



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KARSİNOMLU
OLGULARDA TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE EGFR,
KRAS ve BRAF GEN MUTASYONLARININ BİOFİLM ÇİPE
DAYALI MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem Ceren UZUN

Antalya, 2013



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER KARSİNOMLU
OLGULARDA TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE EGFR,
KRAS ve BRAF GEN MUTASYONLARININ BİOFİLM ÇİPE
DAYALI MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem Ceren UZUN

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Gülay ÖZBİLİM

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2013

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 2011.01.0103.009 Proje No ile desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimim süresince emeği geçen başta tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Gülay Özbilim'e ve tüm hocalarıma, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve sabır gösteren aileme, her zaman yanımda olan canım dostum Sayın Biyolog Hazal Tuzcu'ya, tüm çalışma arkadaşlarıma, çalışmamızı uygulayan Sayın Mualla Özcan'a ve istatistiksel analiz çalışmasını yapan arkadaşım Sayın Deniz Özel'e katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller Dizini	v
Çizelgeler Dizini	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	4
2.2. Etyoloji ve Patogenez	4
2.3. Sınıflama	6
2.4. Klinik	12
2.5. Prognostik Faktörler	12
2.6. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomları	17
2.6.1. Adenokarsinom	17
2.6.2. Yassı epitel hücreli karsinom	17
2.6.3. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom	18
2.7. Küçük Hücreli Akciğer Karsinomları	18
2.8. Biofilm Çipe Dayalı Mikroarray Yöntemi	19
2.9. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Olguların Özellikleri	23
3.2. INFINITI™ Sistemi	23
3.2.1. INFINITI™ analizör	24
3.2.2. BioFilmChip™ Microarray (BioFilmÇip Mikrodizi)	24
3.2.3. Intellipac™ Reagent Yönetim Modülü (Intellipac reaktif modülü)	25
3.2.4. Qmatic™ işletim yazılımı	26
3.3. Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyonu	26
3.4. Cihazın Çalıştırılması	28
3.5. EGFR Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi	28
3.6. KRAS ve BRAF Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi	32
3.7. İstatistiksel Analiz	35

4. BULGULAR	36
4.1. Olguların Klinik ve Histopatolojik Özellikleri	36
4.2. EGFR Mutasyon Bulguları	58
4.3. KRAS Mutasyon Bulguları	59
4.4. BRAF Mutasyonu	60
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇLAR	69
7. ÖZET	72
8. ABSTRACT	73
9. KAYNAKLAR	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAH	Atipik adenomatöz hiperplazi
AC	Atypical carcinoid
AIS	Adenocarcinoma in situ
ASPE	Allele specific primer extension
ATP	Adenozin trifosfat
ATS	American Thoracic Society
BAC	Bronchioloalveolar carcinoma
BAK	Bronkoalveoler karsinom
BHNEK	Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
CEA	Carcinoembryonic antigen
CIS	Carcinoma in situ
DIPNECH	Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFR-TKI	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor
ERS	European Respiratory Society
FISH	Fluorescence in situ hybridization
HE	Hematoksilen eozin
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HPV	Human papilloma virus
IASLC	International association for the study of lung cancer
INC	Incorporated, anonim
KHAK	Küçük hücreli akciğer karsinomu
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KRAS	Kirsten's ras

LCNEC	Large cell neuroendocrine carcinoma
MIA	Minimal invaziv adenokarsinom
Örn.	Örneğin
PCR	Polymerase chain reaction
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Rb	Retinoblastom
SAP	Shrimp alkalen fosfataz
TC	Typical carcinoid
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
TP53	Tumor protein 53
TTF-1	Tyroid transcription factor-1
WHO	World Health Organization
YEHK	Yassı epitel hücreli karsinom

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. BioFilmChip™ Microarrayin dizaynının ayrıntılı görüntüsü	24
3.2. Analizde kullanılan spotların dizilimi	25
3.3. Intellipac™ Reagent Yönetim Modülü	26
4.1. İyi derecede diferansiye akciğer adenokarsinomu (HEx100)	37
4.2. Orta derecede diferansiye akciğer adenokarsinomu (HEx100)	37
4.3. Kötü derecede diferansiye akciğer adenokarsinomu (HEx100)	38
4.4. Bronkoalveoler karsinom (HEx50)	38
4.5. İyi derecede diferansiye akciğer yassı epitel hücreli karsinomu (HEx100)	39
4.6. Orta derecede diferansiye akciğer yassı epitel hücreli karsinomu (HEx100)	39
4.7. Kötü derecede diferansiye akciğer yassı epitel hücreli karsinomu (HEx200)	40
4.8. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom (HEx200)	40
4.9. Tümör tiplerinin evrelere göre dağılımı	42
4.10. Ekson 19'da EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu	44
4.11. Ekson 19'da EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu	45
4.12. Ekson 21'de EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu	46
4.13. Ekson 19'da EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu	47
4.14. Ekson 20'de EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu	48
4.15. KRAS mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu	49

4.16.	KRAS mutasyonu gösteren BAK olgusu	50
4.17.	BRAF mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu	51
4.18.	EGFR mutasyonu göstermeyen adenokarsinom olgusu	52
4.19.	KRAS mutasyonu gösteren yassı epitel hücreli karsinom olgusu	53
4.20.	KRAS mutasyonu gösteren BHNEK olgusu	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Autogenomics Infiniti™ EGFR mutasyon tarama kitindeki mutasyonların tarandığı analiz noktalarının kodları ve her bir analiz noktasında taranan mutasyonların adları	28
3.2. Autogenomics Infiniti™ KRAS-BRAF mutasyon tarama kitinde; KRAS geninin Kodon 12, 13 ve 61' inde ve BRAF geninin Kodon 600'ünde taranan mutasyonlar	33
4.1. Adenokarsinom ve yassı epitel hücreli karsinom (YEHK) olgularının diferansiasyon derecesine göre dağılımı	41
4.2. Adenokarsinom, YEHK ve BHNEK tanılı hastaların evrelerine göre dağılımı	41
4.3. Tümör boyutuna göre hastaların dağılımı	41
4.4. Lenf düğümü metastazına göre hastaların dağılımı	42
4.5. Uzak metastaz yapıp yapmadığına göre hastaların dağılımı	42
4.6. Akciğer adenokarsinom ve bronkoalveoler karsinom tanılı hastaların özellikleri	55
4.7. Akciğer yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastaların özellikleri	57
4.8. Akciğer büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı hastaların özellikleri	58
4.9. Mutasyon izlenen olgu sayılarının tümör tiplerine göre dağılımı	60

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünya genelinde erkeklerde en sık görülen, kadınlarda ise 3. sıklıkta görülen kanser tipidir (1).

Dünyada her yıl yaklaşık 1,2 milyon yeni akciğer kanseri tanısı konulmaktadır ve yine her yıl dünyada 1,4 milyon akciğer kanserine bağlı ölüm görülmektedir (2,3).

Akciğer kanserinin pek çok alt tipi vardır. Esas olarak Küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) ve Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Bu ayrım tümörün lokalizasyonuna bağlı değişken klinik tablo göstermesi, metastaz hızları ve tedaviye yanıtlarının farklı olması nedeniyle önem kazanmaktadır (4).

Akciğer kanserlerinin %85'i küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarından oluşmaktadır. Küçük hücreli akciğer karsinomları %14 oranında görülmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomları içerisinde ise en sık Adenokarsinom (%38), Yassı epitel hücreli karsinom (%20) ve Büyük hücreli karsinom (%3) alt tipleri görülmektedir (4,5).

Akciğer kanserinin patogenezi son 25 yılda daha anlaşılır hale gelmesine rağmen, akciğer karsinomlu hastaların prognozunda minimal bir gelişim izlenmektedir. Akciğer kanserinde hasta yaşı, cinsiyeti, tümör lokalizasyonu, evresi, tümör boyutu, hücre tipi ve diferansiasyon derecesi önemli prognostik faktörlerdir. Akciğer kanserinde sağ kalımın kısa olması, bu tümörlerde yeni tanısı, prognostik ve tedaviye yönelik çalışmalara gereksinim olduğunu göstermiştir (6).

İleri evre Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin kemoterapotik tedavisinde, EGFR geninin tirozin kinaz domainini hedef alan Gefitinib ve Erlotinib olarak adlandırılmış iki küçük tirozin kinaz inhibitörleri ve Cetuximab gibi monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. KHDAK olguların %10-15'inde hem Gefitinib, hem de Erlotinib ile tümörde gerileme görülmektedir. Bu ilaçların klinik gelişimleri esnasında özellikle Asya kökenli olup Adenokarsinom tanısı almış ve sigara içme öyküsü bulunmayan kadın hastaların bu inhibitörlere karşı daha duyarlı oldukları gözlenmiştir. 2004 yılında ise bu hasta grubunda gözlenen duyarlılığın EGFR genindeki somatik mutasyonlardan kaynaklandığı bulunmuştur (7).

EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteinidir, kromozom 7p12'de lokalizedir (8). EGFR geninin, tirozin kinaz aktivitesi 18-21. eksonları ile sağlanmaktadır. Bu bölge tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) bağlandığı, ATP bağlanma bölgesi içeren tirozin kinaz domainini kodlamaktadır.

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında EGFR gen mutasyonu sıklığı %10-40 arasında değişmektedir. En sık gözlenen EGFR gen mutasyonları da, ekson 19'daki in-frame delesyonlar ve ekson 21'deki L858R nokta mutasyonudur (9). Ekson 19'da en sık görülen delesyon, 747.lösin-749.glutamik asit delesyonu olup tüm EGFR mutasyonlarının %44'ünü oluşturur. Ekson 21'deki L858R mutasyonu ise tüm EGFR mutasyonlarının %41'ini oluşturur. Ekson 20'deki delesyonlar ve duplikasyonlar ise %5'ini oluşturmaktadır (10,11).

EGFR genindeki aktive edici mutasyonlar, sadece tedaviye yanıtı değil aynı zamanda hastaların sağ kalım sürelerini de belirlemektedir. Yapılan dört farklı çalışmada, EGFR gen mutasyonuna sahip metastatik KHDAK olgularının tedavi sonucunda sağ kalım sürelerinin oldukça uzun olduğu gösterilmiştir (10,11).

Tirozin kinaz inhibitörlerin etki mekanizmasında, EGFR sinyal yolağının alt basamaklarında rol oynayan direnç gelişimine yol açan diğer aktivatörlerin belirlenmesi önemlidir. Bu aktivatörlerden birisi KRAS (Kirsten's ras) proteinidir. RAS gen ailesi üyelerinde meydana gelen somatik mutasyonlar, genin sürekli olarak aktivasyonuna yol açarak tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç oluşumuna neden olmaktadır (12).

Akciğer kanserlerinden, adenokarsinom histolojik tipinde KRAS mutasyonları %5-40 sıklıkla görülmektedir. En sık (%70-100) müsinöz bronkoalveolar akciğer adenokarsinomlarda görülürken, %23 sıklıkla ise müsinöz olmayan bronkoalveolar adenokarsinomlarda görülmektedir (12).

Görülen KRAS mutasyonlarının %80-90'ı kodon 12'deki nokta mutasyonlar iken, %10'dan daha azı kodon 13'de ve %10'dan azı ise kodon 61'de yer almaktadır. Etnik farklılık göstermekte olup, Asya kökenlilerde %5-15 ve batı kökenlilerde ise %25-50 sıklıkta görülmektedir. KRAS gen mutasyonları, erkeklerde ve sigara içme öyküsü bulunan adenokarsinom tanılı bireylerde görülmektedir (12).

Sigara içinde bulunan sigara spesifik nitroz aminin (4-(metilnitrosamino)-1-(3-(pidil)-1-(butan), KRAS gen mutasyonlarını indüklediği gösterilmiştir. KRAS

geninde mutasyon bulunan adenokarsinom tanılı olguların konvansiyonel kemoterapiye karşı direnç gösterdikleri, ayrıca postoperatif olarak hastalığın yeniden nüksü ve adenokarsinomlu hastaların ölüm riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir (12).

BRAF gen mutasyonları, akciğer kanserinde sadece %1-2 sıklıkla görülmektedir. Schmid ve arkadaşları, 96 primer akciğer adenokarsinom tümör dokusu ve metastatik tümör dokusunda sekans yöntemi ile EGFR, KRAS ve BRAF gen mutasyonuna bakarak, iki olgunun primer tümör dokusunda, 594-599del DFGLAT ve K601L mutasyonu bulmuşlardır (13).

Solid tümörlerde mutasyon taramalarına yönelik çalışmalarda farklı moleküler teknikler kullanılmaktadır. Tümör dokusu genetik yapı itibariyle heterojen olabilmektedir. Bu nedenle kullanılan metodların da mutasyon deteksiyon limitinin yüksek olması gerekmektedir. Sanger yöntemi ile DNA dizi analizinde en az %20-25 oranında mutasyon varsa saptanabilirken, pyrosequansta %5'lik mutasyonlar, real time PCR'da ise %1'lik mutasyonlar bile gösterilebilmektedir (14).

Bizim çalışmamızda, KHDAK tanısı almış 96 olguda, biofilm çipe dayalı mikromarray yöntemi (Infiniti Autogenomics) ile EGFR, KRAS ve BRAF gen mutasyonlarının belirlenmesi, bu genlerdeki mutasyonların Türk popülasyonuna özgü sıklığının belirlenmesi ve yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Akciğer kanseri, dünya genelinde tüm kanser olguları içinde %13 oranla en sık görülen kanserdir (3). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılında akciğer kanseri tanısı almış 221.130 yeni olgu ve aynı yıl akciğer kanserine bağlı 156.940 ölüm saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanseri insidansı 62.5/100.000 ve mortalite oranı 52.5/100.000'dir (15). Avrupa'da kansere bağlı ölen 3,2 milyon kişinin 386.000'ini (%12) akciğer kanseri olan olgular oluşturmaktadır. Bu olguların %55'i gelişmekte olan ülkelerdedir (16).

2005 yılı verilerine göre Türkiye'de akciğer kanseri insidansı 100.000'de 30.13'dür. 2010 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre trakea, akciğer ve bronş karsinomları kaydına göre erkeklerdeki insidans 69.8/100.000 ve kadınlardaki insidans 8.4/100.000 olarak verilmiştir. Ülkemizde akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser olup, kadınlarda 5. sıklıkta görülen kanser tipidir (17).

2.2. Etyoloji Ve Patogenezi

Yaş: Hastaların %65'i 65 yaş ve üzerindedir (18).

Cinsiyet: Erkeklerde daha sık görülmektedir, ancak son yıllarda insidansı kadınlarda, erkeklere göre daha hızlı artış göstermektedir. Bu artıştaki en önemli faktör, kadınlardaki sigara kullanımının artmasıdır. Histolojik tiplere göre sıklık değişebilmektedir (19).

İrk: Siyah ırkta daha sık görülmektedir (20).

Sigara: Sigara kullanımı, akciğer kanserinin etyolojisinde en önemli role sahiptir. Sigara içenlerde, akciğer kanseri gelişme riskinin hiç sigara içmeyenlere göre 10-65 kat fazla olduğu saptanmıştır. Akciğer kanserli hastaların %85-90'ında sigara kullanımı saptanmıştır. Sigara kullanımı, akciğer kanserinin özellikle yassı epitel hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom tipleri ile ilişkilidir. Akciğer adenokarsinomu, sigara içmeyen olgularda en çok rastlanan histolojik tümör tipidir. Sigara içimiyle akciğer kanseri gelişme riski arasında doz cevap ilişkisi vardır ve günlük içilen sigara adedi, sigara kalitesi, inhalasyon derinliği, sigaraya başlama

yaşı bu ilişkinin önemli ögeleridir (21). Sigara trakeobronşial ağaçta sırasıyla metaplastik, displastik ve malign değişikliklere yol açar (22).

Pasif sigara içiciliği: Batı ülkelerinde sigara içmeyenlerde çevresel maruziyete bağlı olgu etkilenim %20-30'dur. Pasif içicilerin aldığı duman, sigara içenler tarafından doğrudan inhale edilen dumanda tanımlanan tüm karsinojenleri içermekte ve sigara filtresinden de geçmediği için, ana dumandaki karsinojen ağırlığının 100 katı kadarını bulundurmaktadır (23).

Mesleki ve Çevresel Faktörler: En çok bilinen karsinojenler arasında asbest, arsenik, bis (klorometil) eter, nikel ve nikel bileşikleri, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, radyasyon, krom, vinil klorid, akrilonitril, berilyum, kadmiyum, formaldehit, aliminyum, asetaldehit, silika, plütonyum ve radon yer almaktadır.

Bu grupta en önemli olan ve sık karşılaşılan karsinojenlerden birisi asbesttir. Asbest maruziyeti sıklıkla akciğer karsinomuna neden olur. Asbestin iki ana grubu vardır; serpantin ve amfibol. Serpantin grubu lifler, kıvrımlıdır ve en iyi bilinen örneği beyaz asbesttir (kritzol asbest). Amfibol grubundaki lifler ise düzdür. Amfibol grubunda 5 tür asbest vardır; krokidolit (mavi asbest), amozit (kahverengi asbest), aktinolit, tremolit, antofilit. Amfibol grubu liflerin fiziksel özelliklerinin ve dokularda uzun süre değişmeden kalabilmesinin toksisite artışında önemli olduğu kabul edilmektedir. Asbestin karsinojen etkisi, sigara ile birleştiğinde 91 kat artar (24).

Sosyoekonomik durum: Mesleki eğitim ve gelire göre belirlenen düşük ve yüksek sosyal sınıflar arasında mortalitede 2 kat fark görülmüştür. Eğitim düzeyi düşük olanlarda sigara içme prevalansı artmaktadır. Ayrıca düşük sosyoekonomik düzey sağlık hizmetlerine ulaşımı, kaliteyi ve kullanımı etkilemektedir (25).

Diyet ve Obezite: Diyetin kanserlerin %30'undan sorumlu olduğu öne sürülmüştür. Bazı beslenme faktörlerinin ise akciğer kanseri gelişimine neden olduğu düşünülmektedir. Örneğin Vitamin A, E ve C'nin düşük serum konsantrasyonları akciğer kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Vitamin A, E ve C'nin antioksidan ve koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (26). Kırmızı et, salam vb. tuzlu füme besinler (nitrit ve nitrozamin içerdiği için), süt ürünleri, doymuş yağlar ve lipidlerin alımının akciğer kanseri riskini artırdığı düşünülmektedir (27). Bazı kanser türleri (endometrium, meme ve kolorektal kanser) ile obezite arasında

anlamli ilişki bulunurken, akciğer kanseri ile obezite arasında ilişki bulunamamıştır (28).

Non-neoplastik akciğer hastalıkları: Akciğer kanseri ile en gl ilişkili olan hastalık Kronik Obstrktif Akciğer Hastalığı'dır (KOAİ). Sigara kullanımı hem KOAİ'nin, hem de akciğer kanserinin primer sorumlusudur. Ayrıca sigara kullanım öyküsü olmayan kadın hastalarda da yapılan bir çalışmada, hava yolu obstrksyonuyla akciğer kanseri arasında anlamli ilişki bulunmuştur (29).

Akciğer kanser riskinin tüberküloz ve pulmoner intertisyel fibrozisi olan hastalarda arttığı bildirilmiştir. Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, akciğer kanseri insidansının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önceden tüberküloz enfeksiyonu tanısı almış olan hastalardaki yüksekliği anlamli bulunmuştur (30).

Viral etkenlerden özellikle HPV tip 16 ve HPV tip 18 sigara içmeyen, Asya kökenli hastalarda, akciğer kanseri gelişimiyle ilişkili bulunmuştur (31).

Genetik Predispozisyon: Karsinogenez çok basamaklı gelişim aşamasına sahiptir. Çevresel faktörler, özellikle sigara ve endüstriyel kirlilik sonucu açığa çıkan ajanlar, genetik bozukluklara yol açmaktadır. Bu karmaşık duruma neden olan pek çok genetik hasar tanımlanmıştır. Akciğer kanserlerinde çok sayıda gen anomali saptansa da en sık görülenleri TP53 mutasyonu, retinoblastom geninde translokasyon [t (13q11)], 3p kromozomunda heterojenite kaybıdır (6).

2.3. Sınıflama

Akciğer tümörleri WHO 2004 histolojik sınıflamasına göre şu şekilde gruplandırılmıştır;

A.Malign Epitelyal Tümörler

1. Skuamöz hücreli karsinom
 - a. Papiller
 - b. Berrak hücreli
 - c. Küçük hücreli
 - d. Bazaloid
2. Küçük hücreli karsinom
- Kombine küçük hücreli karsinom
3. Adenokarsinom

- a. Adenokarsinom, mikst alt tipi
- b. Asiner adenokarsinom
- c. Papiller adenokarsinom
- d. Bronkoalveolar karsinom
 - Non-müsinöz
 - Müsinöz
 - Mikst non-müsinöz ve müsinöz veya ara tip
- e. Müsin üretimiyle birlikte olan solid adenokarsinom
 - Fetal adenokarsinom
 - Müsinöz (kolloid) karsinom
 - Müsinöz kistadenokarsinom
 - Taşlı yüzük hücreli karsinom
 - Berrak hücreli karsinom
- 4. Büyük hücreli karsinom
 - a. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
 - Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom
 - b. Bazaloid karsinom
 - c. Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
 - d. Berrak hücreli karsinom
 - e. Rabdoid fenotip içeren büyük hücreli karsinom
- 5. Adenoskuamöz karsinom
- 6. Sarkomatoid karsinom
 - a. Pleomorfik karsinom
 - b. İğsi hücreli karsinom
 - c. Dev hücreli karsinom
 - d. Karsinosarkom
 - e. Pulmoner blastom
- 7. Karsinoid tümör
 - a. Tipik karsinoid
 - b. Atipik karsinoid
- 8. Tükrük bezi tümörleri
 - a. Mukoepidermoid karsinom
 - b. Adenoid kistik karsinom

c. Epitelyal-myoepitelyal karsinom

9. Preinvaziv Lezyonlar

a. Skuamöz karsinoma in situ

b. Atipik adenomatöz hiperplazi

c. Diffüz idiopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi

10. Mezenkimal tümörler

a. Epiteloid hemanjioendotelyoma

b. Anjiosarkom

c. Plevrapulmoner blastom

d. Kondrom

e. Konjenital peribronşial myofibroblastik tümör

f. Diffüz pulmoner lenfanjiomatozis

g. İnflamatuar myofibroblastik tümör

h. Lenfanjioleiomyomatozis

i. Sinovyal sarkom

Monofazik

Bifazik

j. Pulmoner arter sarkomu

k. Pulmoner ven sarkomu

B. Benign Epitelyal Tümörler

1. Papillomlar

a. Skuamöz hücreli papillom

Ekzofitik

İnverted

b. Glandüler papillom

c. Mikst, skuamöz hücreli ve glandüler papillom

2. Adenomlar

a. Alveoler adenom

b. Papiller adenom

c. Tükrük bezi tipi adenom

Müköz gland adenomu

Pleomorfik adenom

Diğerleri

d. Müsinöz kistadenom

C. Lenfoproliferatif Tümörler

1. MALT tip Marjinal zon B hücreli lenfoma
2. Diffüz büyük B hücreli lenfoma
3. Lenfomatoid granülomatozis
4. Langerhans hücreli histiositosis

D. Diğer Tümörler

1. Hamartom
2. Sklerozan hemanjiom
3. Berrak hücreli tümör
4. Germ hücreli tümörler
 - Matür teratom
 - İmmatür teratom
 - Diğer germ hücreli tümörler
5. İntrapulmoner timoma
6. Melanoma

E. Metastatik Tümörler

WHO : World Health Organization

IASLC: International Assosiation for the Study of Lung Cancer (32)

2004 yılında yapılan WHO sınıflaması, 2011 yılında International Assosiation for the Study of Lung Cancer (IASLC) / American Thoracic Society (ATS) / European Respiratory Society (ERS) tarafından modifiye edilerek akciğer adenokarsinomu sınıflamasında major değişiklikler yapılmıştır (4).

2011 yılında yapılan Modifiye 2004 WHO Sınıflaması ise şu şekildedir;

Akciğer Kanseri Histolojik Sınıflaması

○ ***Preinvaziv lezyonlar***

- Skuamöz displazi/karsinoma in situ (CIS)
- Atipik adenomatöz hiperplazi (AAH)
- Adenokarsinoma in situ (AIS) (non müsinöz, müsinöz, veya mikst non müsinöz/müsinöz)
- Diffüz idiopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi (DIPNECH)

○ ***Skuamöz hücreli karsinom***

- Varyantları
 - Papiller
 - Berrak hücreli
 - Küçük hücreli
 - Bazaloid

○ ***Küçük hücreli karsinom***

- Kombine küçük hücreli karsinom

○ ***Adenokarsinom***

- Minimal invaziv adenokarsinom (MIA) (≤ 3 cm lepidik baskın tip, ≤ 5 mm'den az invazyon)
 - Nonmüsinöz, müsinöz, mikst müsinöz/nonmüsinöz
- İnvaziv adenokarsinom
 - Lepidik baskın tip (nonmüsinöz bronkoalveoler karsinom (BAC) paterni, >5 mm'den fazla invazyon)
 - Asiner baskın tip
 - Papiller baskın tip
 - Mikropapiller baskın tip
 - Müsin üreten solid baskın tip
- İnvaziv adenokarsinomun varyantları
 - İnvaziv müsinöz adenokarsinom (müsinöz BAC)

- Kolloid
- Fetal (düşük ve yüksek gradeli)
- Enterik
- ***Büyük hücreli karsinom***
 - Varyantları
 - Büyük hücreli nöroendokrin karsinom (LCNEC)
 - Kombine LCNEC
 - Bazaloid karsinom
 - Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
 - Berrak hücreli karsinom
 - Rabdoid fenotip içeren büyük hücreli karsinom
- ***Adenoskuamöz karsinom***
- ***Sarkamatooid karsinom***
 - Pleomorfik karsinom
 - İğsi hücreli karsinom
 - Dev hücreli karsinom
 - Karsinosarkom
 - Pulmoner blastom
 - Diğer
- ***Karsinoid tümör***
 - Tipik karsinoid (TC)
 - Atipik karsinoid (AC)
- ***Tükrük bezi tipi karsinomlar***
 - Mukoepidermoid karsinom
 - Adenoid kistik karsinom
 - Epimyoepitelyal karsinom

(Bu sınıflama rezeksiyon materyalleri için geçerlidir (4).)

2.4. Klinik

Lokal hastalık semptomları: Öksürük, hemoptizi, göğüs ağrısı, dispne, wheezing, stridor, kilo kaybı, halsizlik, ateş, kemik ağrısı, clubbing, disfaji, superior vena cava obstrüksiyonu.

Lokal ileri hastalık semptomları: Ses kısıklığı, frenik sinir paralizisine bağlı bulgular, nörolojik bulgular.

Ekstratorasik yayılım:

- Beyin metastazı
- Kemik metastazları
- Karaciğer ve böbrek üstü bezlerine metastaz
- Paraneoplastik sendromlar
- Kaşeksi (33).

2.5. Prognostik Faktörler

Akciğer karsinomlarında uzun dönem prognoz çalışmalarında genellikle kötü sonuçlar saptanmıştır. En önemli prognostik parametre TNM evreleme sistemi olarak saptanmıştır (34).

- 1) Yaş: 40 yaş altında prognoz kötüdür (22,35).
- 2) Cinsiyet: Kadınların sağkalım oranı, erkeklere göre daha kötüdür. Bu durum kısmen, kadınlarda ileri evre lezyonların daha yüksek insidansda görülmesi ve tümörün daha çok adenokarsinomatöz paternde görülmesi ile ilişkilidir (22). Geniş kapsamlı bir metaanaliz çalışmasında ise, toplam 86.800 küçük hücreli dışı akciğer karsinomu olgu serisinde kadın hastalarda daha uzun yaşam süresi izlenmiştir (36).
- 3) Tümör lokalizasyonu: Periferik yerleşimli yassı epitel hücreli karsinom tipleri, santral yerleşimli olanlara göre daha iyi prognozludur (37).
- 4) Evreleme sistemi: TNM sistemine bağlı evreleme en önemli prognostik parametredir (34).
- 5) Tümör boyutu: Aynı histolojik tipteki tümörlerde çap büyüdükçe prognoz kötüleşir. Periferik yerleşimli neoplazilerde tümör 6 cm'ye ulaşıncaya kadar, prognoz çap ilişkisi çok geçerli değildir (22,38).

- 6) Hücre tipi ve diferansiasyon derecesi: Yassı epitel hücreli karsinomlar, akciğer kanserinin en iyi tedavi edilebilen formudur. Uzun sağkalım süresi gösteren hasta serilerinin yaklaşık yarısını yassı epitel hücreli karsinom grubu oluşturur. Yassı epitel hücreli karsinom tanılı rezeksiyon yapılmış hasta grubunda 5 yıllık yaşam oranı; iyi diferansiye tümörlerde %40, orta derece diferansiye tümörlerde %20 ve kötü diferansiye tümörlerde %7'dir. Adenokarsinomlarda ise diferansiyasyondan bağımsız 5 yıllık sağ kalım oranı %25'dir. Adenokarsinom grubu içerisinde mikropapiller patern diğer paternlere göre daha kötü prognozludur. Bronkoalveoler patern ise klasik adenokarsinoma göre daha iyi prognozludur. Undiferansiye büyük hücreli karsinomda 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %15'dir. Dev hücreli karsinom ise gerçekte tedavi edilemez. Küçük hücreli karsinomun prognozu kötü seyirlidir, kısa süreli sağkalım kısmen kemoterapi ile sağlanabilsede birçok seride 5 yıllık sağkalım oranı %2'nin altındadır (22,39).
- 7) Kan damarı invazyonu: Bu özellik kötü prognoz ile ilişkilidir. Lenfatik invazyon ile beraber rekkürrens riskini artırır (40).
- 8) Göğüs duvarı invazyonu: Operatif mortaliteyi arttırdığı için prognoz kötüdür (41).
- 9) Plevral efüzyon: Tümör hücrelerinin plevral sıvıda saptanması kötü prognozdur (42).
- 10) Skar varlığı: Periferik yerleşimli adenokarsinomlar veya undiferansiye büyük hücreli karsinomlar skar zemininden gelişebilir. Bu yüzden skar varlığı ileride tümör gelişme riski taşıdığı için kötü prognoz ile ilişkilidir (43).
- 11) Lenf düğümü tutulumu: Evreleme sisteminde de yer alan en önemli prognostik belirteçtir. Lenf düğümü tutulumu kötü prognozla ilişkilidir (44,45).
- 12) Nötrofil/lökosit oranı: Kanda artmış nötrofil/lökosit oranı kötü prognoz göstergesidir (46).

- 13) Karbonhidrat antijen: A kan grubu ve H/Ley/Leb antijenlerinin kaybı kötü prognoz ile ilişkili saptanmıştır (47,48).
- 14) TTF-1 ekspresyonu: Küçük hücreli dışı karsinomlarda güçlü ekspresyonu, nükleer transkripsiyonun habercisidir ve iyi prognozu gösterir (49,50).
- 15) DNA ploidi: Akciğer kanserlerinde flow sitometrik yöntemle DNA ploidi tayini önerilmektedir (51,52).
- 16) Onkogen ekspresyonu: Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında RAS P21 ekspresyon artışı, küçük hücreli akciğer karsinomlarında NMYC ekspresyon artışı kötü prognoz göstergesidir (22,53,54). P53 ve HER2/neu ekspresyon artışı da kötü prognoz belirteçidir (22). Ancak HER2/neu ekspresyonu izlenen hastalarda, hedefe yönelik tedaviye yanıt alınabildiği için prognozla ilişkisiz olduğunu gösteren çalışmalar vardır (55,56).

Akciğer Kanserinde TNM Sınıflandırması

Primer 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: Tümörün en geniş çapı ≤ 3 cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale invazyon göstermeyen tümör* (Örn. Ana bronşta invazyon yok)

T1a: Tümör ≤ 2 cm

T1b: Tümör > 2 cm fakat ≤ 3 cm

T2: Tümörün en geniş çapı > 3 cm ancak ≤ 7 cm veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması:

- Ana bronşa invaze, ancak karinaya uzaklık ≥ 2 cm
- Visseral plevra invazyonu
- Hiler bölgeye ulaşan, ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni

T2a: Tümör > 3 cm fakat $\leq$ 5 cm

T2b: Tümör > 5 cm fakat $\leq$ 7 cm

T3: Tümör $\geq$ 7 cm olup, göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikard gibi yapılardan herhangi birine direkt invazyon göstermesi veya karinaya 2 cm'den daha yakın, ana bronştaki tümör veya bütün akciğeri kaplayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile birlikte olan tümör veya tümörle aynı lobda satellit nodül veya nodüllerin bulunması.

T4: Tümör herhangi bir büyüklükte olup, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra korpusu, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi veya malign plevral veya perikardiyal sıvı ile birlikte olan tümör ** veya tümörle aynı tarafta fakat farklı lobda satellit nodül veya nodüllerin bulunması.

Bölgesel Lenf Bezi (N)

Nx: Bölgesel lenf bezinin değerlendirilememesi

N0: Bölgesel lenf bezi metastazı yok

N1: Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf perihiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner lenf bezlerinin tutulması

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

N3: Karşı taraf mediastinal, hiler; aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen lenf bezi metastazları

Uzak Metastaz (M)

Mx: Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi

M0: Uzak metastaz yok

M1a: Tümörün olduğu lobdan ayrı lobda (kontralateral lob) tümör nodülleri bulunması veya tümörle birlikte plevral nodül varlığı veya malign plevral yayılım olması

M1b: Uzak metastaz var

*Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki yüzeysel tümör de T1 grubuna girer.

**Akciğer kanseri ile birlikte olan plevral efüzyonların çoğu tümöre bağlıdır.

Bununla birlikte bazı hastalarda plevral sıvının yinelenen sitolojik incelemesinde tümör saptanamaz. Bu olgularda sıvı kanlı ve eksuda özelliğinde değildir. Klinik durum ve sıvının özellikleri tümörü düşündürmüyorsa, sıvı evrelemede dikkate alınmamalı ve T1, T2 veya T3 olarak değerlendirilmelidir. Perikardiyal sıvı da aynı kurallara göre değerlendirilmelidir (34).

TNM'ye göre evreleme sistemi (34);

EVRE	T	N	M
EVRE IA	T1a,b	N0	M0
EVRE IB	T2a	N0	M0
EVRE IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
EVRE IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE IIIA	T1-3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0,1	M0
EVRE IIIB	T4	N2	M0
	T1-4	N3	M0
EVRE IV	Herhangi T	Herhangi N	M1a,b

2.6. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomları

Tüm akciğer karsinomlarının %85'ini oluşturur (4,5). Bu grupta adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, sarkomatoid karsinom/karsinosarkom bu grupta yer alır (22).

2.6.1. Adenokarsinom

Adenokarsinomlar %25-40 oranında görülür. Erkeklerde daha sık görülür, ancak kadınlarda görülen tüm akciğer karsinomlarının yarısını oluşturur. Sigara içiminin tümörle ilişkisi diğer tiplere göre daha az olmakla birlikte, son yıllarda düşük katranlı sigaraların daha derin aspirasyonu ile oluşan etkinin bu tip tümörlerin artmasına yol açtığı düşünülmektedir. Sigara içmeyen kadınlarda daha sık görülür. Genellikle akciğerin periferinde kitle lezyonu oluşturur. Periferik skar zemininden gelişme olasılığı en yüksek olan akciğer karsinom tipidir. Plevrada fibrin birikimi, fibrozis ve çekinti oluşturabilir. Plevra ve göğüs duvarı invazyonu diğer tiplere göre daha sık görülür. Kan damarı invazyonu en çok izlenen akciğer karsinomu tipidir (22).

Mikroskopik olarak, sıklıkla glandüler diferansiasyon gösteren, tubul yapısı, papiller yapılar oluşturan veya müsin sekrete eden malign özellikte hücrelerden oluşur. Müsin sekrete eden asiner, papiller, solid tipleri yanında taşlı yüzük hücreli, müsinöz karsinom, enterik (goblet hücreli) adenokarsinom gibi nadir varyantları bulunur. Tümörün gradelenmesi glandüler diferansiasyonun derecesine göre yapılır (22).

2.6.2. Yassı epitel hücreli karsinom

Yassı epitel hücreli karsinomlar (skuamöz karsinom) yaklaşık %20 oranında görülür (4,5). Erkeklerde belirgin olarak daha çok izlenir. Sigara en önemli etyolojik ajandır. Genellikle hiler veya perihiler yerleşimli, yani akciğerin santral bölgelerinde yerleşen ve kavitasyona yol açan kitle oluşturlar (22).

Mikroskopik olarak, keratin üreten, birbirleriyle interselüler köprüler oluşturan atipik skuamöz hücrelerden oluşur. Arada nekroza girmiş keratinize hücreler, “keratin incileri” adı verilen oluşumlar dikkat çeker. Küçük hücreli, berrak hücreli, iyi diferansiye papiller, bazoloid tip, iğsi hücreli tip varyantları bulunmaktadır. Tümör keratin yapma derecesine göre iyi, orta ve kötü diferansiye olarak grade’lenir. Skuamöz hücreli karsinom, diğer tiplere göre daha geç metastaz yapar, genellikle lokal yayılma eğilimindedir (22).

2.6.3. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom

Akciğer karsinomlarının %3’ünü oluşturur (4,5). Büyük hücrelerden oluşan bir tümördür. Tümör hücreleri belirgin çekirdekçik, iri çekirdek ve orta derecede sitoplazma içerir. Aslında büyük hücreli karsinom tanısı bir eleme tanısıdır. Skuamöz, adenokarsinom ve küçük hücreli karsinom özelliklerini taşımayan, bir çeşit az diferansiye tümördür. Ultrastrüktürel incelemelerde hücrelerde fokal skuamöz ve adenokarsinom yönünde diferansiasyon saptanmıştır. Genellikle periferik yerleşir. Santral yerleşimli de olabilir. Plevra, göğüs duvarı ve çevre yumuşak dokuya invazyon gösterebilir.

Hücreler morfolojik ve immünohistokimyasal olarak nöroendokrin özellikler gösterir. Nekroz ve mitoz sıktır (10 büyük büyütme alanında 11’den fazla). Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom, büyük hücreli nöroendokrin karsinomların diğer tiplerle birlikte görülmesidir (22).

2.7. Küçük Hücreli Akciğer Karsinomları

Tüm akciğer karsinomlarının %14’ünü oluşturur (4,5). Ortalama 60 yaş civarında görülür. Erkeklerde daha sıktır. Olguların %85’i sigara içicisidir. Genellikle akciğerin santral bölgelerinde yerleşerek endobronşiyal lezyon meydana getirir.

Mikroskopik olarak oval yuvarlak hiperkromatik nükleuslu, belirsiz nükleollü, dar sitoplazmalı hücrelerden meydana gelir. Tümörün hızlı büyümesinden dolayı çekilme artefaktları, nükleuslarda ezilme artefaktları dikkati çeker (22).

2.8. Biofilm Çipe Dayalı Mikroarray Yöntemi (Infinity Autogenomics®)

Infinity analiz sisteminin sensitivitesi %100 olarak belirtilmiştir. Infinity analiz sistemi, Biofilm çip üzerindeki proba, floresan işaretli allel spesifik primerlerin bağlanması, ekstensiyonu ve kantifikasyonunu otomatik olarak yapan mikroarray platformudur. Çip üzerinde her bir mutasyon için duplike veya triplike olarak amplifikasyon gerçekleşmekte ve her bir spottaki ışımanın ortalaması alınarak güvenilir bir sonuç elde edilmektedir (57).

Bu yöntem ile olgular, EGFR geni için yaygın olarak belirlenmiş 50 farklı mutasyon, KRAS ve BRAF genleri için ise, tek bir çipte yaygın görülen 24 farklı mutasyon açısından taranabilmektedir (57).

2.9. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Akciğer kanserlerinin etyolojik nedenlerinin başında sigara kullanımı gelmektedir. Sigara dumanındaki mevcut karsinojenler DNA'nın spesifik bölgelerine bağlanarak genetik mutasyona yol açabilir. Bununla birlikte akciğer karsinomlarının özellikle adenokarsinom alt tipinin hiç sigara içmemiş kişilerde sık olması, karsinogeneizde konak yatkınlığının da rol oynadığını göstermiştir (58). Akciğer kanserlerinin etyolojisinde genetik yatkınlığın varlığı ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda özellikle ailesinde akciğer kanseri bulunan kişilerde, diğer kişilere oranla riskin 2-5 kat arttığı gösterilmiştir (59).

Hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki hasar, kanser oluşumundaki temel mekanizmadır. Diğer kanser türlerine benzer olarak, akciğer kanserinde de onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda gelişebilmektedir (60). En sık görülen mutasyon P53 tümör baskılayıcı gen mutasyonu olup, akciğer kanseri vakalarının %60-75'inde görülür. KHAK'inde, genellikle c-myc ve Retinoblastom (Rb); KHDAK'inde ise genelde, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), RAS protoonkogen ailesi üyeleri (K-ras,N-ras,H ras), BRAF, PI3K ve p16 gen mutasyonları görülebilmektedir. 3p,5q,13q'da meydana gelen kromozom hasarları, özellikle küçük hücreli akciğer kanserlerinde görülür (61). Küçük hücreli akciğer kanseri olgularının %90'ında ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularının ise %50'sinden fazlasında, 17p kromozomal bölgede kayıplar bulunmuştur (60).

Son yıllarda kanser tedavisinde hedefe yönelik ajanların kullanıma girmesiyle KHDAK'nın medikal tedavisi, konvansiyonel tedaviden hedefe yönelik tedaviye doğru bir değişim göstermiştir. Bu nedenle moleküler biyolojiye dayanan, uzun süreli sağ kalımı belirleyebilecek yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

İleri evre KHDAK kemotöropatik tedavisinde, EGFR geninin tirozin kinaz domainini hedef alan gefitinip ve erlotinip olarak adlandırılmış iki küçük tirozin kinaz inhibitörleri ve cetuximab gibi monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. KHDAK olguların %10-15'inde hem gefitinip, hem de erlotinip ile tümörde gerileme görülmektedir. Bu ilaçların klinik gelişimleri esnasında özellikle Asya kökenli olup, adenokarsinom tanısı almış ve sigara içme öyküsü bulunmayan kadınların bu inhibitörlere karşı daha duyarlı oldukları gözlenmiştir. 2004 yılında ise bu hasta grubunda gözlenen duyarlılığın EGFR genindeki somatik mutasyonlardan kaynaklandığı bulunmuştur (7).

EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteindir, kromozom 7p12de lokalizedir. 1970 yılında Sporn ve Todaro, akciğer kanseri de dahil olmak üzere pek çok solid tümörün patogenezinin ve progresyonunun lokal parakrin ve otokrin büyüme faktörleri ile regüle edildiğini bildirmişlerdir. EGFR ile karsinogenez arasındaki ilişki üç noktada olmaktadır. Normal EGFR'nin aşırı ekspresyonu; reseptörde mutasyon gelişimi (EGFRvIII mutasyonu) ile reseptörün sürekli aktivite kazanması, ligandların aşırı yapımına bağlı olarak fizyolojik ligand-reseptör dengesinin bozulması, fosfataz aktivitesinde azalma ve heterodimerizasyondur (8).

EGFR geninin, tirozin kinaz aktivitesi 18-21. eksonları ile sağlanmaktadır. Bu bölge tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) bağlandığı, ATP bağlanma bölgesi içeren tirozin kinaz domainini kodlamaktadır. En sık gözlenen EGFR gen mutasyonları da, ekson 19'daki in-frame delesyonlar ve ekson 21'deki L858R nokta mutasyonudur (9).

Ekson 19'da en sık görülen delesyon, 747.lösin-749.glutamik asit delesyonu olup tüm EGFR mutasyonlarının %44'ünü oluşturur. Ekson 21'deki L858R mutasyonu ise tüm EGFR mutasyonlarının %41'ini oluşturur. Ekson 20'deki delesyonlar ve duplikasyonlar ise %5'ini oluşturmaktadır (9).

EGFR genindeki aktive edici mutasyonlar, sadece tedaviye yanıtı değil aynı zamanda hastaların sağ kalım sürelerini de belirlemektedir. Yapılan dört farklı çalışmada, EGFR gen mutasyonuna sahip metastatik KHDAK olgularının sağ kalım sürelerinin oldukça uzun olduğu gösterilmiştir (62). Cappuzzo ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da, günde 250mg gefitinib ile tedavi edilen KHDAK olguların, ilaca karşı yanıtlarının ve sağ kalım sürelerinin EGFR gen mutasyonları ile korele olduğunu göstermişlerdir (10,11).

EGFR geninde, kemotöröpiye iyi yanıt oluşturan mutasyonların yanı sıra T790M mutasyonu ise ilaca karşı direnç geliştiren bir mutasyondur. Bu mutasyon sonucu, gefitinib ve erlotinib gibi kemotöröpatik ilaçların EGFR proteinindeki ATP bağlanma bölgesine bağlanmaları bloklanarak ilaca karşı direnç gelişmektedir. Yapılan çalışmalar da göstermektedir ki terapiden önce tümör hücrelerinin küçük bir kısmında bulunan T790M mutasyonunun belirlenmesi, kemoterapiye yanıt için hayati önem taşımaktadır (63). Bu nedenle, tümörde küçük bir klonda direnci indükleyen mutasyonların belirlenebilmesi için oldukça sensitif metodların kullanılması önemlidir.

Tirozin kinaz inhibitörlerin etki mekanizmasında, EGFR sinyal yolağının alt basamaklarında rol oynayan dirneç gelişimine yol açan diğer aktivatörlerin belirlenmesi önemlidir. Bu aktivatörlerden birisi KRAS (Kirsten's ras) proteinidir. RAS gen ailesi üyelerinde meydana gelen somatik mutasyonlar, genin sürekli olarak aktivasyonuna yol açarak tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç oluşumuna neden olmaktadır. Akciğer kanserlerinden, adenokarsinom histolojik tipinde KRAS mutasyonları %5-40 sıklıkla görülmektedir. En sık (%70-100) müsinöz bronkoalveolar akciğer adenokarsinomlarda görülürken, %23 sıklıkta ise müsinöz olmayan bronkoalveolar adenokarsinomlarda görülmektedir (12).

Görülen KRAS mutasyonlarının %80-90'ı kodon 12'deki nokta mutasyonlar iken %10'dan daha azı kodon 13'de ve %10'dan azı ise kodon 61'de yer almaktadır. Etnik farklılık göstermekte olup, Asya kökenlilerde %5-15 ve batı kökenlilerde ise %25-50 sıklıkta görülmektedir. KRAS gen mutasyonları, erkeklerde ve sigara içme öyküsü bulunan adenokarsinom tanılı bireylerde görülmektedir. Sigara içinde bulunan sigara spesifik nitroz aminin [4-(metilnitrosamino)-1-(3-(pridil)-1-(butan)], KRAS gen mutasyonlarını indüklediği gösterilmiştir. KRAS geninde mutasyon bulunan adenokarsinom tanılı olguların

konvansiyonel kemoterapiye karşı direnç gösterdikleri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca postoperatif olarak hastalığın yeniden nüksü ve adenokarsinomlu hastaların ölüm riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir (12).

BRAF gen mutasyonları, akciğer kanserinde sadece %1-2 sıklıkla görülmektedir. Schmid ve arkadaşları, 96 primer akciğer adenokarsinom tümör dokusu ve metastatik tümör dokusunda sekans yöntemi ile EGFR, KRAS ve BRAF gen mutasyonuna bakarak, iki olgunun primer tümör dokusunda, 594-599del DFGLAT ve K601L mutasyonu bulmuşlardır (13).

Solid tümörlerde mutasyon taramalarına yönelik çalışmalarda farklı moleküler teknikler kullanılmaktadır. Tümör dokusu genetik yapı itibarıyla heterojen olabilmektedir. Bu nedenle kullanılan metodların da mutasyon deteksiyon limitinin yüksek olması gerekmektedir. Sanger yöntemi ile DNA dizi analizinde en az %20-25 oranında mutasyon varsa saptanabilirken, pyrosekans %5'lik mutasyonlar, real time PCR'da ise %1'lik mutasyonlar bile gösterilebilmektedir (14).

Goa ve arkadaşları, kolon kanserli olgularda KRAS gen mutasyonunu belirlemeye yönelik yapmış oldukları bir çalışmada, strip test, pyrosekans ve sanger sekans yöntemlerini karşılaştırmışlar; sonuç olarak, strip testin mutasyon deteksiyon limitini %1, pyrosekansın %5 ve sanger sekans yönteminin ise %20-25 olarak belirtmişlerdir (14). Angulo ve arkadaşları, EGFR mutasyonu belirlemede real time PCR kiti ve direk sekans yöntemini karşılaştırmışlar. Real time PCR kiti ile %1'lik mutasyon bile saptanabilirken, direk sekans yönteminde bu oran %30 olarak belirtilmiştir (64).

Biofilm çipe dayalı mikroarray yöntemi; sanger sekans yöntemi, pyrosekans yöntemi, real time PCR yöntemi, strip test yöntemi gibi mutasyon belirleme yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiş bir mutasyon analiz sistemidir. Bu yöntem ile, çip üzerinde kısa sürede birçok mutasyon aynı anda otomasyon sistemiyle taranabilmektedir. Kullanılan diğer yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç vermesi ve kişiye bağlı değerlendirme gerektirmemesi avantajdır. Özellikle bilinen mutasyonları taramada mutasyon deteksiyon limiti %1'dir (65,66,67).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Olguların Özellikleri

Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2005-2012 yılları arasında küçük hücreli dışı akciğer karsinomu tanısı almış 96 olgu değerlendirilmiştir. Olguların tamamı cerrahi rezeksiyon materyalidir. Rezeksiyon materyallerinden hazırlanan dokular %10'luk formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş örneklerdir. Hastalara ait parafin bloklardan elde edilen 4 mikron kalınlığındaki kesitler, hematoxilen eozin ile boyanarak incelenmiştir. Parafin blok seçiminde %80'i tümör dokusundan oluşan örnekler seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen olgulardan, 58'i adenokarsinom, 30'u yassı epitel hücreli karsinom ve 8'i büyük hücreli nöroendokrin karsinomdan oluşmaktadır.

Çalışmamıza Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Kurulunun 15 Mart 2011 tarihinde 64 sayılı kararı ile Etik Kurul Onayı alınmıştır. Klinik bilgiler, retrospektif olarak hastane arşiv dosyalarından elde edilmiştir. Olguların sigara içiciliği, klinik anamnezi incelenerek saptanmıştır.

2004 Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre histolojik grade, evre, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz analiz edilmiştir. Histolojik grade, adenokarsinom ve yassı epitel hücreli karsinom için iyi, orta ve az diferansiye şeklinde tanımlanmıştır. Evrelemesi TNM sistemine göre yapılmıştır. Her olgu için primer tümör boyutu, bölgesel lenf düğümü tutulumu, uzak metastaz varlığı değerlendirilmiştir.

3.2. INFINITI™ Sistemi

INFINITI sistemi Autogenomics Inc. (A.B.D.) tarafından özellikle Moleküler Patoloji'de uygulanan onkoloji parametreleri başta olmak üzere, moleküler tanıdaki tüm güncel gereksinimler göz önünde bulundurularak geliştirilmiş çoklu analiz yapabilen mikroçip teknolojisi esaslı otomatik bir cihazdır. INFINITI sistemi, niteliksel ve niceliksel birçok proteomik ve genomik uygulamada, hastalığa özgü BioFilmChip Microarray (BioFilmÇip Mikrodizi) kullanan tam otomatik, çoklu moleküler tanı platformudur.

INFINITI™ sistemi aşağıdaki parçalardan oluşmaktadır:

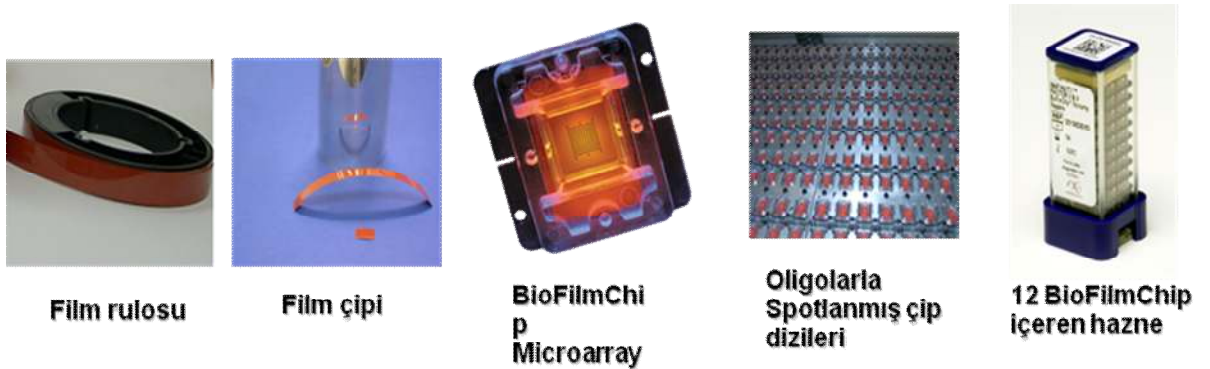
- INFINITI™ Analizör
- BioFilmChip™ Microarray (BioFilmÇip Mikrodizi)
- Intellipac™ Reagent Yönetim Modülü (Intellipac Reaktif Modülü)
- Uygulama arayüzü Qmatic™ İşletim Yazılımı

3.2.1. INFINITI™ analizör

INFINITI Analizör, DNA analizlerindeki örnek işleme, reaktif yönetimi, hibridizasyon ve optik okuma gibi tüm test işlemlerini, tamamen kendi kendine yeten sistem içerisinde tamamlar.

3.2.2. BioFilmChip™ Microarray (BioFilmÇip Mikrodizi)

BioFilmChip™ Microarray üç boyutlu matris sayesinde biyolojik materyallerle yüksek uyum sağlayan polyester film üzerinde yaklaşık 8-10 µm kalınlığındaki hidrojel tabakaların çoklu katmanlarından oluşan mikroarray tabanlı bir filmidir. İkinci katman test hassasiyetinin sağlanması için gerekli olan içerideki floresan sinyali ortadan kaldıran özel bir niteliğe sahiptir. En üstteki katman, oligonükleotid, antikor ya da antijen gibi streptavidin-biotin etkileşimini kullanarak non-kovalent bağlı biyolojik molekülleri tespit etmek için tasarlanmıştır. İşaretlenmiş BioFilmChip Microarray'ler kolay kullanım için özel haznelerde paketlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. BioFilmChip™ Microarrayin dizaynının ayrıntılı görüntüsü.

Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi, oligoların yerleşiminden kaynaklanan hatayı engellemek için rastgele spotlama yapılmaktadır. Aynı özellikteki spottan birden fazla bulunması ile analizin tekrarlı teyidi sağlanabilmektedir (Şekil 3.2).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Reg														Reg
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
		16										16		
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
		89										10		
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
	31	87	13	70						72	14	97	32	
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
	29	86	12	65	14	15	18	19	20	81	15	99	33	
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
	28	85	11	63	13	2	3	4	21	85	18	1	54	
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	25	81	8	61	12	1	16	5	22	86	19	2	61	
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
	24	72	7	54	11	8	7	6	24	87	20	3	63	
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
	22	70	6	33	32	31	29	28	25	89	21	4	65	
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
		65	5	4	3	2	1	10	99	97	22	5	70	
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
		63	61	54	33	32	31	29	28	25	24	6		
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
		21	20	19	18	15	14	13	12	11	8	7		
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
		16	10	99	97	89	87	86	85	81	72	16		
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
							Reg		Bin		Bin		Bin	Ref

Şekil 3.2. Analizde kullanılan spotların dizilimi.

3.2.3. Intellipac™ Reagent Yönetim Modülü (Intellipac reaktif modülü)

Testleri gerçekleştirmek için gerekli tüm ilgili reaktifler, özgün bir tasarıma sahip 4 rezervuarlı reaktif yönetim modülünde yer almaktadır (Şekil 3.3). Intellipac™ reaktif modülüne, kullanıcı için işlem sürecini basitleştiren ve reaktif son kullanma tarihi, kalan reaktif miktarı ve yapılabilecek test sayısı gibi verileri elektronik olarak kaydeden 64kb'lık bir hafıza kartı entegre edilmiştir.



Şekil 3.3. Intellipac™ Reagent Yönetim Modülü (Intellipac Reaktif Modülü).

3.2.4. Qmatic™ işletim yazılımı

Qmatic İşletim Yazılımı çok yönlü bir işletim sistemine sahiptir. INFINITI™ analizör tarafından yapılan, yazılım, örnek ve reaktiflerin boşaltılması, aspirasyonu ile alele-özümlü primer uzatma (ASPE) reaksiyonu, hibridizasyon, floresan sinyal ölçümlerini kontrol eder. Veri analizi, veri işlenmesi ve sonuçların raporlanması gibi tüm elektromekanik ve robotik işlemleri yönetir.

3.3. Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyonu

1. Retrospektif olarak seçilen vakalara ait hemotoksilen-eosin ile boyalı preparatlar yeniden incelenerek, tümör içeren lam seçilerek preparat üzerinde tümör alanı çizilir. %80 ve daha fazla tümör alanına sahip bloklardan direk olarak 10 mikron kalınlığında kesit alınarak steril 2 ml'lik santrifüj tüpüne konulur. Tümör alanının küçük olması durumunda 5 mikron kalınlığında kesitler lam üzerine alınarak tümör alanı lam üzerinden kazınıp 2 ml'lik santrifüj tüpü içine alınır.
2. DNA izolasyonu için parafine gömülü dokudan DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanılmıştır.
3. Dokunun deparafinizasyonu: Santrifüj tüp içine alınan dokulara 1 ml Ksilol eklenir. Vortekslenir. 2 dakika 14000 rpm de santrifüj yapılır. Süpernatant kısım alınır.

4. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanır. Dokudaki parafin kalıntısına bağlı olarak işlem bir kez daha tekrarlanabilir.
5. Ksilol aşamasından sonra 1 ml absölü alkol eklenir, vortekslenir ve 2 dakika 14000 rpm’de santrifüj edilir. Süre sonunda süpernatant kısım alınır.
6. Alkolün uçması için santrifüj tüplerinin kapakları açık bırakılarak 10 dakika oda ısısında bekletilir.
7. Doku lizis aşaması: Santrifüj tüpündeki doku üzerine 180 µl ATL Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklenir. 56°C’de gecede gece boyu (16-18 saat) inkübasyona bırakılır.
8. Ertesi gün lizis olan dokunun bulunduğu santrifüj tüpler 95°C’ye ayarlı ısı bloğunda 15 dakika bekletilir.
9. Süre sonunda tüpler oda ısısında soğumaya bırakılır.
10. Lizis olan dokunun üzerine 200 µl AL buffer ve 200 µl absölü alkol eklenir, vortekslenir ve 14000 rpm kısa 1 dakika santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonunda üst kısım dikkatlice kolona aktarılır. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
12. Kolon temiz bir toplayıcı tüp içine alınır. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu I’dan eklenir. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
13. Kolon temiz bir toplayıcı tüp içine alınır. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu II’dan eklenir. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
14. Kolon temiz bir toplayıcı tüp içine alınır. Kalan solüsyonun uzaklaştırılması için 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilir.
15. Kolon temiz bir 2 ml’lik santrifüj tüpüne alınır. Üzerine 50 µl elüsyon solüsyonundan eklenir. Oda ısısında 5 dakika bekletilir.
16. Süre sonunda 8000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek kolondaki DNA’nın elüsyonu sağlanır.
17. DNA; -20°C’de saklanır.

3.4. Cihazın Çalıştırılması

Bir testin çalışmasına başlayabilmek için, kullanıcı aşağıdaki basit işlemleri yerine getirir:

1. Analizörün kapağını açmak için ekrandaki kapak düğmesine basılır.
2. Intellipac™ modülleri, pipet uçları, BioFilmChip™ hazneleri ve amplifiye edilmiş örnekler yüklenir.
3. Her spesifik örnek için test gereksinimlerini yer aldığı bir iş listesi hazırlanır ve “yürüt”e basılır (Analizörün kapağı kapanır ve daha fazla manuel müdahale gerekmeksizin sonuçları elde edilir).

3.5. EGFR Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi

EGFR gen mutasyonlarını belirlemek amacıyla, Autogenomics Infinity™ EGFR mutasyon tarama kiti kullanılmıştır. Kit; aşağıdaki tabloda görülen ve EGFR geninin tirozin kinaz domainini kodlayan ekzon 18-21’de protein fonksiyonunu değiştiren bilinen en sık görülmüş mutasyonları belirleyebilecek şekilde dizayn edilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Autogenomics Infinity™ EGFR mutasyon tarama kitindeki mutasyonların tarandığı analiz noktalarının kodları ve her bir analiz noktasında taranan mutasyonların adları.

BİOFİLM ÇİP ÜZERİNDEKİ MUTASYON ANALİZ NOKTASININ KODU	AMİNOASİT DEĞİŞİMLERİ
CtrlX18 (Ekzon 18)	Ekzon 18’deki değişimler
2125-MA	Glu709Lys
2125-MC	Glu709Gln
2126-MC	Glu709Ala
2126-MG	Glu709Gly
2126-MT	Glu709Val
2155-MA	Gly719Ser
2155-MC	Gly719Arg
2155-MT	Gly719Cys
2156-MT	Gly719Ala
2159-MT	Ser720Phe
CtrlX19 (Ekzon 19)	Ekzon 19’deki değişimler
2235-MA	Lys739_Ile744dupLysIleProValAlaIle
	Lys745_Glu746del
	Glu746_Alal750del
	Glu746_Thr751delinsAla
	Glu746_Thr751delinsIle
	Glu746_Thr751delinsIle

Çizelge 3.1. (Devam)

2236-MA	Glu746_Ala750delinsArgPro
	Glu746_Ala750del
	Glu746Lys
2236-MC	Glu746_Ala750delinsGlnPro
	Glu746_Pro753delinsLeuSer
2236-MT	Glu746_Ser752del
2237-MG	Glu746_Ser752delinsAla
2237-MT	Glu746-Thr751delinsVal
	Glu746_Thr751delinsValAla
	Glu746_Ser752delinsVal
	Glu746_Ser752delinsVal
	Glu746_Ser752delinsVal
CtrlX19 (Ekzon 19)	Ekzon 19'deki değişimler
2238-MC	Glu746_Ala750delinsPro
2238-MG	Glu746_Thr751delinsAla
	Glu746_Thr751delinsGln
	Glu746_Ser752delinsAsp
2239-MC	Leu747_Glu749del;Ala750Pro
	Leu747_Thr751delinsPro
	Leu747_Thr751delinsGln
	Leu747_Thr751delinsProIle
	Leu747_Ser752del
	Leu747_Ser752delinsGln
	Leu747_Pro753delinsGln
2239-MG	Glu746_Glu749del
	Leu747_Glu749del
2240-MC	Glu746_Thr751del
	Leu747_Thr751del
	Leu747_Thr751delinsSer
	Leu747_Thr751del
	Leu747_Lys754delinsSerArg
2241-MC	Leu747_Pro753delinsSer
	Leu747_Ala750delAAGAGAGinsC
	Leu747_Thr751delAAGAGAAGCAAinsC
2245-MT	Arg748_Thr751delinsT
	Glu749_Thr751del
2252-MA	Thr751_Ile759delinsAsn
2252-MG	Thr751_Ile759delinsSer
2252-MT	Thr751Ile
2253-MC	Ser752_Ile759
CtrlX20 (Ekzon 20)	Ekzon 20'deki değişimler
2291-MG	Glu762insEAFQ
2291-MT	Glu762insGluAlaPheGln
2303-MT	Met766_Ala767insAlaIle
	Ser768Ile
2305-MA	Val769Met
2305-MT	Val769Leu

Çizelge 3.1. (Devam)

CtrlX20 (Ekzon 20)	Ekzon 20'deki değişimler
2309-MC	Asp770insAlaSerVal Asp767_Val769dupAlaSerVal
2310-MA	Asp770fs
2315-MG	Pro772Arg
2312-MG	Ser768_Asp770dupSerValAsp
2318-MG	His773Arg
2318-MT	His773Leu
2320-MA	Asn771_His773dupAsnProHis resistant Val774Met
2326-MT	Arg776Cys
2335-MT	Gly779Phe
2369-MT	Thr79Met
2375-MC	Leu792Pro
CtrlX21	Ekzon 21'deki değişimler
2477-MG	Asn826Ser
2504-MT	His835Leu
2572-MA	Leu858Arg Leu858Met
2573-MG	Leu858Arg Leu858Arg
2582-MA	Leu861Gln
2582-MG	Leu861Arg

A. Kit İçeriği

1. EGFR genine spesifik Biofilm çip magazini
2. Amplifikasyon karışımı: İçeriğinde; dNTP'ler, multipleks primer karışımı, MgCl₂, reaksiyon buffer bulunmaktadır.
3. EGFR genine spesifik Intellipac reagent modülü:
 - a) Reaksiyon master miks: dNTP'ler, işaretli-dCTP, allel spesifik primerler, uzama reaksiyon buffer
 - b) Hibridizasyon buffer
4. Yıkama solüsyonu
5. Titanyum Taq DNA Polimeraz
6. Ekzonükleaz I
7. Shrimp alkaline fosfatase
8. Distile su

B. EGFR geni için polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) kurulması

PZR reaksiyonu için 15-60 ng/μl DNA olması gerekmektedir.

PZR master miksinin hazırlanması:

EGFR PZR reaksiyonu master miski	17.8 μl
Titanyum Taq DNA Polimeraz	0.2 μl
DNA	2 μl

1. Termal cycler'da, aşağıdaki program kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilir.

Step No	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Siklus sayısı
1	94	120	1
2	94 67-57 (-1.0/siklus)	15 15	10
3	94 57	15 15	30
4	94 4	15 Bekleme	1

2. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, PZR ürünlerinin temizlenmesi için SAP (Shrimp alkaline fosfatase) ve Ekzonükleaz I muamelesi yapılır. Bunun için aşağıdaki karışım hazırlanır.

SAP (Shrimp alkaline fosfatase)	1, 5 μl
Ekzonükleaz I	0.375 μl
Titanyum Taq DNA Polimeraz	0.125 μl

3. Hazırlanan karışımdan PZR tüplerine 2 μl dağıtılır.
4. Termal cyclerda aşağıdaki program kullanılarak PZR ürünlerinin temizlenmesi yapılır.

Step No	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
1	37	60
2	94	20
3	4	Bekleme

- 5) Cihaza örneklerin yüklenmesi: Cihaza belirlenen sıralarda gerekli malzemeler ve reaktifler yerlerine yerleştirilir.
 - a) Yüklenen örnek sayısına yetecek kadar cihaza ait pipet uçları yerlerine yerleştirilir.
 - b) Biofilm çiplerin bulunduğu magazin, yıkama solüsyonu, PZR ürünleri, intellipac reagent modül cihazdaki yerlerine yerleştirilir.
 - c) Örnek numaraları yazılarak cihazın çalışması başlatılır
- 6) Çalışma tamamlandıktan sonra rapor halinde sonuçlar alınır.

3.6. KRAS-BRAF Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi

KRAS-BRAF gen mutasyonlarını belirlemek amacıyla, Autogenomics Infiniti™ KRAS-BRAF mutasyon tarama kiti kullanılmıştır. Kit, KRAS ve BRAF geninde, aşağıdaki tabloda görülen ve protein fonksiyonunu değiştiren bilinen en sık görülen mutasyonları belirleyebilecek şekilde dizayn edilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Autogenomics Infinity™ KRAS-BRAF mutasyon tarama kitinde; KRAS geninin Kodon 12, 13 ve 61’inde ve BRAF geninin Kodon 600’ünde taranan mutasyonlar.

Gen	Kodon	Mutasyon	Mutasyonların açıklaması		
KRAS	12	G12A	Gly12Ala	c.35G>C	GGT>GCT
		G12C	Gly12Cys	c.34G>T	GGT>TGT
		G12D	Gly12Asp	c.35G>A	GGT>GAT
		G12F	Gly12Phe	c.34_35GG>TT	GGT>TTT
		G12R	Gly12Arg	c.34G>C	GGT>CGT
		G12S	Gly12Ser	c.34G>A	GGT>AGT
		G12V	Gly12Val	c.35G>T	GGT>GTT
	13	G13A	Gly13Ala	c.38G>C	GGC>GCC
		G13C	Gly13Cys	c.37G>T	GGC>TGC
		G13D	Gly13Asp	c.38G>A	GGC>GAC
		G13R	Gly13Arg	c.37G>C	GGC>CGC
		G13S	Gly13Ser	c.37G>A	GGC>AGC
		G13V	Gly13Val	c.38G>T	GGC>GTC
	61	Q61E	Gln61Glu	c.181C>G	CAA>GAA
		Q61H1	Gln61Hys	c.183A>C	CAA>CAC
		Q61H2	Gln61Hys	c.183A>T	CAA>CAT
		Q62K	Gln61Lys	c.181C>A	CAA>AAA
		Q61L	Gln61Leu	c.182A>T	CAA>CTA
		Q61P	Gln61Pro	c.182A>C	CAA>CCA
		Q61R	Gln61Arg	c.182A>G	CAA>CGA
BRAF	600	V600A	Val600Ala	c.1799T>C	GTG>GCG
		V600D	Val600Asp	c.1799_1800TG>AT	GTG>GAT
		V600E1	Val600Glu	c.1799T>A	GTG>GAG
		V600E2	Val600Glu	c.1799_1800TG>AA	GTG>GAA
		V600KRM	Val600Lys	c.1798_1799GT>AA	GTG>AAG
			Val600Arg	c.1798_1799GT>AG	GTG>AGG
			Val600Met	c.1798G>A	GTG>ATG

A) Kit İçeriği

1. KRAS-BRAF genine spesifik Biofilm ip magazini
2. Amplifikasyon karışımı: içeriğinde; dNTP'ler, multipleks primer karışımı, MgCl₂, reaksiyon buffer bulunmaktadır.
3. KRAS-BRAF genine spesifik İntellipac reagent modülü:
 - a) Reaksiyon master miks: dNTP'ler, işaretli-dCTP, allel spesifik primerler, uzama reaksiyon buffer
 - b) Hibridizasyon buffer
 - c) Yıkama solüsyonu
4. Titanyum Taq DNA Polimeraz
5. Ekzonükleaz I
6. Shrimp alkalın fosfataz
7. Distile su

B. KRAS-BRAF genleri için Polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) kurulması

PZR reaksiyonu için 15-60 ng/ml DNA olması gerekmektedir.

PZR master miksinin hazırlanması:

KRAS-BRAF PZR reaksiyonu master miski 17.8 l

Titanyum Taq DNA Polimeraz 0.2 l

DNA 2 l

Termal cyclers da, aşağıdaki program kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilir.

Step No	Sıcaklık (°C)	Süre(Saniye)	Siklus sayısı
1	94	120	1
2	94 67-57 (-1.0/sikls)	15 15	10
3	94 57	15 15	30
4	94 4	15 Bekleme	1

1. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, PZR ürünlerinin temizlenmesi için SAP (Shrimp alkaline fosfatase) ve Ekzonükleaz I muamelesi yapılır. Bunun için aşağıdaki karışım hazırlanır.

SAP (Shrimp alkaline fosfatase)	1, 5 µl
Ekzonükleaz I	0.375 µl
Titanyum Taq DNA Polimeraz	0.125 µl

2. Hazırlanan karışımdan PZR tüplerine 2 µl dağıtılır.

3. Termal cyclerda aşağıdaki program kullanılarak PZR ürünlerinin temizlenmesi yapılır.

Step No	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
1	37	60
2	94	20
3	4	Bekleme

4. Cihaza örneklerin yüklenmesi: Cihaza belirlenen sıralarda gerekli malzemeler ve reaktifler cihazdaki uygun yerlerine yerleştirilir.

- Yüklenen örnek sayısına yetecek kadar cihaza ait pipet uçları yerlerine yerleştirilir.
- Biofilm çiplerin bulunduğu magazin, yıkama solüsyonu, PZR ürünleri, intellipac reagent modülü cihazdaki yerlerine yerleştirilir.
- Örnek numaraları yazılarak cihazın çalışması başlatılır.

5. Çalışma tamamlandıktan sonra rapor halinde sonuçlar alınır.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen kategorik verilerin analizinde Fisher, Anova ve Pearson Ki kare testi kullanıldı. Üç grup arasında karşılaştırma yapmak için ise Kruskal Wallis testi kullanıldı.

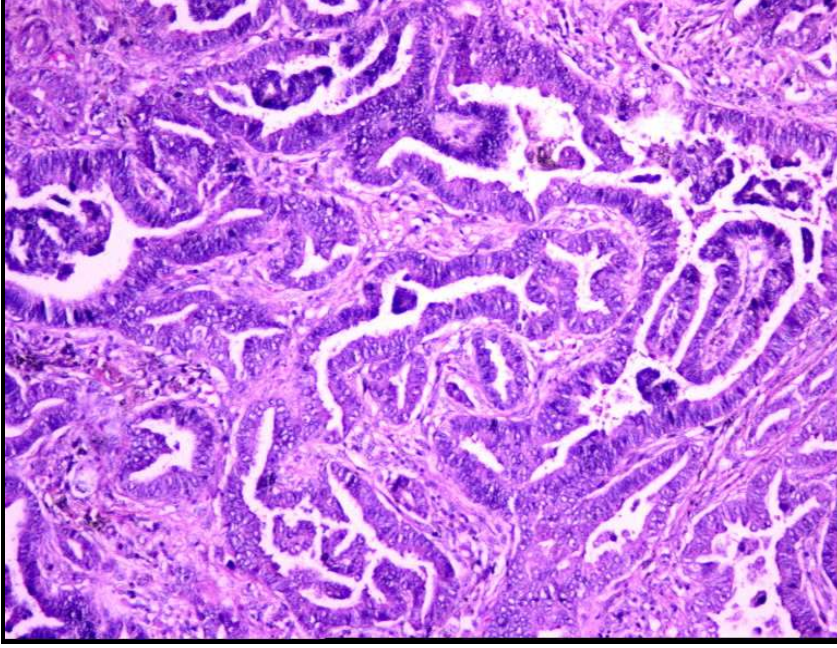
4. BULGULAR

4.1. Olguların Klinik ve Histopatolojik Özellikleri

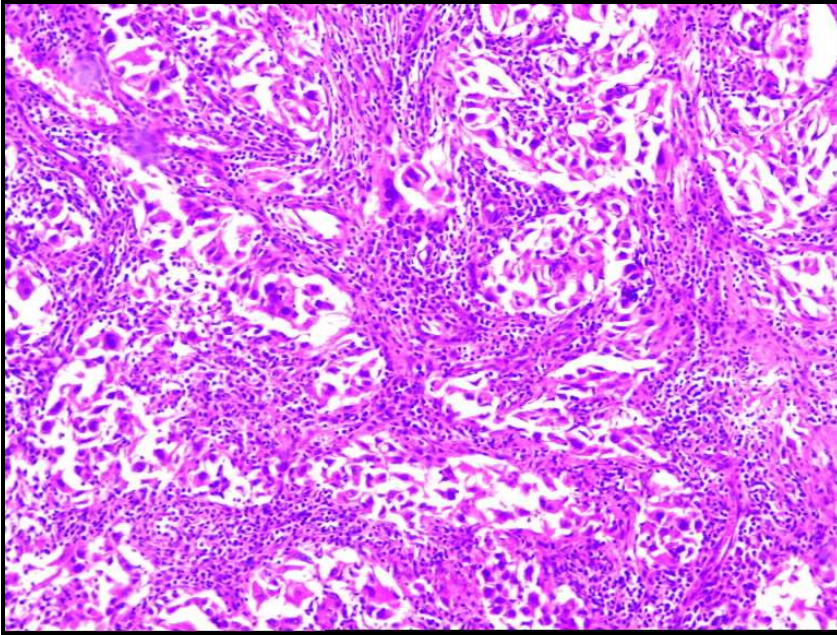
Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaşları, 32 ile 81 arasında değişmekteydi. Tüm hastaların yaş ortalaması 61,5 idi. Çalışmaya dahil edilen 96 olgunun, 58'i (%60,4) adenokarsinom, 30'u (%31,3) yassı epitel hücreli karsinom, 8'i (%8,3) büyük hücreli nöroendokrin karsinomdan oluşmaktaydı. Hastaların 79 tanesi (%82,3) erkek, 17 tanesi (%17,7) kadındı. Hastaların 44 tanesinde sigara anamnezi mevcuttu. 52 hastanın dosyasına arşivden ulaşamadığı için sigara anamnezi bilinmiyordu. 44 hastadan 35 tanesi sigara içmekteydi. 9 hasta sigara içmiyordu.

Adenokarsinom tanılı hastaların 16 tanesi, yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastaların 14 tanesi ve büyük hücreli karsinom tanılı hastaların 5 tanesi sigara içmekteydi. Sigara kullanımı ile histopatolojik tipler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

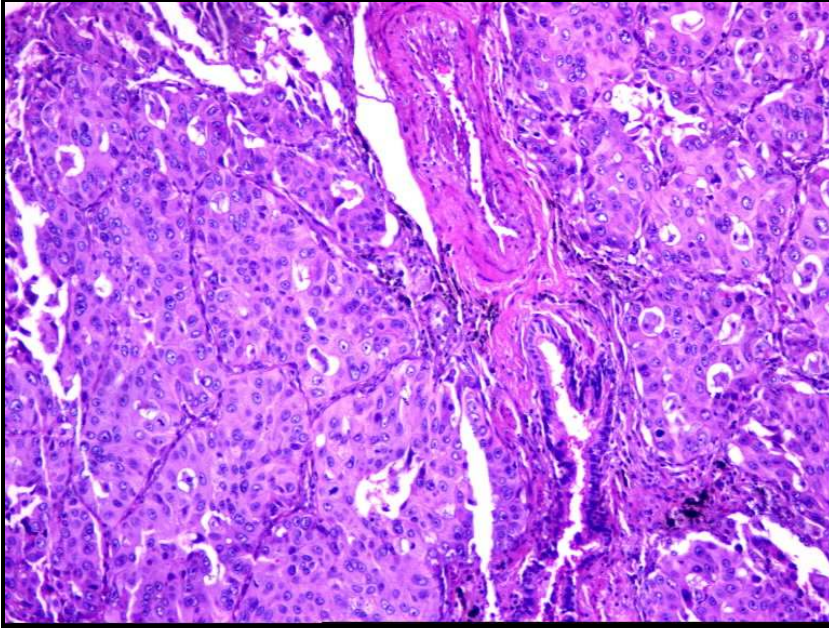
Adenokarsinom tanılı olguların diferansiasyon derecesine göre iyi, orta, kötü diferansiye olan örnekleri ve bronkoalveoler karsinom olgu örneğinin histopatolojik görüntüleri aşağıdaki gibidir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve Şekil 4.4).



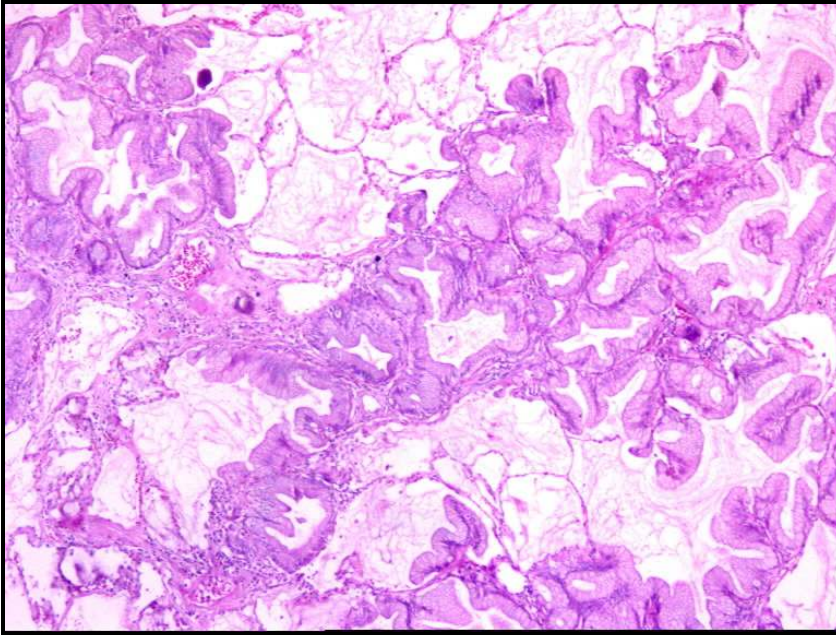
Şekil 4.1. İyi diferansiye akciğer adenokarsinomu (HEx100).



Şekil 4.2. Orta derecede diferansiye akciğer adenokarsinomu (HEx100).

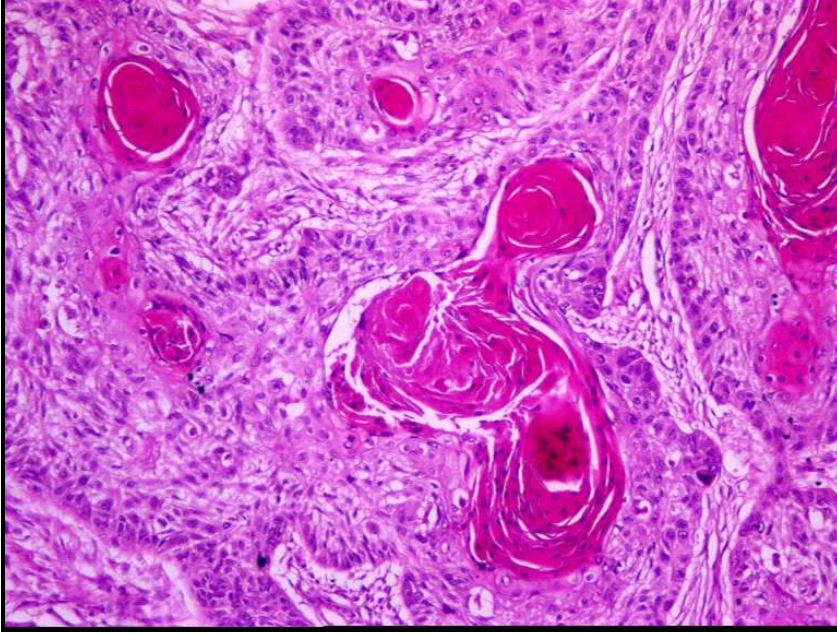


Şekil 4.3. Kötü derecede diferansiye akciğer adenokarsinomu (HEx100).

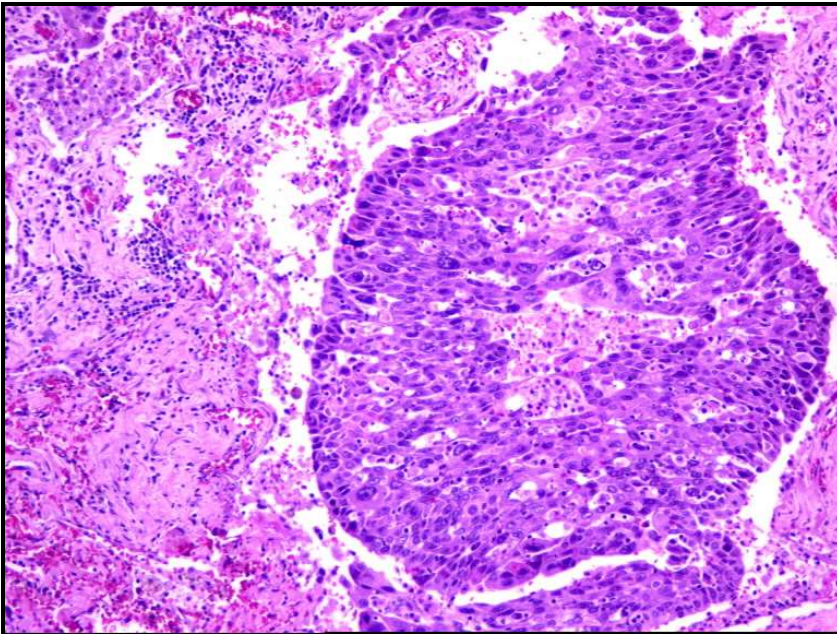


Şekil 4.4. Bronkoalveoler karsinom (HEx50).

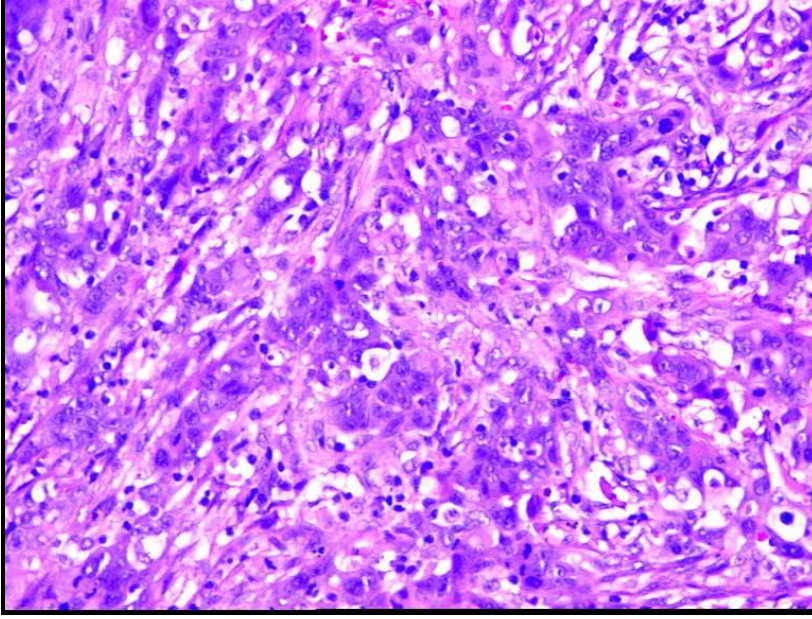
Yassı epitel hücreli karsinom tanılı olguların diferansiasyon derecesine göre iyi, orta, kötü diferansiye olan örneklerin histopatolojik görüntüsü aşağıdaki gibidir (Şekil 4.5, 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.5. İyi derecede diferansiye akciğer yassı epitel hücreli karsinomu (HEx100).

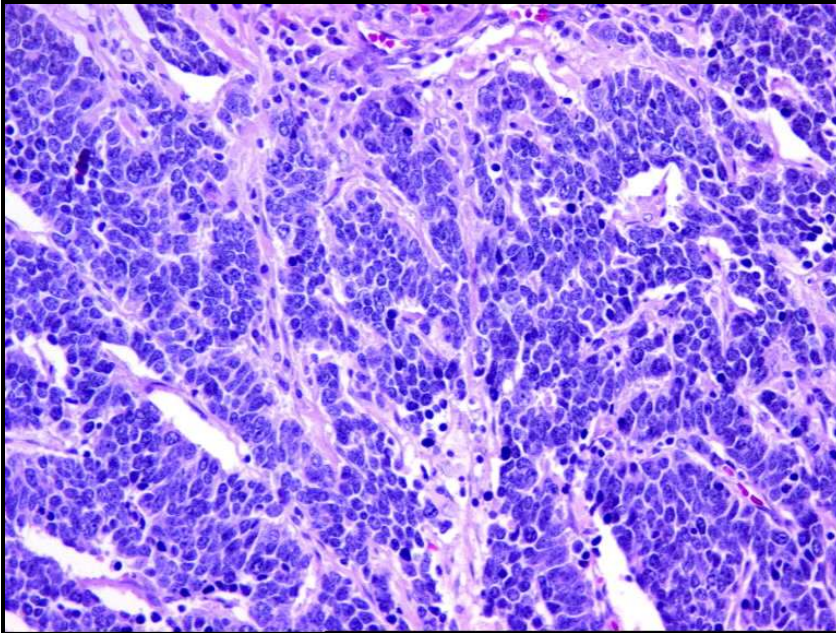


Şekil 4.6. Orta derecede diferansiye akciğer yassı epitel hücreli karsinomu (HEx100).



Şekil 4.7. Kötü derecede diferansiye akciğer yassı epitel hücreli karsinomu (HEx200).

Büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı olgu örneğinin histopatolojik görüntüsü aşağıdaki gibidir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom (HEx200).

Adenokarsinom ve yassı epitel hücreli karsinom olgularının diferansiasyon derecesine göre iyi, orta ve kötü diferansiye olguların dağılımı aşağıdaki gibidir. (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Adenokarsinom ve yassı epitel hücreli karsinom (YEHK) olgularının diferansiasyon derecesine göre dağılımı.

	Diferansiyasyon derecesi		
	İyi	Orta	Kötü
Adenokarsinom	20 (%34,5)	21 (%36,2)	17 (%29,3)
YEHK	5 (%16,7)	12 (%40,0)	13 (%43,3)
Toplam	25 (%28,4)	33 (%34,1)	30 (%37,5)

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom (BHNEK) olgularının evrelerine göre dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Adenokarsinom, YEHK ve BHNEK tanılı hastaların evrelerine göre dağılımı.

Evre	Adenokarsinom	YEHK	BHNEK
Evre IA,B	20 (%34,5)	8 (%26,7)	1 (%12,5)
Evre IIA,B	18 (%31)	17 (%56,7)	4 (%50)
Evre IIIA,B	12 (%20,7)	24(%13,3)	3 (%37,5)
Evre IV	8 (%13,8)	1 (%3,3)	0 (%0)

Tümör boyutu, lenf düğümü metastazı ve uzak metastaz TNM sistemindeki tanımlamalara göre değerlendirildi. Tümör boyutuna göre hastaların dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Tümör boyutuna göre hastaların dağılımı.

	Adenokarsinom	YEHK	BHNEK
T1a	6 (%10,3)	4 (%13,3)	0
T1b	9 (%15,5)	2 (%6,6)	1(%12,5)
T2a	13 (%22,4)	5(%16,6)	3(%52)
T2b	12 (%20,6)	7(%23,3)	2(%25)
T3	11 (%18,9)	9 (%30)	1(%12,5)
T4	7 (%12)	3 (%10)	1(%12,5)

Lenf düğümü metastazına göre hastaların dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Lenf düğümü metastazına göre hastaların dağılımı.

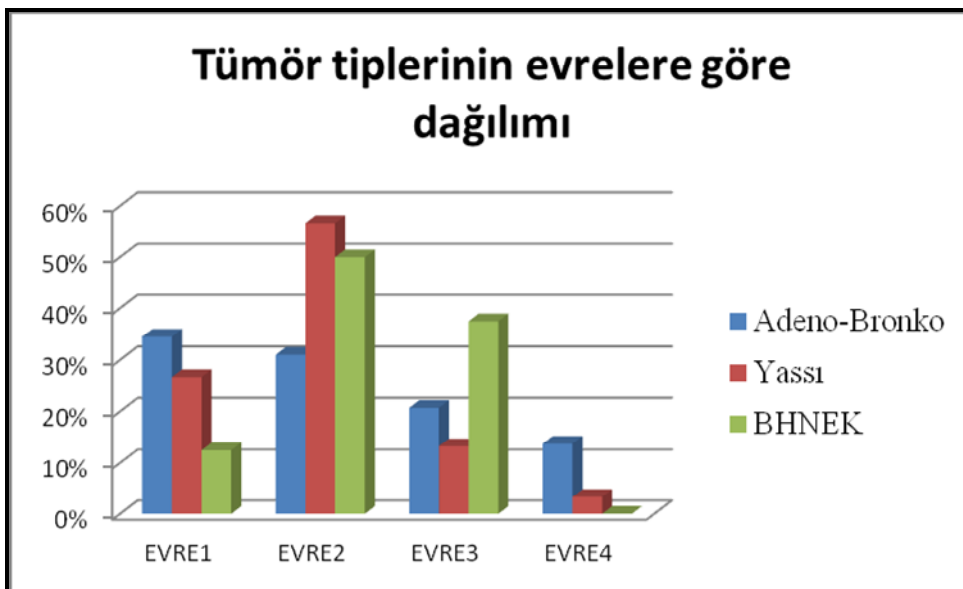
N	Adenokarsinom	YEHK	BHNEK	Toplam
N0	44 (%75,9)	24 (%80,0)	4 (%50,0)	72 (%75,0)
N1	11 (%19,0)	6 (%20,0)	2 (%25,0)	19 (%19,8)
N2	3 (%5,2)	0 (%0)	2 (%25,0)	5 (%5,2)
N3	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

Uzak metastaz yapıp yapmadığına göre hastaların dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Uzak metastaz yapıp yapmadığına göre hastaların dağılımı.

M	Adenokarsinom	YEHK	BHNEK
M0	50 (%87)	29 (%97)	8 (%100)
M1a	0	0	0
M1b	8 (%13)	1 (%3)	0

Tümör tiplerinin evrelere göre dağılımı aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Tümör tiplerinin evrelere göre dağılımı.

Adenokarsinom tanılı hastaların yaş aralığı 44-81 arasında değişmekteydi. Ortalama yaş 62,5 idi. Hastaların toplam sayısı 58 ve bunların 44'ü erkek (%75,9), 14'ü (%24,1) kadındı. 23 hastanın dosyasına ulaşılabildi. Bunlardan 16 tanesi (%69,6) sigara içiyor, 7 tanesi (%30,4) sigara içmiyordu. Hastaların 8 tanesi Bronkoalveoler tip adenokarsinom tanılıydı.

Adenokarsinom tanılı hastaların 14 tanesinde (%24,1) EGFR mutasyonu saptanırken (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14), 12 tanesinde (%20,6) KRAS mutasyonu saptandı (Şekil 4.15). KRAS mutasyonu saptanan 12 hastadan 2 tanesi Bronkoalveoler tip adenokarsinomdu (Şekil 4.16). Hastalar arasında yalnızca 1 hastada BRAF mutasyonu izlendi (Şekil 4.17). Toplam 96 hastada, sadece 1 tane adenokarsinom tanılı vakada BRAF mutasyonu izlendiği için, örneklem yetersizliği nedeniyle karşılaştırma yapılamadı. 31 hastada herhangi bir mutasyona rastlanmadı (Şekil 4.18).

Yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastaların yaş aralığı 32-79 arasında değişmekteydi. Ortalama yaş 62,10 idi. Hastaların toplam sayısı 30 ve bunların 27'si erkek (%90), 3'ü (%10) kadındı. 16 hastanın dosyasına ulaşılabildi. Bunlardan 14 tanesi (%87,5) sigara içiyor, 2 tanesi (%12,5) sigara içmiyordu.

Yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastalardan yalnızca 1 tanesinde (%3,3) KRAS mutasyonu izlenirken, 29 hastada (%97,3) herhangi bir mutasyona rastlanmadı. 1 olguda görülen KRAS mutasyonu kodon 12/13 bölgesindeki G12 S mutasyonuydu (Şekil 4.19).

Büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı hastaların yaş aralığı 50-66 arasında değişmekteydi. Ortalama yaş 57,75 idi. Hastaların toplam sayısı 8 ve tamamı erkek cinsiyetteydi. 5 hastanın dosyasına ulaşılabildi. Bunların tamamı da sigara içiyordu. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı hastalardan yalnızca 1 tanesinde (%12,5) KRAS mutasyonu izlenirken, 7 hastada (%87,5) herhangi bir mutasyona rastlanmadı. 1 olguda görülen KRAS mutasyonu kodon 12/13 bölgesindeki G13 C mutasyonuydu (Şekil 4.20).

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı toplam 96 vakanın hiçbirinde 2 farklı mutasyon birarada görülmedi.

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı toplam 96 olgunun yaş, cinsiyet, sigara içme durumu, tümör tipi, mutasyon varlığı, TNM evresi ve diferansiyasyon derecesi tablolar halinde özetlenmiştir (Çizelge 4.6, 4.7, 4.8).

EGFR				
Intell.Lot: 20335W07J		Sample: 3911-09		Apr 15, 2011
Magz.Lot: 08011220334W06J		ID: 2011041516101784		22:34
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
Exon18				
1	CtrlX18		7396.68	
2	2125-MA	Neg	9.51	0.00
3	2125-MC	Neg	1.00	0.00
4	2126-MC	Neg	52.13	0.01
5	2126-MG	Neg	179.18	0.02
6	2126-MT	Neg	1.00	0.00
7	2155-MA	Neg	4.68	0.00
8	2155-MC	Neg	1.00	0.00
9	2155-MT	Neg	41.04	0.01
10	2156-MT	Neg	13.62	0.00
11	2159-MT	Neg	48.45	0.01
Exon19				
12	CtrlX19		13518.49	
13	2235-MA	Neg	132.35	0.01
14	2236-MA	Positive	3392.12	0.25
15	2236-MC	Neg	32.79	0.00
16	2236-MT	Neg	62.72	0.00
17	2237-MG	Neg	159.69	0.01
18	2237-MT	Neg	3.17	0.00
19	2238-MC	Neg	1.00	0.00
20	2238-MG	Neg	1.00	0.00
21	2239-MC	Neg	12.19	0.00
22	2239-MG	Neg	1.00	0.00
23	2240-MC	Neg	38.19	0.00
24	2241-MC	Neg	4.25	0.00
25	2245-MT	Neg	68.57	0.01
26	2252-MA	Neg	172.00	0.01
27	2252-MG	Neg	1.00	0.00
28	2252-MT	Neg	18.44	0.00
29	2253-MC	Neg	54.08	0.00
Exon20				
30	CtrlX20		5129.06	
31	2291-MC	Neg	67.71	0.01
32	2291-MT	Neg	191.42	0.04
33	2305-MA	Neg	139.33	0.03
34	2305-MT	Neg	1.00	0.00
35	2309-MC	Neg	103.50	0.02
36	2310-MA	Neg	96.17	0.02
37	2312-MC	Neg	21.77	0.00
38	2315-MG	Neg	2.30	0.00
39	2318-MG	Neg	80.10	0.02
40	2318-MT	Neg	1.00	0.00
41	2320-MA	Neg	58.53	0.01
42	2326-MT	Neg	5.55	0.00
43	2335-MT	Neg	60.89	0.01
44	2369-MT	Neg	127.37	0.02
45	2375-MC	Neg	266.47	0.05
Exon21				
46	CtrlX21		4066.37	
47	2477-MG	Neg	60.75	0.01
48	2504-MT	Neg	30.21	0.01
49	2572-MA	Neg	1.00	0.00
50	2573-MG	Neg	1.00	0.00
51	2582-MA	Neg	25.42	0.01
52	2582-MG	Neg	10.87	0.00
53	BKCD		279.59	
Mutation detected in Exon19 at 2236-MA				

Şekil 4.10. Ekson 19'da EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu.

EGFR				
Intell.Lot: 20335W07J		Sample: 14747-1C2-06		Feb 4,2011
Magz.Lot: 08011220334W06J		ID: 2011020418200506		23:48
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
Exon18				
1	CtrlX18		3968.59	
2	2125-MA	Neg	10.97	0.00
3	2125-MC	Neg	119.08	0.03
4	2126-MC	Neg	14.50	0.00
5	2126-MG	Neg	91.23	0.02
6	2126-MT	Neg	1.00	0.00
7	2155-MA	Neg	11.91	0.00
8	2155-MC	Neg	1.53	0.00
9	2155-MT	Neg	18.10	0.00
10	2156-MT	Neg	151.69	0.04
11	2159-MT	Neg	37.40	0.01
Exon19				
12	CtrlX19		10749.30	
13	2235-MA	Neg	38.32	0.00
14	2236-MA	Neg	3.49	0.00
15	2236-MC	Neg	1.00	0.00
16	2236-MT	Neg	45.04	0.00
17	2237-MG	Neg	90.66	0.01
18	2237-MT	Neg	25.89	0.00
19	2238-MC	Neg	22.01	0.00
20	2238-MG	Neg	4.17	0.00
21	2239-MC	Positive	1949.33	0.18
22	2239-MG	Neg	18.82	0.00
23	2240-MC	Neg	99.17	0.01
24	2241-MC	Neg	1.00	0.00
25	2245-MT	Neg	61.28	0.01
26	2252-MA	Neg	129.70	0.01
27	2252-MG	Neg	25.06	0.00
28	2252-MT	Neg	55.22	0.01
29	2253-MC	Neg	57.21	0.01
Exon20				
30	CtrlX20		1928.81	
31	2291-MG	Neg	39.95	0.02
32	2291-MT	Neg	89.32	0.05
33	2305-MA	Neg	35.86	0.02
34	2305-MT	Neg	11.21	0.01
35	2309-MC	Neg	94.33	0.05
36	2310-MA	Neg	74.31	0.04
37	2312-MG	Neg	42.11	0.02
38	2315-MG	Neg	18.15	0.01
39	2318-MG	Neg	33.45	0.02
40	2318-MT	Neg	51.84	0.03
41	2320-MA	Neg	51.59	0.03
42	2326-MT	Neg	3.85	0.00
43	2335-MT	Neg	84.18	0.04
44	2369-MT	Neg	35.21	0.02
45	2375-MC	Positive	210.33	0.11
Exon21				
46	CtrlX21		1755.36	
47	2477-MG	Neg	24.59	0.01
48	2504-MT	Neg	1.00	0.00
49	2572-MA	Neg	4.35	0.00
50	2573-MG	Neg	12.64	0.01
51	2582-MA	Neg	59.95	0.03
52	2582-MG	Neg	35.20	0.02
53	BKGD		365.64	
Mutation detected in Exon19 at 2239-MC				
Mutation detected in Exon20 at 2375-MC				

Şekil 4.11. Ekson 19'da EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu.

EGFR				
Intell.Lot: 20335W07J		Sample: 3595-3E-10		Jan 9,2011
Magz.Lot: 08011220334W06J		ID: 2011010910105212		20:23
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
Exon18				
1	CtrlX18		12084.28	
2	2125-MA	Neg	1.00	0.00
3	2125-MC	Neg	1.00	0.00
4	2126-MC	Neg	15.34	0.00
5	2126-MG	Neg	122.74	0.01
6	2126-MT	Neg	1.00	0.00
7	2155-MA	Neg	18.09	0.00
8	2155-MC	Neg	1.00	0.00
9	2155-MT	Neg	1.00	0.00
10	2156-MT	Neg	1.00	0.00
11	2159-MT	Neg	77.70	0.01
Exon19				
12	CtrlX19		11394.97	
13	2235-MA	Neg	78.13	0.01
14	2236-MA	Neg	54.15	0.00
15	2236-MC	Neg	1.00	0.00
16	2236-MT	Neg	2.38	0.00
17	2237-MG	Neg	110.25	0.01
18	2237-MT	Neg	1.00	0.00
19	2238-MC	Neg	1.00	0.00
20	2238-MG	Neg	36.97	0.00
21	2239-MC	Neg	80.32	0.01
22	2239-MG	Neg	1.00	0.00
23	2240-MC	Neg	36.30	0.00
24	2241-MC	Neg	39.34	0.00
25	2245-MT	Neg	12.60	0.00
26	2252-MA	Neg	115.90	0.01
27	2252-MG	Neg	30.92	0.00
28	2252-MT	Neg	43.07	0.00
29	2253-MC	Neg	50.26	0.00
Exon20				
30	CtrlX20		5388.38	
31	2291-MG	Neg	18.84	0.00
32	2291-MT	Neg	131.93	0.02
33	2305-MA	Neg	29.80	0.01
34	2305-MT	Neg	19.97	0.00
35	2309-MC	Neg	34.58	0.01
36	2310-MA	Neg	19.29	0.00
37	2312-MG	Neg	50.76	0.01
38	2315-MG	Neg	1.00	0.00
39	2318-MG	Neg	55.13	0.01
40	2318-MT	Neg	1.00	0.00
41	2320-MA	Neg	44.56	0.01
42	2326-MT	Neg	1.00	0.00
43	2335-MT	Neg	5.85	0.00
44	2369-MT	Neg	138.75	0.03
45	2375-MC	Neg	285.28	0.05
Exon21				
46	CtrlX21		3602.10	
47	2477-MG	Neg	0.24	0.00
48	2504-MT	Neg	1.00	0.00
49	2572-MA	Neg	1.00	0.00
50	2573-MG	Positive	2862.70	0.79
51	2582-MA	Neg	76.81	0.02
52	2582-MG	Neg	1.52	0.00
53	BKGD		376.17	
Mutation detected in Exon21 at 2573-MC				

Şekil 4.12. Ekson 21’de EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu.

EGFR				
Intelli.Lot : 20335W07J		Sample: 7237-3-10		Jan 9,2011
Magz.Lot: 08011220334W06J		ID: 2011010910102220		18:36
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
Exon18				
1	CtrlX18		11185.11	
2	2125-MA	Neg	19.42	0.00
3	2125-MC	Neg	0.76	0.00
4	2126-MC	Neg	1.00	0.00
5	2126-MG	Neg	139.94	0.01
6	2126-MT	Neg	1.00	0.00
7	2155-MA	Neg	17.74	0.00
8	2155-MC	Neg	11.53	0.00
9	2155-MT	Neg	1.00	0.00
10	2156-MT	Neg	16.99	0.00
11	2159-MT	Neg	102.29	0.01
Exon19				
12	CtrlX19		12151.45	
13	2235-MA	Positive	8192.62	0.67
14	2236-MA	Neg	66.89	0.01
15	2236-MC	Neg	1.00	0.00
16	2236-MT	Neg	17.97	0.00
17	2237-MG	Neg	37.14	0.00
18	2237-MT	Neg	1.00	0.00
19	2238-MC	Neg	15.45	0.00
20	2238-MG	Neg	1.00	0.00
21	2239-MC	Neg	38.72	0.00
22	2239-MG	Neg	1.00	0.00
23	2240-MC	Neg	63.33	0.01
24	2241-MC	Neg	1.00	0.00
25	2245-MT	Neg	4.78	0.00
26	2252-MA	Neg	123.03	0.01
27	2252-MG	Neg	18.78	0.00
28	2252-MT	Neg	59.21	0.00
29	2253-MC	Neg	39.66	0.00
Exon20				
30	CtrlX20		4975.78	
31	2291-MG	Neg	25.24	0.01
32	2291-MT	Neg	142.44	0.03
33	2305-MA	Neg	21.49	0.00
34	2305-MT	Neg	4.17	0.00
35	2309-MG	Neg	25.81	0.01
36	2310-MA	Neg	57.03	0.01
37	2312-MG	Neg	32.28	0.01
38	2315-MG	Neg	1.00	0.00
39	2318-MG	Neg	55.20	0.01
40	2318-MT	Neg	1.00	0.00
41	2320-MA	Neg	23.23	0.00
42	2326-MT	Neg	43.10	0.01
43	2335-MT	Neg	29.15	0.01
44	2369-MT	Neg	61.33	0.01
45	2375-MC	Neg	250.88	0.05
Exon21				
46	CtrlX21		3026.50	
47	2477-MG	Neg	90.15	0.03
48	2504-MT	Neg	32.19	0.01
49	2572-MA	Neg	74.24	0.02
50	2573-MG	Neg	1.00	0.00
51	2582-MA	Neg	31.20	0.01
52	2582-MG	Neg	18.88	0.01
53	BKGD		351.19	
Mutation detected in Exon19 at 2235 MA				

Şekil 4.13. Ekson 19'da EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu.

EGFR				
Intell.Lot: 20335W07J		Sample: 6123-4D-09		Feb 5,2011
Magz.Lot: 08011220334W06J		ID: 2011020418204323		01:34
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
Exon18				
1	CtrlX18		5168.63	
2	2125-MA	Neg	20.02	0.00
3	2125-MC	Neg	4.35	0.00
4	2126-MC	Neg	1.16	0.00
5	2126-MG	Neg	70.98	0.01
6	2126-MT	Neg	1.00	0.00
7	2155-MA	Neg	17.01	0.00
8	2155-MC	Neg	1.00	0.00
9	2155-MT	Neg	19.48	0.00
10	2156-MT	Neg	22.31	0.00
11	2159-MT	Neg	98.18	0.02
Exon19				
12	CtrlX19		17979.49	
13	2235-MA	Neg	312.41	0.02
14	2236-MA	Neg	135.02	0.01
15	2236-MC	Neg	2.49	0.00
16	2236-MT	Neg	37.76	0.00
17	2237-MG	Neg	107.83	0.01
18	2237-MT	Neg	21.25	0.00
19	2238-MC	Neg	23.16	0.00
20	2238-MG	Neg	13.80	0.00
21	2239-MC	Neg	41.77	0.00
22	2239-MG	Neg	34.82	0.00
23	2240-MC	Neg	113.22	0.01
24	2241-MC	Neg	17.85	0.00
25	2245-MT	Neg	10.69	0.00
26	2252-MA	Neg	178.25	0.01
27	2252-MG	Neg	30.84	0.00
28	2252-MT	Neg	32.13	0.00
29	2253-MC	Neg	96.53	0.01
Exon20				
30	CtrlX20		2667.34	
31	2291-MG	Neg	40.46	0.02
32	2291-MT	Neg	124.65	0.05
33	2305-MA	Neg	41.12	0.02
34	2305-MT	Neg	23.43	0.01
35	2305-MG	Neg	120.96	0.05
36	2310-MA	Neg	73.36	0.03
37	2312-MG	Neg	49.02	0.02
38	2315-MG	Neg	16.81	0.01
39	2318-MG	Neg	54.89	0.02
40	2318-MT	Neg	23.51	0.01
41	2320-MA	Neg	1.00	0.00
42	2326-MT	Neg	0.72	0.00
43	2335-MT	Neg	28.66	0.01
44	2369-MT	Neg	31.76	0.01
45	2375-MC	Positive	1056.55	0.40
Exon21				
46	CtrlX21		2771.37	
47	2477-MG	Neg	13.21	0.00
48	2504-MT	Neg	16.84	0.01
49	2572-MA	Neg	22.92	0.01
50	2573-MG	Neg	17.86	0.01
51	2582-MA	Neg	60.92	0.02
52	2582-MG	Neg	16.89	0.01
53	BKGD		370.42	

Şekil 4.14. Ekson 20’de EGFR mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu.

KRAS-BRAF				
rtell.Lot: 20484S11K		Sample: 20143-1C-08		Nov 29, 2011
lagz.Lot: 09011220483J21J		ID: 2011112915214198		23:32
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
KRAS				
1	G12		1954.29	
2	G12A	Neg	32.14	0.01
3	G12C	Positive	965.90	0.23
4	G12D	Neg	104.25	0.03
5	G12F	Neg	18.91	0.00
6	G12R	Neg	33.54	0.01
7	G12S	Neg	35.34	0.01
8	G12V	Neg	32.17	0.01
9	G13		640.39	
10	G13A	Neg	11.29	0.00
11	G13C	Neg	43.60	0.01
12	G13D	Neg	223.68	0.05
13	G13R	Neg	18.52	0.00
14	G13S	Neg	9.57	0.00
15	G13V	Neg	13.61	0.00
16	Amplicon1		4137.21	
17	Q61		770.35	
18	Q61E	Neg	8.87	0.01
19	Q61H1	Neg	8.31	0.01
20	Q61H2	Neg	25.66	0.03
21	Q61K	Neg	4.32	0.00
22	Q61L	Neg	39.45	0.04
23	Q61P	Neg	49.65	0.05
24	Q61R	Neg	95.07	0.09
25	Amplicon2		1001.67	
BRAF				
26	V600		5178.16	
27	V600A	Neg	50.05	0.01
28	V600D	Neg	51.44	0.01
29	V600E1	Neg	26.82	0.00
30	V600E2	Neg	1.00	0.00
31	V600KRM	Neg	138.99	0.03
32	Amplicon3		5446.45	
33	HYBC		1000.00	
34	BKGD		550.35	

Şekil 4.15. KRAS mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu.

KRAS-BRAF				
Intell.Lot: 20484V20J		Sample: 11047-2A-08		Feb 25,2011
Magz.Lot: 09011220483J21J		ID: 2011022517272240		21:57
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
KRAS				
1	G12		3650.77	
2	G12A	Neg	0.70	0.00
3	G12C	Positive	1825.86	0.27
4	G12D	Neg	23.59	0.00
5	G12F	Neg	10.01	0.00
6	G12R	Neg	32.20	0.00
7	G12S	Neg	60.77	0.01
8	G12V	Neg	8.71	0.00
9	G13		1082.07	
10	G13A	Neg	2.57	0.00
11	G13C	Neg	9.92	0.00
12	G13D	Neg	7.56	0.00
13	G13R	Neg	41.82	0.01
14	G13S	Neg	24.02	0.00
15	G13V	Neg	21.47	0.00
16	Amplicon1		6802.03	
17	Q61		1806.62	
18	Q61E	Neg	8.01	0.00
19	Q61H1	Neg	1.00	0.00
20	Q61H2	Neg	6.14	0.00
21	Q61K	Neg	1.00	0.00
22	Q61L	Neg	8.65	0.00
23	Q61P	Neg	12.15	0.01
24	Q61R	Neg	46.02	0.02
25	Amplicon2		1889.59	
BRAF				
26	V600		11075.60	
27	V600A	Neg	36.26	0.00
28	V600D	Neg	165.82	0.01
29	V600E1	Neg	16.16	0.00
30	V600E2	Neg	11.36	0.00
31	V600KRM	Neg	116.82	0.01
32	Amplicon3		11422.02	
33	HYBC		1000.00	
34	BKGD		226.69	
Mutation detected for G12C				
Analyte calls are not dependent on absolute RFU values.				

Şekil 4.16. KRAS mutasyonu gösteren BAK sonucu.

KRAS-BRAF				
Intell.Lot: 20484S11K		Sample: 14669-1B2-11		Nov 24, 2011
Magz.Lot: 09011220483J21J		ID: 2011112318253654		01:40
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
KRAS				
1	G12		3735.01	
2	G12A	Neg	9.04	0.00
3	G12C	Neg	45.35	0.01
4	G12D	Neg	1.00	0.00
5	G12F	Neg	1.00	0.00
6	G12R	Neg	9.64	0.00
7	G12S	Neg	28.74	0.01
8	G12V	Neg	13.58	0.00
9	G13		1139.45	
10	G13A	Neg	10.60	0.00
11	G13C	Neg	26.49	0.01
12	G13D	Neg	26.64	0.01
13	G13R	Neg	23.00	0.00
14	G13S	Neg	2.95	0.00
15	G13V	Neg	7.32	0.00
16	Amplicon1		5079.80	
17	Q61		1202.26	
18	Q61E	Neg	7.91	0.01
19	Q61H1	Neg	14.36	0.01
20	Q61H2	Neg	1.11	0.00
21	Q61K	Neg	5.90	0.00
22	Q61L	Neg	11.53	0.01
23	Q61P	Neg	5.64	0.00
24	Q61R	Neg	4.09	0.00
25	Amplicon2		1252.80	
BRAF				
26	V600		5623.72	
27	V600A	Neg	59.59	0.01
28	V600D	Neg	1.00	0.00
29	V600E1	Positive	1377.55	0.19
30	V600E2	Neg	20.90	0.00
31	V600KRM	Neg	101.88	0.01
32	Amplicon3		7184.64	
33	HYBC		1000.00	
34	BKGD		642.46	
Mutation detected for V600E1				
Analytic calls are not dependent on absolute RFU values.				

Şekil 4.17. BRAF mutasyonu gösteren adenokarsinom olgusu.

EGFR				
Intell.Lot: 20335W07J		Sample: 9205-4D-09		Feb 5, 2011
Magz.Lot: 08011220334W06J		ID: 2011020418210079		02:46
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
Exon18				
1	CtrlX18		5755.00	
2	2125-MA	Neg	18.02	0.00
3	2125-MC	Neg	1.00	0.00
4	2126-MC	Neg	1.00	0.00
5	2126-MG	Neg	79.89	0.01
6	2126-MT	Neg	1.00	0.00
7	2155-MA	Neg	1.00	0.00
8	2155-MC	Neg	1.00	0.00
9	2155-MT	Neg	21.13	0.00
10	2156-MT	Neg	21.68	0.00
11	2159-MT	Neg	1.00	0.00
Exon19				
12	CtrlX19		18737.80	
13	2235-MA	Neg	41.25	0.00
14	2236-MA	Neg	206.77	0.01
15	2236-MC	Neg	5.87	0.00
16	2236-MT	Neg	1.00	0.00
17	2237-MG	Neg	68.84	0.00
18	2237-MT	Neg	20.69	0.00
19	2238-MC	Neg	1.00	0.00
20	2238-MG	Neg	1.00	0.00
21	2239-MC	Neg	51.75	0.00
22	2239-MG	Neg	17.96	0.00
23	2240-MC	Neg	1.98	0.00
24	2241-MC	Neg	1.00	0.00
25	2245-MT	Neg	5.02	0.00
26	2252-MA	Neg	160.31	0.01
27	2252-MG	Neg	13.71	0.00
28	2252-MT	Neg	1.00	0.00
29	2253-MC	Neg	41.91	0.00
Exon20				
30	CtrlX20		2506.21	
31	2291-MG	Neg	41.28	0.02
32	2291-MT	Neg	110.98	0.04
33	2305-MA	Neg	29.27	0.01
34	2305-MT	Neg	1.00	0.00
35	2309-MC	Neg	92.53	0.04
36	2310-MA	Neg	65.81	0.03
37	2312-MG	Neg	1.00	0.00
38	2315-MG	Neg	1.00	0.00
39	2318-MC	Neg	13.11	0.01
40	2318-MT	Neg	10.87	0.00
41	2320-MA	Neg	43.63	0.02
42	2326-MT	Neg	1.00	0.00
43	2335-MT	Neg	7.15	0.00
44	2369-MT	Neg	25.47	0.01
45	2375-MC	Neg	142.43	0.06
Exon21				
46	CtrlX21		2050.10	
47	2477-MG	Neg	1.00	0.00
48	2504-MT	Neg	13.65	0.01
49	2572-MA	Neg	1.00	0.00
50	2573-MG	Neg	1.00	0.00
51	2582-MA	Neg	22.97	0.01
52	2582-MG	Neg	1.00	0.00
53	2582-MT	Neg	1.00	0.00

Şekil 4.18. EGFR mutasyonu göstermeyen adenokarsinom olgusu.

KRAS-BRAF				
Intell.Lot: 20484S11K		Sample: 25		March 16, 2012
Magz.Lot: 09011220483J21J		ID: 2011112318254645		02:08
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
KRAS				
1	G12		2326.50	
2	G12A	Neg	29.06	0.00
3	G12C	Neg	19.07	0.00
4	G12D	Neg	43.75	0.01
5	G12F	Neg	28.05	0.00
6	G12R	Neg	43.58	0.01
7	G12S	Positive	3543.65	0.51
8	G12V	Neg	23.19	0.00
9	G13		705.77	
10	G13A	Neg	17.73	0.00
11	G13C	Neg	21.61	0.00
12	G13D	Neg	23.19	0.00
13	G13R	Neg	32.40	0.00
14	G13S	Neg	35.61	0.01
15	G13V	Neg	49.45	0.01
16	Amplicon1		6964.57	
17	Q61		1245.17	
18	Q61E	Neg	45.95	0.03
19	Q61H1	Neg	33.13	0.02
20	Q61H2	Neg	33.10	0.02
21	Q61K	Neg	51.48	0.03
22	Q61L	Neg	45.97	0.03
23	Q61P	Neg	56.08	0.04
24	Q61R	Neg	50.26	0.03
25	Amplicon2		1561.14	
BRAF				
26	V600		4990.38	
27	V600A	Neg	47.83	0.01
28	V600D	Neg	85.20	0.02
29	V600E1	Neg	17.23	0.00
30	V600E2	Neg	32.18	0.01
31	V600KRM	Neg	125.13	0.02
32	Amplicon3		5297.95	
33	HYBC		1000.00	
34	BKGD		598.04	

Şekil 4.19. KRAS mutasyonu gösteren yassı epitel hücreli karsinom olgusu.

KRAS-BRAF				
Intell Lot: 20484L49K		Sample: 29	Jul 25, 2012	
Magz Lot 09011220483V23J		ID:2012072517172614	23:06	
Sno	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
1	G12		1439.44	
2	G12A	Neg	1.00	0.00
3	G12C	Neg	1.00	0.00
4	G12D	Neg	1.00	0.00
5	G12F	Neg	1.00	0.00
6	G12R	Neg	1.00	0.00
7	G12S	Neg	1.00	0.00
8	G12V	Neg	1.00	0.00
9	G13		666.51	
10	G13A	Neg	1.00	0.00
11	G13C	Positive	470.40	0.18
12	G13D	Neg	1.00	0.00
13	G13R	Neg	1.00	0.00
14	G13S	Neg	1.00	0.00
15	G13V	Neg	1.00	0.00
16	Q61		560.61	
17	Q61E	Neg	1.00	0.00
18	Q61H1	Neg	1.00	0.00
19	Q61H2	Neg	1.00	0.00
20	Q61K	Neg	1.00	0.00
21	Q61L	Neg	1.00	0.00
22	Q61P	Neg	1.00	0.00
23	Q61R	Neg	1.00	0.00
24	V600		2124.14	
25	V600A	Neg	1.00	0.00
26	V600D	Neg	36.46	0.02
27	V600E1	Neg	1.00	0.00
28	V600E2	Neg	1.00	0.00
29	V600KRM	Neg	28.89	0.01
30	HYBC		1000.00	
31	BKGD		735.10	

Şekil 4.20. KRAS mutasyonu gösteren BHNEK olgusu.

Çizelge 4.6. Adenokarsinom ve bronkoalveoler karsinom tanılı hastaların özellikleri.

	Yaş	Cins.	Sig.	Tm.	Mut.	T	N	M	Evre	Dif.
1	62	Erkek	B	A	EGFR	T1a	N0	M0	Evre 1A	Orta
2	70	Erkek	B	A	KRAS	T2b	N1	M0	Evre 2B	Kötü
3	65	Erkek	H	A	EGFR	T2a	N0	M1b	Evre 4	Orta
4	62	Erkek	B	A	YOK	T4	N1	M1b	Evre 4	Kötü
5	56	Erkek	E	A	EGFR	T2b	N0	M0	Evre 2A	Kötü
6	64	Erkek	E	A	YOK	T2b	N0	M0	Evre 2A	Kötü
7	76	Kadın	B	A	YOK	T2a	N0	M0	Evre 1B	İyi
8	49	Erkek	E	A	KRAS	T2b	N0	M1b	Evre 4	İyi
9	80	Erkek	B	A	YOK	T1a	N0	M0	Evre 1A	İyi
10	69	Erkek	E	A	YOK	T2a	N0	M0	Evre 1B	Orta
11	65	Erkek	B	A	YOK	T3	N1	M1b	Evre 4	Orta
12	76	Erkek	B	A	YOK	T2b	N0	M0	Evre 2A	İyi
13	64	Erkek	B	A	EGFR	T1a	N0	M1b	Evre 4	Orta
14	77	Erkek	E	A	YOK	T3	N1	M0	Evre 3A	Kötü
15	74	Kadın	H	A	BRAF	T4	N0	M0	Evre 3A	Kötü
16	44	Erkek	E	A	KRAS	T2a	N0	M0	Evre 1B	Orta
17	70	Erkek	B	A	YOK	T2a	N0	M0	Evre 1B	Kötü
18	65	Erkek	B	A	YOK	T2b	N0	M0	Evre 2A	Kötü
19	77	Erkek	B	A	KRAS	T3	N1	M0	Evre 3A	Orta
20	58	Erkek	B	A	YOK	T3	N1	M0	Evre 3A	Kötü
21	69	Erkek	H	A	YOK	T3	N0	M0	Evre 2B	Orta
22	71	Kadın	B	A	YOK	T1b	N0	M0	Evre 1A	Kötü
23	64	Erkek	B	A	YOK	T2a	N0	M0	Evre 1B	Orta
24	70	Erkek	B	A	YOK	T1b	N0	M0	Evre 1A	İyi
25	61	Kadın	B	A	YOK	T3	N1	M0	Evre 3A	Kötü
26	63	Erkek	B	A	KRAS	T1b	N0	M0	Evre 1A	İyi
27	74	Kadın	B	A	KRAS	T2b	N0	M0	Evre 2A	İyi
28	55	Kadın	B	A	YOK	T4	N0	M0	Evre 3A	İyi
29	71	Erkek	B	A	YOK	T1a	N0	M0	Evre 1A	Orta
30	57	Kadın	E	A	YOK	T2b	N0	M0	Evre 2A	İyi
31	69	Kadın	B	A	EGFR	T2a	N2	M1b	Evre 4	Orta
32	77	Erkek	B	A	YOK	T3	N0	M0	Evre 2B	Kötü
33	79	Erkek	B	A	YOK	T3	N0	M0	Evre 2B	Kötü
34	60	Erkek	B	A	YOK	T4	N0	M0	Evre 3A	Orta
35	45	Erkek	E	A	KRAS	T1b	N0	M0	Evre 1A	Orta

Çizelge 4.6. (Devam).

	Yaş	Cins.	Sig.	Tm.	Mut.	T	N	M	Evre	Dif.
36	57	Kadın	H	A	EGFR	T4	N0	M0	Evre 3A	İyi
37	73	Erkek	H	A	EGFR	T1b	N0	M0	Evre 1A	Orta
38	70	Kadın	H	A	EGFR	T1b	N0	M0	Evre 1A	İyi
39	53	Erkek	B	A	YOK	T1a	N1	M1b	Evre 4	Kötü
40	61	Erkek	E	A	YOK	T2b	N1	M0	Evre 2B	İyi
41	68	Erkek	E	A	YOK	T3	N0	M0	Evre 2B	Orta
42	47	Erkek	E	A	EGFR	T1b	N0	M0	Evre 1A	Kötü
43	65	Kadın	B	A	EGFR	T2b	N2	M0	Evre 3A	İyi
44	52	Erkek	B	A	KRAS	T1a	N0	M1b	Evre 4	Orta
45	51	Kadın	B	A	EGFR	T2a	N0	M0	Evre 1A	Orta
46	64	Erkek	B	A	KRAS	T3	N0	M0	Evre 2B	İyi
47	80	Erkek	E	A	KRAS	T2a	N1	M0	Evre 2A	Kötü
48	53	Erkek	B	A	EGFR	T1b	N2	M0	Evre 3A	Orta
49	68	Erkek	E	A	EGFR	T3	N0	M0	Evre 2B	Orta
50	70	Erkek	B	A	EGFR	T2a	N1	M0	Evre 2A	Kötü
51	66	Erkek	B	BAK	YOK	T2b	N0	M0	Evre 2A	İyi
52	74	Kadın	E	BAK	KRAS	T2a	N0	M0	Evre 1B	Orta
53	81	Kadın	E	BAK	KRAS	T1b	N0	M0	Evre 1A	İyi
54	71	Erkek	B	BAK	YOK	T2a	N0	M0	Evre 1B	İyi
55	51	Erkek	B	BAK	YOK	T4	N0	M0	Evre 3A	İyi
56	69	Erkek	E	BAK	YOK	T2b	N0	M0	Evre 2A	Orta
57	55	Erkek	B	BAK	YOK	T2a	N0	M0	Evre 1B	İyi
58	76	Erkek	H	BAK	YOK	T4	N0	M0	Evre 3A	İyi

NOT: Cins: Cinsiyet, Sig: Sigara, Tm: Tümör alt tipi, Mut: Mutasyon durumu, Dif: Diferansiasyon durumu, Sigara içme hikayesi E: evet, H: hayır, B: bilinmiyor, A: Adenokarsinom

Çizelge 4.7. Yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastaların özellikleri.

	Yaş	Cins.	Sig.	Tm.	Mut.	T	N	M	Evre	Dif.
1	51	Erkek	B	YEHK	Yok	T3	N0	M0	Evre 2B	Kötü
2	50	Erkek	B	YEHK	Yok	T4	N1	M0	Evre 3A	İyi
3	54	Erkek	B	YEHK	Yok	T4	N0	M0	Evre 3A	Orta
4	62	Erkek	E	YEHK	Yok	T3	N0	M0	Evre 2B	Orta
5	69	Erkek	E	YEHK	Yok	T3	N0	M0	Evre 2B	Orta
6	63	Kadın	B	YEHK	Yok	T2b	N0	M0	Evre 2A	Orta
7	57	Erkek	B	YEHK	Yok	T3	N0	M0	Evre 2B	Kötü
8	75	Erkek	B	YEHK	Yok	T2a	N0	M0	Evre 1B	Orta
9	70	Erkek	B	YEHK	Yok	T1a	N0	M0	Evre 1A	Orta
10	60	Erkek	H	YEHK	KRAS	T3	N0	M0	Evre 2B	Orta
11	58	Erkek	B	YEHK	Yok	T3	N0	M0	Evre 2B	Kötü
12	58	Erkek	E	YEHK	Yok	T3	N1	M0	Evre 3A	Kötü
13	73	Erkek	E	YEHK	Yok	T1b	N0	M0	Evre 1A	Kötü
14	64	Erkek	E	YEHK	Yok	T2b	N0	M0	Evre 2A	Orta
15	79	Erkek	E	YEHK	Yok	T2b	N0	M0	Evre 2A	Kötü
16	72	Erkek	E	YEHK	Yok	T1b	N0	M0	Evre 1A	İyi
17	65	Erkek	E	YEHK	Yok	T1a	N1	M0	Evre 2A	Kötü
18	61	Erkek	E	YEHK	Yok	T3	N0	M0	Evre 2B	Orta
19	67	Erkek	E	YEHK	Yok	T2a	N1	M1b	Evre 4	Kötü
20	32	Erkek	E	YEHK	Yok	T2a	N1	M0	Evre 2A	İyi
21	62	Erkek	H	YEHK	Yok	T2b	N0	M0	Evre 2A	Orta
22	68	Kadın	B	YEHK	Yok	T1a	N0	M0	Evre 1A	Orta
23	60	Erkek	B	YEHK	Yok	T3	N0	M0	Evre 2B	Kötü
24	65	Erkek	E	YEHK	Yok	T2b	N1	M0	Evre 2B	Orta
25	63	Erkek	B	YEHK	Yok	T2b	N0	M0	Evre 2A	İyi
26	64	Erkek	B	YEHK	Yok	T1a	N0	M0	Evre 1A	Kötü
27	46	Erkek	B	YEHK	Yok	T2b	N0	M0	Evre 2A	İyi
28	62	Erkek	B	YEHK	Yok	T2a	N0	M0	Evre 1B	Kötü
29	61	Erkek	E	YEHK	Yok	T2a	N0	M0	Evre 1B	Kötü
30	72	Kadın	E	YEHK	Yok	T4	N0	M0	Evre 3A	Kötü

Çizelge 4.8. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı hastaların özellikleri.

	Yaş	Cins.	Sig.	Tm.	Mut.	T	N	M	Evre
1	50	Erkek	E	BHNEK	Yok	T4	N0	M0	Evre 3A
2	56	Erkek	E	BHNEK	Yok	T1b	N0	M0	Evre 1A
3	62	Erkek	B	BHNEK	Yok	T2b	N0	M0	Evre 2A
4	56	Erkek	E	BHNEK	Yok	T2a	N1	M0	Evre 2A
5	58	Erkek	B	BHNEK	Yok	T2a	N2	M0	Evre 3A
6	66	Erkek	B	BHNEK	KRAS	T3	N0	M0	Evre 2B
7	56	Erkek	E	BHNEK	Yok	T2b	N2	M0	Evre 3A
8	58	Erkek	E	BHNEK	Yok	T2a	N1	M0	Evre 2A

Elde edilen kategorik verilerin istatistiksel analizinde Fisher, Anova ve Pearson Ki kare testi kullanıldı ve istatistiksel analizde anlamlılık değeri $p < 0.05$ alındı. Üç grup arasında karşılaştırma yapmak için ise Kruskal Wallis testi kullanıldı.

4.2. EGFR Mutasyon Bulguları

EGFR mutasyonu görülen vakalar tek yönlü varyans analizi (Anova testi) ile yaş farkı açısından değerlendirildi. Ancak EGFR mutasyonu ve yaş arasında anlamlı ilişki bulunamadı. EGFR mutasyonu ile kadın cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptandı ($p = 0.001$).

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom tanılı hasta grupları arasında EGFR mutasyonu açısından anlamlı fark bulundu ($p=0.001$). Daha sonra detaylı analiz için Pearson Ki kare testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Adenokarsinom tanılı ve yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastalar EGFR mutasyonu açısından karşılaştırıldı ve EGFR mutasyonu, adenokarsinom tanılı olgularda yassı epitel hücreli karsinom tanılı olgulara göre, anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Adenokarsinom grubu ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubu arasında, EGFR mutasyonu açısından anlamlı fark bulunamadı ($p=0.169$). Yassı epitel hücreli karsinom grubu ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubunda EGFR mutasyonu olmadığı için bu iki grup arasında karşılaştırma yapılamadı.

EGFR mutasyonu olan hastalarda, sigara içen ve içmeyen gruplar arasında fark olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı ve EGFR mutasyonu sigara içmeyen grupta daha çok izlendi ($p=0.016$).

EGFR mutasyonu ile hastaların evreleri arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p=0.094$). Ayrıca EGFR mutasyonu ile T, N, M değerleri arasında korelasyon bulunamadı ($p=0.186$) (Olumsuzluk katsayısı= 0.291). EGFR mutasyonu ile tümör diferansiasyonu arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p=0.162$).

4.3. KRAS Mutasyon Bulguları

KRAS mutasyonu görülen vakalar tek yönlü varyans analizi (Anova testi) ile yaş farkı açısından değerlendirildi. Ancak KRAS mutasyonu ve yaş arasında anlamlı ilişki bulunamadı. EGFR mutasyonu bulunan olgularda cinsiyet farkı olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı, KRAS mutasyonu ile cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.393$).

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom tanımlı olgularda KRAS mutasyonu açısından fark olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı ve p değeri 0.022 ile anlamlı fark bulunduğu için detaylı analiz için Pearson Ki kare testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Adenokarsinom tanımlı ve yassı epitel hücreli karsinom tanımlı hastalar KRAS mutasyonu açısından karşılaştırıldı, KRAS mutasyonu, Adenokarsinom grubunda yassı epitel hücreli karsinom grubuna göre, anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.007$). Adenokarsinom grubu ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubu arasında, KRAS mutasyonu açısından anlamlı fark bulunamadı ($p=0.662$). Yassı epitel hücreli karsinom grubu ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubunda KRAS mutasyonu açısından fark olup olmadığına örneklem yetersizliği nedeniyle p değeri verilemedi ve iki grup arasında karşılaştırma yapılamadı.

KRAS mutasyonu olan hastalarda, sigara içen ve içmeyen gruplar arasında fark olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı ve KRAS mutasyonu ile sigara içiciliği arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p=0.999$).

KRAS mutasyonu ile hastaların evreleri arasında bir ilişki olup olmadığına bakıldı ve anlamlı ilişki bulunamadı. Ayrıca KRAS mutasyonu ile T, N, M değerleri

arasında korelasyon bulunamadı. KRAS mutasyonu ile tümör diferansiasyonu arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

EGFR ve KRAS mutasyonu taşıyan olgular ile tümör tipleri arasındaki ilişki, örneklem yetersizliği nedeniyle p değeri verilemediği için değerlendirilemedi.

4.4. BRAF Mutasyonu

96 hasta içerisinde, adenokarsinom grubuna giren bir kadın hastada BRAF mutasyonu izlendi. Ancak örneklem yetersizliği nedeniyle bu grup istatistiksel çalışmaya dahil edilemedi.

Mutasyon izlenen olguların dökümü aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Mutasyon izlenen olgu sayılarının tümör tiplerine göre dağılımı.

Olgu sayısı	Tümör tipi	EGFR	KRAS	BRAF
50	Adenokarsinom	14	10	1
8	BAK	0	2	0
30	YEHK	0	1	0
8	BHNEK	0	1	0
Toplam 96		14	14	1

5. TARTIŞMA

Dünyada her yıl yaklaşık 1,2 milyon yeni akciğer kanseri tanısı konulmaktadır ve yine her yıl dünyada 1,4 milyon akciğer kanserine bağlı ölüm görülmektedir (2,3).

Ülkemizde de son yıllarda akciğer kanseri görülme sıklığında belirgin artış izlenmektedir. Yeni tanısal yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşmasıyla erken tanının bu artışa etkisi olsa da, esas neden etyolojik faktörlere maruziyetin artmasıdır. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin %31'i, kadınlarda ise %22'si akciğer kanserine bağlıdır. Akciğer kanseri sık görülen diğer kanser türlerinden (kolon, prostat ve meme kanseri) daha fazla ölüme yol açmaktadır (1).

Akciğer kanserlerinin etyolojik nedenlerinin başında sigara kullanımı gelmektedir. Sigara kullananlarda kanser gelişimini etkileyen faktörler; sigara içme süresi, başlama yaşı ve günlük tüketilen sigara sayısıdır. Akciğer kanserlerinin etyolojisinde genetik yatkınlığın varlığı da ileri sürülmektedir. Hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki hasar, kanser oluşumundaki temel mekanizmadır (68). Diğer kanser türlerine benzer olarak, akciğer kanseride onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda gelişebilmektedir (60).

Kanserli dokular üzerinde yapılan moleküler genetik çalışmalar sayesinde akciğer kanserinin başlangıcında ve gelişiminde önemli role sahip çeşitli bozukluklar saptanmıştır. Genetik bozuklukların, akciğer kanserli hastaların prognozu ile ilişkisi ve bu gen bozuklukları üzerinden geliştirilecek yeni tedavi yöntemlerinin saptanması gereklilik olmuştur (69,70).

Kanser tedavisinde hedefe yönelik ajanların kullanıma girmesiyle KHDAK'ın medikal tedavisi konvansiyel tedaviden hedefe yönelik tedaviye doğru bir değişim göstermiştir. Bu nedenle moleküler biyolojiye dayanan, uzun süreli sağ kalım belirleyebilecek yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır ve hedefe yönelik tedavi protokollerinin hasta seçiminde moleküler analiz ve karakterizasyonu önem kazanmıştır.

Yapılan çalışmalarda EGFR mutasyonu saptanan hastalar tedaviye iyi yanıt verirken, bu hastalarda KRAS mutasyon varlığının tedavi direncine yol açtığı

gösterilmiştir. BRAF mutasyonu tek başına kötü prognoza yol açmazken, farklı sınıflardaki tirozin kinaz inhibitörlerine sensitiftir (71,72).

Sun ve arkadaşları toplam 301 hastayı EGFR ve KRAS mutasyonu ilişkisi açısından incelemişlerdir. 301 hastanın 99'unda (%32.9) EGFR mutasyonu ve 14'ünde (%4.7) KRAS mutasyonu bulmuşlardır. KRAS mutasyonu görülen hiçbir hastada EGFR mutasyonu izlememişlerdir. EGFR ve KRAS mutasyonu arasında ilişki bulamamışlardır (73).

Chiosea ve arkadaşları yaptıkları çalışmada EGFR FISH pozitif ve negatif akciğer adenokarsinomlu hastalarda KRAS mutasyonuna bakmışlar ve aralarında anlamlı ilişki bulamamışlardır (74).

Ohashi ve arkadaşları çalışmalarında ise, ilaca sensitif EGFR mutasyonu gösteren hücrelerde ektopik NRAS veya BRAF mutasyon varlığının EGFR tirozin kinaz inhibitör tedavisine direnç kazandırdığını göstermişlerdir (75). Bizim çalışmamızda EGFR mutasyonu olan olgularda KRAS ve BRAF gen mutasyonu izlenmemiştir ve bu nedenle EGFR mutasyonu ile KRAS ve BRAF mutasyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

Akciğer kanserinin etyolojisinde genellikle sigara içiciliği olmak üzere çeşitli karsinojenler suçlanmaktadır. Ancak küçük hücreli dışı akciğer kanserinin adenokarsinom alt tipi özellikle sigara içmeyen hasta grubunda daha sık izlenmektedir.

Sigara içen ve sigara içmeyen hasta grubunda farklı hücresel ve moleküler yollarla malign transformasyona neden olmaktadır (76). Daha önce yapılan dört farklı retrospektif çalışmada da, sigara içen ve içmeyen gruplarda akciğer kanserinin özellikleri ve hedefe yönelik tedavi yanıtları açısından karşılaştırılmış, sigara içmeyen grupta görülen akciğer kanserinin sigara içen gruba göre daha çok genç yaşta pik insidans yaptığı, daha çok kadınlarda ve adenokarsinom alt tipinde olduğu görülmüştür (77-80).

Baykara ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 50 primer küçük hücreli dışı akciğer kanserinde EGFR ve KRAS mutasyonu ile sigara içme hikayesi arasında ilişki olup olmadığına bakmışlardır. EGFR mutasyonu (L858R) ve sigara içiciliği arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır. KRAS mutasyonu ile sigara içme hikayesi, tümörün evresi, hasta cinsiyeti ve tümör histolojisi arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır (81).

Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 200 akciğer adenokarsinom tanılı hasta incelenmiş ancak KRAS mutasyonu sıklığı ve sigara içiciliği arasında bir ilişki bulamamışlardır (82). Bizim çalışmamızda da KRAS mutasyonu ile sigara içiciliği arasında ilişki bulunamamıştır.

EGFR mutasyonu olan Asya kökenli, sigara içmeyen, kadın, adenokarsinom tanılı olguların tedaviye daha iyi yanıt verdikleri görülmüştür (83,84,85). Yang ve arkadaşları, sigara içmemiş olan adenokarsinom olgularında EGFR mutasyonu ile kadın cinsiyet arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır (86). Wang ve arkadaşları, 1,444 küçük hücreli dışı akciğer karsinom tanılı hasta grubunda EGFR mutasyonu ile kadın cinsiyet, sigara içmeme durumu ve adenokarsinom alt tipi arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır (87).

Feng ve arkadaşları, 309 küçük hücreli dışı akciğer karsinomu tanılı hasta grubunda özellikle 60 yaş altı, sigara içmeyen, kadın ve adenokarsinom tanılı hasta grubunda daha fazla EGFR mutasyonuna rastlamışlardır (88). Bizim çalışmamızda da EGFR mutasyonu ile kadın cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptandı ve EGFR mutasyonu sigara içmeyen hasta grubunda daha çok izlendi. EGFR mutasyonu farkı açısından, yassı epitel hücreli karsinom, büyük hücreli nöroendokrin karsinom ve adenokarsinom tanılı hasta grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında adenokarsinom tanılı hasta grubunda EGFR mutasyonu anlamlı yüksek olarak bulundu.

Fan ve arkadaşları, 282 küçük hücreli dışı akciğer karsinomu tanılı olguda EGFR mutasyonuna bakmışlar, mutasyon varlığı ve hastaların klinik TNM evre durumunun ilişkisiz olduğunu bulmuşlardır (89). Wang ve arkadaşları, 1,444 küçük hücreli dışı akciğer karsinom tanılı hasta grubunda EGFR mutasyonu ile hasta yaşı, tümörün derecesi, lenf nodu metastazı ve TNM evresi arasında ilişki bulamamışlardır (87).

Suda ve arkadaşları, toplam 405 küçük hücreli dışı akciğer karsinomu tanılı olguda EGFR mutasyonunun yaş ile ilişkisine bakmışlar, 65 yaş ve altı hastaları 75 yaş ve üzeri olan hastalar ile karşılaştırmışlar, sonuçta yaşlı hasta grubunda EGFR mutasyon prevalansını (%53.1) daha yüksek bulmuşlardır (90). Bizim çalışmamızda, EGFR mutasyonu ile hastaların yaşı, evresi, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve diferansiyasyon derecesi arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Adenokarsinom grubunda EGFR mutasyonu sıklığı %10-40 arasında değişmekte olup, birçok çalışmada farklı oranlar mevcuttur (91,92,93). Murray ve

arkadaşları, toplam 202 makaleyi analiz için incelemişler, 12,244 küçük hücreli dışı akciğer karsinom tanılı olguların 3,381'inde somatik EGFR gen mutasyonu bulunduğunu bildirmişlerdir (94). D'Angelo ve arkadaşları, 1,118 akciğer adenokarsinom tanılı rezeksiyon spesmeninde EGFR ve KRAS mutasyonuna bakmışlar. 1,118 tane geniş popülasyonlu hasta grubu içerisinde, 222 hastada EGFR mutasyonu (%20) ve 227 hastada KRAS mutasyonu (%25) tespit etmişlerdir (95).

Tiffany ve arkadaşlarının çalışmasında, toplam 484 küçük hücreli dışı akciğer karsinom tanılı hastada (467 adenokarsinom, 12 Yassı epitel hücreli karsinom, 3 büyük hücreli karsinom ve 2 adenoskuamöz hücreli karsinom) EGFR mutasyonuna bakılmış, 484 hastanın 221 tanesinde (%45.7), sıklıkla kadın hastalarda (%60.6) ve adenokarsinom histolojisine sahip tümörlerde (%47.1) EGFR mutasyonu anlamlı ölçüde yüksek tespit edilmiştir (96). Bizim çalışmamızda adenokarsinom vakalarında EGFR gen mutasyonu 58 hastadan 14 tanesinde (%24,1) mevcut olup, literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Önceki yapılan ilk çalışmalarda sadece adenokarsinom vakalarında EGFR mutasyon analizi çalışılmıştır, fakat daha sonra yassı epitel hücreli akciğer karsinomunda da EGFR mutasyonu saptanmıştır. Miyamae ve arkadaşları yassı epitel hücreli akciğer karsinomunda EGFR mutasyon sıklığını %3.4 olarak bulmuşlardır (97).

Marchetti ve arkadaşları, toplam 860 küçük hücreli dışı akciğer karsinom olgularında EGFR mutasyonuna bakmışlar, 375 adenokarsinom olgusunun 39 tanesinde (%10) EGFR mutasyonu saptamışlar, vakalar içerisinde 454 yassı epitel hücreli karsinom ve 31 büyük hücreli karsinom tanılı hastalarda EGFR mutasyonuna rastlamamışlardır. Ayrıca 375 adenokarsinom tanılı hastaların 86'sı bronkoalveoler karsinom, 289'u ise konvansiyonel akciğer adenokarsinomundan oluşmakta olup, adenokarsinom olgularında %6 oranında ve bronkoalveoler karsinomlu olguların %26'sında EGFR mutasyonu izlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda bronkoalveoler karsinom, kadın cinsiyet ve sigara içmeme durumunu EGFR mutasyonu ile ilişkili bulmuşlardır (98).

Hata ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 249 yassı epitel hücreli akciğer karsinomu olgusunun 33 tanesinde (%13.3) EGFR mutasyonu saptamışlar, bu hastaların da 20 tanesi EGFR-TKI tedavisi almış, tedavi alan hastaların ise 5'inde (%25) 6 aydan uzun progresyonsuz sağkalım sağlamışlardır (99).

Çalışmamıza alınan 30 yassı epitel hücreli karsinom vaka grubu içerisinde EGFR mutasyonu görülen olgu saptanmamıştır.

EGFR-TKI tedavisine adenokarsinom histolojisindeki tümörler daha iyi yanıt vermekle birlikte, yassı epitel hücreli karsinom olgularının bazılarında da tedaviye yanıt görülmüştür. Ancak bu tedaviye yanıt alınan hastalarda sigara içmeme, TTF-1 ekspresyonu ve yüksek karsinoembriyjenik antijen (CEA) seviyeleri dikkati çekmiş olup, hasta seçiminde sadece mutasyon varlığının değerlendirilmemesi ve klinikopatolojik faktörlerinde değerlendirilmesi önerilmektedir (99).

Fiala ve arkadaşlarının çalışmasında, 223 yassı epitel hücreli akciğer karsinomu olgusunun 179 tanesine EGFR-TKI tedavisi uygulanmıştır. Direk sanger sekans yöntemiyle, hastaların %7.2'sinde EGFR mutasyonu ve %7.4'ünde KRAS mutasyonu izlenmiştir. Ancak bu mutasyonların, yassı epitel hücreli karsinom olgularında EGFR-TKI tedavisine katkıları gösterilememiştir (100).

Bizim çalışmamızda yer alan 30 yassı epitel hücreli karsinom olgusundan yalnızca 1 tanesinde KRAS mutasyonu tespit edildi. Boch ve arkadaşlarının çalışmasında, KRAS mutasyonunu, histoloji ayrımı yapmaksızın sigara içen ve kadın hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (101). Ancak bizim çalışmamızda KRAS mutasyonu tespit edilen hasta erkek olup sigara içme öyküsü bulunmuyordu ve beraberinde EGFR veya BRAF mutasyonu izlenmedi.

Iyoda ve arkadaşları, 13 büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı olguda hem FISH hem de PCR ile EGFR mutasyon analizi yapmışlar, 1 olguda PCR ile mutasyon saptarken, FISH ile mutasyon bulamamışlardır (102). İlk olarak De Pas ve arkadaşlarının çalışmasında, büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı bir olgu sunumunda Sanger sekans yöntemiyle EGFR mutasyonu gösterilmiş ve hastaların Gefitinib tedavisinden fayda görebileceği ileri sürülmüştür (103).

Araki ve arkadaşları 40 BHNEK tanılı hastada immünohistokimyasal olarak EGFR mutasyonuna bakmışlar, olgular arasında EGFR mutasyonu bulamamışlardır (104). Bizim çalışmamıza dahil edilen 8 BHNEK vakası arasında EGFR mutasyonu görülmedi.

Przygodzki ve arkadaşlarının çalışmasında, 15 BHNEK olgusunda KRAS mutasyonuna bakmışlar, olguları hiçbirinde mutasyon izlememişlerdir (105).

Boch ve arkadaşları, 80 büyük hücreli akciğer karsinomu olgusunda KRAS ve EGFR mutasyonuna bakmışlar, 11 olguda (%14) KRAS mutasyonu ve 2 olguda

(%5,6) EGFR mutasyonu izlemişlerdir. Ayrıca çalışmada 186 tane yassı epitel hücreli karsinom olgusu bulunmakta, bunların da 5 tanesinde (%2,7) KRAS mutasyonu izlemişlerdir. KRAS mutasyonunun yassı epitel hücreli karsinoma oranla büyük hücreli karsinomda daha sık bulunması anlamlı yüksek bulunmuştur. EGFR ve KRAS mutasyonunu bir arada izlememişlerdir. KRAS mutasyonunu, histoloji ayrımı yapmaksızın sigara içen ve kadın hasta grubunda daha çok izlemişlerdir (101).

Bizim çalışmamıza dahil edilen 8 BHNEK olgusu arasında sadece 1 vakada KRAS mutasyonu görüldü. KRAS mutasyonu izlediğimiz hastanın cinsiyeti erkek idi, ancak sigara içme durumu bilinmiyordu. 7 BHNEK olgusunda herhangi bir mutasyon saptanmadı.

Literatürdeki çalışmalara en sık gözlenen EGFR gen mutasyonları, ekson 19'daki in-frame delesyonlar ve ekson 21'deki L858R nokta mutasyonudur (9). Ekson 19'da en sık görülen delesyon, 747.lösin-749.glutamik asit delesyonu olup tüm EGFR mutasyonlarının %44'ünü oluşturur. Ekson 21'deki L858R mutasyonu ise tüm EGFR mutasyonlarının %41'ini oluşturur. Ekson 20'deki delesyonlar ve duplikasyonlar ise %5'ini oluşturmaktadır (10,11). Bizim çalışmamızda ise, adenokarsinomlu hastalarda izlenen 14 EGFR mutasyonunun 1 tanesi ekzon 21'de L858Arg mutasyonu, 1 tanesi ekzon 19'da Leu792Pro mutasyonuydu. Geriye kalan 12 EGFR mutasyonu ise yine ekson 19'da görüldü. Bulgularımız literatürle uyumludur.

Adenokarsinom histolojik tipinde KRAS mutasyonları %5-40 sıklıkla görülmektedir (12,106,107). Bizim çalışmamızda 58 adenokarsinom olgusu içerisinde 12 (%20.6) vakada KRAS mutasyonu görüldü ve literatür ile uyumlu bulundu. Riely ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada KRAS mutasyonu ve sigara içiciliği arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır (108). Ancak bizim çalışmamızda KRAS mutasyonu ile yaş, cinsiyet, sigara içiciliği, hastalığın evresi, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve diferansiasyon derecesi arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Kriegshauser ve arkadaşlarının çalışmasında, KHDAK'da biofilm çipe dayalı KRAS mutasyonu bakmışlar ve adenokarsinom grubu olgularda daha yüksek oranda KRAS mutasyonu tespit etmişlerdir (109). Bizim çalışmamızda da KRAS mutasyonu, adenokarsinom grubunda yassı epitel hücreli karsinom grubuna göre, anlamlı olarak yüksek bulundu.

Çalışmamızda adenokarsinom grubu ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubu arasında, KRAS mutasyonu açısından anlamlı fark bulunamadı. Yassı epitel hücreli karsinom grubu ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubu arasında KRAS mutasyonu açısından fark olup olmadığına örneklem yetersizliği nedeniyle bakılamadı. EGFR ve KRAS mutasyonu taşıyan olgular ile tümör tipleri arasındaki ilişki, örneklem yetersizliği nedeniyle değerlendirilemedi.

Adenokarsinomlu hastalarda görülen KRAS mutasyonlarının %80-90'ı kodon 12'deki nokta mutasyonlar iken, %10'dan daha azı kodon 13'de ve %10'dan azı ise kodon 61'de yer almaktadır (12). Bizim analizlerimiz sonucunda da adenokarsinomlu hastalarda izlenen 12 tane KRAS mutasyonu ekson 2'deki kodon 12 ve 13 bölgelerinde izlendi. Bu olguların 5 tanesinde G12 V, 4 tanesinde G12C, 2 tanesinde G12D ve 1 tanesinde G13C alt tip izlendi, bulgularımızın literatürle uyumlu olduğu görüldü (12).

Paik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 697 adenokarsinom olgusunda BRAF mutasyonu bakılmış ve BRAF mutasyon sıklığı %3 olarak bulunmuştur (110). Sasaki ve arkadaşlarının çalışmasında, toplam 305 akciğer karsinomu olgusunu EGFR, KRAS ve BRAF mutasyonu açısından incelemişlerdir. 261 hasta (%85,6) adenokarsinom ve 38 hasta (%12,5) ise yassı epitel hücreli karsinom olgusuymuş. Toplam 305 hastanın 93 tanesinde EGFR mutasyonu, 22 tanesinde KRAS mutasyonu ve 6 tanesinde (%1,96) BRAF mutasyonu tespit edilmiş. BRAF mutasyonu saptanan hastaların 5 tanesinde V600E, 1 tanesinde N581I mutasyonu görülmüş. 4 hasta erkek ve 2 hasta kadınmış. Hastaların 1 tanesinde sigara içme öyküsü bulunmazken, diğerleri sigara içiyormuş ve tamamı adenokarsinom tanılı hastalardan oluşmaktaymış (111).

Sasaki ve arkadaşlarının çalışmasında, ayrıca toplam hasta populasyonunda BRAF mutasyonu ile cinsiyet, yaş, tümör evresi ve sigara içme durumu ile de anlamlı ilişki bulunmamış. Ancak adenokarsinom tanılı hasta grubunda BRAF mutasyonu sigara içen grupta anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (111).

Bizim çalışmamızda; yalnızca 1 adenokarsinom tanılı vakada BRAF mutasyonu izlenmiş olup, kadın hasta ve sigara içme öyküsü bulunmamaktaydı. BRAF mutasyonu izlenen hastada, KRAS veya EGFR mutasyonu görülmedi. 30 yassı epitel hücreli karsinom ve 8 BHNEK vakaları içerisinde BRAF mutasyonuna

rastlanmadı. Örneklem yetersizliği nedeniyle BRAF mutasyonu diğer mutasyon tipleri ve tümör tipleri arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

Önceki çalışmalarda BRAF mutasyonu en sık ekson 15’de nokta mutasyonu şeklinde bulunmuştur (13). Yine birçok çalışmada BRAF mutasyonu en sık valin ve glutamat amino asitlerinin yer değiştirmesiyle kodon 600’de (V600E) saptanmıştır (110). Bizim olgularımız arasında adenokarsinom tanılı 1 olguda ise BRAF V600E1 alt tip mutasyon görülmüş olup, literatürle uyumludur (110).

Solid tümörlerde mutasyon taramalarına yönelik çalışmalarda farklı moleküler teknikler kullanılmaktadır. Tümör dokusunun genetik yapısının incelenmesinde kullanılan metodların mutasyon deteksiyon limitinin yüksek olması gerekmektedir. Sanger yöntemi ile DNA dizi analizinde %20-25 mutasyon varlığında ancak saptama yapılabilmekte; pyrosekansda bu oran %5 olarak verilirken, real-time PCR için ise %1 olarak gösterilmektedir. Goa ve arkadaşları, kolon kanserli olgularda KRAS gen mutasyonunu belirlemeye yönelik yapmış oldukları bir çalışmada, strip test, pyrosekans ve sanger sekans yöntemlerini karşılaştırmışlar; sonuç olarak, strip testin mutasyon deteksiyon limitini %1, pyrosekansın %5 ve sanger sekans yönteminin ise %20-25 olarak belirtmişlerdir (14).

Tümör dokusu genetik yapı itibariyle heterojen olabilmektedir. Bu nedenle kullanılan metodların çok düşük orandaki mutasyonu dahi saptamak için sensitivitesinin yüksek olması ve güvenilir bir yöntem olması gerekmektedir (67,112).

Mikroarray yöntemi, real time PCR ve nothern blot analize göre gen ekspresyonundaki küçük değişiklikleri saptamada daha hassastır (64,65,113). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz verilerin analizleri, önceki çalışmalardaki analiz sonuçlarıyla uyumlu olup, yöntemimizin güvenilirliğini göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda kullandığımız mikroarray yöntemi ile üç farklı alt tipte küçük hücreli dışı akciğer karsinomlu (adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom) toplam 96 olguda EGFR geni için yaygın olarak belirlenmiş 50 farklı mutasyon, KRAS ve BRAF genleri için ise tek bir çipte yaygın görülen 24 farklı mutasyon açısından olguların aynı zamanda ve kısa sürede taranması sağlanmıştır. Çalışmamızın tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve bu protokollerin kullanılacağı hasta seçimine faydalı olacağı kanısındayız.

6. SONUÇLAR

Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaşları, 32 ile 81 arasında değişmekteydi. Tüm hastaların yaş ortalaması 61,5 idi. Çalışmaya dahil edilen 96 olgunun, 58'i (%60,4) adenokarsinom, 30'u (%31,3) yassı epitel hücreli karsinom, 8'i (%8,3) büyük hücreli nöroendokrin karsinomdan oluşmaktaydı. Hastaların 79 tanesi (%82,3) erkek, 17 tanesi (%17,7) kadındı. Hastaların 44 tanesinde sigara anamnezi mevcuttu. 52 hastanın sigara anamnezi bilinmiyordu. 44 hastadan 35 tanesi sigara içmekteydi. 9 hasta sigara içmiyordu.

Adenokarsinom tanılı hastaların 16 tanesi, yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastaların 14 tanesi ve büyük hücreli karsinom tanılı hastaların 5 tanesi sigara içmekteydi. Sigara kullanımı ile histopatolojik tipler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Adenokarsinom tanılı hastaların yaş aralığı 44-81 arasında değişmekteydi. Ortalama yaş 62,5 idi. Hastaların toplam sayısı 58 ve bunların 44'ü erkek (%75,9), 14'ü (%24,1) kadındı. 23 hastanın dosyasına ulaşılabildi. Bunlardan 16 tanesi (%69,6) sigara içiyor, 7 tanesi (%30,4) sigara içmiyordu. Hastaların 8 tanesi Bronkoalveoler tip adenokarsinom tanılıydı. Adenokarsinom tanılı hastaların 14 tanesinde (%24,1) EGFR mutasyonu saptanırken, 12 tanesinde (%20,6) KRAS mutasyonu saptandı. KRAS mutasyonu saptanan 12 hastadan 2 tanesi Bronkoalveoler tip adenokarsinomdu. Hastalar arasında yalnızca 1 hastada BRAF mutasyonu izlendi. Toplam 96 hastada, sadece 1 tane adenokarsinom tanılı vakada BRAF mutasyonu izlendiği için, örneklem yetersizliği nedeniyle karşılaştırma yapılamadı. 31 hastada herhangi bir mutasyona rastlanmadı.

Yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastaların yaş aralığı 32-79 arasında değişmekteydi. Ortalama yaş 62,10 idi. Hastaların toplam sayısı 30 ve bunların 27'si erkek (%90), 3'ü (%10) kadındı. 16 hastanın dosyasına ulaşılabildi. Bunlardan 14 tanesi (%87,5) sigara içiyor, 2 tanesi (%12,5) sigara içmiyordu. Yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastalardan yalnızca 1 tanesinde (%3,3) KRAS mutasyonu izlenirken, 29 hastada (%97,3) herhangi bir mutasyona rastlanmadı. 1 olguda görülen KRAS mutasyonu kodon 12/13 bölgesindeki G12 S mutasyonuydu.

Büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı hastaların yaş aralığı 50-66 arasında değişmekteydi. Ortalama yaş 57,75 idi. Hastaların toplam sayısı 8 ve tamamı erkek cinsiyetteydi. 5 hastanın dosyasına ulaşılabildi. Bunların tamamı da sigara içiyordu. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı hastalardan yalnızca 1 tanesinde (%12,5) KRAS mutasyonu izlenirken, 7 hastada (%87,5) herhangi bir mutasyona rastlanmadı. 1 olguda görülen KRAS mutasyonu kodon 12/13 bölgesindeki G13 C mutasyonuydu.

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanılı toplam 96 vakanın hiçbirinde 2 farklı mutasyon birarada görülmedi.

Elde edilen kategorik verilerin istatistiksel analizinde Fisher, Anova ve Pearson Ki kare testi kullanıldı ve istatistiksel analizde anlamlılık değeri $p<0.05$ alındı. Üç grup arasında karşılaştırma yapmak için ise Kruskal Wallis testi kullanıldı.

EGFR mutasyonu görülen vakalar tek yönlü varyans analizi (Anova testi) ile yaş farkı açısından değerlendirildi. Ancak EGFR mutasyonu ve yaş arasında anlamlı ilişki bulunamadı. EGFR mutasyonu ile kadın cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0.001$).

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom tanılı hasta grupları arasında EGFR mutasyonu açısından anlamlı fark bulundu ($p=0.001$). Daha sonra detaylı analiz için Pearson Ki kare testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Adenokarsinom tanılı ve yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastalar EGFR mutasyonu açısından karşılaştırıldı ve EGFR mutasyonu, adenokarsinom tanılı olgularda yassı epitel hücreli karsinom tanılı olgulara göre, anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Adenokarsinom grubu ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubu arasında, EGFR mutasyonu açısından anlamlı fark bulunamadı ($p=0.169$). Yassı epitel hücreli karsinom grubu ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubunda EGFR mutasyonu olmadığı için bu iki grup arasında karşılaştırma yapılamadı.

EGFR mutasyonu olan hastalarda, sigara içen ve içmeyen gruplar arasında fark olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı ve EGFR mutasyonu sigara içmeyen grupta daha çok izlendi ($p=0.016$).

EGFR mutasyonu ile hastaların evreleri arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p=0.094$). Ayrıca EGFR mutasyonu ile T, N, M değerleri arasında korelasyon bulunamadı ($p=0.186$) (Olumsuzluk katsayısı= 0.291). EGFR mutasyonu ile tümör diferansiasyonu arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p=0.162$).

KRAS mutasyonu görülen vakalar tek yönlü varyans analizi (Anova testi) ile yaş farkı açısından değerlendirildi. Ancak KRAS mutasyonu ve yaş arasında anlamlı ilişki bulunamadı. EGFR mutasyonu bulunan olgularda cinsiyet farkı olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı, KRAS mutasyonu ile cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.393$).

Adenokarsinom, yassı epitel hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom tanılı olgularda KRAS mutasyonu açısından fark olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı ve p değeri 0.022 ile anlamlı fark bulunduğu için detaylı analiz için Pearson Ki kare testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Adenokarsinom tanılı ve yassı epitel hücreli karsinom tanılı hastalar KRAS mutasyonu açısından karşılaştırıldı, KRAS mutasyonu, Adenokarsinom grubunda yassı epitel hücreli karsinom grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.007$). Adenokarsinom grubu ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubu arasında KRAS mutasyonu açısından anlamlı fark bulunamadı ($p=0.662$). Yassı epitel hücreli karsinom grubu ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubunda KRAS mutasyonu açısından fark olup olmadığına örneklem yetersizliği nedeniyle p değeri verilemedi ve iki grup arasında karşılaştırma yapılamadı.

KRAS mutasyonu olan hastalarda, sigara içen ve içmeyen gruplar arasında fark olup olmadığına Fisher testi ile bakıldı ve KRAS mutasyonu ile sigara içiciliği arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p=0.999$).

KRAS mutasyonu ile hastaların evreleri arasında bir ilişki olup olmadığına bakıldı ve anlamlı ilişki bulunamadı. Ayrıca KRAS mutasyonu ile T, N, M değerleri arasında korelasyon bulunamadı. KRAS mutasyonu ile tümör diferansiasyonu arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

EGFR ve KRAS mutasyonu taşıyan olgular ile tümör tipleri arasındaki ilişki, örneklem yetersizliği nedeniyle p değeri verilemediği için değerlendirilemedi.

96 hasta içerisinde, adenokarsinom grubuna giren bir kadın hastada BRAF mutasyonu izlendi. Ancak örneklem yetersizliği nedeniyle bu grup istatistiksel çalışmaya dahil edilemedi.

7. ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KARSİNOMLU OLGULARDA TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE EGFR, KRAS ve BRAF GEN MUTASYONLARININ BİOFİLM ÇİPE DAYALI MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Çalışmamızda küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı almış 96 olguda, biofilm çipe dayalı mikroarray yöntemi (Infiniti Autogenomics®) ile EGFR, KRAS ve BRAF gen mutasyonlarının belirlenmesi, mutasyonların sigara içiciliği, hastanın cinsiyeti, tümör tipi ve hastalığın evresi ile ilişkisi, bu genlerdeki mutasyonların Türk popülasyonuna özgü sıklığının belirlenmesi ve kullanılan yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi amaçlandı.

96 olgunun 58 tanesi Adenokarsinom, 30 tanesi yassı epitel hücreli karsinom ve 8 tanesi büyük hücreli nöroendokrin karsinom grubundan oluşmaktaydı. Adenokarsinom tanılı hastaların 58 tanesinden 14 tanesinde (%24,1) EGFR mutasyonu saptanırken, 12 tanesinde (%20,6) KRAS mutasyonu saptandı. Yassı epitel hücreli karsinom tanılı 30 vakadan yalnızca 1 tanesinde (%3,3) KRAS mutasyonu izlendi. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom olan 8 vakadan ise sadece 1 vakada (%12,5) KRAS mutasyonu görüldü.

EGFR mutasyonu, kadın cinsiyet ve sigara içme öyküsü bulunmayan hastalarda literatürle uyumlu olarak daha yüksek oranda izlendi. EGFR mutasyonu, adenokarsinom tanılı olgularda yassı epitel hücreli karsinom tanılı olgulara göre, anlamlı olarak yüksek bulundu. KRAS mutasyonu ile cinsiyet farkı ve sigara içiciliği arasında anlamlı ilişki bulunamadı. KRAS mutasyonu, Adenokarsinom grubunda yassı epitel hücreli karsinom grubuna göre, anlamlı olarak yüksek bulundu. Her üç mutasyon varlığı ile tümör boyutu, lenf nodu metastaz varlığı, uzak metastaz varlığı ve hastalığın evresi arasında korelasyon görülmedi.

Anahtar Kelimeler: EGFR, KRAS, BRAF, mikroarray, akciğer kanseri.

8. ABSTRACT

DETERMINATION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR), KRAS and BRAF MUTATION IN NON SMALL CELL LUNG CANCERS USING BIOFILM CHIP BASED MICROARRAY TECHNOLOGY

In our study, 96 patients diagnosed with non-small cell lung cancer with biofilm chip-based microarray method (Infiniti Autogenomics[®]) in the identification of EGFR, KRAS and BRAF gene mutations. The relationship with smoking, patient gender, tumor type and stage of the disease in the Turkish population and mutations in these genes determine the frequency and reliability used to determine the specific of the method.

In our study, we have 96 patient with 58 cases were adenocarcinoma, 30 cases were squamous cell carcinoma, and 8 cases of them large-cell neuroendocrine carcinoma group. Grain of 58 patients with adenocarcinoma of 14 patients (24.1%) were detected EGFR mutations, and in 12 patients (20.6%) KRAS mutations were found. Only 1 out of 30 cases diagnosed with squamous cell carcinoma (3.3%) had KRAS mutation. In large cell neuroendocrine carcinoma group only 1 case of 8 cases (12.5%) had KRAS mutations.

EGFR mutation were higher in female gender patients with no history of smoking and consistent with the literature. EGFR mutations, patients diagnosed with adenocarcinoma were found to be significantly higher than in patients diagnosed with squamous cell carcinoma. KRAS mutation had no relationship between gender and smoking. In adenocarcinoma group KRAS mutation were found to be significantly higher than in squamous cell carcinoma group. With the presence of all three mutations was not observed between tumor size, lymph node metastasis, distant metastasis and stage of the disease.

Key words: EGFR, KRAS, BRAF, microarray, lung cancer.

9. KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics, CA Cancer J Clin 2011; 61: 69-90.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001; 94: 153-6.
3. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures; 2nd Edition 2008. Available at: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>. Pg 15.
4. Travis WD. Pathology of Lung Cancer. Clin Chest Med 2011; 32: 669-92.
5. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2012.
6. Miller Y. Pathogenesis of Lung Cancer 100 year report. Am J Respir Cell Mol Biol 2005; 33(3): 216-23.
7. Mitsudami T. Advances in target therapy for lung cancer JPN J Clin Oncol 2010; 40 (2): 101-6.
8. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. Febs Journal 2010; 277: 301-8.
9. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non small cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. Oncogene 2009; 24-31.
10. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and Gefitinib sensitivity in non small cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 643-55.
11. Dacic S. EGFR assays in lung cancer. Adv Anat Pathol 2008; 15: 241-7.
12. Okudela K, Woo T, Kitamura H. KRAS gene mutations in lung cancer: Particulars established and issues unresolved. Pathology International 2010; 60: 651-60.
13. Schmid K, Oehl N, Wrba F, Pirker C, Filipits M. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. Clin Cancer Res 2009; 15: 14.
14. Tsiatis A, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparisons of sanger sequencing, pyrosequencing and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations. Journal of Molecular Diagnostics 2010; 12: 4.

15. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths, *Cancer Statistics* 2011; 61(4): 212-36.
16. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet] Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
17. Mollahaliloğlu S, Başara BB, Eryılmaz Z. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2010, 1. Baskı, Ankara 2011; 25-9.
18. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(13): 1367–80.
19. Haiman CA, Stram DO, Wilkens LR. Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(4): 333–42.
20. Cote' ML, Kardia SL, Wenzlaff AS. Risk of lung cancer among white and black relatives of individuals with early-onset lung cancer. *JAMA* 2005; 293(24): 3036–42.
21. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2001; 31(2-3): 139-48.
22. Rosai J. Surgical Pathology, Volume one, Respiratory tract, Houston M, 10. edition, China, Mosby 2011; 366-90.
23. Tiwari RC, Ghosh K. A new method of predicting US and state level cancer mortality counts for the current calendar year. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 30-40.
24. Hessel PA, Gamble JF, McDonald JC. Asbestos, asbestosis, and lung cancer: a critical assessment of the epidemiological evidence. *Thorax* 2005; 60(5): 433-6.
25. Aronsson ME, Nilson PM. Socio-economic status and lung cancer risk including histologic subtyping-a longitudinal study. *Lung Cancer* 2006; 51(1): 21-9.
26. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barros-Dios JM. Diet and lung cancer: a new approach. *Eur J Cancer Prev* 2000; 9(6): 395–400.
27. Mahabir S, Forman MR, Dong YQ. Mineral intake and lung cancer risk in the NIH American Association of Retired Persons Diet and Health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(8): 1976–83.
28. Renehan AG, Tyson M, Egger M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371(9612): 569–78.
29. Turner MC, Chen Y, Krewski D. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(3): 285–90.

30. Wu CY, Hu HY, Pu CY, Huang N, Shen HC, Li CP, Chou YJ. Pulmonary tuberculosis increases the risk of lung cancer: a population-based cohort study. *Cancer* 2011; 117(3): 618-24.
31. Rezazadeh A, Laber DA, Ghim SJ. The role of human papilloma virus in lung cancer: a review of the evidence. *Am J Med Sci* 2009; 338(1): 64–7.
32. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Tymus and Hearth, Tumours of Lung, Lyon France 2004; 10-13.
33. Spiro SS, Gould MK, Colice GL. Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer: Symptoms, Signs, Laboratory Tests, and Paraneoplastic Syndromes, ACCP Evidenced-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition) *Chest* 2007; 132: 149-60.
34. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The New Lung Cancer Staging System, *Chest* 2009; 136: 260–71.
35. Jiang W, Kang Y, Shi GY, Zhang HY, Cai L, Sun XW et al. Comparisons of multiple characteristics between young and old lung cancer patients. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125(1): 72-80.
36. Nakamura H, Ando K, Shinmyo T, Morita K, Mochizuki A, Kurimoto N, et al. Female gender is an independent prognostic factor in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 17(5): 469-80.
37. Tomashefski FJ Jr, Connors AF Jr. Peripheral vs central squamous cell carcinomas of the lung. A comparison of clinical features, histopathology and survival. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 468-74.
38. Patel AM, Dunn WF. Staging systems of lung cancer. *Mayo Clinic Proc* 1993; 68: 475-82.
39. Kawase A, Yoshida J, Ishii G, Nakao M, Aokage K, Hishida T, et al. Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal? *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42(3): 189-95.
40. Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, et al. Pathological Vascular Invasion and Tumor Differentiation Predict Cancer Recurrence in Stage Ia Non-Small-Cell Lung Cancer After Complete Surgical Resection. *J Thorac Oncol* 2012; 7(8): 1263-70.
41. Lee CY, Byun CS, Lee JG, Kim DJ, Cho BC, Chung KY, et al. The prognostic factors of resected non-small cell lung cancer with chest wall invasion. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 9.
42. Froudarakis ME. Pleural effusion in lung cancer: more questions than answers. *Respiration* 2012; 83(5): 367-76.

43. Maeshima AM, Niki T, Maeshima A, Yamada T, Kondo H, Matsuno Y. Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma. *Cancer* 2002; 95(12): 2546-54.
44. Wisnivesky JP, Arciniega J, Mhango G, Mandeli J, Halm EA. Lymph node ratio as a prognostic factor in elderly patients with pathological N1 non-small cell lung cancer. *Thorax* 2011; 66(4): 287-93.
45. Nwogu CE, Groman A, Fahey D, Yendamuri S, Dexter E, Demmy TL, Miller A, Reid M. Number of lymph nodes and metastatic lymph node ratio are associated with survival in lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2012; 93(5): 1619-20.
46. Cedrés S, Torrejon D, Martínez A, Martinez P, Navarro A, Zamora E, Mulet-Margalef N, Felip E. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) as an indicator of poor prognosis in stage IV non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 2012, 1st ed: 872-5.
47. León-Atance P, Moreno-Mata N, González-Aragoneses F, Cañizares-Carretero MÁ, Poblet-Martínez E, Genovés-Crespo M, et al. Prognostic influence of loss of blood group A antigen expression in pathologic stage I non-small-cell lung cancer. *Arch Bronconeumol* 2012; 48(2): 49-54.
48. Miyake M, Taki T, Hitomi S, Hakomori S. Correlation of expression of H/Le(y)/Le(b) antigens with survival in patients with carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1992; 327(1): 14-8.
49. Solis LM, Behrens C, Raso MG, Lin HY, Kadara H, Yuan P, et al. Histologic patterns and molecular characteristics of lung adenocarcinoma associated with clinical outcome. *Cancer* 2012; 118(11): 2889-99.
50. Tan D, Li Q, Deeb G, Ramnath N, Slocum HK, Brooks J, et al. Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. *Hum Pathol* 2003; 34(6): 597-604.
51. Lockwood WW, Wilson IM, Coe BP, Chari R, Pikor LA, Thu KL, et al. Divergent genomic and epigenomic landscapes of lung cancer subtypes underscore the selection of different oncogenic pathways during tumor development. *PLoS One* 2012; 7(5): e37775.
52. Granone P, Cardillo G, Rumi E, D'Ugo D, Rumi C, Ciletti S, et al. DNA flow cytometric analysis in patients with operable non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7(7): 351-5.
53. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2005; 92(1): 131-9.

54. Wang H, Wang W, Wang X, Cai K, Wu H, Ju Q et al. Reduced N-Myc downstream-regulated gene 2 expression is associated with CD24 upregulation and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Med Oncol* 2012.
55. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J* 2001; 18(4): 705-19.
56. Tomizawa K, Suda K, Onozato R, Kosaka T, Endoh H, Sekido Y, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer* 2011; 74(1): 139-44.
57. Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol* 2013; 66(2): 79-89.
58. Wen J, Fu J, Zhang W, Guo M. Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Modern Pathology* 2011; 24: 932-43.
59. Vincenz B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Perrone G, Di Marino M. Cell cycle alterations and lung cancer. *Histopathol* 2006; 21(4): 423-35.
60. Soh J, Okumura N, Lockwood W, Yamamoto H, Shigematsu H, Zhang W, et. al. Oncogene Mutations, Copy Number Gains and Mutant Allele Specific Imbalance (MASI) Frequently Occur Together in Tumor Cells. *PLOS One* 2009; 4(10): e7464.
61. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic Implications of Cell Cycle, Apoptosis, and Angiogenesis Biomarkers in Non Small Cell Lung Cancer: A Review. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3974-86.
62. El-Zammar OA, Zhang S, Katzenstein AL. Comparison of FISH, PCR and immunohistochemistry in assessing EGFR status in lung adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic features. *Diagn Mol Pathol* 2009; 18(3): 133-7.
63. Ercan D, Zejnullahu K, Yonesaka K, Xiao Y, Capelletti M, Rogers A, et al. Amplification of EGFR T790M causes resistance to an irreversible EGFR inhibitor. *Oncogene* 2010; 29(16): 2346-56.
64. Angulo B, Conde E, Suárez-Gauthier A, Plaza C, Martínez R, Redondo P, et al. A comparison of EGFR mutation testing methods in lung carcinoma: direct sequencing, real-time PCR and immunohistochemistry. *PLoS One* 2012; 7(8): e43842.
65. Baloglu H. Mutasyon tarama teknikleri: KRAS, EGFR, BRAF mutasyon analiz tekniklerinin avantajları/dezavantajları. 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 19 Kasım 2011, İzmir. http://www.turkpath.org.tr/pdf/SMYRNA/19/hbaloglu_upk-2011.pdf
66. Özkara AH. Mutasyon tarama yöntemleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2003; 1: 47-53.
67. Bilitewski U. DNA microarrays: an introduction to the technology. *Methods Mol Biol* 2009; 509: 1-14.

68. Cruz C, Tanove L, Matthay R. Lung Cancer Epidemiology, Etiology and Prevention, Clin Chest Med 2011; 32: 605-44.
69. Rossell R, Felip E, Garcia-Campelo R, Balana C. The biology of non-small cell lung cancer: identifying new targets for rational therapy. Lung Cancer 2004; 46: 135-48.
70. Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2001; 34: 53-8.
71. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanakoulou D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic KRAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol 2008; 9(10): 962-72.
72. Pratils CA, Hanrahan AJ, Halilovic E, Persaud Y, Soh J, Chitale D, et al. Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer. Cancer Res 2008; 68(22): 9375-83.
73. Sun LN, Luan HL, Zang FL, Wang M, Dong N, Guo Y, et al. Relationship between EGFR and K-ras mutations and clinicopathological characteristics and response to erlotinib treatment in 301 Chinese patients with non-small cell lung cancer. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2010; 32(9): 667-70.
74. Chiosea S, Shuai Y, Cieply K, Nikiforova MN, Dacic S. EGFR fluorescence in situ hybridization-positive lung adenocarcinoma: incidence of coexisting KRAS and BRAF mutations. Hum Pathol 2010; 41(8): 1053-60.
78. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Moran T, Chmielecki J, Lin YL. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(31): E2127-33.
76. Rudin CM, Tang EA, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. Clin Cancer Res 2009; 15(18): 5646-61.
77. Tan YK, Wee TC, Koh WP. Survival among Chinese women with lung cancer in Singapore: a comparison by stage, histology and smoking status. Lung Cancer 2003; 40: 237-46.
78. Nordquist LT, Simon GR, Cantor A, Alberts WM, Bepler G. Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung. Chest 2004; 126: 347-51.
79. Toh CK, Gao F, Lim WT. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. J Clin Oncol 2006; 24: 2245-51.

80. Janjigian YY, McDonnell K, Kris MG. Pack years of cigarette smoking as a predictor of survival in 2013 patients with stage IIIb/IV non-small cell lung cancer (NSCLC) ASCO. Chicago, IL: The American Society of Clinical Oncology 2008; 425.
81. Baykara O, Tansarikaya M, Demirkaya A, Kaynak K, Tanju S, Toker A, et al. Association of epidermal growth factor receptor and K-Ras mutations with smoking history in non-small cell lung cancer patients. *Exp Ther Med.* 2013; 5(2): 495-8.
82. Kim HR, Ahn JR, Lee JG, Bang DH, Ha SJ, Hong YK, et al. The Impact of Cigarette Smoking on the Frequency of and Qualitative Differences in KRAS Mutations in Korean Patients with Lung Adenocarcinoma. *Yonsei Med J* 2013; 54(4): 865-74.
83. Subramanian J, Govidan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007; 25(5): 561-70.
84. Li C, Fang R, Sun Y, Han X, Li F, Gao B. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers. *Plos One* 2011; 6(11): 28204.
85. Sun Y, Ren Y, Fang Z, Li C, Fang R, Gao B, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol* 2010; 28(30): 4616-20.
86. Yang SY, Yang TY, Chen KC, Li YJ, Hsu KH, Tsai CR. EGFR L858R mutation and polymorphisms of genes related to estrogen biosynthesis and metabolism in never-smoking female lung adenocarcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2011; 17(8): 2149-58.
87. Wang F, Fu S, Tang T, Deng L, Zhang X, Li YZ, et al. Relationship between mutations of epidermal growth factor receptor gene and clinicopathologic features of non-small cell lung cancers. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011; 40(10): 664-6.
88. Feng Q, Li XH, Chen Z, He JS, Wang CX, Zhou LX, Xue WC. Epidermal growth factor receptor gene mutations and clinicopathologic correlation in 309 patients with non-small cell lung cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011; 40(10): 660-3.
89. Fan MJ, Li HG, Lü ZQ, Zhang HZ, Shen XM. Relationship of epidermal growth factor receptor gene mutations, clinicopathologic features and prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011; 40(10): 679-82.
90. Suda K, Tomizawa K, Mizuuchi H, Ito S, Kitahara H, Shimamatsu S, et al. Genetic and Prognostic Differences of Non-small Cell Lung Cancer between Elderly Patients and Younger Counterparts. *Aging Dis* 2012; 3(6): 438-43.
91. Riely GJ, Politi KA, Miller VA. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7232-41.
92. Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3908-14.
93. Marchetti A, Martella C, Felicioni L. 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: 857-5.

94. Murray S, Dahabreh IJ, Linardou HM, Manoloukos M, Bafaloukos D, Kosmidis P. Somatic mutations of the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor and tyrosine kinase inhibitor response to TKIs in non-small cell lung cancer: an analytical database. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 832–9.
95. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, Riely GJ, Chaft JE, Sima CS, et al. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol* 2012; 7(12): 1815-22.
96. Yeen TNS, Pathmanathan R, Shiran MS, Zaid FAA, Cheah YK. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in formalin fixed paraffin embedded biopsies in Malaysian non-small cell lung cancer patients. *J Biomed Sci* 2013; 20(1): 22.
97. Miyamae Y, Shimizu K, Hirato J, Araki T, Tanaka K, Ogawa H, et al. Significance of epidermal growth factor receptor gene mutations in squamous cell lung carcinoma. *Oncol Rep* 2011; 25(4): 921-8.
98. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. 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(4): 857-65.
99. Hata A, Katakami N, Yoshioka H, Kunimasa K, Fujita S, Kaji R, et al. How sensitive are epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors for squamous cell carcinoma of the lung harboring EGFR gene-sensitive mutations? *J Thorac Oncol* 2013; 8(1): 89-95.
100. Fiala O, Pesek M, Finek J, Benesova L, Bortlicek Z, Minarik M. Gene mutations in squamous cell NSCLC: insignificance of EGFR, KRAS and PIK3CA mutations in prediction of EGFR-TKI treatment efficacy. *Anticancer Res* 2013; 33(4): 1705-11.
101. Boch C, Kollmeier J, Roth A, Falkenau SS, Misch D, Grüning W, et al. The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open* 2013; 3(4): e002560.
102. Iyoda A, Travis W, Sarkaria IS, Jiang SX, Amano H, Sato Y, et al. Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma. *Exp Ther Med* 2011; 2(6): 1041–5.
103. De Pas TM, Giovannini M, Manzotti M, Trifirò G, Toffalorio F, Catania C, et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung harboring EGFR mutation and responding to gefitinib. *J Clin Oncol* 2011; 29(34): e819-22.

104. Araki K, Ishii G, Yokose T, Nagai K, Funai K, Kodama K, et al. Frequent overexpression of the c-kit protein in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2003; 40(2): 173-80.
105. Przygodzki RM, Finkelstein SD, Langer JC, Swalsky PA, Fishback N, Bakker A, et al. Analysis of p53, K-ras-2, and C-raf-1 in pulmonary neuroendocrine tumors. Correlation with histological subtype and clinical outcome. *Am J Pathol* 1996; 148(5): 1531-41.
106. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proc. Am Thorac Soc* 2009; 6(2): 201-5.
107. Miller VA, Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, et al. Smoking history and frequency of somatic KRAS mutations in adenocarcinoma of the lung. *Journal of Clinical Oncology* 2007 ASCO 25: 18.
108. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Dhananjay A. et al. Frequency and Distinctive Spectrum of KRAS Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5731.
109. Kriegshauser G, Fabjani G, Ziegler B, Zöchbauer-Müller S, End A, Zeillinger R. Detection of KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 2011; 12(12): 8530–8.
110. Paik P, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical Characteristics of Patients With Lung Adenocarcinomas Harboring BRAF Mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29(15): 2046–51.
111. Sasaki H, Shitara M, Yokota K, Okuda K, Hikosaka Y, Moriyama S, et al. Braf and erbB2 mutations correlate with smoking status in lung cancer patients. *Exp Ther Med* 2012; 3(5): 771–5.
112. Jancik S, Drabek J, Berkovcova J, Xu YZ, Stankova M, Klein J, et al. A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 79.
113. French D, Smith A, Powers MP, Wu AH. KRAS mutation detection in colorectal cancer by a commercially available gene chip array compares well with Sanger sequencing. *Clin Chim Acta* 2011; 412 (17-18): 1578-81.