



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ
OLGULARINDAN SORUMLU GEN MUTASYONLARININ
LİKİT BİYOPSİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

Cemal Çağrı ÇETİN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr.Üyesi Muhammet Yusuf TEPEBAŞI

Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-8346'nolu proje ve YÖK 100/2000
“Moleküler Onkoloji” Tematik Alanında Doktora Burs Programı ile
desteklenmiştir.

ISPARTA-2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:29/08/2023

Danışman : Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Faköltesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Üye : Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Faköltesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Üye : Prof. Dr. Önder ÖZTÜRK
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Faköltesi Dahili Tıp-Göğüs
Hastalıkları A.B.D

Üye : Doç. Dr. Esin SAKALLI ÇETİN
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Tıp Faköltesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Üye : Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Edebiyat Faköltesi Moleküler Hücre
Biyolojisi A.B.D.

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

“KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ OLGULARINDAN SORUMLU GEN MUTASYONLARININ LİKİT BİYOPSİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Cemal Çağrı ÇETİN

İmza

Danışman

Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR

İmza

İkinci Danışman

Dr. Öğr.Üyesi Muhammet Yusuf TEPEBAŞI

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamın oluşmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren, deneyimlerini benimle paylaşan doktora tez danışmanım Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Siz olmadan bu başarıyı elde edemezdim. Her adımda yanımda olan, sabırla benimle ilgilenen ve her zaman desteklerini esirgemeyen sizin gibi değerli bir danışmana, en önemlisi dostluğunuza sahip olduğum için derin minnettarlık duyuyorum.

Ayrıca kıymetli zamanını bana ayıran ve tezimde bana desteğini esirgemeyen ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Yusuf TEPEBAŞI'na teşekkür ederim.

Yazıma devam edeceğim diğer bir kişinin Tıbbi Biyoloji A.B.D. Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na olmasını istiyorum. Akademik başarısının yanı sıra, kendisi bölümümüzün neşe kaynağıdır. Evet öyledir! Neşe dolu karakteri ile de bize büyük ilham olduğunu belirtmek istiyorum. Doktora süreci gerçekten stresli bir dönem, bu eğitimi alan değerli hocalarım ne demek istediğimi bilirler. İşte en zor ve sıkıntılı böyle zamanlarımızda, yüzümüzü güldüren, moral ve motivasyon kaynağımız olmuştur. Ayrıca doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli eşi Prof. Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na minnettarlığımı belirtmek isterim. Siz değerli hocalarım ile fikirlerimi tartışmak, benim için büyük bir ayrıcalık ve değerli bir deneyim olmuştur. Bu doktora sürecimde sizin dostluğunuzu da kazanmak, benim için tartışmasız en güzel şeydi. Her şey için çok teşekkür ederim.

Çalışmamızın klinik kısmında kendisini tanıma fırsatını yakaladığım Göğüs Hastalıkları A.B.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Önder ÖZTÜRK'ün bize sağladığı klinik imkanları tartışmasız tez çalışmamızın temel dayanaklarını oluşturdu Kendisiyle yaptığımız görüşmeler ve veriler üzerine tartışmalarımız sonuçlarımızın daha doğru bir şekilde yorumlanmasına olanak sağladı. Hocamızın değerli katkıları sayesinde, araştırmamız daha anlamlı ve kapsamlı bir şekilde sonuçlandı. Tüm emekleriniz için çok teşekkür ederim.

Ayrıca klinik verilerinin değerlendirilmesinde bir diğer emeği olan Onkolog Uzman Dr. Erkan KAYIKÇIOĞLU'na;

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e, Prof. Dr. Nilgün GÜRBÜZ, Öğr. Görevlisi Dr. İbrahim ONARAN'a

Gelecekteki bilim hayatında çok başarılı olacağına inandığım bölümümüzün değerli doktora öğrencileri Esmâ SELÇUK ile Didem KAHRAMAN'a, Zeynep AKPINAR

Lisans eğitimizden doktora eğitimimizin sonuna kadar bu yolda beraber ilerlediğim, kardeşlerim kadar değerli olan ERGİN TURANTEPE'ye çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen haklarını asla ödeyemeyeceğimi düşündüğüm anneme, babama ve kardeşlerime minnet ve şükranlarımı sunarım.

Son olarak akademik kariyerimin başlangıcı olan yüksek lisans danışmanım Prof. Dr. Mehmet Faruk GÜRBÜZ'e çok teşekkür ederim. Doktora tezimde adınızı anarak tekrardan size olan minnettarlığımı belirtmek istedim.

Bu satırlarda teşekkür edemediğim, üzerimde ve tezimde emeği olan herkese, sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Moleküler Onkoloji öncelikli alanda doktora eğitimim süresi boyunca bana YÖK 100/2000 Doktora Bursu kapsamında destek sağlayan Yükseköğretim Kuruluna; ayrıca tezime, maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje numarası: TDK-2021-8346) teşekkür ederim.

Cemal Çağrı ÇETİN

ISPARTA, 2023

ÖZET

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgularından Sorumlu Gen Mutasyonlarının Likit Biyopsi Yöntemi ile Araştırılması

Kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinen sürücü genler, hücrelerin büyümesi, yayılması ve tedaviye direnci gibi kritik süreçleri kontrol etmektedir. Akciğer kanserinde uygulanan hedefe yönelik tedaviler de sürücü genlere özgü inhibitör ilaçlarla etkili olabilmektedir. Tüm dünyada genomik değişikliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılmaya başlanan; hızlı, noninvaziv ve tekrarlanabilir bir yöntem olan likit biyopsi ile, SDÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tanısı konulan ve kemoterapi almamış hastalarda 31 gen içeren yeni nesil dizileme (NGS) ticari kiti panel şeklinde taranarak mutasyonların sıklık ve dağılımının belirlenerek; patojenitesinin, klinik parametreler ile ilişkisinin ve genel sağ kalım açısından öneminin saptanması amaçlandı. Lokal ve ileri evredeki 24 hastanın dahil edildiği çalışmamızda, NGS ile ONCO/Reveal cfDNA Multi-Kanser Panelini kullanarak doku biyopsisine alternatif bir yöntem olan likit biyopsi analizi gerçekleştirildi. Histopatolojik olarak %33,3'ü adenokarsinom, %66,7'si skuamöz hücreli karsinom alt tipinine sahip hastaların %91,67'sinin (22/24) erkek ve yaş ortalamasının $65,6 \pm 7,7$ olduğu belirlendi. Olguların %45,83'ünde (11/24) gen paneline ait herhangi bir varyasyon saptanamazken, geri kalan olguların %54,16'sının (13/24) ise en az bir mutasyona sahip olduğu belirlendi. Hastalarımızın hiçbirinde *BRAF*, *ROS1*, *CTNNB1* genlerine ait mutasyon tespit edilemedi. Ayrıca evre III'de olan hastalarda *NTRK3*, *SMAD4*, *IDH1*, *PPP2R1A* ve evre IV'de olan hastalarda *AKT1*, *ESR1*, *MET* genlerine ait mutasyon tespit edilemedi. Bunun yanı sıra *PDGFRA*, *ALK*, *TP53* genlerine ait mutasyonların hastalığın kötü prognozu üzerine etkisinin olduğu belirlendi. Sonuç olarak, etkili tedavi ancak doğru tanı ile gerçekleştirilebilir. Bu yüzden ctDNA testi KHDAK'nin klinik yönetimine dahil edilmesi ve anatomik evrelemeye alternatif olarak, moleküler evreleme modelinin oluşturulması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: KHDAK, Likit biyopsi, cfDNA, NGS, ONCO/Reveal cfDNA Multi-Kanser Paneli

ABSTRACT

Investigation of Responsible Gene Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer Cases with Small Cell Histology Using Liquid Biopsy Method

Known as driver genes, which play a significant role in cancer development, control critical processes like cell growth, spreading, and treatment resistance. Targeted therapies in lung cancer, too, can be effective by using inhibitor drugs specific to these driver genes. Globally, for detecting genomic alterations, liquid biopsy, a rapid, non-invasive, and repeatable method, has gained popularity. In a study conducted at SDU Faculty of Medicine Hospital, liquid biopsy was utilized as an alternative to tissue biopsies to analyze mutations in a panel of 31 genes, including patients diagnosed with non-small cell lung cancer (NSCLC) who hadn't received chemotherapy. Among the 24 patients in various stages included in the study, utilizing NGS (Next Generation Sequencing) and the ONCO/Reveal cfDNA Multi-Cancer Panel, liquid biopsy analysis was carried out. Histopathologically, 33,3% had adenocarcinoma and 66,7% had squamous cell carcinoma subtype. Of these, 91,67% (22/24) were male, with an average age of $65,6 \pm 7,7$. While 45,83% (11/24) of cases showed no variations in the gene panel, the remaining 54,16% (13/24) exhibited at least one mutation. No mutations were detected in the *BRAF*, *ROS1*, and *CTNNB1* genes among the patients. Additionally, no mutations were found in the *NTRK3*, *SMAD4*, *IDH1*, *PPP2R1A* genes in stage III patients, nor in the *AKT1*, *ESR1*, *MET* genes in stage IV patients. Furthermore, it was observed that mutations in *PDGFRA*, *ALK*, and *TP53* genes were associated with a poor prognosis. In conclusion, effective treatment hinges on accurate diagnosis. Therefore, it is recommended to integrate ctDNA testing into NSCLC clinical management and establish a molecular staging model as an alternative to anatomical staging.

Keywords: NSCLC, Liquid biopsy, cfDNA, NGS, ONCO/Reveal cfDNA Multi-Cancer Panel

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri.....	3
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Risk Faktörleri.....	4
2.2. Akciğer Kanseri Histopatolojisi	7
2.2.1 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri.....	7
2.2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	8
2.3. Akciğer Kanseri Tanı Yöntemleri	11
2.4. Akciğer Kanseri Evreleme	13
2.5. Akciğer Kanseri Hastalarının Performans Durumu	16
2.6. Akciğer Kanseri Tedavisi.....	17
2.7. Akciğer Kanseri Moleküler Tedavisi	19
2.8. KHDak İçin Güncel Moleküler Testler	21
2.9. Akciğer Kanseri Moleküler Patogenezi.....	22
2.9.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü	22
2.9.2. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1	24
2.9.3. Mezenşimal Epitelyal Dönüştürücü	25
2.9.4. Anaplastik Lenfoma Kinaz.....	25
2.9.5. ROS Proto-Onkogen 1	26
2.9.6. Kirsten Sıçan Sarkoma 2 Viral Onkogen Homolog	27
2.9.7. Nöroblastoma RAS Viral Onkogen Homolog	28
2.9.8. V-Raf Murin Sarkom Viral Onkogen Homolog B.....	29
2.9.9. TP53	29

2.9.10. PI3K/AKT/mTOR.....	30
2.9.11. Fosfataz ve Tensin Homoloğu.....	32
2.10. Likit Biyopsi.....	33
2.10.1. Hücre Dışı DNA'nın Keşfi.....	33
2.10.2. Hücre Dışı DNA'nın Doku Kökeni	35
2.10.3. Dolaşıma CfDNA ve Alt Fraksiyonlarının Salınımının Mekanizmaları	35
2.10.4. CfDNA'nın Klirensi.....	36
2.10.5. Akciğer Kanseri Likit Biyopsinin Klinik Önemi	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Çalışma Onayı.....	40
3.2. Hasta Seçimi.....	40
3.3. CfDNA İzolasyonu İçin Plazma Ayrımı	40
3.4. CfDNA İzolasyonu Uygulama Protokolü	41
3.5. Kütüphane Hazırlama Protokolü.....	42
3.6. Linear PCR: High Fidelity Linear Amplification	43
3.7. Linear PCR Ürününün Pürifikasyonu	45
3.8. Pürifikasyon Aşaması.....	45
3.9. Exponential PCR: High Fidelity Exponential Amplification.....	47
3.10. Exponential PCR ürünün saflaştırılması	48
3.11. Indexing PCR: Amplify the Libraries	49
3.12. Kütüphanenin Pürifikasyonu.....	52
3.13. Yeni Nesil Sekanslama.....	53
3.14. Saflaştırılmış Kütüphanenin Qubit Ölçümü.....	53
3.15. Varyantların Protein Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Araçlar	54
3.15.1. SIFT.....	54
3.15.2. I Mutant 2.0	54
3.15.3. PolyPhen-2	55
3.16. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	109
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	145
KAYNAKLAR.....	147
EK A. ETİK KURUL KARARI.....	174
ÖZGEÇMİŞ.....	175

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. TNM Evrelemesinin N Faktörü Tanımlayıcıları.....	13
Tablo 2.2. TNM Evrelemesinin M Faktörü Tanımlayıcıları	13
Tablo 2.3. 2021 Dünya Sağlık Örgütü Torasik Malign Epitelial Tümörler ve Prekürsörlerinin Sınıflandırması	14
Tablo 2.4. TNM Evrelemesinin T Faktörü Tanımlayıcıları	15
Tablo 2.5. TNM'ye Göre Evre Grupları	16
Tablo 2.6. Eastern Oncology Cooperative Group Performans Skalası	16
Tablo 3.1. Linear PCR Master Mix Hazırlanması.....	44
Tablo 3.2. Linear PCR Master Mix Seyreltilmiş DNA Eklenmesi	44
Tablo 3.3. Thermal-Cycler'da PCR Protokolü.....	44
Tablo 3.4. Exponential PCR Master Mix Hazırlanması.....	47
Tablo 3.5. Saflaştırılmış Lineer PCR Ürününe Master Mix Ürünün Eklenmesi.....	47
Tablo 3.6. Thermal Cycler'da PCR Protokolü	48
Tablo 3.7. Forward ve Reverse İndeksleme Primeri Ürünü ve Hacimleri	50
Tablo 3.8. High Fidelity PCR Master Mix Hazırlanması.....	51
Tablo 3.9. High Fidelity PCR Master Mix'e İndeksleme Primerlerinin Eklenmesi .	51
Tablo 3.10. Exponential PCR ürününe İndeks PCR Master Mix'in Eklenmesi	51
Tablo 3.11. Thermal Cycler'da PCR Protokolü	52
Tablo 4.1. KRAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları.....	60
Tablo 4.2. NRAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları.....	63
Tablo 4.3. HRAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları.....	65
Tablo 4.4. ARAF Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları.....	67
Tablo 4.5. EGFR Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	68
Tablo 4.6. ErbB2-3 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	71
Tablo 4.7. FGFR2 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	73
Tablo 4.8. PDGFRA Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları ...	75
Tablo 4.9. PIK3CA Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	77
Tablo 4.10. TP53 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları.....	79
Tablo 4.11. FBXW7 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları....	81
Tablo 4.12. KIT Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları.....	83
Tablo 4.13. GNAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	85
Tablo 4.14. ALK Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	87

Tablo 4.15. PTEN Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	89
Tablo 4.16. IDH1-2 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları.....	90
Tablo 4.17. Diğer Gen Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları	92
Tablo 4.18. Takibe Alınan Hastaların Klinik Verileri.....	94
Tablo 4.19. Histopatolojik Tanıya Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	99
Tablo 4.20. Yaş Kategorisine Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	100
Tablo 4.21. Evre Dağılımına Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	101
Tablo 4.22. Genel Evreye Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	102
Tablo 4.23. Birden Fazla Mutasyon Varlığına Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	103
Tablo 4.24. PDGFRA İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	104
Tablo 4.25. ALK İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	105
Tablo 4.26. EGFR İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	106
Tablo 4.27. KRAS İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	107
Tablo 4.28. TP53 İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İleri Evre KHDAK'da Test Algoritması	21
Şekil 2.2. İnsan LUAD'ında KRAS Mutasyonlarının Sıklığı	28
Şekil 3.1. ONCO/Reveal PillarHS Multi-Cancer Panel Kütüphane Hazırlığı.....	43
Şekil 3.2. ONCO/Reveal PillarHS Multi-Cancer Panel İndeksleme Primerleri.....	50
Şekil 3.3. Polphen 2 Skalası.....	55
Şekil 4.1. Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı	56
Şekil 4.2. Hastalarının Yaşa Göre Dağılımı.....	56
Şekil 4.3. Histopatolojik Tanının Evrelere Göre Dağılımı	57
Şekil 4.4. KHDAK Mutasyonların Evrelere Göre Dağılımı.....	58
Şekil 4.5. Başvuru Anında Metastatik Odaklara Göre Dağılımı	59
Şekil 4.6. KRAS Geni Saptanan Varyasyonlar.....	61
Şekil 4.7. NRAS Geni Saptanan Varyasyonlar.....	64
Şekil 4.8. HRAS Geni Saptanan Mutasyonlar	66
Şekil 4.9. ARAF Geni Saptanan Varyasyonlar.....	67
Şekil 4.10. EGFR Geni Saptanan Varyasyonlar	69
Şekil 4.11. ErbB Geni Saptanan Varyasyonlar.....	72
Şekil 4.12. FGFR2 Geni Saptanan Varyasyonlar	74
Şekil 4.13. PDGFRA Geni Saptanan Varyasyonlar.....	76
Şekil 4.14. PIK3CA Geni Saptanan Varyasyonlar	77
Şekil 4.15. TP53 Geni Saptanan Varyasyonlar.....	80
Şekil 4.16. FBXW7 Geni Saptanan Varyasyonlar.....	82
Şekil 4.17. KIT Geni Saptanan Varyasyonlar.....	84
Şekil 4.18. GNAS Geni Saptanan Varyasyonlar	86
Şekil 4.19. ALK Geni Saptanan Varyasyonlar	88
Şekil 4.20. PTEN Geni Saptanan Varyasyonlar	89
Şekil 4.21. IDH Geni Saptanan Varyasyonlar	91
Şekil 4.22. Diğer Saptanan Varyantlar	93
Şekil 4.23. Histopatolojik Tanının Durumuna Göre Sağkalım Grafiği	99
Şekil 4.24. Yaş Durumuna Göre Sağkalım Grafiği	100
Şekil 4.25. Evre Durumuna Göre Sağkalım Grafiği.....	101
Şekil 4.26. Genel Evre Durumuna Göre Sağkalım Grafiği	102

Şekil 4.27. Birden Fazla Mutasyon Varlığı ve Sağ Kalım İlişkisi.....	103
Şekil 4.28. PDGFRA Durumuna Göre Sağ Kalım Grafiği.....	104
Şekil 4.29. ALK Mutasyon Varlığına Göre Sağ Kalım İlişkisi	105
Şekil 4.30. EGFR Durumuna Göre Sağkalım Grafiği	106
Şekil 4.31. KRAS durumuna göre sağkalım grafiği	107
Şekil 4.32. TP53 Durumuna Göre Sağkalım Grafiği.....	108



KISALTMALAR DİZİNİ

µl	: Mikrolitre
AAK	: Akciğer Adenokarsinom
ACMG	: Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji
AIS	: Adenokarsinoma in situ
BRAF	: V-Raf murin sarkom viral onkogen homolog B
BAD	: Hücre ölümü antagonisti
BRAF	: V-Raf murin sarkom viral onkogen homolog B
cfNA	: Plazmada dolaşan hücresiz nükleik asit
COVID	: Koronavirüs hastalığı
CTCs	: Dolaşımdaki tümör hücreleri
ctDNA	: Dolaşımdaki tümör DNA
ctRNA	: Dolaşımdaki RNA
DBD	: DNA bağlanma alanı
ddPCR	: Droplet Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DDR	: Discoidin domain reseptör
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EB	: Elution Buffer
EBUS	: Endobronşiyal ultrason
EUS	: Endoskopik ultrason
ECOG PS	: Eastern Oncology Cooperative Group Performans Skalası
EMT	: Epitelyalden mezenkimal geçiş
EML-4	: Echinoderm mikrotübül ile ilişkili protein benzeri 4
ERBB2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
ESMO	: Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği
EV	: Hücre dışı veziküller
FNA	: Transbronşiyal ince iğne aspirasyonu
GAP	: GTPaz Aktive eden Protein
GEF	: Nükleotid Değişim Faktörleri
GIST	: Gastrointestinal stromal tümör
GPCR	: G protein bağımlı reseptörler
GSK	: Genel Sağ Kalım

HRAS	: Harvey rat sarkoma viral onkogen homolog
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
IHC	: İmmünohistokimyasal
IASLC	: Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği
IDH	: İzositrat dehidrojenaz
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücre dışı akciğer kanseri
KT	: Kemoterapi
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KRAS	: Kirsten sıçan sarkoma 2 viral onkogen homolog
KRT	: Kemoradyoterapi
MDM2	: p-53 bağlayıcı protein
MET	: Mezenşimal epitelyal dönüştürücü
miRNA	: MikroRNA
MIA	: Minimal invaziv adenokarsinom
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
Mut	: Mutasyon
NCCN	: Ulusal kapsamlı kanser ağı
ncRNA	: Kodlamayan RNA
NFκB	: Nükleer Faktör Kappa-B
nM	: Nanomolar
NNK	: Nikotin türevi nitrozamin keton
NRAS	: Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog
PFS	: Uzun hastalıksız sağkalım
PIP3	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatın
PİVAT	: Pillar Varyant Analiz Araç Seti
PolyPhen-2	: Polimorfizm Fenotiple v2
PRT	: Palyatif RT
PK	: Proteinaz K
pM	: Pikomolar
PS	: Progresyonsuz sağkalım
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homoloğu
SES	: Sosyoekonomik statü

SF3B1	: Splicing Factor 3b Subunit 1
SBRT	: Stereotaktik vücut radyoterapisi
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SIFT	: Sorting Intolerant From Tolerant
T	: Tümör
TKİ	: Tirozin kinaz inhibitörü
UTR	: 3' translasyon olmayan bölge
VUS	: Klinik önemi bilinmeyen varyant
WB I	: Yıkama tamponu



1.GİRİŞ

Akciğer kanseri; nokta mutasyon, amplifikasyon, insersiyon, delesyon ve translokasyon gibi birçok genetik ve epigenetik değişikliklerin etkisiyle, özellikle büyümeyi teşvik eden yolların aktivasyonunun ve tümör süpresör yollarının inhibisyonunun dahil olduğu çok adımlı bir süreç sonrası gelişir (1)

Akciğer kanserlerinin histopatolojik olarak iki ana formu bulunmaktadır. Bu formlar %15-20 oranıyla küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve en sık ve yaygın gözlenen formu olan %80-85 oranıyla küçük hücre dışı akciğer kanseridir (KHDAK) (2). KHDAK hastalarında, alt tiplerinden en sık görülen adenokarsinoma (AAK) ve skuamöz hücreli kanser (ASHK)'dir (1). Küresel kanser araştırmaları ve istatistiklerine göre dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olan akciğer kanseri, şiddeti her geçen gün artan bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. 2020 yılında dünya çapında tahmini yeni akciğer kanseri vakası sayısı 2.206,771 olup, 1.796,144 ölümün akciğer kanserine bağlı olduğu tahmin edilmektedir. 2020 yılı küresel tahminlerine göre tüm kanser türleri arasında akciğer kanseri insidansı %11,4, ölüm oranı ise %18 ile ilk sırada yer almaktadır (3) Tüm akciğer kanserlerinin 5 yıllık sağkalım oranı %19'dur. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri için 5 yıllık sağkalım oranı %23 iken, KHAK için %9'dur (4).

Günümüzde en yüksek mortaliteye sahip kanser tipi olan akciğer kanseri insidansı ve moleküler yapısı açısından toplumdan topluma farklılıklar göstermektedir. Sessiz seyretmesi sebebiyle genellikle ileri evrelerde tespit edilmesinden dolayı tedavi başarısı son derece düşük olmaktadır. Son yıllarda tümör dokusundaki genetik değişikliklerin tespit edilmesi ve bu değişiklikler sonucu oluşan onkoproteinlere karşı baskılayıcı moleküllerin kullanılmasıyla tedavide ilerlemeler kaydedilmiştir. Görülme sıklığı açısından toplumlar arası farklılıklar gösteren bu genetik değişiklikler aynı baskılayıcı moleküllere karşı farklı cevaplar verebilmektedir. Akciğer kanserinde moleküler markerlar hedeflenmiş tedavilere yanıtta önemli belirleyiciler haline gelmiş ve son zamanlarda hastaya ait tümör dokularında moleküler patolojiye dayalı en iyi tedavi seçeneklerinin belirlenmesi önem kazanmaya başlamıştır (5).

Doku biyopsisi tümör genotiplemesinde altın standart olmasına rağmen gerek doku materyalinin azlığı, gerekse tümör heterojenitesinden dolayı ilaç direncine yol açan mutasyonları göstermekte eksik kalabilmektedir (6). İlginç bir şekilde, ctDNA, tedavinin baskısına yanıt olarak dinamik klonal ve alt klonal evrimi izlemek için kullanılabilir (7). Likit biyopsi, vücut sıvılarında prognostik veya diyagnostik olarak anlamlı tümör kaynaklı belirteçleri saptamak için minimal invaziv bir yaklaşımdır (8). Likit biyopsi analizi kanser araştırmalarında hızla ilerleyen bir alandır. Kanser hastalarında erken tanı ve tedavi süreçlerinin izlenmesinde, metastatik relaps veya metastatik progresyon, gerçek zamanlı risk tahmini, tedavi hedeflerinin belirlenmesi ve dirençliliği gibi konularda yol göstericidir (9).

Kanserde etkili tedavi ancak doğru tanı ile gerçekleşebilmektedir. Ancak günümüzde uygulandığı gibi, sadece evreleme bilgilerine dayalı olarak hastaların prognozunun takibi ve tedavi sürecinin belirlenmesi yeterli olmayabilir. Kanser hücrelerindeki genetik değişikliklerin ve özellikle sürücü gen mutasyonlarının belirlenmesi, hastalık prognozunun daha iyi tahmin edilebilmesi ve tedavinin kişiselleştirilebilmesi için yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, kanser gelişiminde rol oynadığı bilinen 31 gene (*AKT1*, *BRAF*, *ERBB3*, *GNAS*, *KIT*, *NRAS*, *PIK3CA*, *SF3B1*, *ALK*, *CTNNB1*, *ESR1*, *HRAS*, *KRAS*, *NTRK1*, *PPP2R1A*, *SMAD4*, *APC*, *EGFR*, *FBXW7*, *IDH1*, *MAP2K1*, *NTRK3*, *PTEN*, *TP53*, *ARAF*, *ERBB2*, *FGFR2*, *IDH2*, *MET*, *PDGFRA*, *ROS1*) ait varyantlar, KHDAK tanısı almış fakat henüz kemoterapi almamış 24 hastada yeni nesil dizileme ticari kiti ONCO/Reveal Multi-Cancer cfDNA Paneli kullanarak incelendi. Hızlı, noninvaziv ve tekrarlanabilir bir yöntem olması nedeniyle genomik değişikliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılmaya başlanan likit biyopsi yöntemi ile elde edilen örneklerde var olduğu belirlenen mutasyonların sıklık ve dağılımı ile patojenite durumu belirlendi. Ayrıca tespit edilen mutasyonların cinsiyet, hastalığın ortaya çıkış yaşı, histopatolojik tip, evre, metastaz odak sayısı ve genel sağkalım ile ilişkisi değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji

Yirminci yüzyılın ortalarından itibaren akciğer kanseri, özellikle sigara kullanımının artmasıyla halk sağlığını tehdit eden, önemli mortalite ve morbiditeye neden olan bir hastalık haline gelmiştir (10). 2020 yılında kanser tanı ve tedavisi, koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) pandemisinden olumsuz etkilenmiştir. Küresel olarak sağlık tesislerinin kapanması ve halkın COVID-19'a maruz kalma korku psikolojisi içinde olması teşhis ve tedavide gecikmelere neden oldu. Sonucunda kanser insidansında kısa vadeli bir düşüşe, ardından ileri evre hastalıkta bir artışa ve nihayetinde artan mortaliteye sebebiyet vermiştir (11).

2020 yılında dünya çapında tahmini yeni akciğer kanseri vakası sayısı 2.206,771 olup, 1.796,144 ölümün akciğer kanserine bağlı olduğu tahmin edilmektedir. 2020 yılı küresel tahminlerine göre kanser türleri arasında akciğer kanseri insidansı %11,4, ölüm oranı ise %18 ile ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri erkeklerde kanser morbidite ve mortalitesinin önde gelen nedeni iken, kadınlarda meme ve kolorektal kanserden sonra insidans açısından üçüncü, mortalite açısından meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (12).

Amerika'da 2022 yılında 1,9 milyon kişinin kansere yakalanacağı ve 609,360 kişinin kanserden öleceği ve bu ölümlerin yaklaşık beşte birinin akciğer kanserine bağlı olacağı tahmin edilmektedir. 130,180 akciğer kanseri ölümünün yaklaşık 105,840'ına (%81) doğrudan sigara içenlerde görüleceği, 3650'si pasif içicilikten kaynaklanmış olacağı tahmin edilmiştir. En fazla ölüm erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektum, kadınlarda ise akciğer, meme ve kolorektum kanserlerinden kaynaklanmaktadır. 2050 yılında ise, akciğer kanserinin küresel yükünün her yıl 3,8 milyon yeni vakaya ve 3,2 milyon ölüme ulaşacağı tahmin ediliyor (13).

GLOBOCAN 2020 veri tabanına göre; dünya genelinde erkeklerde akciğer kanserinin insidans oranlarına baktığımızda yüksekten azalışa doğru sırasıyla, Mikronezya/Polinezya, Doğu ve Güney Avrupa, Doğu Asya ve Batı Asya olarak

devam etmektedir. Özellikle Batı Asya içerisinde erkeklerde Türkiye, kadınlarda ise doğu Avrupa içerisinde Macaristan en yüksek insidansa sahiptir (12). Türkiye’de ise, 2020 yılında yeni teşhis konulan hasta sayısı 233.834 olarak tahmin edilmektedir. Kansere bağlı ölüm sayısı ise 126.335’tir. Ülkemizde en sık rastlanan kanser türü olan akciğer kanseri 41.264 (%17,6) sayısı ile ilk sırada yer alırken, ikinci sırada 24.174 (%10,3) oranla meme kanseri, üçüncü olarak da 21.191 (%9,1) oranla kolorektal kanser olarak bildirilmiştir (3).

2.1.2. Risk Faktörleri

Akciğer kanseri için risk, kanser genetiğindeki gelişmeler, immünolojik kontrol ve tedavi seçenekleri konusundaki ilerlemelere rağmen, kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam ediyor. Tütün içimi, akciğer kanseri gelişimi için baskın risk faktörüdür. Tütün dışı risk faktörleri arasında çevresel ve mesleki maruziyetler, kronik akciğer hastalığı, akciğer enfeksiyonları ve yaşam tarzı faktörleri yer alır (14). Bu faktörlerin oynadığı roller coğrafi konum, cinsiyet ve ırk özellikleri, genetik yatkınlık ve sinerjistik etkileşimlerine bağlı olarak değişir (14,15).

2.1.2.1. Tütün Kullanımı

Tütün kullanımı tartışmasız en önemli ve yaygın akciğer kanseri risk faktörüdür. Tütün dumanı, en az 69 kanıtlanmış kanserojen ve önemli hastalıklarla ilişkili diğer toksik maddeler dahil olmak üzere 4.000’den fazla kimyasal içerir. Sigara içenlerin sadece yaklaşık %15’i akciğer kanserine yakalansa da Amerika Birleşik Devletleri’nde akciğer kanseri teşhislerinin %80 ile %90’ı tütün kullanımına bağlanmaktadır. Akciğer kanserinin göreceli riskinin, ömür boyu hiç sigara içmemiş birine göre yaklaşık 20 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir ve akciğer kanseri riskinin büyüklüğü, sigara içme yoğunluğuyla ilişkilidir (4).

Tütün dumanındaki birçok faktör akciğer kanserine katkıda bulursa da temel bileşen olan nitrozamin 4-(metilnitro-samino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK, nikotin türevi nitrozamin keton) karsinogenezde önemli bir rol oynar. Tütün dumanındaki en kanserojen moleküller iki gruba aittir: i) polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve ii)

nitrozaminler. Her ikisi de akciğer tümörigenezi ile önemli bir ilişki göstermiş olsa da nitrozaminler dikkate değer ölçüde daha büyük bir etkiye sahiptir. Spesifik olarak, tütün dumanı üzerine yapılan çalışmalar, NNK'nin akciğer karsinogenezinden sorumlu en güçlü bileşen olduğunu doğrulamıştır (16). Aktivasyonları sonucunda DNA eklentilerinin oluşumuna ve gen metilasyonuna, DNA dizisi değişikliklerine, DNA segment amplifikasyonuna ya da delesyonuna, tüm kromozom kazanımlarına ya da kayıplarına yol açar (15).

2.1.2.2. Mesleki ve Çevresel Karsinojenler

Akciğer karsinojenleri olduğu önerilen veya kanıtlanan mesleki maruziyetler arasında arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterler, krom, nikel, radon, silika ve vinil klorür bulunur. Mesleki karsinojen maruziyeti, akciğer kanserinin %5 ile %10'undan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bunlar arasında en yaygın olanı asbest maruziyetidir. Doğal olarak oluşan bir silikat minerali olan asbestin amfibol (amosit, krosidolit, trenolit) ve serpantin (krizotil) alt tipleri bulunmakta olup, asbestin inşaatlarda kullanımı 19. yüzyıldan beri devam etmektedir (14,17). Havaya saçılan liflerin solunmasıyla solunum yollarına ulaşan liflerin çoğu akciğer dokusunda birikir. Bunun sonucunda asbeste bağlı benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) hastalıklar meydana gelir. Bening hastalıklara kalsifiye plaklar, paryetel plevrada hyalinize plaklar, perikard hastalıkları ve benign akciğer hastalıkları olarak belirtilirken; ölümle sonuçlanabilen malign hastalıklar ise Mezotelyoma veya Akciğer Kanseri'dir. Mezotelyoma Türkiye'de en sık rastlanan kanser türlerindendir (18). Akciğer kanseri için göreceli risk tek başına asbest maruziyeti ile 6 kat, tek başına sigara içimi ile 11 kat, ancak hem asbest hem de sigara dumanına maruz kalma ile artış 59 kat kadar yüksek olabilir (14).

2.1.2.3. Diğer Faktörler

Cinsiyet akciğer kanseri insidansını etkilemektedir. Sigara içen kadınların erkeklere göre kansere yakalanma riskinin daha fazla olduğu ya da bu riskin eşit olduğunu belirten çalışmalar vardır. Bir meta-analize göre; östrojen ve progesteron içeren hormon tedavilerinde akciğer kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir (19).

Amerikan Kanser Derneği'nde yapılan analizler sonucunda, akciğer kanseri insidansının hispanik olmayan siyah erkeklerin (100.000'de 85.4), hispanik olmayan beyaz erkekler (100.000'de 74.3) ve hispanik erkeklerden (100.000'de 39.2) daha yüksek olduğunu ortaya koydu. Akciğer kanseri mortalitesi için benzer eğilimler kaydedilmiştir. Akciğer kanserli siyah kökenli hastaların (%16) genel olarak 5 yıllık göreceli sağkalım oranı beyazlardan (%19) daha düşüktür (4).

Sosyoekonomik statü (SES), tütün içme davranışı da dahil olmak üzere bazı akciğer kanseri risk faktörleriyle güçlü bir şekilde ilişkilidir; bu nedenle düşük SES'lü kişilerde alım daha yüksek olabilir ve bırakma girişimlerinin başarılı olma olasılığı daha düşüktür. Yapılan çalışmalarda kanser ölümleri en fazla görüldüğü bölgeler fiziksel ve psikososyal stres faktörlerine bağlı, tütün kullanımının arttığı, koşullarda olan SES kötü bölgelerde yaşayan insanlarda görülmektedir (4).

Kronik akciğer hastalıkları; akciğer kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir, en güçlü ilişki ise özellikle erkeklerde kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ile birliktedir (14). Geniş bir meta-analizde, hiç sigara içmeyen bireylerde bile kronik bronşit, tüberküloz, amfizem veya pnömoni öyküsünün olması, bu bireylerde akciğer kanseri yakalanma riskini artırmıştır (15). Uluslararası Akciğer Kanseri Konsorsiyumu, amfizem öyküsünün akciğer kanseri riskini 2,44 kat artırdığını belirtmişlerdir (4).

Obezite ve bazı diyet faktörlerinin akciğer kanseri ile bağlantılı olduğu çeşitli raporlarda belirtilmiştir. C vitamini, beta karoten ve alfa-tokoferolün serumda düşük düzeyde olması akciğer kanseri gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Kırmızı et, süt ürünleri, ekmek, pirinç, bitkisel ve hayvansal yağlar başta olmak üzere birçok gıda akciğer kanseri gelişimi için muhtemel risk faktörleridir (19). İçme suyunda ve yiyeceklerde doğal olarak bulunan arsenik, akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Meyve ve sebze tüketimi özellikle turpgillerden sebzelerin yenilmesinin akciğer kanserine karşı koruyucu etkisinin olduğu vurgulanmıştır (15).

Akciğer dışı maligniteler nedeniyle radyoterapi uygulanan hastalarda seconder primer akciğer kanseri gelişme riski artmaktadır. Günümüzde gelişen radyoterapi teknikleri malign olmayan dokuların radyasyon maruziyet riskini oldukça azaltmıştır (19).

sitoplazmalı ve belirgin olmayan hücre sınırları ile KHDAK'den belirgin bir şekilde ayrılabilir (21,23,24). Ayrıca CD56, nöral hücre adezyon molekülü, sinaptofizin ve kromogranin dahil olmak üzere nöroendokrin belirteçlerin varlığı ile KHDAK'den ayırt edilebilir (21).

2.2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, gelişmiş dünyada kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve hastaların %15'inden azı 5 yıldan fazla hayatta kalmaktadır (25). KHDAK ise kendi içinde adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç ana histolojik tipe ayrılmaktadır (21).

2.2.2.1. Akciğer Adenokarsinom

Akciğer adenokarsinomu (AAK), Amerika Birleşik Devletleri'nde görülen en yaygın birincil akciğer kanseridir. AAK genellikle mukozal bezlerden gelişir ve tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını temsil eder. Hiç sigara içmemiş kişilerde teşhis edilen en yaygın alt tiptir. Akciğer adenokarsinomu genellikle akciğer çevresinde oluşur ve birçok durumda skarlarda veya kronik inflamasyon alanlarında bulunabilir.

Semptomları ve fiziksel belirtileri akciğer kanserinin evresine bağlıdır. En erken evreler genellikle asemptomatiktir ve diğer hastalık süreçleri için yapılan radyografik görüntülerde tesadüfen bulunan nodüller ile teşhis edilebilmektedir. İleri evre süreci, öksürük, hemoptizi veya kasıtsız kilo kaybı gibi spesifik olmayan semptomlarla beraber ortaya çıkabilir. Hastada plevral efüzyon varsa, solunum seslerinde azalma ile nefes darlığı olabilir. Hastaların büyük çoğunluğunun sigara içme öyküsü olacaktır ve KOAH veya ailede akciğer kanseri öyküsü gibi başka ilişkili hastalıkları da olabilir. AAK çoğu hastada, superior vena kava sendromu, frenik sinir felci, Horner sendromu, brakial pleksusun sıkışması, perikardiyal efüzyon gibi bölgesel bir yayılma gösteren semptomlar vardır.

Akciğer adenokarsinomu 4 tipte sınıflandırılır: adenokarsinoma in situ (AIS), minimal invaziv adenokarsinom (MIA), invaziv adenokarsinom ve adenokarsinom varyantları. Bunlardan AIS ve MIA erken rezeke edildiğinde daha iyi sonuçlara

sahiptir. Lokal yayılım doğrudan plevra, diyafram, perikard veya bronşlara yayılmayı içerebilir ve ileri hastalık mediastene, büyük damarlara, trakea, özofagusa, vertebral kolona veya komşu loba yayılır. Lenf nodu metastazı, mediastinal veya subkarinal nodlara ve ardından kontralateral akciğere geçmeden önce peribronşiyal lenf nodlarında meydana gelir. Uzak metastaz, kontralateral lob, plevral nodüller, malign plevral veya perikardiyal efüzyon veya beyin, kemik veya karaciğer gibi herhangi bir uzak bölgeye yayılmayı içerir (26).

2.2.2.2. Akciğer Skuamöz Hücreli Karsinom

Akciğer skuamöz hücreli karsinom bronş epitelinde skuamöz metaplazi/displazinin ilerlemesiyle gelişen, genellikle santral yerleşimli tümör olması (24) ve KHDAK'lı vakalarının %30'unu temsil etmesiyle bilinen bir hastalıktır (27). Ayrıca yüksek oranda mutasyonun varlığı ve çoğunlukla uzun süreli tütün kullanımı ile ilişkilidir (27,28). ASHK diyagnozu keratinizasyon ve/veya intrasellüler köprüleşme (hücreler arası dezmozomlar) oluşumunun görülmesi (28) ile immunohistokimyasal olarak SHK belirteci olan p40, p63, CK5, CK5/6 veya desmoglein ekspresyonlarının saptanması ile konulur (29).

2004 DSÖ sınıflamasında ASHK'unun papiller, şeffaf hücreli, bazaloid ve küçük hücreli varyantları sınıflandırılmıştır. Ancak 2015'te non-keratinize, keratinize ve bazaloid tipler olarak sınıflamada değişiklikler yapıldı ve tümörler, keratinizasyon göstermiyorsa non-keratinize, herhangi bir oranda keratinizasyon varsa keratinize, bazaloid özellik gösteren hücreler %50'den fazlasını oluşturuyorsa bazaloid alt tipler olarak sınıflandırılmaya başlandı. Non-keratinize tipteki tümörleri solid adenokarsinomdan ve null fenotipteki büyük hücreli karsinomdan ayırt etmek için immunhistokimyasal boyalamalar gerekir. Bu tümörlerde squamoz belirteçlerin diffüz pozitif olması nonkeratinize SHK'ı teyit eder. Fakat p63 gibi bazı belirteçler tümüyle squamoz farklılaşmaya spesifik değildir. p63 reaktivitesinin bazen adenokarsinomlarda da olabileceği unutulmamalıdır (29).

Akciğer SHK'larının kapsamlı bir genomik analizi rapor edilmemiş olmasına rağmen, tek platformlu çalışmalar, Akciğer SHK'larında SOX2, PDGFRA ve FGFR1/WHSC1L1'in amplifikasyonu ve CDKN2A'nın delesyonu dahil olmak üzere

somatik kopya sayısı değişikliği b6lgelelerini tanımlamıştır. Akciğer SHK'larının DNA dizileme alışmaları, TP53, NFE2L2, KEAP1, BAI3, FBXW7, GRM8, MUC16, RUNX1T1, STK11 ve ERBB4 dahil olmak üzere bir dizi gende tekrarlayan mutasyonlar bildirmiştir. DDR2 mutasyonları ve FGFR1 amplifikasyonu terap6tik hedefler olarak belirlenmiştir (30).

Akciğer adenokarsinomunun aksine, akciğer skuam6z hücreli karsinomunun moleküler karakterizasyonunda 6nemli bir keşif yapılmamıştır. Terap6tik olarak hedeflenebilir sürücü mutasyonu, SHK olan hastalar için hala belirsizdir, ancak tek başına veya kemoterapi ile kombinasyon halinde anti-programlanmış hücre 6lm proteini-1/PD-L1 tedavisinden fayda g6rebilirler. Bununla birlikte, EGFR ve MET mutasyonları ve ALK veya ROS1 yeniden düzenlemeleri, akciğer skuam6z hücreli karsinomunda, 6zellikle skuam6z histolojiye sahip hiç sigara içmeyen genç hastalarda meydana gelebilir; bu nedenle, bu klinik grupta bu sürücü mutasyonları için moleküler testler esastır (31)

2.2.2.3. Büyük Hücreli Akciğer Kanseri

Büyük hücreli karsinom (BHAK), sitolojik ve yapısal olarak glandüler, skuam6z veya n6roendokrin farklılaşması olmayan ve küçük hücreli karsinomun sitolojik 6zelliklerinden yoksun malign bir epitelyal neoplazmdır. BHAK genellikle belirgin nekrozlu büyük bir periferik kitle olarak kendini g6stermektedir. Histolojik olarak incelendiğinde belirgin nükleollere sahip yuvarlaktan çokgene kadar değişen, farklılaşma 6zelliği olmayan, soluk boyanan sitoplazma ile karakterize edilen hücrelerden oluşur. (29). 2015 DS6 büyük hücreli karsinomları sınıflandırmasında kullanılmaya başlanan immünohistokimyasal (IHC) analizlerin varlığı ile; k6t farklılaşmış karsinomlar, p40 ekspresyonuna sahiplerse skuam6z hücreli karsinom olarak yeniden sınıflandırılır; msin olmasa bile TTF-1 ekspresyonu g6zlemlenirse katı adenokarsinom; ve kromogranin ve sinaptofizin ile boyanma varsa n6roendokrin karsinom olarak tanımlanırken; k6t farklılaşmış karsinomlar, yalnızca tanımlayıcı IHC belirteçlerinden yoksunlarsa ve "boş" fenotipe sahiplerse büyük hücreli olarak kabul edilirler (32,33).

2.3. Akciğer Kanseri Tanı Yöntemleri

Akciğer kanseri şüphesi olan tüm hastalarda tanıyı doğrulamak için biyopsi yapılması gereklidir. Metastatik evre şüphesi olan hastalarda, doku doğrulaması için hastalığın en uzak bölgesinden biyopsi tercih edilir. KHDAK hastaları için moleküler testlere daha fazla önem verildiği göz önüne alındığında, analiz için yeterli dokuyu sağlamak için bir çekirdek biyopsisi tercih edilir. Tümör dokusu, fiberoptik bronkoskopi sırasında bronşiyal veya transbronşiyal biyopsi gibi minimal invaziv tekniklerle, görüntü kılavuzluğunda ince iğne aspirasyonu veya perkütan biyopsi ile veya endobronşiyal ultrason (EBUS) kılavuzluğunda biyopsi yoluyla elde edilebilir. Lokasyona bağlı olarak, transözofageal endoskopik ultrason kılavuzluğunda biyopsi (EUS), EBUS veya kor biyopsi yoluyla lenf nodu örnekleme yapılabilir. Lenf nodu veya deri metastazı gibi klinik olarak palpe edilebilen hastalığı olan hastalarda, biyopsi alınabilir. Metastatik hastalık şüphesi olan hastalarda, yumuşak doku kitlesi, litik kemik lezyonu, kemik iliği, plevral veya karaciğer lezyonu veya malign plevral efüzyondan elde edilen yeterli hücre bloğunun perkütan biyopsisi ile tanı doğrulanabilir. Malign plevral efüzyon şüphesi olan hastalarda, ilk torasentez negatifse, tekrar torasentez istenebilir. Plevral efüzyonların çoğu malign hastalığa bağlı olsa da özellikle eksüdatif veya kanlı ise, bazıları parapnömonik olabilir. Uzak hastalığın yokluğunda, bu tür hastalar olası küratif tedavi için düşünülmelidir.

Herhangi bir biyopsinin tanısal verimi, tümörün konumu (erişilebilirlik), tümör boyutu, tümör tipi ve bronkoskopistin ve patoloğun deneyim düzeyi, tanı prosedürünün teknik yönleri de dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Genel olarak, skuamöz hücreli karsinomlar, küçük hücreli karsinomlar gibi merkezi lezyonlar veya karsinoid tümörler gibi endobronşiyal lezyonlar bronkoskopik inceleme ile daha kolay teşhis edilirken, adenokarsinomlar ve büyük hücreli karsinomlar gibi periferik lezyonlar transtorasik biyopsiye daha uygundur. Çoğu numune için KHAK'a karşı KHDAK için diyagnostik doğruluk mükemmeldir, KHDAK'nın alt tipleri için daha az doğruluk vardır. Bronkoskopik numuneler arasında bronşiyal fırça, bronşiyal yıkama, bronşiyoloalveolar lavaj, transbronşiyal ince iğne aspirasyonu (FNA) ve kor iğne biyopsi bulunur. Mutasyon analizi veya

diğer araştırma amaçları için, histolojik sınıflandırmanın doğruluğu, FNA ile elde edilen rutin bir sitoloji örneğinden daha fazla doku elde edilmesine bağlıdır.

Bronkoskopik yöntemlerin kombine kullanımı için genel duyarlılık yaklaşık %80'dir ve doku biyopsisi ile birlikte verim %85-90'a çıkar. Transbronşiyal kor biyopsi örnekleri gibi transtorasik kor biyopsi örnekleri de tercih edilir. Duyarlılık, daha büyük lezyonlar ve periferik tümörler için en yüksektir. Genel olarak, transbronşiyal, transtorasik veya EUS kılavuzluğundaki kor biyopsi örnekleri diğer örnek türlerinden üstündür.

Balgam sitolojisi ucuzdur ve invaziv değildir, ancak hücrelerin kötü korunması ve iyi kalitede bir numune elde etmede daha fazla değişkenlik nedeniyle diğer numune türlerinden daha düşük bir verime sahiptir. Balgam sitolojisi için verim, skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom histolojisi gibi daha büyük ve merkezi yerleşimli tümörler için en yüksektir. Balgam sitolojisi için özgüllük ortalamaları %100'e yakındır, ancak duyarlılık genellikle <%70'tir. Balgam sitolojisinin doğruluğu, analiz edilen numune sayısının artmasıyla artar. Sonuç olarak, en az üç balgam örneğinin analizi önerilir (34).

2.4. Akciğer Kanseri Evreleme

Akciğer kanserinde evreleme tedavi yönteminin belirlenmesi ve prognostik değerlendirmelerin yapılabilmesi için gerekli olan en kritik basamaktır. Evrelemede Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASLC) kabul ettiği 8. Evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu evreleme sistemi ile tümör (T), lenf nodu (N) ve metastazlar (M) değerlendirilerek hastalığın evresi ve prognozu hakkında bilgiler elde edilmektedir (Tablo 2.1-2.5) (35).

Tablo 2.1. TNM Evrelemesinin N Faktörü Tanımlayıcıları (35)

Nx	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve/veya intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf bezlerine metastaz

Tablo 2.2. TNM Evrelemesinin M Faktörü Tanımlayıcıları (35)

M0		Uzak metastaz yok
M1		Uzak metastaz var
	M1a	Karşı akciğerde metastatik nodül/nodüller, plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon ¹
	M1b	Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz ²
	M1c	Bir veya birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz

¹Akciğer kanseriyle birlikte olan plevral-perikardiyal efüzyonlar genellikle tümöre bağlı gelişir. Ancak bazen patolojik incelemelerde plevral-perikardiyal sıvıda tümör görülmemektedir. Bu bulgular varsa ve klinik değerlendirme efüzyonun tümörle ilgili olmadığı yönündeyse efüzyon evreleme belirleyicisi olarak kullanılmamalıdır.

²Bu durum bölgesel olmayan tek bir uzak lenf bezi metastazını da kapsamaktadır.

Tablo 2.3. 2021 Dünya Sağlık Örgütü Torasik Malign Epitelyal Tümörler ve Prekürsörlerinin Sınıflandırması (31).

Prekürsör glandüler lezyonlar	Sarkomatoid karsinomlar
• Atipik adenomatöz hiperplazi • Adenokarsinoma in situ • Adenokarsinoma in situ, non-müsinöz • Adenokarsinoma in situ, müsinöz	• Pleomorfik karsinom ➤ Dev hücreli karsinom ➤ İğsi hücreli karsinom • Karsinosarkom • Pulmoner blastoma
Adenokarsinomlar	Diğer epitelyal tümörler
• Minimal invaziv adenokarsinom ➤ Minimal invaziv adenokarsinom, nonmüsinöz ➤ Minimal invaziv adenokarsinom, müsinöz • İnvaziv non-müsinöz adenokarsinom ➤ Lepidik adenokarsinom ➤ Asiner adenokarsinom ➤ Solid adenokarsinom ➤ Papiller adenokarsinom ➤ Mikropapiller adenokarsinom • İnvaziv müsinöz adenokarsinom ➤ Miks invaziv müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinom • Fetal adenokarsinom • Kolloid adenokarsinom • Adenokarsinom, enterik tip • Adenokarsinom, NOS	• NUT karsinom • Torasik SMARCA4 eksikliği olan indifferansiye tümör
Skuamöz prekürsör lezyonlar	Tükruk bezi-tipi tümörler
• Skuamöz hücreli karsinoma in situ • Hafif skuamöz displazi • Orta skuamöz displazi • Şiddetli skuamöz displazi	• Adenoid kistik karsinom • Epitelyal-miyoepitelyal karsinom • Mukoepidermoid karsinom • Miyoepitelyal karsinom • Hyalanize Geçerli hücreli karsinom
Skuamöz hücreli karsinomlar	Akciğer nöroendokrin neoplazmlar
• Skuamöz hücreli karsinom, ➤ NOS Skuamöz hücreli karsinoma, keratinize ➤ Skuamöz hücreli karsinoma, non-keratinize ➤ Bazaloid skuamöz hücreli karsinom • Lenfoepitelyal karsinom	• Prekürsör lezyon ➤ Diffüz idiyopatik nöroendokrin hücre hiperplazisi
Büyük hücreli karsinomlar	Nöroendokrin tümörler
• Büyük hücreli karsinom	➤ Karsinoid tümör, NOS/nöroendokrin tümör, NOS ➤ Tipik karsinoid/nöroendokrin tümör, grade 1 ➤ Atipik karsinoid/nöroendokrin tümör, grade 2
Adenoskuamöz karsinomlar	Nöroendokrin karsinomlar
• Adenoskuamöz karsinom	• Küçük hücreli karsinom ➤ Kombine küçük hücreli karsinom • Büyük hücreli nöroendokrin karsinom ➤ Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom
• NUT: nuclear protein in testis, NOS: not otherwise specified.	

Tablo 2.4. TNM Evrelemesinin T Faktörü Tanımlayıcıları (35).

Tx		Primer tümörün değerlendirilemediği veya balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında malign hücrelerin gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile saptanamadığı durumlar
T0		Primer tümör kanıtı yok
Tis		Karsinoma in situ (adenokarsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinoma in situ'yu kapsar)
T1		Ana bronş tutulumu olmadan akciğer veya visseral plevra ile çevrili, en geniş çapı ≤ 3 , bronkopik olarak lob bronşundan daha proksimalde invazyon bulgusu olmayan tümör (örn. ana bronşta olmayan) ¹
	T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom ²
	T1a	Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm ²
	T1b	Tümörün en geniş çapı > 1 cm, ≤ 2 cm
	T1c	Tümörün en geniş çapı > 2 cm, ≤ 3 cm
T2		Tümörün en geniş çapı > 3 cm, ≤ 5 cm; veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör ³ ➤ Karinayı invaze etmeden, karinaya uzaklığına bakılmaksızın ana bronşu tutan tümör ➤ Visseral plevra invazyonu ➤ Hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni (akciğerin bir bölümünü/tümünü kapsayabilir)
	T2a	Tümörün en geniş çapı > 3 cm, ≤ 4 cm
	T2b	Tümörün en geniş çapı > 4 cm, ≤ 5 cm
T3		Tümörün en geniş çapı > 5 cm, ≤ 7 cm veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon; Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikard * Primer tümörle aynı lobda nodül(ler)
T4		Tümörün en geniş çapı > 7 cm veya aşağıdaki yapılardan birine invazyon; * Diyafram, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra gövdesi, karina * Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül(ler)

¹Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayımı da T1a olarak sınıflandırılır.

²Soliter adenokarsinom (3 cm'den daha büyük boyutta olmayan), daha baskın olarak lepidik paternli ve herhangi bir odakta 5 mm'den daha büyük boyutta invazyona sahip olmayan

³Bu özellikleri ile T2 tümör; eğer ≤ 4 cm veya büyüklüğü belirlenemiyor ise T2a; eğer > 4 cm fakat ≤ 5 cm ise T2b olarak sınıflandırılır.

Tablo 2.5. TNM'ye Göre Evre Grupları (35)

	N0	N1	N2	N3	M1a	M1b	M1c
T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIC	IVA	IVA	IVB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB

2.5. Akciğer Kanseri Hastalarının Performans Durumu

Performans durumu, hastanın başkalarının yardımı olmadan belirli günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirme yeteneğini tahmin eden bir puandır. Hastaların performans durumunu değerlendirirken Karnofsky skalası ve Eastern Oncology Cooperative Group Performans Skalası (ECOG PS) kullanılmaktadır. Karnofsky indeksi hastanın günlük aktivitelerini gerçekleştirme becerisine ve ihtiyaç duyduğu yardıma bağlı olarak 0 ila 100 arasında doğrusal puanlar kullanır. Öte yandan ECOG, PS'yi değerlendirmek için 0 ile 5 arasında puan kullanır ve günlük klinik uygulamada kullanmak için basit bir araçtır (36). Karnofsky skalası 70'in üstünde veya ECOG PS skoru 0-2 arasında olan hastaların prognozunun daha iyi olduğu tablo 2.6.'da gösterilmiştir (37). Metastatik KHDAK'lı hastaların ECOG PS'leri ikiden büyükse genellikle kemoterapi için uygun olmadığı kabul edilir (38).

Tablo 2.6. Eastern Oncology Cooperative Group Performans Skalası (38)

SKOR	TANIM
0	Kısıtlamasız normal aktivite.
1	Ayakta gündelik işlerini yapıyor ancak ağır fiziksel aktiviteler sınırlı.
2	Ayakta geçirmesi gereken sürenin %50'sinden azında yatağa bağımlı.
3	Ayakta geçirmesi gereken sürenin %50'sinden fazlasında yatak sandalyeye bağımlı.
4	Yatağa bağımlı, yardımsız hiçbir işi yapamıyor.
5	Ölü

2.6. Akciğer Kanserinin Tedavisi

KHDAK hastaların tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi yaygın kullanılan üç tedavi rejimidir.

Evre I ve II KHDAK 'nin cerrahi rezeksiyon, ayrıntılı bir evreleme ve operasyon öncesi değerlendirmeden sonra uygun hastada tercih edilen uzun süreli sağkalım ve tedavi için en iyi seçenektir. Rezeksiyonun kapsamı, eksplorasyon bulgularına dayanan bir cerrahi karar meselesidir. Evre IA KHDAK'li hastalarda, lobektomi lokal nüks oranları açısından wedge rezeksiyondan üstündür. Genel hayatta kalmada iyileşmeye yönelik bir eğilim de vardır. Komorbiditeleri olan, akciğer rezervi zayıf ve küçük periferik lezyonları olan hastalarda sınırlı rezeksiyon, kama rezeksiyon ve segmentektomi (potansiyel olarak video yardımcı torakoskopik cerrahi ile) makul bir cerrahi seçenek olabilir. Pnöminektomi, merkezi tümörü olan hastalar için saklıdır ve sadece mükemmel akciğer rezervi olan hastalarda yapılmalıdır. Beş yıllık sağkalım oranları evre I KHDAK'li hastalarda %60-80 ve evre II KHDAK'li hastalarda %40-50'dir. Segmentektomi makul cerrahi seçenek olabilir.

Negatif sınırlarla evre I veya II KHDAK rezeksiyonundan sonra hastalarda postoperatif radyasyon tedavisinin şu anda bir rolü yoktur. Bununla birlikte, evre I ve II hastalığı olan ve cerrahi reddeden veya cerrahiye uygun olmayan hastalarda küratif radyasyon tedavisi düşünülmelidir. Stereotaktik vücut radyoterapisi, izole pulmoner nodülleri (≤ 5 cm) olan ve cerrahi rezeksiyona aday olmayan veya bunu reddeden hastaların tedavisinde kullanılan bir tekniktir. Tedavi tipik olarak 1-2 hafta içinde verilen üç ile beş fraksiyon halinde uygulanır. Kontrolsüz çalışmalarda SBRT ile hastalık kontrol oranları $>90\%$ ve 5 yıllık sağkalım oranları 60% 'a varan oranlarda bildirilmiştir. Karşılaştırıldığında, standart dış ışınlı radyoterapisi ile tedavi edilen evre I veya II KHDAK'li hastalarda hayatta kalma oranları tipik olarak 13% ile 39% arasında değişir. Kriyoablasyon, küçük, izole tümörleri (yani, ≤ 3 cm) tedavi etmek için ara sıra kullanılan başka bir tekniktir. Ancak, bu teknikle ilgili uzun vadeli sonuçlara ilişkin çok az veri mevcuttur.

Rezeke edilmiş evre IA veya IB KHDAK'li hastalarda adjuvan kemoterapinin belirgin bir rolü yoktur. Elde edilen veriler adjuvan kemoterapinin rezeke edilmiş

evre II veya III KHDAK'li hastalarda en iyi şekilde uygulandığını düşündürmektedir. Hedefe yönelik tedaviler ya da immünoterapilerin adjuvan tedavi uygulamasında da yeri yoktur.

Evre III KHDAK'li hastaların tedavisinin birçok yönü tartışmalıdır ve optimal tedavi stratejisi net bir şekilde tanımlanmamıştır. Ayrıca, birçok potansiyel tedavi seçeneği olmasına rağmen, hiçbiri çok yüksek bir iyileşme olasılığı sağlamaz. Ayrıca, evre III hastalık oldukça heterojen olduğundan, tüm hastalar için tek bir tedavi yaklaşımı önerilemez. Tedavi seçimlerini yönlendiren anahtar faktörler, tümör ve nodal hastalığın özel kombinasyonunu, endike ise tam bir cerrahi rezeksiyon elde etme becerisini ve hastanın genel fiziksel durumunu ve tercihlerini içerir. Örneğin, ilgili mediastinal lenf nodlarının rezeke edilebildiği sınırlı evre IIIA hastalığı olan hastalarda, ilk ameliyatın ardından postoperatif kemoterapi (radyasyon tedavisi ile veya tek başına) endike olabilir. Buna karşın, klinik olarak belirgin hacimli mediastinal lenf nodu tutulumu olan hastalarda standart tedavi yaklaşımı eş zamanlı kemoradyoterapidir. Bununla birlikte, bazı durumlarda, ikinci hasta grubu kemoradyoterapiyi takiben cerrahi için aday olabilir. Evre IIIA hastalarında N2 negatif ise cerrahi ve sonrasında kemoterapi ve radyoterapi düşünülmektedir.

Evre IV KHDAK'de tedavi hedefi; yaşam kalitesini bozmadan, tedaviye bağlı yan etkileri en az düzeyde tutarak yaşam süresini uzatmaktır. Bu hastalarda tedaviyi yönlendiren anahtar özellikler: Hastalığın yaygınlığı, metastaz sayı ve bölgesi, metastaz ile ilişkili semptom varlığı; Skuamoz, non-skuamoz histoloji; Adenokarsinomlu olguda sürücü mutasyon varlığı; epidermal büyüme faktörü reseptörü, anaplastik lenfoma kinaz, ROS1 varlığı; tümörde yüksek düzeyde programlanmış hücre ölüm reseptörü-1 (PDL 1) ekspresyonudur (39).

KHAK'de cerrahi yaklaşım sadece olguların %2-5'lik kısmında evre I hastada mümkündür. Bu grup hastada endobronşiyal ultrasonografi ve/veya endoskopik ultrasonografi ile mediastinal evreleme gereklidir. Bunun dışındaki hastalarda tedavi yaklaşımını belirlemek için patolojik evrelemeye gerek yoktur.

KHAK olgularında ayrıntılı bir evreleme, radyoterapi için tedavi rehberi oluşturacaktır. Bu amaçla toraks, abdomen BT ve kraniyal MRG planlanmalıdır. Anemi, nötropeni ve trombositopeni varlığında kemik iliği aspirasyonu

planlanmalıdır, bu durumlar dışındaki olgularda gerekli değildir. Sınırlı hastalık kararı PET/BT değerlendirilmesiyle verilmelidir. Sınırlı hastalık bir hemitoraksa sınırlı, güvenli RT alanına girebilen lezyondur. Evrelemeye göre evre I-III küratif RT için uygundur ancak multipl nodül nedeniyle T3 ve T4 lezyonlar yaygın hastalık kapsamındadır. Toraksa sınırlı hastalık varlığında tedavi hedefi küratiftir ve akselere hiperfraksiyone radyoterapiyle birlikte platin bazlı KT (sisplatin + etopozid) seçkin yaklaşımdır. Yaygın hastalıkta ise tedavi hedefi palyatiftir. Toraksa sınırlı ve yaygın hastalıkta, kısmi veya tam yanıt durumunda profilaktik kraniyal ışınlama önerilmektedir. Yaygın hastalığı olan hastalarda sistemik KT ile tam ya da tama yakın yanıt alınan olgularda konsolidatif radyoterapinin etkinliğı kanıtlanmıştır (39).

2.7. Akciğer Kanserinin Moleküler Tedavisi

Akciğer kanseri heterojen ve karmaşık bir hastalıktır. Akciğer kanserinin genomik ve transkriptomik profili, yalnızca kanserin başlaması ve ilerlemesi hakkındaki bilgimizi arttırmakla kalmaz, aynı zamanda tedavi kararları konusunda rehberlik sağlayabilir. Hedefe yönelik tedavinin bir tümör alt kümesinde en başarılı olduğı ger eğı, ilgili genlerdeki, özellikle onkojenik sürücü mutasyonlarındaki mutasyonların daha iyi anlaşılmasına dayalı olarak klinik olarak ilişkili moleküler tümör fenotiplerinin daha iyi sınıflandırılmasına duyulan ihtiyaç gösterir (40).

KHDAK'de çeşitli genomik ve epigenetik anormallikler bildirilmiştir. Onkojenik sürücü mutasyonları, kanserin hem başlamasından hem de sürdürülmesinden sorumlu olan mutasyonları ifade eder. Bu mutasyonlar genellikle normal hücresel çoğalma ve hayatta kalma için kritik olan sinyal proteinlerini kodlayan genlerde bulunur. Bu genler üzerindeki mutasyonların mevcudiyeti, kanser hücrelerine büyüme avantajı sağlayarak, tümör ilerlemesi sırasında seçilmelerine yardımcı olacaktır. KHDAK, özellikle akciğer adenokarsinomları, genetik mutasyon profillerine göre alt sınıflara ayrılabilir, bu da onkojenik sürücü mutasyonlarının tanımlanmasına dayalı kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerini mümkün kılar (40).

Genetik değişiklikler sonucu oluşan onkoproteinler, tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikörler gibi spesifik baskılayıcı moleküller ile hedef alınarak kanser gelişimindeki etkinlikleri durdurulabilmektedir. Akciğer kanserinde genetik

değişiklikler sonucu oluşan mutant epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin tirozin kinaz inhibitörleriyle baskılanması hedeflenmiş tedavilere en iyi örneklerden biridir. Diğer taraftan birçok kanserde olduğu gibi Akciğer kanserinde de KRAS gen mutasyonu sonucu oluşan KRAS onkoproteinlerini baskılayacak efektif bir baskılayıcı olmaması sebebiyle prognoz kötü yönde ilerlemektedir (5).

Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan hedefe yönelik ilaçların başında gelen 1. nesil Tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) ilaçların (erlotinib ve gefitinib), klasik kemoterapatlere göre daha uzun hastalıksız sağkalım (PFS) ile ilişkilendirilmiş ve bu nedenle KHDAK hastalarında birinci basamak tedavide 2016 yılında Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) onayı almıştır (41). Aktive edici EGFR mutasyonlarını barındıran kanser hastaları, birinci basamak TKI tedavisinden yararlanır. Ancak hastaların %10'unda primer TKI direnci görülürken, diğerlerinin %50'sinde TKI'ye başladıktan sonraki 9-12 ay içinde sekonder direnç gelişir. Şu anda, ilerleme ile ilişkili ikincil direnç mekanizmaları daha iyi bilinmektedir: EGFR direnç mutasyonunun klonal seçimi (ekzon 20'de T790M mutasyonu), diğer büyüme faktörleri (c-met, HER ailesi, IGF1R veya AXL) için transmembran reseptörlerinin amplifikasyonu, akış aşağı EGFR sinyal yolundaki moleküler değişiklikler (PI3K veya PTEN) ve küçük hücreli kansere epitelyal mezenkimal geçiş veya transdiferansiyasyon olarak söylenebilir (42).

Osimertinib, hem EGFR-TKI-hassaslaştırıcı hem de EGFR Thr790Met (T790M) direnç mutasyonlarını seçici olarak inhibe eden ve merkezi sinir sistemi metastazı olan KHDAK'li hastalarda etkinlik gösteren üçüncü nesil, geri dönüşümsüz, oral bir EGFR-TKI'dir. Osimertinib ilk olarak EGFR T790M, direnç mutasyonu pozitif hastalarda kullanım endikasyonu almıştır. Bununla birlikte yakın zamanda yapılan çalışmalar sonucunda 1. ve 2. nesil EGFR TKİ ve klasik kemoteraplere göre PFS ve genel sağ kalım (GSK)'da anlamlı artış sağladığı gösterildiğinden EGFR aktive edici mutasyonu pozitif olan KHDAK hastalarında birinci basamak tedavide de FDA onayı almıştır (43)

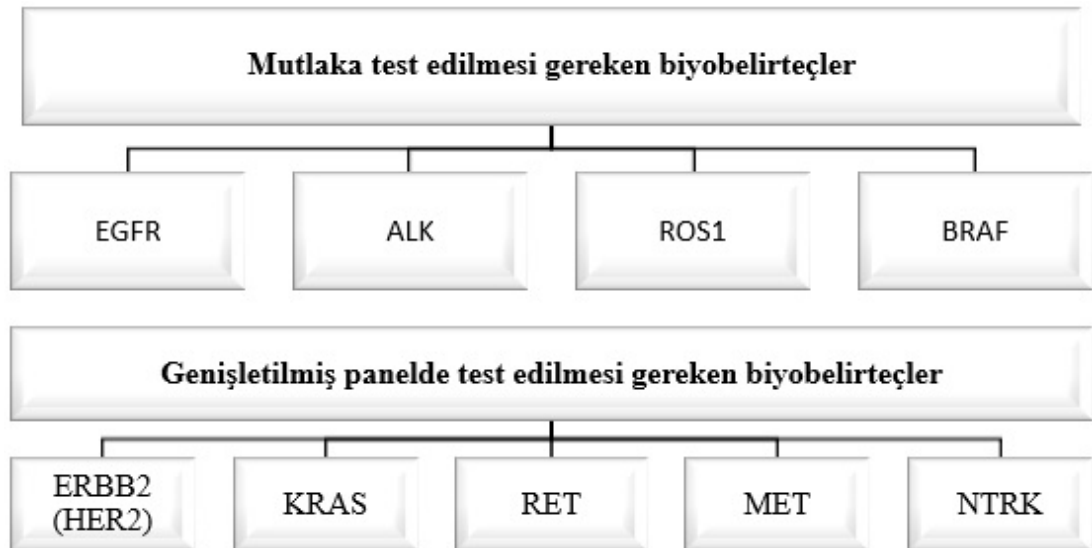
Diğer bir hedefe yönelik ilaç olarak crizotinib, ALK füzyon geninin protein ürününü inhibe eden ve ALK'yi anormal şekilde eksprese eden KHDAK'nin tedavisi için yakın zamanda onaylanmış bir oral tirozin kinaz inhibitörüdür. Ortaya çıkan

veriler, krizotinibin MET onkogeninin amplifikasyonunu veya mutasyonunu gösteren tümörler veya ROS1 onkogeninin translokasyonunu gösteren tümörler dahil olmak üzere diğer akciğer kanseri alt kümelerinde de aktiviteye sahip olabileceğini düşündürmektedir (44). Ayrıca bu mutasyonlara sahip olan hastalarda klasik kemoterapatlere göre PFS artışı sağladığı gösterilmiştir (45). Ek olarak dabrafenib ise BRAF V600E mutasyonu pozitif KHDAK hastalarda birinci basamak tedavide kullanılan diğer bir hedefe yönelik ilaçtır (46).

2.8. KHDAK İçin Güncel Moleküler Testler

İlk basamakta; EGFR, ALK ve ROS1 genlerine yönelik moleküler testler eş zamanlı olarak yapılmalıdır. EGFR, ALK ve ROS1 genlerinde mutasyon saptanamadığı durumda, ikinci basamakta BRAF, MET, ERBB2/HER2, RET, KRAS genlerine yönelik moleküler test yapılması önerilmektedir. Ancak ESMO (European Society for Medical Oncology), KHDAK tanılı hastalarda ilk basamak moleküler testler arasında BRAF mutasyon analizinin de yer almasını önermiştir (47).

Uluslararası rehberlerde adenokarsinom ve adenokarsinom komponentinin dışlanamadığı KHDAK aşağıdaki genlerin incelenmesi önerilmektedir.



Şekil 2.1. İleri Evre KHDAK’da Test Algoritması (47).

2.9. Akciğer Kanserinde Moleküler Patogenezi

Kanser, genomdaki dinamik değişiklikleri içeren bir hastalıktır. Neredeyse tüm kanser hücreleri büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçma, sınırsız replikasyon potansiyeli, sürekli anjiyogenez ile doku istilası ve metastaz olmak üzere altı ayırt edici özellik kazanır. Bu ayırt edici özelliklerin kazanılma sırası oldukça değişken görünmektedir ve tümörden tümöre farklılık gösterebilir. Kanserleşme süreci onkogenlerin aktivasyon kazanması ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar (21).

Akciğer kanseri hücreleri, mutasyonlar, amplifikasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar ve translokasyonlar dahil olmak üzere çok sayıda kromozomal anormallik barındırır. KHDAK tümör dokusunda EGFR, ALK, ROS1 ve HER2 gibi reseptör tirozin kinaz genlerinde, RAS, RAF ve MEK1 gibi MAPK sinyal yolağı üyelerinde ve PIK3CA, AKT1 gibi PI3K/AKT sinyal yolağındaki genlerde mutasyonlar gözlenmekte ve bunlar kanserleşme ile ilişkilendirilmektedir (5).

2.9.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EGFR geni kromozom 7p12-13'e lokalize (48) ve birçok epitelyal tümörde anormal olarak aktive olan, ErbB ailesi üyesi bir tirozin kinaz reseptörüdür (46). ErbB1 ya da HER1 olarak da bilinmektedir. ErbB ailesinin bilinen EGFR, HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4) olmak üzere dört üyesi bulunmaktadır (40,42). EGFR, alveolar epitel hücrelerinde orta düzeyde ekspresyonla birlikte bronş epitel hücrelerinin yüzeyinde de güçlü bir şekilde eksprese edilir. Diğer HER 2, 3 ve 4 üyeleride normal akciğer epitel hücrelerinden eksprese olmaktadır (42).

EGFR'deki değişiklikler, KHDAK dahil birçok tümörün patogenezinde rol oynar (40). EGFR'ye ligand bağlanması sonucu hücre içinde yer alan tirozin kinaz kısmı aktive olur ve hücre proliferasyonu, diferansiyasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastazın düzenlenmesinde rol oynayan PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPK ve JAK/STAT gibi önemli sinyalizasyon yolları aktive olur (46,49).

EGFR mutasyonları, akciğer adenokarsinomlarında yaklaşık %20-30 oranlarında görülmekte olup skuamöz hücreli karsinomlarda çok nadir olarak

görülmektedirler. EGFR mutasyonları; kadınlarda, sigara içmemiş hastalarda ve Asya toplumlarında daha yüksek sıklıkta görülür. Somatik EGFR mutasyonları, Avrupa kökenli akciğer adenokarsinomlu hastaların yaklaşık %10-20'sinde görülürken; Doğu Asya kökenli hastaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir. Bu oranlar, sigara içme oranlarına göre de değişiklik gösterir. Sigara içme oranının daha yüksek olduğu bölgelerde EGFR mutasyon oranı düşüktür (46).

EGFR geni 28 ekzondan oluşmakta olup, tirozin kinaz domaini ekzon 18-21 arasındaki ekzonlar tarafından kodlanmaktadır (46). Ekzon 18'deki aktive edici mutasyonlar, ekzon 19'daki delesyonlar ve ekzon 21'deki L858R nokta mutasyonu tüm EGFR mutasyonlarının %90'ını oluşturur. Bu mutasyonlara sahip tümörlerin EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine yanıt oranları %70 civarındadır. Ekzon 20'deki mutasyonlar daha nadir görülmekte olup, EGFR inhibitörlerine direnç kazandırdığı düşünülmektedir (50).

EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinden Erlotinib, Gefitinib ve Afatinib; EGFR mutant adenokarsinomlarda tedavide kullanılmaktadır. Genellikle bu tedavilerin 1. yılından sonra direnç gelişmeye başlar. Altta yatan en önemli neden EGFR geninde ikinci bir mutasyon gelişmesidir. EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine edinilmiş direncin en yaygın en iyi karakterize edilmiş mekanizması vakaların yaklaşık %60'ında ortaya çıkan, ekzon 20'deki nükleotid 2369'da bir C ile T değişikliği sonucu treoninin metiyonine dönüşümü ile sonuçlanan T790M mutasyonudur (46).

EGFR'deki mutasyonlar, hedefe yönelik tedavi için hem biyolojik belirteçler hem de rasyonel hedefler olarak rol oynar. TKİ ilaçlar, EGFR TK domainindeki ATP bağımlı domaini için ATP ile yarışarak protein fosforilasyonunu azaltır. Birinci nesil TKİ'ler (erlotinib, gefitinib), geri dönüşümlü şekilde EGFR'nin indüklediği aşağı akış sinyalleme aktivasyonunda inhibisyon yaparken, ikinci nesil TKİ'ler (afatinib, dacomitinib, geri dönüşümsüz şekilde inhibisyon yapar. Ayrıca ikinci nesil TKİ'ler EGFR ailesinin diğer üyelerini de (ErbB2, ErbB3 ve ErbB4) inhibe eder (42,51). Osimertinib, hem EGFR-TKI duyarlılaştırıcı hem de EGFR T790M direnç mutasyonlarını seçici olarak inhibe eden, oral, üçüncü nesil, geri dönüşümsüz bir epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaz inhibitörüdür (52). Sitotoksik kemoterapi kullanımı, ilerlemiş küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan hastalarda

%20 ila 35'lik bir yanıt oranı ve 10 ile 12 aylık medyan sağkalım süresi ile ilişkilidir (53). KHDAK hastaları üzerine yapılan birçok klinik çalışmada, TKİ ilaçların kemoterapatik ilaçlara göre çok daha iyi yanıt verdiği ve PS süresinin uzadığı bildirilmiştir (42,51).

2.9.2. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1

Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü (FGFR) ailesi, embriyonik gelişim ve yetişkinlerin yaralanmaya, doku onarımına ve rejenerasyona tepkisi sırasında çok çeşitli önemli fizyolojik olaylarda merkezi bir rol oynar. FGFR'ler, hayatta kalma, çoğalma, göç, farklılaşma ve metabolizma gibi bir dizi hücresel sürecin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır (54).

FGFR ailesi, hücre yüzeyi reseptörleri olarak işlev gören FGFR1-4'ten ve FGFR benzeri protein (FGFR5) olarak bilinen beşinci bir üyeden oluşur (54). FGFR1-4, çeşitli fibroblast büyüme faktörü (FGF) ligandlarının bağlanmasıyla aktive edilen hücre sağkalımı, göçü ve anjiyogenez ile ilişkili tirozin kinaz reseptörleridir (54,55). FGFR1-4 aktif kinazlar iken, hücre zarına da lokalize olan ve FGF ligandlarını bağlayan FGFR5, kinaz alanından yoksundur ve kinaz aktivitesine sahip değildir (54).

FGFR1 geni, kromozom 8 üzerinde, insan kanserinde en sık amplifiye edilen genlerden biridir (46). Artmış FGFR1 ekspresyonu, skuamöz hücreli karsinomlar (SHK) (~%25) ve adenokarsinomlar (~%15) dahil olmak üzere çeşitli akciğer kanseri histolojilerinde sık görülür ve FGFR inhibitörleri şu anda akciğer SHK ve diğer maligniteleri olan hastalarda değerlendirilmektedir (55). ASHK hastalarında en sık görülen FGFR2 ve FGFR3'teki mutasyonlar ise vakaların yaklaşık %3'ünde görülmektedir. SHK hastalarında tanımlanan en sık hotspot mutasyonları, FGFR2'de extrasellular alan mutasyonları olan W290C ve S320C ve kinaz alanı mutasyonları K660E ve K660N'dir. FGFR3'teki en yaygın mutasyonlar kinaz alanında (R248C ve S249C) bulunur (54).

Son zamanlarda, FGFR1 aşırı ekspresyonunun, EGFR-TKI'lere karşı bir direnç mekanizması olduğu ve bu amaçla yüksek FGFR1 ekspresyonunun EGFR-TKI tedavisi alan hastalarda azalmış PFS ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Bu yüzden,

EGFR ve FGFR'ünün her ikisinin de hedeflemesinin, KHDAK'de edinilmiş EGFR-TKI ilaç direncinin üstesinden gelmek için umut verici bir strateji olduğu ispatlanmıştır (55).

2.9.3. Mezenşimal Epitelyal Dönüştürücü

Hepatosit büyüme faktör (HGF) reseptörü olarak da bilinen MET (Mezenşimal epitelyal dönüştürücü) bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. 7q21-q31 kromozomu üzerinde yerleşmiş bir proto-onkogendir (49). MET sayısız aşağı akış efektör ile etkileşime girdiğinden, MET sinyalleşmesinin aktivasyonu birçok yolu etkiler ve hücre proliferasyonu, hücre motilitesi hayatta kalma, metastaz, anjiyogenez ve epitelyalden mezenkimal geçişe (EMT) dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenler. Dönüştürülmüş hücrelerde MET, aşırı ekspresyon, genomik amplifikasyon, mutasyonlar veya alternatif ekleme yoluyla değiştirilebilir. Bu değişiklikler, HGF'ye bağımlı veya HGF'den bağımsız mekanizmalar aracılığıyla ilişkilendirilen anormal MET aktivasyonu ile sonuçlanır (40).

MET amplifikasyonu KHDAK'lerinde %5-10 arası görülmektedir. Yüksek gen kopyalama sayıları, skuamöz hücreli karsinomada adenokarsinoma göre daha yaygındır. Yüksek MET protein ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilidir. MET amplifikasyonu, EGFR TKİ direncinin bir mekanizmasıdır ve dirençli hastaların yaklaşık %20'sinde görülür. MET amplifikasyonunun, EGFR blokajını atlayarak PI3K/AKT yolağını koruyup sürdürerek bu direnci oluşturduğu düşünülüyor (46).

2.9.4. Anaplastik Lenfoma Kinaz

Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) geni 2.kromozomun 23p bölgesinde yerleşmiş olup, insulin reseptör tirozin kinaz alt ailesinin bir üyesidir. ALK, 29 ekzon ile 1620 aminoasit uzunluğunda transmembran ALK reseptör tirozin kinaz proteinini kodlar. ALK aktivasyonu apoptoz inhibisyonunda ve hücre proliferasyonu ile ilişkilidir (56).

ALK protein, ilk olarak 1997 yılında anaplastik büyük hücreli lenfomada t(2;5) (p23;q35) kromozom translokasyonundan kaynaklanan kimerik bir protein olarak bulunmuştur. 2007 yılında ise KHDAK'de farklı bir ALK translokasyonu

saptanmıştır. İkinci kromozomda yerleşik ALK'nin bir parçası, inversiyonuyla aynı gende yerleşik EML-4 geninin (Echinoderm mikrotübül ile ilişkili protein benzeri-4) parçasıyla birleşmiştir. Bu yeni ALK füzyon proteini, ligand gereksinimi duymadan da sitoplazmada aktive olur. EML4-ALK füzyonu RAS/RAF/MEK, PI3K/AKT/mTOR ve JAK/STAT sinyal yollarını harekete geçirir. ALK-EML-4 proteini KHDAC hastaların yaklaşık % 4-7'sinde; genellikle genç, sigara içmeyen ve klinik olarak ilerlemiş hastalığı olan hastalarda görülmüştür (46).

ALK rearranjmanı saptanan pozitif hastalarda uygulanan krizotinibe ilk bir yıl içinde çoğunlukla direnç ortaya çıkacaktır. Krizotinibe karşı kazanılmış direnç, ALK'nın ek hedef mutasyonlarından, ALK gen amplifikasyonundan veya alternatif sinyal yollarının aktivasyonundan kaynaklanabilir. Krizotinibe direnç durumunda ya da krizotinibi tolere edemeyen hastalarda bu dirençle mücadele etmek için ikinci nesil ALK inhibitörü “ceritinib”, “alectinib” veya “brigatinib” gibi daha etkili tirozin kinaz inhibitörleri ile tedaviye devam edilmesi önerilmektedir (57,58).

2.9.5. ROS Proto-Onkogen 1

ROS proto-onkogen 1 (ROS1), protein kinaz alanında ALK ile yüksek homolojiye sahip olan bir transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlayan, kromozom 6q22 üzerinde bulunan bir proto-onkogendir. ROS1 aktivasyonu, PI3K/AKT/mTOR, STAT3 ve RAS/MAPK/ERK yolu üzerinden sinyalleşmeye yol açar (49).

ROS1 kromozomal rearranjmanlarına FIG, KDEL2, TPM3, SDC4, LRIG3, EZR, SLC34A2 ve CD74 dahil çeşitli 5' füzyon formu tanımlanmıştır. ROS-1 yeniden düzenlemeleri olan KHDAC hastalarının klinik özellikleri, ALK yeniden düzenlenmiş KHDAC hastalarına benzerdir. Daha sık etnik kökeni Asyalı, genç yaş (ortalama yaş 49), kadın cinsiyet, hiç sigara içmemiş (49,59) ve adenokarsinom histolojisi olan hastaların hastaların %1-2'sinde görülür. Akciğer adenokarsinomlarında ROS1 geni birkaç farklı genle füzyonu uğrayabilir. En sık görülen CD74-ROS1 füzyonudur. ALK füzyonu pozitif akciğer kanseri için FDA tarafından onaylanan bir TKI olan krizotinib, ROS1 ve ALK proteinlerinin kinaz alanlarının yapısal benzerliği nedeniyle ROS1 proteinini de inhibe eder (46).

2.9.6. Kirsten Sıçan Sarkoma 2 Viral Onkogen Homolog

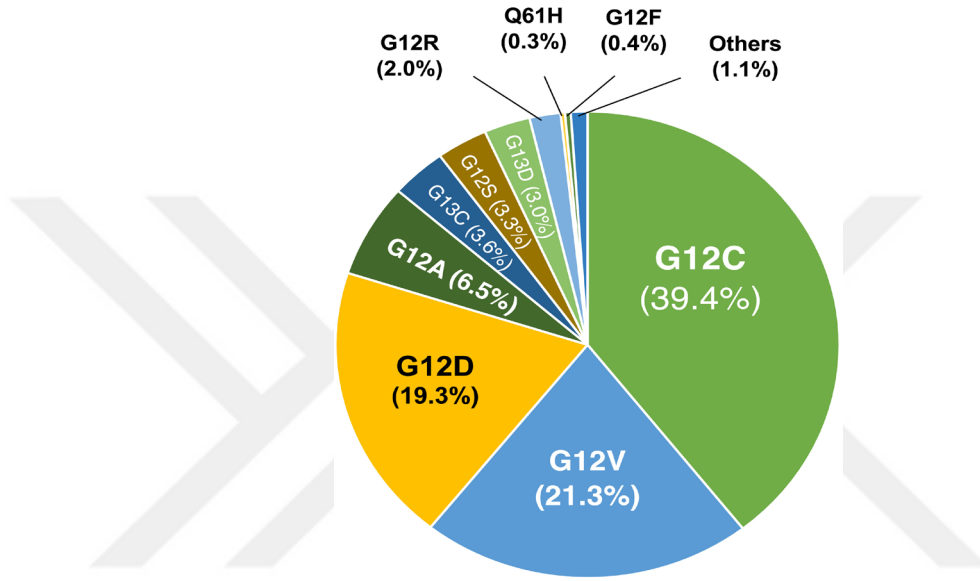
Ras, tüm ökaryotik hücrelerde hücre büyümesinin kilit düzenleyicisidir (60). RAS onkogen ailesi, genleri farklı kromozomlarda bulunan KRAS, HRAS ve NRAS olmak üzere üç üyesi vardır (61). RAS protoonkogen ailesinin üyeleri hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen sinyal iletim yollarının kontrolünde kritik öneme sahip bir G proteinidir (49,59). Bunlardan insan KRAS geni, 6 ekzondan oluşmakta ve kromozom 12p12.1 üzerinde yer almaktadır (61).

KRAS, insan pankreas kanserlerinin %80'inden fazlasında, kolorektal ve kolanjiyal kanserlerin %30 fazlasında görülen en sık mutasyona uğramış onkogendir (61). Akciğer kanserinde en çok aranan terapötik hedeflerden biri de KRAS onkogenidir. Bu onkogen yeni teşhis edilen KHDAK adenokarsinomlarının yaklaşık %30'unda ve skuamöz hücreli karsinomların %5'inde gözlenilir (59). KRAS mutasyonlarının insidansı ise sigara içenlerde sadece %5 kadarken sigara içenlerde %25-35'e ulaşır. KRAS mutasyonu tipi sigara öyküsü ile ilişkilidir (62) Hiç sigara içmeyen kişilerde, en yaygın KRAS mutasyonu G12D (%56) iken, eski sigara içiciler ve halen sigara içenler arasında en sık görülen mutasyon G12C (%41) mutasyonudur (46).

Ras'ın biyolojik aktivitesi, GTPaz Aktive eden Proteinler (GAP) ve Guanin Nükleotid Değişim Faktörleri (GEF) tarafından düzenlenmektedir. Guanin nükleotid değişim faktörleri (GEFs1; RasGRF1/2 ve Sos1/2) Ras'ın aktif, GTP'ye bağlı formunun oluşumunu destekleyerek (60), kaskadın aşağısında yer alan hücre çoğalmasını, hareketliliğini ve apoptozu düzenleyen mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), RAS/RAF/MEK/MAPK yolu ve PI3K yolaklarını aktive eder (49,59). Buna karşılık, KRAS sinyali, GTP hidroliz aktivitesini uyaran çeşitli GAP'ler (p120 GAP ve NF1) tarafından Ras'ın inaktif, GDP'ye bağlı formunun oluşumunu teşvik etmek için negatif olarak kontrolünü sağlayarak Ras aktivasyonunu sonlandırılır (63).

Akciğer adenokarsinomasındaki KRAS mutasyonları; çoğunlukla kodon 12'de bulunan hotspot bölgelerdeki tek amino asit değişimlerinden oluşur, ancak daha nadir olarak kodon 13 ve 61'de bulunabilmektedir (46). Akciğer kanseri

adenokarsinom vakalarında G12C (%40) en sık görülen KRAS mutasyonu olmasıyla birlikte, G12V (%21), G12D (%19), G12A (%7) ve diğer G12 ve G13 (%14) KRAS mutasyonları arasında görülen diğer izoformlarıdır (Şekil 2.2). Bu mutasyonlar, KRAS'ın GAP ile uyarılan GTPaz aktivitesini önemli ölçüde bozar ve bu da KRAS'ın sürekli aktive olmasına neden olur (63,64).



Şekil 2.2. İnsan LUAD'ında KRAS Mutasyonlarının Sıklığı (63).

KRAS, 1982'de insan tümörlerinde tanımlanan ilk onkogenlerden biri olmasına rağmen, etkili inhibitörler geliştirme çabaları neredeyse kırk yıldır başarısız olmuştur. Sotorasib (AMG510), FDA, CodeBreaK 100 denemesinde G12C mutasyonlu KRAS'lı hastalardaki %37 genel yanıt oranı ile Mayıs 2021'de için hızlandırılmış onay verilen tek KRAS inhibitörüdür (63).

2.9.7. Nöroblastoma RAS Viral Onkogen Homolog

Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog (NRAS) RAS ailesinin ikinci en sık mutasyona uğrayan üyesidir. KHDAK hastalarının yaklaşık %1'inde gözlenmektedir (65). Kromozom 1p13.2 yer almaktadır (61). Akciğer kanserinin bu nadir alt grubuna ilişkin klinik veriler azdır. NRAS mutasyonu KHDAK yüksek bir

kodon 61 mutasyon sıklığına sahiptir. Bu, gelecekteki NRAS hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için önemli bir faktördür (65).

2.9.8. V-Raf Murin Sarkom Viral Onkogen Homolog B

BRAF (V-Raf murin sarkom viral onkogen homolog B), RAS'ın aşağı akış efektör proteini olan bir serin/treonin protein kinazını kodlar ve hücre proliferasyonunun ve sağkalımının regülasyonunda yer alan MAPK sinyal iletim yolunu aktive eder (46,66). Sağlıklı dokuda BRAF kinazı, sinyal kaskadda bir sonraki noktaya geçtiğinde negatif geri besleme yoluyla devre dışı bırakılır. MAPK yolunda meydana gelen BRAF mutasyonları, akış aşağı hücre sinyallemesinin kalıcı aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu şekilde hareket eden BRAF mutasyonları, kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasına yol açabilen onkojenik sürücüler olarak hareket eder. Bu süreçten sorumlu en yaygın olarak tanımlanan BRAF varyantı, V600E nokta mutasyonudur (67).

BRAF mutasyonları ağırlıklı olarak hairy cell lösemi (%100), melanom (%50), papiller tiroid karsinoması (%45), kolorektal kanser (%10) ve nadiren over ve akciğer kanserlerinde görülmek üzere tüm insan kanserlerinin %8'inde bulunur. BRAF mutasyonları adenokarsinomda %3 oranında saptanır (46). Ayrıca KHDAK'de en sık adenokarsinomun grubunda tanımlanır (67).

BRAF mutasyonlu KHDAK artık nadir görülen bir akciğer kanseri formu olarak kabul edilmektedir. Ulusal kapsamlı kanser ağı (NCCN) ve ESMO kılavuzları bir V600E mutasyonu olan hastalar için ilk veya sonraki tedavi hatlarında BRAF/MEK inhibitörlerinin kullanılmasını önermektedir (67).

2.9.9. TP53

İnsanlarda TP53 geni; 17. kromozomun (17p13.1) kısa kolunda yer alan, hücre döngüsü kontrolü, DNA onarımı ve apoptoz kontrolü, otofaji ve metabolizmanın düzenlenmesinde görev alan çok sayıda hedef genin ekspresyonunu düzenleyebilen tetramerik yapıda transkripsiyon faktörü olarak işlev gören bir tümör supresör genidir (68).

TP53 gen mutasyonlarının çoğu, P53 proteininin DNA bağlanma alanını (DBD) kodlayan bölgesindeki yanlış anlamlı mutasyonların varlığı ile oluşmaktadır. Bu bölge içinde, hotspot mutasyonları olarak adlandırılan sekiz aminoasit değişimi (R175H, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273S ve R282W), insan kanserlerinde tanımlanan tüm mutant P53 proteinlerinin yaklaşık %27'sini temsil etmektedir (68).

TP53 inaktivasyonu, küçük hücreli karsinomların %90'ında ve KHDAA'nin yaklaşık %65'inde meydana gelen, TP53 lokusu içeren 17p13 hemizigot delesyonu ile akciğer kanserindeki en önemli genetik anormalliklerden biridir. TP53'te inaktive edici mutasyonlar (çoğunlukla DNA bağlama alanındaki yanlış anlamlı mutasyonlar) küçük hücreli akciğer karsinomlarının %80-100'ünde rapor edilmiştir (49).

Şimdiye kadar birçok çalışma, KHDAA'de p53 anormallikleri ile platin ilaçlara kemosensitivite arasındaki ilişkiye odaklanmıştır. Ancak sonuçların hala birbirleriyle tutarlı olmadığı görülmüştür. Örneğin, bazı çalışmalar, p53 aşırı ekspresyonunun KHDAA hastalarında platin ilaçlara karşı kemosensitiviteyi arttırdığını bildirirken, diğer bazı çalışmalar, p53 aşırı ekspresyonunun platin ilaçlara karşı kemosensitiviteyi azalttığını bildirmiştir. Bu arada, birkaç farklı çalışmada ise, p53 protein anormalliğinin plazma ile karşı kemosensitiviteyi etkilemediğini öne sürmüştür (69).

2.9.10. PI3K/AKT/mTOR

PI3K/Akt/mTOR yolu hücre siklusu, hücre yaşamı, protein sentezi, büyüme, metabolizma ve angiogenez gibi önemli fizyolojik olaylarda rol alan merkezi bir sinyal iletim yoludur. Bu yolak birçok tümör tipi tarafından bazı genetik ve epigenetik mekanizmalar ile kullanılmaktadır (70).

PI3K'ler, fosfatidilinositol ve fosfoinositidlerin 3' hidroksil grubunu fosforile eden hücre içi lipid kinazların bir ailesidir. Her biri sinyal iletiminde farklı rollere sahip olan üç sınıfa (I-III) ayrılırlar. Sınıf I PI3K'ler kendi içinde, büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlar tarafından aktive edilen sınıf IA PI3K'lere ve G protein bağlı reseptörler tarafından aktive edilen sınıf IB PI3K'lere ayrılır. Sınıf IA PI3K, p85 olan alt biriminden ve bir p110 katalitik alt biriminden oluşan bir heterodimerdir. p85

düzenleyici alt birim, sırasıyla p85 α , p85 β ve p55 γ izoformlarını kodlayan PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 genleri tarafından kodlanır ve p110 katalitik alt birimi ise, sırasıyla p110 α , p110 β ve p110 δ izoformlarını kodlayan PIK3CA, PIK3CB ve PIK3CD genleri tarafından kodlanır. Sınıf II PI3K'ler yalnızca p110 benzeri bir katalitik alt birimden oluşur. PIK3C2A, PIK3C2B ve PIK3C2G genleri sırasıyla PIK3C2 α , PIK3C2 β , PIK3C2 γ izoformlarını kodlar. Sınıf III PI3K, PIK3C3 geni tarafından kodlanan tek bir katalitik üye, Vps34'den (vacuolar protein sorting 34) oluşur. Vps34, PIK3R4 geni tarafından kodlanan adaptör protein Vps15'e bağlanır. Her bir PI3K sınıfının rolü, genel olarak hücre sinyalleşmesindeki (sınıf I ve II) veya membran trafiğindeki (sınıf II ve III) önemine göre kategorize edilebilir (71).

Akt, AGC (PKA/PKG/PKC) protein kinaz ailesinin bir üyesidir ve sırasıyla 14q32, 19q13 ve 1q44 kromozomlarında bulunan Akt1, Akt2 ve Akt3 olmak üzere üç homologdan oluşmaktadır (71). Akt, PI3K yolağında merkezi mediatör olup, kilit hücresel olayları kontrol eder. Akt'nin işlevi, çatal başlı (FOXO) transkripsiyon faktörleri ailesi, p53 bağlayıcı protein (MDM2), proapoptotik protein BCL2-hücre ölümü antagonisti (BAD) ve tüberoskleroz 1 ve 2 (TSC1/2) gibi hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve protein sentezini ve dolayısıyla hücre büyümesini düzenlemek için sayısız aşağı akış sitoplazmik ve nükleer substratı fosforile etmek, aktive etmek veya inaktive etmektir (71,72). PI3K yolak aktivitesi SHIP, PTEN gibi bazı proteinlerin yardımıyla da durdurulabilir NF κ B transkripsiyon faktörü, PI3K/Akt yolu aktivasyonun da çok önemli bir rol oynar. NF κ B, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü, bağışıklık modülasyonu, hücre sağkalımı ve hücre adezyonu ve farklılaşmasında rol oynayan yüzlerce genin gen ekspresyonunu düzenler. Akt, NF κ B'nin I κ B ailesi ve özellikle I κ B α tarafından negatif düzenlenmesini önler. I κ B α , NF κ B'yi DNA'dan uzaklaştırır ve sitoplazmaya geri döndürür (71).

Akt aktivasyonundan kaynaklanan bir diğer önemli aşağı akış yolu, protein kinaz mTOR'un aktivasyonudur. Rapamisin'in memeli hedefi (mTOR), kinazların fosfatidilinositol kinazla ilişkili kinaz (Pikk) ailesinin üyesi olan bir serin-treonin kinazdır. mTOR proteini sitoplazmada bulunan mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTORC2 bileşenlerinden oluşur (71). mTOR'un önemli fonksiyonlarından biri hücre siklusunun ilerlemesinde yer alan siklin D1, c-myc proteinlerin mRNA

translasyonlarını düzenlemesi ve p27 ve p21 gibi hücre siklusu inhibitörlerini inaktive etmesidir (70).

PIK3CA'daki mutasyonlar çoğunlukla p110 α 'nın helikal bölgesini kodlayan ekson 9 ve p110 α 'nın katalitik bölgesini kodlayan ekzon 20'de toplanmıştır. Bu mutasyonlar hepatoselüler kanserlerin %36'sında, meme ve kolon kanserlerinin %26'sında tespit edilmiştir. Daha düşük oranlarda PIK3CA mutasyonları yumurtalık, gliomalar, mide ve akciğer kanserlerinde de görülür. PIK3CA amplifikasyonları ise, özellikle skuamöz hücreli karsinomlarda da yaygındır. Bu amplifikasyonlar serviks kanserlerinin %69'unda, akciğer SCC'sinin %66'sında ve baş ve boyun kanserlerinin %42'sinde görülmektedir. Ayrıca mide, tiroid, meme, özofagus adenokarsinomu ve akciğer adenokarsinomlarında görülmektedir (71).

2.9.11. Fosfataz ve Tensin Homoloğu

Kromozom 10'daki fosfataz ve tensin homologue (PTEN), fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatın (PIP3) PIP2'ye dönüşümünü katalize etmek için lipid fosfataz kodlayan güçlü bir tümör supresör gendir. Böylece PI3K sinyalini antagonize eder ve hücre döngüsü ilerlemesi, çoğalma, hayatta kalma, motility ve metastaz dahil olmak üzere çoklu hücresel süreçleri bastırır. PTEN, endometriyal karsinom, glioblastoma multiforme, cilt, meme, prostat ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde yetersiz durumda ya da aşağı regüle edilmiştir. Bu nedenle, yüksek PIP3 seviyeleri, apoptozu baskımlarken hücresel büyümeyi ve çoğalmayı teşvik eder (73).

PTEN mutasyonları KHDAK'lerinin yaklaşık %5'inde görülmekte olup; bu oran skuamöz hücreli karsinomda adenokarsinoma göre daha sıktır ve sigara içme öyküsü ile ilişkilidir (46). Akciğer kanserinde PTEN, p53, Oct4, c-Jun ve NF-kappa B tarafından düzenlenir. Hem gen promotör metilasyonu hem de histon modifikasyonu ile epigenetik susturma, PTEN ekspresyonunu baskılayabilmektedir (73). Akciğer kanserlerinin çoğunda PTEN ekspresyonu kaybı gözlenmesi, hastalarda daha kötü prognoz ile sonuçlanmaktadır (74). PTEN kaybı KHDAK'lerinin yaklaşık %75'inde görülür (46). Akciğer kanserinde PTEN ekspresyonunun düzenlendiği mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (73).

KHDAK'de EGFR mutasyonu PTEN kaybı birlikte bulunabilir ve bu hastaların prognozunu olumsuz etkileyebilir. PI3K yolunun EGFR sinyal yolunun aşağı akışında olduğu göz önüne alındığında, PTEN inaktivasyonunun EGFR TKI'leri ile tedavi edilen hastalarda progresyon ve/veya terapötik dirençte önemli bir rol oynaması muhtemeldir (74). Tirozin kinaz inhibitörü olan Vandetanib'in, PTEN kaybı gösteren EGFR mutasyon-pozitif akciğer kanseri hücre hatlarına karşı etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (46).

2.10. Likit Biyopsi

Likit biyopsi, vücut sıvılarında prognostik veya diyagnostik olarak anlamlı tümör kaynaklı belirteçleri saptamak için minimal invaziv bir yaklaşımdır (8). Son birkaç yılda, klinik amaçlar için dolaşımdaki biyobelirteçlerin saptanması ve kullanılması, özellikle onkolojide radyolojik prosedürler ve geleneksel biyopsilere potansiyel bir alternatif ve/veya korelasyon olarak ortaya çıkmıştır. Plazmada dolaşan hücresiz nükleik asitlerin (cfNA'lar) DNA veya RNA formunda saptanması, kanserden etkilenen hastalarda klinik amaçlar için ciddi potansiyel sağlar. Dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA), yani tümör hücrelerinin apoptoz ve nekrozundan, neoplastik hücrelerden veya hücre dışı veziküllerden aktif salım süreçlerinden türetilen hücresiz DNA'nın (cfDNA) fraksiyonu, neoplastik hastalarda en umut verici biyobelirteçlerden birini temsil eder. Ayrıca bu yöntem klinik uygulamaya geçiş için ciddi potansiyele sahiptir (75). Diğer cfNA türleri ise, mikroRNA (miRNA) ve kodlamayan RNA (ncRNA) gibi RNA içeren biyobelirteçleri içermektedir (76). Günümüzde kullanımı gittikçe yaygınlaşan likit biyopsiler ile tümör kaynaklı bir ürün, dolaşımdaki tümör hücresi (CTCs), ekzozom, dolaşımdaki tümör DNA (ctDNA) ya da RNA'sı (ctRNA) ya da tümör eğitilmiş trombositler (tumor educated platelets: TEPs) basit bir kan örneğinden tespit edilebilmektedir (77).

2.10.1. Hücre Dışı DNA'nın Keşfi

Kan plazmasında Mandel ve Metais tarafından 1948 yılında keşfedilen hücre dışı DNA'lar (78) tüm biyolojik sıvılarda var olduğu bilinen kısa DNA parçalarıdır (79). Radyoterapi gören kanser hastalarının kan serumlarında cfDNA'nın yüksek

olduğu ve tümör markır olarak kullanılabileceği 1977 yılında Leon ve ark. tarafından saptanmıştır (80). Bu çalışmada [125I]-İyododeoksiüridin etiketli DNA'yı izleyerek plazmada dolaşan DNA'yı ölçmek için radyoimmünoassay yöntemini geliştirmişlerdir. Normal kontrollerde ortalama cfDNA seviyesi 13 ng/mL iken; kanser hastalarında 180 ng/mL'ye ulaşabilir. Daha ileri evrelerde, metastatik hastalığı olan hastaların plazmasında ise yaklaşık 209 ng/mL'ye kadar yükselebilir. Radyoterapiyi takiben kanser hastalarında cfDNA düzeylerinin kademeli olarak azalması, cfDNA ve hastalığın ilerlemesi arasındaki kapsamlı bir korelasyonu destekler. 1989'da Stroun ve arkadaşları "dolaşan tümör DNA'sı" veya ctDNA olarak bilinen tümör hücrelerinden dökülen parçalanmış DNA'yı, malign olmayan hücrelerden farklı özelliklerine dayanarak ilk sınıflandırmayı yapan kişilerdir (81). Sorenson ve arkadaşları, cfDNA'nın bir komponenti olan ve circulating tumor DNA (ctDNA) olarak da bilinen komponent 1994 yılında KRAS ve NRAS mutasyonlarının pankreas kanserli ve akut miyeloid lösemili iki ayrı hastada gösterilmesi ile tanımlanmış oldu (82,83). Diehl ve arkadaşları cfDNA üzerindeki nokta mutasyonlarını taramak için BEAMing methodunu, büyük kanser hastaları kohortlarında 2005 yılında klinikte uygulamaya başlamışlardır (84). 2008 yılında yapmış oldukları çalışmalarında kolorektal kanser hastalarında cerrahi rezeksiyon öncesi ve sonrası cfDNA seviyeleri ile tümör yükü arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (85). Dawson ve arkadaşları 2013 yılında, DNA dizileme teknolojisindeki gelişmelerle beraber ilk kez, metastatik meme kanserinde kanser ilerlemesini ve takibini izlemek için, cfDNA'yı somatik genomik değişiklikleri tanımlamak için kullandılar (86). Kısa bir süre sonra, ctDNA üzerinden kolorektal kanser hastalarında KRAS ve BRAF mutasyonlarının tespitinin klinik doğrulamasını yaparak, cfDNA analizi yoluyla likit biyopsinin avantajlı bir şekilde tümör kesit analizinin yerini alabileceğini ve kanserli hastalar için kişiselleştirilmiş tıbbın kapsamını genişletebileceğini göstermişlerdir (87). Günümüze kadar FDA tarafından onaylı cfDNA testleri sınırlıdır. Klinisyenlerin erlotinib veya osimertinib tedavisi için uygun olan akciğer kanseri hastalarını belirlemelerine yardımcı olmak için tasarlanmış bir test olan cobas EGFR Mutasyon Testi ve FDA onaylı ilk test olmuştur. Sonrasında SEPT9 promotörünün metilasyon durumuna dayalı bir kolorektal kanser (CRC) tarama testi olan Epi proColon rutin klinik uygulamada

yerini almıştır (88). ABD FDA, rucaparib tedavisi için uygun yumurtalık kanseri olan hastalarda BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının tanımlanmasıyla ilgili likit biyopsi yeni nesil dizilemeye dayalı FoundationOne Liquid CDx testini 2020 yılında onaylamıştır (89).

2.10.2. Hücre Dışı DNA'nın Doku Kökeni

Hücre dışı DNA'nın kaynağı, kanserde ve diğer patolojik durumlarda merak uyandıran bir sorudur. cfDNA kökeninin belirlenmesi, etkilenen doku veya organların ortaya çıkarılmasına katkıda bulunabilir ve cfDNA dökülme mekanizmaları hakkında bizlere bilgi sağlayabilir. Dolaşan tümör hücrelerinin cfDNA'nın ana kaynağı olmadığı varsayılabilir. Gerçekten de kandaki cfDNA miktarı birkaç bin genomik eşdeğere karşılık gelir ve kanda dolaşan çok daha az tümör hücresi bulunur. Toplam cfDNA'nın önemli bir kısmı mutasyona uğramamış DNA'dan oluşur. Çeşitli çalışmalara göre, ctDNA fraksiyonu cfDNA'nın ~%0,1-89'unu oluşturur, ancak hastalığın ilerlemesi ile bu değer artabilir. Sonuç olarak, cfDNA'nın büyük kısmının tümör mikro çevresindeki hücrelerden kaynaklandığı, hipoksik koşullarda yok edildiği veya antitümör yanıtında yer alan hücrelerden kaynaklandığı tahmin edilebilir (8).

Hücre dışı DNA'nın nükleozom footprint'i, orijinal dokuların gen ekspresyonu bilgisini taşır ve bu nedenle kemoterapiye yanıtı tahmin etmek için kullanılabilir (90). Sağlıklı bireylerde yapılan cfDNA'nın dokuya özgü metilasyon paternlerinin tüm genom dizi analizleri sonucunda çoğu cfDNA'nın hematopoietik kökenli olduğu da (%55 beyaz kan hücreleri ve %30 eritrosit progenitörleri) anlaşılmıştır (8,81).

2.10.3. Dolaşıma CfDNA ve Alt Fraksiyonlarının Salınımının Mekanizmaları

DNA fragmanlarının boyutları önemli biyolojik bilgilere ulaşmayı sağlamaktadır. Farklı cfDNA boyut dağılımı, kapalı veya açık kromatine bağlı olarak nükleozom occupancy ile ilişkilidir (81). Bir hücre çekirdeğinde histonların çevresinin 146 bp'lik DNA ile sarılmasıyla nükleozomlar oluşur. Hücreler apoptoz

veya nekroz geçirdiğinde, bu nükleozomlar kan dolaşımına salınır ve plazmada serbestçe dolaşır. Hücre dışı bu DNA fragmanlarının uzunlukları yaklaşık 10 bç ile 150 kbç arasında değişebilmektedir (81,91). İlginç bir şekilde, araştırmalar tümör hücrelerinden salınan ctDNA'nın, somatik hücrelerden elde edilen cfDNA'dan daha kısa olduğunu göstermiştir. ctDNA genellikle cfDNA'dan daha kısadır ve ortalama uzunluğu 132-145 baz çiftidir. Bununla birlikte cfDNA ve ctDNA arasındaki fragman uzunluğu farkı yaklaşık 20 bp'dir (92–94)

Apoptoz sırasında DNA, ilk önce büyük parçalara (50-300 kb) ve daha sonra nükleozomal birimlerin katlarına (180-200 bç) parçalanır. Dolaşımdaki cfDNA büyüklüğünün sıklıkla düzgün biçimde kesilmiş fragmanlar olduğu ve bunların apoptotik veziküllerde gözlemlenmesi ile birlikte, cfDNA ana kaynağı olarak apoptoz gösterilebilir (91). Apoptozdan farklı olarak, nekrotik hücrelerin kromatini spesifik olmayan bir şekilde sindirimi gerçekleşmektedir. Böylece çeşitli boyutlarda DNA fragmentlerinin, özellikle yüksek moleküler ağırlıklı 10 kb'dan daha uzun DNA parçalarının nekrotik hücre ölümünden kaynaklandığı kabul edilmektedir (8,81). Kanseri dokulardan türetilen hücre dışı veziküller (EV), oldukça değişken boyutta zarla çevrili yapılardır. EV DNA'ları üzerine yapılan ilk çalışmalardan birinde, farklı EV popülasyonlarının (apoptotik cisimler, mikro-parçacıklar ve eksozomlar) TP53 veya PTEN mutasyonlarını barındırdığını göstermiştir. Vagner ve ark. (2018), çoğu ctDNA'nın büyük (1-10 µm çapında) hücre dışı veziküllerde paketlenildiğini göstermiştir (95).

2.10.4. CfDNA'nın Klirensi

Dolaşımdaki hücre dışı DNA seviyesi, DNA salınımı ve DNA temizleme süreçleri arasındaki denge ile belirlenir. cfDNA klirensi “home” dokusunda, kanda veya diğer vücut sıvılarında ve karaciğer, dalak, böbrek veya lenf düğümleri gibi organlarda meydana gelebilir. Dolaşımdaki cfDNA'nın tahmini yarı ömrü, birkaç dakika ile 1-2 saat arasında değişir. İlginç bir şekilde, fetal DNA'nın anne kanından temizlenmesi iki fazlı bir şekilde gerçekleşir: ilk olarak, ortalama yarılanma ömrü ~10 dakika ile 1 saat olan hızlı bir faz oluşmaktadır. Daha sonra ortalama yarılanma ömrü ~13 saat olan ikinci bir yavaş faz meydana gelir. Tavşan baş ve boyun kanseri

modelinde cerrahi tümör rezeksiyonu sonrası ctDNA seviyesinin yarılanma ömrü 23-52 dakika arasındadır. Bazı araştırmalar da kolorektal kanserli hastaların ctDNA'larının seri analizi ile, 114 dakikalık bir yarı ömür göstermişlerdir. cfDNA'nın kısa yarı ömrü, cfDNA'nın “gerçek zamanlı” analizleri için uygundur ve çeşitli patofizyolojik koşullarda tedaviye yanıt değerlendirmelerini ve dinamik doku durum değerlendirmelerini kolaylaştırır (8).

2.10.5. Akciğer Kanserinde Likit Biyopsinin Klinik Önemi

Akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavinin başarısı ve hastalığın yönetimi için, tümöre özel moleküler profilin belirlenmesi çok önemlidir. Aynı hastada olsa bile her bir tümörün moleküler profili farklı olabilir ve yine her bir tümörün zaman içindeki moleküler devinimi değişebilir. Tümör içi ve arası heterojenite olarak tanımlanan bu sonuç aslında tümörün klonal gelişim sürecidir ve bu dinamik moleküler değişimin bilinmesi ve takibi, tedavi başarısının takibi için esastır (96). Aksi takdirde; ilaca dirençli tümörlerin gelişmesine ve tedavinin başarısız olmasına katkıda bulunur (7). Tümör içinde ilaca dirençli mutasyon taşıyan küçük bir genetik klon, tedavilerden sonra yayılabilir. Bu genetik klonlar, düşük prevalans veya tümör içindeki hücrelerin uzaysal dağılımı nedeniyle doku biyopsilerinde gözden kaçırılabilir (7). Başka bir deyişle longitudinal klonal evolüsyonun takibi tedavi başarısında bu kadar önemli iken, aktif takip için gereken tümör örneklemeleri, yani biyopsi alınması, pratikte efektif uygulanabilirliği olan bir yaklaşım değildir (96). İlginç bir şekilde, ctDNA, tedavinin baskısına yanıt olarak dinamik klonal ve alt klonal evrimi izlemek için kullanılabilir (7).

Akciğer kanserinde artan cfDNA miktarının, KHDAK hastalarında prognostik faktör olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceği son çalışmalar ile gösterilmiştir. Wang ve ark çalışmalarında 1. nesil TKİ direnci olan hastalarda T790M mutasyonu saptamak amacıyla farklı iki PCR cihazı olan ddPCR ve dPCR cihazlarını ve yöntemlerini kıyaslamış ve T790M mutasyonu allel fraksiyonu artan hastaların T790M allel fraksiyonu daha az artan hastalara göre daha iyi PFS ve genel sağ kalım gösterdiğini ve T790M pozitif hastaların T790M negatif hastalara göre daha iyi sonuçlarını elde ettiklerini bildirmişlerdir (97). Başka bir çalışmada da NGS

yöntemi kullanılarak metastatik KHDAC hastalarında cfDNA seviyeleri yüksek olanların kanlarındaki varyant sayılarına bakılmaksızın kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (98).

Bu çalışmalarda da gösterildiği gibi cfDNA miktarındaki artış KHDAC hastalarında prognostik faktör olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, likit biyopsilerden plazmanın ayrılması, plazmadan serbest DNA izolasyonu, izole edilen uygun kalite ve miktardaki DNA’lardan hedef bölge zenginleştirilmesi, her biri farklı bir barkod ile işaretlenmiş çalışma kütüphanelerinin oluşturulması, klonal amplifikasyon ve yeni nesil dizilemeden meydana gelmektedir. Ardından veri analizi ile çalışma kalitesinin tayini ve hastaların klinik öyküleri doğrultusunda varyant analizi ile varyantların biyoinformatik olarak yorumlanması yapılmaktadır.

DNA kütüphanelerinin oluşturulması için “ONCO/Reveal cfDNA Multi-Cancer Panel” ve dizileme çalışmalarında ise “illumina NextSeq” yeni nesil dizileme platformu kullanıldı. Çalışma öncesinde, her bir örneğin konsantrasyonu Qubit florometre sistemleri ile ölçülmüş olup, uygun konsantrasyonda olanlar tespit edildi. Ayrıca olası protein ve kontaminasyonları da Nanodrop spektrofotometre ile incelendi. Uygun örneklerde, hedef gen bölgelerine yönelik tasarlanmış primerler ile PCR gerçekleştirilerek bu bölgeler zenginleştirildi.

Kütüphane hazırlama sürecinde, kullanılan ONCO/Reveal cfDNA Multi-Kanser Panel Kitinin uygulanmasında üretici tarafından hazırlanan protokolü takip edildi. Kütüphane hazırlanması sürecinde ürün saflaştırma basamaklarında Agencourt AMPure XP (BeckmanCoulter) kullanıldı. Dizileme çalışması sonucunda, illumina NextSeq dizileme platformu kullanılarak her bir örnek için 2x150 bp'lik okumalarla toplamda 10 milyon okuma elde edildi.

Okuma sonucunda oluşturulan ham verilerin kalite kontrolleri FastQC aracı ile gerçekleştirildi. Elde edilen ham veriler Pivat 2022.1.1 analiz aracı kullanılarak referans genoma hizalanması gerçekleştirildi. Indel bölgelerindeki hizalama düzeltmelerinin yapılması, DNA dizi kalite değerlerinin normalize edilmesi ve varyant çekimi işlemleri uygulandı. Bu analizle tüm ve hedef bölge okuma sayıları, kalite skoru ($Q30 \geq 75$), forward/reverse okuma dengesi ve hedef bölgelerin okuma derinliği ($\geq 20x$) parametreleri veri kalitesini değerlendirmek için kriter olarak alındı. Elde edilen tüm varyantlar, bu program içinde Integrative Genomics Viewer (IGV) aracı ile gözle kontrol edildi. Varyant anotasyonlarında filtreleme yapıldı. Sonrasında

“True Positive Varyants” seçeneği kullanılarak yüksek güvenilirlikteki varyantların listesine erişildi. Varyantların patojenite sınıflandırılması, allel frekansları, COSMIC ID’leri için database bağlantı linki ve ilaç önerisi olup olmadığı görülmüştür. Ayrıca varyantların klinik olarak anlamlandırılması ve patojenisitesinin belirlenmesi amacıyla başta PIVAT (Pillar Variant Analysis Tool Kit) programı olmak üzere ClinVar, Varsome, ve ACMG (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji), dbSNP ve diğer veri tabanları kullanıldı. Ayrıca in silico analizler için PolyPhen-2 (Polimorfizm Fenotiple v2) ve SIFT (sorting intolerant from tolerant), I Mutant 2.0, Hope programlarından yararlanıldı.

3.1. Çalışma Onayı

Araştırmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 17.02.2021 tarih ve 5/85 sayılı kararı ile kabul edildi.

3.2. Hasta Seçimi

Bu çalışma prospektif bir çalışma olup, çalışmaya dahil edilen tüm hastaların çalışmaya katılımları, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunun araştırma projesi bilgi ve taahhüt formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış, bilgilendirilmiş, gönüllü onam formları doldurularak sağlandı. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı’na başvuran KHDAK tanısı almış, cinsiyet farkı gözetmeksizin, 18-80 yaş arası, ECOG performans skoru 0-2 arası olan, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri normal aralıklarda, 3. ve 4. evre olup, henüz kemoterapi almamış özelliklere sahip toplam 24 hasta çalışmaya alındı. Hastaların klinik bilgileri hastane veri tabanı ve hasta dosya arşivinden elde edildi.

3.3. CfDNA İzolasyonu İçin Plazma Ayrımı

Her hastadan K2-EDTA içerikli tam kan tüplerine toplamda 10 ml olacak şekilde taze kan alındı. 24 saat içinde alınan taze periferik kan örnekleri 15000xg’de 10 dakika santrifüj edildi, ardından pelete dokunulmadan dikkatli bir şekilde 2 ml plazma kısmı (supernatant) çekilerek cfdna izolasyon protokolüne geçildi.

3.4. CfDNA İzolasyonu Uygulama Protokolü

Elde edilen plazma örneklerinden cobas® cfDNA Sample Preparation Kit (Roche) kullanılarak cfDNA izole edildi. cfDNA izolasyon kiti içerisinde bulunan WB I (DNA Wash Buffer I) ve WB II (DNA Wash Buffer II) yıkama tamponları ayrıca PK (Proteinase K) solüsyonları izolasyon öncesi hazırlandı. Liyofilize haldeki PK üzerine 4,5 ml steril su eklenerek sulandırıldı. Su ile çözündürülmüş olan PK solüsyonu her örnek için ayrı ayrı kullanılmak üzere 250 µl'lik hacimlerde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktararak -20°C'de saklanmak üzere buz dolabına kaldırıldı. Yıkama tamponu I (WB I) içerisine 15 ml saf etil alkol eklenerek, yıkama tamponu II (WB II) içerisine 50 ml saf etil alkol eklenerek hazırlandı. Solüsyon tüpleri 5 ile 10 kez ters çevirerek karıştırılmış olup, sonrasında alkol oranları ile hazırlanış tarihi yazılarak etiketlendi. Sulandırılmış PK dışındaki tüm izolasyon komponentleri oda ısısında muhafaza edildi. 15- 30°C'de saklanan tüm solüsyonlar berrak olmalıdır. Herhangi bir solüsyonda çökelti varsa, çözeltiliyi çökelti çözülene kadar 37°C'de ısıtılmalıdır. Tüm çökelti çözülene kadar kullanılmamalıdır.

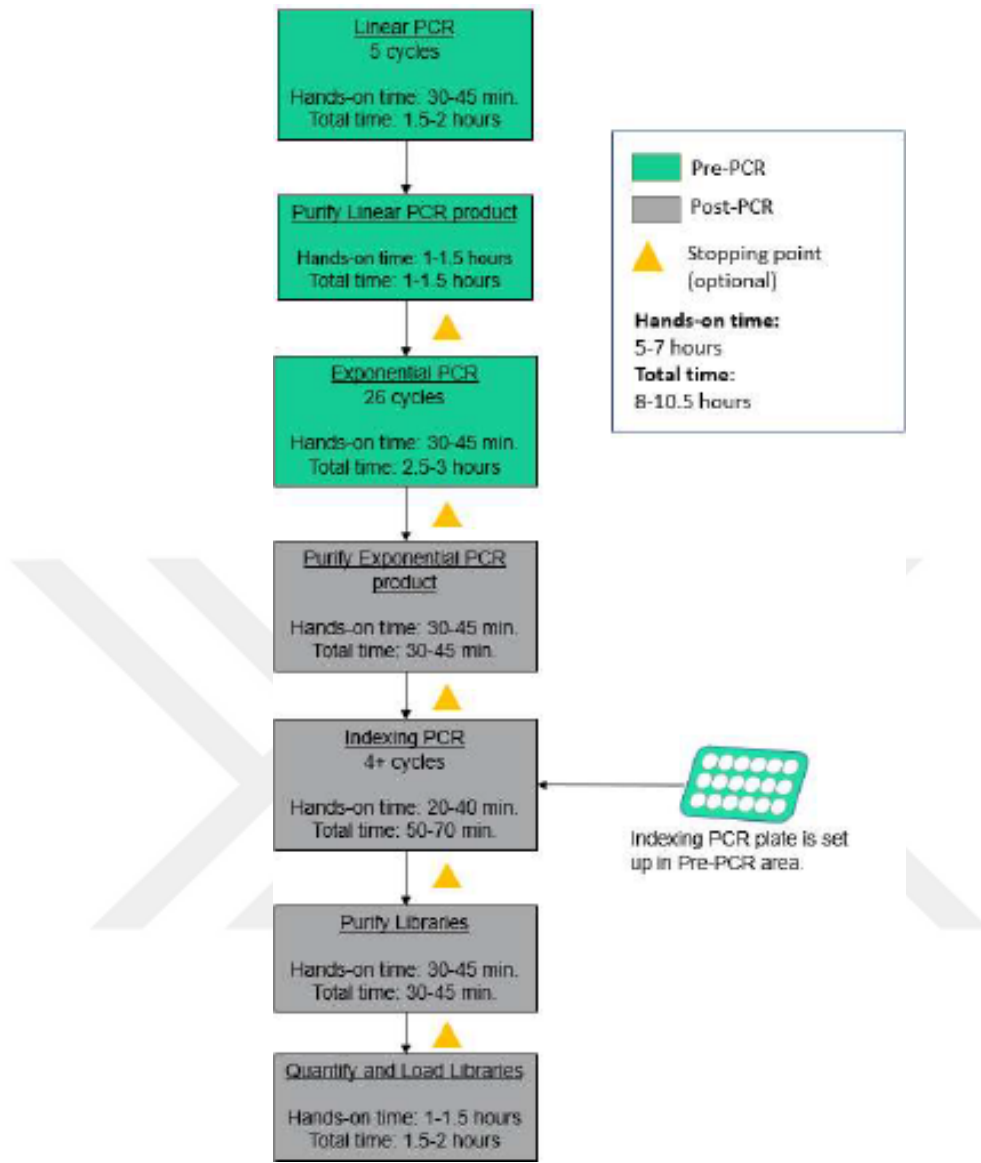
cfDNA izolasyon protokolü

- 2 ml plazma örneği 15 ml falcon içine alınarak, üzerine 2 ml DNA PBB buffer (DNA Paraffin^b Binding Buffer) ve 250 µl PK eklendi. 3-5 defa alt üst ederek karıştırıldı. Ardından 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- İnkübasyon sırasında, her örnek için kitin içinden çıkan bir adet HPEA FT (High Pure Extension Assembly Unit) tüpü ve 3 adet toplama tüp (CT) ayrıca elüsyon tüpü (1,5 ml mikrosantrifüj tüpü) isim veya numara ile etiketlendirildi.
- İnkübasyon işlemi sonrası karışımın üzerine 500 µl isopropil alkol eklenerek ardından 3-5 defa alt üst edildi.
- cfDNA izolasyonu için özel üretilmiş HPEA FT tüpüne tüm karışım aktarıldı.
- Ağzı sıkıca kapatılan HEPA FT tüpü 5 dakika 4000xg'de santrifüj edildikten sonra HEPA FT tüpü içerisindeki filtre çıkarılarak toplama tüpüne aktarıldı. Geriye kalan kısım ise atıldı.

- Filtre üzerine 500 µl WB I eklendikten sonra 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında toplama tüpü atılıp ve filtre yeni toplama tüpüne aktarıldı.
- Filtre üzerine 500 µl WB II eklendikten sonra tekrar 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında toplama tüpü atılarak, filtre yeni toplama tüpüne aktarıldı.
- Herhangi bir kimyasal eklenmeksizin 16000xg'de 2 dakika süresince boş santrifüj gerçekleştirildi. Boş santrifüj sonrası filtre etiketlenilerek 1.5 ml'lik steril ependorfa aktarıldı.
- Filtre üzerine 100 µl DNA EB (Elution Buffer) eklendi.
- Oda ısısında 5 dakika inkübe edildikten sonra 1 dakika 8000xg'de santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüp atılarak, içerisinde cfDNA bulunan ependorf tüpün ağzı iyice kapatılıp -80 °C'de mutasyon deteksiyon çalışması yapılana dek saklandı.
- Nanodrop 2000 cihazında ölçümleri yapılan ve 0,2-1 ng/µl cfDNA içeren örnekler çalışmaya alındı.

3.5. Kütüphane Hazırlama Protokolü

Aşağıdaki tablo, ONCO/Reveal PillarHS Multi-Cancer Panel kütüphane hazırlığının gerçekleştirilmesi için iş akışını göstermektedir.



Şekil 3.1. ONCO/Reveal PillarHS Multi-Cancer Panel Kütüphane Hazırlığı

3.6. Linear PCR: High Fidelity Linear Amplification

Protokolün bu kısmı için bir buz kovası hazırlandı. High Fidelity PCR Master Mix (HiFi PCR MMX) ve Linear PCR oligo pool buz üzerine yerleştirildi.

- Elde edilen cfDNA, son hacmi 35,5 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen suda seyreltilti. Kit protokülünde önerilen giriş aralığı 10-50 ng cfDNA'dır. İyi kalitede cfDNA kullanılıyorsa önerilen minimum giriş 10 ng olmalı veya düşük kaliteli cfDNA kullanılıyorsa, önerilen minimum giriş 25 ng olması dikkate alındı.

- PCR master mix hazırlanması öncesinde, HiFi PCR MMX ve oligo pool vortekslenip ardından spin yapıldı. İşlenmekte olan numune sayısı ve fazlası için yeterli bir master mix hazırlandı. Her bir PCR reaksiyonu için, her bileşenin hacmi aşağıda tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. Linear PCR Master Mix Hazırlanması

Reaktif	Hacmi (µL)
HiFi PCR Master Mix (4x)	12.5
Linear PCR oligo pool	2.0
Ara Toplam Hacim	14.5

Master mixi aktarırken seyreltilmiş DNA'yı buz üzerinde tutulmuştur. PCR tüpündeki her numune kuyusuna 14,5 µL master mix aktarıldı.

Tablo 3.2. Linear PCR Master Mix Seyreltilmiş DNA Eklenmesi

Reaktif	Hacmi (µL)
PCR master mix	14.5
Diluted DNA (or water)	35.5
Toplam Hacim	50.0

- Reaksiyonları dikkatlice kapatılıp ardından 10-15 saniye vortekslendi. Sonrasında kuyuların tabanındaki hava kabarcıklarını çıkarmak ve yan duvarlardan damlacıkları aşağı düşürmek için reaksiyonları kısaca spin yapıldı. Ardından plate thermal-cycler’a yerleştirilerek tablo 3.3’teki program çalıştırıldı.

Tablo 3.3. Thermal Cycler’da PCR Protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95°C	10 saniye	x1
95°C	10 saniye	x5
58°C	10 dakika	
8°C	Hold	Hold

- Thermalcycler'dan reaksiyon çıkarıldıktan sonra, AMPure saflaştırmasının hemen öncesine kadar bir buz bloğu üzerinde soğutulmuş halde bekletildi.

3.7. Linear PCR Ürününün Pürifikasyonu

Pürifikasyon işlemini gerçekleştirmeden önce AMPure boncuklarının oda sıcaklığına ulaşması çok önemlidir. Boncuk çözeltisinin sıcaklığı saflaştırma sürecini değiştirebilir. Bu yüzden Agencourt AMPure XP (BeckmanCoulter) boncuklarını kullanmadan önce en az 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Reaksiyonların ortam sıcaklığında uzun süre bırakılması ürün kaybına neden olabileceğinden sürelerle dikkat etmek önemlidir. Bu yüzden AMPure saflaştırmasını gerçekleştirmeye hazır olduğunda reaksiyonları tezgâh üzerinde 3-5 dakika süreyle ortam sıcaklığına getirildi.

3.8. Pürifikasyon Aşaması

- Şeffaf kaplama filmi çıkarılmadan önce yan duvarlardaki damlacıkları gidermek için plate kısaca spinlendi ve ardından şeffaf kaplama filmi PCR plate'den dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Pürifikasyon işlemini gerçekleştirmeden önce AMPure boncuk solüsyonunun homojen olması çok önemlidir. Düzgün olmayan bir dağılım, saflaştırma sürecini etkileyebilir. Bu yüzden kullanımdan önce AMPure XP boncuklarını kısa bir süre vorteks yapıldı.
- Her kuyuya homojinize edilmiş Agencourt AMPure XP Reagent (manyetik boncuk) 75 µL boncuk (örnek hacmi x 1,5) eklenmiştir. Karışımı 10 kez yukarı ve aşağı pipetaj işlemi yapılarak karışım sağlanmıştır. Ardından plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı. Eğer kuyuların dibinde kabarcıklar gözlenmişse, plate kısaca spinlenerek ardından tekrar karıştırıldı.
- Boncuklar eklendikten sonra 15 saniye vorteks yapıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin bekleme aşamasında, daha sonra boncukları yıkamak için kullanılacak olan 35 mL etanol ve 15 mL moleküler biyoloji dereceli suyu birleştirerek 50 mL %70'lik etanol solüsyonu hazırlandı.

- Plate manyetik standda yerleştirildi. Solüsyon berrak görünene kadar (5 dakika) manyetik stand üzerinde bekletildikten sonra pelete dokunmadan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Manyetik stand üzerinde yerleştirilip, boncukları bozmadan her kuyuya 150 μ L taze hazırlanmış %70'lik etanol eklendi. 30 saniye inkübasyonun ardından süpernatant dikkatlice atıldı.
- İkinci kez alkol yıkaması tekrarlanarak istenmeyen moleküllerin temizlenmesi sağlanmış oldu. Ardından süpernatant dikkatlice atıldıktan sonra, alkolün tamamen uzaklaştırılabilmesi için 5 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Burada dikkat edilmesi gereken husus boncuk halkasının ortasında küçük çatlaklar oluştuğu anda işlemi sonlandırmalıyız. Boncuk halkasının tamamında büyük çatlaklar oluşmuşsa veya pul pul dökülmüşlerse, aşırı kurumuşlardır. Sonucunda çok kuru olan boncukların yeniden süspanse edilmesi zor olabilmektedir.
- Plate manyetik standdan alındı ve kurutulmuş boncukları 52 μ L nükleaz içermeyen su kullanarak her kuyuda yeniden süspanse edildi. Süspansiyon için 10 kez yukarı ve aşağı yavaşça pipetleme yapıldı. Kuyuların dibinde kabarcıklar oluşursa, plate kısaca döndürülüp ve tekrar karıştırıldı.
- Ürünü elüsyon etmek için plate ortam sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Çözelti berrak görünene kadar plate manyetik stand üzerinde bekletilerek, boncukların üründen ayrılması gerçekleştirildi.
- Yeni bir PCR plate karşılık gelen kuyulara 50 μ L elüsyon pipetleyerek elüe edilen ürün aktarıldı. Ardından yukarıda açıklanan saflaştırma işlemleri tekrarlanarak ikinci bir pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Yukarıda bahsedilen işlemlerdeki tek fark kurutulmuş boncukları 25 μ L nükleaz içermeyen su kullanarak her kuyuda yeniden süspanse edilmesidir.
- İkinci pürifikasyon işleminin son aşamasında PCR ürünü boncuklardan tamamıyla ayrıştırılmalıdır. Pelet kısmında 3 μ L solüsyon bırakarak, boncuklardan ayrıştırılan üründen exponential PCR reaksiyon plate'ine 22 μ L elüsyon (süpernatant) aktarıldı. Plate şeffaf kaplama filmi ile kapatılıp ve exponential PCR kurulumu sırasında en az 5 dakika buz üzerinde bekletildi.

3.9. Exponential PCR: High Fidelity Exponential Amplification

- PCR master mix hazırlanması protokolünün bu kısmında High Fidelity PCR Master Mix (HiFi PCR MMX) ve Exponential PCR oligo pool buz üzerinde tutulmuştur. Kullanmadan önce her iki reaksiyonu iyice vorteksleyip ardından spin yapıldı. Her bir PCR reaksiyonu için, her bileşenin hacmi tablo 3.4'te gösterildi.

Tablo 3.4. Exponential PCR Master Mix Hazırlanması

Reaktif	Hacmi (µL)
HiFi PCR Master Mix (4x)	12.5
Exponential PCR oligo pool	2.0
Su	13.5
Toplam Hacim	28.0

- Her kuyusunda 22 µL saflaştırılmış Lineer PCR ürünü içeren soğutulmuş plate 28 µL master mix doğrudan eklendi.

Tablo 3.5. Saflaştırılmış Lineer PCR Ürününe Master Mix Ürünün Eklenmesi

Reaktif	Hacmi (µL)
PCR master mix	28.0
Saflaştırılmış Lineer PCR Ürünü	22.0
Toplam Hacim	50.0

- Reaksiyonları dikkatlice kapatılıp ardından 10-15 saniye vorteks yapıp ve kuyuların tabanındaki hava kabarcıklarını çıkarmak için kısaca spinlendi.
- Ardından plate thermal-cycler'a yerleştirilerek tablo 3.6' daki program çalıştırıldı.

Tablo 3.6. Thermal Cycler’da PCR Protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95°C	15 saniye	x5
60°C	10 dakika	
95°C	15 saniye	x1
66°C	6 dakika	
95°C	15 saniye	X20
66°C	2 dakika	
8°C	Hold	Hold

3.10. Exponential PCR ürünün saflaştırılması

- Numuneler -20°C'de saklanmışsa veya yoğunlaşma oluşmuşsa, yan duvarlardaki damlacıkları gidermek için numuneleri çözdürdükten sonra kısaca spin yapılmıştır. Sonrasında şeffaf kaplama film dikkatlice açıldı.
- Agencourt AMPure XP boncuklarını 4°C'den çıkarılmış ve kullanımdan önce en az 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından tüm boncuklar iyice homojenize olana kadar vortekslendi.
- Kuyucuklarda reaksiyon hacmi 50 µL olup olmadığı kontrol edilerek, hacmi 50 µL olmayan gözlenmiş ise nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır.
- Her kuyuya Agencourt AMPure XP Reagent (manyetik boncuk) 75 µL boncuk (örnek hacmi x 1,5) eklendi. Karışımı 10 kez yukarı ve aşağı pipetaj işlemi yapılarak karışım homojenize olması sağlanmıştır. Ardından plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı. Eğer kuyuların dibinde kabarcıklar gözlenmişse, plate kısaca spinlenerek ardından tekrar karıştırılmıştır.
- Örnekler 15 saniye vorteks yapıp ardından oda sıcaklığında 5 dakika inkübe ederek boncukların PCR ürününe bağlaması sağlanmıştır. Bekleme sürecinden sonra boncukları yıkamak için kullanılacak olan 35 mL etanol ve 15 mL moleküler biyoloji dereceli suyu birleştirerek 50 mL %70'lik etanol solüsyonu hazırlanmıştır.
- Çözelti berrak görünene kadar PCR plate manyetik standa yerleştirildi. Beş dakika bekletilip, süpernatantı her bir kuyudan dikkatlice uzaklaştırıldı.

- Manyetik stand üzerindeyken her bir kuyuya 150 µl %70'lik etanol eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildikten sonra süpernatant dikkatlice atıldı.
- İkinci kez %70'lik etanol ile yıkama tekrar yapıldı ardından süpernatant dikkatlice atıldı. Eser miktarda dahi olsa etanolün kalmaması için 10-15 saniye spin yapıldı. Tekrar manyetik standla alınarak kuyuların dibinde kalan etanol solüsyonunu 10 veya 20 µL'lik bir uç kullanarak ortamdan uzaklaştırıldı.
- Boncuklar 2-5 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Burada dikkat edilmesi gereken husus boncuk halkasının ortasında küçük çatlaklar oluştuğu anda işlemin sonlandırılmasıdır. Boncuk halkasının tamamında büyük çatlaklar oluşmuşsa veya pul pul dökülmüşlerse, aşırı kurumuşlardır. Sonucunda çok kuru olan boncukların yeniden süspanse edilmesi zor olabilmektedir. Kullanılmayan etanol çözeltisi ise PCR indekslendikten sonraki saflaştırma aşamaları için ayrıldı.
- Plate manyetik standdan alındı ve kurutulmuş boncukları 32 µL nükleaz içermeyen su kullanarak her kuyuda yeniden süspanse edildi. Süspansiyon 10 kez yukarı ve aşağı yavaşça pipetleme yapıldı. Kuyuların dibinde kabarcıklar oluşursa, plate kısaca döndürülüp ve tekrar karıştırıldı.
- Ürünü tamamen elüsyon etmek için plate ortam sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında 5 dk ya da çözelti berrak görüne kadar plate manyetik bir standla yerleştirildi. Elde edilen süpernatant Exponential PCR ürünü içermektedir. Saflaştırılmış ürün boncuklarla beraber -20 °C'de muhafaza edildi.

3.11. Indexing PCR: Amplify the Libraries

- Protokolün bu kısmı için bir buz kovası hazırlandıktan sonra indeksleme PCR maxter mix buz üzerinde bekletildi.
- Her indeksleme reaksiyonu için kullanılan her numune kuyusuna 4 µL uygun forward ve reverse indeksleme primeri eklendi. İndeksleme primerleri tablo 3.7'de verildi.

Tablo 3.7. Forward ve Reverse İndeksleme Primeri Ürünü ve Hacimleri

Reaktif	Hacmi (µL)
Pi700 Pillar Index	4.0
Pi500 Pillar Index	4.0
Toplam Hacim	8.0

- ONCO/Reveal PillarHS Multi-Cancer Panel örneklerini sıralamak için gereken kapsama derinliğinde indeksleme primerleri arasında karışmayı önlemek için, bir P5 ve P7 sekansı sekanslama çalışmasında yalnızca bir kez kullanılmıştır. Örneğin, bir örnek Pi501 ve Pi701 kullanılarak indekslenirse, Pi501 başka bir P7 sekansı ile tekrar kullanılmamıştır. Ayrıca Pi701 de başka bir P5 dizisi ile tekrar kullanılmadı.

i7 Index		i5 Index		
Index Name	Index Barcode Sequence	Index Name	Index Barcode Sequence for Miseq	Index Barcode Sequence for NextSeq
Pi701	ATTACTCG	Pi501	TATAGCCT	AGGCTATA
Pi702	TCCGGAGA	Pi502	ATAGAGGC	GCCTCTAT
Pi703	CGCTCATT	Pi503	CCTATCCT	AGGATAGG
Pi704	GAGATTCC	Pi504	GGCTCTGA	TCAGAGCC
Pi705	ATTCAGAA	Pi505	AGGCGAAG	CTTCGCCT
Pi706	GAATTCGT	Pi506	TAATCTTA	TAAGATTA
Pi707	CTGAAGCT	Pi507	CAGGACGT	ACGTCCTG
Pi708	TAATGCGC	Pi508	GTACTGAC	GTCAGTAC
Pi709	ATCACGAC	Pi509	TGAACCTT	AAGGTTCA
Pi710	ACAGTGGT	Pi510	TGCTAAGT	ACTTAGCA
Pi711	CAGATCCA	Pi511	TGTTCTCT	AGAGAACA
Pi712	ACAAACGG	Pi512	TAAGACAC	GTGTCTTA
Pi713	GAAACCCA	Pi513	CTAATCGA	TCGATTAG
Pi714	TGTGACCA	Pi514	CTAGAACA	TGTTCTAG
Pi715	AGGGTCAA	Pi515	TAAGTTCC	GGAACTTA
Pi716	AGGAGTGG	Pi516	TAGACCTA	TAGGTCTA

Şekil 3.2. ONCO/Reveal PillarHS Multi-Cancer Panel İndeksleme Primerleri

- High Fidelity PCR Master Mix'i kullanmadan önce vorteksleyip ardından spin yapılmıştır. Tablo 3.8'de gösterildiği gibi maxter mix hazırlandı. 36 µL maxter mix bir PCR plate içindeki her numune kuyucuğuna aktarıldı.

Tablo 3.8. High Fidelity PCR Master Mix Hazırlanması

Reaktif	Hacmi (µL)
High Fidelity PCR Master Mix (4x)	12.5
Nuclease-free water	23.5
Toplam Hacim	36.0

- Hazırlanan maxter mix üzerine 4 µL uygun forward ve reverse indeksleme primeri eklendi.

Tablo 3.9. High Fidelity PCR Master Mix’e İndeklesme Primerlerinin Eklenmesi

Reaktif	Hacmi (µL)
Pi500 and Pi700 Indices	8.0
Master Mix	36.0
Total	44.0

- Ayrılan süpernatandan (Exponential PCR ürünü) 6 µL'lik kısmı, indeksleri ve PCR Master Mix'i içeren uygun kuyulara boncuk aktarılmadığından emin olarak koyuldu ve plate seffaf kaplama film ile kapatıldı.

Tablo 3.10. Exponential PCR ürününe İndeks PCR Master Mix'in Eklenmesi

Reaktif	Hacmi (µL)
İndeks primer ve PCR Master Mix	44.0
Gene-specific PCR product	06.0
Toplam Hacim	50.0

- Karıştırmak için kapalı reaksiyonları orta ayarda 5-10 saniye vortekslendi ve reaksiyon çözeltilerindeki kabarcıkları gidermek için kısaca spin yapıldı.
- Ardından plate thermal-cycler'a yerleştirilerek tablo 3.11'deki program çalıştırıldı. İndekslenen kütüphaneler -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.11. Thermal Cycler’da PCR Protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95°C	2 dakika	1
95°C	30 saniye	4*
66°C	30 saniye	
72°C	60 saniye	
72°C	5 dakika	1
8°C	Hold	1

* Nihai kütüphane verimi düşükse, ek İndeksleme PCR döngüleri gerçekleştirilebilir.

3.12. Kütüphanenin Pürifikasyonu

Pürifikasyon işleminden önce numuneler -20°C’de alınıp, ortam sıcaklığına kadar çözülmeleri sağlandı. Saflaştırma işlemini gerçekleştirmeden önce AMPure boncuklarının oda sıcaklığına ulaşması çok önemlidir. Boncuk çözeltisinin sıcaklığı saflaştırma sürecini değiştirebilir. Bu yüzden Agencourt AMPure XP boncuklarını 4°C’den çıkarıldıktan sonra en az 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- Şeffaf kaplama filmi çıkarmadan önce yan duvarlardaki damlacıkları gidermek için plate kısaca spinlendi ve ardından şeffaf kaplama filmi PCR plate’den dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Saflaştırma işlemini gerçekleştirmeden önce AMPure boncuk solüsyonunun homojen olması çok önemlidir. Bu yüzden tüm boncuklar iyice dağılana kadar AMPure XP Boncuklarını iyice vorteksleme yapıldı.
- Her kuyuya Agencourt AMPure XP Reagent (manyetik boncuk) 60 µL boncuk (reaksiyon 50 µL’de değilse 1,2x boncuk) eklenmiştir. Karışımı 10 kez yukarı ve aşağı pipetaj işlemi yapılarak karışım sağlandı. Ardından plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı. Eğer kuyuların dibinde kabarcıklar gözlenmişse, plate kısaca spinlenerek ardından tekrar karıştırıldı. Plate 15 saniye vorteks yapıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Çözelti berrak görüne kadar PCR plate manyetik standa yerleştirildi. Beş dakika bekletilip, süpernatantı her bir kuyudan dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Manyetik stand üzerindeyken her bir kuyuya 150 µl %70’lik etanol eklendi ve plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı. Oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildikten sonra süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.

- İkinci kez %70'lik etanol ile yıkama tekrar yapıp ardından süpernatant dikkatlice atıldı. Eser miktarda dahi olsa etanolün kalmaması için 10-15 saniye spin yapıldı. Tekrar manyetik standda alınarak kuyuların dibinde kalan etanol solüsyonunu 10 veya 20 µL'lik bir uç kullanarak ortamdan uzaklaştırıldı.
- Plate manyetik standdan alındı ve boncuklar 2-5 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş boncukları 32 µL nükleaz içermeyen su kullanarak her kuyuda yeniden süspanse edildi. Süspansiyonu 10 kez yukarı ve aşağı yavaşça pipetleme yapıldı. Kuyuların dibinde kabarcıklar oluşursa, plate kısaca döndürülüp ve tekrar karıştırıldı.
- Ürünü tamamen elüsyon etmek için plate ortam sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Çözelti berrak görünene kadar elüsyonları manyetik stand üzerinde oda sıcaklığında bekletildi. PCR platenin her bir kuyusundan yeni bir plate karşılık gelen kuyusuna 30 µL berrak süpernatant aktarılmıştır. Daha sonra elde edilen ürünün nanodrop ile ölçümü yapıldı.

3.13. Yeni Nesil Sekanslama

Yeni nesil dizileme paneli, toplam hedef büyüklüğü 3,5 kbp olan sıcak noktaları ve 31 genin bölgelerini kapsayan 31 gene ait ortalama 71 bp boyutunda 131 amplikon içerir. Örnekler 25ng getirildi, her bir üründen eşit miktarda alınarak amplikon havuzu oluşturuldu. Oluşturulan kütüphane nextseq cihazının protokolüne göre 4 nM'e düşürüldü. DNA 0,2 N NaOH ile denatüre edildi. En sonda cihaza 1 pM örnek yüklendi. Nextseq Mid ile çalışıldı. Pivat aracı ile biyoinformatik programı kullanılarak analizleri yapıldı.

3.14. Saflaştırılmış Kütüphanenin Qubit Ölçümü

Qubit ile DNA ölçümünde Qubit dsDNA HS Assay Kit kullanıldı. Qubit dsDNA HS reaktifini Qubit dsDNA HS tamponu kullanarak 1/200 oranında seyreltildi. Standartlar ve numuneler için 0,5 mL Qubit tüpleri hazırlandı ve tüpler etiketlendi. 190 µL Qubit çalışma solüsyonunu standart 1 ve standart 2 için iki tüpe aktarılıp ve ardından ilgili tüpe her standarttan 10 µL eklenmiştir. Her tüpe 198 µL

Qubit çalışma solüsyonu aktarılıp ve ardından tüpe her örnekten 2 µL (1:100 dilüsyon) eklenmiştir. Tüpler vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Qubit 2.0 Fluorometer'da Qubit Kullanım Kılavuzu'na göre her numunenin konsantrasyonunu ölçülmüştür. Qubit dsDNA High Sensitivity assay kiti kullanarak standart 1 ve 2, ng/µl olacak şekilde okutuldu. Sonrasında cfDNA'sını içeren tüpler okutularak miktarı belirlendi. Qubit ölçümünde cfDNA konsantrasyonu 10-50 ng/ µl olan örnekler sonraki aşamaya alındı.

3.15. Varyantların Protein Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Araçlar

In silico öngörü algoritmaları, bir gendeki bir nükleotit değişikliğinin proteinin yapısını ve işlevini değiştirip değiştirmeyeceğini tahmin etmek için sıklıkla kullanılan araçlardır (99). Tanımlanan varyantların zararlı etkisini tahmin etmek için Pivat yazılım programı vasıtasıyla SIFT (v5.2.2) ve PolyPhen-2 (v2.2.2) in silico araçları kullanıldı.

3.15.1. SIFT

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) yazılım aracı bir amino asit substitüsyonunun protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini dizi homolojisine ve amino asitlerin fiziksel özelliklerine dayanan bir yöntem ile tahmin etmektedir. SIFT programındaki cutoff değeri ≥ 0.05 bir tolerans indeksidir. Amino asit substitüsyonunun 0,05 bir değere sahip olması ise tolere edilebilir olduğu şeklinde öngörülmektedir (100).

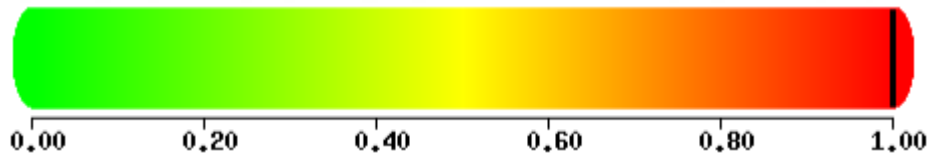
3.15.2. I Mutant 2.0

Amino asit substitüsyonunun proteinin stabilizasyonu üzerine etkisini belirlemek için I-Mutant 2.0 yazılımı kullanılmıştır. I-Mutant 2.0, mutasyon nedeniyle meydana gelen protein stabilite değişimini, protein yapısından ya da protein dizisinden tahmin etmek üzere optimize edilmiş bir yazılımdır. I-Mutant 2.0, yabanıl ve mutant tip amino asitler arasındaki serbest enerji değişiminin (DDG) protein stabilizasyonu ile ilişkisini ortaya çıkarmaktadır. Hesaplanan DDG 0

(kcal/mol): stabilitedeki artışı göstermektedir. Sonuç olarak, protein stabilizasyonu azalmıştır ya da artmıştır şeklinde bir tahmin ortaya koymaktadır (100). I-Mutant 2.0 yazılımında PH:6, Sıcaklık:37 olarak alınmıştır.

3.15.3. PolyPhen-2

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) yazılım aracı bir amino asit substitüsyonunun bir insan proteininin yapısı ve işlevi üzerindeki olası etkisini, doğrudan fiziksel ve karşılaştırmalı değerlendirmeler kullanarak tahmin eden bir araçtır. Tahmin sonuçları zarar verici ya da tehlikesiz şeklinde elde edilmektedir. Bu yazılım aracı üç boyutlu yapısı bilinen bir protein ile substitüsyon bölgesinin karakterizasyonunu temel alarak bir skor hesaplaması yapmaktadır. PolyPhen-2 skoru (PSIC skoru) her bir bölgedeki varyantlar ve bunların aralarındaki farklılıklar için hesaplanmaktadır. Varyantlar arasındaki skor farklılığının yüksek olması, belirli bir amino asit substitüsyonunun fonksiyonel etkilerinin daha yüksek olabileceği anlamına gelmektedir (100).



Şekil 3.3. Polphen 2 Skalası

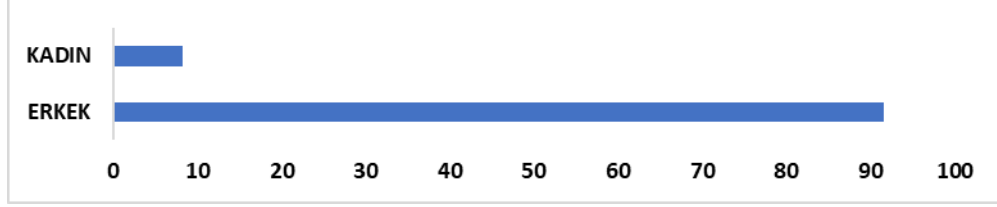
Not: PolyPhen-2 Hvar; Muhtemelen Zararlı (≥ 0.909), Olası Zararlı ($0.447 \leq \text{pp2_hdiv} \leq 0.909$); benign ($\text{pp2_hdiv} \leq 0.446$) olarak değerlendirildi.

3.16. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 9.5.0 programı kullanıldı. Bütün istatistiksel analizlerde önemlilik seviyesi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edildi.

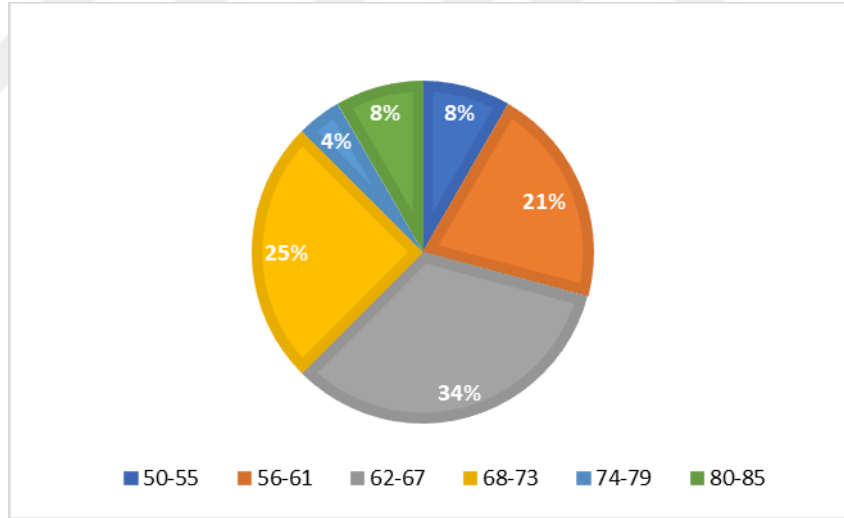
4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların 2'si (%8,33) kadın; 22'si (%91,67) erkek olarak dağılım göstermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı

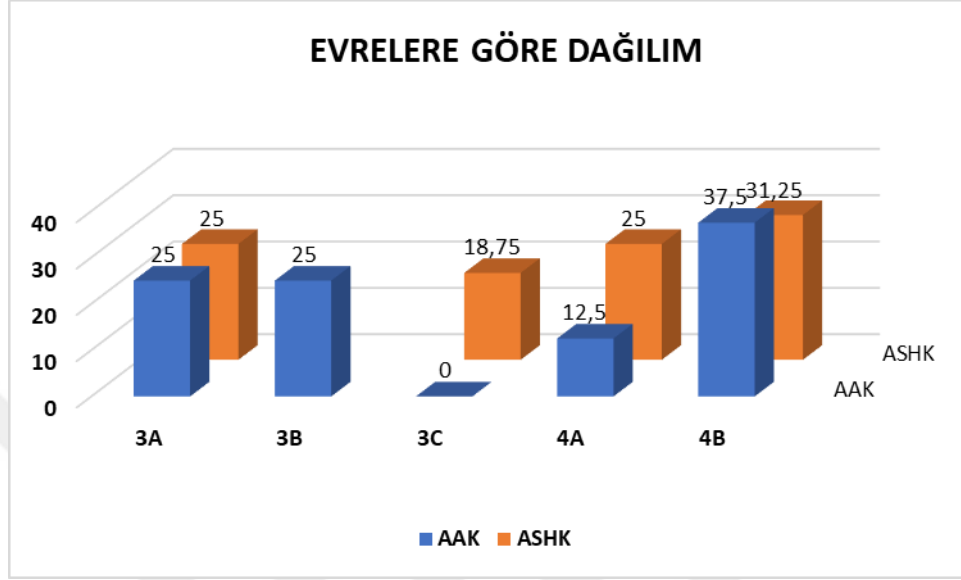
Hastaların başvuru anındaki yaş ortalaması 65.6 ± 7.7 , ortanca yaş ise 64,5 idi. Hastaların yaş aralığı ise 50 ile 85 arasında değişmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hastalarının Yaşa Göre Dağılımı

Hastalarımızın tümünün (n=24) histopatolojik tanısı KHDAK olup; hastaların %33,3'ü adenokarsinom, %66,7'i skuamöz hücreli karsinom alt tipindeydi. Hastaların tümü tanı anında TNM evrelemesine göre Evre III ve IV idi. Histopatolojik tanıya göre evrelemenin dağılımında AAK olan hastaların (n=8) 2'si 3A (%25), 2'si 3B (%25), 1'i 4A (12,5), 3'ü 4B (%37,5); ASHK olan hastaların

(n=16) 4'ü 3A (%25), 3'ü 3C (%18,75), 4'ü 4A (%25), 5'i 4B (%31,25) olarak dağılım göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Histopatolojik Tanının Evrelere Göre Dağılımı

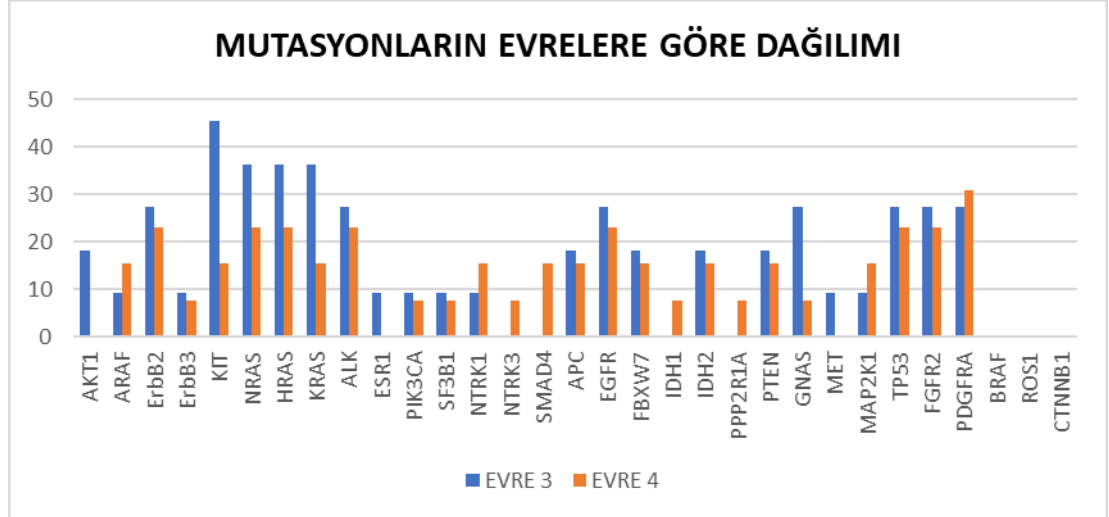
Likit biyopsi testi çalışması tamamlanan 24 hastanın 11'inden (%45,83) elde edilen cfDNA'dan gen paneline ait herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. Bu olguların 5'i (% 45,45) III. evre olup, 6'sı (%54,54) ise IV. evre de olan hastalardı. Geri kalan 13 hastanın (%54,16) herhangi birinde en az bir mutasyon belirlendi

KHDAK histopatolojik tanı ayrımı olmadan likit biyopsi (cfDNA) yöntemiyle elde edilen mutasyonların dağılımı Evre III ve IV olarak değerlendirildiğinde;

Evre III'de olan hastaların (n: 11); 2'si (%18,18) AKT1, 1'i (%9.09) ARAF, 3'ü (%27,27) ErbB2, 1'i (%9.09) ErbB3, 5'i (%45,45) KIT, 4'ü (%36,36) NRAS, 4'ü (%36,36) HRAS, 4'ü (%36,36) KRAS, 3'ü (%27,27) ALK, 1'i (%9.09) ESR1, 1'i (%9.09) PIK3CA, 1'i (%9.09) PIK3CA, 1'i (%9.09) SF3B1, 1'i (%9.09) NTRK1, 2'si (%18,18) APC, 3'ü (%27,27) EGFR, 2'si (%18,18) FBXW7, 2'si (%18,18) IDH2, 2'si (%18,18) PTEN, 3'ü (%27,27) GNAS, 1'i (%9.09) MET, 1'i (%9.09)

MAP2K1, 3'ü (%27,27) TP53, 3'ü (%27,27) FGFR2, 3'ü (%27,27) PDGFRA genlerinde mutasyon tespit edilmiştir.

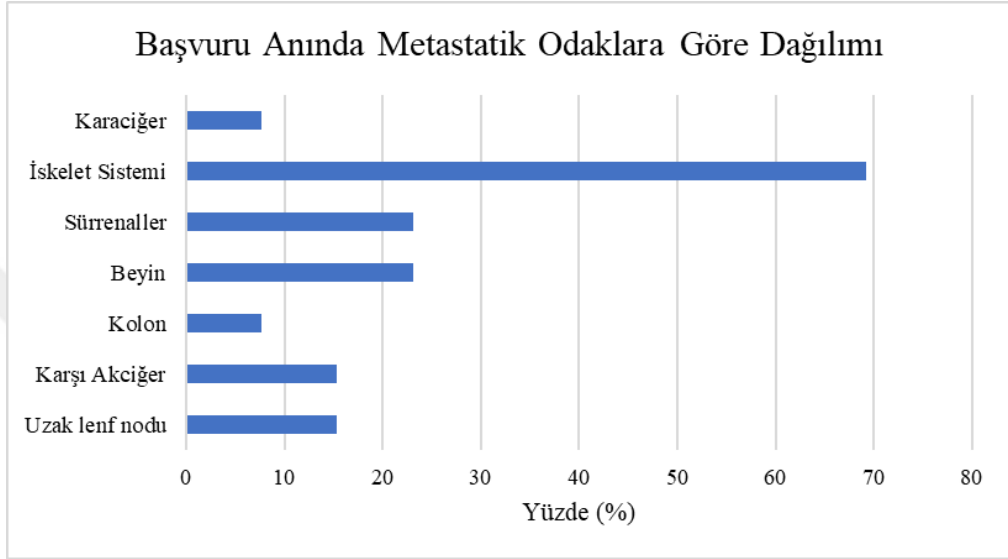
Evre IV 'de olan hastaların (n: 13); 2'si (%15,38) ARAF, 3'ü (%23,07) ErbB2, 1'i (%7,69) ErbB3, 2'si (%15,38) KIT, 3'ü (%23,07) NRAS, 3'ü (%23,07) HRAS, 2'si (%15,38) KRAS, 3'ü (%23,07) ALK, 1'i (%7,69) PIK3CA, 1'i (%7,69) SF3B1, 2'si (%15,38) NTRK1, 1'i (%7,69) NTRK3, 2'si (%15,38) SMAD4, 2'si (%15,38) APC, 3'ü (%23,07) EGFR, 2'si (%15,38) FBXW7, 1'i (%7,69) IDH1, 2'si (%15,38) IDH2, 1'i (%7,69) PPP2R1A, 2'si (%15,38) PTEN, 1'i (%7,69) GNAS, 2'si (%15,38) MAP2K1, 3'ü (%23,07) TP53, 3'ü (%23,07) FGFR2, 4'ü (%30,76) PDGFRA genlerinde mutasyon tespit edilmiştir. Hastalarımızın tamamında BRAF, ROS1, CTNNB1 genlerine ait mutasyon tespit edilmedi. Ayrıca Evre III'de olan hastalarda NTRK3, SMAD4, IDH1, PPP2R1A genlerine ait mutasyon belirlenememişken; Evre IV'de olan hastalarda ise AKT1, ESR1, MET genlerine ait mutasyon tespit edilemedi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. KHDAK Mutasyonların Evrelere Göre Dağılımı

Başvuru anında hastalar (24 yeni tanı) PET/BT'deki metastatik odaklar açısından incelendiğinde IV. evrede olan 13 hastada uzak organ metastazı vardı. Sırasıyla en sık %69,23 (9/13) metastaz iskelet sistemine; %23,08 beyine (n=3),

%23,08 sürrenaller (3/13), %15,38 (2/13) uzak lenf nodu ve karşı akciğere, %7,69 (1/13) kolon ve karaciğerde tespit edilmiştir. (Şekil 4.5). On bir hastanın ise uzak organ metastazı bulunmuyordu. III. evrede olan 4 hastada ise bölgesel lenf nodlarında yayılım görülmüştür.



Şekil 4.5. Başvuru Anında Metastatik Odaklara Göre Dağılımı

Çalışmaya alınan 24 hastanın 6'sında (%25) KRAS genine ait 14 farklı varyant saptanmıştır. Bu hastalar histopatolojik tanısına göre 3'ü AAK, diğer 3'ü ise ASHK tanılı hastalardı. KRAS genine ait bu mutasyonlar ekzon 2 ve ekzon 3'te saptandı. Ekzon bölgelerinde tespit edilen 14 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 2'de %14,28 iken, ekzon 3'te %85,71 oranındadır. Bu mutasyonlar histopatolojik tanısına göre AAK tanılı hasta grubunun %50 (3/6)'sinde görülürken, %50'si (3/6) ise ASHK tanılı hastalarda tanımlandı. Üç hastada birden fazla KRAS somatik mutasyonuna sahipti. Bir AAK hastada toplam 9 (%64,29) KRAS varyantı belirlenmiştir. Bunlar ekzon 3'de gerçekleşen S65G, Y64C, Y64H, E63G, E63K, E62G, G60D Missense (yanlış anlamlı) mutasyonu ile c.177A>G p.A59=, c.183A>G p.Q61= sinonim varyantlarıdır. Bir ASHK hastada toplam 3 (%21,43) KRAS varyantı belirlenmiştir. Bunlar ekzon 2'de V14A, G12S Missense mutasyonu ile ekzon 3'te c.189G>A E63= sinonim varyantlarıdır. Bir AAK hastada

toplam 2 (%14,29) KRAS varyantı belirlenmiştir. Bunlar ekzon 3'te E63G, A59S Missense mutasyonlarıdır. Farklı bir ASHK hastada (%7,14) ise G60D varyantı ve bir AAK hastada (%7,14) Ekzon 3'te c.174A>C T58= sinonim varyantları gözlemlendi.

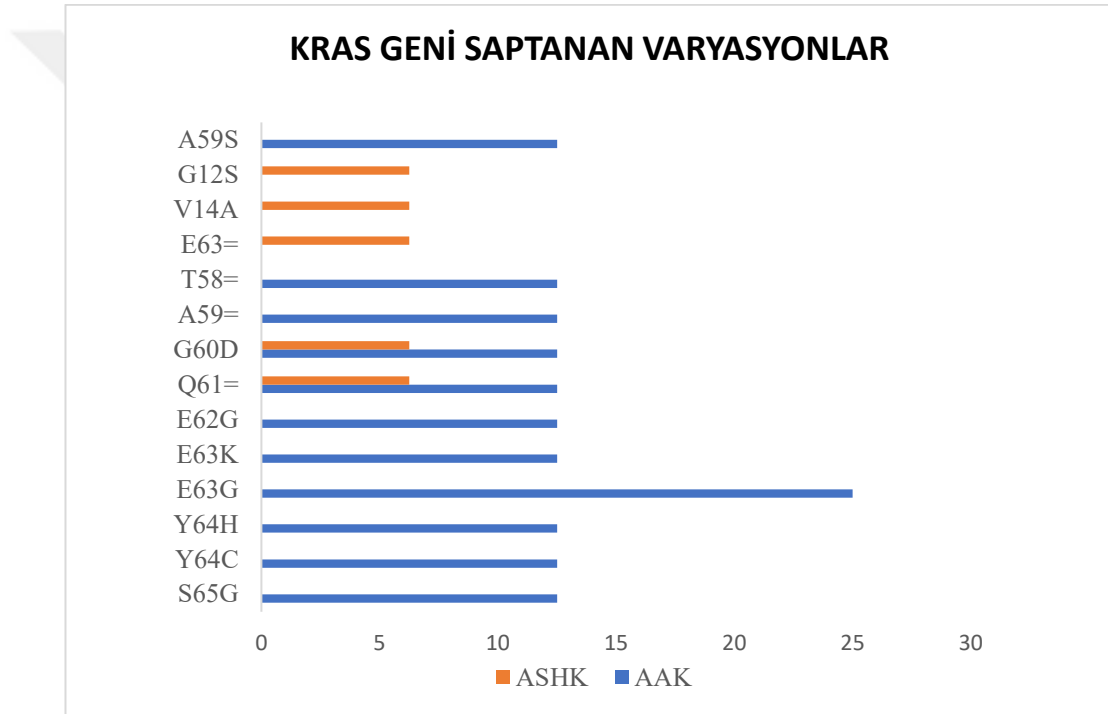
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. SIFT skoruna göre zararlı tespit edilen KRAS varyantları (n=10), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %50, olası zarar verici %30, benign (İyi huylu) olanlar ise %20'lik kısmı oluşturmaktadır. Ayrıca 10 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edildi. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerden bir tanesinin protein stabilizasyonunu arttırdığı, 9 tanesinin ise protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edildi ve sonuçları tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. KRAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	3	193A>G	S65G	Olası Zararlı	0,796	Zararlı	0,03	3	Azalış	1
2	3	191A>G	Y64C	Benign	0,293	Zararlı	0,02	3	Artış	1
3	3	190T>C	Y64H	Muhtemelen Zararlı	0,984	Zararlı	0	1	Azalış	1
4	3	188A>G	E63G	Muhtemelen Zararlı	0,973	Zararlı	0,01	8	Azalış	2
5	3	187G>A	E63K	Muhtemelen Zararlı	0,962	Zararlı	0	5	Azalış	1
6	3	185A>G	E62G	Muhtemelen Zararlı	0,982	Zararlı	0	1	Azalış	1
7	3	179G>A	G60D	Muhtemelen Zararlı	1	Zararlı	0	8	Azalış	2
8	2	41T>C	V14A	Olası Zararlı	0,676	Zararlı	0,05	9	Azalış	1
9	2	34G>A	G12S	Olası Zararlı	0,46	Zararlı	0,03	5	Azalış	1
10	3	175G>T	A59S	Benign	0,258	Zararlı	0,04	9	Azalış	1

Çalışmaya alınan tüm hastaların histopatolojik olarak sınıflandırıldığında 8'i AAK olup; 16'sı ASHK alt tipine sahipti. KRAS varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; üç hasta AAK tanılı olup, 3 hasta ise ASHK alt tipine

sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanıli hastalar arasında görülme sıklıkları; S65G, Y64C, Y64H, E63K, E62G, Q61=, G60D, A59=, T58=, E63G, A59S %12,5, E63G %25’iken, ASHK tanıli hastalar arasında görülme sıklıkları ise E63=, V14A, G12S, G60D, Q61= %6,25’tir. Bu iki alt tip arasında ortak olarak tanımlanan Q61= ve G60D varyantlarıdır. AAK tanıli 2 hastada ortak olarak görülen E63G misesens mutasyonudur. Bu iki histopatolojik alt tip arasında 2 hastada ortak görülen Q61= ve G60D varyantlarıdır. Bu varyantların histopatolojik dağılımları şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. KRAS Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 7’sinde (%29,16) NRAS genine ait 13 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 2 ve ekzon 3’te saptandı. Ekzon bölgelerinde tespit edilen 13 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 2’de %53,84 iken, ekzon 3’te %46,15 oranındadır. Bu mutasyonlar histopatolojik tanısına göre AAK tanıli hasta grubunun %12,5’inde (1/8) görülürken, %37,5’i (6/16) ise ASHK tanıli hastalarda tanımlandı. 2 hastada birden fazla NRAS

somatik mutasyonuna rastlandı. AAK olan bir hastada toplam 6 NRAS (%46,15) varyantı tespit edilmiştir. Bu varyantlardan sinonim olmayan tek nükleotid değişimi (nsSNV) sonucunda oluşan D57G, V14I, G10R missense (yanlış anlamlı) mutasyonu; ekzon 2 c.36T>C p.G12=, ekzon 3 c.186A>G p.E62= sinonim varyantları (sSNV) ile ekzon 2’de delesyon sonucu oluşan c.25del p.Val9LeufsTer11 ise çerçeve kayması mutasyonu tespit edildi. ASHK tanılı bir hastada 4 NRAS (%30,76) varyantı tespit edildi. Bu varyantlar SNV sonucunda oluşan Q61E, D57N, G13V missense mutasyonu ve ekzon 2 c.30A>G, p. G10= sinonim varyantı gözlenmiştir. Geri kalan 5 ASHK tanılı hastalarda sırasıyla L56P, A11E, ekzon 2 c.30A>G p.G10=, ekzon 3 c.186A>G p.E62=, ekzon 3 c.180A>G p.G60= olmak üzere birer (%7,69) varyant tespit edildi.

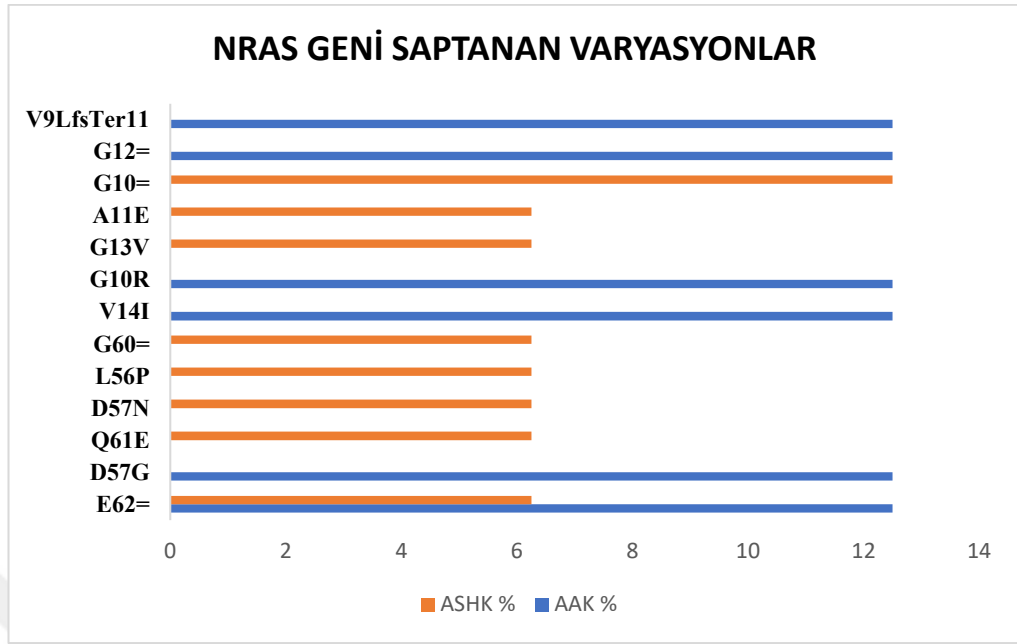
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. NRAS varyantlarının (n=8), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %62,5, olası zarar verici %37,5’lik kısmı oluşturmaktadır. SIFT sonucuna göre A11E varyantının protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin tolere edilebilir (iyi huylu) olarak tahmin edilsede; Polyphen-2 sonucuna göre olası zararlı olması çelişki oluşturmaktadır. PROJECT HOPE analiz programının sonucuna göre bu SNP’nin yabani tipi (nötr) ve mutant amino asiti (negatif) arasında bir yük farkı bulunmaktadır. Yabanıl tip rezidü proteinin çekirdeğine gömülü olarak yer alırken, mutant rezidü daha büyük olması nedeniyle bu bölgeye muhtemelen yerleşemeyecektir. Bu durum protein katlanma problemlerine yol açabilen bir yük getirir. Ayrıca mutasyona uğramış rezidü, diğer moleküllerin bağlanması için önemli olan bir alanda bulunur ve proteinin aktivitesi için önemli olan bir alandaki rezidülerle temas halindedir. Mutasyon bu etkileşimi etkileyebilir ve böylece bağlanma alanından aktivite alanına sinyal transferini bozabilir. Vahşi tip ve mutant rezidü arasındaki özelliklerdeki bu farklılıklar, nükleotid (GTP) ile etkileşimlerin kaybına kolayca neden olabilir. Bu durum proteinin işlevini doğrudan etkileyebilir. Bu yüzden A11E SNP’ni büyük ihtimalle zararlı olarak belirtebiliriz. Ayrıca 8 SNP’nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP’lerden 4 tanesinin protein stabilizasyonunu

arttırdığı, 4 tanesinin ise protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir ve sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. NRAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlik İndeksi	Azalış Artış	
1	3	170A>G	D57G	Olası Zararlı	0,772	Zararlı	0	0	Azalış	1
2	2	40G>A	V14I	Muhtemel Zararlı	0,916	Zararlı	0	8	Azalış	1
3	2	28G>A	G10R	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	4	Azalış	1
4	3	181C>G	Q61E	Olası Zararlı	0,715	Zararlı	0	5	Artış	1
5	3	169G>A	D57N	Muhtemel Zararlı	0,984	Zararlı	0	2	Artış	1
6	2	38G>T	G13V	Muhtemel Zararlı	0,968	Zararlı	0,02	3	Artış	1
7	3	167T>C	L56P	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	4	Azalış	1
8	2	32C>A	A11E	Olası Zararlı	0,776	Tolere	0,14	1	Artış	1

NRAS varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; bir hasta AAK tanılı olup, geri kalan hastaların tümü ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları; D57G, V14I, G10R, G12=, E62=, Val9LeufsTer11 %12,5 iken; ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları L56P (%6,25), A11E (%6,25), G10= (%12,50), E62= (%6,25), G60= (%6,25) olarak tespit edilmiştir. ASHK tanılı 2 hasta arasında görülen ortak olarak görülen G10= mutasyonudur. Bu iki alt tip arasında ortak olarak tanımlanan 2 hasta arasında görülen E62= sSNV mutasyonudur. Bu varyantların histopatolojik dağılımları şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. NRAS Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 7'sinde (%29,16) HRAS genine ait 12 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 2 ve ekzon 3'de saptandı. Ekzon bölgelerinde tespit edilen 12 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 2'de %41,66 iken, ekzon 3'te %58,33 oranındadır. Bu mutasyonlar histopatolojik tanısına göre AAK tanılı hasta grubunun %25 (2/8)'inde görülürken, %31,25 (5/16)'ü ise ASHK tanılı hastalarda tanımlandı. Dört hastada birden fazla HRAS somatik mutasyonuna sahipti. AAK'lu bir hastada toplam 5 (%41,66) varyant belirlenmiştir. Bu varyantlar ise ekzon 3'te nsSNV sonucunda oluşan Q61H, G60D, G60S, A59V missense mutasyonlarıydı. ASHK bir hastada toplam 3 (%25) varyant belirlenmiştir. Bu varyantlar ekzon 3'de A59T missense mutasyonu, ekzon 2'de delins (delesyon-insersiyon) sonucu meydana gelen G10S missense mutasyonu ile delesyon sonucu oluşan c.26_28del p.V9del çerçeve kayması mutasyonu gözlemlendi. Başka bir ASHK tanılı hastada 2 (%16,66) varyant belirlenmiştir. Bu varyantlar ekzon 2'de A11S, V9del mutasyonlarıydı. AAK'lu başka bir hastada 3 (%25) varyant belirlenmiştir. Ekzon 3'te E63K, c.181C>T Q61Ter (stop-gained) nsSNV ve ekzon 2'de G10D missense mutasyonlarıydı. Diğer ASHK tanılı hastalarda ise 1'er

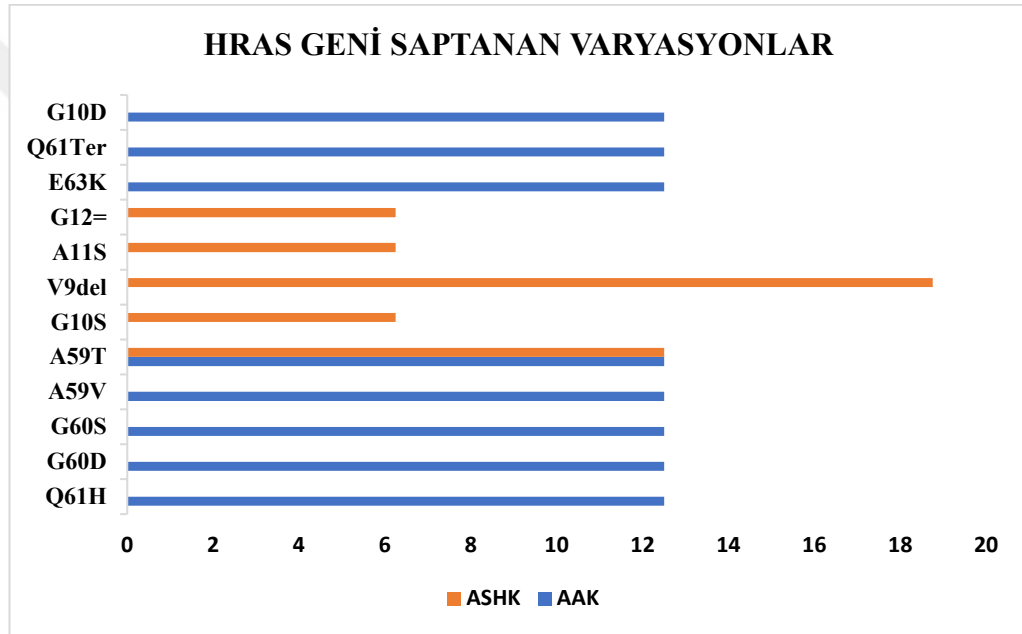
(%8,33) varyant görüldü. Bunlar sırasıyla ekzon 2’de c.36C>A G12= sSNV, A59T, V9del mutasyonları tespit edilmiştir.

Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. HRAS varyantlarının (n=9), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %55,55’ini, olası zarar verici %22,22’sini ve benign olanlar ise %22,22’sini oluşturmaktadır. SIFT sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, Polyphen-2 sonucuna göre benign olan Q61H SNP zarar verici, A59T ise tolere edilebilir olarak tanımlandı. Yine Polyphen-2 sonucuna göre olası zararlı olan A11S ise tolere edilebilir olarak belirlendi. Ayrıca 9 SNP’nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP’lerden 1 tanesinin protein stabilizasyonunu arttırdığı, 8 tanesinin ise protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3. HRAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	3	183G>C	Q61H	Benign	0,099	Zararlı	0,03	5	Azalış	1
2	3	179G>A	G60D	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	8	Azalış	1
3	3	178G>A	G60S	Muhtemel Zararlı	0,996	Zararlı	0	8	Azalış	1
4	3	176C>T	A59V	Olası Zararlı	0,907	Zararlı	0,03	1	Artış	1
5	3	175G>A	A59T	Benign	0,215	Tolere	0,06	7	Azalış	3
6	2	28_30del insAGT	G10S	Muhtemel Zararlı	0,996	Zararlı	0,01	3	Azalış	1
7	2	31G>T	A11S	Olası Zararlı	0,503	Tolere	0,08	6	Azalış	1
8	3	187G>A	E63K	Muhtemel Zararlı	0,948	Zararlı	0	5	Azalış	1
9	2	29G>A	G10D	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	3	Azalış	1

HRAS varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanıılı olup, geri kalan hastaların tümü ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanıılı hastalar arasında görülme sıklıkları; Q61H, G60D, G60S, A59V, E63K, Q61Ter, G10D %12,5'iken, ASHK tanıılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise G10S, G12= %6,25, A59T %12,5, V9del 18,75'tir. ASHK tanıılı hastalar arasında ortak olarak görülen 2 hastada A59T ve 3 hastada ise V9del mutasyonudur. Bu iki alt tip arasında 3 hasta arasında ortak olarak tanımlanan sadece A59T varyantıdır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. HRAS Geni Saptanan Mutasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 3'ünde (%12,5) ARAF genine ait 3 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 7'de saptandı. AAK tanıılı bir hastada c.651C>T N217= sSNV ve diğerinde ise nsSNV sonucunda P216S missense mutasyonlarıydı. ASHK tanıılı bir hastada ise V218F missense mutasyonu gözlemlendi.

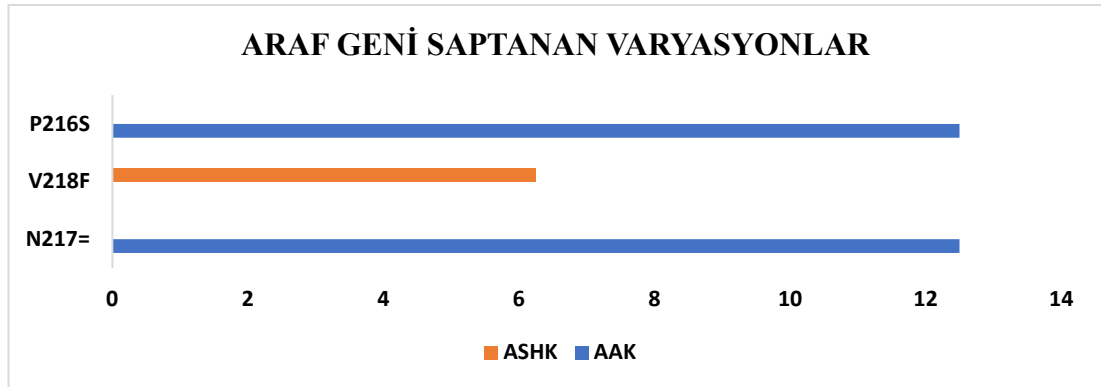
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. SIFT sonucunda zararlı olarak bulunan ARAF varyantlarının (n=2), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde her

ikisi de olası zararlı olarak tanımlandı. Ayrıca 2 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. ARAF Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik İndeksi	Azalış Artış	
1	7	652G>T	V218F	Olası Zararlı	0,759	Zararlı	0	8	Azalış	1
2	7	646C>T	P216S	Olası Zararlı	0,768	Zararlı	0	8	Azalış	1

ARAF varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanıılı olup, bir hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanıılı hastalar arasında görülme sıklıkları; N217=, P216S %12,5'iken, ASHK tanıılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise V218F %6,25'tir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. ARAF Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 6'sında (%25) EGFR genine ait 13 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 19, 20, 21'de saptandı. Ekzon bölgelerinde tespit edilen 13 (%100) farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme

sıklığı; ekzon 19’da %15,38; ekzon 20’de %76,92; ekzon 21’de 7,69 oranındadır. 4 hastada birden fazla EGFR somatik mutasyonuna sahipti. ASHK tanıli bir hastada toplam 2 (%15,38) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonlar insersiyon sonucu oluşan ekzon 20’de c.2315_2326dup P772_C775dup çerçeve kayması mutasyonu ve M793I missense mutasyonuydu. ASHK tanıli bir hastada 4 (%30,76) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonlar ekzon 19’da c.2259G>A P753= ekzon 20 c.2292C>T Y764= ve P772_C775dup, ekzon 2’de c.2581C>T L861= sSNV’di. ASHK tanıli başka bir hastada toplam 3 (%23,07) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonlar ekzon 19’da c.2239T>C L747= sSNV, ekzon 20 D770G ve C775R missense mutasyonlarıdır. AAK tanıli bir hastada toplam 3 (%23,07) mutasyon tespit edildi. Ekzon 20’de oluşan bu mutasyonlar c.2292C>A Y764Ter nsSNV (stop_gained), S768G, H773Y missense mutasyonlarıydı. AAK tanıli bir hastada V769M missense mutasyonu (%7,69) ile ASHK tanıli bir hastada ise T790= sSNV’ı (%7,69) görülmüştür.

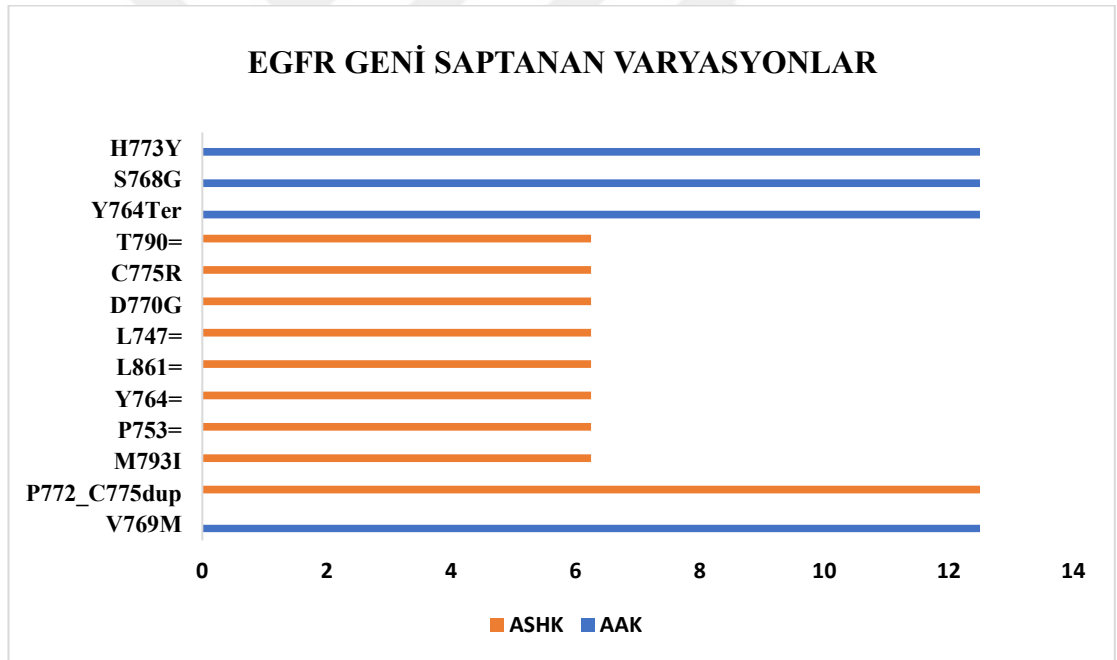
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde %50 muhtemelen zararlı, %16,66 olası zararlı ve %50 benign olarak belirlenmiştir. SIFT sonucuna göre M793I varyantı hariç, diğer SNPlerin %83,33’ü tolere edilebilir olarak saptandı.

Tablo 4.5. EGFR Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	20	2305G>A	V769M	Muhtemel Zararlı	0,947	Tolere	0,33	8	Azalış	1
2	20	2379G>T	M793I	Muhtemel Zararlı	0,990	Zararlı	0	4	Azalış	1
3	20	2309A>G	D770G	Benign	0,127	Tolere	0,49	6	Azalış	1
4	20	2323T>C	C775R	Muhtemel Zararlı	0,988	Tolere	0,06	5	Azalış	1
5	20	2302A>G	S768G	Olası Zararlı	0,677	Tolere	0,46	8	Azalış	1
6	20	2317C>T	H773Y	Benign	0,061	Tolere	0,54	2	Artış	1

Ayrıca 6 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerden 1 tanesinin protein stabilizasyonunu arttırdığı, 5 tanesinin ise protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.5'te verilmiştir.

EGFR varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanıli olup, diğer hastalar ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanıli hastalar arasında görülme sıklıkları; V769M, Y764Ter, S768G, H773Y %12,5'iken, ASHK tanıli hastalar arasında görülme sıklıkları ise c.2315_2326dup p.P772_C775dup %12,5, M793I, P753=, Y764=, L861=, L747=, D770G, C775R, T790= %6,25'tir. EGFR tanıli ortak olarak tanımlanan sadece ASHK 2 tanıli hasta arasında görülen P772_C775dup mutasyonudur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. EGFR Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 7'sinde (%29,16) ErbB genine ait 21 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 3, 8, 19, 20, 22 ve intron 19'da saptandı. ErbB2 geninin ekzon bölgelerinde tespit edilen 18 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 8'de %5,55; ekzon 19'da %16,66; ekzon 20'de

%61,11; ekzon 22'de %16,66 oranındadır. 5 hastada birden fazla ErbB2 somatik mutasyonuna sahipti. AAK bir hastada toplam 9 (%42,85) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 8'de c.921C>T D307=, ekzon 20'de c.2313A>G A771=, c.2316C>T Y772=, M774V, G776S, V777M, S779P, ekzon 22'de E892G ve intron 19'da c.2308-3C>T 2308-3C>T'dir. AAK tanılı başka bir hastada toplam 2 (%9,52) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonlar ekzon 19'da I752V missense mutasyonu ile ekzon 22'de c.2685C>T L895= sSNV'dir. ASHK tanılı bir hastada toplam 2 (%9,52) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonlar L755F ile Y781C missense mutasyonlarıdır. ASHK tanılı bir hastada toplam 2 (%9,52) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonlar ekzon 20'de V773L ve A775S missense mutasyonlarıdır. ASHK tanılı bir hastada toplam 5 (%19,04) mutasyon tespit edildi. ErbB2'deki mutasyonlar ekzon 19'da (c.2253C>T) A751=, c.2328T>C G776= sSNV ile S779P, R897W missense mutasyonlarıdır.

ErbB3 geninde meydana gelen ise ekzon 3'te c.316C>T R106Ter nsSNV (stop_gained)'dir. Ayrıca ASHK tanılı 1 farklı hastada ErbB3 genine ait ekzon 3'te meydana gelen 1 (%4,76) farklı varyant saptanmıştır. Bu varyantlar G107 missense mutasyonudur.

Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde %61,53'ü muhtemelen zararlı, %15,38 olası zararlı ve %23,07 benign olarak tanımlandı. SIFT sonucuna göre ise varyantların %69,23'ünün protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu, %30,76'sının ise tolere edilebilir (iyi huylu) olduğu sonucuna ulaşıldı.

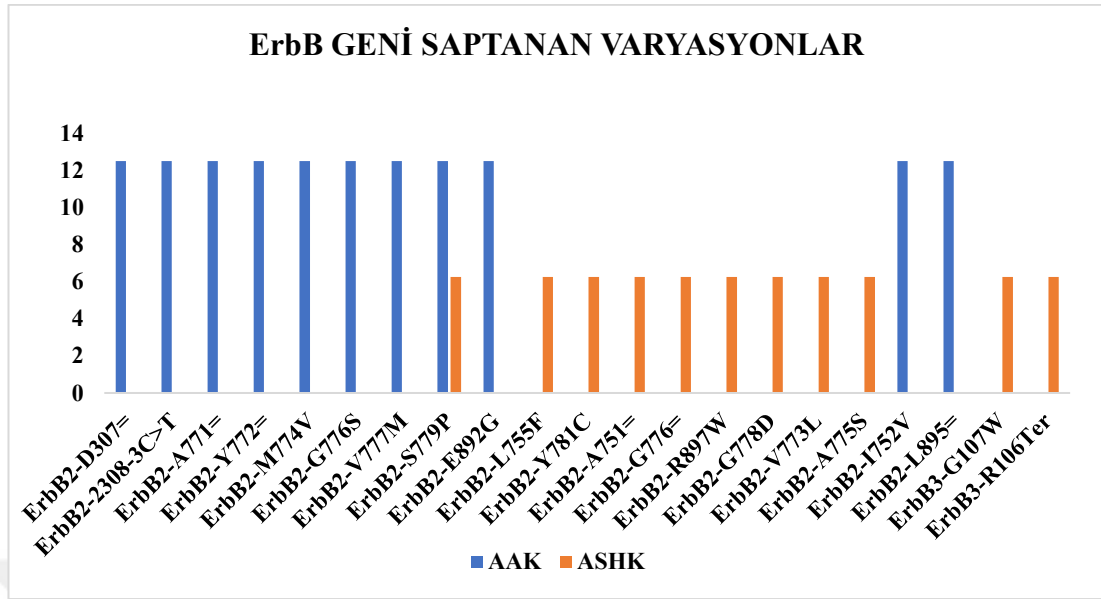
Ayrıca 13 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerden 1 tanesinin protein stabilizasyonunu arttırdığı, 12 tanesinin ise protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. ErbB2-3 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	20	2320A>G	M774V	Muhtemel Zararlı	0.967	Zararlı	0	7	Azalış	1
2	20	2326G>A	G776S	Benign	0.291	Tolere	1	9	Azalış	1
3	20	2329G>A	V777M	Olası Zararlı	0.599	Tolere	0.27	8	Azalış	1
4	20	2335T>C	S779P	Muhtemel Zararlı	0.965	Zararlı	0.02	4	Artış	2
5	22	2675A>G	E892G	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	5	Azalış	1
6	19	2265G>T	L755F	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	7	Azalış	1
7	20	2342A>G	Y781C	Muhtemel Zararlı	0,998	Zararlı	0	6	Azalış	1
8	22	2689C>T	R897W	Olası Zararlı	0,635	Tolere	0,09	7	Azalış	1
9	20	2333G>A	G778D	Benign	0,046	Tolere	1	7	Azalış	1
10	20	2317G>T	V773L	Muhtemel Zararlı	0,98	Zararlı	0	6	Azalış	1
11	20	2323G>T	A775S	Muhtemel Zararlı	0,981	Zararlı	0	9	Azalış	1
12	19	2254A>G	I752V	Benign	0,418	Zararlı	0,04	7	Azalış	1
13	3	319G>T	G107W	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	8	Azalış	1

13. sıra ErbB3 geninde meydana gelen varyasyonu göstermektedir.

ErbB2 varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanılı olup, diğer 4 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları; D307=, intron 19 c.2308-3C>T 2308-3C>T, A771=, Y772=, M774V, G776S, V777M, S779P, E892G, I752V, L895= %12,5'iken, ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise L755F, Y781C, A751=, G776=, S779P, R897W, G778D, V773L, A775S %6,25'tir. Bu iki histopatolojik alt tip arasında S779P varyantı ortak olarak görüldü. ErbB3 varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde ASHK 2 hastada gözlenmiştir. Bu varyantların görülme sıklıkları ise G107W, R106Ter %6,25'tir. S779P varyantı iki histopatolojik alt tipde ortak olarak görülen tek varyanttır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. ErbB Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 6'sında (%25) FGFR2 genine ait 9 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 7'de saptandı. 4 hasta birden fazla FGFR2 somatik mutasyonuna sahipti. AAK bir hastada toplam 4 (%44,44) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar c.780C>T A260=, c.756G>A S252= sSNV'leri, P253S missense mutasyonu ve R251Ter nsSNV (stop_gained)'dır. ASHK bir hastada toplam 3 (%33,33) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar A260= sSNV, P256S ile R255W missense mutasyonlarıdır. ASHK başka bir hastada toplam 3 (%33,33) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar R251Ter nsSNV (stop_gained) ve P256Si ile R251Q missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 2 (%22,22) mutasyon gözlemlendi. G261R ve I257T missense mutasyonlarıdır. AAK tanılı bir hastada S252L (%11,11) ve ASHK farklı bir hastada ise G261R (%11,11) missense mutasyonları gözlemlendi.

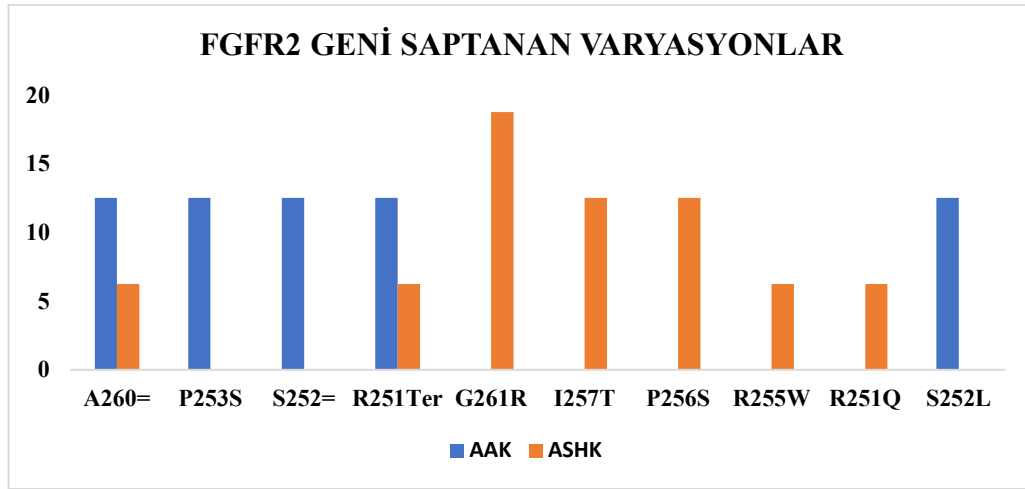
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. FGFR2 varyantlarının (n=7), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %42,85'ini, olası zarar verici %42,85'ini ve benign olanlar ise %14,28'ini oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %85,71'i protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu, %14,28'inin ise tolere edilebilir (iyi huylu) olduğu

sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 7 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin tamamında protein stabilizasyonunun azaldığı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. FGFR2 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	7	757C>T	P253S	Benign	0,321	Zararlı	0,003	8	Azalış	1
2	7	755C>T	S252L	Olası Zarar	0,505	Tolere	0,08	3	Azalış	1
3	7	781G>A	G261R	Muhtemel Zararlı	0,994	Zararlı	0,02	7	Azalış	3
4	7	770T>C	I257T	Muhtemel Zararlı	0,938	Zararlı	0,01	9	Azalış	2
5	7	766C>T	P256S	Olası Zarar	0,834	Zararlı	0,01	9	Azalış	1
6	7	763C>T	R255W	Muhtemel Zararlı	0,996	Zararlı	0,02	7	Azalış	1
7	7	752G>A	R251Q	Olası Zarar	0,611	Zararlı	0	8	Azalış	1

FGFR2 varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanılı olup, diğer 4 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları; A260=, P253S, S252=, R251Ter, S252L %12,5'iken, ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları; G261R %18,75; I257T, A260=, R255W, R251Q, R251Ter %6,25; P256S %12,5'tir. Bu iki histopatolojik alt tip 2 farklı hasta arasında ortak olarak gözlenen R251Ter ve A260= mutasyonlarıdır. ASHK tanılı 3 hasta arasında rastlanan mutasyon G261R ile 2 hasta arasında P256S missense mutasyonudur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. FGFR2 Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 7'sinde (%29,16) PDGFRA genine ait 13 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 12, 14 ve 18'de saptandı. PDGFRA geninin ekzon bölgelerinde tespit edilen 13 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 12'de %7,69; ekzon 14'te %69,23; ekzon 18'de %23,07 oranındadır. 4 hasta birden fazla FGFR2 somatik mutasyonuna sahipti. AAK bir hastada toplam 5 (%38,46) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 14'te meydana gelen c.1978T>C L660=, c.1980G>A L660=, c.1986A>G G662=, ekzon18'de c.2517G>A L839= sSNV'leri ile ekzon 14'de T665I missense mutasyonudur. ASHK bir hastada toplam 3 (%15,38) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 14'te meydana gelen N656D, N659D, K666E missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 2 (%15,38) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 14'te oluşan V658I, K666E missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 2 (%15,38) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 14 N659D ile ekzon 18 I843T missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada ekzon 2 c.1701A>G, P567= (%7,69) sSNV ile bir başka hastada L661P (%7,69) missense mutasyonları gözlemlendi. AAK bir hastada A840T (%7,69) missense mutasyonu gözlemlendi.

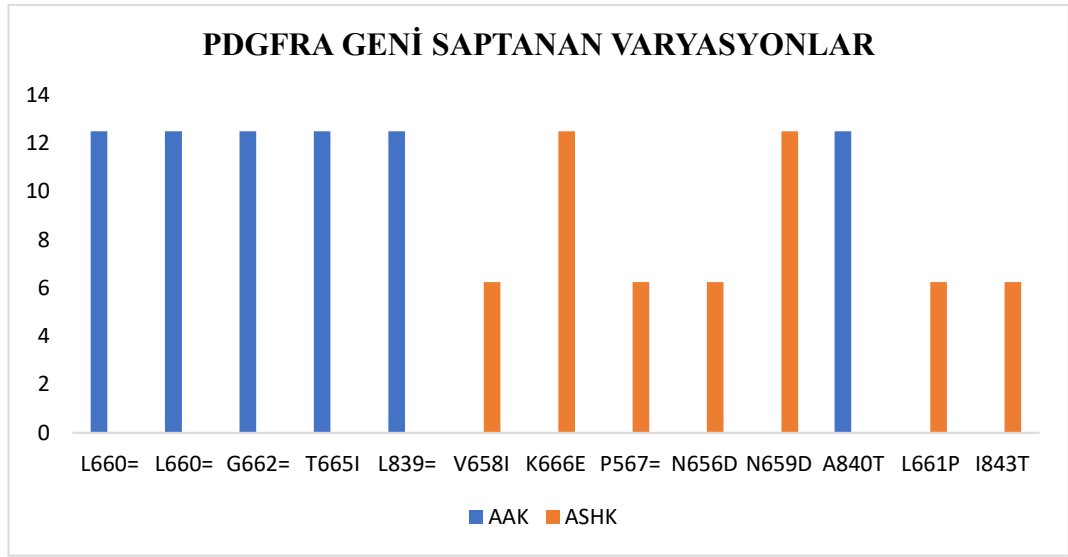
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. PDGFRA gen varyantlarının (n=8), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %87,5'ini, olası zarar verici %12,5'ini oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre

ise varyantların tamamı protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 8 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerden 2 tanesinin protein stabilizasyonunu arttırdığı, 6 tanesinin ise protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8. PDGFRA Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik İndeksi	Azalış Artış	
1	14	1994C>T	T665I	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	7	Azalış	1
2	14	1972G>A	V658I	Olası Zararlı	0,634	Zararlı	0,01	5	Azalış	1
3	14	1996A>G	K666E	Muhtemel Zararlı	0,973	Zararlı	0	5	Azalış	2
4	14	1966A>G	N656D	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	2	Artış	1
5	14	1975A>G	N659D	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	3	Artış	2
6	18	2518G>A	A840T	Muhtemel Zararlı	0,994	Zararlı	0	4	Azalış	1
7	14	1982T>C	L661P	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	5	Azalış	1
8	18	2528T>C	I843T	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	9	Azalış	1

PDGFRA varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanılı olup, diğer 5 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları; L660=, L660=, G662=, L839=, T665I, A840T %12,5'iken, ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise V658I, P567=, N656D, L661P, I843T %6,25, K666E ile N659D varyantları %12,5'tir. ASHK tanılı farklı 2 hasta arasında rastlanan mutasyon K666E ile N659D missense mutasyonudur. Bu iki histopatolojik alt tip hasta arasında ortak olarak gözlenen mutasyon yoktur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. PDGFRA Geni Saptanan Varyasyonlar

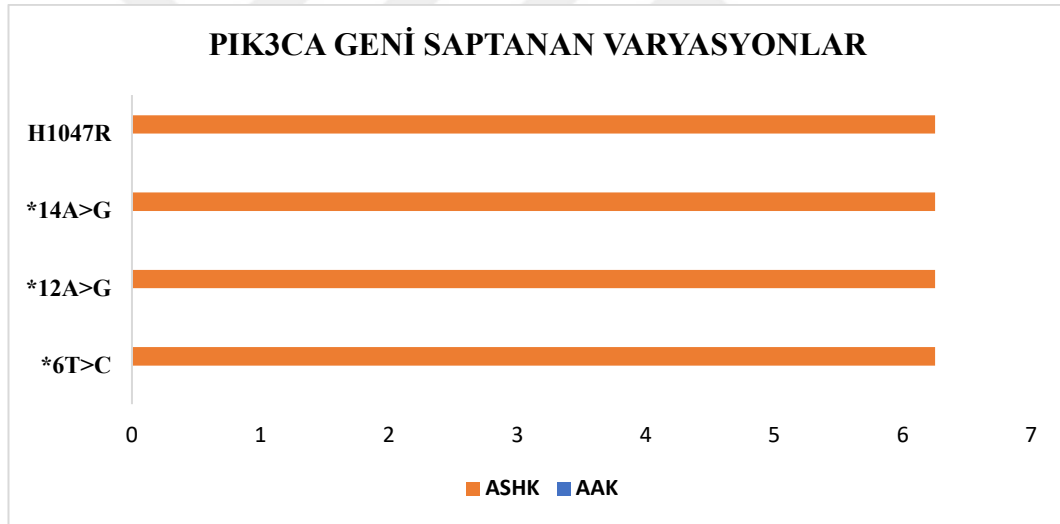
Çalışmaya alınan 24 hastanın 2'sinde (%8,33) PIK3CA genine ait 4 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 21'de saptandı. Bir hasta birden fazla PIK3CA mutasyonuna sahipti. ASHK bir hastada toplam 3 (%75) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 21'de 3'-UTR (3'-untranslated regions) bölgesinde gerçekleşen c.*6T>C, c.*12A>G, c.*14A>G nsSNV'dir. ASHK bir hastada toplam 1 (%25) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyon H1047R missense mutasyonudur.

Tespit edilen H1047R varyantının Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. Bu varyantın Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; benign olarak tespit edildi. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantın protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin tolere edilebilir (iyi huylu) olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca bu SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'in protein stabilizasyonunun azaldığı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. PIK3CA Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu Skoru		Sonucu Skoru		Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	21	3140A>G	H1047R	Benign	0,085	Tolere	0,11	4	Azalış	1

Çalışmaya alınan tüm hastaların histopatolojik olarak sınıflandırıldığında 8'i (%100) AAK olup; 16'sı ASHK alt tipine sahipti. PIK3CA varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları; c.*6T>C, c.*12A>G, c.*14A>G, H1047R varyantları %6,25'tir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. PIK3CA Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 6'sında (%25) TP53 genine ait 28 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 5, 7, 8,10 ve intron 9'da saptandı. TP53 geninin ekzon bölgelerinde tespit edilen 27 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 5'de %11,11; ekzon 7'de %33,33; ekzon 8'de %48,14; ekzon 10'da %7,40 oranındadır. 4 hasta birden fazla TP53 genine ait varyasyonlara sahipti. AAK bir hastada toplam 9 (%32,14) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 7'de

c.744G>A R248=, ekzon 8 c.834T>A P278= sSNV'leri ile ekzon 7'de M246T, M243V ve ekzon 8'de R306Q, R282Q, R282W, P278L, V274A missense mutasyonlarıdır. AAK başka bir hastada toplam 8 (%30,76) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon'de 5 H179Y, A138T; ekzon 7'de R249K missense, c.732C>T G244= sSNV, ekzon 8'de c.813G>A E271=, c.798A>G G266= sSNV'ları, ekzon 10'da E339K missense mutasyondur. ASHK bir hastada toplam 8 (%28,57) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon 7'de R248W, N247S, G245S missense mutasyonları ve ekzon 8'de gerçekleşen c.792A>G L264= sSNV ile G334R, R273H, R273L, G266R missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 3 (%10,71) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon 5'de K132R ekzon 8'de R273H, ekzon 10'da R335H missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada ekzon 7'de R248Q (%3,57) ile başka bir hasta da ise Intron 9'da c.993+2T>C p.993+2T>C (%3,57) splice donor varyant gözlendi.

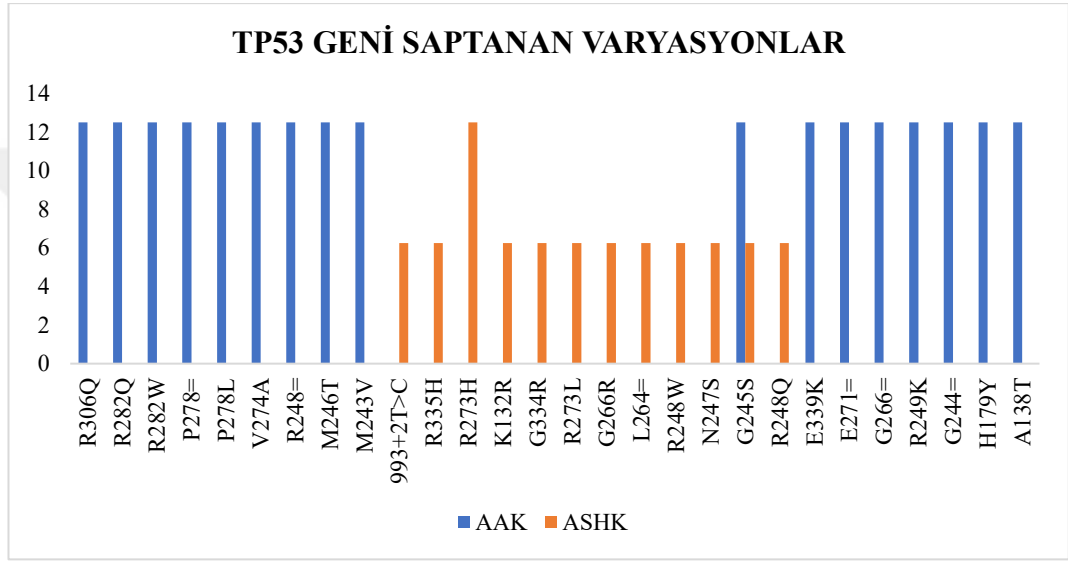
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. TP53 gen varyantlarının (n=21), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %76,19'unu, olası zarar verici %9,52'sini, benign olanlar ise %14,28'ini oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %76,19'u protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu, %23,80'inin ise tolere edilebilir (iyi huylu) olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 21 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin tamamının protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir ve sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10. TP53 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	8	917G>A	R306Q	Benign	0,271	Tolere	0,06	6	Azalış	1
2	8	845G>A	R282Q	Muhtemel Zararlı	0,984	Zararlı	0	9	Azalış	1
3	8	844C>T	R282W	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	6	Azalış	1
4	8	833C>T	P278L	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	2	Azalış	1
5	8	821T>C	V274A	Muhtemel Zararlı	0,915	Zararlı	0	9	Azalış	1
6	7	737T>C	M246T	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	7	Azalış	1
7	7	727A>G	M243V	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	8	Azalış	1
8	10	1004G>A	R335H	Benign	0,159	Tolere	0,15	8	Azalış	1
9	8	818G>A	R273H	Olası zararlı	0,643	Tolere	0,13	9	Azalış	2
10	5	395A>G	K132R	Muhtemel Zararlı	0,993	Zararlı	0,01	3	Azalış	1
11	8	1000G>A	G334R	Muhtemel Zararlı	0,997	Zararlı	0	5	Azalış	1
12	8	818G>T	R273L	Olası zararlı	0,643	Tolere	0,13	9	Azalış	1
13	8	796G>A	G266R	Muhtemel Zararlı	0,951	Zararlı	0,03	8	Azalış	1
14	7	742C>T	R248W	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	4	Azalış	1
15	7	740A>G	N247S	Muhtemel Zararlı	0,946	Zararlı	0	1	Azalış	1
16	7	733G>A	G245S	Muhtemel Zararlı	0,998	Zararlı	0	6	Azalış	2
17	7	743G>A	R248Q	Muhtemel Zararlı	0,994	Zararlı	0	8	Azalış	1
18	10	1015G>A	E339K	Benign	0,127	Tolere	0,2	7	Azalış	1
19	7	746G>A	R249K	Muhtemel Zararlı	0,918	Zararlı	0,04	6	Azalış	1
20	5	535C>T	H179Y	Muhtemel Zararlı	0,991	Zararlı	0	3	Artış	1
21	5	412G>A	A138T	Muhtemel Zararlı	0,992	Zararlı	0	7	Azalış	1

TP53 gen varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanılı olup, diğer 4 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları R306Q, R282Q, R282W, P278=,

P278L, V274A, R248=, M246T, M243V; E339K, E271=, G266=, R249K, G245S, G244=, H179Y, A138T %12,5'iken; ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise 993+2T>C; K132R R335H, G334R, R273L, G266R, L264=, R248W, N247S, G245S; R248Q %6,25; R273H %12,5'tir. Bu iki histopatolojik alt tip arasında 2 hastada ortak görülen G245S ve R273H ASHK tanılı 2 hastada ortak görülen R273H mutasyonudur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. TP53 Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 4'ünde (%16,66) FBXW7 genine ait 5 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 10'da saptandı. Bir hasta birden fazla FBXW7 genine ait somatik mutasyonuna sahipti. AAK bir hastada toplam %60 (3/5) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar V474= ve R473= sSNV'leri ile S478P missense mutasyonlarıdır. ASHK tanılı diğer hastalarda sırasıyla R473= sSNV (%20) ve V474A (%20), R505H (%20) missense mutasyonları görüldü.

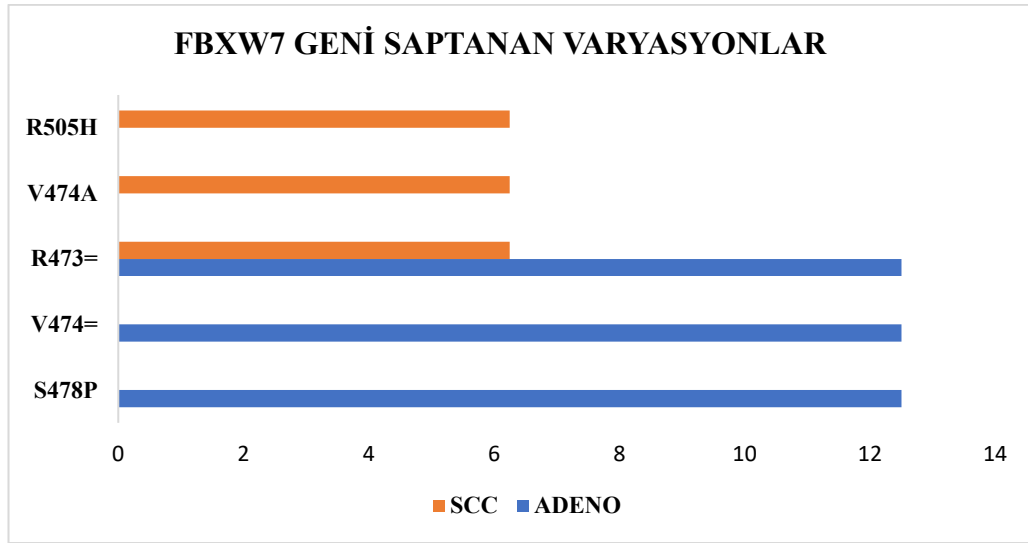
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirildi. TP53 gen varyantlarının (n=3), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; tamamı muhtemelen zarar verici olduğu tespit edildi. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %66,66'sı protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu, %33,33'ünün ise tolere edilebilir

(iyi huylu) olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 3 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin 2'sinin protein stabilizasyonunu azaltıcı, diğerinin ise artırıcı etkisinin olduğu tespit edilip ve sonuçları ise tablo 4.11'de verildi.

Tablo 4.11. FBXW7 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi Artış		
1	10	1432T>C	S478P	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	3	Artış	1
2	10	1421T>C	V474A	Muhtemel Zararlı	0,988	Tolere	0,07	9	Azalış	1
3	10	1514G>A	R505H	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	9	Azalış	1

FBXW7 gen varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; bir hasta AAK tanılı olup, diğer 3 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları V474=, R473=, S478P %12,5; ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise V474A, R473=, R505H %6,25'tir. Bu iki histopatolojik alt tip arasında 2 hastada ortak görülen sadece R473= mutasyonudur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. FBXW7 Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 8'inde (%33,33) KIT genine ait 18 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 11, 13, 17'de saptandı. KIT genine ait tespit edilen 18 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı ekzon 13'de %77,77'iken, ekzon 11 ve 17'de görülen varyantların ise %11,11'dir. Beş hasta birden fazla KIT genine ait somatik mutasyonuna sahipti. AAK bir hastada toplam 2 (%11,11) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon 13'te c.1959T>C I653= sSNV ile S645G missense mutasyonlarıydı. Diğer AAK bir hastada sadece ekzon 13'te S639P missense mutasyonu gözlendi. ASHK bir hastada toplam 9 (%50) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon 11'de c.1677T>C V559=, c.1695A>G G565= sSNV'ı, ekzon 13'te c.1956T>C N652= sSNV'ı ile S639P, V643A, S645I, M651V missense mutasyonları, ekzon 17'de c.2445A>G R815= sSNV'ı ile D816G missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 5 (%27,77) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon 13'te S639P, L641I, V643A, Y646H ve ekzon 17'de D816G missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 2 (%11,11) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon 13'te c.1920A>G E640= sSNV ile E640G missense mutasyonlarıdır. ASHK başka bir hastada toplam 2 (%11,11) mutasyon gözlendi. Bu mutasyonlar ekzon 13'te c.1917T>C S639= sSNV ile Y646H missense mutasyonlarıdır. ASHK diğer 2 hastada toplam 1 (%11,11) mutasyon gözlendi. Bu

mutasyonlar sırasıyla ekzon 13'te gözlenen c.1935T>C S645= sSNV ile L647P missense mutasyonlarıdır.

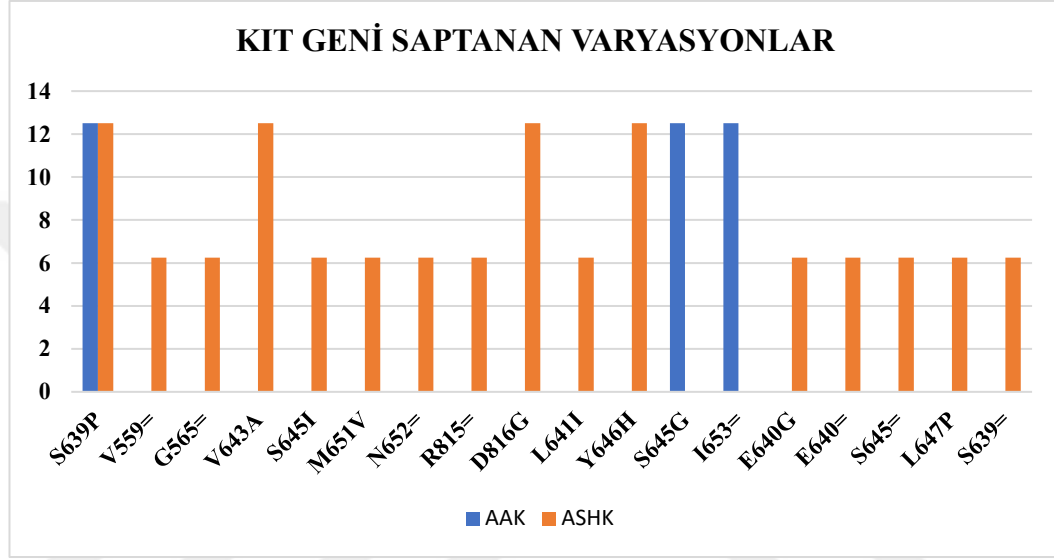
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. KIT gen varyantlarının (n=10), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %90'ı ve benign olan ise %10'unu oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %70'i protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu, %30'unun ise tolere edilebilir (iyi huylu) olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 10 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin 9'unun protein stabilizasyonunu azaltıcı, bir tanesinin ise artırıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir ve sonuçları Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. KIT Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlik Azalış İndeksi	Azalış Artış	
1	13	1915T>C	S639P	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	4	Azalış	3
2	13	1928T>C	V643A	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	10	Azalış	2
3	13	1934G>T	S645I	Muhtemel Zararlı	1	Tolere	0,06	5	Artış	1
4	13	1951A>G	M651V	Benign	0,005	Tolere	0,59	6	Azalış	1
5	17	2447A>G	D816G	Muhtemel Zararlı	0,965	Zararlı	0,02	10	Azalış	2
6	13	1921C>A	L641I	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	4	Azalış	1
7	13	1936T>C	Y646H	Muhtemel Zararlı	1	Tolere	0,14	9	Azalış	2
8	13	1933A>G	S645G	Muhtemel Zararlı	0,998	Zararlı	0	6	Azalış	1
9	13	1919A>G	E640G	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	8	Azalış	1
10	13	1940T>C	L647P	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	9	Azalış	1

KIT gen varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanılı olup, diğer 6 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları S639P, S645G, I653= %12,5; ASHK

tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise V559=, G565= S645I, M651V, N652=, R815=, L641I, E640G, E640=, S645=, L647P, %6,25; S639P, V643A, Y646H ve D816G %12,5'tir. ASHK tanılı 2'şer hasta grubunda S639P, V643A, D816G mutasyonları ortak tanımlanmıştır. Bu iki histopatolojik alt tip arasında 3 hastada ortak görülen S639P missense mutasyonudur (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. KIT Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 4'ünde (%16,67) GNAS genine ait 11 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 8 ve 9'da saptandı. GNAS genine ait tespit edilen 11 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı ekzon 8'de %9,09'iken, ekzon 9'da görülen varyantların ise %90,90'ıdır. Üç hasta birden fazla GNAS varyantına sahipti. AAK bir hastada toplam 5 (%45,45) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 8'de R201C missense mutasyonu ve ekzon 9'da meydana gelen c.679C>T Q227Ter (stop gained) nsSNV mutasyonu, c.681G>A Q227= ile c.684C>T R228= sSNV'ları ve R231C missense mutasyonlarıdır. AAK bir hastada toplam 2 (%18,18) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 9'da oluşan Q227K ve D229N missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 4 (%36,36) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 9'da oluşan R228C, D229G, R231C, R231H

missense mutasyonlarıdır. ASHK bir hastada toplam 1 (%9,09) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyon ekzon 9'daki G226V missense mutasyonudur.

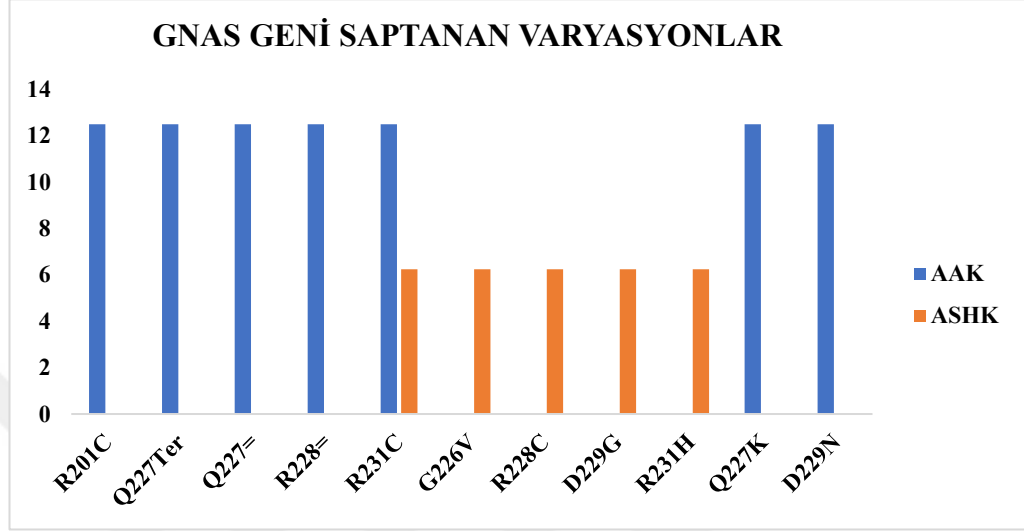
Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. GNAS gen varyantlarının (n=8), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %75'i ve benign olan ise %25'ini oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %75'i protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu, %25'inin ise tolere edilebilir (iyi huylu) olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 8 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin 7'sinin protein stabilizasyonunu azaltıcı, bir tanesinin ise artırıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13. GNAS Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlik Azalış İndeksi	Artış	
1	8	601C>T	R201C	Muhtemel Zararlı	0,960	Zararlı	0,02	4	Azalış	1
2	9	691C>T	R231C	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0,03	7	Azalış	2
3	9	677G>T	G226V	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	7	Azalış	1
4	9	682C>T	R228C	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0,02	6	Azalış	1
5	9	686A>G	D229G	Benign	0,192	Tolere	0,28	1	Azalış	1
6	9	692G>A	R231H	Muhtemel Zararlı	0,998	Zararlı	0	9	Azalış	1
7	9	679C>A	Q227K	Muhtemel Zararlı	0,984	Zararlı	0,01	5	Azalış	1
8	9	685G>A	D229N	Benign	0,164	Tolere	0,13	2	Artış	1

GNAS gen varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanılı olup, diğer 2 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları R201C, Q227Ter, Q227=, R228=, R231C, Q227K, D229N %12,5; ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise

G226V, R228C, D229G, R231C, R231H %6,25'tir. Bu iki histopatolojik alt tip arasında ortak görülen R231C missense mutasyonudur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. GNAS Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 6'sında (%25) ALK genine ait 11 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 21, 22, 23 ve intron 21'de saptandı. ALK genine ait ekzon bölgelerinde tespit edilen 10 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı ekzon 21'de %20, ekzon 22'de %70 ekzon 23'te %10 oranındadır. Üç hasta birden fazla ALK genine ait varyasyona sahipti. ASHK bir hastada toplam 3 (%27,27) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 22'de D1160G missense mutasyonu görülürken, ekzon 21'de A1126T missense mutasyonu ile c.3375C>A G1125= sSNV'dır. ASHK bir hastada toplam 3 (%27,27) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 22'de E1167G, c.3480C>T D1160= ve ekzon 21'de G1125= sSNV'dır. ASHK bir hastada toplam 6 (%54,54) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 21'de G1125= sSNV, ekzon 22'de L1165H, T1151M missense mutasyonları ile c.3484C>T L1162= sSNV, ekzon 23 c.3537T>C I1179= ve intron 21'de 3451-5C>T splice region variant (intron variant) mutasyonlarıdır. Kalan 3 ASHK tanıli hasta da birer (%9,09) mutasyon gözlenmiştir. Bu mutasyonlar ekzon 21'de G1125= sSNV 2 hasta da görülürken; ekzon 22'deki c.3457_3462del P1153_E1154del çerçeve kayması mutasyonudur.

Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. ALK gen varyantlarının (n=5), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %80'i ve olası zararlı olan ise %20'sini oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %100'ü protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 5 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin 4'ünün protein stabilizasyonunu azaltıcı, bir tanesinin ise artırıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14. ALK Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	22	3479A>G	D1160G	Muhtemel Zararlı	0,942	Zararlı	0	1	Artış	1
2	21	3376G>A	A1126T	Muhtemel Zararlı	0,997	Zararlı	0	3	Azalış	1
3	22	3500A>G	E1167G	Olası Zarar	0,787	Zararlı	0	1	Azalış	1
4	22	3494T>A	L1165H	Muhtemel Zararlı	0,985	Zararlı	0	9	Azalış	1
5	22	3452C>T	T1151M	Muhtemel Zararlı	0,970	Zararlı	0,01	1	Azalış	1

ALK gen varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde varyantların tamamının ASHK tanılı 6 hastada olduğu saptandı. Tespit edilen varyantların ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise D1160G, A1126T, E1167G, D1160=, I1179=, L1165H, L1162=, T1151M, 3451-5C>T, P1153_E1154del %6,25 ve G1125= %31,25'tir. Bu histopatolojik alt tip arasında 5 hastada ortak görülen G1125= sSNV'dır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. ALK Geni Saptanan Varyasyonlar

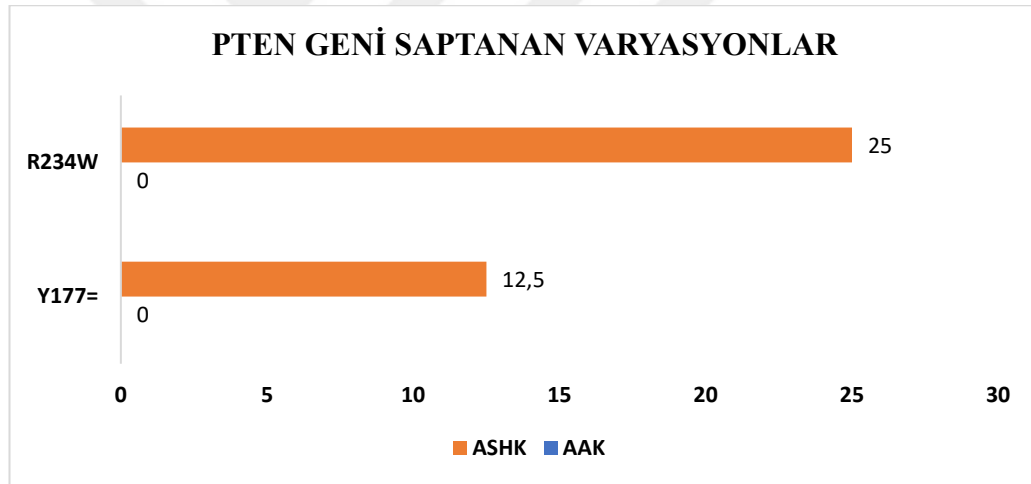
Çalışmaya alınan 24 hastanın 4'ünde (%16,66) PTEN genine ait 2 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 6 ve 7'de saptandı. İki hasta birden fazla PTEN genine ait varyanta sahipti. ASHK tanılı iki hastada toplam 2 mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 6'da c.531T>C Y177= sSNV ile ekzon 7'de R234W missense mutasyonlarıydı. ASHK tanılı diğer iki hastada toplam 1 (%50) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyon R234W missense mutasyonuydu.

Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. PTEN R234W varyantının, Polyphen-2 ve SIFT analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde sırasıyla; protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisi muhtemelen zarar verici ve tolere edilebilir olarak tespit edildi. Ayrıca bu SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. PTEN Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik İndeksi	Azalış Artış	
1	7	700C>T	R234W	Muhtemel Zararlı	0,971	Tolere	0,12	5	Azalış	4

PTEN gen varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde varyantların tamamının ASHK tanılı 4 hastada olduğu saptandı. Tespit edilen varyantların ASHK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları ise Y177= %12,5 ve R234W %25'tir. Bu histopatolojik alt tip arasında 2 hastada Y177= mutasyonu ile 4 farklı hastada R234W missense mutasyonu ortak tanımlandı (Şekil 4.20).

**Şekil 4.20.** PTEN Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 4'ünde (%16,66) IDH genine ait 8 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar tamamı ekzon 4'te saptandı. Üç hasta birden fazla IDH genine ait somatik mutasyonuna sahipti. AAK tanılı bir hastada IDH2 genine ait toplam 3 (%37,5) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar, c.510T>C I170= sSNV ve G171D ile I170T missense mutasyonlarıydı. AAK tanılı bir hastada IDH1 ve IDH2 genine ait toplam birer (%12,5) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar sırasıyla R132C missense mutasyonu ile c.411A>G G137= sSNV'dir. ASHK tanılı

bir hastada IDH2 genine ait toplam 3 (%37,5) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyonlar I170T, I168T, K166E missense mutasyonlarıydı. ASHK tanılı başka bir hastada 1 (%12,5) mutasyon gözlemlendi. Bu mutasyon I168V missense mutasyonuydu.

Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. IDH gen varyantlarının (n=6), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %50'si ve olası zararlı olan %16,66'sını, %33,33'ünü benign oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %88,33'ü protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı düşük güven olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca bu 6 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin tamamının protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.16'da verildi.

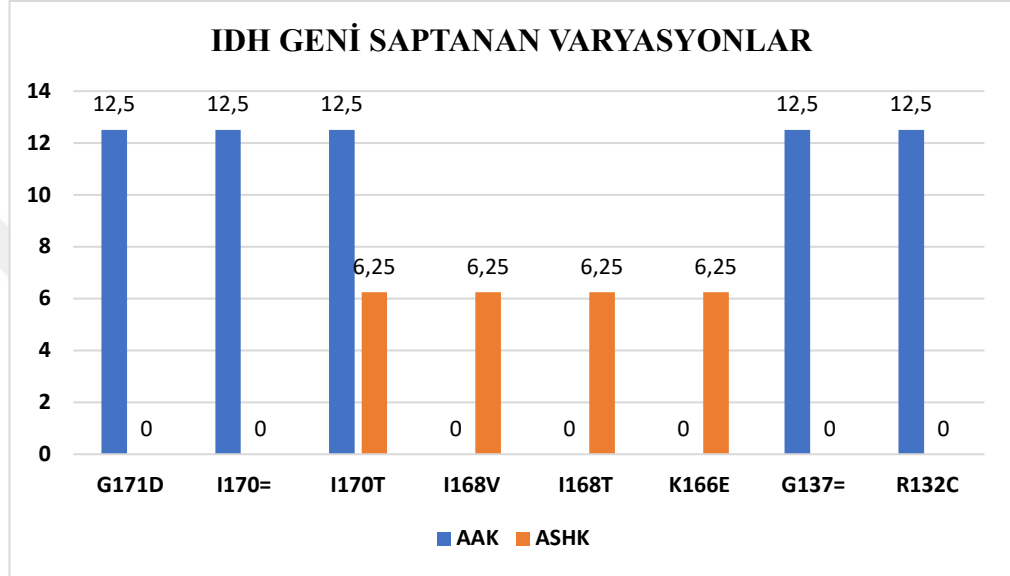
Tablo 4.16. IDH1-2 Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	4	512G>A	G171D	Muhtemel Zararlı	0,998	Zararlı Düşük Güven	0	7	Azalış	1
2	4	509T>C	I170T	Muhtemel Zararlı	0,948	Zararlı Düşük Güven	0	7	Azalış	2
3	4	502A>G	I168V	Olası Zarar	0,629	Zararlı Düşük Güven	0,01	7	Azalış	1
4	4	503T>C	I168T	Muhtemel Zararlı	0,99	Zararlı Düşük Güven	0	7	Azalış	1
5	4	496A>G	K166E	Benign	0,003	Tolere Düşük Güven	0,09	3	Azalış	1
6	4	394C>T	R132C	Benign	0,1	Zararlı Düşük Güven	0,03	3	Azalış	1

6.sıra, IDH1 geni varyantını temsil etmektedir.

IDH2 varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanılı olup, diğer 2 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanılı hastalar arasında görülme sıklıkları; G171D, I170=, I170T, G137=

%12,5'iken, ASHK tanıli hastalar arasında görölme sıklıkları ise I168V, I170T, I168T, K166E varyantları %6,25'tir (Şekil 4.21). Bu iki histopatolojik alt tip arasında ortak olarak görölven I170T varyantıdır. Ayrıca IDH2 geni G137= sSNV taşıyan hastada aynı zamanda IDH1 R132C missense mutasyonu göröldü. Çalışmaya alınan hastalar arasında IDH1 gen mutasyonunu taşıyan tek hastadır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. IDH Geni Saptanan Varyasyonlar

Çalışmaya alınan 24 hastanın 3'ünde (%12,5) MAP2K1 genine ait 3 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar AAK tanıli bir hastada ekzon 3'te c.378C>T I126= sSNV görölürken; ASHK tanıli diğer iki hastada sırasıyla ekzon 6'da c.618C>A L206= sSNV ile ekzon 3'te F129L missense mutasyonu tespit edildi.

SMAD4 genine ait 3 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar AAK tanıli bir hastada ekzon 9'da c.1059C>T Y353= sSNV ile ekzon 11'de C443R görölürken; ASHK tanıli diğer bir hastada ise ekzon 8'de P312T missense mutasyonu gözlemlendi.

SF3B1 genine ait 2 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar AAK tanıli bir hastada ekzon 15'te R702Q görölürken; ASHK tanıli diğer bir hastada ise ekzon 15'te K700E missense mutasyonu gözlemlendi.

NTRK genine ait 3 farklı varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlar AAK tanımlı bir hastada NTRK1 genine ait ekzon 15'te V664A missense mutasyonu, ASHK tanımlı bir hastada NTRK1 genine ait ekzon 15'te V664A, NTRK3 genine ait ekzon 16'da K621Q missense mutasyonları, başka bir ASHK tanımlı hastada ekzon 15'te c.1998T>C I666= sSNV tespit edilmiştir. Bu iki histopatolojik alt tip arasında ortak olarak gözlenen NTRK1- V664A varyantıdır.

ASHK tanımlı diğer 3 hastada sırasıyla; PPP2R1A genine ait ekzon 5'te c.546G>A R182= sSNV, MET genine ait ekzon 16'da c.3330A>G V1110= sSNV, ESR1 genine ait ekzon 5'te W383C missense mutasyonu tespit edildi.

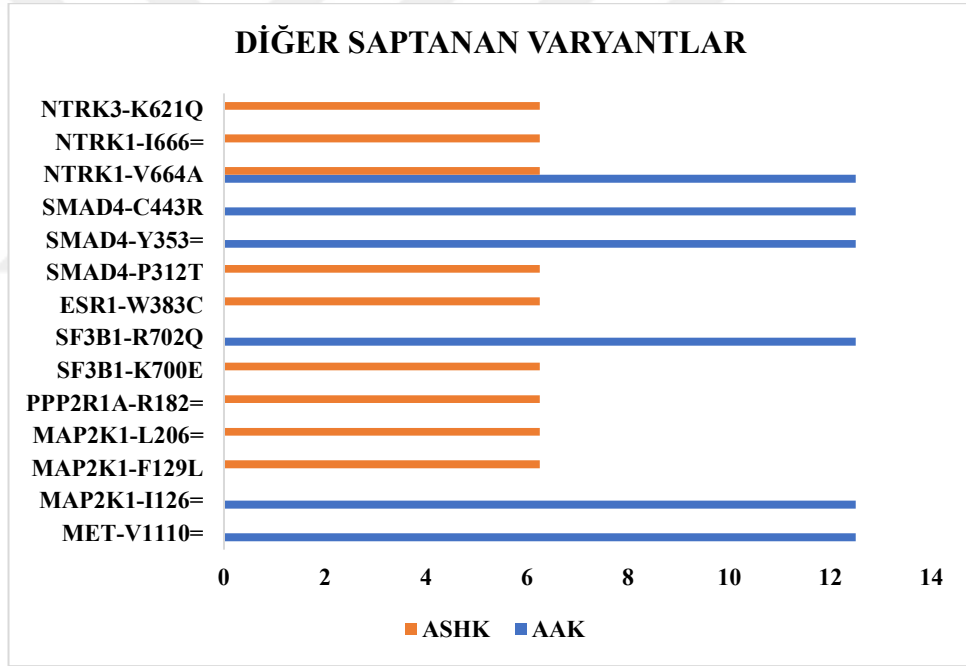
Tablo 4.17. Diğer Gen Mutasyonlarının İnsilico Yazılımlarının Tahmin Sonuçları

Sıra No	Ekzon	Gen- Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	POLYPHEN 2		SIFT		I-Mutant Sonucu		Sıklık
				Sonucu	Skoru	Sonucu	Skoru	Güvenirlilik Azalış İndeksi	Artış	
1	8	SMAD4 934C>A	P312T	Benign	0,176	Tolere	0,18	8	Azalış	1
2	11	SMAD4 1327T>C	C443R	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	1	Artış	1
3	3	MAP2K1 385T>C	F129L	Muhtemel Zararlı	0,994	Zararlı	0,01	7	Azalış	1
4	5	ESR1 1149G>T	W383C	Muhtemel Zararlı	1	Zararlı	0	6	Azalış	1
5	15	SF3B1 2098A>G	K700E	Muhtemel Zararlı	0,999	Zararlı	0	4	Azalış	1
6	15	SF3B1 2105G>A	R702Q	Olası Zararlı	0,85	Zararlı	0	6	Azalış	1
7	15	NTRK1 1991T>C	V664A	Benign	0,328	Zararlı	0	10	Azalış	2
8	16	NTRK3 1861A>C	K621Q	Olası Zararlı	0,826	Zararlı	0,01	1	Azalış	1

Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. Farklı genlere ait varyantlarının (n=8), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %50'si ve olası zararlı olan %25'ini ve %25'ini ise benign oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %87,5'i protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğu, %12,5'i ise tolere edilebilir sonucuna ulaşıldı. Ayrıca bu 8

SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin 7'sinin protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu, 1 snp'nin ise (SMAD4-C443R) artışı tespit edilmiştir ve sonuçları tablo 4.17'de verildi.

Diğer genlere ait varyantların histopatolojik dağılımlarını incelediğimizde; iki hasta AAK tanıli olup, 4 hasta ASHK alt tipine sahipti. Tespit edilen varyantların AAK tanıli hastalar arasında görülme sıklıkları; MET-V1110=, MAP2K1-I126=, SF3B1-R702Q, SMAD4-Y353=, SMAD4-C443R %12,5'iken, ASHK tanıli hastalar arasında görülme sıklıkları ise MAP2K1-F129L, MAP2K1-L206=, PPP2R1A-R182=, SF3B1-K700E, ESR1-W383C, SMAD4-P312T %6,25'tir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Diğer Saptanan Varyantlar

Tablo 4.18. Takibe Alınan Hastaların Klinik Verileri

Hasta Sıra	Evre	KRAS	BRAF	ALK	ROS1	EGFR	Tedavi	Sağ Kalım	Ortalama Takip süresi
1	3B	x	x	x	x	+	KRT	Sağ	754
2	4B	-	-	-	-	-	Palyatif RT	Öldü	420
3	3A	x	x	-	-	-	Tedavi yok	Sağ	432
4	4B	x	x	-	-	-	Takip	Öldü	51
5	4B	-	-	-	-	-	Tedavi yok	Öldü	334
6	4A	x	x	-	-	-	KT	Sağ	306
7	3A	x	x	-	-	-	KT	Sağ	327
8	3A	-	-	-	-	-	Takip	Sağ	249
9	4A	x	x	-	-	-	KT	Sağ	239
10	4B	x	x	x	x	x	Takip	Öldü	425
11	4A	x	x	x	x	x	Takip	Öldü	447
12	4B	x	x	x	x	x	KT	Öldü	313
13	3A	x	x	x	x	x	Tedavi yok	Sağ	414
14	4A	x	x	x	x	x	PRT	Öldü	421
15	4B	x	x	x	x	x	KT, PRT	Öldü	396
16	3A	x	x	x	x	x	Tedavi yok	Sağ	420
17	3A	x	x	x	x	x	KRT	Sağ	389
18	4A	x	x	x	x	x	KRT	Sağ	371
19	3C	x	x	x	x	x	KRT	Sağ	356
20	3C	x	x	x	x	x	KRT	Sağ	364
21	3A	x	x	x	x	x	Tedavi yok	Sağ	422
22	4B	x	x	x	x	x	KT	Öldü	364
23	3C	x	x	x	x	x	KT	Sağ	263
24	4B	x	x	x	x	x	KRT	Öldü	480

Not: Palyatif Radyoterapi (PRT); Kemoradyoterapi (KRT);Kemoterapi (KT)

Birinci sıradaki olguda AAK evre 3B de olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda, EGFR genine ait ekzon 18 kodon 719'da G719S (c.2155G>A), G719C (c.2155G>T), G719C (c.2156G>A), G719C (c.2156G>C) mutasyonlarından birisi saptanmıştır. Ekzon 19'da delesyon tespit edilmiştir. Ekzon 21 kodon 858'de L858R (c.2573T>G) ve kodon 861'de ise L861Q (c.2582T>A) nokta mutasyonları tespit edilmiştir. Olguda EGFR mutasyonu tespit edildiği içinse ALK, ROS1 FISH çalışması yapılmamıştır. Likit biyopsi sonucunda KRAS-T58= sSNV tespit edilirken, EGFR genine ait mutasyon tespit edilemedi. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi almıştır. Tanı konulmasından ortalama 26 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

İkinci sıradaki olguda AAK evre 4B de olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda KRAS, BRAF, ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise sadece NTRK1-

V664A varyantı tespit edildi. Bu olguda beyin, kemik ve böbreküstü bezlerinde metastazı bulunmaktadır. Tedavi olarak palyatif radyoterapi almıştır. Tanı konulmasından ortalama 14 ay içinde hasta vefat etmiştir.

Üçüncü sıradaki olguda AAK evre 3A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda KRAS, BRAF, ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potensiyel klinik önemi olan KRAS, NRAS, HRAS, PDGFRA, KIT, FBXW7, EGFR, FGFR2, IDH2, TP53, ERBB2, GNAS genlerine ait 39 varyant tespit edildi. Tedavi almamıştır. Tanı konulmasından ortalama 15 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Dördüncü sıradaki olguda ASHK evre 4B olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucu ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potensiyel klinik önemi olan NRAS, HRAS ALK, PDGFRA, TP53, ERBB2, ARAF genlerine ait 7 varyant tespit edildi. Bu olguda uzak lenf nodülü, kemik ve karşı akciğer de metastazı bulunmaktadır. Tedavi süreci takipli durumdaydı. Tanı konulmasından ortalama 2 ay içinde hasta vefat etmiştir.

Beşinci sıradaki olguda AAK evre 4B olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potensiyel klinik önemi olan PDGFRA genine ait A840T ile KIT genine ait S645G missense mutasyonları tespit edildi. Bu olguda uzak lenf nodülü, kemik metastazı bulunmaktadır. Tedavi almamıştır. Tanı konulmasından ortalama 12 ay içinde hasta vefat etmiştir.

Altıncı sıradaki olguda AHSK evre 4A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Bu olguda böbreküstü metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoterapi almıştır. Tanı konulmasından ortalama 10 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Yedinci sıradaki olguda AHSK evre 3A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon

saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potensiyel klinik önemi olan FGFR2 genine ait P256S, R251Q, R251Ter ile GNAS genine ait G226V mutasyonları tespit edildi. Tedavi sürecinde kemoterapi almıştır. Tanı konulmasından ortalama 11 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Sekizinci sıradaki olguda ASHK evre 3A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda KRAS, BRAF, ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potensiyel klinik önemi olan KRAS, NRAS, HRAS, ALK, PIK3CA, PDGFRA, KIT, APC, EGFR, PTEN, FGFR2, TP53 genlerine ait toplam 23 varyant tespit edildi. Tedavi süreci takipli durumdaydı. Tanı konulmasından ortalama 8 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Dokuzuncu sıradaki olguda ASHK evre 4A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Bu olguda uzak lenf nodülünde metastaz bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoterapi almıştır. Tanı konulmasından ortalama 9 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Onuncu sıradaki ASHK evre 4B tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Bu olguda adrenal ve kemik metastaz bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoterapi almıştır. Tedavi süreci takipli durumdaydı. Tanı konulmasından ortalama 15 ay içinde hasta vefat etmiştir.

On birinci sıradaki AAK evre 4A tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Bu olguda kemik metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoterapi almıştır. Tedavi süreci takipli durumdaydı. Tanı konulmasından ortalama 15 ay içinde hasta vefat etmiştir.

On ikinci sıradaki ASHK evre 4B tanılı olan hastanın solid biyopsi analizi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Bu olguda karşı akciğer ve kemik

metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoterapi aldı. Tedavi süreci takipli durumdaydı. Tanı konulmasından ortalama 11 ay içinde hasta vefat etmiştir.

On üçüncü sıradaki AAK evre 3A tanılı olan hastanın solid biyopsi analizi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Tedavi almamıştır. Tanı konulmasından ortalama 14 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

On dördüncü sıradaki ASHK evre 4A ve Alzheimer tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda sadece PDGFRA genine ait ekzon 14'te oluşan V658I, K666E missense mutasyonları tespit edilmiştir. Bu olguda beyin metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde palyatif radyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 14 ay içinde hasta vefat etti.

On beşinci sıradaki ASHK evre 4B tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Bu olguda karşı kemik ve dalak metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde palyatif radyoterapi ve kemoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 13 ay içinde hasta vefat etmiştir.

On altıncı sıradaki ASHK evre 3A tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Tedavi almamıştır. Tanı konulmasından ortalama 14 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

On yedinci sıradaki ASHK evre 3A tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda potansiyel klinik önemi olan SF3B, KIT, ESR1, EGFR, PTEN, HRAS, IDH2, ERBB2 ve GNAS genlerine ait toplam 16 varyant tespit edildi. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 13 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

On sekizinci sıradaki ASHK evre 4A tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda potansiyel klinik önemi olan KRAS, NRAS, HRAS, NTRK1, NTRK3, ALK, KIT, FBXW7,

APC, EGFR, PTEN, FGFR2, MAP2K1, IDH2, TP53, ERBB2, PIK3CA genlerine ait 28 varyant tespit edildi. Bu olguda kemik metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 13 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

On dokuzuncu sıradaki ASHK evre 3C tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 12 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Yirminci sıradaki ASHK evre 3C tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 13 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Yirmi birinci sıradaki AAK evre 3A tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda ise; gen paneline ait genlerde mutasyon bulunamamıştır. Tedavi almamıştır. Tanı konulmasından ortalama 14 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Yirmi ikinci sıradaki ASHK evre 4B tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda potansiyel klinik önemi olan PDGFRA, KIT, FBXW7, APC, PTEN, FGFR2, ERBB3, SMAD4 genlerine ait 8 varyant tespit edildi. Bu olguda karaciğer, komşu akciğer ve kemik metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 13 ay içinde hasta vefat etmiştir.

Yirmi üçüncü sıradaki ASHK evre 3C tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda potansiyel klinik önemi olan ALK, PDGFRA, KIT, ERBB2, ERBB3 ve TP53 genlerine ait 15 varyant tespit edildi. Tedavi sürecinde kemoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 9 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı.

Yirmi dördüncü sıradaki AAK evre 4B tanılı olan hastanın solid biyopsi yapılmadığından dolayı patoloji verisi yoktur. Likit biyopsi sonucunda potansiyel klinik önemi olan SF3B1, IDH1, EGFR, FGFR2, KRAS, HRAS, TP53, ERBB2,

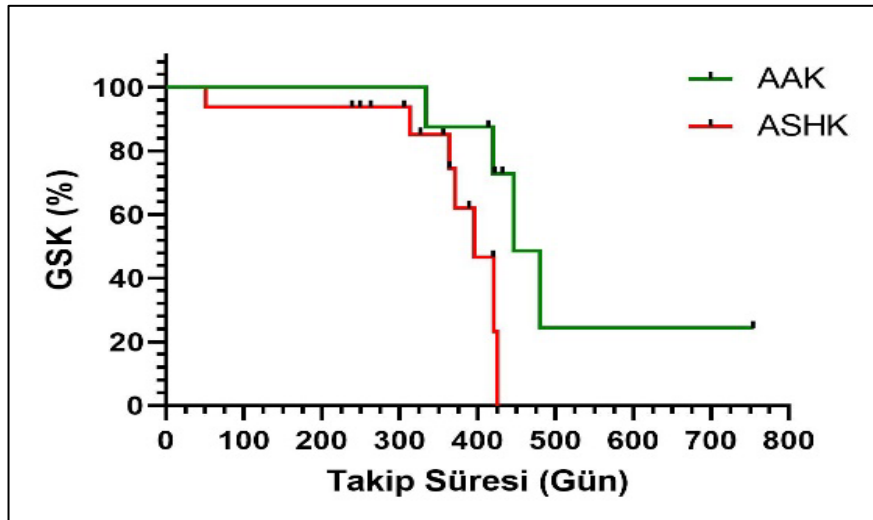
SMAD4, GNAS ve ARAF genlerine ait 21 varyant tespit edildi. Bu olguda kolon, komşu akciğer ve beyin metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 16 ay içinde hasta vefat etti.

Genel Sağkalıma Histopatolojik Tanının Etkisi

Histopatolojik tanıya göre GSK etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı AAK tanılı hastalar için 447, ASHK tanılı hastalar için 396 gün olarak bulundu. Tablo 4.19 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark Log Rank (Mantel-Cox) testine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p_1=0,0325$); Gehan-Breslow-Wilcoxon testine göre ise anlamlı bulunamamıştır ($p_2=0,1074$).

Tablo 4.19. Histopatolojik Tanıya Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

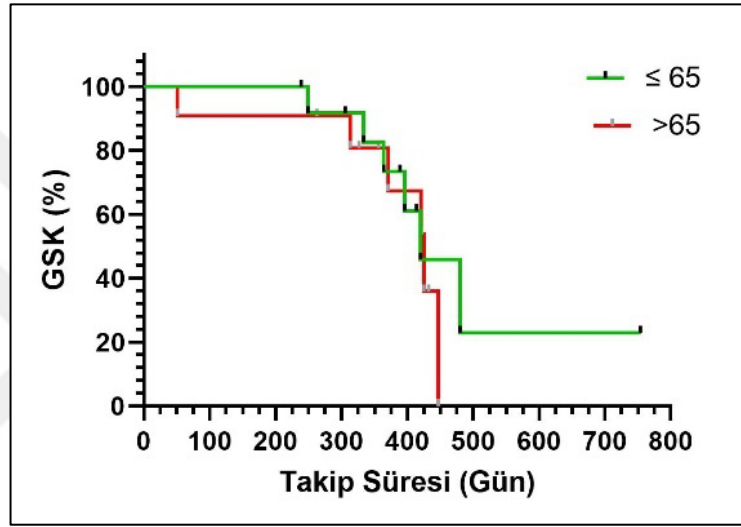
	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	4,574	0,0325
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	2,592	0,1074



Şekil 4.23. Histopatolojik Tanının Durumuna Göre Sağkalım Grafiği

Genel Sağkalıma Yaş Kategorilerinin Etkisi

Yaş kategorisine göre GSK etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı ≤ 65 yaş ve altındaki hastalar için 420 gün, >65 yaş üstünde ise 425 gün olarak bulundu. Tablo 4.20 incelendiğinde sağkalım süresi yönünden yaş kategorileri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p_1=0,6743$, $p_2=0,9015$).



Şekil 4.24. Yaş Durumuna Göre Sağkalım Grafiği

Tablo 4.20. Yaş Kategorisine Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	0,1766	0,6743
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	0,01533	0,9015

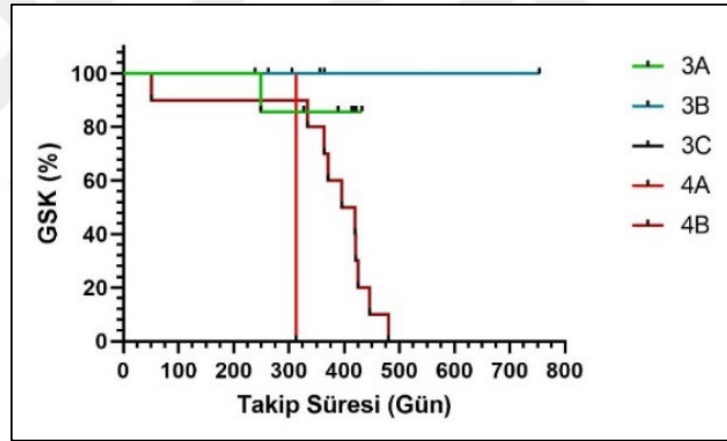
Genel Sağkalıma Evre Dağılımının Etkisi

Evre dağılımına GSK etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde üç farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı 3A, 3B, 3C grupları için yeterli veri olmadığından tanımlanamamıştır.

4A hasta grubu için 313 gün 4B hasta grubu içinse 408 gün olarak bulundu. Tablo 4.21 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark Log Rank (Mantel-Cox) testi ile Gehan-Breslow-Wilcoxon testine göre ise anlamlı bulunamamıştır ($p_1=0,0936$, $p_3=0,3462$). Logrank test for trend testine göre ise anlamlı bulunmuştur ($p_2=0,0217$).

Tablo 4.21. Evre Dağılımına Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	7,946	0,0936
Logrank test for trend	5,271	0,0217
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	4,469	0,3462



Şekil 4.25. Evre Durumuna Göre Sağkalım Grafiği

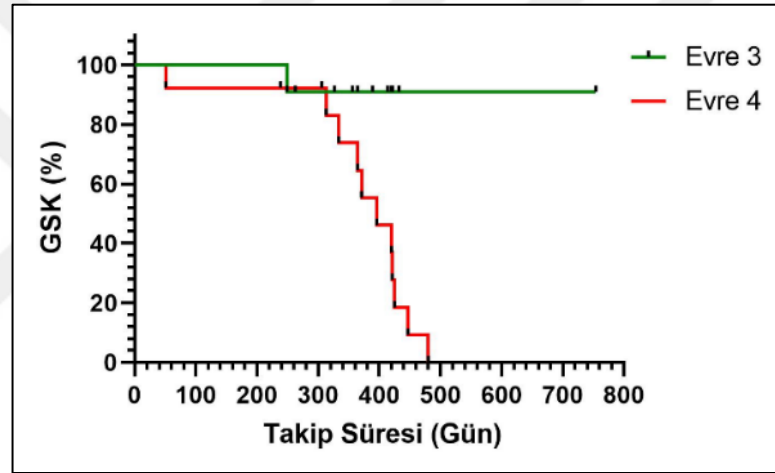
Genel Sağkalıma Genel Evre Dağılımının Etkisi

Genel evreye göre GSK etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde 2 farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı evre 3 için yeterli veri olmadığından tanımlanamamışken; evre 4 için 396 gün olarak bulundu. Tablo 4.22 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark Log Rank (Mantel-Cox) testine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken;

($p_1=0,0105$); Gehan-Breslow-Wilcoxon testine göre ise anlamlı bulunamamıştır ($p_2=0,0593$).

Tablo 4.22. Genel Evreye Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

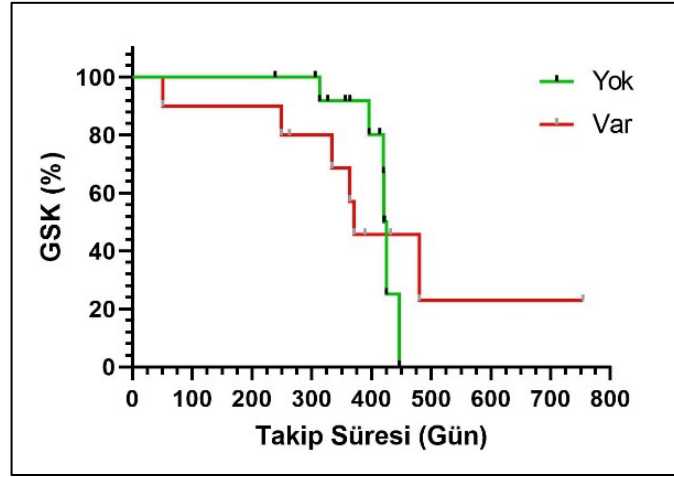
	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	6,547	0,0105
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	3,556	0,0593



Şekil 4.26. Genel Evre Durumuna Göre Sağkalım Grafiği

Genel Sağkalıma Birden Fazla Mutasyon Durumunun Etkisi

Birden fazla somatik mutasyon varlığına göre GSK etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı birden fazla mutasyonu olmayan hasta grubu için 425 gün, birden fazla mutasyonu olan hasta grubu için ise 371 gün olarak tespit edilmiştir. Tablo 4.23 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Genel sağ kalıma hastalığın birden fazla somatik mutasyonunun etkisi yoktu ($p_1=0,8474$, $p_2=0,1658$).



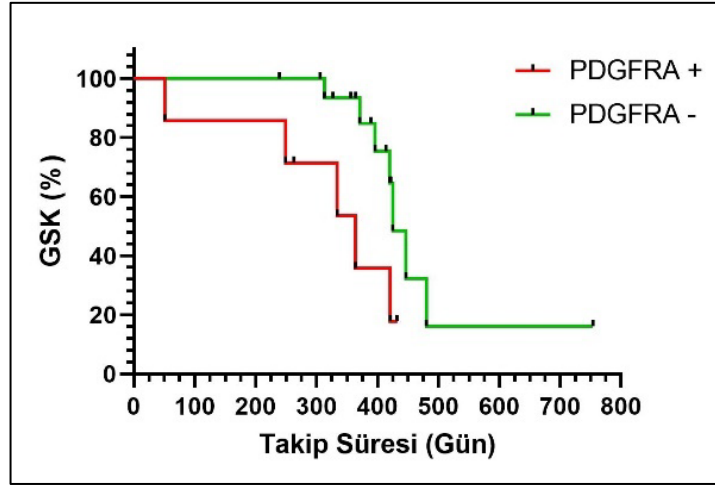
Şekil 4.27. Birden Fazla Mutasyon Varlığı ve Sağ Kalım İlişkisi

Tablo 4.23. Birden Fazla Mutasyon Varlığına Göre Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	0,03703	0,8474
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	1,921	0,1658

Genel Sağ Kalıma PDGFRA mutasyonunun etkisi

GSK'a PDGFRA mutasyonunun etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı PDGFRA mutasyonu olmayan (negatif) için 425 gün, mutasyonu olan hasta grupları içinse (pozitif) 364 gün olarak belirlendi. Tablo 4.24 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Genel sağ kalıma PDGFRA mutasyonunun etkisi vardı ($p_1=0,0366$, $p_2=0,0123$).



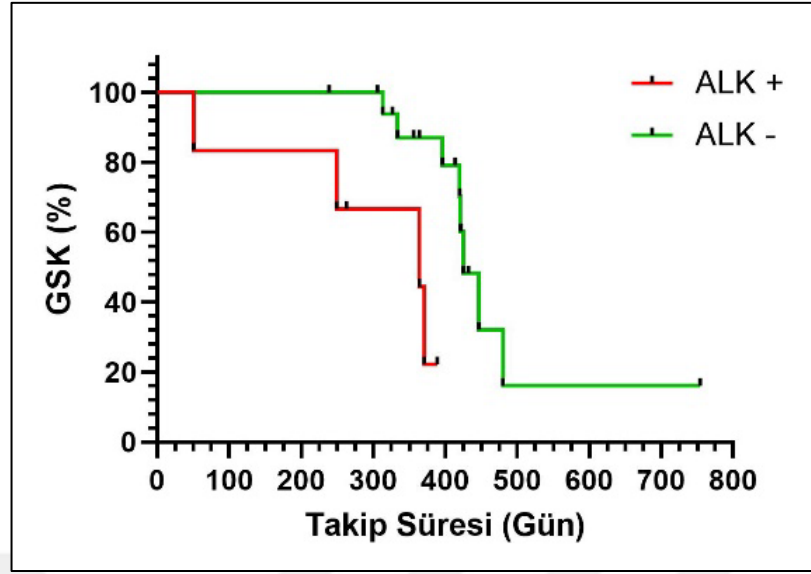
Şekil 4.28. PDGFRA Durumuna Göre Sağ Kalım Grafiği

Tablo 4.24. PDGFRA İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	4,367	0,0366
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	6,274	0,0123

Genel Sağ Kalıma ALK mutasyonunun etkisi

GSK'a ALK mutasyonunun etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı ALK mutasyonuna sahip olan hasta grubu 364 gün, ALK mutasyonuna sahip olmayan ise 425 gün olarak tespit edildi. Tablo 4.25 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Genel sağ kalıma ALK mutasyonunun etkisi vardı ($p_1=0,0366$, $p_2=0,0123$).



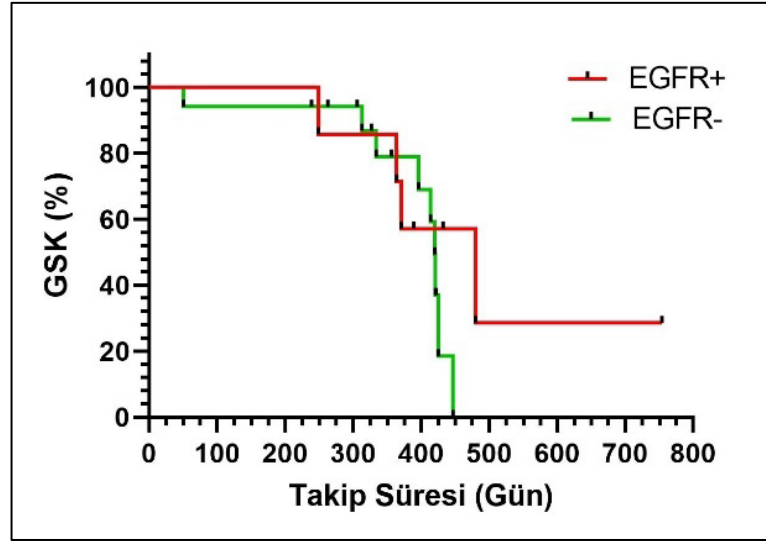
Şekil 4.29. ALK Mutasyon Varlığına Göre Sağ Kalım İlişkisi

Tablo 4.25. ALK İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	8,624	0,0033
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	7,930	0,0049

Genel Sağ Kalıma EGFR mutasyonunun etkisi

GSK'a EGFR mutasyonunun etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı EGFR mutasyonuna sahip olan hasta grubu için 480 gün, sahip olmayan hasta grubu içinse 420 gün olarak tespit edildi. Tablo 4.26 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Genel sağ kalıma EGFR mutasyonunun etkisi yoktu ($p_1=0,3095$, $p_2=0,8640$).



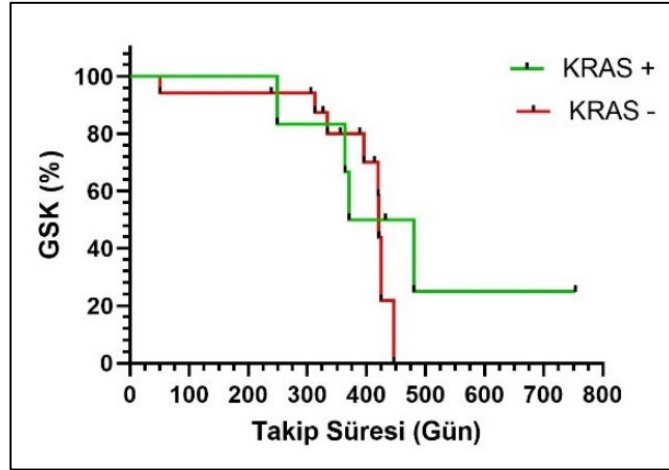
Şekil 4.30. EGFR Durumuna Göre Sağkalım Grafiği

Tablo 4.26. EGFR İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	1,033	0,3095
Gehan-Breslow-Wilcoxon testi	0,02936	0,8640

Genel Sağ Kalıma KRAS Mutasyonunun Etkisi

GSK'a KRAS mutasyonunun etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı KRAS mutasyonuna sahip hasta grubu 425 gün, sahip olmayan hasta grubu ise 421 gün olarak tespit edildi. Tablo 4.27 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Genel sağ kalıma KRAS mutasyonunun etkisi yoktu ($p_1=0,4960$, $p_2=0,8536$).



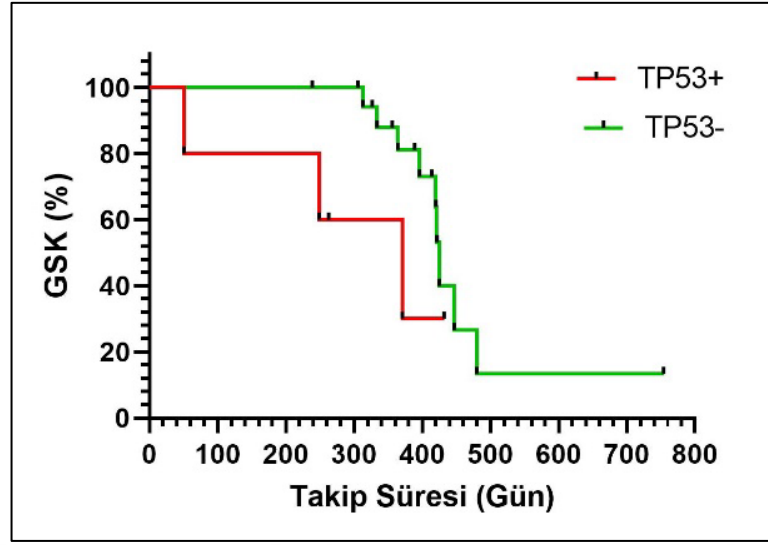
Şekil 4.31. KRAS durumuna göre sağkalım grafiği

Tablo 4.27. KRAS İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	0,4635	0,4960
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	0,03404	0,8536

Genel Sağkalıma TP53 Mutasyonunun Etkisi

GSK'a TP53 mutasyonunun etkisini karşılaştırmak için hesaplanan Kaplan Meier Analizinde iki farklı yöntem ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda medyan sağkalım oranı TP53 mutasyonuna sahip olan hasta grubu için 371 gün, sahip olmayan hasta grubu için ise 425 gündür. Tablo 4.28 incelendiğinde sağkalım dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak Log Rank (Mantel-Cox) anlamlı bulunamamışken; Gehan-Breslow-Wilcoxon testine göre anlamlı bulunmuştur. Genel sağ kalıma hastalığın TP53 mutasyonunun etkisi var/yoktu ($p_1=0,1594$, $p_2=0,0301$).



Şekil 4.32. TP53 Durumuna Göre Sağkalım Grafiği

Tablo 4.27. TP53 İçin Kaplan-Meier Yönteminde Kullanılan Testlerin Karşılaştırması

	Testin Değeri (Ki Kare)	p Değeri
Log Rank (Mantel-Cox)	1,980	0,1594
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	4,704	0,0301

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri riski yaşla birlikte artmaktadır. 2020 Globacon verilerine göre yapılan çalışmada dünya da yaş gruplarına göre akciğer kanseri yükünün, 45 yaşın altındaki yaş gruplarında çok küçük bir yüzdesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Farklı bölgelerde yaşa özel akciğer kanseri yükü modelini yapan araştırmacılar, insidans ve mortalitenin 65-69 yaş grubunda zirveye ulaştığını ve ardından düşüşe geçtiğini bildirmişlerdir (13). Erdem ve Tor, (2022) Türkiye’de akciğer kanseri hastaları ile yaptıkları çalışmada ise 210 hastanın yaş ortalamasını $61,21 \pm 10,0$ olarak bildirmişlerdir (101). Çalışmamızdaki hasta grupları bu veriler ile uyumlu olup, hastalarımızın başvuru anındaki yaş ortalaması $65,6 \pm 7,7$ ve ortalama yaş ise 64,5’tir. Hastalarımızın yaş aralığı ise 50 ile 85 arasında değişmekte olup, literatürde belirtilen yaş aralığı sınırları içerisinde yer almaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda GSK süresine yaş faktörünün etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüşken (101,102), çalışmamızda da benzer sonuç saptandı ($p_1=0,6743$, $p_2=0,9015$).

Akciğer kanseri en fazla histopatolojik alt grubu sahip kanser türlerinden biri olup, histopatolojisinin moleküler alt yapısı ve türünün bilinmesi prognoz açısından oldukça önemlidir. Türkiye’de Kanser İstatistiklerine göre, akciğer kanseri olgularının yaklaşık %45-50’sini ADK, %35’ini SHK, %2’sini BHK ve geri kalanını ise diğer tiplerin oluşturduğu belirtilmektedir (103). Türkiye Kanser İstatistikleri verilerinden farklı olarak hastalarımızın %33,3’ü adenokarsinom, %66,7’i skuamöz hücreli karsinom olarak tespit edildi. Ayrıca yapılan çalışmalarda ve çalışmamızda ASHK tipi hastaların AAK tipine göre GSK’ı daha kötü bir prognoza neden olduğu belirlendi (101).

KHDAK'nin tedavi stratejileri ve prognozları büyük ölçüde hastalığın tanı anındaki evresine bağlıdır (104). AK hastaların çoğu (~%75) tanı aldıkları sırada ilerlemiş (Evre III/IV) hastalığa sahiptir (101,105,106). Elde edilen bulgularımız literatürle uyumlu olup, tanı anında TNM evrelemesine göre ilk tanıda lokal veya ileri evre olarak sınıflandırıldı. Histolojik ayrımı yapılmadan genel olarak değerlendirildiğinde ise; %45,83 evre III; %54,17’si evre IV olarak tespit edildi.

Çalışmamızda başvuru anında hastalar (24 yeni tanı) PET/BT'deki metastatik odaklar açısından incelendiğinde IV. evrede olan 13 hastada uzak organ metastazı olduğu tespit edildi. Sırasıyla en sık metastaz iskelet sistemine (%69,23; n=9), beyine ve sürrenallere (%23,08; n=3), uzak lenf nodu ve karşı akciğere (%15,38; n=2), kolon ve karaciğer ise (%7,69; n=1) olarak tespit edildi. Yapılan çalışmalara benzer olarak en sık metastaz odağı iskelet sistemi olarak görülmektedir (107–109). Metastazların diğer organlarda görülme sıklığı, literatürdeki çalışmalar arasında ve kendi çalışmamızda da değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliğin nedeni birkaç faktöre bağlı olabilir. İlk olarak, hastaların başvuru anındaki evre durumu metastaz sıklığını etkileyebilir. Erken evre kanserlerde metastaz görülme olasılığı daha düşükken, ileri evre kanserlerde metastaz sıklığı artabilir. İkinci olarak, görüntüleme yöntemlerinin farklılıkları metastaz tespitinde etkili olabilir. Son olarak, tümör mutasyon heterojenitesi metastaz oluşumunu etkileyebilir. Tümör içindeki genetik değişikliklerin heterojen olması, farklı metastatik potansiyele sahip hücre alt popülasyonlarının varlığına işaret edebilir. Bu da metastaz görülme sıklığının değişkenlik göstermesine yol açabilir. Bu nedenlerden dolayı, metastazların diğer organlarda görülme sıklığı farklılıklar gösterebilir ve bu durum literatürdeki çalışmalarda ve kendi çalışmamızda da ortaya çıkmıştır.

Periferal kandan cfdna ile mutasyon taraması her zaman %100 başarılı olan bir yöntem değildir. Hastalığın evresi, tümör yükü, kan numunesi miktarı, kanın alınma zamanı, hastanın yakın zamanda almış olduğu tedavi gibi faktörlerin de cfDNA elde edilememesinde etkili olduğu düşünülmektedir (110). Ayrıca elde edilen cfDNA'nın tümör kökenli olmama ihtimalide bulunmaktadır (81).

Diehl ve ark. ctDNA ölçümlerinin, ameliyat veya kemoterapi gören kanserli hastalarda tümör dinamiklerini güvenilir bir şekilde izlemek için kolorektal tanılı 18 hastadan tedavinin öncesi ve sonraki aşamalarında 162 plazma örneği almıştır. Hastaları rezeksiyon durumuna göre değerlendirmeye aldıklarında 20 plazma örneğinden 16'sında ctDNA saptamışlardır. Bu hastaların 4'ü hariç geri kalanında nüks meydana gelmiştir. Eksik rezeksiyon durumundaki hastalarda genel olarak rezeksiyonun ilk 24 saatinde azalma görülürken, sonrasında ise yüksek miktarda artış gözlenmiştir. Bu durumu cerrahi ile indüklenen doku hasarından kaynaklandığını

rapor etmişlerdir. Tam rezeksiyon olan hastalarda ise ctDNA seviyesinin keskin bir düşüş gösterdiğini belirtmişlerdir. Ameliyattan sonra ctDNA'nın yarı ömrünü 114 dakika olarak bildirilmiştir. Araştırmalarında 11 hasta kemoterapi almıştır. Hastalarda kemoterapi tedavisi sırasında ctDNA seviyesinde azalma olmuşken, ilk kemoterapinin kesilmesinden sonra ctDNA'sında ani bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar ctDNA'nın seviyesinin yakın zamanda alınan tedaviye bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir (85). Dawson ve ark. (2013) metastatik meme kanserini izlemek için 30 kadın hastadan 141 seri plazma örneği almıştır. 30 kadının 29'unda (%97) ve 141 plazma örneğinin 115'inde (%82) dolaşımdaki tümör DNA'sı saptadığını raporlamıştır (86). Yapılan bu çalışmalar likit biyopsi uygulamasında farklı zamanlarda alınan numunelerin ctDNA yakalama imkanını ve prognostik sürecin değerlendirilmesinde önemini göstermektedir.

Likit biyopsi testi çalışması tamamlanan 24 hastanın 11 (%45,83)'inden elde edilen cfDNA'dan gen paneline ait herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. Bu olguların 5 (% 45,45)'i III. evre olup, 6 (%54,54)'sı ise IV. evre de olan hastalardı. Lokal ve ileri evrede olan bu olgularda mutasyon bulunmaması ve test sonucunun negatif olması bu genlerde mutasyonun var olmadığı anlamı taşımaz. Ya da var olduğu sonucunu da göstermez. Kullanmış olduğumuz panel dışındaki herhangi bir onkogenik mutasyonun kanserleşme sürecini tetikleyebilir. Ya da yukarıdaki literatürlerde bahsedilen herhangi bir faktör bu süreci etkileyebilir.

Bu durumu en iyi şekilde kanıtlayan birinci sıradaki olgumuzdur. Bu olguda LB sonucunda KRAS-T58= sSNV tespit edilirken, 31 gen panelindeki diğer genlere ait mutasyon tespit edilemedi. AAK evre 3B de olan bu hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda, EGFR genine ait ekzon 18 kodon 719'da G719S (c.2155G>A), G719C (c.2155G>T), G719C (c.2156G>A), G719C (c.2156G>C) mutasyonlarından birisi saptandı. Ekzon 19'da delesyon tespit edilmiştir. Ekzon 21 kodon 858'de L858R (c.2573T>G) ve kodon 861'de ise L861Q (c.2582T>A) nokta mutasyonları tespit edildi. Olguda EGFR mutasyonu tespit edildiği içinse ALK, ROS1 ve FISH çalışması yapılmadı.

Tümörün boyutuna bağlı olarak, tek bir alandan biyopsi veya sitolojik materyal alınacaksa, mümkün olan en iyi sonuçlar için birden fazla örnekleme

yapmaya çalışılmalıdır. Tek bir biyopsi örneği alınan materyal tümörün tüm özelliklerini yansıtmayabilir; bunun nedeni tümörün çoğunlukla heterojen genetik profilinin olmasıdır. Genomik çalışmalar, aynı tümörün farklı bölgelerinde, primer ve metastatik tümörlerde ve hatta eşzamanlı farklı metastatik bölgeler arasındaki heterojenlik ve tümörün de genetik evrim geçirdiğini savunan birçok araştırma bildirilmiştir (86,111–113).

Doku biyopsinin yetersiz kaldığı ve heterojenlik durumlarına örnek olarak çalışmamızdaki 3, 4, 7 ve 8. sıradaki olgularımızın sonuçları en iyi şekilde yansıtmaktadır. Üçüncü sıradaki olguda AAK evre 3A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda KRAS, BRAF, ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potansiyel klinik önemi olan KRAS, NRAS, HRAS, PDGFRA, KIT, FBXW7, EGFR, FGFR2, IDH2, TP53, ERBB2, GNAS genlerine ait 39 varyant tespit edildi. Dördüncü sıradaki olguda ASHK evre 4B olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucu ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potansiyel klinik önemi olan NRAS, HRAS, ALK, PDGFRA, TP53, ERBB2, ARAF genlerine ait 7 varyant tespit edildi. Yedinci sıradaki olguda AHSK evre 3A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potansiyel klinik önemi olan FGFR2 genine ait P256S, R251Q, R251Ter ile GNAS genine ait G226V mutasyonları tespit edildi. Sekizinci sıradaki olguda ASHK evre 3A olan hastanın klinik verilerinden elde edilen solid biyopsi patoloji sonucunda KRAS, BRAF, ALK, ROS1, EGFR genlerinde mutasyon saptanmadı. Likit biyopsi sonucunda ise; potansiyel klinik önemi olan KRAS, NRAS, HRAS, ALK, PIK3CA, PDGFRA, KIT, APC, EGFR, PTEN, FGFR2, TP53 genlerine ait toplam 23 varyant tespit edildi.

Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (mKHDAK) tanısı konmuş hastaların tedavisinde uluslararası kılavuzlarda önerilen biyobelirteçler için eksik genotiplemenin yapılması, günümüzde hala aşılması gereken sorundur. Gutierrez ve ark. (2017) yapmış olduğu çalışmada, 15 farklı klinikten elde edilen ve yeni teşhis edilmiş mKHDAK tanılı 814 hastanın sadece %8'inde uluslararası kılavuzlar

tarafından önerilen tüm biyobelirteçler için eksiksiz genotipleme yapıldığı bildirilmiştir. Bu durum, mKHDAK tanılı hastaların tedavisini zorlaştırmaktadır. Çalışmada, hastaların yaklaşık üçte biri EGFR mutasyonları veya ALK füzyonları için test edilmemiştir. Ayrıca, ROS1 füzyonlarının %75'i, BRAF V600E mutasyonu, MET amplifikasyonları veya ekson 14 atlama değişiklikleri, RET füzyonları ile ERBB2 mutasyonları için ise %80'den fazlası test edilmemiştir (114). Leighl ve ark. (2019) yeni tanı konulmuş 282 KHDAK tanılı hastalar için yapmış oldukları çalışmada, hastaların sadece %18'inde moleküler analiz için önerilen sekiz kılavuz biyobelirteç genin doku genotipleme analizinin yapıldığını bildirmişlerdir. Bu hastaların %83'ü EGFR mutasyonları için test edilmiş ve %80'i ise ALK füzyonları için test edilmiştir (115).

Yapılan çalışmalara benzer olarak, çalışmaya alınan 24 hastanın 15'inden (%62,5) klinikte moleküler patoloji istenmemiştir. Bu hastaların 11'i ASHK ve 4'ü AAK tanılı hastalardır. ASHK tedavisinde ön planda moleküler analiz yapılması gerekli görülmedikçe, diğer rutin tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bu yüzden patoloji sonuçları veri olmadığı için değerlendirilmeye alınmadı. AAK tanılı hastalarda ise moleküler patoloji analizi ASHK histolojik tipine göre daha ön planda değerlendirmeye alınmaktadır. Buna karşı hastalarımızdan 4'ünde ALK, ROS ve EGFR mutasyon testi yapılmadı. Bu hastalarımızdan ikisi tanı sonrası tedavi almadı. 4B evrede olan iki hastanın durumu doku biyopsisine uygun olmaması nedeniyle tedavilerinde kemoterapi ve kemoradyoterapi gördü.

Lin ve ark. (2021)'nın yapmış olduğu çalışmada AAK tanılı 100 hastadan almış oldukları doku ve likit biyopsi örnekleri üzerinden ilgili gen mutasyonlarını NGS ile tespit ederek, doku ve likit biyopsi sonuçlarını birbirleriyle karşılaştırmışlardır. Hastaların %78'inde tespit ettikleri mutasyonları doku, plazma veya her ikisinde de bulmuşlardır. Ayrıca hastaların %22'sinde ise her iki analizde mutasyon tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Klinik olarak ilgili 78 mutasyondan 37'si (%47,4) hem doku hem de plazmada, 37'si (%47,4) yalnızca dokudan ve 4'ü (%5,1) ise sadece plazmada tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, buldukları sonuçlara göre, ilgili genlerde her iki testi negatif sonuçlanan durumlarda mutasyon olmadığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca, ilgili genlerde her iki testten en az birinde mutasyon

tespit edilen durumları ise gerçek pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak doku bazlı NGS'nin akciğer adenokarsinomunda klinik olarak ilgili mutasyonların saptanmasında plazma bazlı NGS'den önemli ölçüde daha yüksek klinik duyarlılığa sahip olduğunu raporlamışlardır (116). Leighl ve ark. (2019) yeni tanı konulmuş 282 KHDAK hem solid hem de likit biyopsi teknikleri kullanarak 8 gen üzerinden karşılaştırmasını yapmışlardır. İki panelde ortak olarak taranan genler için değerlendirildiğinde, sadece solid biyopsi sonucu pozitif olan hastalar %4,26'sını, her ikisinde negatif sonuçlanan %68,43'ünü, sadece LB analizinde pozitif sonuçlanan %10,28'ini, her ikisinde pozitif sonuçlanan %17,02'sini oluşturmaktadır (115).

Çalışmaya alınan 24 hastanın 9'unda (%37,5) klinikte moleküler patoloji analizi yapıldı. Birinci olgu hariç 2-9. arası olguların (%88,89) moleküler patoloji sonucunda ALK, ROS, EGFR genlerine ait varyasyon saptanmadı. Sekizinci olguda ALK, ROS ve EGFR dışında KRAS ve BRAF genlerine de bakılmış ve sonuç negatif olarak tespit edilmiştir. LB testi taraması sonucunda ise, ALK, ROS, EGFR genlerine ait 6 hastada (%66,67) mutasyon analizi negatif sonuçlanmıştır. Bu 6 hastanın 3'ünde ise gen paneline ait herhangi bir mutasyon tespit edilemedi. Geri kalan 3'ünde ise gen paneline ait en az bir gene ait mutasyon tespit edildi. Üçüncü olguda EGFR, 4. olguda ALK, 8. olgu da ise KRAS, ALK, EGFR genlerine ait varyantlar tespit edildi. Beş hastanın (%55,56) hem plazma hem doku örneklerinin analiz sonucu negatif olarak bulundu. Likit biyopsi analizi sonucunda 3, 4 ve 8. olgularda ilgili genlere ait en az bir mutasyon bulundu. Üçüncü olguda KRAS, NRAS, HRAS, PDGFRA, KIT, FBXW7, EGFR, FGFR2, IDH2, TP53, ERBB2, GNAS genlerine ait 39 varyant tespit edildi. Dördüncü olguda NRAS, HRAS ALK, PDGFRA, TP53, ERBB2, ARAF genlerine ait 7 varyant tespit edildi. Sekizinci olguda KRAS, NRAS, HRAS, ALK, PIK3CA, PDGFRA, KIT, APC, EGFR, PTEN, FGFR2, TP53 genlerine ait toplam 23 varyant tespit edildi. Sadece 1. sıradaki olguda doku analizinde tanımlanan EGFR genine ait patojenik mutasyon tespit edildi. Likit biyopsi analiz sonucunda ise KRAS T58= sSNV tespit edildi. İkinci ve 7. olgularda, likit biyopsi analizi sonucunda ALK, ROS ve EGFR genlerinde mutasyon negatif bulunmasına rağmen, potansiyel klinik önemi olan farklı mutasyonlar tespit edildi. 2. olguda NTRK1 V664A varyantı tespit edilirken, 7. olguda FGFR2 genine ait P256S,

R251Q, R251Ter varyantları ile GNAS genine ait G226V varyantları belirlendi. Lin ve ark. (2021)'nın yapmış olduğu çalışmada bahsedildiği gibi elde edilen bulgularımızın sonucunda her iki testte ilgili genlerde mutasyonun negatif olması gerçek negatifliği gösterirken, her iki testten birinde mutasyonun olması ise gerçek pozitifliği tanımlamaktadır. Özetle araştırmamızda iki panelde ortak olarak taranan genler için değerlendirdiğimizde, sadece solid biyopsi sonucu pozitif olan hastalar %11,11'ini, her ikisinde negatif sonuçlanan %55,55'ini, sadece LB analizinde pozitif sonuçlanan 33,33'ünü oluşturmaktadır. Ayrıca literatürlerde karşılaştırıldığında her iki test yönteminin de belirli kısıtlamaları olmasına rağmen, yaptığımız çalışmada görüldüğü gibi hem doku biyopsisi hem de likit biyopsi birbirinin eksikliğini dolduran tamamlayıcı yöntemler olduğu düşüncesindeyiz.

EGFR geni 28 ekzondan oluşmakta olup, tirozin kinaz domaini ekzon 18-21 arasındaki ekzonlar tarafından kodlanmaktadır (46). Ekzon 18'deki aktive edici mutasyonlar, ekzon 19'daki delesyonlar ve ekzon 21'deki L858R nokta mutasyonu tüm EGFR mutasyonlarının %90'ını oluşturur. Bu mutasyonlara sahip tümörlerin EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine yanıt oranları %70 civarındadır. Ekzon 20'deki mutasyonlar daha nadir görülmekte olup, EGFR inhibitörlerine direnç kazandırdığı düşünülmektedir (50).

Huang ve ark. (2022) KHDAK doku biyopsisi materyalinden yapılan incelemesinde 238 vakanın (%43,3) 103'ünde, 104 EGFR mutasyonu tanımladıklarını ve ekzon bölgelerinde en yüksek görülme sıklığına göre ise ekzon 19'da %20,6 ile ekzon 21'de %19,3, ekzon 18'de %2,5 ve ekzon 20 için ise %0,4 olarak raporlamışlardır (117). Sedef ve ark. (2017) KHDAK tanılı 63 hasta ile yaptıkları çalışmada EGFR mutasyonu taşıyan 45 (%71,4) hastayı tanımlamışlar. Ekzon bölgelerinde görülme sıklıklarına göre EGFR mutant 45 hastanın 22'sinde (%34,9) ekzon 19 delesyonu ve 16 hastada (%25,4) ekzon 21 mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir (118). Ünal ve ark. (2013) çalışmasında KHDAK'li 48 hastanın 18'inde (%42,6) EGFR mutasyonlarını tespit etmişlerdir. Elde edilen bulgularında EGFR mutasyonlarının %50'si ekzon 20 T790M, %38'i ekzon 19 delesyonları ve %12'si ekzon-21 L858R mutasyonu olarak bildirilmiştir (119). Chatrziandreu ve ark (2015) 956 KHDAK tanılı hasta da EGFR mutantı taşıyan 101 (%10,6) hastayı tespit

etmişlerdir. EGFR mutasyonlarının ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 18’de %2,9, ekzon 19’da %61,4, ekzon 20’de %15,8, ve ekzon 21’de %19,8 olarak raporlamışlardır (120). Çalışmaya alınan 24 hastanın 6’sında (%25) EGFR genine ait 13 farklı varyant LB yöntemiyle saptanmıştır. Bu mutasyonların ekzon 19, 20, 21’de dağılım gösterdiği tespit edildi. Ekzon bölgelerinde tespit edilen 13 farklı varyantın görülme sıklığı; ekzon 19’da %15,38; ekzon 20’de %76,92; ekzon 21’de 7,69 oranındadır. Farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, ekzon 19’da en yüksek mutasyon oranı görülürken, çalışmamızda ise ekzon 20 ‘de en yüksek mutasyon oranı görüldü. Ünal ve ark. (2013) yapmış olduğu çalışma ile çalışmamız da ekzon 20’de mutasyon görülme durumu benzerlik göstermektedir. Oxnard ve ark. (2014) yapmış olduğu çalışmada ekzon 20 mutasyonlarının sigara içmeyen ve Asyalı hastalarda daha sık görüldüğünü belirtmişlerdir. Ekzon bölgelerinde elde edilen mutasyon oranının coğrafi faktörler, etnik köken gibi faktörlerin etkisi ile etkili olabileceği düşünülmektedir. Solid biyopsi sonucunda bir hastada EGFR gen mutasyonunun eklenmesiyle çalışmamızda ilgili genin görülme sıklığı %29,16 (n:7) olarak tespit edildi. Diğer çalışmalar ile literatürde belirtilen oranlara yakın bir sonuç elde edilmiştir. Bu oranın düşük olması, bazı hastalarda hem solid biyopsi analizin bulunmaması hem de likit biyopsi analiz sonucunda tedaviden önce tek bir likit örneğinden analiz yapılması, tedavi sonrası tekrar likit biyopsi analizi yapılamaması gibi kısıtlamalardan kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Yapılan araştırmalarda EGFR mutasyonları olan hastalar, vahşi tip EGFR'ye sahip olanlardan daha iyi hayatta kalma süresine sahip olduğunu bildirmişken (117,119); benzer olarak çalışmamızda GSK’a EGFR mutasyonuna sahip olgularımızın daha iyi sağkalıma sahip olduğu tespit edildi.

Birkaç önde gelen kanser mutasyon veri tabanını değerlendiren yakın tarihli bir yayına göre, KRAS solid tümörlerdeki üç RAS geninden en yaygın şekilde mutasyona uğrayan gen olmakla beraber (%75), ardından NRAS (%17) ve HRAS (%7) olduğunu raporlamışlardır (121).

Batı toplumlarında yapılan çalışmalarda, akciğer adenokarsinomunda KRAS mutasyonunun %20-50 oranında görüldüğü raporlanmıştır (5,122–125). Benzer şekilde, bu toplumlarda ASHK’da KRAS mutasyonu düşük oranlarda (%4,4)

görülmektedir (122). Çin'de yapılan bir çalışmada, akciğer adenokarsinomlu hastalarda KRAS mutasyonunun %10,7 olduğu tespit edilmiştir (126). Çalışmamızda batı toplumlarına benzer olarak KRAS mutasyonunun AAK'da %25 sıklıkla görüldüğü, özellikle ASHK'da daha yüksek oranda (%18,75) tespit edildiği belirlenmiştir. KRAS mutasyonunun akciğer kanseri hastalarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda KRAS mutasyonlarının %80'i ekzon 2'de bulunan kodon 12'de tespit edilmiştir (5,122,123,125,126). Çalışmamızda KRAS genine ait 14 farklı varyant saptanmış olup, yapılan araştırmalardan farklı olarak mutasyonlarının %14,28 ekzon 2'de'iken, %85,71 ekzon 3'te daha yaygın olduğu tespit edildi.

Literatüre benzer olarak G12S mutasyonu olgularımızda %6,25 sıklıkta tespit edilen tek 12. kodon mutasyonudur. Bulgularımızda iki histopatolojik alt tip arasında 2 hastada ortak görülen Q61= ve G60D varyantlarıdır. G60D onkogenik varyantı bir çok kanser türünde nadir olarak tanımlanmıştır (127–129). Çalışmamızda 3. ve 8. olguda tespit edilen G60D varyantı için insilico analizini sonuçlarımız Polyphen-2 muhtemelen zararlı (1) olarak tespit edilirken, SIFT sonucumuz ise zararlı (0) olarak tespit edilmiştir. Bu varyantın SNP'si için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. PROJECT HOPE analiz programının sonucuna göre bu varyantın vahşi tip ve mutant rezidü arasındaki özelliklerindeki farklılıklar, nükleotid (GTP) ile etkileşimlerin kaybına kolayca neden olabilir (130). Clinvar veri tabanında bu varyant patojenik olarak belirtilmiştir. G60D KHK'da ise daha önce yayınlanan bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda 2 histolojik alt tip arasında (3. ve 8. olgu) görülen bu varyant üzerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Ayrıca AAK tanılı 3A evreli 3. olgumuzda ve ASHK tanılı 3A evreli 8. olgumuzda KRAS, HRAS NRAS mutantı ait genler bulunmaktadır. RAS ailesi için mutant birlikteliği gösteren olgularda kötü prognoz göstereceğine dair yapılan araştırmalar bulunmaktadır. Bu duruma örnek verecek olursak, Tang ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada, vahşi tip HRAS ve NRAS'ın in vitro ve in vivo olarak onkogenik KRAS kaynaklı insan akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini

baskılayabildiğini tespit etmişlerdir. Bu bulgular, HRAS ve NRAS'ın onkojenik KRAS kaynaklı akciğer adenokarsinomunda tümör baskılayıcı etkileri olabileceği göstermektedir (131). Çalışmaya alınan hastaların %41,67'sinde (10/24) RAS genine ait en az bir mutasyon tespit edildi. Sinonim olan varyantları taşıyan olguları çıkardığımızda klinik için önemi olan %60 (6/10) sıklıkta varyanta sahip olgumuz tespit edildi. KRAS, HRAS ve NRAS gen mutasyonlarının birlikteliği olan olgularımız %50'sini (3/6), KRAS ve HRAS geninin birlikteliği olan olgumuz ve NRAS ve HRAS birlikteliği görülen olgumuz ise %16,7'sini (1/6) oluşturmaktadır. RAS birlikteliği göstermeyen sadece %16,7'sininde (1/6) HRAS tespit edildi. Literatür verisi ile değerlendirildiğinde RAS izoformlarını beraber taşıyan olgularda, RAS aktivasyonunun giderek artacağı bir sürece girmesine, yakın bir süreç içinde de evresinin artacağı veya hasta gruplarının daha kötü prognoza sahip olacağı düşüncesindeyiz.

KRAS E63K ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre depolarizasyonu, hücre periferi çevresinde yoğun zar dalgalanması ve lamellipodia oluşumunun belirgin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Filopodia ve psödopodia oluşumu da gözlemlenmiştir. Bu hücre iskeleti özellikleri, oldukça dinamik aktin ağlarına sahip kontraktıl ve hareketli hücrelerin tipik özelliğidir ve bu, nadir KRAS mutantlarının hücresel göç üzerindeki rolünün olacağını bildirmişlerdir (132). Ayrıca E63 kodonuna ait varyantlar SOS1'in α H sarmalını taklit ederek RAS-GEF etkileşimlerini bozar (133). Çalışmamızda AAK tanılı 3. ve 24. olgularımızda ortak olarak görülen E63G misesens mutasyonudur. Bununla beraber aynı kodonda ASHK tanılı 18. olguda E63= ile 3. olgumuzda E63K varyantları da tespit edilmiştir. AAK tanılı 3A evreli 3. olgumuzda ve 4B evreli 24. olgumuzda KRAS, HRAS, NRAS gen mutasyon birliktelikleri ile aynı zamanda bu olguda kolon, komşu akciğer ve beyin metastazı bulunmaktadır. Ayrıca Angeles ve ark. (2019) E63K varyantı için insilico analizleri kullanan araştırmacılar Polyphen-2 analizi sonucunda muhtemelen zararlı (0,985) olarak tespit ederken, SIFT sonucu ise zararlı (0) olarak bildirmişlerdir (132). Çalışmamızda E63 varyantları için insilico analizini sonuçlarımız benzerlik göstermekle birlikte yapılan çalışmadan farklı olarak, bu kodona ait varyantların SNP'leri için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık.

Üçüncü olguda Y64 kodonunda tespit edilen varyantlar üzerine literatürde çok az çalışma bulunmaktadır. Heterozigot Y64C varyantı daha önce in vitro kolon kanseri hücre hattında tespit edilmişken (134), KHDAK'de daha önce Y64C/H tanımlanmamıştır. Bu varyantlar üzerine yapmış olduğumuz in silico analiz sonucunda Y64C/H Poyphen 2 sonuçları sırasıyla benign (0,293), muhtemelen zararlı (0,984); SIFT sonuçları ise zararlı (0,02) ve zararlı (0) olarak tespit edildi. Bu kodona ait varyantların SNP'leri için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde Y64C'nin protein stabilizasyonunu artırıcı etkisinin olduğu diğerinin ise azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. PROJECT HOPE yazılımından elde edilen veriye göre mutasyona uğramış kalıntıları, diğer moleküllerin bağlanması için önemli olan bir alanda bulunur ve proteinin aktivitesi için önemli olan bir alandaki kalıntılarla temas halindedir. Mutasyon bu etkileşimi etkileyebilir ve böylece bağlanma alanından aktivite alanına sinyal transferini bozabileceği tahmin edilmiştir (130).

KRAS A59 kodonu ile ilgili yapılan çalışmalar analiz edildiğinde kemik, kolorektal kanserlerde düşük sıklıkta görülmüştür (134–136). Koga ve ark. (2021) sotorasib veya adagrasib direnci ile ilişkilendirilen mutasyonların edinimini, N-etil-N-nitrozürea ile tedavi edilmiş Ba/F3 hücreleri kullanarak modellemişlerdir. Oluşturulan 142 dirençli klonun %87,3'ünde ikincil KRAS mutasyonları belirlenmiştir. Sotorasib direncine sahip klonlarda, KRAS G13D (%23), en yaygın ikincil mutasyon olmuştur. Bunu sırasıyla %21,2 sıklıkta R68M ve A59S izlemiştir (137). Çalışmamızda AAK tanılı 4B evreli 24. olguda tespit edilen A59S varyantına sahip olgumuz tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 16 ay içinde hasta vefat etti. Tedavi sürecinden önce biyopsi alınan olgumuzda görülen direnç mutasyonu, literatürde bahsedilen ilaca karşı direnç sonrası görülmesi ile benzer durumu ifade etmemektedir. Ayrıca bu varyant için insilico analiz sonuçlarımız Polpyhen 2 sonucumuz benign (0,258) olarak tespit edilirken SIFT sonucumuz ise zararlı (0,04) olarak tespit edildi. Aynı zamanda SNP'leri için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde A59S'in protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. PROJECT HOPE analiz programının sonucuna göre bu varyantın vahşi tip ve mutant rezidü arasındaki özelliklerindeki farklılıklar, nükleotid (GTP) ile etkileşimlerin kaybına kolayca neden olması (130),

bu varyantın Clinvar veri tabanında patojenik olarak bildirilmesi de onkojenik süreçte etkili olduğu sonucunu düşündürmektedir.

KRAS geni V14 kodonuna ait varyantlar daha önceki çalışmalarda farklı insan kanserinde tanımlanmıştır (138). Bhaumik ve ark. (2016) yapmış oldukları çalışmalarında KHDAK tanılı olgularında varyantı %14.2 (2/14) sıklıkta ve ilk kez KHDAK vakalarında tanımladıklarını bildirmişlerdir. KRAS kodon 14 mutasyonunun işlevsel önemi henüz açıklanmadığını belirtmişlerdir (139). Yapılan çalışmaya benzer olarak çalışmamızda 18. olguda tespit edilen V14A varyantı %4,17 (1/24) sıklıkta tespit edildi. Bu varyant üzerine yapmış olduğumuz in silico analiz sonucunda Poyphen 2 sonucu sırasıyla olası zararlı (0,676), SIFT sonuçları ise zararlı (0,05) olarak tespit edildi. Bu kodona ait varyantların SNP'leri için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde V14A'nın protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. Ayrıca PROJECT HOPE yazılımından elde edilen bulgumuzda mutasyon sonucu, vahşi tip ve mutasyonlu kalıntılar arasındaki özellik farkları, ligandlar ve "GTP" gibi nükleotitlerle olan etkileşimleri bozabilir. Ligand bağlanması, proteinlerin düzgün işlevi için hayati önem taşır ve mutasyonun neden olduğu herhangi bir bozulma işlev kaybına veya değiştirilmiş işlevselliğe neden olarak çeşitli hastalık ve bozukluklara katkıda bulunabilir (130). Bu mutasyonların protein işlevi üzerindeki etkisini anlamanın, hedefe yönelik tedavilerin ve müdahalelerin geliştirilmesi için önemli olduğu düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda 3. olgumuzda tespit edilen KRAS genine ait S65G ile E62G varyantları üzerine literatürde bilgiye rastlanılamamıştır. Bu varyantlar üzerine yapmış olduğumuz in silico analiz sonucunda S65G ile E62G Poyphen 2 sonuçları sırasıyla olası zararlı (0,796), muhtemelen zararlı (0,982); SIFT sonuçları ise zararlı (0,03) ve zararlı (0) olarak tespit edildi. Bu kodona ait varyantların SNP'leri için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. PROJECT HOPE yazılımından elde edilen veriye göre mutasyona uğramış kalıntıların, diğer moleküllerle bağlanma için önemli olan bir alan içinde ve proteinin aktivitesi için kritik olan bir alanla temas halinde olması çok önemlidir. Bu mutasyonlar, bu etkileşimi etkileyebilir ve böylece bağlanma alanından aktivite alanına sinyal iletimini bozabilir (130).

TCGA veritabanına göre, HRAS mutasyonları 550 adenokarsinom vakasının 3'ünde (%0.55) ve 480 SHK vakasının 8'inde (%1.67) tespit edilmiştir. HRAS mutasyonları, AAK ve SHK hastalarının yaklaşık %0,2-0,8 sıklıkta nadir görülmektedir (124,140). Çin'de yapılan farklı bir çalışmada 431 olguda hiç tanımlayamadıklarını raporlamışlardır (126). Çalışmamızdaki HRAS mutasyonu tüm olgularda görülme sıklığı %29,16 (7/24) olup; histopatolojik tanısına göre ise AAK tanılı hasta grubunun %25'inde (2/8) görülürken, %31,25'i (5/16) ise ASHK tanılı hastalarda tanımlandı. Literatürden farklı olarak çalışmamızda yüksek sıklıkta tespit edildiği görülmektedir.

Mathiot ve ark. (2022) Fransa'da yapmış olduğu çalışmalarında %0,25 sıklıkta (4/1614) en sık gözlemlenen mutasyon HRAS Q61L, ardından %0,12 sıklıkta G13V diğer tanımlanan varyantlar arasında çalışmamıza benzerlik gösteren A11P varyantını raporlamışlardır. Aktive edici HRAS mutasyonlarının çoğunun kodon 12, 13, 61, 117 ve 146'yı içerdiğini vurgulamışlardır (124). Çalışmamızda tespit edilen 12 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 2'de %41,66 iken, ekzon 3'te %58,33 oranındadır. Benzer olarak çalışmamızda Q61 kodonunda ait Q61H ve A11 kodonundaki A11S varyantları tanımlanmıştır.

Doğal olarak meydana gelen ras onkogenlerde tespit edilen mutasyonlar, kodon 12, 13, 59 ve 61'i etkiler. Bu mutasyonlar ya GTPaz aktivitesini azaltarak ya da guanin nükleotid değişim oranını modüle ederek GTP hidrolizinin inhibisyonu ile sonuçlanır (141,142). Çalışmamızda HRAS A59 kodonuna ait iki farklı varyant tespit edilmiştir. Bu varyantlar 3. sıradaki AAK tanılı olgumuzda A59T ile A59V varyantları tespit edilirken; ASHK tanılı 4. ve 18. olgularımızda A59T varyantı görüldü. Bu varyantlar üzerine yapmış olduğumuz in silico analiz sonucunda A59T ile A59V Poyphen 2 sonuçları sırasıyla olası benign (0,215), olası zararlı (0,907); SIFT sonuçları ise tolere edilebilir (0,06) ve zararlı (0,03) olarak tespit edildi. Bu kodona ait varyantların SNP'leri için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde A59T protein stabilizasyonunu azaltıcıyken; A59V'nin artırıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. Yine 3. sıradaki AAK tanılı olgumuzda Q61H, G60D/S varyantları A59 mutasyonlarıyla beraber görüldü. Ayrıca 18. olgumuzda G10S ile V9del mutasyonları da gözlemlendi. V19del mutasyonu olgularımızdan 8. ile

17. tespit edilmiştir. Clinvar veri tabanında V19del mutasyonu için HRAS ile ilişkili durumlarda etkilenen bireylerde daha önce literatürde rapor edilmediğini, deneysel çalışmalar ve tahmin algoritmaları değerlendirilmediğini raporlamışlardır. Bu varyantın hastalıktaki rolünü belirlemek için yeterli kanıt olmadığından dolayı VUS olarak sınıflandırılmıştır. Sonuç olarak bu varyantın fonksiyonel önemi şu anda bilinmemektedir. Çalışmamızda ilk klinik vaka olarak tanımlanan bu varyant ASHK tanılı olgularımızın %18,75 sıklıkta (3/16) görülmüştür. Sekizinci olgumuzda A11S varyantı da saptandı. Bu varyant daha önce nevus sebaceus lezyonu bir vakada tanımlanmıştır (143). Veri tabanlarında akciğer kanseri ile ilgili bir çalışma vakası bulunmamaktadır. İnsilico analiz sonucumuzda Poyphen 2 olası zararlı (0,505), SIFT sonucumuz ise tolere edilebilir (0,08) olarak tespit edilirken, I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. Yirmi dördüncü olgumuzda ise E63K, Q61Ter ile G10D mutasyonları gözlenmiştir. G10 kodonun tespit edilen iki varyant üzerine literatürde akciğer kanseri ilişkili bir çalışma bulunmamaktadır. Clinvar veri tabanında E63K varyantını patojenik olarak tanımlamışlardır. Kanser ile daha önce ilişkili olarak tanımlanmamış olup, Costello sendromu ile konjenital miyopati gibi genetiksel rahatsızlıklarda patojenik özellikte olduğu vurgulanmıştır (144).

Ohaski ve ark. (2013) Amerika’da 6 klinik merkezinden toplamış oldukları 4562 AK tanılı hastanın 30’unda (%0,65) NRAS mutasyonu belirlediklerini bu hastaların 28’inde başka sürücü mutasyonu olmadığını raporlamışlardır (145). İtalya’da yapılan benzer bir çalışmada %0,8 (2/251) (123), Çin’de yapılan farklı bir çalışmada 431 olguda hiç tanımlayamadıklarını raporlamışlardır (126). Çalışmamızda NRAS mutasyonu görülme sıklığı %29,16 (7/24) ve histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanılı hastaların %25 (1/8)’inde görülürken, ASHK tanılı hastalar için bu oran %31,25 (5/16) olup; literatür verilerine göre yüksek sıklıkta tespit edildi.

Ohaski ve ark. (2013) 30 NRAS gen mutasyondan 9 farklı varyant tespit ettiklerini, bu varyantların ekzon 3’te Q61H/K/L/R ve ekzon 2’de G12A/C/D/R/S olduğunu raporlamışlardır. En sık mutasyon kodon 61’de görülen Q61L (%80) mutasyondur (145). Malapella ve ark. (2021) İtalya’da yapmış oldukları

çalışmalarında tanımladıkları iki NRAS nokta mutasyonu, ekzon 2’de G12A ve ekzon 3’te Q61L olarak bilmişlerdir (123). Çalışkan ve ark. (2018) çalışmalarında NRAS mutasyonlarını %4 kodon 61’de olduğunu belirtmişlerdir (5). Çalışmamızda NRAS genine ait 13 farklı varyant saptanmıştır. Ekzon bölgelerinde tespit edilen 13 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 2’de %53,84 iken, ekzon 3’te %46,15 sıklıkta benzerlik sağlamaktadır.

BRAF’taki mutasyonlar, insan kanserlerinin yaklaşık %7’sinde saptanırken, ARAF ve CRAF’taki mutasyonlar nadir olarak görülmektedir. Wang ve ark. (2015) Çin’de 1356 KHDAK tanılı hastanın sadece birinde ARAF S214C mutasyonu saptadıklarını raporlamışlardır (146). Çalışmamızda ARAF gen mutasyonları literatürden farklı olarak tüm hastaların %12,5 (3/24) yüksek sıklıkta tespit edildi. Bu mutasyonlar ekzon 7’de saptandı. Klinik için önemli olan varyantları değerlendirdiğimizde 4. olgumuzda V218F ile 24. olgumuzda P216S missense mutasyonları gözlemlendi. cBioPortal veri tabanında bu mutasyonlardan P216S daha önce hepatoselüler karsinom ve melanomda tanımlanmışken; V218F için herhangi bir rapor olmadığı tespit edildi. Bu iki varyant KHDAK ilk kez bu çalışmada raporlanmıştır. Bu varyantları insilico analiz programlarıyla değerlendirdiğimizde, her iki varyantın SIFT sonucunda göre zarar verici olup, Polyphen 2 analiz programına göre ise olası zararlı olarak tanımlandı. Ayrıca 2 SNP’nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile incelendiğinde, bu SNP’lerin protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edildi. Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan ACMG kriterlerine göre, hasar verici olarak belirlediğimiz bu iki varyant sınıflandırılması VUS olarak bildirilmiştir.

Doğan ve ark (2014) çalışmalarında KHDAK tanılı 42 hastadan almış oldukları doku örneğinde %2,38’inde BRAF V600E (1/42) mutasyonu tespit etmişlerdir (147). Çalışkan ve ark. (2018) çalışmalarında KHDAK tanılı 80 hastadan almış oldukları doku örneğinde %1,25’inde BRAF V600E (1/80) mutasyonu tespit etmişlerdir (5). Çalışmamızda BRAF gen mutasyonları, çalışmamızda likit biyopsi analizi sonucunda tespit edilememiştir. Ayrıca çalışmaya alınan 24 hastanın 9’unda (%37,5) klinikte moleküler patoloji analizi yapıldı. Moleküler patolojisi istenen hastalardan sadece 2. 3. ve 8. olgularda BRAF için moleküler patoloji analizi

yapılmış olup, bu olgularda BRAF'a ait mutasyon saptanamamıştır. Bu sonuçlar BRAF gen mutasyonlarının KHDAK vakalarında az oranda rastlanıldığını gösterirken, çalışmamızda BRAF genine ait mutasyon tespit edilememesi de yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Akciğer adenokarsinomlarında ErbB2 amplifikasyonu vakaların yaklaşık %10-20 oranında tespit edilirken, ErbB2 mutasyonları ise yaklaşık %2-4 oranında saptanmaktadır (48). Farklı çalışmalarda en sık ekzon 20'de, %0-2,6 oranında tespit edildiği raporlanmıştır (5,148,149). Çalışmamızda ErbB2 gen mutasyonu hastalarımızın %25'inde (6/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde ise, AAK tanılı olgularımızın %25'inde (2/8) ve ASHK tanılı olgularımızın %25'inde (4/16) gözlemlendi. Ayrıca benzer olarak ekzon 20'de yüksek sıklıkta tespit edilmiştir.

HER3, EGFR ve HER2'ye kıyasla araştırmalarda arka planda kalan HER ailesinin bir üyesidir. Bu RTK'lar hücre büyümesinde, sinyalleşmesinde ve hayatta kalmasında rol oynar. HER3 mutasyonları, tümör tipine bağlı olarak tümörlerin ~%10'una varan bir oranda meydana gelir. HER3, akciğer adenokarsinomunda olası bir terapötik hedef olarak gösterilmektedir. Mutant EGFR daha yaygın olmasına ve onaylanmış terapötik tedavilere sahip olmasına rağmen, HER3 mutasyonu onunla dimerize olabilir ve bir tür direnç mekanizması olarak aşağı akış sinyalini yayabilir. Artmış HER3 ekspresyonunu ile MEK aktivitesinde de artış gözlemlendiğini, sonuçta da HER3'ün EGFR terapilerine bir kaçış mekanizması sağlayabileceğini bildirmişlerdir (150). Çalışmamızda 22. olgumuzda EGFR ve HER3 mutasyonu birlikteliği bulunmaktadır. Bu mutasyonlar klinik için önemli olmayan EGFR-T790= ile bir ERBB3- R106Ter nonsense mutasyondur.

Verlingue ve ark. (2018) farklı kanser tiplerine ait doku örneklerinde hastaların %3,7'sinde (31/844) somatik ErbB3 mutasyonun olduğunu bildirmişlerdir. Hasta grubundan ASHK tanılı olguda Q865H varyantı tanımladıklarını, klinik açıdan patojenitesini VUS olarak raporlamışlardır (151). Çalışmamızda ErbB3 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %8,33'ünde (2/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde sadece ASHK tanılı olgularımızın %12,5'inde (2/16) tespit edildi. Yapılan çalışmalara göre tespit edilen ErbB3 mutasyonların görülme sıklığı

çalışmamızda benzer sıklıkta tespit edildi. Histolojik tipi ASHK tanılı hastalarda görülmesi literatür ile uyumludur.

Li ve ark. (2018) Çin etnik kökenli ASHK tanılı olgularda, FGFR gen mutasyon oranını %16,8 (24/143) olarak bildirmiştir. Tespit edilen mutasyonların %7'si (10/143) somatik mutasyonlar, %9,8'i (14/143) germline mutasyonları olduğunu ve FGFR mutasyonlarının varlığının artmış lenf nodu metastazı riski ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. FGFR2'de 2 somatik mutasyon ve 2 germline mutasyonu tespit etmişlerdir (152). Helsten ve ark. (2016) farklı kanser dokularındaki NGS analiz sonucunda kanserlerin %7.1'inde (343/4853) FGFR anormallikleri tespit etmişlerdir. Bunların %66'sı gen amplifikasyonu, %26'si nokta mutasyonları ve %8 yeniden düzenlemeler olarak sıralanmıştır. FGFR1 en yaygın etkilenen gen olup, hastaların %3.5'inde (4,853 hastada) görüldüğünü, ardından %2.0'sinde FGFR3, %1.5'inde FGFR2 ve %0.5'inde FGFR4 mutasyonu gözlemlendiğini belirtmişlerdir. En sık etkilenen kanser türleri sırasıyla ürotelyal (%32), meme (%18), endometrial ve skuamöz akciğer kanseri (~%13) ve over kanseri (~%9) olarak raporlanmıştır. Hasta gruplarından 93 ASHK tanılı hastaların %3'ünde somatik FGFR2/3 mutasyonlarını tespit etmişler (153). Çalışmamızda FGFR2 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %25'inde (6/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanılı olguların %25'inde (2/8) ve ASHK tanılı olgularımızın %25'inde (4/16) literatüre göre değerlendirildiğinde yüksek sıklıkla tespit edildi.

Spiegelberg ve ark. (2014) 254 mesane tümöründe ekzon 7'de gerçekleşen FGFR2 gen mutasyonlarını Sanger sekanslama yöntemi ile analiz etmişler. Tüm doku örneklerinde ekzon 7'de mutasyon bulamamışlardır. Ekzon 7 mutasyonlarının genel olarak mesane tümörü oluşumunda hiçbir rol oynamadığını bildirmişlerdir (154). Li ve ark. (2018) Çin etnik kökenli ASHK tanılı olgularda FGFR gen mutasyonlarını ekzon 7'de W290C, ekzon 9'da K405E, ekzon 11'de A511T, ekzon 18'de S796Y varyantlarıdır. Ekzon 7 ve 8'deki varyantlar muhtemelen zarar verici olduğunu diğer ikisinin de benign etkisinin olduğunu raporlamışlardır (152). Farklı bir çalışmada hücre kültürü ve ksenograft modellerini kullanarak FGFR2'de ASHK hastalarında en sık rastlanan hotspot mutasyonları, hücre dışı alan mutasyonları

W290C ve S320C ile kinaz alanı mutasyonları K660E ve K660N olduğunu belirtmişlerdir (155). Çalışmamızda FGFR2 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %25'inde (6/24) ekzon 7'de 9 farklı varyant saptanmıştır. KHDAK'de ekzon 7 mutasyonlarının tümörün ilerlemesinde rolü olduğu düşünülmektedir.

Helsten ve ark. (2016) araştırmasında FGFR2 genine ait ASHK tanılı olgularında, kalıtsal cücelik sendromlarında gözlenen ekzon 7'de P253R, ve S252W mutasyonlarını tespit ederken (153), çalışmamızda benzer olarak AAK tanılı 3. olguda P253S ile 24. olguda tek görülen FGFR2 mutasyonu olan S252L tespit edildi. Ayrıca diğer klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde 7. ve 8. sıradaki olgularımızda görülen P256S missense mutasyonu FGFR2 proteininin Ig benzeri C2 tipi alan 3 içinde bulunur. P256S missense mutasyonu daha önce Çin'de yapılan bir çalışmada rahim ağzı kanserinde tanımlanmıştır (156). Ancak biyokimyasal olarak karakterize edilmemiştir. Bu nedenle FGFR2 protein fonksiyonu üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu mutasyon ASHK 3A evrede olan 2 olgumuzda görülmüştür. Bu olgulardan 7. sıradaki olgumuzda taranan gen panelinde FGFR2 genine ait P256S, R251Q, R251* ile GNAS genine ait G226V mutasyonları tespit edildi. Sekizinci sıradaki olgumuzda ise FGFR2 genine ait G261R, P256S ve A260= varyantları ile birçok gene ait mutasyonlar birlikte tespit edildi. Yine sekizinci sıradaki olgumuzda tespit edilen FGFR2 genine ait varyantlardan G261R ASHK tanılı 4B evreli 18. ve 22. olgularımızda da tespit edildi. Ayrıca 18. olgumuzda I257T varyantı da görülmüştür. Yirmi ikinci sıradaki olguda görülen tek FGFR2 mutasyonu G261R'dır. Yine klinik açıdan önemli olmayan A260= sinonim varyantı ise AAK tanılı evre 3A olan 3. olgumuzda ve ASHK tanılı evre 3A olan 8. olgumuzda tespit edildi. Ayrıca 7. sıradaki olgumuzda görülen R251* mutasyonu ise yine 3. olgumuzda da tespit edildi. Tüm bu sonuçlar KHDAK bu mutasyonların olgularda kötü prognoza sahip olmasını, hastaları ileri evreye taşınmasında rolünün olduğunu desteklemektedir. Bu mutasyonlar için KHDAK tanılı olgularda daha önceden tanımlanan bir rapor bulunamamıştır. Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. FGFR2 varyantlarının (n=7), Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; muhtemelen zarar verici %42,85'ini, olası zarar verici %42,85'ini ve benign olanlar ise %14,28'ini oluşturmaktadır. SIFT yazılım sonucuna göre ise varyantların %85,71'i protein işlevi

üzerindeki potansiyel etkisinin zararlı olduğunu, %14,28'inin ise tolere edilebilir (iyi huylu) olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 7 SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, bu SNP'lerin tamamında protein stabilizasyonunun azaldığı tespit edilmiştir.

Hem KIT hem de PDGFRA, III. sınıf tirozin kinaz ailesi üyesidir. KIT veya PDGFRA reseptöründe fonksiyon kazandıran mutasyonlar, sürekli, ligandan bağımsız aktivasyona neden olur ve hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozunu ve hayatta kalmasını düzenleyen sinyal yollarını etkiler (157). Liu ve ark. (2017) KHDAK tanılı hastalar arasında PDGFRA gen mutasyon sıklığını Doğu Asyalı olgularda %2,7 Kafkasyalı olgularda %7,0 olduğunu bildirmiştir(158). Sun ve ark. (2021) Çin'de yaptıkları araştırmasında PDGFRA gen mutasyon sıklığını %1,86 olarak bildirmiştir (159). Xu ve ark. (2018) yapmış oldukları çalışmada KHDAK'de PDGFRA gen mutasyon oranı %2,14 (10/467) olarak bildirmişlerdir (160). Çalışmamızda PDGFRA gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %29,17'sinde (7/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanılı olguların %25'inde (2/8) ve ASHK tanılı olgularımızın %31,25'inde (5/16) tespit edildi. Bulgularımız PDGFRA gen mutasyonlarının sıklığının KHDAK tanılı olgularda literatüre göre yüksek oranda saptandı.

Gastrointestinal stromal tümör (GIST), gastrointestinal sistemdeki en yaygın mezenkimal tümördür. GIST'lerin yaklaşık %85-90'ının KIT veya PDGFR'nün aktive edici mutasyonlarını barındırdığı bulunmuştur (161). PDGFRA, GIST'te en sık mutasyona uğrayan ikinci onkogendir. PDGFRA mutasyonları, GIST'lerin %5-10'unda rapor edilmiştir. Çoğunlukla gastrik bölgelerde ve epitelyoid morfoloji sergileyen vakalarda bulunur. Bu mutasyonlar, vakaların %0.7'sinde ekzon 12'yi (juxtamembrane bölgesi) ve %6'sında ekzon 18'i (tirozin kinaz bölgesi) etkilerken, %0.1'inde ekzon 14 mutasyonları nadir olarak gözlemlendiği raporlanmıştır (157,162). Çalışmamızda KHDAK tanılı olgularda görülen PDGFRA geninin ekzon bölgelerinde tespit edilen 13 farklı görülme sıklığı; ekzon 12'de %7,69; ekzon 14'te %69,23; ekzon 18'de %23,07 oranındadır. Ülkemizde KHDAK PDGFRA gen mutasyonları üzerinde çok az çalışma bulunmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızın sonuçları değerli olduğu gibi literatürdeki verilerden farklı olarak GIST'te ekzon

14'te nadir olarak görülen nokta mutasyonlarının KHDAK'de daha sık görülmesiyle daha önem kazanmıştır.

Xu ve ark. (2018) yapmış oldukları çalışmada PDGFRA gen mutasyonu taşıyan KHDAK tanılı olguların ortalama genel sağkalım (OS) süresi 24 ay olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada PDGFRA ile birçok gen birlikteliği gözlenmiştir (160). Protein ekspresyonu yapılan 54 hastanın KIT için güçlü pozitif vakalar (medyan, 12 ay) ile orta veya zayıf pozitif vakalar (medyan, 11 ay) arasında sağkalım açısından anlamlı bir farkın olmadığını ve aynı şekilde, PDGFRA-pozitif vakalar (medyan, 11 ay) ve PDGFRA-negatif vakalar (medyan, 12 ay) arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark olmadığını raporlamışlardır (163). Çalışmamızda literatürden farklı olarak, PDGFRA mutasyonunu taşıyan olgularda kötü prognostik etkisinin olduğunu saptadık.

Xu ve ark. (2018) yapmış oldukları çalışmada KHDAK'de PDGFRA gen mutasyonlarını S716R, L615*, A916T, H104R, V536M, N505K, V421I, V538M, M578K ve V544A %10 (1/10) sıklıkla tespit etmişlerdir (160). Çalışmalarda PDGFRA geninde %56-75 oranında D842V mutasyonu en sık rastlanan mutasyon olduğu raporlanmıştır (157,162). Çalışmamızda literatürden farklı olarak tanımladığımız varyantlardan klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde AAK tanılı olgularda ekzon 14 T665I, ekzon 18'de A840T mutasyonları ile ASHK tanılı olgularda ekzon 14'te N656D, N659D, K666E, V658I, N659D, L661P ve ekzon 18 I843T mutasyonları tespit edildi. ASHK tanılı farklı 2 hasta arasında ortak olarak tanımlanan K666E ile N659D missense mutasyonudur. Bu iki histopatolojik alt tip hasta arasında ortak olarak gözlenen mutasyon tespit edilemedi.

Funkhouser ve ark. (2022) araştırmalarında 35 meme kanseri ve 39 KHDAK tanılı olgularında KIT mutasyon analizi sonucunda meme kanseri olgularının %11,4'ünde (4/35) ve KHDAK tanılı olgularının %18'inde (7/39) mutasyon tespit etmişlerdir (164). Wen ve ark. (2014) Çin'de yapmış oldukları araştırmalarında evre 1B AAK tanılı 156 olgunun %3,20'sinde KIT mutasyonu tanımlarken, PDGFRA genine ait mutasyon belirleyememişlerdir (165). Lu ve arkadaşları (2012), Çin'de yaptıkları bir araştırmada, KHDAK teşhisi konulmuş 36 hasta örneğinde (1-3. evre), c-kit geninin ekzon 9 ve 11'inde meydana gelen mutasyonları analiz etmişlerdir.

Ancak, yapılan analiz sonucunda mutasyon saptayamadıklarını raporlamışlardır (166). Sihto ve ark. (2005) tarafından yapılan bir araştırmada, Japon kökenli 334 farklı kanser tanılı olguda KIT geninin ekzon 9, 11, 13 ve 17 ve PDGFRA geninin ekzon 12 ve 17'ye moleküler genetik analiz yapılmıştır. Bu çalışmada, sadece araştırılan 18 GİST'in 17'sinde (%94,4) bu genlerin herhangi birinde mutasyon olduğu tespit edilmişken, KHDAK tanılı 20 olgu dahil diğer kanser tiplerinde mutasyon bulunamamıştır. GİST'lerdeki 15 KIT mutasyonunun tamamı ekzon 11'de bulunurken, PDGFRA ekzon 17 mutasyonu ise KIT mutasyonu taşımayan iki GİST'te tespit edilmiştir (167). Tereda (2012) tarafından yapılan benzer bir çalışmada KHAK tanılı 20 olguda KIT geninin ekzon 9, 11, 13 ve 17 ve PDGFRA geninin ekzon 12 ve 18 bölgeleri için solid dokuda moleküler genetik analizin sonucunda tüm olgular negatif sonuç verdiğini belirtmiştir (163). Çalışmamızda batı toplumlarına benzer sıklıkta görülen KIT mutasyonu tüm hasta olgularımızın %33,3'ünde (8/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanılı olguların %25'inde (2/8) ve ASHK tanılı olgularımızın %37,5'inde (6/16) tespit edildi. Bulunan varyantlar KHDAK olgularında literatürden farklı olarak ekzon 13'te meydana geldi.

GIST'teki primer aktive edici mutasyonlar genellikle ya KIT juxtamembran domain (ekson 11) ya da ekstraselüler bölgede (ekson 9) ve nadiren sitoplazmik ATP bağlama alanında (ekson 13/14) ya da aktivasyon döngüsünde (A-loop; ekson 17) ortaya çıkar (161). KIT ekzon 11'deki (juxtamembran domain) mutasyonlar en yaygın olanlardır ve tüm mutasyon pozitif vakaların %70-75'inde gözlenir. Nokta mutasyonları çoğunlukla 557, 559, 560 ve 576 kodonlarıyla sınırlıdır. Ekzon 9 (ekstraselüler bölge) içindeki tek bulgu, kodon 502 ve 503 duplikasyonudur ve GIST mutasyonlarının %9-20'sini oluşturur. Bu duplikasyon, ince bağırsak tümörleriyle ilişkilidir ve daha yüksek potansiyel maligniteye sahiptir. Ekzon 13 ve 17'de (tirozin kinaz aktivitesine sahip bölgeler) nokta mutasyonları tek bulgudur ve sıklıkları sırasıyla %0,8-4,1 (ekzon 13) ve <%1 (ekzon 17) arasında değişmektedir (162). Ülkemizde KHDAK KIT gen mutasyonları üzerinde çok az çalışma bulunmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızın sonuçları değerli olduğu gibi literatürdeki verilerden farklı olarak GİST'te ekzon 13'te nadir olarak görülen nokta mutasyonlarının KHDAK'de daha sık görülmesiyle daha önem kazanmıştır.

Seminomlarda, KIT mutasyonları genellikle ekzon 17'de meydana gelir ve en sık mutasyona uğrayan kodon genellikle 816'dır (D816V, D816H, D816Y). Germ hücreli tümörlerin yanı sıra, KIT kodon 816 mutasyonları insan mast hücreli hastalığı (D816V, D816Y, D816F), akut miyeloid lösemi (D816V, D816Y) ve sinonazal doğal öldürücü/T hücreli lenfomada (D816N) tanımlanmıştır (167). Yapılan çalışmadan farklı olarak çalışmamızda tespit edilen 18 farklı varyantın ekzon bölgelerinde görülme sıklığı ekzon 13'te %77,77'iken, ekzon 11 ve 17'de görülen varyantların ise %11,11 oranındadır. Bu çalışmaya benzer olarak ASHK tanılı 8. ve 18. olgularımız da ekzon 17' de D816G tespit edilmiştir. Hem seminomlarda hem de KHDAK'de D816 kodonundaki varyantlar klinik önem taşımaktadır. Bu varyantı in silico analizi ile değerlendirdiğimizde sonuçlarımız Polyphen-2 yazılımına göre muhtemelen zararlı (0,965) olarak tespit edilirken, SIFT sonucumuz ise zararlı (0,02) olarak tespit edilmiştir. Bu varyantın SNP'si için I-Mutant analiz programı ile değerlendirdiğimizde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu sonucuna ulaştık. PROJECT HOPE yazılımından elde edilen bilgiye göre; mutasyon, UniProt veritabanında "Protein kinase" olarak adlandırılan bir alan içinde gerçekleşmiştir ve proteinin aktivitesi için önemli olan bir alanın içindeki bazı amino asitlerle temas halindedir. Bu mutasyon, bu etkileşimi etkileyebilir ve böylece bağlanma alanından aktivite alanına sinyal iletimini bozabilir. Bu durumda proteinin kinaz aktivitesinin düzgün çalışmasını engelleyebilir ve sonuç olarak proteinin işlevini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (130). Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada KIT D816G mutasyonunun, otofosforilasyonu ve hücre proliferasyonunu indükleyen aktive edici bir mutasyon olduğunu ve crizotinib tedavisine direnç kazanmış hastalarda ROS1'e bağlı olmayan yeni bir direnç mekanizması olarak raporlanmıştır (168). Çalışmamızda ise KHDAK'de%1-2'sinde sıklıkta görülen ROS1 mutasyonunu (169) tüm olgularımızda tespit edilememiştir. Ayrıca bu mutasyonu taşıyan ASHK tanılı 3A evreli 8. olgumuzda ROS 1 geni için hem doku hem de likit biyopsi sonucu negatif çıkmıştır. Yine bu olguda D816G varyantıyla beraber S639P, V643A, L641I ve Y646H varyantları da tespit edilmiştir. ASHK tanılı 4A evreli 18. olgumuzda ise D816G varyantıyla beraber S639P, V643A, S645I, M651V mutasyonları gözlenmiştir. Ayrıca AAK evre 3A olan 3. olgumuzda bahsedilen olgularda ortak olarak görülen S639P varyantı tek olarak görülmüştür. S639P ve V643A varyantları

farklı kanserlerle ilişkilendirilmesine rağmen (170–172) KHDAK ile ilgili daha önce yayınlanmış çalışmalar literatürde yoktur. Bu iki farklı evredeki vakalarda aynı KIT genine ait mutasyonların beraber görülmesi bu varyantların KHDAK tanılı hastalarda hastalığın seyrini ve prognozunu etkileyebileceğini ve sürecin metastatik bir boyuta ulaşacağının bir belirtici olduğunun kanıtı durumundadır. Ancak, net bir sonuca ulaşmak için daha fazla araştırma ve klinik verilerin incelenmesi gerekebilir. Bu tür bulgular, hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılabilecek önemli bilgiler sağlayabilir.

Son zamanlarda onaylanan ripretinib, geniş spektrumlu bir KIT/PDGFRA inhibitörüdür ve imatinib dahil olmak üzere 3 veya daha fazla kinaz inhibitörü ile önceden tedavi görmüş ileri evre GIST'li yetişkin hastaların tedavisi için kullanılmaktadır. Avapritinib ise aktif konformasyona yönelik bir tip I kinaz inhibitörü olup, PDGFRA ekzon 18 mutasyonu içeren, PDGFRA D842V mutasyonlarını içeren rezektabl olmayan veya metastatik GIST'li yetişkinlerin tedavisi için onaylanmıştır (157). Çalışmamızda PDGFRA veya KIT gen mutasyonlarını taşıyan olgularımız %41,2'lik (10/24) kısmını oluşturmaktadır. Bu olgularımızdan her iki gen mutantlarını taşıyan %50 (5/10) (3,5,8,22 ve 23. olgular) sadece PDGFRA veya KIT mutantlarının görüldüğü olgularımız sırasıyla %20 (4 ve 14. olgular) ve %20 (17 ve 18. olgular) sıklıkta görülmüştür. AAK tanılı 4B 5. olgumuzda sadece potansiyel klinik önemi olan PDGFRA genine ait A840T ile KIT genine ait S645G missense mutasyonları tespit edildi. Bu mutasyonları taşıyan hastalarımız klasik genel tedavi almışlardır.

F-box ve WD40 alan proteini 7 (FBXW7), çeşitli onkojenik hedef proteinlerin her yerde bulunmasına aracılık eden SKP1-CUL1-F-box protein (SCF) kompleksinin bir bileşenidir (173). FBXW7 birçok kanserde yüksek bir mutasyon oranı gösterir. COSMIC veri tabanının meta analizi, tüm insan tümörlerinde FBXW7'nin genel mutasyon oranının %7,79 (3844 /49348) olduğu bildirilmiştir (174,175). Xiao ve ark. (2018) FBXW7'nin insan akciğer kanseri gelişimindeki rollerini değerlendirmek için TCGA verilerini değerlendirdiklerinde AAK tanılı olguların %30,9 (71/230) ile ASHK tanılı olgularda %63,5 (113/178) delesyon olduğunu; AAK tanılı olguların %8,3 (19/230) ve ASHK tanılı olguların ise %6,2 (11/178) insersiyon olduğunu raporlamışlardır. Ayrıca somatik mutasyon sıklığı ise;

AAK tanılı olgularda %1,7 (4/230) ve ASHK tanılı olgularda ise %6,2 (11/178) sıklıkta bildirilmiştir (176). Çalışmamızda FBXW7 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %16,7'sinde (4/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanılı olguların %12,5'inde (1/8) ve ASHK tanılı olgularımızın %18,75'inde (3/16) tespit edildi. Hasta sayımızın benzer çalışmalardakine kıyasla çok daha az olduğu göz önünde bulundurulursa elde ettiğimiz sonucun literatürle uyum sağladığı söylenebilir.

FBXW7 mutasyonlarının çoğu, WD40 alanı içindeki korunmuş arginin kalıntılarını (Arg 465, Arg 479 ve Arg 505) etkileyen patojenik yanlış anlamalı mutasyonlardır. R465C, insan primer tümörlerinde en sık görülen mutasyon olmakla birlikte R505G'nin farklı sıklıklarda görüldüğü, akciğer kanserlerinde ise %18,7 oranında saptanmaktadır. R505G mutasyonu 335 ASHK tanılı olguda %0,33 sıklıkta raporlanmıştır. Ancak, bu mutasyonların insan kanserlerindeki önemi ve rolü henüz derinlemesine araştırılmamıştır (173,175). Yapılan literatür verilerine benzer olarak çalışmamızda FBXW7 geninin tespit edilen 5 farklı varyantın tamamı ekzon 10'da saptandı. Klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde AAK tanılı bir olguda S478P ile ASHK tanılı 2 olguda sırasıyla V474A ile R505H mutasyonları tespit edildi. Bu varyantları değerlendirdiğimizde; ACMG veri tabanında S478P ve V474A varyantları VUS olarak bildirilmiştir. Literatür ile benzer olarak saptadığımız R505H varyantı ise ACMG veri tabanında muhtemelen patojenik olarak değerlendirilirken; clinvar'da VUS olarak bildirilmiştir. Literatür verileri ile değerlendirildiğinde R505 varyantı farklı kanser tiplerinde sıklıkla görüldüğü; çalışmamızda ASHK tanılı 22. olgumuzda %6,25 (1/16) sıklıkla görülen R505H varyantı daha önceki çalışmalarda farklı olarak Rahim Endometrioid Karsinomu ile Kolon adenokarsinomunda tespit edilmiştir (177).

Jiang ve arkadaşları (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, daha önce tedavi görmemiş farklı evrelerdeki 141 KHDAK hastasının plazma ve doku örneklerinde TP53 gen mutasyonlarını ASHK tanılı olgularda %83,3 ve adenokarsinomda %43,4 sıklıklarıyla tespit etmişlerdir. Tüm doku örneklerinde farklı genler ile kıyaslandığında prevalansı en yüksek sıklıkta (%61,7) TP53 gen mutasyonunun olduğunu vurgulamışlardır (178). Literatüre uyumlu olarak,

çalışmamızda TP53 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %25'inde (6/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanıli olguların %25'inde (2/8) ve ASHK tanıli olgularımızın %25'inde (4/16) tespit edildi.

TP53 gen mutasyonlarının çoğu, P53 proteininin DNA-bağlanma alanını (DBD) kodlayan bölgesindeki yanlış anlamlı mutasyonların varlığı ile oluşmaktadır. Bu bölge içinde, hotspot mutasyonları olarak adlandırılan sekiz aminoasit değişimi (R175H, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273S ve R282W), insan kanserlerinde tanımlanan tüm mutant P53 proteinlerinin yaklaşık %27'sini temsil etmektedir (68). Literatüre uyumlu olarak, TP53 geninde meydana gelen mutasyonlar çalışmamızda diğer genlere göre en fazla varyanta sahip (n:27) ve tüm mutant P53 proteinlerinin yaklaşık %27'sini temsil eden varyantlardan AAK tanıli olgularımızda R282Q, R282W, R249K, G245S varyantları tespit edilirken ve ASHK tanıli olgularımızda ise R273L, R248W, R248Q, R273H varyantları benzer olarak tespit edilmiştir. Bulgularımızda histolojik alt tip arasında 2 hastada ortak görülen G245S ve R273H ASHK tanıli 2 hastada ortak görülen R273H mutasyonları klinik açıdan önemli görülmüştür. Çalışmamızda tespit dilen TP53 geninin 27 farklı varyantının ekzon bölgelerinde görülme sıklığı; ekzon 5'te %11,11; ekzon 7'de %33,33; ekzon 8'de %48,14; ekzon 10'da %7,40 oranındadır.

Aggarwal ve ark. (2018) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, EGFR mutasyonlu evre IV 131 hasta üzerinden TP53 mutasyonunun sağkalım üzerindeki etkisi araştırmışlardır. Elde etmiş oldukları bulgularında %62'sinde (81/131) TP53 mutasyonu ve %42'sinde (55/131) diğer birlikte görülen mutasyonlar tespit edilmiştir. EGFR T790M mutasyonu ise %32'sinde (42/131) raporlanmıştır. EGFR T790M/TP53 çift mutasyona sahip hastalar, tek başına T790M mutasyonlu hastalara kıyasla daha kötü OS'ye sahip olduğunu vurgulamışlardır (46,4-82,9 ay) (179). Yapılan çalışmaya benzer olarak değerlendirildiğinde çalışmamızda EGFR mutasyonu bulunan olgularımız (n:7) ile TP53 mutasyonu taşıyan olgularımızın %57,1 (4/7) sıklıkla birlikte görüldüğü, TP53 mutasyonu taşıyan olgularımızın hepsi diğer gen mutasyonları ile beraber tespit edildi. Ayrıca TP53 mutasyonu taşıyan olgularımızın GSK'ı kötü prognozunu olduğu saptandı. Sonuç olarak TP53

durumunun varlığı, daha agresif özelliklere sahip bir hastalığa ve dolayısıyla potansiyel olarak daha kısa bir sağkalımı tanımlayabilir.

Jin ve ark. (2010) Koreli KHDAK tanılı hastalarda PTEN mutasyonları görülme sıklığı %4,5 (8/176) oranında olduğunu ve yalnızca sürekli sigara içenlerde tespit ettiklerini raporlamışlardır. PTEN mutasyonu histolojik olarak dağılımında skuamöz hücreli karsinomda adenokarsinomadan önemli ölçüde daha sık görüldüğünü (%10.2-%1.7) bildirmişlerdir. Bu mutasyonlar ekzon 5-8 arasında olup; ekzon 5’de %50 (4/8), ekzon 6’da %25’i (2/8), ekzon 7-8 ise %12,5’inde dağılım göstermiştir (180). Çalışmamızda PTEN gen mutasyonunun görülme sıklığı literatüre göre yüksek olup, tüm hasta olgularımızın %16,7’sinde (4/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde tamamı ASHK tanılı olgularımızın %25’inde (4/16) tespit edildi. Ayrıca literatüre benzer olarak bu mutasyonlar ekzon 6 ve 7’de saptandı. Klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde ASHK tanılı tüm olgularımızda ekzon 7’de R234W mutasyonu tespit edilmiştir. Bu varyantı değerlendirdiğimizde Staal ve ark. (2002) gliomalı bir hastada PTEN tümör baskılayıcı geninde heterozigotluk kaybı olmadan yeni bir germ line mutasyonu R234W ilk kez tanımlamışlardır. Epikrizinde hastanın, glioma yanı sıra geçmişte benign meningiomadan da muzdarip olduğu ancak Cowden sendromu veya genellikle PTEN germ hattı mutasyonlarıyla ilişkilendirilen diğer kalıtsal hastalıkların herhangi bir klinik belirtisini göstermediği belirtilmiştir. Yine araştırmacılar vahşi tip moleküle karşı, mutasyonlu PTEN proteini apoptozu indükleyemediğini, artmış hücre proliferasyonuna neden olduğunu ve yüksek düzeyde sürekli PKB/Akt aktivasyonuna yol açtığını vurgulamışlardır. Bu bulgular birlikte, PTEN’deki Arg234Gln missense mutasyonunun onkogenik özelliklere sahip olduğunu ve çeşitli kökenden gelen beyin tümörlerine yatkınlık oluşturduğunu bildirmişlerdir (181). Farklı bir çalışmada ise, pankreatik duktal adenokarsinomun (PDAC) tanılı ama PTEN hamartom tümör sendromlarının (PHTS) karakteristik bulgularını göstermeyen 82 yaşındaki bir kadından alınan germ line ve somatik DNA üzerinde genom çapında tam ekzom dizilimi yapmışlardır. Tümör immünohistokimyası, bir PTEN ekspresyonu kaybına ve TP53’ün aşırı ekspresyonunu ile sonuçlanmıştır. Ekzom dizilimi bir Kras mutasyonu G12V ve germline ekzom dizilimi PTEN’in R234W bir yanlış anlamlı mutasyonunu tespit

etmişlerdir. PTEN R234W mutasyonu PDAC kanser gelişimi ile bildirilen bir ilişkisi olan ancak diğer PHTS fenotipleri ile ilişkisi olmayan nadir bir değişkendir (182). Çalışmamızda bu varyantı temsil eden 8 ile 17. olgularda herhangi bir kalıtsal hastalık tanımlanmamıştır. Bu mutasyonu taşıyan 18. ve 22. olguların epikrizlerine ulaşamamıştır. Ayrıca çalışmamızda R234W missense mutasyonu Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; protein işlevi üzerindeki potansiyel etkisi muhtemelen zarar verici olarak tespit edilirken, SIFT sonucuna göre ise tolere edilebilir olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca bu SNP'nin protein stabilizasyonuna etkisi I-Mutant 2.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Literatürde bahsedilen, R234W varyantının kanserleşme süreci ile ilişkili ilk ASHK raporudur. Bu varyantın literatür ile uyumlu olarak 4 farklı ASHK tanı olgunun tamamında görülmesi klinik olarak patojenitesinin farklı çalışmalar ile tekrardan değerlendirilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak R234W mutasyonu ile ilgili ASHK tanı olgular için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

PIK3CA mutasyonlarının %80'den fazlası üç farklı sıcak noktadan birinde bulunur. Bunlardan ikisi, E542K ve E545K olarak temsil edilen tek amino asit değişimleri, proteinin helikal alanında lokalizedir; üçüncüsü ise kinaz alanında bulunan H1047R değişimiyle temsil edilir. PIK3CA geninin helikal veya kinaz alanındaki bu sıcak nokta mutasyonları, p110a'nın lipid kinaz aktivitesini artırarak ve PI3K'nın kazanç fonksiyonuyla onkogenik dönüşümü indükler. PIK3CA mutasyonları primer meme kanserinin %25-46'sında rapor edilmiştir. PIK3CA'nın, anti-HER2 ajanları ile tedaviden sonra meme kanserli hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmiştir (183). Guo ve ark. (2020) yapmış oldukları araştırmasında meme tümör dokusunda en yüksek %7,8 (7/90) sıklıkta H1047R tespit etmişlerdir (183). KHDAK'de yapılan çalışmalarda PIK3CA mutasyon oranları %1,5 ile %8 arasında değişmektedir (165,184,185). Literatüre benzer olarak çalışmamızda PIK3CA gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %8,33'sinde (2/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde tamamı ASHK tanı olgularımızın %12,5'inde (2/16) tespit edildi. KHDAK'de H1047 kodonuna ait mutasyonlar çoğu çalışmada farklı sıklıklarla tespit edilmiştir (165,186). Çalışmamızda benzer olarak klinik

önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde ASHK tanılı 8. olgumuzda ekzon 21'de H1047R mutasyonu tespit edilmiştir. H1047R varyantı ise ACMG, Clinvar, Clingen, varsome veri tabanlarında patojenik olarak bildirilmiştir. Fare modellerini kullanarak yapılan bir çalışmada KRAS G12D ile PIK3CA H1047R mutasyonunun onkojenik iş birliği araştırılmıştır. PIK3CA H1047R varyantı tek başına tümör oluşumunu destekleyemezken, KRAS G12D tarafından başlatılan tümörenezisi önemli ölçüde artırdığı raporlanmıştır. Ayrıca KRAS G12D ve PIK3CA H1047R arasındaki onkojenik işbirliği, c-MYC, GSK3 β , p27KIP1, survivin ve RB yolu bileşenlerinin PI3K α aracılı düzenlemesine eşlik ederek, insan veya fare akciğer kanseri türetilmiş hücre hatlarında hücre bölünmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (187). Çalışmamızda benzer olarak ASHK tanılı 8. olgumuzda clinvar veri tabanında patojenik olarak tanımlanan KRAS G60D varyantı tespit edilmiştir. Kras G60D ile PIK3CA H1047R aynı etkiyi göstermesi beklenebilir. Bu varyantların birbirleriyle olan etkileşimleri üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

GNAS, G protein bağımlı reseptörlerin (GPCR'ler) aktivasyonuna yanıt olarak çeşitli hücresel sinyal yollarını düzenleyen G protein alt birimi G α s'ı kodlar. Birden fazla çalışma, GPCR ile ilişkili sinyallemenin, hücre büyümesinde ve proliferasyonda anormal artışa ve kanserin invazyonuna, metastazına ve tümör mikroçevrenin korunmasına neden olduğunu göstermektedir. GNAS'ta R201 mutasyonları adenilat siklaz aktivasyonuna, artan siklik-AMP'ye ve çeşitli aşağı akış onkojenik sinyal yollarının aktivasyonuna yol açan daha yüksek Gas protein aktivitesi ile sonuçlanır. GNAS'ın R201 kodonundaki mutasyonların, apendiks, kolon ve gastrik adenokarsinomun yanı sıra pankreasın İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazmaları ve KHAK onkogenezi tetiklediği raporlanmıştır (188). Yapılan çalışmalarda GNAS KHDAK'de görülme sıklığı %0.8- 1,27 arasında görülürken (189,190); çalışmamızda tüm olguların %16,67'sinde yüksek sıklıkta tespit edilmiştir.

Ritterhouse ve ark. (2021) KHDAK tanılı kohortunda GNAS mutasyonlarını 14'ü kodon 201'de ve 5'i kodon 227'de olmak üzere sahip on dokuz akciğer adenokarsinomlu olguda tanımlandıklarını bildirmişlerdir (189). Çalışmamızda ise, AAK tanılı 3. olguda ekzon 8'de R201C ve ACMG ve Clinvar'da farklı hastalıklarla

ilişkili (191) olup patojenik olarak değerlendirilen ekzon 9'da Q227* mutasyonu ile R231C tanımlandı. Yine 227 kodonuna ait mutasyon taşıyan 24. olgumuzda Q227K ile kolorektal kanserle ilişkili (192) D229N mutasyon birlikteliği görüldü. D229 kodonuna ait 17. olgumuzda D229G mutasyonu tespit edilirken aynı zamanda bu olguda R228C, R231C, R231H mutasyon birlikteliği tespit edilmiştir. Dikkate değer olarak çalışmamızda iki histopatolojik alt tip arasında ortak görülen R231C missense mutasyonudur. KHDAK de daha önce belirtilmeyen R231 kodonundaki mutasyonların kalıtsal hastalıklar ile bağlantı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (193). Clinvar veri tabanında patojenik olarak tanımlanan R228C mutasyonunun Psödohipoparatiroidizm tip 1a'ya (PHP-1a) neden olan bir işlev kaybı mutasyonu olduğu bildirilmiştir. R228 kalıntısının Switch III ile Switch II arasındaki etkileşimleri R231 kalıntısıyla birlikte düzenlediğini ve bu bölge, guanin nükleotid bağlanmasını düzenler ve sonucunda G proteininin aktif GTP bağlı formuna veya pasif GDP bağlı formuna dönüşümünü sağlar. Mutant formu ise G proteinlerin GDP'yi daha hızlı bir şekilde serbest bırakmasına ve sonucunda GTP bağlanma hızlarını artırarak G proteinlerinin hızlı bir şekilde aktive olmasını ters mekanizmanın ise yavaşlamasına neden olduğunu belirtmişlerdir. R201C G α s mutantının biyokimyasal ve yapısal verileri, R201C G α s mutantının yalnızca azalmış GTPaz aktivitesi sergilemediğini, aynı zamanda G $\beta\gamma$ alt birimlerinin varlığında bile GDP'ye bağlandığında adenilil siklazı aktive edebildiğini ortaya koymaktadır. Bu durum kanserli olgularda kötü prognozun artacağına göstergesidir. Bu onkogenik mutanti taşıyan olguların G α q yerine G α 'lara bağlanan YM-254890 analogları ile tedavi edebildiğini raporlamışlardır (194). Özetle, mutant G proteinlerinin hücrel sinyal iletimini ve sinyal yollarındaki aktivasyonu etkileyebileceği göz önünde bulundurularak, hedefe yönelik tedavilerin veya sinyal yolu inhibisyonu stratejilerinin değerlendirilmesi önemlidir.

Anaplastic Lymphoma Kinase gen mutasyonları KHDAK hastalarının yaklaşık %4-7'sinde yıllık olarak gözlenir. ALK pozitif (ALK+) KHDAK vakaları olan hastalar, çoğu vakada birkaç yıllık progresyonsuz sağkalıma (PFS) ve genel hayatta kalma (OS) durumu bulunmaktadır (195). ALK yeniden düzenlenmiş KHDAK'li hastalar, vahşi tip hastalara göre kemoterapi ile tedavi edilir ve medyan genel sağkalım (mOS) 15 aydan azdır (196). Çalışmamızda ALK mutasyonu taşıyan

ASHK evre 4B olan 4. olgumuz tedavi süreci takipli durumdaydı. Bu olguda uzak lenf nodülü, kemik ve karşı akciğer de metastazı bulunmaktadır. Tanı konulmasından ortalama 2 ay içinde hasta vefat etmiştir. Sekizinci sıradaki olguda ASHK evre 3A olan Tedavi süreci takipli durumdaydı. Tanı konulmasından ortalama 8 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı. On sekizinci sıradaki ASHK evre 4A tanılı olgumuz kemik metastazı bulunmaktadır. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 13 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı. Yirmi üçüncü sıradaki ASHK evre 3C tanılı olgumuz tedavi sürecinde kemoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 9 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı. Bu hastalarımızdan 4 ve 8. sıradaki olgularımızda ALK geni için solid biyopsi sonucu negatif çıkarken diğer iki olguda ise solid biyopsi analizi yapılmamıştır. Literatürle kıyaslandığında yüksek sıklıkta görülen ALK mutasyonlarının olgularımızın %25'inde (6/24) tespit edilmiştir. Çalışmamızda literatüre benzer olarak, ALK mutasyonunun kötü prognostik etkisinin olduğunu saptadık.

Dhamelincourt ve ark. (2023) KHDAK 80 olguda Crizotinib tedavisi sonrasında yapılan 12 rebiopsinin %14,1'inde (1,7 biyopsi) ilerlemeye bağlı olarak 3 direnç mutasyonu (iki G1202R ve bir D1160G) tespit etiklerini bildirmişlerdir (197). Alshareef ve ark. (2016) çalışmasına göre, β -katenin'in (A1126, F1127, G1128, E1129, E1154, V1155, D1160, R1248, R1279, M1290, A1300, F1301, M1302, N1335 ve Q1336) 15 ALK kalıntısıyla etkileşime geçmesi öngörülmüştür. Bu öngörüye göre, β -katenin varlığı, Crizotinib moleküllerinin hedeflenen ALK kalıntılarına ulaşmasını engelleyebilir veya belirli ALK kalıntılarıyla bağımlı bozabilir (198). Klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde ASHK tanılı olgularımızda ekzon 21'de A1126T, ekzon 22'de D1160G, E1167G, L1165H, T1151M ve c.3457_3462del P1153_E1154del mutasyonları tespit edilmiştir. Bu histopatolojik alt tip arasında 5 hastada ortak görülen G1125= sSNV'dır. Literatür ile uyumlu olarak sık karşılaşılan A1126T ve D1160G mutasyonları çalışmamızda da gözlenmiştir. Tedavi sürecinde dirençle ilişkilendirilen bu varyantlar çalışmamızda tedaviden önce alınan biyopsi örneğinin analizi sonucunda tespit edilmiştir. Bu durumun sebebi genetik olarak aktarılması, çevresel faktörlerin etkileri, tümör hücrenin agresif olması, hastalığın doğal seyri, diğer gen mutasyonlarının etkisi gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca bu varyantlara sahip olgularımızda farklı ALK pozitifliğiyle beraber karşılaşılmıştır. On sekizinci olgumuzda A1126T, D1160G ve G1125G; 23.olgumuzda T1151M, L1165H, G1125G, I1179I mutasyonları tespit edildi. Tüm ALK mutasyonları diğer gen mutasyonlarıyla birlikte gözlendi. Bu tür mutasyonların tespiti, kanserin tedavisine yönelik önemli bilgiler sağlar. Direnç mutasyonları tespit edilirse, hastanın tedavi planı gözden geçirilebilir ve farklı bir tedavi stratejisi uygulanabilir. Özellikle hedefe yönelik tedavilerde, mutasyonların tespiti tedavi seçeneklerini yönlendirmede kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, hastalara daha etkili tedaviler sunmak için likit biyopsi ile mutasyon analizleri düzenli olarak yapılabilir.

İzositrat dehidrojenazlar 1 ve 2 (IDH1/2), izositratı α -ketoglutarata (α -KG) dönüştüren önemli metabolik enzimlerdir. IDH1/2 mutasyonları, çoklu malignitelerin gelişimi ile ilişkilidir. Bu enzimlerin mutasyonları, α -KG yerine izositrattan 2-hidroksioglutarat üreten bir fonksiyon kazanımı ile sonuçlanmakta ve sonuçta hipermetilasyona ve bozulmuş hücre farklılaşmasına yol açmaktadır (199). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, IDH mutasyonlarının KHDAK'de nispeten düşük bir oranda görüldüğünü (%0.4–%1.1), ancak önemli ve umut vadeden bir terapötik bir hedef olduğunu vurgulanmıştır (199,200). Çalışmamızda IDH gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %16,67'sinde (4/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanıli olgularımızın %25'inde (2/8) ile ASHK tanıli olgularımızın %12,5'inde (2/16) literatüre göre yüksek sıklıkta tespit edildi.

KHDAK tanıli olgularda IDH gen mutasyonları ile yapılan çalışmalarda IDH1 geninde en sık karşılaşılan R132C varyantı iken, IDH2 geninde ise R140W mutasyonudur. Tanımlanan gen mutasyonları genel olarak ekson 4'de tanımladıklarını belirtmişlerdir (199,200). Yine bu araştırmalarda R132C mutasyonu osimertinib direnci oluşuktan sonra, bu olguda tespit etmişler ve hasta 2 ay içinde öldüğü raporlanmıştır (200). Çalışmamızda yapılan çalışmalara benzer olarak mutasyonların tamamı ekzon 4'te saptandı. Bu mutasyonlardan R132C varyantı 24. olguda tespit edilirken, IDH1 gen mutasyonunu taşıyan tek hasta durumundadır. AAK evre 4B tanıli bu hastada ayrıca EGFR, dahil birçok gen mutasyon birlikteliği bulunmakla beraber kolon, komşu akciğer ve beyin metastazı bulunmaktadır. Tanı

konulmasından ortalama 16 ay içinde hasta vefat etti. EGFR gen mutasyonu taşıyan bu olgu EGFR mutasyonuna karşı inhibitör ilaç kullanmamıştır.

Klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde AAK tanılı 3. olgumuzda G171D ile I170T mutasyonları tanımlanmıştır. G171D varyantının gliomalı hastalarda (201), melanomda (202) tanımlandığına belirten kanserli ilişkili çalışmalar bulunmaktadır. Akut miyeloid lösemide bir vakada I170T varyantı daha önce tanımlandığına dair çalışma bulunmaktadır (203). Bu varyant ASHK tanılı 17. olgumuzda tanımlanmıştır. Ayrıca 17. olgumuzda I168T ve K166E varyantlarda tespit edilmiştir. 18. olgumuzda ise sadece I168V mutasyonu tespit edilmiştir. Bu varyantlar için de akciğer kanseri ile ilişkili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. IDH1 genine ait R132C missense mutasyonu ise ACMG, Clinvar ve Uniprot, Varsome veri tabanlarında patojenik olarak bildirilmiştir. IDH2 gen mutasyonları için veri tabanlarında bir sınıflandırma yapılmamıştır.

Çalışmamızda MAP2K1 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %12,5'inde (3/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanılı olgularımızın %12,5'inde (1/8) ile ASHK tanılı olgularımızın %12,5'inde (2/16) tespit edildi. Bu mutasyonlar tamamı ekzon 3 ve 6'da saptandı. Klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde ASHK tanılı 18. olguda ekzon 3'te F129L missense mutasyonu %6,25 (1/16) tespit edilirken, diğerleri sinonim varyantlardı. Bu olguda daha önceden bahsedilen çoklu gen mutasyonları arasında B-RAF ait mutasyon bulunmamaktadır. KHDAK akış aşağı sinyal proteinlerini etkileyen mutasyonlar arasında ARAF (%0,2), BRAF (%4,5), RAF1 (%0,4) ve MAP2K1 (%0,7) (204) sıklıklarda nadir olarak görülmesi ile uyumlu olarak görülmektedir. Clinvar veri tabanında MAP2K1-F129L varyantı muhtemelen patojenik olarak bildirilmiştir. Bu varyantla ilgili Wang ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmalarında B-Raf V600E mutasyonunu taşıyan kolon kanseri hücrelerinde, MEK inhibitörlerine karşı direnç gelişiminin potansiyel bir mekanizması olarak MEK1(F129L) aktivasyon mutasyonu ilk kez tanımlamışlardır. Bu mutasyona sahip olan MEK1(F129L) mutantı, vahşi tip MEK1'e kıyasla daha yüksek intrinsik kinaz aktivitesine sahiptir, bu da ERK ve aşağıdaki hedeflerinin güçlü bir şekilde aktive olmasına neden olur. Ayrıca, MEK1(F129L) mutasyonunun c-Raf ile etkileşimini güçlendirdiği, bu da daha

yüksek intrinsik kinaz aktivitesinin temelinde yatan bir mekanizma neden olabileceğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak B-Raf V600E mutasyonu taşıyan kanserlerde MEK inhibitörlerine karşı direncin potansiyel bir nedeni olarak MEK1 (F129L) aktivasyon mutasyonudur (205). Kanser hastalarında MEK1(F129L) mutasyonunun potansiyel etkisi dikkate alınarak, kombine tedavi yaklaşımları düşünülmeli ve genetik analizler ile kişiselleştirilmiş tedavi planları geliştirilmelidir.

SMAD4, TGF- β yolunun hücre içi bir sinyal aracısıdır. Mutasyonu, pankreas kanseri gibi gastrointestinal kanserlerde yaygın olarak gözlenir. SMAD4'ün KHDAK gelişimindeki işlevi ve moleküler mekanizması büyük ölçüde bilinmemektedir. Wang ve ark. (2021) araştırmalarında çalışmaya dahil etmiş oldukları 963 KHDAK vakasından 24'ünde (%2.5), histolojik olarak dağılımında 23 adenokarsinom ve 1 adenoskuamöz karsinom dahil olmak üzere SMAD4 mutasyonları tespit ettiğini bildirmiştir. Ayrıca Pan kanserlerindeki SMAD4 değişikliklerini cBioPortal veri tabanını kullanarak KHDAK için analizini yaptıklarında, esas olarak mutasyon ve kopya numarası delesyonu dahil, %5'lik bir insidans oranı göstermiştir. SMAD4'ün genetik varyasyonlarını daha fazla değerlendirmek için, beş çalışmadaki 819 KHDAK vakasının SMAD4 değişikliklerini incelediklerini KHDAK'de SMAD4'ün değişim sıklığının %4 olduğunu ve mutasyonun, tüm genetik varyasyonların yarısından fazlasını içeren en yaygın tip olduğu sonucuna varmışlardır (206). Çalışmamızda literatür verileri ile benzer sıklıkta görülen SMAD4 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %8,33'ünde (2/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanıli olgularımızın %12,5'inde (1/8) ile ASHK tanıli olgularımızın %6,25'inde (1/16) tespit edildi. Bu mutasyonlar tamamı ekzon 8 ve 11'de belirlendi. Klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde AAK tanıli ekzon 11 C443R ile ASHK tanıli bir olguda ekzon 8 P312T varyantları tespit edildi. Elde edilen varyantlar Pivat analiz programı ile Polyphen-2 ve SIFT skorları değerlendirilmiştir. Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; P312T (0,176) benign, C443R varyantı ise muhtemelen zararlı (1) olarak tespit edilirken; SIFT sonucuna göre sırasıyla tolere edilebilir (0,18), zararlı (0) olarak tespit edildi. SMAD4 varyantları için mevcut kanıtlar bu varyantın hastalıktaki rolünü belirlemek için şu anda yetersizdir. Bu nedenle ACMG veri tabanının VUS olarak sınıflandırılması yapılmıştır. Literatür taramalarında bu genler için raporlanmış bir

vakanın olmaması çalışmamızda SMAD4 mutasyonu olan C443R ile P312T varyantı kanserleşme süreci ile ilişkili ilk KHDAC raporudur.

SF3B1 (Splicing Factor 3b Subunit 1) geninin varyantlarının %50'den fazlası kodon 700'de bildirilmiştir (207). Kanserle ilişkili en çok sıklıkla görülen SF3B1 K700E mutasyonu, genotoksik R-loop'ların oluşumu, durmuş replikasyon çatalları, bozulmuş homolog rekombinasyon ve artmış replikasyon çatalı bozunması gibi mekanizmalarla DNA hasarına yol açar. Bu hasar, PARP inhibitörleri gibi ilaçlarla hedeflenebilir ve kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engelleyebilir (208).

SF3B1 ayrıca uvea melanomunun (UM) önemli bir oranında (~%20) ve diğer solid tümörlerde daha düşük sıklıklarda mutasyona uğramış bulunmuştur (209). Literatür ile benzer sıklıkta görülen SF3B1 gen mutasyonu tüm hasta olgularımızın %8,33'ünde (2/24) histolojik olarak değerlendirildiğinde AAK tanılı olgularımızın %12,5'inde (1/8) ile ASHK tanılı olgularımızın %6,25'inde (1/16) tespit edildi. Bu mutasyonlar tamamı ekzon 15'te belirlendi. Klinik önemi olan mutasyonları değerlendirdiğimizde AAK tanılı olguda R702Q ile ASHK tanılı olguda K700E varyantları tespit edildi. Clinvar veri tabanında SF3B1-K700E varyantları muhtemelen patojenik; ACMG veri tabanında SF3B1-K700E patojenikken SF3B1-R702Q muhtemelen patojenik olarak bildirilmiştir. Tespit edilen varyantların Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; R702Q olası zararlı (0,85), K700E muhtemelen zararlı (0,999) olarak tespit edilirken; SIFT sonucuna göre sırasıyla zararlı (0), zararlı (0) olarak tespit edildi. Bu SNP'lerin I-Mutant 2.0 yazılımı ile değerlendirildiğinde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Literatürde taramalarında bu K700E raporlanmış birçok vakanın olmasına rağmen akciğer kanseri üzerine bir yayın bulunmamaktadır. R702Q varyantı içinse yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda SF3B1 mutasyonu olan R702Q ile K700E varyantı kanserleşme süreci ile ilişkili ilk KHDAC raporudur.

NTRK (Nörotrofik tropomiyozin reseptör kinaz) gen füzyonları KHDAC yaklaşık %0,1 ile %3,3 arasında değişmektedir (210). Güncellenen 2019 NCCN kılavuzlarında, NTRK geni, KHDAC için dokuzuncu sürücü gen olarak kullanılmış ve NTRK geni füzyon pozitif metastatik KHDAC'si olan hastalar için birinci

basamak tedavi olarak larotreklinib önerilmektedir (211). Li ve ark.'nın (2020) Çin'de yapmış oldukları çalışmada %2,3 yanlış anlam mutasyonu (4/173), %1,2 NTRK füzyon gen mutasyonu (2/173) ve %4,6 NTRK geni kopya sayısında delesyon (2/173) dahil sekiz hastada %1,2 (8/173) NTRK mutasyonu tespit etmişlerdir (211). Çalışmamızda benzer sıklıkta tespit edilen NTRK genine ait genine ait klinik açıdan önemli 2 farklı varyant saptanmıştır. Klinik açıdan önemli olan mutasyonları değerlendirdiğimizde ASHK tanılı 18. olgumuzda NTRK1 V664A ile NTRK 3 K621Q missense mutasyonları beraber gözlenmiş ve AAK tanılı 2. olgumuzda NTRK1 genine ait ekzon 15'te V664A varyantı tespit edilmiştir. Bu iki histopatolojik alt tip arasında ortak olarak gözlenen NTRK1- V664A varyantıdır. Tespit edilen varyantların Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; V664A benign (0,328), K621Q olası zararlı (0,826) olarak tespit edilirken; sift sonucuna göre sırasıyla zararlı (0), zararlı (0,01) olarak tespit edildi. Bu SNP'lerin I-Mutant 2.0 yazılımı ile değerlendirildiğinde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu tespit edildi. NTRK varyantları için mevcut kanıtlar bu varyantların hastalıktaki rolünü belirlemek için şu anda yetersizdir. Bu nedenle ACMG veri tabanının VUS olarak sınıflandırılması yapılmıştır. Literatürde taramalarında bu genler için raporlanmış bir vakanın olmaması çalışmamızda NTRK mutasyonu olan V664A ile K621Q varyantları kanserleşme süreci ile ilişkili ilk KHDAK raporudur.

Sundaresan ve ark. (2021) likit biyopsi yöntemiyle yapmış oldukları çalışmalarında KHDAK tanılı olguların %17'sinde (7/41) ESR1 LBD (ligand bağlama alanı) içerisinde Y537, D538 kodonlarında mutasyonu tespit etmişlerken (212), çalışmamızda ise olgularımızın %4,17 (1/24) oranında düşük sıklıkta tespit edildi. On yedinci sıradaki ASHK evre 3A tanılı olgumuzda ESR1 genine ait ekzon 5'te W383C missense mutasyonu tespit edildi. Bu olguda çoklu gen mutasyonuna sahip toplamda 16 varyant tespit edildi. Tedavi sürecinde kemoradyoterapi aldı. Tanı konulmasından ortalama 13 ay sonrası sağ kalım takibi bırakıldı. ACMG veri tabanının muhtemelen patojenik olarak sınıflandırılması yapılmıştır. Tespit edilen varyantın Polyphen-2 analiz programına göre hasar yapıcılığı derecelendirildiğinde; W383C muhtemelen zararlı (1) olarak tespit edilirken; SIFT sonucuna göre sırasıyla zararlı (0) olarak tespit edildi. Bu SNP'nin I-Mutant 2.0 yazılımı ile

değerlendirildiğinde protein stabilizasyonunu azaltıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Literatürde taramalarında ESR1 W383C varyantı için kayıtlı bir veri bulunmaması nedeniyle bu varyantın kanserleşme süreci ile ilişkili ilk KHDAK raporudur.

KHDAK tanılı hastalarda MET amplifikasyonunun rapor edilen yaygınlığı %1-5, arasında değişirken, MET protein aşırı ifadesinin yaygınlığı %25-75, arasında değişmektedir. Non-skumöz KHDAK tanılı hastalarda, MET mutasyonlarının oranı %2-4 arasında değişmektedir (213). Çalışmamızda olgularımızın %4,17 (1/24) oranında tespit edildi. Çalışmamızda klinik için önemi olmayan MET genine ait ekzon 16'da c.3330A>G V1110= sinonim varyantı 3. olguda tespit edilmiştir. MET gen mutasyon sıklığının düşük olması literatür ile benzerlik göstermektedir.

Zhang ve ark. (2017) TCGA Pan-Cancer veritabanında elde etmiş oldukları PPP2R1A genine ait mutasyon görülme sıklığını AAK %1,30 ve ASHK %4,60 olarak tanımlamışlardır. (214). Çalışmamızda klinik için önemi olmayan PPP2R1A genine ait ekzon 5'te c.546G>A R182= sinonim varyantı 18. olguda elde edilmiştir. PPP2R1A gen mutasyon sıklığının düşük olması literatür ile benzerlik göstermektedir.

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde CTNNB1 mutasyonları nadir olarak gözlenir. Sequist ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmalarında CTNNB1 mutasyonlarını sadece 546'nın 11'inde tespit etmişlerdir (215) ve Mäki Nevala ve ark. yapmış oldukları benzer bir çalışmada ise 425 KHDAK hastasının 10'unda (216) ve farklı bir çalışmada ise %2,81 (26/925) sıklıkta görülmüştür (217). Çalışmamızda CTNNB1 genine ait mutasyon bulunamaması nadir olarak gözlenen bu gen için literatürle uyum sağlamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser evreleme modelleri, hastaların kanser türüne, tümör büyüklüğüne, lenf nodu tutulumuna ve metastaz varlığına göre sınıflandırılmasında önemli bir rol oynar. Ancak günümüzde, sadece evreleme bilgilerine dayalı olarak hastaların prognozunun takibi ve tedavi sürecinin belirlenmesi yeterli olmayabilir. Kanser hücrelerindeki genetik değişikliklerin ve özellikle sürücü gen mutasyonlarının belirlenmesi, hastanın prognozunu daha iyi tahmin etmek ve tedaviyi kişiselleştirmek için yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Sürücü genler, kanser gelişiminde önemli bir rol oynayan ve kanser hücrelerinin büyümesi, yayılması ve tedaviye direnci gibi kritik süreçleri kontrol eden genlerdir. Bu genlerdeki mutasyonlar veya değişiklikler, kanser hücrelerinin anormal bir şekilde büyümesine ve yayılmasına neden olabilir. Ayrıca, sürücü genlerin diğer genlerle etkileşimi, kanser hücrelerinin biyolojik davranışını ve tedaviye yanıtını etkileyebilir. Sürücü genlerin tanımlanması ve karakterizasyonu, kanser hastalarının prognozunu daha iyi anlamamıza ve tedavi yaklaşımlarını kişiselleştirmemize yardımcı olur. Örneğin, belirli bir sürücü gen mutasyonuna sahip olan hastalar, diğerlerine göre daha kötü bir prognoza sahip olabilir veya belirli bir tedaviye daha iyi yanıt verebilirler. Bu bilgiler, hastaların takibini optimize etmek, risk gruplarını belirlemek ve tedavi planlarını bireyselleştirmek için kullanılabilir. Ayrıca, sürücü genlerin spesifik hedeflenmesi, kanser tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine de olanak sağlar. Örneğin, sürücü gen mutasyonlarına özgü hedefe yönelik ilaçlar, kanser hücrelerini daha spesifik ve etkili bir şekilde hedefleyerek tedavi sonuçlarını iyileştirebilir. Bu nedenle, kanser evreleme modellerinin sadece tümörün anatomik özelliklerine dayanmaması, aynı zamanda sürücü genlerin incelenmesi ve hastanın genetik profilinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu yaklaşım, hastalığın prognozunu daha doğru tahmin etmek, tedavi sürecini optimize etmek ve genel sağ kalım sürecini iyileştirmek için önemli bir adımdır. Bu yüzden kanser evreleme modelinde yeni bir bakış getirilmesi zorunludur. Kanserde sürücü genlerin olgularda görülme sıklıkları, sürücü genin özellikleri ve temas halinde bulunmuş oldukları diğer genlere olan etkileri düşünülerek yeni bir evreleme modeli oluşturulmalıdır. Bu evreleme modeli,

moleküler evreleme modeli olarak ilk kez bu çalışmada önerilmektedir. Örneğin hastalarda tespit edilen direnç genleri bir üst evreye geçmesine neden olabilir.

Hedefe yönelik moleküler tedavi yaklaşımları arasında ALK, ROS1, MET gibi genlerdeki mutasyonların hedeflenmesi yer alır. Bu mutasyonlara sahip olan akciğer kanseri hastaları, spesifik inhibitör ilaçlarla tedavi edilebilir ve daha iyi tedavi yanıtı elde edebilir. KHDAK histolojik alt tip ayırmaksızın her hastada mutasyon tespiti ve uygun tedavinin belirlenmesi için genetik testler yapılması gerekmektedir. ASHK tanılı hastalar için kliniğimizde hedefe yönelik moleküler tedavi uygulanacak yöntemlerin ilkinde yer almamaktadır. Bu eksik genotiplleme durumu, hastaların potansiyel olarak hedefe yönelik tedavilere erişimini sınırlamaktadır. Bu biyobelirteçler, spesifik hedefleyici ilaçların kullanılmasına olanak tanıyarak tedaviye yanıtı artırabilir ve hastaların yaşam kalitesini iyileştirebilir. Bu nedenle, eksik genotiplleme yapılması ya da moleküler yaklaşımın olmaması hastaların tedavi seçeneklerini sınırlayabilir ve optimal sonuçlara ulaşmalarını engelleyebilir. Ayrıca bu bulgular, sağlık çalışanlarının ve sağlık politika yöneticilerinin KHDAK tanılı hastaların genotiplleme testlerine erişimini artırmak için çabalarını yoğunlaştırması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu şekilde, hastalar daha uygun tedavi seçenekleriyle yönlendirilebilir ve tedavi sonuçları iyileştirilebilir.

Periferik kandan cerrahi rezeksiyon sonrası cfDNA elde edilebilmesi için ameliyat sonrası periferik kanda yarılanma ömrü dikkate alınarak kan numunesi alınmalıdır. Kemoterapi kullanımı sırasında kanda cfDNA bulma olasılığı düşmektedir. Son olarak; ctDNA testi, doku biyopsisinin mümkün olmadığı veya yetersiz numune verdiği durumlarda önemli bir rol oynayabileceğinden, ilerlemiş KHDAK'nin klinik yönetimine dahil edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Cicek Y, Kosar P, Öztürk Ö. Molecular genetics of lung cancer. *Eurasian Journal of Pulmonology*. 2018;20(3):111.
2. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* [Internet]. 2019;94(8):1623–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>
3. Globocan. Türkiye IARC Kanseri verileri [Internet]. International Agency for Research on Cancer: Global Cancer Observatory; 2020, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>. 23 Mayıs 2023. 2020. p. 1–2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf> Erişim Tarihi:06.07.2021
4. Schabath MB, Cote ML. Cancer progress and priorities: Lung cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2019;28(10):1563–79.
5. Çalışkan M, Bozkurt G, Meydan N, Meteoglu İ, Selvi Günel N. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Onkogen Mutasyonlarının Araştırılması. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2018;25(3):322–8.
6. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nature Communications* [Internet]. 2016;7(May):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11815>
7. Yadav DK, Bai X, Yadav RK, Singh A, Li G. Liquid biopsy in pancreatic cancer : the beginning of a new era. *Oncotarget*. 2018;9(42):26900–33.
8. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy* [Internet]. 2019;20(8):1057–67. Available from: <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>

9. Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Robles AI, Molina M ángel, Faus-Dáder MJ, Calleja-Hernández M ángel. Liquid biopsy in early stage lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2016;5(5):517–24.
10. Özsu S, Özlü T. Türkiye’de Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi Epidemiology of Lung Cancer in Turkey. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi* [Internet]. 2013;1(3):7–11. Available from: <http://ghs.asyod.org/konular/2013-3-14.pdf>
11. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2022;72(1):7–33.
12. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–49.
13. Sharma R. Mapping of global, regional and national incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio of lung cancer in 2020 and 2050. *International Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2022;27(4):665–75. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10147-021-02108-2>
14. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine* [Internet]. 2020;41(1):1–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
15. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*. 2019;85(1):1–16.
16. Akopyan G, Bonavida B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (review). *International Journal of Oncology*. 2006;29(4):745–52.
17. Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2018;7(3):220–33.
18. Atabey E. Türkiye asbest haritas ı (Çevresel asbest maruziyeti-akciğer kanseri-mezotelyoma). *Tuberk Toraks*. 2014;63(3):199–219.
19. Erbaycu AE. Akci ğ er kanserinde epidemiyoloji ve risk faktörleri. Ünsal M,

- editör Akciğer Kanseri 1 Baskı Ankara: Türkiye Klinikleri. 2020;(December):1–5.
20. Gorlova OY, Weng S, Zhang Y, Amos CI, Spitz MR. Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International journal of cancer*. 2007;118(September 2006):111–8.
 21. Horn L, Lovly CM, Johnson DH. 107: Neoplasms of the Lung. 2022;1–32.
 22. Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Carter CA. What's New in SCLC? A Review. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2017;19(10):842–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.07.007>
 23. Van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruysscher DKM. Small-cell lung cancer. *The Lancet* [Internet]. 2011;378(9804):1741–55. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60165-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60165-7)
 24. Yener NA, Dusmez Apa D. Akciğer Kanserinde Morfolojik Tanı ve Sınıflama. *Türk Radyoloji Seminerleri*. 2015;2(3):281–9.
 25. Coate LE, John T, Tsao M, Shepherd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncology* [Internet]. 2009;10(10):1001–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70155-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70155-X)
 26. Myers DJ, Wallen JM. Lung adenocarcinoma. StatPearls Publishing. 2021.
 27. Friedlaender A, Banna G, Malapelle U, Pisapia P, Addeo A. Next generation sequencing and genetic alterations in squamous cell lung carcinoma: Where are we today? *Frontiers in Oncology*. 2019;9(MAR):1–6.
 28. Sabbula BR, Anjum F. Squamous Cell Lung Cancer. StatPearls Publishing. 2021. 1–13 p.
 29. Tazelaar HD, Lilenbaum RC. Pathology of lung malignancies [Internet]. UpToDate, Waltham, MA. 2019. Available from: https://www.uptodate.com/contents/pathology-of-lung-malignancies?search=pathology of lung malignancies&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H1177018

30. Cancer Genome Atlas Research Network. ShopNotes 055 - Dust Collection Upgrade.pdf. *Nature*. 2012;489(7417):519–25.
31. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Boreczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet]. 2021;17(3):362–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003>
32. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet]. 2015;10(9):1243–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
33. Pelosi G, Barbareschi M, Cavazza A, Graziano P, Rossi G, Papotti M. Large cell carcinoma of the lung: A tumor in search of an author. A clinically oriented critical reappraisal. *Lung Cancer* [Internet]. 2015;87(3):226–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.01.008>
34. Horn L, Christine ML. Neoplasms of the lung. Jameson J, & Fauci A.S., & Kasper D.L., & Hauser S.L., & Longo D.L., & Loscalzo J(Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e. McGraw Hill. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bo>. 2018;
35. Kıyık M. The 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*. 2020;6(3):39–44.
36. Azam F, Latif MF, Farooq A, Tirmazy SH, Alshahrani S, Bashir S, et al. Performance Status Assessment by Using ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Score for Cancer Patients by Oncology Healthcare Professionals. *Case Reports in Oncology*. 2019;12(3):728–36.
37. Çeltik NY, Okan İ. Palyatif Bakımda Hasta Değerlendirmesi ve Skalalar. *Klinik Tıp Aile Hekimliği Dergisi*. 2016;8(3).
38. Malalasekera A, Sim C, Tan Y, Phan V, Yee P, Vardy J, et al. Eastern Cooperative Oncology Group score : Agreement between non-small-cell lung

- cancer patients and their oncologists and clinical implications. *Cancer Treatment Communications* [Internet]. 2016;5:17–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrc.2015.11.009>
39. Yılmaz Ü. Treatment Approaches in Lung Cancer. *Nükleer Tıp Seminerleri* [Internet]. 2018 Mar 28;4(1):32–8. Available from: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_16854/NTS-4-32-En.pdf
 40. Luo SY, Lam DC. Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Translational Respiratory Medicine*. 2013;1(1):2–9.
 41. Khozin S, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Boyd K, Murgo A, et al. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Erlotinib for the First-Line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Epidermal Growth Factor Receptor Exon 19 Deletions or Exon 21 (L858R) Substitution Mutations. *The Oncologist* [Internet]. 2014 Jul 1;19(7):774–9. Available from: <https://academic.oup.com/oncolo/article/19/7/774/6399331>
 42. Cadranet J, Ruppert AM, Beau-Faller M, Wislez M. Therapeutic strategy for advanced EGFR mutant non-small-cell lung carcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [Internet]. 2013;88(3):477–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.06.009>
 43. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR -Mutated Advanced NSCLC. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2020 Jan 2;382(1):41–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204519307788>
 44. Forde PM, Rudin CM. Crizotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2012;13(8):1195–201.
 45. Xu H, Zhang Q, Liang L, Li J, Liu Z, Li W, et al. Crizotinib vs platinum-based chemotherapy as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer with different ROS1 fusion variants. *Cancer Medicine*. 2020;9(10):3328–36.
 46. Cicek Y, Kosar P, Öztürk Ö. Molecular genetics of lung cancer. *Eurasian Journal of Pulmonology* [Internet]. 2018;20(3):111. Available from:

<http://www.eurasianjpulmonol.com/text.asp?2018/20/3/111/249013>

47. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* [Internet]. 2018;29(January):iv192–237. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>
48. Bozkurtlar E, Kaya H. Molecular Pathology of Lung Cancer. *Nükleer Tip Seminerleri* [Internet]. 2018 Mar 28;4(1):26–31. Available from: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_16855/NTS-4-26-En.pdf
49. Cooper WA, Lam DCL, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. 2013;5(SUPPL.5).
50. Roh MS. Molecular Pathology of Lung Cancer : Current Status and Future Directions. *Tuberc Respir Dis*. 2014;77(2):49–54.
51. Morgillo F, Maria C, Corte D, Fasano M, Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR- targeted drugs : lung cancer. 2016;1–9.
52. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer . *New England Journal of Medicine*. 2018;378(2):113–25.
53. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small- Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. 2010;362:2380–8.
54. Pacini L, Jenks AD, Lima NC, Huang PH. Targeting the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Family in Lung Cancer. *cells*. 2021;10(5):1154.
55. Terp MG, Jacobsen K, Molina MA, Karachaliou N, Beck HC, Bertran-alamillo J. Combined FGFR and Akt pathway inhibition abrogates growth of FGFR1 overexpressing EGFR-TKI-resistant NSCLC cells. *npj Precision Oncology* [Internet]. 2021;5(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41698-021-00208-w>

56. Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 2007;110(7):2259–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-04-060715>
57. Jain RK, Chen H. Spotlight on brigatinib and its potential in the treatment of patients with metastatic ALK-positive non-small cell lung cancer who are resistant or intolerant to crizotinib. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 2017;8:169–77.
58. Muller IB, De Langen AJ, Giovannetti E, Peters GJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in metastatic non-small cell lung cancer: Clinical impact of alectinib. *OncoTargets and Therapy*. 2017;10:4535–41.
59. Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, Leighl NB. Biomarkers that currently effect clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1 and KRAS. *Frontiers in Oncology*. 2014;4 JUL(August):1–26.
60. Vojtek AB, Der CJ. Increasing Complexity of the Ras Signaling Pathway *. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1998;273(32):19925–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.32.19925>
61. Timar J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2020;39(4):1029–38.
62. Kempf E, Rousseau B, Besse B, Paz-ares L. KRAS oncogene in lung cancer: focus on molecularly driven clinical trials. *European respiratory review* [Internet]. 2016;25(139):71–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0071-2015>
63. Drosten M, Barbacid M. Targeting KRAS mutant lung cancer : light at the end of the tunnel. *Molecular Oncology*. 2022;16(5):1057–71.
64. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS Mutations in Non – Small Cell Lung Cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009;6(2):201–5.
65. Dehem A, Mazieres J, Chour A, Guisier F, Ferreira M, Boussageon M, et al. 1341P NRAS mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) patients:

- Characteristics and outcomes. *Annals of Oncology* [Internet]. 2021 Sep;32:S1023–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1942>
66. Luk PP, Yu B, Ng CC, Mercorella B, Selinger C, Lum T, et al. BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research*. 2015;4(7):142–8.
 67. Leary CGO, Andelkovic V, Ladwa R, Pavlakis N, Zhou C, Hirsch F, et al. Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research*. 2019;8(6):1119–24.
 68. Monti P, Menichini P, Speciale A, Cutrona G, Fais F, Taiana E, et al. Heterogeneity of TP53 Mutations and P53 Protein Residual Function in Cancer: Does It Matter? *Frontiers in Oncology*. 2020;10(October):1–8.
 69. Lin S, Li X, Lin M, Yue WX. Meta-analysis of P53 expression and sensitivity to platinum-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Medicine*. 2021;100(5):e24194.
 70. Küpeli S. Kanserde Hedefe Yönelik Tedavi: PI3K/Akt/mTOR İnhibitörleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2022;31(1):15–20.
 71. Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thoracic Cancer*. 2020;11(3):511–8.
 72. Yip PY. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2015;4(2):165–76.
 73. Gu X, Zhou L, Chen L, Pan H, Zhao R, Guang W, et al. Human Schlafen 5 inhibits proliferation and promotes apoptosis in lung adenocarcinoma via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR pathway. *BioMed Research International*. 2021;2021.
 74. Ferrara MG, Martini M, D'Argento E, Forcella C, Vita E, Di Noia V, et al. PTEN Loss as a Predictor of Tumor Heterogeneity and Poor Prognosis in Patients With EGFR-mutant Advanced Non-small-cell Lung Cancer

- Receiving Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clinical Lung Cancer* [Internet]. 2021;22(4):351–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.12.008>
75. Cirmena G, Dameri M, Ravera F, Fregatti P, Ballestrero A, Zoppoli G. Assessment of circulating nucleic acids in cancer: From current status to future perspectives and potential clinical applications. *Cancers*. 2021;13(14):1–24.
 76. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs — an update. *Nature Reviews Clinical Oncology* [Internet]. 2018;15(9):541–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0035-x>
 77. Kabalak PA, Yılmaz Ü. Akciğer Kanserinde Sıvı (Likit) Biyopsinin Yeri. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*. 2018;6(3):18–22.
 78. Mandel P, Metais p. Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3–4):241–243.
 79. Manoğlu B, Altun Z, Yavuzşen T, Aktaş S. Colorectal Cancer and Circulating Tumor DNA: Future Biomarker. *The Journal of Tepecik Education and Research Hospital*. 2019;29(1):11–20.
 80. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research*. 1977;37(March):646–50.
 81. Udomruk S, Orrapin S, Pruksakorn D. Critical Reviews in Oncology / Hematology Size distribution of cell-free DNA in oncology. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* [Internet]. 2021;166(July):103455. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103455>
 82. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA. Soluble Normal and Mutated DNA Sequences Genes in Human Blood ” from Copyright © 1994 American Association for Cancer Research Page 2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(1):67–71.
 83. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point

- mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British journal of haematology*. 1994;86(4):774–9.
84. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(45):16368–73.
 85. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *nature medicine*. 2008;14(9):985–90.
 86. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2013 Mar 28;368(13):1199–209. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1213261>
 87. Thierry AR, Mouliere F, Messaoudi S El, Mollevi C, Lopez-crapez E, Rolet F, et al. Technical Reports Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature Medicine* [Internet]. 2014;20(4):430–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3511>
 88. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. Biomolecular Detection and Quantification The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular Detection and Quantification* [Internet]. 2019;17(March):100087. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100087>
 89. Khier S, Gahan PB. Hepatic Clearance of Cell-Free DNA: Possible Impact on Early Metastasis Diagnosis. *Molecular Diagnosis and Therapy* [Internet]. 2021;25(6):677–82. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00554-2>
 90. Yang X, Cai G, Han B, Guo Z, Wu Y, Lyu X. Association between the nucleosome footprint of plasma DNA and neoadjuvant chemotherapy response for breast cancer. *npj Breast Cancer* [Internet]. 2021;7(35):1–12.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41523-021-00237-5>

91. Kocana CC, Toprak SF, Yasa B, Hekimoglu H, Tokdemir SS. Cell Free DNA and Genometastasis. *Experimed* [Internet]. 2019 Aug 29;9(2):69–74. Available from: <http://iupress.istanbul.edu.tr/journal/experimed/article/hucre-disi-dna-ve-genometastaz>
92. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genetics*. 2016;12(7):1–24.
93. Lu J, Han B. Liquid biopsy promotes non-small cell lung cancer precision therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2018;17:1–7.
94. Bingham N, Spencer A. The role of cell free DNA and liquid biopsies in haematological conditions. *Cancer Drug Resist*. 2020;3:521–31.
95. Vagner T, Spinelli C, Minciocchi VR, Balaj L, Zandian M, Conley A, et al. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *Journal of Extracellular Vesicles* [Internet]. 2018;7(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1505403>
96. Baloğlu H. Akciğer kanserinde likit biyopsinin yeri. *Toraks Cerrahisi Bülteni*. 2017;10:27–30.
97. Wang W, Song Z, Zhang Y. A Comparison of ddPCR and ARMS for detecting EGFR T790M status in ctDNA from advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Cancer Medicine*. 2017;6(1):154–62.
98. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2016 Dec 1;22(23):5772–82. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-16-1231>
99. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in

Cancer A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology , American Society of Clinical Oncology , and College of American Pathologists. The Journal of Molecular Diagnostics [Internet]. 2017;19(1):4–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>

100. Özkan Oktay E, Kaman T, Karasakal ÖF, Ulucan K, Konuk M, Tarhan N. Alzheimer Hastalığı ile İlişkilendirilen APOE Genindeki Zararlı SNP ' lerin In Silico Yöntemler ile Belirlenmesi Determination of Deleterious SNPs in APOE Gene Related to Alzheimer ' s Disease by In Silico Methods. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2019;23(2):472–80.
101. Tomruk Erdem A, Tor MM. Kliniğimizde İzlenen Akciğer Kanseri Hastalarında Klinik Özellikler ve Sağ Kalımı Etkileyen Faktörlerin Değerlendirilmesi : Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hastanesi Örneği Evaluation of Lung Cancer Patients and Analysis of Factors Affecting Survival. Batı Karadeniz Tıp Dergisi. 2022;6(1):89–96.
102. Yang B, Li J, Li F, Zhou H, Shi W, Shi H, et al. Comprehensive analysis of age-related somatic mutation profiles in Chinese young lung adenocarcinoma patients. Cancer Medicine [Internet]. 2019 Apr;8(4):1350–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.1839>
103. Özmen S, Demirağ F, Şipal S. Akciğer Adenokarsinomlarında Patern Analizi ve Derecelendirme. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi. 2022;1(3):105–16.
104. Fois SS, Paliogiannis P, Zinellu A, Fois AG, Cossu A, Palmieri G. Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(2):612.
105. Karadurmuş N, Kaya A, Tuncay G, Yılmaz Ü, Tülek N. Akciğer kanserinde immünoterapi ve tedavide multidisipliner yaklaşım. Tuberk Toraks. 2020;68(1):66–75.
106. Visser E, Genet SAAM, Kock RPPA De, Borne BEEM Van Den, Soud MY, Belderbos HNA, et al. Lung Cancer Liquid biopsy-based decision support

- algorithms for diagnosis and subtyping of lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2023;178(November 2022):28–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2023.01.014>
107. Acar P, Ünsal M, Altıntaş N. Evaluation of Lung Cancer Patients with Distant Organ Metastasis *. *Kafkas Journal of Medical Sciences*. 2016;6(2):115–20.
 108. Tamura T, Kurishima K, Nakazawa K, Kagohashi K, Ishikawa H, Satoh H, et al. Specific organ metastases and survival in metastatic non - small - cell lung cancer. *Molecular and Clinical Oncology*. 2015;3(1):217–21.
 109. Conte A Del, Carlo E De, Bertoli E, Stanzione B, Revelant A, Bertola M, et al. Bone Metastasis and Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Microenvironment and Possible Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(12):6832.
 110. Newman AM, Bratman S V., To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*. 2014;20(5):548–54.
 111. Yung TKF, Chan KCA, Mok TSK, Tong J, To K, Lo YMD. Single-Molecule Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Plasma by Microfluidics Digital PCR in Non ^ Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):17–9.
 112. Heuckmann JM, Thomas RK. A new generation of cancer genome diagnostics for routine clinical use : overcoming the roadblocks to personalized cancer medicine. *Annals of Oncology* [Internet]. 2015;26(9):1830–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv184>
 113. Öz B. Patoloji : Morfolojiden Moleküler Analize Geçişde Doku Ekonomisi. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*. 2018;6(3):12–7.
 114. Gutierrez ME, Choi K, Lanman RB, Licitra EJ, Skrzypczak SM, Benito RP, et al. Genomic Pro fi ling of Advanced Non e Small Cell Lung Cancer in Community Settings : Gaps and Opportunities. *Clinical Lung Cancer* [Internet]. 2017;18(6):651–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.04.004>

115. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, Daniel DB, Divers SG, Reckamp KL, et al. Clinical utility of comprehensive cell-free DNA analysis to identify genomic biomarkers in patients with newly diagnosed metastatic non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(15):4691–700.
116. Lin LH, Allison DHR, Feng Y, Jour G, Park K, Zhou F, et al. Comparison of solid tissue sequencing and liquid biopsy accuracy in identification of clinically relevant gene mutations and rearrangements in lung adenocarcinomas. *Modern Pathology* [Internet]. 2021 Dec;34(12):2168–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0893395222003775>
117. Huang HM, Wei Y, Wang JJ, Ran FY, Wen Y, Chen QH, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status and the Impact on Clinical Outcomes in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Balkan Journal of Medical Genetics*. 2022;25(2):29–36.
118. Sedef AM, Çalikuşu Z, Bakkal Temi Y, Gökçay S, Mertsoylu H, Besen AA, et al. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring driver mutation (EGFR mutation or ALK translocations) with clinical characteristics and management in a real-life setting: a retrospective observational multicenter case series study. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2017;10(3):361–7.
119. Unal OU, Oztop I, Calibasi G, Baskin Y, Koca D, Demir N, et al. Relationship between epidermal growth factor receptor gene mutations and clinicopathological features in patients with non-small cell lung cancer in Western Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(6):3705–9.
120. Chatziandreou I, Tsioli P, Sakellariou S, Mourkioti I, Giannopoulou I, Levidou G, et al. Comprehensive molecular analysis of NSCLC; Clinicopathological associations. *PLoS ONE*. 2015;10(7):1–18.
121. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The frequency of ras mutations in cancer. *Cancer Research*. 2020;80(14):2669–974.
122. Judd J, Karim NA, Khan H, Naqash AR, Baca Y, Xiu J, et al. Characterization

- of KRAS mutation subtypes in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2021;20(12):2577–84.
123. Malapelle U, Passiglia F, Cremolini C, Reale ML, Pepe F, Pisapia P, et al. RAS as a positive predictive biomarker: focus on lung and colorectal cancer patients. *European Journal of Cancer*. 2021;146(February):74–83.
 124. Mathiot L, Herbreteau G, Robin S, Fenat C, Bennouna J, Blanquart C, et al. HRAS Q61L Mutation as a Possible Target for Non-Small Cell Lung Cancer: Case Series and Review of Literature. *Current Oncology*. 2022;29(5):3748–58.
 125. Nacchio M, Sgariglia R, Gristina V, Pisapia P, Pepe F, Luca C De, et al. KRAS mutations testing in non-small cell lung cancer: the role of Liquid biopsy in the basal setting. *Journal of Thoracic Disease*. 2020;12(7):3836–43.
 126. Liu Y, Li H, Zhu J, Zhang Y, Liu X, Li R, et al. The Prevalence and Concurrent Pathogenic Mutations of KRASG12C in Northeast Chinese Non-small-cell Lung Cancer Patients. *Cancer Management and Research* [Internet]. 2021 Mar;Volume 13:2447–54. Available from: <https://www.dovepress.com/the-prevalence-and-concurrent-pathogenic-mutations-of-krasg12c-in-nort-peer-reviewed-article-CMAR>
 127. Calvez-Kelm F Le, Foll M, Wozniak MB, Delhomme TM, Durand G, Chopard P, et al. KRAS mutations in blood circulating cell-free DNA: A pancreatic cancer case-control study. *Oncotarget*. 2016;7(48):78827–40.
 128. Weeraratne SD, Tse JY, Pantazi A, Jiang J, Lvova M, Ring JE, et al. Identification of very rare clinically actionable KRAS variants in colorectal cancer patients using a comprehensive large gene panel. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2018 May 20;36(15_suppl):e15632–e15632. Available from: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e15632
 129. Dunnett-Kane V, Burkitt-Wright E, Blackhall FH, Malliri A, Evans DG, Lindsay CR. Germline and sporadic cancers driven by the RAS pathway: parallels and contrasts. *Annals of Oncology*. 2020;31(7):873–83.
 130. Venselaar H, te Beek TAH, Kuipers RKP, Hekkelman ML, Vriend G. Protein

- structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2010 Dec 8;11(1):548. Available from: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-548>
131. Tang R, Shuldiner EG, Kelly M, Murray CW, Hebert JD, Andrejka L, et al. Multiplexed screens identify RAS paralogues HRAS and NRAS as suppressors of KRAS-driven lung cancer growth. *Nature Cell Biology*. 2023;25(1):159–69.
 132. Angeles AKJ, Yu RTD, LA PAZ EMC De, Garcia RL. Phenotypic characterization of the novel, non-hotspot oncogenic KRAS mutants E31D and E63K. *Oncology Letters*. 2019;18(1):420–32.
 133. Bueno A, Morilla I, Diez D, Moya-Garcia AA, Lozano J, Ranea JAG. Exploring the interactions of the RAS family in the human protein network and their potential implications in RAS-directed therapies. *Oncotarget*. 2016;7(46):75810–26.
 134. Vartanian S, Bentley C, Brauer MJ, Li L, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. Identification of mutant K-Ras-dependent phenotypes using a panel of isogenic cell lines. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(4):2403–13.
 135. Bozzao C, Varvara D, Piglionica M, Bagnulo R, Forte G, Patruno M, et al. Survey of KRAS, BRAF and PIK3CA mutational status in 209 consecutive Italian colorectal cancer patients. *International Journal of Biological Markers*. 2012;27(4):366–74.
 136. Alvarez K, Orellana P, Villarroel C, Contreras L, Kawachi H, Kobayashi M, et al. EGFR pathway subgroups in Chilean colorectal cancer patients, detected by mutational and expression profiles, associated to different clinicopathological features. *Tumor Biology*. 2017;39(9).
 137. Koga T, Suda K, Fujino T, Ohara S, Hamada A, Nishino M, et al. KRAS Secondary Mutations That Confer Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitors, Sotorasib and Adagrasib, and Overcoming Strategies: Insights From In Vitro Experiments. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet].

2021;16(8):1321–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.04.015>

138. Ney JT, Froehner S, Roesler A, Buettner R, Merkelbach-Bruse S. High-resolution melting analysis as a sensitive prescreening diagnostic tool to detect KRAS, BRAF, PIK3CA, and AKT1 mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2012;136(9):983–92.
139. Bhaumik S, Ahmad F, Das BR. Somatic mutation analysis of KRAS, BRAF, HER2 and PTEN in EGFR mutation-negative non-small cell lung carcinoma: determination of frequency, distribution pattern and identification of novel deletion in HER2 gene from Indian patients. *Medical Oncology*. 2016;33(10):1–11.
140. Pazik M, Michalska K, Marta Ž, Zawadzka I, Mariusz Ł. Clinical significance of HRAS and KRAS genes expression in patients with non – small-cell lung cancer - preliminary findings. *BMC Kanseri*. 2021;21(130):1–13.
141. Castellano E, Santos E. Functional specificity of Ras isoforms: So similar but so different. *Genes and Cancer*. 2011;2(3):216–31.
142. Muñoz-Maldonado C, Zimmer Y, Medová M. A comparative analysis of individual ras mutations in cancer biology. *Frontiers in Oncology*. 2019;9(OCT):1–22.
143. Groesser L, Herschberger E, Ruetten A, Ruivenkamp C, Lopriore E, Zutt M, et al. Postzygotic HRAS and KRAS mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nature Genetics*. 2012;44(7):783–7.
144. Gripp KW, Morse LA, Axelrad M, Chatfield KC, Dobyns W, Doyle D, et al. Costello syndrome: Clinical phenotype, genotype, and management guidelines. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2021;179(9):1725–44.
145. Ohashi K, Sequist L V, Arcila ME, Lovly CM, Chen X, Rudin CM, et al. Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(9):2584–91.

146. Wang R, Zhang Y, Pan Y, Li Y, Hu H, Cai D. Comprehensive investigation of oncogenic driver mutations in Chinese non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2015;6(33).
147. Dogan M, Demirkazik A, Tukun A, Sak SD, Ceyhan K, Yalcin B, et al. Türkiye’de İleri evre küçük hücreli di{dotless}şi{dotless} akciğer kanserinde si{dotless}k görülen EGFR, BRAF, KRAS mutasyonları{dotless}ni{dotless}n tedaviye yani{dotless}t ve prognozla İlişkisi. *UHOD - Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*. 2014;24(1):1–10.
148. Wen W, Chen WS, Xiao N, Bender R, Ghazalpour A, Tan Z, et al. Mutations in the kinase domain of the HER2/ERBB2 gene identified in a wide variety of human cancers. *Journal of Molecular Diagnostics* [Internet]. 2015;17(5):487–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.003>
149. 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* [Internet]. 2011;74(1):139–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.01.014>
150. Kilroy MK, Park S, Feroz W, Patel H, Mishra R, Alanazi S, et al. HER3 Alterations in Cancer and Potential Clinical Implications. *Cancers* [Internet]. 2022 Dec 14;14(24):6174. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/24/6174>
151. Verlingue L, Hollebecque A, Lacroix L, Postel-Vinay S, Varga A, El Dakdouki Y, et al. Human epidermal receptor family inhibitors in patients with ERBB3 mutated cancers: Entering the back door. *European Journal of Cancer* [Internet]. 2018 Mar;92:1–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804917315095>
152. Li JJ, Yan S, Pan Y, Liu Z, Liu Y, Deng Q, et al. FGFR genes mutation is an independent prognostic factor and associated with lymph node metastasis in squamous non-small cell lung cancer. *Cancer Biology and Therapy* [Internet]. 2018;19(12):1108–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1480294>

153. Helsten T, Elkin S, Arthur E, Tomson BN, Carter J, Kurzrock R. The FGFR landscape in cancer: Analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(1):259–67.
154. Spiegelberg C, Giedl J, Gaisa NT, Rogler A, Riener M. Frequency of activating mutations in FGFR2 exon 7 in bladder tumors from patients with early-onset and regular-onset disease. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(4):1708–13.
155. Liao RG, Jung J, Tchaicha J, Wilkerson MD, Sivachenko A, Beauchamp EM, et al. Inhibitor-Sensitive FGFR2 and FGFR3 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* [Internet]. 2013 Aug 15;73(16):5195–205. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/73/16/5195/657498/Inhibitor-Sensitive-FGFR2-and-FGFR3-Mutations-in>
156. Xiang L, Li J, Jiang W, Shen X, Yang W, Wu X. Comprehensive analysis of targetable oncogenic mutations in chinese cervical cancers. *Oncotarget*. 2015;6(7):4968–75.
157. Bauer S, George S, von Mehren M, Heinrich MC. Early and Next-Generation KIT/PDGFR Kinase Inhibitors and the Future of Treatment for Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor. *Frontiers in Oncology*. 2021;11(July):1–11.
158. Liu L, Liu J, Shao D, Deng Q, Tang H, Liu Z, et al. Comprehensive genomic profiling of lung cancer using a validated panel to explore therapeutic targets in East Asian patients. *Cancer Science*. 2017;108(12):2487–94.
159. Sun S, Du W, Sun Q, Zhao X, Qin B, Shi D, et al. Driver gene alterations profiling of Chinese non-small cell lung cancer and the effects of co-occurring alterations on immunotherapy. *Cancer Medicine*. 2021;10(20):7360–72.
160. Xu C, Wang W, Zhang Q, Zhuang W, Zhu Y, Chen Y, et al. P2.03-11 PDGFRA Defines a Unique Molecular Subtypes of Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 2018;13(10):S720.
161. Jiang L, Zhang Z, Wang Z, Liu Y. Discovery of novel potential KIT inhibitors for the treatment of gastrointestinal stromal tumor. *Open Life Sciences* [Internet]. 2021 Apr 3;16(1):303–10. Available from: <https://www.degruyter>.

com/document/doi/10.1515/biol-2021-0036/html

162. Martin-Broto J, Martinez-Marín V, Serrano C, Hindi N, López-Guerrero JA, Ramos-Asensio R, et al. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): SEAP–SEOM consensus on pathologic and molecular diagnosis. *Clinical and Translational Oncology*. 2017;19(5):536–45.
163. Terada T. An immunohistochemical and molecular genetic analysis of KIT and PDGFRA in small cell lung carcinoma in Japanese. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2012;5(4):331–8.
164. Funkhouser AT, Strigenz AM, Blair BB, Miller AP, Shealy JC, Ewing JA, et al. KIT Mutations Correlate with Higher Galectin Levels and Brain Metastasis in Breast and Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* [Internet]. 2022 Jun 3;14(11):2781. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/11/2781>
165. Wen YS, Cai L, Zhang XW, Zhu JF, Zhang ZC, Shao JY, et al. Concurrent oncogene mutation profile in chinese patients with stage Ib lung adenocarcinoma. *Medicine (United States)*. 2014;93(29):e296.
166. Lu HY, Zhang G, Cheng QY, Chen B, Cai JF, Wang XJ, et al. Expression and mutation of the c-kit gene and correlation with prognosis of small cell lung cancer. *Oncology Letters*. 2012;4(1):89–93.
167. Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O, Tanner M, Andersson LC, Franssila K, et al. KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(1):49–57.
168. Dziadziuszko R, Wrona A, Jassem J, Camidge DR, Varella-garcia M, Aisner DL, et al. HHS Public Access. *Journal of Thoracic Oncology*. 2017;11(8):1273–81.
169. Muminovic M, Carracedo Uribe CR, Alvarez-Pinzon A, Shan K, Racz LE. Importance of ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Cancer Drug Resistance*. 2023;6(2):332–44.
170. Hussain SR, Babu SG, Raza ST, Singh P, Ahmed F, Naqvi H, et al. Screening

- of the c-kit gene missense mutation in invasive ductal carcinoma of breast among north Indian population. *Molecular Biology Reports*. 2012;39(9):9139–44.
171. Jin SA, Chun SM, Choi YD, Kweon SS, Jung ST, Shim HJ, et al. BRAF mutations and KIT aberrations and their clinicopathological correlation in 202 Korean melanomas. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(2):579–82.
 172. Vila L, Liu H, Al-Quran SZ, Coco DP, Dong H-J, Liu C. Identification of c-kit gene mutations in primary adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Modern Pathology* [Internet]. 2009 Oct;22(10):1296–302. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0893395222024516>
 173. Ikenoue T, Terakado Y, Zhu C, Liu X, Ohsugi T, Matsubara D, et al. Establishment and analysis of a novel mouse line carrying a conditional knockin allele of a cancer-specific FBXW7 mutation. *Scientific Reports* [Internet]. 2018 Jan 31;8(1):2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19769-1>
 174. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, et al. COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D777–83.
 175. Fan J, Bellon M, Ju M, Zhao L, Wei M, Fu L, et al. Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers. *Molecular Cancer* [Internet]. 2022;21(1):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01548-2>
 176. Xiao Y, Yin C, Wang Y, Lv H, Wang W, Huang Y, et al. FBXW7 deletion contributes to lung tumor development and confers resistance to gefitinib therapy. *Molecular Oncology*. 2018;12(6):883–95.
 177. Vasuki KA, Christy HJ. Comprehensive Study of Human FBXW7 Deleterious nsSNP's Functional Inference and Susceptibility to Gynaecological Cancer. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [Internet]. 2022;194(1):407–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03759-7>

178. Jiang J, Adams HP, Yao L, Yaung S, Lal P, Balasubramanyam A, et al. Concordance of Genomic Alterations by Next-Generation Sequencing in Tumor Tissue versus Cell-Free DNA in Stage I–IV Non–Small Cell Lung Cancer. *Journal of Molecular Diagnostics* [Internet]. 2020;22(2):228–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.10.013>
179. Aggarwal C, Davis CW, Mick R, Thompson JC, Ahmed S, Jeffries S, et al. Influence of TP53 Mutation on Survival in Patients With Advanced EGFR - Mutant Non–Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precision Oncology* [Internet]. 2018 Nov;(2):1–29. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/PO.18.00107>
180. Jin G, Kim MJ, Jeon HS, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* [Internet]. 2010;69(3):279–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.11.012>
181. Staal FJT, Van der Luit RB, Baert MRM, Drunen J Van, Bakel H Van, Peters E, et al. A novel germline mutation of PTEN associated with brain tumours of multiple lineages. *British Journal of Cancer*. 2002;86(10):1586–91.
182. Uemura S, Matsubayashi H, Kiyozumi Y, Uesaka K, Yamamoto Y, Sasaki K, et al. Pancreatic adenocarcinoma with a germline PTEN p.Arg234Gln mutation. *Familial Cancer*. 2018;17(2):255–9.
183. Guo S, Loibl S, Minckwitz G Von, Darb-Esfahani S, Lederer B, Denkert C. PIK3CA H1047R Mutation Associated with a Lower Pathological Complete Response Rate in Triple-Negative Breast Cancer Patients Treated with Anthracycline-Taxane-Based Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancer Research and Treatment*. 2020;52(3):689–96.
184. Wu SG, Chang YL, Yu CJ, Yang PC, Shih JY. The role of PIK3CA mutations among lung adenocarcinoma patients with primary and acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibition. *Scientific Reports*. 2016;6(July):1–9.
185. Scheffler M, Bos M, Gardizi M, König K, Michels S, Fassunke J, et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic

- heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget*. 2015;6(2):1315–26.
186. Chaft JE, Arcila ME, Paik PK, Lau C, Riely GJ, Pietanza C, et al. Coexistence of PIK3CA and other oncogene mutations in lung adenocarcinoma rationale for comprehensive mutation profiling. *Mol Cancer Ther*. 2013;11(2):485–91.
 187. Green S, Trejo CL, McMahon M. PIK3CAH1047R accelerates and enhances KRASG12D-driven lung tumorigenesis. *Cancer Research*. 2015;75(24):5378–91.
 188. More A, Ito I, Haridas V, Chowdhury S, Gu Y, Dickson P, et al. Oncogene addiction to GNAS in GNAS R201 mutant tumors. *Oncogene*. 2022;41(35):4159–68.
 189. Ritterhouse LL, Vivero M, Mino-Kenudson M, Sholl LM, Iafrate AJ, Nardi V, et al. GNAS mutations in primary mucinous and non-mucinous lung adenocarcinomas. *Modern Pathology* [Internet]. 2017;30(12):1720–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.88>
 190. Lai L, Xu C, Wang W, Wang D, Song Z, Zhu Y, et al. P70.18 Distribution of GNAS Mutations in Chinese Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2021;16(10):S1217.
 191. Hara K, Saito T, Hayashi T, Yimit A, Takahashi M, Mitani K, et al. A mutation spectrum that includes GNAS, KRAS and TP53 may be shared by mucinous neoplasms of the appendix. *Pathology Research and Practice* [Internet]. 2015;211(9):657–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2015.06.004>
 192. Abdullah M, Meilany S, Trimarsanto H, Malik SG, Sukartini N, Idrus F, et al. Genomic profiles of Indonesian colorectal cancer patients. *F1000Research*. 2022;11:443.
 193. Ngai YF, Chijiwa C, Mercimek-Mahmutoglu S, Stewart L, Yong SL, Robinson WP, et al. Pseudohypoparathyroidism type 1a and the GNAS p.R231H mutation: Somatic mosaicism in a mother with two affected sons. *American Journal of Medical Genetics, Part A*. 2010;152(11):2784–90.

194. Hu Q, Shokat KM. Disease-Causing Mutations in the G Protein Gas Subvert the Roles of GDP and GTP. *Cell* [Internet]. 2018 May;173(5):1254-1264.e11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418302988>
195. Barton C, Al Achkar M, Blender JA, Farnen SH, Hall RB, Konidari AM, et al. Patient-led advocacy in ALK-positive lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2023;12(6):1303–19.
196. Chazan G, Solomon BJ. Optimal first-line treatment for metastatic ALK+ non-small cell lung cancer-a narrative review. *Translational Lung Cancer Research*. 2023;12(2):369–78.
197. Dhamelincourt E, Rousseau Bussac G, Doubre H, Decroisette C, Fournel P, Demontrond P, et al. Caractéristiques cliniques et moléculaires des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) de stade avancé avec réarrangement ALK et longs répondeurs au CRIZOTINIB : étude CRIZOLONG GFPC 05-2019. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*. 2023;15(1):132.
198. Alshareef A, Zhang HF, Huang YH, Wu C, Zhang JD, Wang P, et al. The use of cellular thermal shift assay (CETSA) to study Crizotinib resistance in ALK-expressing human cancers. *Scientific Reports* [Internet]. 2016;6(September):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep33710>
199. Toth LN, Abreu FB, Tafe LJ. Non-small cell lung cancers with isocitrate dehydrogenase 1 or 2 (IDH1/2) mutations. *Human Pathology* [Internet]. 2018 Aug;78:138–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.04.014>
200. Chen S, Zhu H, Jin M, Yuan H, Liu Z, Li J, et al. Molecular and clinical characteristics of IDH mutations in Chinese NSCLC patients and potential treatment strategies. *Cancer Medicine*. 2022;11(22):4122–33.
201. Taher MM, Dairi G, Butt EM, Al-Quthami K, Al-Khalidi H, Jastania RA, et al. EGFRvIII expression and isocitrate dehydrogenase mutations in patients with glioma. *Oncology Letters*. 2020;20(6):1–15.

202. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki N. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *American Journal of Pathology* [Internet]. 2011;178(3):1395–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.011>
203. Paschka P, Schlenk RF, Ibañez M, Kaggias A, Bullinger L, Gaidzik VI, et al. Isocitrate Dehydrogenase Gene Mutations In Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) and Outcome After Treatment with All-Trans Retinoic Acid: A Study of the German-Austrian AML Study Group (AMSLG). *Blood*. 2010;116(21):101–101.
204. Harada G, Yang SR, Cocco E, Drilon A. Rare molecular subtypes of lung cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2023;20(4):229–49.
205. Wang H, Daouti S, Li WH, Wen Y, Rizzo C, Higgins B, et al. Identification of the MEK1(F129L) activating mutation as a potential mechanism of acquired resistance to MEK inhibition in human cancers carrying the B-Raf V600E mutation. *Cancer Research*. 2011;71(16):5535–45.
206. Wang Y, Xue Q, Zheng Q, Jin Y, Shen X, Yang M, et al. SMAD4 mutation correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation* [Internet]. 2021;101(4):463–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41374-020-00517-x>
207. Zhou Z, Gong Q, Wang Y, Li M, Wang L, Ding H, et al. The biological function and clinical significance of SF3B1 mutations in cancer. *Biomarker Research* [Internet]. 2020 Dec 3;8(1):38. Available from: <https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-01922-y>
208. Lappin KM, Barros EM, Jhujh SS, Irwin GW, McMillan H, Liberante FG, et al. Cancer-Associated SF3B1 Mutations Confer a BRCA-Like Cellular Phenotype and Synthetic Lethality to PARP Inhibitors. *Cancer Research*. 2022;82(5):819–30.
209. Canbezdi C, Tarin M, Houy A, Bellanger D, Popova T, Stern M-H, et al. Functional and conformational impact of cancer-associated SF3B1 mutations depends on the position and the charge of amino acid substitution.

- Computational and Structural Biotechnology Journal [Internet]. 2021;19:1361–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.012>
210. Liu F, Wei Y, Zhang H, Jiang J, Zhang P, Chu Q. NTRK Fusion in Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis, Therapy, and TRK Inhibitor Resistance. *Frontiers in Oncology*. 2022;12(March):1–16.
 211. Li H, Yan S, Liu Y, Ma L, Liu X, Liu Y, et al. Analysis of NTRK mutation and clinicopathologic factors in lung cancer patients in northeast China. *International Journal of Biological Markers*. 2020;35(3):36–40.
 212. Sundaresan TK, Dubash TD, Zheng Z, Bardia A, Wittner BS, Aceto N, et al. Evaluation of endocrine resistance using ESR1 genotyping of circulating tumor cells and plasma DNA. *Breast Cancer Research and Treatment* [Internet]. 2021;188(1):43–52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06270-z>
 213. Xu L, Wang F, Luo F. MET-targeted therapies for the treatment of non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2022 Oct 27;12:1013299. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.1013299/full>
 214. Zhang Y, Zhang L, Li R, Chang DW, Ye Y, Minna JD, et al. Genetic variations in cancer-related significantly mutated genes and lung cancer susceptibility. *Annals of Oncology*. 2017;28(7):1625–30.
 215. Sequist L V., Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Annals of Oncology* [Internet]. 2011;22(12):2616–24. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr489>
 216. Mäki-Nevala S, Sarhadi VK, Rönty M, Kettunen E, Husgafvel-Pursiainen K, Wolff H, et al. Hot spot mutations in Finnish non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* [Internet]. 2016 Sep;99:102–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.06.024>
 217. Thomas Montpréville V, Lacroix L, Rouleau E, Mamodaly M, Leclerc J, Tutuianu L, et al. Non-small cell lung carcinomas with CTNNB1 (beta-

catenin) mutations: A clinicopathological study of 26 cases. *Annals of Diagnostic Pathology* [Internet]. 2020 Jun;46:151522. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151522>



EK A. ETİK KURUL KARARI



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 72867572-050.01.04- 34793
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Doç.Dr. Pınar ASLAN KOŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Isparta

Sorumlu araştırmacı olduğunuz "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgularından Sorumlu Gen Mutosyonlarının Likit Biyopsi Yöntemi ile Araştırılması" isimli çalışmanızın kurulumuz tarafından uygun görüldüğüne ilişkin 17.02.2021 tarih ve 85 sayılı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı yazımız ekinde gönderilmiştir. Bilgilerinizi rica ederim.



Prof. Dr. Mekin SEZİK
Başkan

Eki :Etik Kurulu Kararı (2 Sayfa)

S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dekanlığı Doğu Kampüsü 32260-İSPARTA
Tel : 0(246)211 37 04 Faks : 0(246)237 71 65
e-Posta :tipetik@sdu.edu.tr İnternet Adresi :www.tip.sdu.edu.tr

Bilgi için : Dilek TOLA OLGUN
Bilgisayar İşletmeni
Tel : 0(246)211 32 30

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Cemal Çağrı ÇETİN

Eğitim Durumu

Doktora : Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji A.B.D., 100/2000 YÖK Doktora Bursu ‘Moleküler Onkoloji’ Öncelikli Alanı-2023

Yüksek Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoloji A.B.D. Entomoloji 2017

Lisans Öğrenimi : Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2013.

: Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Yönetimi Bölümü (Çift Anadal), 2014.

Ön Lisans Öğrenimi : Süleyman Demirel Üniversitesi, Gelendost MYO Gıda Teknoloji, 2009.

Bilimsel Yayınlar ve Çalışmalar

SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

Antic, D.Z., Çetin, C.Ç., Turantepe, E., Gürbüz, M.F. 2016. A new cave-dwelling species of the genus *Mesoiulus* Berlese, 1886 (Diplopoda, Julida, Julidae) from Turkey. *Zootaxa*, 4196(2), 296–300.

Çetin, C. Ç., Turantepe, E., & Gürbüz, M. (2021). Arthropoda fauna of Zindan Cave (Isparta, Turkey) with notes on new records and some ecological characteristics. Turkish Journal of Entomology, 45(2), 219-233.

Ulusal toplantıda sunulurak tam metin olarak yayımlanan bildiri

Aydın, G., Şen, İ., Aydın, B., Turantepe, E., Çetin, C.Ç., Özten, U., Akkaya, U.M., Çelebi, F. 2018. Türkiye'de İlk Biyospeleoloji Araştırma Topluluğu (Bat) ve Mağara Ekosistemlerinde Biyolojik Materyal Toplama Etiği. 8. Ulusal Mağara Bilimi Sempozyumu, 29 Eylül – 06 Ekim, Antalya, 9-12 p.

Tabur, M.A., Ayvaz, Y., Çetin, C.Ç., Şimşek, B., Turantepe, E. 2013. Isparta'daki Kaya Sansarı (Martes foina) (Erxleben, 1777)'nin Populasyon Özellikleri. Porsuk ve Sansarların Türkiye'deki Durumu Sempozyum 1, 10-11 Mayıs, Muğla, 119-124.

Ulusal toplantıda sunulurak özet metin olarak yayımlanan bildiri

Aydın, G., Kunt, K.B., Aydın, B., Şen, İ., Turantepe, E., Özten, U., Akkaya, U.M., Çelebi, F., Çetin, C.Ç. 2018. A Preliminary Study On Cave Dwelling Arthropoda Fauna of Kadini Cave (Antalya, Turkey). 8. Ulusal Mağara Bilimi Sempozyumu, 29 Eylül-06 Ekim, Antalya, 13 p.

Çetin, C.Ç., Turantepe, E., Gürbüz, M.F. 2018. Zindan Mağarası (Isparta-Aksu) Arthropoda Faunasının Biyospeleolojik Araştırılması. 8. Ulusal Mağara Bilimi Sempozyumu, 29 Eylül-06 Ekim, Antalya, 14-14.

Projeler

Çetin, C.Ç., Turantepe, E. 2013. Zindan Mağarası (Isparta-TÜRKİYE) Omurgasız Faunasının Araştırılması. TUBİTAK 2209-A.

1. Isparta Bilim Şenliği, TUBİTAK-4007 Bilim Şenlikleri Destekleme Programı. 23-26 Mayıs 2016. (Atölye lideri, Rehber).