyon 1/5 sulandırıldığında 0,2 N solusyon elde ediliyor.

20X SSC STOK SOLUSYONU

(3M Sodium Chloride, 0,3 M Sodium Citrate)

175,3 gr NaCl + 88,2 gr Sodium Citrate-2H₂O, 800 ml distile su içinde çözülür.

Ph 7.0'a ayarlanır (HCL ile)

Çözeltiye distile su eklenerek 1 litreye tamamlanır.

Oda ısısında stok solusyon olarak saklanır.

2X SSC (0,3 M Sodium Chloride + 0,03 M Sodium Citrate)

20X SSC 1/10 oranında sulandırılır.

2X SSC / 0,05% TWEEN 20

(100 cc 2X SSC içine 50 mikrolitre Tween 20 eklenir.)

TEN SOLUSYONU (Tris-EDTA-Na Cl)

100 ml için,05 M Tris-HCl, pH 7,8	0,788 gr
0,01 M EDTA	0,3722 gr
0,01 M NaCl	0,0584 gr

+4 °C de birkaç hafta saklanabilir.

PROTEİNAZ HAZIRLANMASI

Final konsantrasyon: 0,05 mg/ml

50 µgr/µlt konsantrasyonda solusyondan 1/ 1000 TEN solusyonu ile sulandırılıp saklanabilir.

0,05 mg/ml konsantrasyon için toz Proteinaz K'dan hazırlama

Örnek: 0,5 mg 10 ml TEN solusyonu içinde çözünür ve porsiyonlanır, 20 °C'de saklanır.

DENATÜRASYON SOLUSYONU: 50 ml %70 Formamide /2X SSC

35 ml Formamide

5 ml 20X SSC

7 ml distile su

pH 1 N HCL ile 7.0'a ayarlanır. Bundan sonra solusyon hacmini distile su ekleyerek 50 ml'ye tamamlar

Bu solusyon +4 °C de saklandığı sürece 2-3 hafta kullanılabilir.

FORMAMİD YIKAMA SOLUSYONU: %50 Formamide /2X SSC (150 ml)

-75 ml Formamide

-15 ml 20X SSC

-60 ml distile su

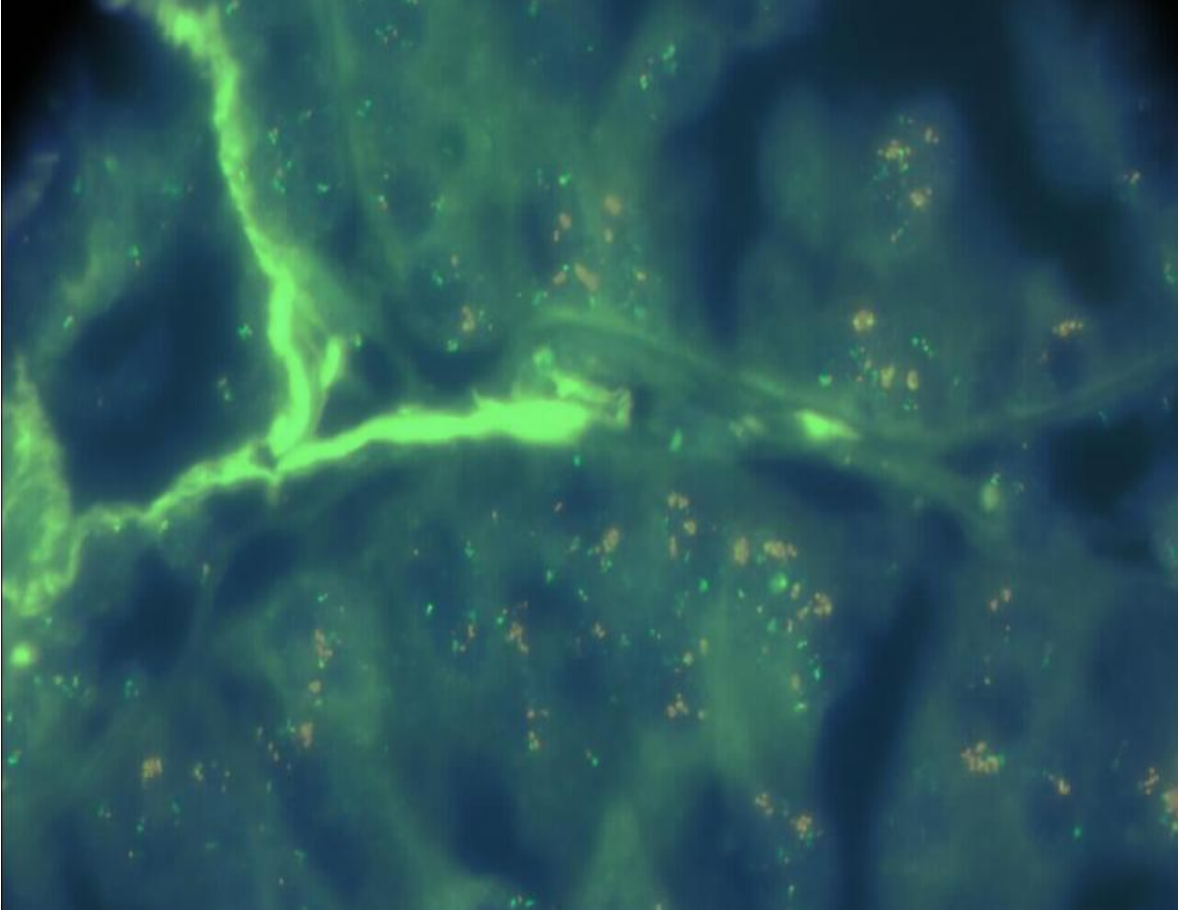
-pH 1 N HCL ile 7.0'a ayarlanır.

Bu solusyon +4 °C de saklandığı sürece 2-3 hafta kullanılabilir.

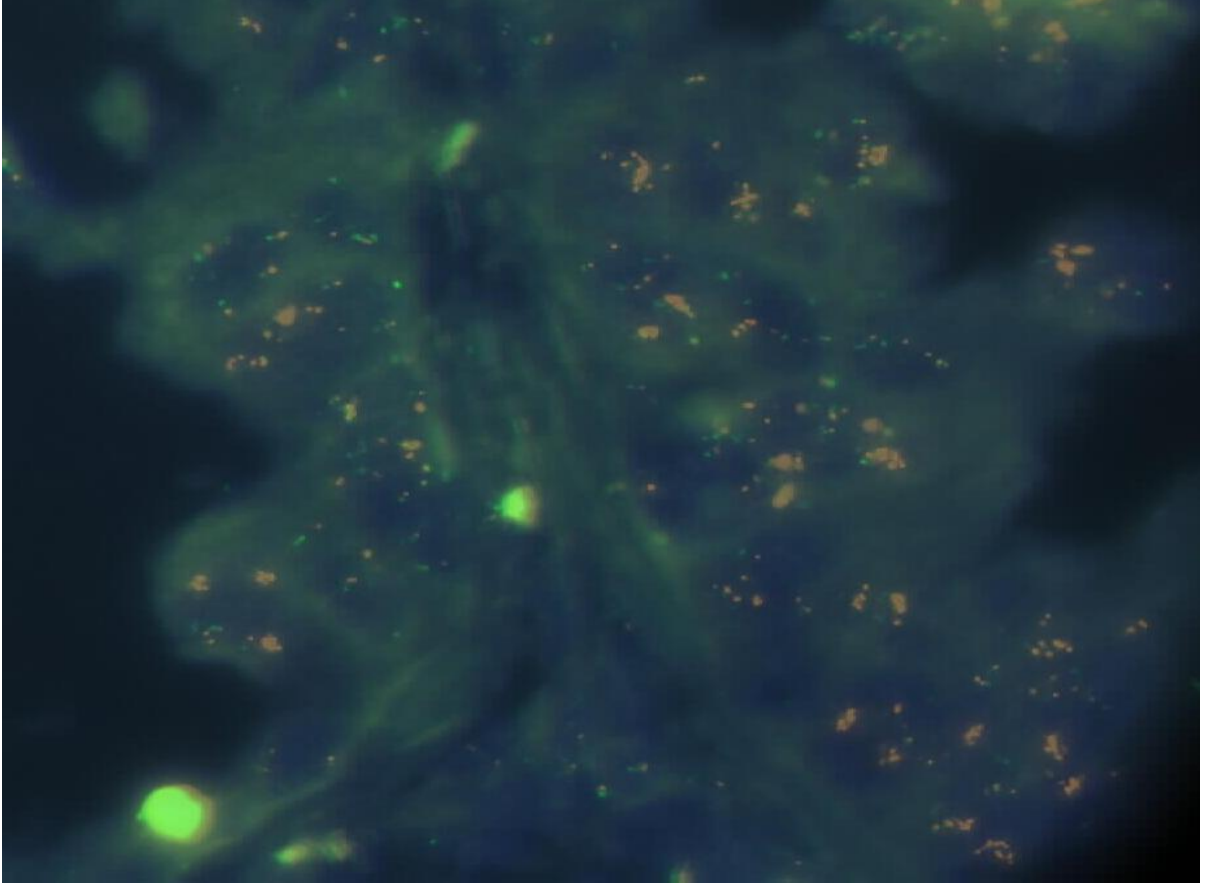
DAPI HAZIRLAMA

2X SSC içinde 0,03 µg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI)

Resim 5: EGFR gen amplifikasyonunun FISH ile saptanması



Resim 6: EGFR gen amplifikasyonunun FISH ile gösterilmesi

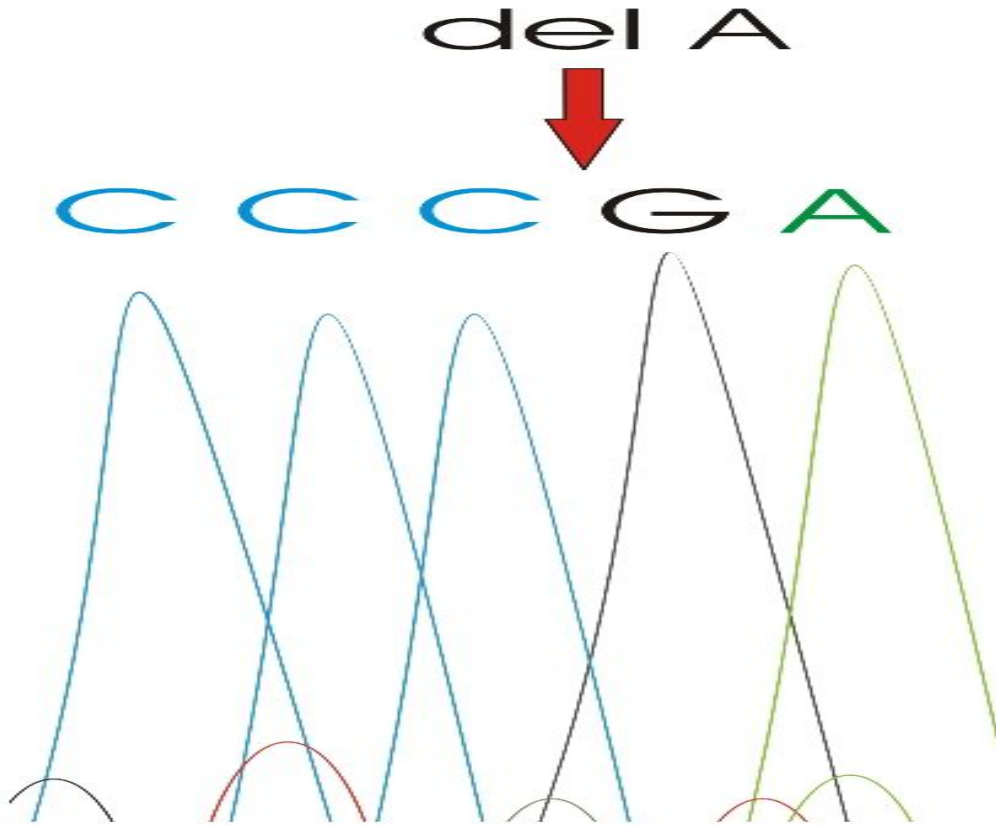


BULGULAR

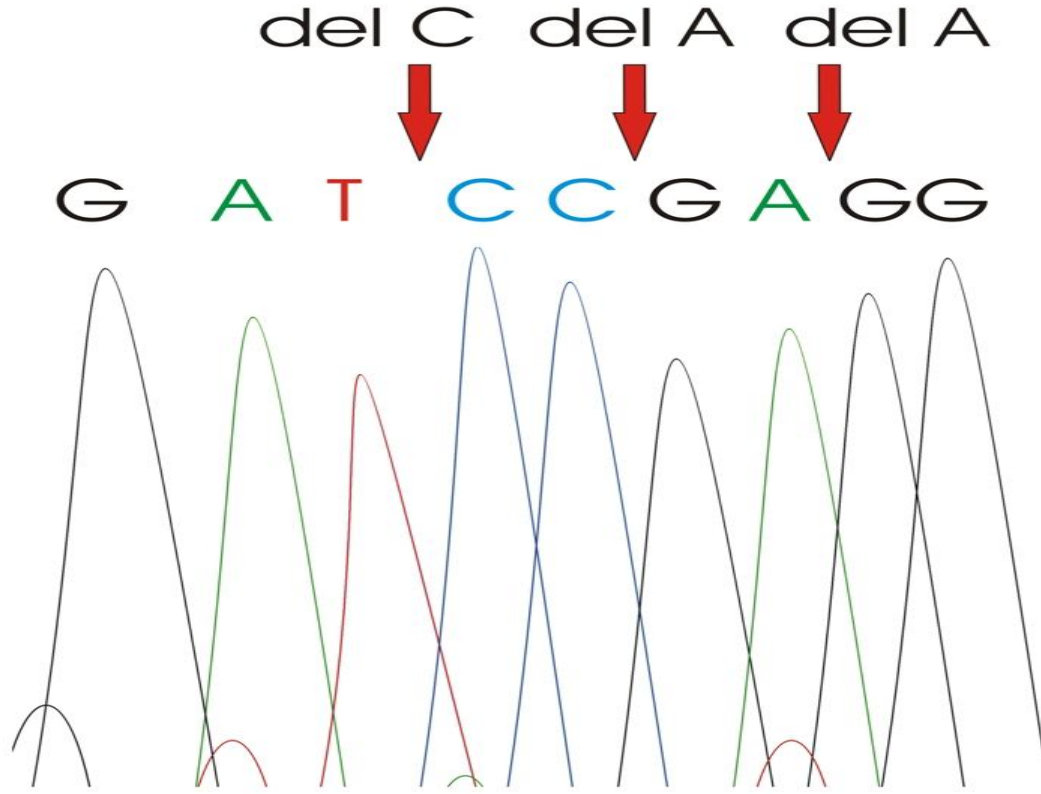
Çalışmamızda akciğer adenokarsinomu tanısı almış 29 olgunun biyopsi ve lobektomi materyallerinde EGFR exon 19 ve exon 21 ile Kras mutasyonlarını PCR yöntemi ile tespit ettik. Ayrıca FISH (Floresan insutu hibridizasyon) ile EGFR (Her 1/neu) gen amplifikasyonunu değerlendirdik.

EGFR exon19 gen mutasyonunu 23 olguda değerlendirdik. 6 olgunun biyopsi örneklerinde DNA düzeyleri düşük olduğu için bu olgularda değerlendirme yapılamadı. 23 olgunun 6 lobektomi örneğinde mutasyon tespit ettik (%26,1). Aynı olgulara ait 23 biyopside ise mutasyon saptanmadı.

Resim 7: Adenokarsinom tanılı lobektomi örneğinde EGFR Exon 19 mutasyonu

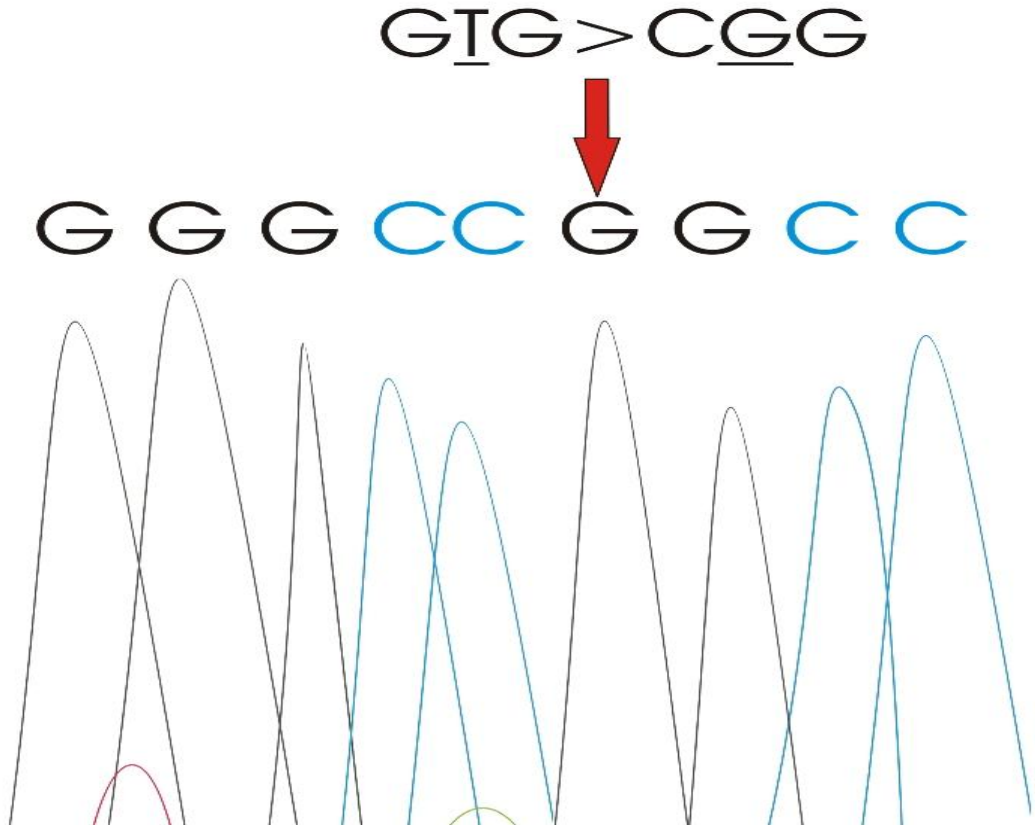


Resim 8: Adenokarsinom tanılı lobektomi örneğinde EGFR Exon 19 mutasyonu



EGFR exon 21 gen mutasyonu 26 olguda değerlendirildi. 3 olguda DNA düzeyleri düşük olduğu için bu olgular değerlendirme dışı bırakıldı. 26 olgunun 1 lobektomi örneğinde mutasyon tespit edildi (%3,8). 26 biyopsi örneğinde ise mutasyon saptanmadı.

Resim 9: Adenokarsinom tanılı lobektomi örneğinde EGFR Exon 21 mutasyonu



Kras mutasyonu 29 olguda değerlendirildi. 29 lobektomi ve biyopsi örneğinde de mutasyon saptanmadı.

FISH ile 23 olguda EGFR gen amplifikasyonunu değerlendirdik. 3 olgu kesitlerde tümör kaybolduğu için, 2 olgu doku çok küçük olduğu için, 1 olgu takip koşulları kötü olduğu için değerlendirme dışında bırakıldı. 23 olgunun lobektomi örneklerinden 1 tanesinde gen amplifikasyonu izlendi (%4,3). 23 biyopsi örneğinde ise EGFR gen amplifikasyonu izlenmedi.

EGFR exon 19 mutasyonunu 25 olgunun lobektomi örneklerinde PCR ile, FISH ile de EGFR gen amplifikasyonunu karşılaştırmalı olarak değerlendirdik. FISH ile EGFR gen

amplifikasyonu tespit ettiğimiz 1 olguda PCR ile EGFR exon 19'da mutasyon saptamadık. 21 olgunun biyopsi örneklerinde FISH ile EGFR gen amplifikasyonu ve PCR ile exon 19'da mutasyon saptamadık.

EGFR exon 21 mutasyonunu 25 olgunun lobektomi örneklerinde PCR ile, FISH ile de EGFR gen amplifikasyonunu değerlendirdik. FISH ile 1 olguda EGFR gen amplifikasyonu saptarken PCR ile bu olguda mutasyon saptamadık, fakat farklı 1 olguda EGFR exon 21'de mutasyon varlığını izledik. 24 olgunun biyopsi örneklerinde ise FISH ile EGFR gen amplifikasyonu saptanmazken PCR ile de exon 21'de mutasyon tespit edilmedi.

TARTIŞMA

EGFR, 170 KD ağırlığında tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoprotein olup, hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR üç bölgeden oluşur: Hücre dışı ligandların (EGF, TGF-a, Amfiregülin) bağlandığı N terminali, hidrofobik transmembran bölgesi ve hücre içi yerleşimli tirozin kinaz aktivitesine sahip C terminali. Büyüme faktörlerinin EGFR ile etkileşimi ile EGFR’de dimerizasyon ve ardından otofosforilasyon olarak, mitojenik sinyalizasyonda rol alan sitoplazmik proteinlerin aktivasyonu meydana gelir (28).

EGF ve TGF-a’nın, EGFR’nün hücre dışı yerleşimli N terminaline bağlanması ile tirozin kinaz aktivasyonu sağlanır. Tirozin kinaz aktivasyonu ile, sinyal iletimi sağlanarak, hücre proliferasyonu ve tümör progresyonunda rol alan anahtar olaylar başlatılır. Bunlar; mitogenez, apoptozisin inhibisyonu, hücre motilitesinde artış, protein sekresyonunda artış, hücre adezyonu (E-kaderin ile etkileşerek), invazyon, hücre yaşam süresinde artış, diferansiyasyon /dediferansiyasyon, anjiyogenez ve metastaz gelişimidir.

KHDAK’larında yapılan çalışmalarda EGFR ekspresyonunun artışı; ileri evre hastalık, metastaz gelişimi, sağkalım süresinde azalma ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının %13-80’inde (skuamöz hücreli kanserlerin %24-89’u, adenokanserlerin %23-46’sında) EGFR aşırı ekspresyonu saptanmıştır (28).

Biz çalışmamızda 29 olgunun 23 lobektomi örneğininin 6 tanesinde EGFR exon 19 gen mutasyonu (%26,1), 26 lobektomi örneğininin 1 tanesinde EGFR exon 21 gen mutasyonu varlığını saptadık (%3,8). Çalışmamızda araştırdığımız mutasyonlar moleküler patoloji laboratuvarlarında kullanılan RT-PCR veya gen sekans cihazı gibi pahalı ve günümüz şartlarında her merkezde bulunmayan gereçlere gerek olmadan sadece DNA izolasyon kiti, PCR cihazı (termal cykler), elektroforez ve jel görüntüleme sistemi gibi basit cihazlarla kolaylıkla ve duyarlı bir şekilde tespit edilebilmektedir.

EGFR’nün tümör gelişimindeki rolü göz önüne alınarak son beş yıl içinde EGFR aktivasyonu ve fonksiyonunu bloke eden çeşitli ajanlar geliştirilmiştir. EGFR’nü bloke eden monoklonal antikorlar ve difteri/pseudomonos toksinleri ile elde edilen immüntoksinler, ilk selektif anti-EGFR ajanlardır. EGFR ve tirozin kinaz enzimini bloke eden ajanlar beş grupta toplanır. Bunlar anti-EGFR antikorları, tirozin kinaz inhibitörleri, OSI 774, PKI 166, PD, ligand konjugatlar (Seragen), immünokonjugatlar ve antisens oligonükleotidlerdir (28). EGFR

tirozin kinaz inhibitörleri olan Gefitinib veya Erlotinib küçük hücreli dışı akciğer kansinonlarının tedavisinde kullanılır (14,47,48,49,50).

Antonio Marchetti ve arkadaşları (51) 375 akciğer adenokarsinomu olgusunda PCR yöntemi ile EGFR exon 18, exon 19, exon 21'deki mutasyonları değerlendirilmişler. Toplam 39 mutasyon saptanmış (%10). Mutasyonların 18 tanesi exon 19'da (%46), 18 tanesi exon 21'de (%46), 3 tanesi exon 18'de (%8) lokalize bulunmuş. Aynı çalışmada olguların 86 tanesi BAC (Bronkoalveoler kansinon) imiş. BAC (Bronkoalveoler kansinon)'larda %27 adenokarsinomlarda %29 oranında kodon 12'de K-ras mutasyonu saptanmış. Biz çalışmamızda akciğer adenokarsinomlu 23 lobektomi örneğinin %26,1'inde PCR ile EGFR exon 19'da, 26 lobektomi örneğinin %3,8'inde EGFR exon 21'de mutasyon tespit ettik. 29 olgunun lobektomilerinde K-ras mutasyonu saptamadık. Aynı olguların biyopsi örneklerinde ise PCR ile EGFR exon 19, exon 21, K-ras mutasyonu, FISH ile de EGFR gen amplifikasyonu tespit etmedik. Bu bulgularla PCR ve FISH yöntemlerinin lobektomilerde biyopsilerden daha efektif olduğunu saptadık.

Irma E. Garcia de Palazzo ve arkadaşları (52) yaptıkları bir çalışmada toplam 32 olgunun 12 tanesinde doğuştan EGFR ekspresyonu, 5 tanesinde EGFR tip III delesyon mutasyonu tanımlamışlar (%16). 13 olgu skuamöz hücreli kansinon, 2 olgu adenoskuamöz kansinon, 10 olgu adenokarsinon, 7 olgu undiferansiye kansinon imiş.

Hisayuki Shigematsu ve arkadaşları (53) çalışmalarında 671 KHDAK olgusunu incelemiş, 54 olguda (%8) K-ras mutasyonu, 149 olguda (%22) EGFR mutasyonu saptamışlar. EGFR mutasyonları sigara içmeyen olgularda görülürken K-ras mutasyonları sigara içenlerde görülmüş.

Allan R.Li ve arkadaşları (54) bizim çalışmamıza benzer şekilde EGFR'nün KHDAK'larında mutasyonu, amplifikasyonu ve protein ekspresyonunun ilişkisini araştırmışlar. EGFR mutasyonlu tümörlerin %52'sinde nonmutasyonlu olgularla karşılaştırıldığında %16'sında EGFR amplifikasyonu bulunmuş. Amplifikasyon CISH (Kromojen İnSutu Hibridizasyon) ile değerlendirilmiş. EGFR gen amplifikasyonu ile EGFR exon 19 delesyonu arasında anlamlı fark bulunmamış. EGFR gen amplifikasyonlu olguların %80'sinde İHC pozitif (0-+3) iken nonamplifiye tümörlerde %33 pozitif bulunmuş. EGFR mutasyonu ile EGFR İHK sonuçları arasında anlamlı ilişki bulunmamış. Biz çalışmamızda 23 olgunun lobektomi örneklerinin 6 tanesinde EGFR exon 19'da, 26 lobektomi örneğinin 1

tanesinde EGFR exon 21’de mutasyon izlerken 1 olguda FISH ile EGFR gen amplifikasyonu saptadık.

Çalışmamızda EGFR gen amplifikasyonu ile EGFR exon 19 ve exon 21 mutasyonları arasında anlamlı bir ilişki saptamadık.

Tae Won Jang ve arkadaşları (70) bir çalışmada EGFR mutasyonu ile sigara hikayesi, yaş veya hastalık stage arasında korelasyon bulmamışlar. Wang HY ve arkadaşları (71) EGFR exon 19 mutasyonunu kadın, sigara içmeyen, adenokarsinomlu olgularda yüksek bulmuşlar.

S.Matsumoto ve arkadaşları (55) 41 adenokarsinomun %37’sinde (15/41) EGFR mutasyonu, %2’sinde (1/41) K-ras mutasyonu izlemişler. Bronkoalveoler karsinom, atipik adenomatöz hiperplazi veya normal akciğer dokusunda mutasyon saptamamışlar. Biz çalışmamızda adenokarsinom tanısı almış 23 olgunun lobektomi örneklerinin %26,1’inde EGFR exon 19’da, 26 olgunun lobektomilerinin %3,8’inde EGFR exon 21’de mutasyon izlerken, 29 olguda K-ras mutasyonu saptamadık.

Gregory J. Riely ve arkadaşları (58) çalışmalarında ve diğer iki çalışmada K-ras mutasyonu bulunan KHDAK’lu olgularda prognozun EGFR mutasyonu bulunan olgulardan daha kötü olduğunu bulmuşlar (56-58). Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarındaki K-ras mutasyonlarının %97’si kodon 12 veya kodon 13’de görülmüştür. K-ras mutasyonu akciğerde Skuamöz hücreli karsinomda sık değildir. K-ras mutasyonu sigara içenlerde daha sık görülür. Riely ve arkadaşları bu çalışmalarında akciğer adenokarsinomlarında K-ras mutasyonu tespit ettikleri olguların %15’inin daha önce sigara içmediğini belirtmişler (58). Aynı çalışmada ve diğer çalışmalarda hedefe yönelik tedavide (Erlotinib, Gefitinib) K-ras mutasyonunun negatif etkili olduğu, direnç gelişimine neden olduğu belirtilmiş (58-61).

Ras genleri H-ras, K-ras, N-ras olmak üzere üç tiptir. Sjoerd Rodenhuis ve arkadaşları (62) 141 sigara içen adenokarsinomlu olgudan 41 tanesinde kodon 12’de K-ras mutasyonu saptarken (%30) 40 sigara içmeyen olgudan 2 tanesinde K-ras mutasyonu tespit etmişler. Bu çalışmada ve diğer üç çalışmada K-ras mutasyonu pozitif olan olguların prognozu negatif olanlardan kötü bulunmuş (62-65).

G.H.Gao ve arkadaşları (66) akciğer kanserlerinde K-ras exon 1 ve 2 ile p53 exon 5-8 mutasyonunu araştırmışlar. Tümörlerde %48 oranında bulunan K-ras mutasyonlarının tamamı exon 1’de ve kodon 9 ile kodon 32 arasında imiş. K-ras mutasyonları sigara içenler ve içmeyenlerde farklı değilmiş. Skuamöz hücreli karsinomlarda %54, adenokarsinomlarda %42

oranında K-ras mutasyonu tespit edilmiş. Çalışmada p53 mutasyonu %67 oranında görülmüş ve exon 7 ve 8'de kodon 226, 270, 275, 281'de izlenmiş. Skuamöz hücreli karsinomlarda %69, adenokarsinomlarda %67 oranında gözlenmiş. Sigara içenlerde (%70) ve içmeyenlerde (%65) benzer oranlarda saptanmış (66).

Kenji Sugio ve arkadaşlarının (67) çalışmasında K-ras mutasyonu izlenen tüm olgular invaziv akciğer karsinomu ya da metastatik tümörlerdi. 12 displastik lezyonun 1 tanesinde K-ras mutasyonu izlenirken hiperplastik ve normal hücrelerde mutasyon izlenmedi. Biz çalışmamızda akciğerin invaziv adenokarsinomu tanısı almış 29 olguda K-ras mutasyonu saptamadık.

William H.Westra ve arkadaşları (68) 41 atipik alveoler hiperplazi vakasından 16 tanesinde (%39), 18 adenokarsinomun 8 tanesinde (%42) K-ras kodon 12 mutasyonu tespit etmişler. 5 adenokarsinom olmayan olguda mutasyon bulunmamış.

Robert Gealy ve arkadaşları (69) K-ras mutasyonunun sigara içen kadınlarda içmeyenlere oranla daha fazla görülürken p53 mutasyonunun sigara içen ve içmeyen kadınlarda farklı pozisyon veya farklı kodonlarda olduğunu tespit etmişler. Bizim çalışmamızda akciğer adenokarsinomu tanısı almış 29 olguda K-ras mutasyonu izlenmedi.

SONUÇLAR

Çalışmamız kapsamında 29 adet akciğer adenokarsinomu tanısı almış olgunun biyopsi ve lobektomi materyallerine ait formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş blokları kullanılmıştır. Biyopsi ve lobektomi materyallerinde EGFR exon 19, EGFR exon 21, K-ras mutasyonları PCR yöntemi ile saptanmıştır. Ayrıca FISH (Floresan insutu hibridizasyon) ile EGFR gen amplifikasyonu değerlendirilmiştir.

PCR ile 23 olgunun lobektomi örneklerinin %26,1'inde (6/23) EGFR exon 19'da, 26 olgunun lobektomi örneklerinin %3,8'inde (1/26) EGFR exon 21'de mutasyon saptanmıştır. 29 lobektomi örneğinde K-ras mutasyonu saptanmamıştır. FISH ile 23 olgunun lobektomi örneklerinin %4,3'ünde (1/23) EGFR (Her 1/neu) gen amplifikasyonu izlenmiştir. Ancak bu olgu PCR ile tespit edilen mutasyonlardan biri değildir. Yani FISH ile PCR arasında anlamlı bir uyum bulunamamıştır.

PCR ile 23 olgunun biyopsi örneklerinde EGFR exon 19'da, 26 olgunun biyopsi örneklerinde EGFR exon 21'de mutasyon ve 29 olgunun biyopsilerinde K-ras mutasyonu saptanmamıştır. FISH ile 23 olgunun biyopsilerinde gen amplifikasyonu gözlenmemiştir.

Sonuç olarak PCR ile EGFR exon 19, exon 21 ve K-ras mutasyonunu saptarken lobektomi materyelleri biyopsi materyallerinden daha efektiftir. FISH ile EGFR gen amplifikasyonunu göstermede de lobektomi materyelleri daha efektiftir. FISH ile PCR arasında EGFR exon 19 için lobektomilerde %75 gerçek negatiflik vardır. EGFR exon 21 için bu oran %95,8'dir. Biyopsiler için EGFR exon 19 ve exon 21'de gerçek negatiflik oranı %100'dür.

Moleküler hedefli tedavilerde EGFR ve K-ras mutasyonunun bilinmesinin hedefe yönelik tedavinin uygulanmasında önemli rol oynadığı yayınlarda bildirilmiştir.

Literatürde çalışmamızda incelediğimiz EGFR exon 19, exon 21 ve K-ras mutasyonlarının PCR ile tespitinde ve FISH ile gen amplifikasyonunun saptanmasında biyopsi mi yoksa lobektomi materyelleri mi daha efektiftir sorusu ile ilgili bir yayın bulunmamaktadır.

Çalışmamızda araştırdığımız mutasyonlar moleküler patoloji laboratuvarlarında kullanılan RT-PCR veya gen sekans cihazı gibi pahalı ve günümüz şartlarında her merkezde bulunmayan gereçlere gerek olmadan sadece DNA izolasyon kiti, PCR cihazı (termal cycler), elektroforez ve jel görüntüleme sistemi gibi basit cihazlarla kolaylıkla ve duyarlı bir şekilde tespit edilebilmektedir.

ÖZET

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) ve tirozin kinaz enzimini bloke eden ajanlar (Gefitinib, Erlotinib) akciğer adenokarsinomlarında hedefe yönelik tedavide çok önemlidir. Ayrıca EGFR ekspresyonunun artması ileri evre hastalık, metastaz gelişimi, sağkalım süresinde azalma, kötü prognozla ilişkilidir. K-ras mutasyonuna sahip olgular EGFR mutasyonu olanlardan daha kötü prognoza sahiptir.

Floresan InSitu Hibridizasyon (FISH) analizi tedavi öncesi değerlendirme için çok iyi bir yöntemdir. EGFR gen amplifikasyonunu değerlendirmek için kullanılır. İmmünohistokimiyadan daha spesifik ve hassastır. FISH kantitatif sonuçlar verir, yani farklı laboratuvarlar arasındaki çeşitliliğe ve özel yorumlara yer vermez. Ayrıca FISH prognozu ve ilaca yanıtı immünohistokimiyadan daha doğru bir şekilde değerlendirir.

Çalışmada toplam 29 olguya ait akciğer adenokarsinomu tanısı alan biyopsi ve bunlara ait rezeksiyon materyalleri değerlendirilmiştir. Tüm materyallerde PCR yöntemle EGFR exon 19, 21, K-Ras, FISH yöntemiyle EGFR gen amplifikasyonu bakılmıştır. değerlendirmeye alınan 23 lobektominin %26,1'inde EGFR exon 19'da, 26 lobektominin %3,8'inde EGFR exon 21'de mutasyon saptanırken 29 lobektomide K-ras mutasyonu görülmemiştir. Aynı olguların biyopsilerinde mutasyon varlığı görülmemiştir.

Ayrıca FISH ile gen amplifikasyonu değerlendirilmiş 23 lobektominin %4,3'ünde amplifikasyon görülürken biyopsilerde görülmemiştir.

Elde edilen sonuçlara göre Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve FISH yöntemlerinin lobektomilerde biyopsilerden daha efektif olduğu ve EGFR gen mutasyonu ile FISH ile değerlendirilen amplifikasyonu arasında anlamlı ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer adenokarsinomu, EGFR Exon 19, Exon 21, K-ras, PCR, FISH, biyopsi , lobektomi

SUMMARY

The agents (Gefitinib, Erlotinib) that blocks Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and tyrosine kinase enzyme are highly important for specific treatment of lung adenocarcinomas. Furthermore, increased EGFR expression level associated with advanced stage of disease, developing metastasis, a decrease of survival rate and poor prognosis. Cases with K-ras mutation, represent poorer prognosis than cases which have ERGF mutation.

Floresan InSutu Hybridization (FISH) analyze is an excellent method as a pretreatment test. FISH is used to evaluate the level of EGFR gene amplification and it has more sensitivity and specificity than immunohistochemistry. FISH always produces quantitative results, therefore, never leads to subjective comments and variability between results of different laboratories. In addition, FISH evaluates prognosis and drug response more correctly than immunohistochemistry.

In this study, biopsies which belong to 29 patient with lung adenocarcinoma and its resection metarials are evaluated. In whole metarials; EGFR exon19, exon 21, K-ras were searched by PCR method and EGFR gene amplification was searched by FISH method. EGFR exon 19 mutation was detected in %26,1 of 23 evaluated lobectomies and EGFR exon 21 mutation was detected in %3,8 of 26 lobectomies. However, K-ras mutation was not observed in 29 lobectomies. Additively, there was no evidence concerning presence of mutation in biopsies of same cases.

Amplification was observed in %4.3 of 23 lobectomies which were assessed by FISH for gene amplification, but was not observed in biopsies.

As a result, according to obtained results, Polymerase Chain Reaction (PCR) and FISH methods are more effective for lobectomies than biopsies and it was detected that there was not any significant relation between EGFR gene mutation and its amplification which is assessed by FISH.

Keywords: Lung adenocarcinoma, EGFR exon 19, exon 21, K-ras, PCR, FISH, biopsy, lobectomy

KAYNAKLAR

- 1- WHO Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, IARC Lyon. 2004: 12- 15.
- 2- Melek Ergen. Moleküler Patoloji-Molecular Pathology. Aegean Pathology Journal1, 103-107, 2004.
- 3- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pathologic Basis of Disease (8th ed), Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004;712-772.
- 4- Moore KL, Persaud T.V.N: İnsan Embriyolojisi (Çev. M. Yıldırım, İ. Okar, H. Dalçık) Nobel Tıp Kitabevi, 2002:268.
- 5- Dere F. Anatomi Ders Kitabı (3. baskı). Adana, Okullar Pazarı Kitabevi, 1994:540-565.
- 6- Sternberg SS. Histology for Pathologists (2nd ed) Philadelphia, Lipincot-Raven, 1997: 433-440.
- 7- Sodeman WA Jr, Sodeman TM. Sodeman's Pathologic Physiology Mechanism of Disease (2nd ed) 1991:487-534.
- 8- Guyton AC, Hall JE Textbook of Medical Physiology (11th ed) Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2006:471-472.
- 9- Akkoçlu A, Öztürk C. Akciğer Kanseri. 1999 Toraks Kitapları. Bilimsel TıpYayınevi. 1999; 23-47.
- 10- Beadsmoore CJ, Screaton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. European Journal of Radiology 2003; 45: 8-17.
- 11- Buzdar AU, Freedman RS, Fossella FV. Lung Cancer. 281-296 (2002) <http://site.ebrary.com/lib/deulibrary>.
- 12- Paez J.G., Janne P.A., Lee J.C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F.J., Lindeman N., Boggon T.J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M.J., Sellers W.R., Johnson B.E., Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to Gefitinib therapy. Science 2004;304:1497-1500.
- 13- Amann J., Kalyankrishna S., Massion P.P., Ohm J.E., Girard L., Shigematsu H., Peyton M., Juroske D., Huang Y., Salmon S., Kim Y.H., Pollack J.R., Yanagisawa K., Gazdar A., Minna J.D., Kurie J.M., Carbone D.P. Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer . Cancer Res 2005;65(1):226-35.

- 14- Li D., Ji H., Zaghlul S., McNamara K., Liang M-C., Shimamura T., Kubo S., M., Chirieac L.R., Padera R.F., Scott A.M., Jungbluth A.A., Cavenne W.K., Old L.J., Demetri G.D., Wong K-K. The journal of clinical investigation 007;117(2):346-352.
- 15- Iyengar P, Tsao MS. Clinical relevance of molecular markers in lung cancer. Surgical Oncology 2002; 11: 167-179.
- 16- Travis W.D, Brambilla E, Hermelink H.K.M, Harris C.C World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart ,IARC Pres Lyon (France) 2004:125-144.
- 17- 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu Bildiri Kitabı, Gaziantep, Ekim 2004.
- 18- Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology (9th ed). Edinburgh: Mosby, 2004:361-364.
- 19- Beadsmoore CJ, Screaton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. European Journal of Radiology 2003; 45: 8-17.
- 20- TNM, Malign tümörlerin klasifikasyonu , 7. baskı.
- 21- Iyengar P, Tsao MS. Clinical relevance of molecular markers in lung cancer. Surgical Oncology 2002; 11: 167-179.
- 22- Yarden Y. Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer Oncology, 2001; 61: 1-13.
- 23- Bunn PA, Helfrich B, Soriano AF, Franklin WA, Varella- Garcia M, Hirsch FR, Baron A, Zeng C, Chan DC. Expression of HER-2/Neu in Human Lung Cancer Cell Lines by Immunohistochemistry and Fluorescence in Situ Hybridization and its Relationship to in Vitro Cytotoxicity by Trastuzumab and Chemotherapeutic Agents. Clinical Cancer Research 2001; 7: 3239-3250.
- 24- Doherty JK, Bond C, et al. The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci, 1999; 96: 10869-10874.
- 25- Menard S, Casalini P, et al. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy Cell Mol Life Sci, 2004; (61: 2965-2978).
- 26- Andre F, Chevalier TL, Soria JC. Her2-neu: a target in lung cancer? European Society for Medical Oncology 2004; 15: 3-4.
- 27- Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. Cancer Letters 2006; 232 : 123-138.

- 28- Kırışoğlu CE, Öztürk C, Köktürk N. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde epidermal büyüme faktör reseptörü ve inhibitörlerinin yeri. *Solunum*2003; 5: 146-152.
- 29- Rosell R. Toward Customized Trastuzumab in HER-2/neu-Overexpressing Non-Small-Cell Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology* 2004; Vol 22, No 7 11711173.
- 30- Clifton F, Libshitz HI, Hermes KE. A Handbook for Staging, Imaging, and Lymph Node Classification. Charles P Young Companypages Mountain, CF (1997).
- 31- Akkoçlu, Atilla. Akciğer kanserlerinde tanı, evreleme ve tedavi öncesi değeriendirme. Türk toraks derneği. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* (American College of Chest Physicians) 111: 1710–1717. [http :// www. chestjournal. org/ cgi/ reprint/ 111/ 6/ 1710](http://www.chestjournal.org/cgi/reprint/111/6/1710).
- 32- Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82:241-250.
- 33- Meert A-P, Martin B, Delmotte P ve ark. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J* 2002; 20: 975-981.
- 34- Ciardello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 2000; 60 (Suppl 1): 25-32.
- 35- Raymond E, Faivre S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 2000; 60 (Suppl 1): 15-23.
- 36- Goldfarb M, Shimizu K, Perucho M, Wigler M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from t24 bladder carcinoma cells. *Nature* 1982;296:404–409.
- 37- Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Robbins KC, Barbacid M. Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2845–2849.
- 38- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981;290:261–264.
- 39- Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the RAS gene family located on chromosome 1. *Nature* 1983;303:396–400.
- 40- Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, Feramisco J, Stavnezer E, Fogh J, Wigler MH. Three human transforming genes are related to the viral RAS oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2112–2116.

- 41- Özen RS. MD, PhD, K- ras export laboratory, İstanbul Genetik Grubu, 2009.
- 42- Sealy Center for Molecular Science, University of Texas Medical Branch at Galveston , Galveston , Texas 77555-1061, Department of Chemistry, Standford Universty, Stanford, California. 2004: 94305-5080.
- 43- Maassen, J.A, Kadowaki, T., Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype, *Diabetologia*. 1996; 39:375-382.
- 44- Van den Ouweland, J.M., Lemkes, H.H, Ruitenbeek, W., et al., Mutation in mitochondrial tRNA (Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness, *Nat Genet*. 1992; 1:368-371.
- 45- Lander, E.S, Schork N.J., Genetic dissection of complex traits, *Science*. 1998; 265:2037-2048.
- 46- Kava, A. Elektroforez Yöntemleri, *Dicle Tıp Dergisi*, 29: 3, 2002.
- 47- Amann J, Kalyankrishna S, Massion PP, Ohm JE, Girard L, Shigematsu H, Peyton M, Juroske D, Huang Y, Salmon JS, Kim YH, Pollack JR, Yanagisawa K, Gazdar A, Minna JD, Kurie JM, Carbone DP. Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 226-235.
- 48- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer : correlation with clinical response to Gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500.
- 49- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba I, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gen mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97: 339-345.
- 50- Shih J-Y, M.D., Gow Ph.D. C-H, Yang M.D. P-C, M.D., D.Ph. EGFR mutation conferring primary resistance to Gefitinib in non-small cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353: 207-208.
- 51- Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Camplese PP, Iarussi T, Mucilli F, Mezzetti A, Cuccurullo F, Sacco R, Buttitta F. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 857-865.

- 52- Palazzo IEG, Adams GP, Sundareshan P, Wong AJ, Testa JR, Bigner DD, Weiner LM. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research* 1993; 53: 3217-3220.
- 53- Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, Lee H, Wistuba I, Fong KM, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Minna JD, Gazdar AF. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2005; 65: 1642-1646.
- 54- Li AR, Chitale D, Riely GJ, Pao W, Miller VA, Zakowski MF, Rusch V, Kris MG, Ladanyi M. EGFR mutations in lung adenocarcinomas clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *Journal of Molecular Diagnostic* 2008; 10: 242-248.
- 55- Matsumoto S, Takuwa T, Kondo N, Okumura Y, Fukuoka K, Nakano T, Hasegawa S, Tanaka F. EGFR/K-ras mutations in lung adenocarcinoma and atypical adenomatous hyperplasia (AAH). *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25: 18.
- 56- Keohavong P, DeMichele MAA, Melacrinis AC, Landreneau RJ, Weyant RJ, Siegfried JM. Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis. *Clinical Cancer Research* 1996; 2: 411-418.
- 57- Rodenhuis S, Slebos RJC, Boot AJM, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, Bodegom PC, Bos JL. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Research* 1988; 48: 5738-5741.
- 58- Riely GJ, Marks J, Pao W. K-ras mutations in non-small cell lung cancer. *The American Thoracic Society* 2009; 6: 201-205.
- 59- Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. K-ras mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *Plos Medicine* 2005; 2: 57-61.
- 60- Riely GJ, Ladanyi M. K-ras mutations an old oncogene becomes a new predictive biomarker. *Journal of molecular diagnostics* 2008; 10: 493-495.
- 61- Ronen SA, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clinical Lung Cancer* 2006; 8: 30-38.
- 62- Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Research* 1992; 52: 2665-2669.

- 63- Nelson HH, Christiani DC, Mark EJ, Wiencke JK, Wain JC, Kelsey KT. Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91: 2032-2038.
- 64- Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, Lamb ML, Kohman LJ, Poiesz BJ. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17: 668-675.
- 65- Pursiainen KH, Hackman P, Ridanpaa M, Anttila S, Karjalainen A, Partanen T, Taikina-Aho O, Heikkila L, Vainio H. K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *International Journal of cancer* 1992; 53: 250-256.
- 66- Gao HG, Chen JK, Stewart J, Song B, Rayappa C, Whong WZ, Ong T. Distribution of p53 and K-ras mutations in human lung cancer tissues. *Carcinogenesis* 1997; 18: 473-478.
- 67- Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY, Gazdar AF. K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Research* 1994; 54: 5811-5815.
- 68- Westra WH, Baas IO, Hruban RH, Askin FB, Wilson K, Offerhaus JA, Slebos RJC. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Research* 1996; 56: 2224-2228.
- 69- Gealy R, Zhang L, Siegfried JM, Luketich JD, Keohavong P. Comparison of mutations in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women. *Cancer Epidemiology* 1999; 8: 297-302.
- 70- Jang TW, Oak CH, Chang HK, Suo SJ, Jung MH. EGFR and K-ras mutations in patients with adenocarcinoma of the lung. *Korean J Intern Med* 2009; 24: 48-54.
- 71- Wang HY, Luo H, Zhao YM, Tang L, Zhou CC. Mutations in exon 19 of EGFR gene in non-small cell lung cancer from chinese patients. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2008; 25: 315-318.