



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**AKCİĞER ADENOKARSİNOMLU OLGULARDA BİRİNCİ BASAMAK TEDAVİ SONRASI
ONKOGEN DEĞİŞİMLERİNİN PERİFERİK KAN SERBEST DNA (CFDNA)
ÖRNEKLERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Metin ÇALIŞKAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**AKCİĞER ADENOKARSİNOMLU OLGULARDA BİRİNCİ BASAMAK TEDAVİ SONRASI
ONKOGEN DEĞİŞİMLERİNİN PERİFERİK KAN SERBEST DNA (CFDNA)
ÖRNEKLERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

Metin ÇALIŞKAN

Danışman
Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2020

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç.Dr. Nur SELVİ GÜNEL

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Prof.Dr. Gökay BOZKURT

Üye : Doç.Dr. Çığır BİRAY AVCI

Üye : Doç.Dr. Buket KOSOVA

Üye : Doç.Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 07.02.2020

Önsöz

Yüksek lisans tezimde akciğer kanserli olgularda her geçen gün önemini arttıran ve tedaviye önemli ivme katan onkogenler üzerine çalışmıştım, doktora tezimle minimal invaziv ve gelecekte tedaviye yön verecek olduğunu düşündüğüm likit biyopsi örneklerinden onkogen değişimlerini inceleyerek moleküler monitörizasyona katkı sağlamayı amaçladım. Hızlı gelişen teknoloji ile gelişim ve değişimlere adapte olmak biraz yorucu olsada hocalarımla, ailemin ve meslektaşlarımla desteği sayesinde zevkle ve heyecanla bu süreci tamamlıyorum. Eşimin başka bir üniversiteye atanmasıyla tez dönemim eşim ve çocuklarımla hasretiyle biraz daha duygusal ve yorucu geçti bu süreci hafifletmek için bana desteklerini esirgemeyen hocalarıma ayrıca çok teşekkür ediyorum.

Bir üyesi olmaktan onur duyduğum Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda kaliteli öğretimin yanında olağan üstü bir eğitim süreci yaşadım. Birbirinden değerli hocalarımla farklı yönlerden sağladıkları katkılar yeri doldurulmaz etkiler yarattı. Bu süreçte yolunda gitmeyen şeyler yorucu ve stresli durumlar yaratsa da herbiri bilgi ve görgü dağarcığımı genişletti. Bu süreçte desteği bulunan herkese gönülden teşekkür ediyorum.

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından Tıp-2015-005 nolu proje ile bize destek veren Ege Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ediyorum.

İzmir, 20.02.2020

Metin ÇALIŞKAN

Özet

Akciğer adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması

Akciğer kanseri günümüzde en yüksek mortaliteye sahip kanser tipidir. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki tipi vardır. KHDAK'nin yaklaşık yarısını adenokarsinom alt tipi oluşturmaktadır. Klasik tedavide cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi uygulanırken immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi önemini her geçen gün artırmaktadır. Adenokarsinomların yaklaşık yarısında gözlemlenen onkogen mutasyonlarının varlığı hedefe yönelik tedavi ve prognoz tayini açısından önemlidir. Onkogen mutasyonlarının tespiti tümör biyopsisi ile gerçekleştirilmektedir. Tümör biyopsisinin hastaların tümünde uygulanamaması, uzmanlık gerektiren, zaman alıcı ve invaziv bir işlem olması önemli dezavantajlardır. Ayrıca tümör biyopsisi sadece biyopsi alınan bölgeyi yansıtmakta intra ve inter tümör heterojenitesini yansıtamamaktadır. Tedavi sürecinde tümörün takibi açısından tekrarlanma şansı yok denecek kadar azdır. Son yıllarda likit biyopsi olarak tanımlanan, vücut sıvılarına yayılmış tümör serbest DNA'sının (cfDNA) toplanmasıyla tümöre ait onkogenlerin tespit edilebilmesi mümkün olmuştur. Likit biyopsi örneğinin tümör yükünü ve heterojenitesini yansıtması, minimal invaziv olması tüm hastalarda istenilen zaman ve sıklıkta tekrarlanabilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır. Gelecekte likit biyopsi ile tümör monitörizasyonunun mümkün olabileceğini, tespiti muhtemel çok sayıdaki moleküler değişikliğin ortaya çıkış sırasının ve interaksiyonlarının tümörün moleküler evrimine ışık tutacağını böylece tedavi başarısının artacağını düşünmekteyiz. Bu projede, birinci basamak tedavi öncesi ve sonrası tespit edilebilen onkogen değişimleri, mutasyon değişimleri, mutasyon yükü değişimleri ve mutasyon birlikteliklerinin tümörün akciğer içi pozisyonu ve yerleşimi, yeni oluşumlarla olan ilişkisi, metastaz ilişkileri, tedavi yanıtıyla karşılaştırarak tedavi ve prognoza katkı sağlayabilecek bilgiler elde etmeyi amaçladık.

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bilimdalı'na başvurmuş ve akciğer adenokarsinomu tanısı almış 52 olgu araştırmaya dahil edilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası örnekleri temin edilen olgulardan *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* ve *PIK3CA* onkogenlerinde sık gözlemlenen 123 mutasyon Allel Spesifik PCR (AS-PCR) yöntemiyle araştırılmıştır. Olguların

29'unda tedavi öncesi ve sonrası hiçbir mutasyona rastlanmazken 23'ünde en az bir mutasyon olmak üzere toplam 39 mutasyon tespit edilmiştir. Bir olguda 3 ayrı mutasyon, 4 olguda 2 ayrı mutasyon ve 18 olguda tek mutasyon saptanmıştır. Tedavi öncesi mutasyon tespit edilmeyen 3 olguda tedavi sonrası mutasyon tespit edilirken tedavi öncesi mutasyonu mevcut 5 olguda tedavi sonrası mutasyon tespit edilememiştir. Mutasyon tespit edilen 15 olguda tedavi öncesi ve sonrası mutasyon yükü değişimleri tespit edilmiştir. *NRAS* mutasyonu bulunan bir olguda tedavi sonrası *KRAS* mutasyonları tespit edilmiştir.

EGFR mutasyonu mevcut olan olgular tedaviye iyi yanıt vermiş tedavi sonrası tümörün gerilemesiyle *EGFR* mutasyonları tespit edilemeyecek seviyeye düşmüştür. Literatürde nadir gözlemlenen *KRAS* kodon 59, 117, 146 mutasyonları çalışmamızda %7,5 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Bu mutasyonların çoklu mutasyon birliktelikleri göstermesi tümör merkezlerinin nekroze olması ve özellikle sağ akciğer üst lobda konumlandıkları gözlenmiştir. *KRAS* kodon 12 mutasyonu içeren olguların *KRAS* kodon 13 mutasyonu içeren olgulara göre daha iyi tedavi yanıtı sergiledikleri, mutasyon birliktelikleri göstermedikleri ve sağ akciğer üst lob dışında konumlandıkları gözlenmiştir. Primer tümörü merkezi yerleşimli olguların uzak metastaz göstermeyip akciğer içi yayılımla kötü prognoza sebep oldukları tespit edilmiştir. Kemik metastazı gösteren olguların sağ akciğerde yoğunlaştıkları, primer tümörü sağ akciğerde olan olguların sağ sürrenal beze, solda olanların sol sürrenal beze metastaz eğiliminde oldukları gözlemlenmiştir. Bulguların daha fazla olgu içeren çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer adenokarsinomu; Onkogen; cfDNA; *EGFR*; *KRAS*

Abstract

Investigation of oncogene changes in periferic blood cfDNA specimens after first line therapy of lung adenocarcinoma patients.

Nowaday, lung cancer has the highest mortality rate among cancer types. There are two types of lung cancer that small cell lung cancer (SCLC), and non-small cell lung cancer (NSCLC). Approximately half of NSCLC is composed of adenocarcinoma subtype. Surgery, chemotherapy and radiotherapy are applied in classical treatment, while the importance of immunotherapy and targeted therapy are increasing day by day. The presence of oncogene mutations observed in about half of adenocarcinomas is important in terms of targeted treatment and prognosis. Oncogenic mutation detection is based on samples of tumor tissue taken by biopsy. Tumor biopsy cannot be performed in all patients and it is a time consuming and invasive procedure that requires expertise. In addition, tumor biopsy reflects only the biopsy site and does not reflect intra and inter tumor heterogeneity. There is little chance of repeat the follow-up of the tumor during the treatment process. In recent years, it has been possible to detect oncogene mutations by collecting cell-free DNA (cfDNA) called liquid biopsy. Liquid biopsy specimen reflects tumor burden and heterogeneity, is minimally invasive and can be repeated at any time and frequency in all patients. We think that tumor monitoring by liquid biopsy may be possible in the future, and that the sequence and interactions of many possible molecular changes will shed light into the molecular evolution of the tumor, thus improving treatment success. In this thesis, we aimed to obtain information that can contribute to treatment and prognosis by comparing oncogene changes, mutation changes, mutation burden changes, the mutation associated with tumor before and after first-line therapy, relation of tumor with new formations, metastasis relationships, and treatment response.

Fifty-two cases with adenocarcinoma of lung admitted to Aydın Adnan Menderes University Practice and Research Hospital Medical Oncology Department were included in the study. 123 mutations observed in EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA oncogenes were investigated by Allel Specific PCR (AS-PCR) method. In 29 of the cases, no mutations were detected before and after the treatment, while 39 mutations were detected, of which 23 had at least one mutation. There were 3 different mutations in one case, 2 mutations in 4 cases and one mutation in 18 cases. In 3 cases where no mutation was detected before treatment, post-treatment mutation was

detected in 5 cases, whereas in 5 cases there was no post-treatment mutation. In 15 cases with mutation, mutation burden changes were detected before and after treatment. One patient with NRAS mutation had KRAS mutations after treatment. The cases with EGFR mutation responded well to the treatment and the EGFR mutations decreased to an undetectable level after tumor regression. KRAS codon 59, 117, 146 mutations, which are rarely observed in the literature, were detected as high as 7.5% in our study. It was observed that these mutations showed multiple mutation associations, tumor centers were necrosis and they were located especially in the upper lobe of the right lung. It was observed that patients with KRAS codon 12 mutation having better treatment response than patients with KRAS codon 13 mutation, did not show mutation associations, and were located outside the upper lobe of the right lung. It was found that the primary tumor of the central location did not show distant metastasis, and caused a poor prognosis with intra-pulmonary spread. It was observed that the cases with bone metastasis were concentrated in the right lung, the cases with primary tumor in the right lung were tend to metastasize to the right adrenal gland, and the left ones to the left adrenal gland. The findings were supported by studies involving more cases.

Keywords; Lung adenocarcinoma; cfDNA; Oncogene; *EGFR*; *KRAS*

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Grafikler Dizini	XI
Kısaltma Listesi	XIII
Giriş	1
1.1. Giriş	1
Genel Bilgiler	3
2.1. Akciğer Kanseri.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyoloji	4
2.1.3. Klinik Belirtiler	4
2.1.4. Sınıflandırma	4
2.1.5. Evreleme.....	5
2.1.6. Akciğerlerin Anatomisi.....	8
2.1.7. Pozitron Emisyon Tomografisi / Bilgisayarlı Tomografi (PET/BT).....	9
2.1.8. Akciger kanserinde sürücü onkogenler	10
2.2. Likit biyopsi	13
Gereç ve Yöntem	15
3.1 Olguların toplanması	15
3.2 cfDNA izolasyonu uygulama protokolü	15
3.3 Onkogen mutasyonların belirlenmesi	17
3.4 Verilerin toplanması	28
3.5 Verilerin analizi.....	29
Bulgular.....	30
4.1 Olguların tanımlayıcı özellikleri	30
4.2 Tespit edilen onkogen mutasyonları birliktelikleri ve değişimleri	31
4.3 Cinsiyet, yaş, tanı evresi ve sigara kullanımına göre mutasyon dağılımı	34
4.4 Primer tümörün konumuna göre mutasyonlar ve metastazlar	35

4.5 Primer tümörün yerleşimine göre mutasyonlar ve metastazlar	41
4.6 Onkogen değişimlerine göre tedavi yanıtı ve yeni oluşumlar	43
Tartışma	51
Sonuç ve Öneriler	66
Kaynaklar	69
Ekler	84
Teşekkür.....	91
Özgeçmiş	93



Tablolar Dizini

Tablo 1: T,N ve M değerlerine göre evre gruplandırması.....	6
Tablo 2 : Primer tümör, bölgesel lenf nodu ve metastaz değerlendirmesi.....	7
Tablo 3: Araştırılan <i>EGFR</i> geni mutasyonları	19
Tablo 4: EGFR çalışma karışımının hazırlanması	20
Tablo 5: EGFR mikslarının AD-Plate yükleme pozisyonları	20
Tablo 6: Araştırılan <i>KRAS</i> geni mutasyonları	21
Tablo 7: KRAS çalışma karışımının hazırlanması	22
Tablo 8: KRAS mikslarının AD-Plate yükleme pozisyonları	22
Tablo 9: Araştırılan <i>NRAS</i> geni mutasyonları	23
Tablo 10: Araştırılan <i>BRAF</i> geni mutasyonları.....	24
Tablo 11: BRAF / NRAS çalışma miksi hazırlanması.....	24
Tablo 12: BRAF / NRAS mikslarının AD-Plate yükleme pozisyonları	25
Tablo 13: Araştırılan <i>PIK3CA</i> geni mutasyonları	26
Tablo 14: PIK3CA çalışma karışımının hazırlanması.....	26
Tablo 15: PIK3CA karışımının AD-Plate yükleme pozisyonları.....	27
Tablo 16: Olgulara ait tanımlayıcı özellikler	30
Tablo 17 : Olgulara göre tespit edilen mutasyonlar	33
Tablo 18: Cinsiyet, yaş, tanı evresi ve sigara kullanımına göre mutasyon dağılımı.	35
Tablo 19: Akciğer loblarına göre tespit edilen mutasyonlar	35
Tablo 20: Primer tümörün yerleşimine göre mutasyon ve metastaz durumları	42

Şekiller Dizini

Şekil 1: Birliktelik gösteren mutasyonlar ve primer tümör konumları.....	36
Şekil 2: Birliktelik göstermeyen mutasyonlar ve primer tümör konumları.....	37
Şekil 3: Mutasyon içermeyen olguların primer tümör konumları	38
Şekil 4: Kemik metastazı gözlenen olguların primer tümör konumları	39
Şekil 5: Sürrenal bez metastazlarına göre primer tümör konumları	40
Şekil 6: Beyin, karaciğer ve diğer organ metastazlarının konumları.....	41



Grafikler Dizini

Grafik 1: Amerika Birleşik Devletleri 2019 yılı akciğer kanseri yeni tanı ve ölüm tahminleri. 2009-2015 yılları arası 5 yıllık sağkalım yüzdesi. 1992–2016 yılları arası her yüzbin kişideki yeni tanı ve ölüm sayısı	3
Grafik 2: Tedavi öncesi ve sonrası olgularda mutasyon değişimleri.....	31
Grafik 3: Tespit edilen mutasyonların tüm mutasyonlar içindeki oranları.....	32



Resimler Dizini

Resim 1: HPEA FT falkon tüp	16
Resim 2: cobas z 480(Roche)	27
Resim 3: EGFR L858R içeren olgunun PET/BT görüntüsü	43
Resim 4: EGFR Ex19Del ve KRAS G13X içeren olgunun PET/BT görüntüsü.....	44
Resim 5: NRAS G13X içeren olgunun PET/BT görüntüsü	45
Resim 6: KRAS G13X ve Q61X içeren olgunun PET/BT görüntüsü.....	46
Resim 7: KRAS G13X içeren olgunun PET/BT görüntüsü	47
Resim 8: KRAS Q61X içeren olgunun PET/BT görüntüsü	48
Resim 9: KRAS G12X içeren olgunun PET/BT görüntüsü	49
Resim 10: KRAS A146X içeren olgunun PET/BT görüntüsü	49
Resim 11: BRAF V600E içeren olgunun PET/BT görüntüsü.....	50

Kısaltma Listesi

BRAF	: v-Raf Murine sarkoma viral onkogen homologu
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
cfDNA	: Hücre içermeyen deosiribonükleik asit
cfRNA	: Hücre içermeyen ribonükleik asit
CTC	: Dolaşımdaki tümör hücreleri
ctDNA	: Dolaşımdaki tümör deosiribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
FDG	: 2-18F-floro-2-deoksi-D-glukoz
GAP	: GTPaz aktive edici protein
GDP	: Guanozindifosfat
GEF	: Guanin nükleotid değiştirme faktörü
GTP	: Guanozintrifosfat
GTPaz	: Guanozintrifosfataz
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
ITH	: Tümör içi heterojenite
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	: Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu

MYCN	: Avian Miyelositomatozis viral onkogen nöroblastoma
NGS	: Yeni nesil dizileme
NRAS	: v-Ras Nöroblastom viral onkogen homologu
TKIs	: Tirozin kinaz inhibitörleri
TP53	: Tümör süpresör proteini 53
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PI3K	: Fosfatidil inositol-3-kinaz
PIK3CA	: Fosfatidil inozitol-3-kinaz katalitik alfa polipeptid
PIP3	: Fosfatidil inositol trifosfat
<i>Rb</i>	: Retinoblastoma geni
ROS-1	: c-ros oncogene 1
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SUV	: Standart Alım Değeri
TK	: Tirozin kinaz

Giriş

1.1. Giriş

Akciğer kanseri günümüzde en yüksek mortaliteye sahip kanser tipidir (Siegel vd, 2019). Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom en yaygın alt tipleridir. Bu alt tiplerin alan etkisi (field affect) ile farklı öncül malignant hücrelerden köken alarak akciğere yayıldıkları düşünülmektedir (Steiling vd., 2008, Cheng vd., 2012, Wang vd., 2009). Diğer bazı kanserlerde de benzer durum gözlemlense de öncül malignant hücrelerin sadece morfoloji ile tanımlanması zordur, bu nedenle akciğer kanseri evriminin en erken evrelerini genetik çalışmalarla incelemek gerekmektedir (Campbell vd., 2016). Ayrıca, akciğer kanseri erken bir aşamada metastaz yapma, hem lenf hem de kan yoluyla yayılma eğilimi göstermektedir. Genetik çalışmalarla bu yıkıcı etkiyi hangi preinvaziv klonun yaratabileceğinin belirlenebileceği umut edilmektedir (Teixeira vd., 2019). Meme ve prostat kanserlerinin %60'ından fazlası tedavi edilebilirken, erken bir aşamada olsa dahi uzak metastazları olan akciğer karsinomu vakalarının % 57'sinin 5 yıllık sağkalımı % 19'un altında kalmaktadır (Siegel vd., 2019). Erken evre değişikliklerinin genetik olarak ortaya konması kanserin evrimi, invazyonu, immünsüpresyonu ve metastazı hakkında önemli bilgiler sunacaktır (Siegel vd., 2019, Hanahan ve Weinberg, 2011). Akciğer kanseri alt tipleri arasındaki bu ayrımın tedaviye farklı yanıtlar veren akciğer adenokarsinomu olgularında da primer tümörün bulunduğu bölge ve mutasyon içeriğine göre farklı genetik değişiklikler ile farklı prognoz ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca kolon kanserlerinde sağ ve sol kolon için farklı tedavi stratejileri uygulanmakta veya aynı tedaviden farklı tedavi yanıtları alınmaktadır (Venook vd., 2016). Akciğer adenokarsinomunun bir pregenitör hücreden çoğalarak yayıldığı düşünülse de ortaya çıktığı bölgedeki mikro çevre ve epigenetik farklılıkların farklı tümör davranışlarına yol açabileceğini düşünmekteyiz. Akciğer adenokarsinomlarının histopatolojik altipleri yanı sıra gelecekte oluşturulması muhtemel moleküler evrim sırası ve moleküler genetik alt tiplerinin birlikte kullanımıyla tanı ve tedavide başarının artabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca onkolojik görüntüleme yöntemlerinin moleküler genetik verilerle birleştirilmesi tümör hakkında daha çok bilgi edinilmesine, mikro çevrenin moleküler yapı ve tümörün

evriminde katkıları ortaya koyacağı gibi daha özelleşmiş tedavi ve öngörülebilir prognoz ile tanı ve tedavide başarı şansının artabileceğini düşünmekteyiz.

Bu tez çalışmasında, tedavi öncesi akciğer adenokarsinomu tanısı alan olgularda tümöre ait kan dolaşımına çıkmış olan cfDNA örneklerinden en sık gözlemlenen onkogen mutasyonları taranmıştır. Primer tümörün lokalizasyonu, yerleşimi, metastaz durumu ve tedavi yanıtı, tedavi öncesi ve sonrası mutasyon değişimi, tümör yükü ve mutasyon birliktelikleriyle birlikte değerlendirilerek tümörün moleküler evrimi hakkında bilgiler verecek kişiye özgü tedavilerin oluşmasına zemin hazırlayabilecek tanı ve tedavi başarısına katkı sağlayabilecek bilgiler elde etmeyi amaçladık.

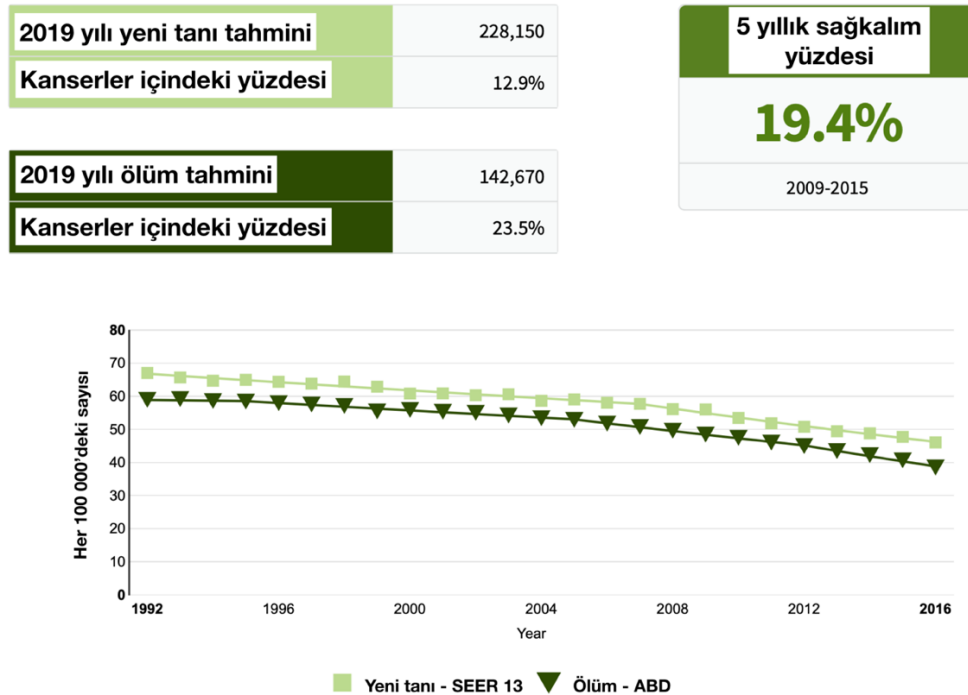


Genel Bilgiler

2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri tüm yaş ve cinsiyetlere göre dünyada görülme sıklığı açısından %11,6 ve ölüme sebebiyet açısından %18,4 ile en üst sırada bulunmaktadır. 2018 yılı Globocan verilerine göre yaklaşık 2 milyon yeni tanı ve yaklaşık 1,7 milyon kansere bağlı ölüm ile ilk sıradaki konumunu korumaktadır. Ülkemizde akciğer kanseri 2014 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre görülme sıklığı açısından kadınlarda beşinci sırada erkeklerde ise ilk sırada bulunmaktadır (Türkiye Kanser İstatistikleri 2014). Son yıllarda kanser biyolojisindeki gelişmeler tanı ve tedavide gelişmeler sağlamış Amerikan Ulusal Kanser Entitüsünün verilerine göre tüm kanserlerde beş yıllık sağkalım %67,1'e kadar yükselmiştir. Ancak bu başarı akciğer kanserine yansımamış beş yıllık sağ kalım %19,4'lere ancak ulaşabilmiştir (NIH) (Grafik 1).



Grafik 1: Amerika Birleşik Devletleri 2019 yılı akciğer kanseri yeni tanı ve ölüm tahminleri. 2009-2015 yılları arası 5 yıllık sağkalım yüzdesi. 1992-2016 yılları arası her yüzbin kişideki yeni tanı ve ölüm sayısı

Akciğer kanseri belirtileri nadiren erken evrelerde kendini göstermekte bu sessiz seyrediş kısa sağkalım ve yüksek mortaliteye sebep olmaktadır. Olguların büyük çoğunluğu ileri evrelerde, %14'ü ancak cerrahi müdahaleye uygun evrede farkedilebilmektedir (Karapinar ve ark., 2015)

2.1.2. Etiyoloji

Uzun yıllardır tütün ve tütün ürünlerinin akciğer kanseri etyolojisinde önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir; öyle ki %90'dan yüksek oranda tütün ve tütün ürünleri kanser oluşumunda sebep olarak ortaya çıkmaktadır. Sigara kullanan her on kişiden birisinde akciğer kanseri görülürken akciğer kanseri tanısı alan her on kişiden dokuzu sigara kullanıcısıdır. Sigara kullanımı akciğer kanseri riskini yaklaşık otuz kat artırırken dumana maruziyet yani pasif içicilik yüzde onbir ile Amerika Birleşik devletlerinde her yıl 3000'den fazla kanser vakasıyla ilişkilidir. Genetik yatkınlığın yanı sıra mesleki etkenler %9-15, radon maruziyeti %10, hava kirliliği %1-2, radyasyon, diğer hastalıklar ve beslenme tütün dışı etkenler olarak ön plana çıkmaktadır. Histopatolojik olarak sigara kullanıcılarında genellikle küçük hücreli ve yassı hücreli akciğer kanseri görülmektedir (Alberg vd., 2007, Cooper, 2016).

2.1.3. Klinik Belirtiler

Akciğer kanserinin ilerlemeden veya metastaz oluşturmadan önce fazla belirti vermemesi solunum sisteminin ağrı hissi oluşturmaması ve öksürüğün sigara içenlerde belirti olarak kabul edilmemesinden kaynaklanmakta hastalığın ancak geç evrelerde farkedilmesine sebep olmaktadır. Daha çok hastalar primer kanserden kaynaklanan şikayetle değil de, metastazların oluşturmuş olduğu rahatsızlıkla bir sağlık kuruluşuna başvurmaktadır (Alar ve Şahin, 2012). Klinik bulgu ve belirtiler tümörün bölgesi ve yayılımına göre farklılıklar göstermekte merkezi pozisyonadaki tümörlerde öksürük şikayeti ön plana çıkmaktadır. Ayrıca akciğer kanserinde, plevral efüzyona bağlı dispne, kemik ağrısı, çomak parmak, ses kısıklığı, yutma güçlüğü görülebilmektedir.

2.1.4. Sınıflandırma

Akciğer kanseri Küçük Hücreli Akciğer kanseri (KHAK) yaklaşık %15-20 ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) yaklaşık %80-85 ile iki ana gruba ayrılmaktadır. KHDAK skuamöz hücreli karsinomlar ve non-skuamöz karsinomlar

(Adenokarsinom, Büyük Hücreli Karsinom ve diğer subtipler) olarak iki alt grupta değerlendirilmektedir (Travis, 2004).

Akciğer adenokarsinomları özellikle gelişmiş ülkelerde en büyük alt grubu oluşturmakta çoğunlukla sigara kullanmayan olgular ve kadın hastalarda sıklıkla gözlemlenmektedir. DSÖ akciğer adenokarsinomlarını dört ana grupta göstermekte ve nadir varyantları tanımlamaktadır. Bu gruplar Bronkoalveoler, Asiner, Solid, ve Papiller tiplerdir ve değişen oranlarda bir arada gözlenmektedirler. Bronkioloalveoler Karsinomun Müsinöz, Nonmüsinöz ve İntermediate form olmak üzere üç ayrı formu mevcuttur. KHDAK'nin sıklıkla gözlenen alt gruplarından olan Skuamöz hücreli karsinom; Küçük Hücreli, Şeffaf Hücreli, Papiller ve Bazaloid morfoloji formları olarak tanımlanmaktadır (Travis, 2004).

2.1.5. Evreleme

Akciğer kanserinde tedavi başarısı doğru prognoz tayini ve tedavi seçimi açısından evrelemenin ne kadar iyi yapıldığına bağlıdır. Evreleme genel olarak anamnez, fizik muayene, laboratuvar tetkikleri, görüntüleme ve tümör biyopsisi ile gerçekleştirilmektedir. Tanı sırasında primer tümörün anatomik yaygınlığı TNM evreleme sistemiyle belirlenmektedir. T,N,M evrelemesinde tümörün büyüklüğü ve yaygınlığı (T), bölgedeki lenf nodu tutulumu (N) ve metastaz durumu (M) ile tanımlanmaktadır. T, N, M evreleme sistemiyle hastalığın derecesi evre I ve evre IV arasında genel olarak tespit edilmektedir (Silvestri vd., 2003). Akciğer kanserinde TNM sınıflandırması 2009 yılında yedinci versiyonuyla yayınlanmış ve 2010 yılı itibariyle yürürlüğe girmiştir. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneğinin (IASLC) ve 19 ülkenin katılımıyla T, N ve M faktörleri ile sağkalım ilişkisi analiz edilerek evrelemede değişikliklere gidilerek sekizinci TNM sınıflaması oluşturulmuştur. Ülkemiz bu yeni sınıflandırma sistemine 2017 yılı itibariyle geçiş yapmıştır (Tablo 1 ve 2) (Turna, vd., 2017).

Tablo 1: T,N ve M değerlerine göre evre gruplandırması

EVRE		T	N	M
Gizli karsinom		Tx	N0	M0
Evre 0		Tis	N0	M0
Evre I	IA1	T1mi, T1a	N0	M0
	IA2	T1b	N0	M0
	IA3	T1c	N0	M0
	IB	T2a	N0	M0
Evre II	IIA	T2b	N0	M0
	IIB	T1a, T1b, T1c, T2a, T2b	N1	M0
		T3	N0	M0
Evre III	IIIA	T1a, T1b, T1c, T2a, T2b	N2	M0
		T3, T4	N1	M0
		T4	N0	M0
	IIIB	T1a, T1b, T1c, T2a, T2b	N3	M0
		T3, T4	N2	M0
		T3, T4	N3	M0
Evre IV	IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a, M1b
	IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

Tablo 2 : Primer tümör, bölgesel lenf nodu ve metastaz değerlendirmesi

Primer tümör (T)	
Tx	Tümörün değerlendirilemediği veya malign hücrelerin balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile belirlenemediği durumlar
T0	Primer tümör belirtisi yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Normal akciğer veya viseral plevra ile çevrili, en geniş çapı ≤ 3 cm tümör
T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom
T1a	Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm
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 şu özelliklere sahip tümör • Karinaya uzaklığına veya invazyonuna bakılmaksızın ana bronş invazyonu • Viseral plevra invazyonu • Hiler bölgeye uzanan atelektazi (lobar veya total) veya obstrüktif pnömoni
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 aynı lobda tümör nodülü(leri) olması veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon: • Göğüs duvarı invazyonu (parietal plevra ve superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikard
T4	Tümörün geniş çapı >7 cm veya ipsilateral farklı bir lobda tümör nodülü(leri) olması veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon: • Diyafram, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra korpusu ve karina • Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül/nodüller
Bölgesel lenf nodları(N)	
Nx	Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf nodlarına ve/veya intrapulmoner lenf nodlarına metastaz veya direkt invazyon
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarına metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya
Uzak metastaz (M)	
M0	Metastaz yok
M1	Metastaz var
M1a	Karşı taraf akciğerde ayrı tümör nodülü(leri), plevral veya perikardiyal nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon
M1b	Tek ekstratorasik organda, tek metastaz
M1c	Tek veya birçok organda birden çok metastaz

2.1.6. Akciğerlerin Anatomisi

Akciğerler yaklaşık ağırlıkları 1200-1300 gram olan üst kısımları alt kısımlarına göre daha dar büyüklükleri birbirinden farklı, sağ ve sol olmak üzere iki parçadan oluşan solunum organlarıdır. Sağ akciğer üst, orta ve alt lob olmak üzere üç parçadan sol akciğer ise üst lob ve alt lob olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır (Semiz, 1990).

Göğüs boşluğunda sağda ve solda bulunan plevral kese içerisinde yer alırlar ve içinde kalbinde yer aldığı mediastinum yerleşimli yapılarıyla birbirinden ayrılırlar. Hafif iç bükey olan akciğerin mediastinal yüzeyinde bronşlar, sinirler ve pulmoner damarların geçtiği hilum pulmonis adı verilen dikey bir yarık mevcuttur Akciğer alveolleri ve bronşial ağaç dahil ana bronş ve distalinde yerleşimli tüm solunum sistemi yapıları akciğer içinde yer almaktadır. Akciğerlerin ikisi de dörder yüze sahiptir, alt yüzlerine konkav şekilli basis pulmonis hemen altındaki dış bükey diyafram ile uyum göstermektedir. Apex pulmonis olarak isimlendirilen akciğer üst yüzeyi köprücük kemiği üzerine kadar uzanır. Kaburgaların iç yüzü ile temasta olan facies costalis akciğerin en geniş yüzüdür. Akciğer lobları pulmoner alveolleri bulunduran lobüllerden oluşmaktadır. Akciğerde gaz değişiminin olduğu fonksiyonel birimler pulmoner alveollerdir (Kılıç, 2016).

Bronş ağacı trachea ardından bifurcatio trachea buradan iki ana bronş ile sağ ve sol akciğere dağılır. Ana bronşlar lobar bronşlarla devam eder ardından segmental bronşlar ve devamında küçük tübüller bulunmaktadır. Segmental bronşların beraberinde devam eden bir arter dalı ve sinirler bulunmaktadır (Kılıç, 2016, Sinnatamby, 2006, Johnson vd., 2005).

Akciğerleri seröz yapıda, çift katlı ve iki yapraklı plevra zarı çevrelemektedir. Plevranın dış yaprağı parietal plevra olarak adlandırılır ve göğüs duvarına yapışıktır. İçteki plevra yaprağı visseral plevra olarak adlandırılır ve akciğerleri çepeçevre sarmış vaziyettedir. Birbirinden ayrılması çok güç olan bu iki plevra yaprağı arasında cavitas pleuralis bulunur ve burada solunumu kolaylaştıran çok az miktarda sıvı bulunmaktadır (Sinnatamby, 2006, Johnson vd., 2005). Plevranın büzülmemesi için plevra yaprakları arasında negatif basınç mevcuttur (Tuncel, 2006).

2.1.7. Pozitron Emisyon Tomografisi / Bilgisayarlı Tomografi (PET/BT)

Kanser hücreleri değişmiş enerji metabolizması sebebiyle normal hücrelere göre yüksek miktarda glukoz tüketmektedir. Pozitron emisyon tomografisi (PET), kanser hücrelerinin bu artmış glukoz tüketimini glukozun radyoaktif işaretli bir türevi olan 2-18F-floro-2-deoksi-D-glukoz (FDG) kullanarak görüntülenmesine yarayan önemli bir görüntüleme yöntemidir. FDG-PET, diğer görüntüleme yöntemleriyle elde edilemeyen ve çeşitli kanser türlerine sahip hastaların tanı ve tedavisinde çok etkili bilgiler sağlamaktadır; ancak bazı kanserlerde düşük FDG alımı, enflamatuvar hücrelerde FDG alımı, tümör morfoljisini tam yansıtamaması ve görüntü kalitesinin düşük olması gibi bazı sınırlamalar ortaya çıkmaktadır. PET kamera ve BT tarayıcısı birleştirilerek yeni geliştirilen bir entegre PET/BT sistemi, aynı pozisyonda hem anatomik hem de fonksiyonel görüntüleme sağlayarak bu dezavantajların üstesinden gelmiştir. FDG kullanan PET ve/veya PET/BT, kanserin tespiti, kötü huylu ve iyi huylu lezyonların farklılaşması, tedaviden önceki kanserin evrelendirilmesi ve kanser tedavisinin değerlendirilmesinde ve ayrıca tedaviden sonraki nüksün belirlenmesinde klinik olarak önemli bilgiler sunmaktadır. Akciğer kanseri, gastrointestinal kanserler, meme kanseri ve malign lenfoma dahil çoğu kanserde PET/BT birçok kanser hastasının tanı ve tedavisinde görüntüleme konusunda yeni standart yaklaşım olmuştur (Endo vd., 2006). Vücutta herhangi bir bölgede meydana gelen FDG tutulum miktarı kantitatif bir değer olan Standart Alım Değeri (SUV) değeri ile ifade edilir. Kanser hücrelerinin glukoz metabolize etme hızları yüksek olduğundan SUV değerleri yüksektir ve bu değer ne kadar yüksekse malignite olma olasılığı o kadar yüksektir (Lardinois vd., 2003).

Akciğerin yüksek glukoz kullanımının bulunmaması kanserleşme durumunda artmış FDG tutulumuyla tümörün tespitinde PET/BT görüntülemeye önemli avantaj sağlamaktadır. Normalde yüksek glukoz metabolizmasına sahip beyin ve kalp kasında FDG tutulumu doğru bilgi elde etmede güçlükler yaratmaktadır. Ayrıca mesane ve böbrekte uygulanan ilacın atımıyla ilgili artmış FDG tutulumu malignite değerlendirmesinde güçlükler ortaya koymaktadır. (Lardinois vd., 2003). Akciğer kanserinde akciğerin dışında kalan bölgelerle meydana gelen metastaz ve yeni oluşumlarla ilgili malignite belirlenmesi diğer görüntüleme ve invaziv yöntemler ile birlikte incelenmesi gerekmektedir (Enön ve Güngör, 2005)

2.1.8. Akciger kanserinde sürücü onkogenler

Kanserlerde tümörün moleküler patolojisine dayanarak hedefe yönelik tedavi uygulamaları son zamanlarda önem kazanmaya başlamıştır. Her kanser alt tipinin belirli bazı genetik değişiklik yada değişikliklerle ile tetiklenmesi bu markerlere karşı hedeflenmiş tedavilerin özelleşmesi tedavide başarı şansını önemli ölçüde artırmaktadır (Tuononen vd., 2013). Özellikle proto-onkogenlerde meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan onkogenlerin ürettiği onko-proteinleri inhibe etmekte kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikolar yardımıyla tümörün progresyonunun durdurulması ve baskılanan klonun ortadan kalkmasıyla tümör yükünde azalma oluşmakta ve tedavi olumlu yönde ilerlemektedir (Costa vd., 2007). Buna en iyi örnek akciğer adenokarsinomlarında gözlemlenen *EGFR* geninde meydana gelen nokta mutasyonları, küçük delesyon ve insersiyonlar sonucu oluşan aşırı aktif Reseptör Tirozin Kinazın (RTK) Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKIs) ile baskılanarak proliferasyonun durdurulması olarak gösterilmektedir (Costa vd., 2007). Yine akciğer adenokarsinomları ve diğer birçok kanserde gözlemlenen v-Kiras2 Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu (*KRAS*) gen mutasyonları sıklıkla gözlenmekte fakat oluşan onkoproteine karşı henüz etkin bir baskılayıcı bulunmaması sebebiyle prognoz kötü yönde ilerlemektedir (Riely vd., 2009).

Genetik değişiklikler akciğer kanserinin büyük çoğunluğunu oluşturan KHDAK tipinde *EGFR*, *HER2*, *ROS1* ve *ALK* gibi reseptör tirozin kinaz genlerinde, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *MEK1* gibi map kinaz yolağı genlerinde ve *PIK3CA*, *AKT1* gibi *PI3K/Akt* yolağının bazı genlerinde özellikle kendini göstermekte karsinogenezi tetiklemektedir.

Bir reseptör tirozin kinaz olarak görev yapan *EGFR* hücrenin çoğalma farklılaşma ve apoptoz gibi temel görevlerini düzenleyen birçok sinyal yolağını regüle etmekte ve *EGFR*'de meydana gelen anormallikler kanser etkeni olarak gösterilmektedir (Tuononen vd., 2013). *EGFR* geninde oluşan sürücü mutasyonlar KHDAK tanısı konulan Kafkas popülasyonunun %14'ünde bulunabilirken, Asya popülasyonlarında %38,4 gibi daha yüksek bir oranda gözlenmektedir. Kadın, sigara içmeyen ve adenokarsinom tanısı alan hastaların *EGFR* mutasyonunu taşıma olasılıkları daha yüksektir, ancak bu özellikleri olmayan hastalarda da bulunabilir (Zhang vd., 2016). *EGFR* kinaz domaini mutasyonları, tirozin kinaz domaininin bir bölümünü kodlayan ve enzimin ATP bağlayıcı cebinin etrafına kümelenmiş olan 18-21 ekzonunda bulunur.

EGFR'deki kinaz domaini mutasyonları, genellikle arttırılmış kinaz aktivitesiyle sonuçlanan aktif mutasyonlar olarak adlandırılır. En yaygın gözlenen mutasyonlar ekzon 19 delesyonu ve ekzon 21 L858R mutasyonudur (Kosaka vd., 2004). EGFR'nin aktivitesi TKIs ile baskılanmakta, böylece aşağı yönlü sinyal yolları sinyal iletisini durdurmakta, proapoptotik yolak upregüle olarak apoptotik yolağın aktive olması sağlanmaktadır (Costa vd., 2007).

KHDAK'nde *EGFR* geninin 18. ve 21. ekzonunda meydana gelen çoğu mutasyon TKIs hassasiyetiyle ilişkilendirilirken 19. ve 20. ekzonda meydana gelen insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonları TKIs direnci ile suçlanmaktadır (Sharma vd., 2010, Costa vd., 2007). Ayrıca *EGFR* mutasyonu mevcut olmasa dahi *KRAS* gen mutasyonları EGFR sinyal yolağını ileti almaksızın aktifleştirerek TKIs direncine neden olmaktadır (Riely vd., 2009)

Bir lipid grubu ile hücre zarının sitoplazmik kısmına bağlanan ve monomerik guanozintrifosfat (GTP) bağlayan GTPaz'lardan olan RAS proteinleri dört fonksiyonel gen Kristen RAS A ve B (*KRAS*), Harvey RAS (*HRAS*) ve v-Ras Nöroblastom viral onkogen homologu (*NRAS*) tarafından kodlanmaktadır. Birbirine çok benzer ve korunmuş olan RAS proteinleri birçok hücrede çoğalmanın yanısıra dolaylı olarak hücre döngüsü kontrolünde de görev almaktadır. Ras proteinleri Guanozindifosfat (GDP) bağlı iken inaktiftir ve GDP'nin ayrılarak GTP'nin bağlanmasıyla aktive olmaktadır. RAS genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan RAS onko-proteinleri GTP'den ayıramamakta sürekli aktif halde kalması sonucu karsinogenez tetiklenmektedir. RAS genlerinde meydana gelen mutasyonlar insan kanserlerinin en sık gözlemlenen genetik değişikliklerindendir (Nanda vd., 2010, Watzinger ve Lion, 1999, Capon vd., 1983, Schubbert vd., 2007).

RAS tarafından aşağı yönlü aktive edilen bir serin-treonin kinaz olan RAF; kanser gelişiminde merkezi öneme sahip ERK yolağının bir üyesidir (Matallanas vd., 2011). v-Raf Murine sarkoma viral onkogen homologu (BRAF)'ın mutasyona uğraması RAS-ERK sinyal iletisinde hiperaktivasyona yol açmakta böylece hücre sağkalımı ve çoğalması artış göstermektedir (Brose vd., 2002, Naoki vd., 2002). BRAF mutasyonları akciğer karsinomlarının da dahil olduğu birçok tümörde gösterilmiştir (Brandao vd., 2012, Kobayashi vd., 2011, Matallanas vd., 2011).

KHDAK hastalarında EGFR mutasyonu çoğunlukla kadınlarda (%37,5) gözlenirken erkeklerde (%13) daha az oranında gözlenmektedir. Tütün ürünü kullanmayanlarda

%50,8 gibi yüksek bir oranda gözlenirken, sigara kullananlarda bu oran %9 larda kalmaktadır. Asyalı olmayan kökene sahip hastalarda %7,9 oranında gözlenirken, asyalılarda %29,1 oranı gözlenmektedir. Diğer histolojik alt tipler sadece %2,3 gibi oranda EGFR mutasyonu gösterirken, adenokarsinomlu olgularda bu oran %31,3 seviyelerindedir. KHDAK olgularının yaklaşık %15-30'unda gözlenen KRAS mutasyonu EGFR mutasyonunun tersine daha çok kafkas kökenlilerde ve sigara kullanıcılarında gözlenirken, EGFR mutasyonlarına benzer şekilde adenokarsinom alt tipinde yoğunlukla gözlenmektedir (Brandao vd., 2012). Çoğunlukla sigara kullanıcısı hastalarda gözlemlenen BRAF mutasyonu akciğer kanserinde yaklaşık %3 oranında tespit edilmektedir (Brose vd., 2002, Davies vd., 2002, Marchetti vd., 2011, Paik vd., 2011). EGFR, KRAS ve BRAF mutasyonları birbirini dışlayan mutasyonlar olarak gösterilmektedir (Paik vd., 2011).

Fosfatidil inozitol-3-kinaz katalitik alfa polipeptid (PIK3CA), 21 ekzon içeren ve fosfatidil inozitol kinaz (PI3K)'ın katalitik alt ünitesini kodlayan bir gen olarak gösterilmektedir (Liu ve Roberts, 2006). Büyüme faktörleri tarafından uyarılan reseptör tirozin kinazlar PIK3K'ı aktive etmekte aktive olan PIK3K hücrede birçok fonksiyonu düzenleyen sinyal yollarında görev yapan ve ikincil mesajcı olan Fosfatidil inositol trifosfatı (PIP3) üretmektedir (Zhao ve Vogt, 2008). Meme, akciğer, kolon, mide, beyin ve karaciğer kanseri gibi birçok kanserde bu gene ait delesyonlar, amplifikasyonlar ve çoğunlukla nokta mutasyonları gösterilmektedir (Karakas vd., 2006). Mutasyonlarla enzimatik fonksiyonlarda artış oluşmakta böylece sebepsiz aktif hale gelen AKT sinyal iletimi artmış onkojenik aktiviteye sebep olmaktadır (Gardefors, 2007). Bu durum mutasyona uğramış PIK3CA geninin birçok kanser tipinde onkojenik aktivite oluşturmaya sebep olmaktadır (Zhao ve Vogt, 2008). PIK3CA mutasyonları sebebiyle sürekli aktif konumda kalan PI3K/Akt yolağı EGFR'a karşı kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinde etkisizleşme ve ilaç direncine sebep olma ile ilişkilendirilmektedir.

Akciğer adenokarsinomlarının %40-55'inde birbirini dışlayan en az bir sürücü mutasyon olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (Dacic S., 2011, Hirsch vd., 2010, Cheng vd., 2010). Eskiden beri EGFR ve KRAS mutasyonlarının birbirini dışladığı bilinmektedir ve *ALK*, *AKT1*, *BRAF*, *HER2*, *PIK3CA* ve *ROS-1*'in birbirini dışlayan diğer mutasyonlardır. Ancar akciğer adenokarsinomlarının %40-45'inde sürücü genetik değişiklikler henüz bilinmemektedir.

2.2. Likit biyopsi

Son on yılda, tümörün moleküler yapısına dayalı “kişiselleştirilmiş” veya “sınıflandırılmış” tedavi ileri evre KHDAK olgularında rutin klinik uygulamalara dahil olmuştur. Günümüzde tümör dokusundan hedefe yönelik tedavi biyobelirteçlerinin tespiti zorunlu hale gelmiştir. Ancak bazı biyolojik ve teknolojik zorluklarla karşı karşıyadır (Ilié ve Hofman, 2016). İlk olarak aynı hastadan elde edilen çoklu tümör numunelerinin kapsamlı karakterizasyonu, aynı tümördeki farklı bölgeler (mekansal heterojenite) arasında ve aynı hastadaki primer tümör ile lokal veya uzak nüksler arasında (zamansal heterojenite) intratümör heterojenitenin gösterilmesi önemli bir zorluk olarak gösterilmektedir (Gerlinger vd., 2012). Dahası, son zamanlarda yapılan çalışmalar, tümör içi tedaviye dirençli alt klonların ortaya çıkmasıyla primer tümörün zaman içindeki dinamik değişimleri gösterilmiştir (Bedard vd., 2013). İnter ve intratumoral heterojenite, akciğer onkolojisinde tedavi yönlendirmede önemli bir zorluk teşkil etmektedir ve bu sebeple tümör biyopsisi tümörün moleküler yapısını yansıtmakta yetersiz kalmaktadır (Bedard vd., 2013). İkincisi, tümörün tüm moleküler yapısının elde edilmesi tümöre her zaman erişimin kolay olmaması sebebiyle zorluklar içermektedir. Tanıda ve tedavi boyunca doku elde etmenin invazif prosedürler gerektirmesi ve klinik komplikasyon oranının artması tümörün erişilebilirliğini kısıtlamaktadır (Sholl vd., 2016). Bununla birlikte ileri evre KHDAK hastalarının birçoğunda ortaya çıkan düşük performans durumu, rahatsız edici girişimsel biyopsi işlemlerinin uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır (Sholl vd., 2016). Ayrıca elde edilen doku miktarının artan biyobelirteç ve diğer test taleplerine karşı yetersiz kalması başka bir zorluk olarak ortaya çıkmaktadır. İleri evre KHDAK hastalarının %80’inden küçük miktarda doku alınabilmekte bu da ek testler uygulama şansını kısıtlamaktadır hatta olguların %31’inde dokuya ulaşmak mümkün olmamaktadır (Wong vd., 2014). Doku temin edilebilen olgularda formalin fiksasyonu gibi koruma yöntemleri DNA’da C>T / G>A dönüşümlerine sebep olarak %1-25 gibi bir oranda allel frekansı değişimlerine yol açmakta bu da moleküler testler için yanlış pozitiflik ihtimalini artırmaktadır (Wong vd., 2014). Yeni nesil dizileme (NGS) teknikleri gelişmiş olsa da bu durum tekniğe sınırlamalar oluşturmaktadır. Son olarak, doku biyopsileri hasta bakım maliyetlerini artırdığı gibi sonuç alma süresinin uzun olması önemli dezavantajlar ortaya koymaktadır. Doku biyopsisi kullanımındaki bu

sınırlamalar tümör genetiği ve dinamiklerini gözlemlemek için alternatifler aranmasına yol açmıştır (Ilié ve Hofman, 2016).

Her ne kadar tümör dokusu, klinik moleküler analizler için hala altın standart kaynak olarak konumunu korusa da, tümöre ait materyalin kan dolaşımından toplanabilmesi tümör biyopsisinin sebep olduğu olumsuzlukları bertaraf edebilen çekici bir alternatif olarak önemini artırmaktadır. Kan örneğinden kansere ait materyallerin toplanarak teşhisde kullanılması “sıvı biyopsi” olarak tanımlanmaktadır (Ilié ve Hofman, 2016).

Sıvı biyopsi ile değerlendirilebilecek birkaç tümör materyali kaynağı vardır: dolaşımında hücre içermeyen veya kompleksleşmiş nükleik asitleri içeren cfDNA (cell-free DNA), bunun alt kümesi olan dolaşımdaki tümör DNA’sı (ctDNA) ve hücre içermeyen RNA (cfRNA) ve bir diğeri dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC)’dir (Ilie vd., 2014). cfDNA, hücreler veya hücre fragmanları içermeyen, apoptotik ve nekrotik tümör hücreleri ve normal hücrelerinden kan dolaşımına salınan küçük DNA parçalarından oluşmaktadır. Tanımlanmış onkojenik mutasyonlar, ctDNA’nın varlığını ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (Diaz ve Bardelli 2014). cfDNA, idrar, tükürük veya beyin omurilik sıvısı gibi diğer vücut sıvılarında tespit edilebilmektedir (Ilie vd., 2014). CTC’ler kandan izole edilebilen malign özelliklere sahip sağlam, canlı hematolojik olmayan hücreleri temsil etmektedir (Ilie vd., 2014). CTC’ler, kanserin hematojen yayılımı sırasında kan dolaşımına salınır ve tek veya kümeler halinde bulunur. Tümör hücreleri, dolaşımdaki kodlamayan RNA’lar (örn., MikroRNA’lar, küçük nükleolar RNA’lar, PIWI-etkileşimli RNAlar ve küçük kodlayıcı olmayan RNAlar) dahil olmak üzere kandaki RNazlara güçlü şekilde direnç gösteren eksozomlarla zenginleştirilmiş çeşitli cfRNA türlerini kan dolaşımına aktif olarak salgılamaktadırlar. Özellikle, trombositler ayrıca serbest nükleik asitleri sekrete edebilir ve bu nedenle tümör hücreleri tarafından salınan alternatif bir cfRNA kaynağı olarak işlev görebilmektedir (Nilsson vd., 2016).

Yaklaşık 50 milyon malign hücre içeren tümörler kanda ctDNA tespiti için yeterli DNA salgılayabilirken PET/BT görüntüleme yöntemiyle genellikle ancak 7 ila 10 mm boyutundan küçük olmayan ve ~ 1 milyar hücre içeren tümörleri tespit edebilmektedir (Diaz vd., 2012, Sholl vd., 2016). Hücre yakalama cihazlarındaki son gelişmeler, plazma izolasyon teknikleri ve son derece hassas sekans bazlı yöntemler KHDAK’de sıvı biyopsinin uygulanabilir olmasını sağlamaktadır (Sholl vd., 2016, Diaz ve Bardelli 2014).

Gereç ve Yöntem

3.1 Olguların toplanması

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bilimdalı'na 2017 ve 2019 yılları arasında başvurmuş ve akciğer adenokarsinomu tanısı almış 87 olgu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 13.10.2016 tarihli ve 14 nolu kararı ile araştırmaya dahil edilmiştir. Ölüm, tedaviyi ret ve başka merkezde tedavi tercihi sebebiyle 36 olgudan sadece tedavi öncesi örneği temin edilebilmiş ve bu olgular araştırmadan çıkarılmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası örnekleri temin edilebilen 11'i kadın ve 41'i erkek toplam 52 olgu ile araştırma gerçekleştirilmiştir. Her olgudan tedavi öncesi bir kez ve tedavi sonrası bir kez olmak üzere K2-EDTA içerikli tam kan tüplerine 10 ml periferik kan alınmış, ardından 1100xg'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma kısmı ayrılmış ve bu örneklerden 2 saat içinde cfDNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2 cfDNA izolasyonu uygulama protokolü

Elde edilen plazma örneklerinden cobas cfDNA Sample Preparation Kit (Roche) kullanılarak cfDNA izole edilmiştir. cfDNA izolasyon kiti içerisinde bulunan WB II ve WB I yıkama tamponları ayrıca PK proteinaz K solüsyonları izolasyon öncesi hazırlanmıştır. Liyofilize haldeki PK 4,5 ml steril su eklenerek sulandırılmıştır. Su ile çözdürülmüş olan PK solüsyonu her örnek için ayrı ayrı kullanılmak üzere 260 µl'lik hacimlerde 0,5 ml'lik ependorf tüplere aktararak -20 °C'de saklanmak üzere buz dolabına kaldırılmıştır. Yıkama tamponu I (WB I) içerisine 15 ml saf etil alkol eklenerek hazırlanmıştır. Yıkama tamponu II (WB II) içerisine 50 ml saf etil alkol eklenerek hazırlanmıştır. Sulandırılmış PK dışındaki tüm izolasyon komponentleri oda ısısında muhafaza edilmiştir. Ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra izolasyon kit içeriği bitene değin gelen örnekler izole edilmiştir. Yeni izolasyon kiti açılımı yapıldığında ön hazırlıklar tekrar uygulanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen olgulardan alınan ve hemolize uğramamış olduğu tespit edilen periferik kan örnekleri 1100xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş en üst kısımdan çökeltileri hareket ettirmeyecek şekilde 2 ml plazma kısmı çekilerek izolasyon protokolüne geçilmiştir.

- **cfDNA izolasyon protokolü** (her bir 2ml plazma örneği için)

1. 2 ml plazma örneği 15 ml konikal tüp(falcon) içine alınmış üzerine 2 ml DNA PBB buffer ve 250 µl Proteinaz K eklenmiştir. 3-5 defa alt üst ederek karıştırılmıştır.
2. Karışım 30 dakika oda ısında inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sona ermeden önce kitin içinden çıkan HPEA FT tüpü ve 3 adet toplama tüp (CT) isim veya numara ile etiketlenmiştir.
4. İnkübasyon işlemi sonrası karışımın üzerine 500 µl isopropil alkol eklenmiş ardından 3-5 defa alt üst edilmiştir.
5. Tüm karışım cfDNA izolasyonu için özel üretilmiş HPEA FT tüpüne aktarılmıştır (Resim 1).



Resim 1: HPEA FT falkon tüp

6. Ağız sıkıca kapatılan HEPA FT tüpü 5 dakika 4000xg'de santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonrası HEPA FT tüpü içerisindeki filtre çıkarılarak toplama tüpüne aktarılmıştır. Geriye kalan kısım atılmıştır.
8. Filtre üzerine 500 µl WB I eklenip 8000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

9. Toplama tüpü atılmış ve filtre yeni toplama tüpüne aktarılmıştır.
10. Filtre üzerine 500 µl WB II eklenipve 8000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Toplama tüpü atılmış ve filtre yeni toplama tüpüne aktarılmıştır.
12. Herhangi bir kimyasal eklenmeksizin 16000xg'de 2 dakika süresince boş santrifüj gerçekleştirilmiştir.
13. Boş santrifüj sonrası filtre etiketlendirilmiş 1.5 ml'lik steril ependorfa aktarılmıştır.
14. Filtre üzerine 100 µl DNA EB Elution Buffer eklenmiştir.
15. Oda ısısında 5 dakikalık inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
16. Inkübasyon sonrası 1 dakika 8000xg'de santrifüj edilmiştir.
17. Filtreli tüp atılmış içerisinde cfDNA bulunan ependorf tüpün ağzı iyice kapatılarak -80 °C'de mutasyon deteksiyon çalışması yapılana dek saklanmıştır.
18. Nanodrop 2000 cihazında ölçümleri yapılan ve 0,2-1 ng/µl cfDNA içeren örnekler çalışmaya alınmıştır.

3.3 Onkogen mutasyonların belirlenmesi

Elde edilen cfDNA örneklerinde *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* ve *PIK3CA* onkogenlerinde sık gözlemlenen 123 mutasyon tümöre özgü mutasyonları yüksek seçicilikte ayırt edebilen Allel Spesifik PCR (AS-PCR) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

- **Allel Spesifik PCR (AS-PCR)**

Allel Spesifik PCR yönteminde hedeflenen her mutasyon için seçici oligonükleotit problemleri kullanılmaktadır; bunlar, işaretli floresans haberci (reporter) boya yanı sıra bozulmamış problemlerden gelen floresan ışınları absorbe eden bir söndürücü (quencher) molekülü içermektedir. Her amplifikasyon döngüsünde, tamamlayıcı prob, tek sarmallı DNA ampikonuna bağlanır ve daha sonra DNA polimerazının nükleaz aktivitesi ile bağlanmış olduğu DNA dizisinden ayrılır bu durum söndürücüyü etkisiz hale dönüştürerek işaretli floresans haberci boyanın ışıma yapmasına neden olur, bu sayede floresan ışıma karakteristik bir dalga boyunda ölçülebilir. Her döngü ile ışıma miktarı giderek artar yeterli yoğunlukta oluşan ışıma artışı ile örneğe ait devir eşiği (Ct) değeri belirlenmiş olur. Test tarafından hedeflenen mutasyonları etiketlemek için üç farklı haberci boya kullanılsa da, yedi farklı hedefinin amplifikasyonu bağımsız

olarak tespit edilmektedir. Böylece daha az reaksiyon gerçekleştirerek daha fazla sonuç elde edilmektedir.

AS-PCR primerler sayesinde spesifik olarak yabanıl tip dizilerden ve / veya diğer insan genomik DNA'sından ziyade hedeflenen mutant diziler çoğaltılabilmektedir. Testlerimizde üç ayrı kuyucukta reaksiyon gerçekleştiren üç ana karışım reaktifi kullanılmaktadır. Bu ana karışım reaktiflerinin her biri deoksiüridin trifosfat içerir. Böylece muhtemel kontaminasyonlarla ilk döngüde ortaya çıkan ampliconların timidin değil de deoksiüridin içermelerini sağlamaktadır. Karışım ayrıca, uracil-N-glycosylase enzimi (UNG) içermektedir, bu enzim ilk döngü boyunca kalan deoksiüridin içerikli DNA zincirlerini yıkar; fakat timidin içerikli DNA zincirlerini etkilemez. UNG 55°C'da inaktive edilir ve bu nedenle aktivitesi, ilk PCR denatürasyon aşamasından sonra ortadan kaldırılmış olur; böylece yeni sentezlenen hedef ampliconu tahrip etmez.

Kullanıcı arayüzleri ve çekirdek yazılım motorlarını sağlayan cobas 4800 sistem yazılımı otomatik amplifikasyon ve tespit sistemlerini kontrol eder ve cobas 4800 analizörü bu verileri doğrular. Hedeflenen mutasyon dizilerinin çoğaltılması, ayrı optik kanallarda karakteristik dalga boylarında floresans ölçülerek, üç reaksiyon için bağımsız olarak tespit edilir. Termal çalıştırma tamamlandığında, yazılım ham verileri özel analiz algoritmaları kullanarak işler, kontrollerin geçerliliğini değerlendirir ve devir eşiği (Ct) ve göreceli Ct değerlerini temel alan teste özgü sonuçların yorumlama mantığını kullanarak sonuçları belirlemektedir

- **EGFR mutasyonlarının belirlenmesi**

EGFR onkogeninde gözlemlenen 42 ayrı mutasyon cobas EGFR Mutation Test v2 (Roche) ticari kiti kullanılarak araştırılmıştır. Araştırılan mutasyonlar tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Araştırılan *EGFR* geni mutasyonları

Ekzon	EGFR mutasyon grubu	EGFR nükleik asit sekansı	KOZMİK ID
Ekzon 18	G719X	2156G>C	6239
		2155G>A	6252
		2155G>T	6253
Ekzon 19	Ex19Del	2240_2251del12	6210
		2239_2247del9	6218
		2238_2255del18	6220
		2235_2249del15	6223
		2236_2250del15	6225
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2237_2254del18	12367
		2240_2254del15	12369
		2240_2257del18	12370
		2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2251>C	12383
		2237_2255>T	12384
		2235_2255>AAT	12385
		2237_2252>T	12386
		2239_2258>CA	12387
		2239_2256>CAA	12403
		2237_2253>TTGCT	12416
		2238_2252>GCA	12419
		2238_2248>GC	12422
		2237_2251del15	12678
		2236_2253del18	12728
		2235_2248>AATTC	13550
		2235_2252>AAT	13551
		2235_2251>AATTC	13552
		2253_2276del24	13556
		2237_2257>TCT	18427
		2238_2252del15	23571
		2233_2247del15	26038
Ekzon 20	S768I	2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	6240
	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9GCGTGGACA	13428
Ekzon 21	L858R	2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	12429
	L861Q	2582T>A	6213

cobas EGFR Mutation Test v2 kiti içerisinde MMX 1, MMX 2 ve MMX 3 olmak üzere üç ayrı reaksiyon karışımı, MGAC, Sample diluent ve MC pozitif kontrol tüpleri hazır şekilde çıkmaktadır. Örnek sayısına göre üç ayrı karışım tablo 4’te gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 4: EGFR çalışma karışımının hazırlanması

		Örnek sayısı *									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 µL	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 µL	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Herbir çalışma MMX'i için toplam hacim (µL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Hacim hesaplaması örnek sayısı + 2 kontrol + 1 fazla olarak belirlenmektedir.

Hazırlanan 3 ayrı karışım cobas 4800 System Microwell Plate (AD-Plate)'e her bir kuyucukta 25 µl karışım olacak şekilde pipetlenmiştir. Örnek ve kontrollerin pipetlenmesi tablo 5'teki A/01 kuyucuğuna, A/02 kuyucuğuna ve A/03 kuyucuğuna 25'er µl Mutant kontrol (MC), B/01 kuyucuğuna, B/02 kuyucuğuna, B/03 kuyucuğuna 25'er µl sample diluent (NEG), C/01 kuyucuğuna, C/02 kuyucuğuna, C/03 kuyucuğuna 25'er µl olgu cfDNA'sı ve geri kalan kuyucuklara sıralı şekilde olgu cfDNA'ları (S1, S2...) yüklenmiştir.

Tablo 5: EGFR mikslerinin AD-Plate yükleme pozisyonları

Row / Column	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3 v2	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3 v2	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3 v2	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3 v2
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3 v2	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3 v2	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3 v2	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3 v2
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3 v2	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3 v2	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3 v2	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3 v2
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3 v2	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3 v2	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3 v2	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3 v2
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3 v2	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3 v2	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3 v2	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3 v2
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3 v2	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3 v2	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3 v2	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3 v2
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3 v2	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3 v2	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3 v2	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3 v2
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3 v2	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3 v2	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3 v2	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3 v2

Yükleme işlemi ardından AD-Plate tüm kuyucukların üzeri ışık geçirgen seal ile hava teması olmayacak şekilde kapatılması ardından 2000xg'de 2 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Son olarak cobas z 480 cihazı açılıp cobas 4800 software başlatılmış AD-Plate cihaza yerleştirilip EGFR Plasma PCR protokolü seçilerek çalışma başlatılmıştır. Çalışma sonunda tüm olgularda mevcut mutasyonlar Semikantitatif değerleri (SQI) ile birlikte programdan alınarak kaydedilmiştir.

- **KRAS mutasyonlarının belirlenmesi**

KRAS onkogeninde sık gözlemlenen 28 mutasyon cobas KRAS Mutation Test v2 (LSR) (Roche) ticari kiti kullanılarak araştırılmıştır. Araştırılan mutasyonlar tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6: Araştırılan KRAS geni mutasyonları

Ekzon	KRAS mutasyon grubu	Mutasyon	Nükleotid değişimi	Aminoasit değişimi
Ekzon 2	G12X	G12A	c.35G>C	p.Gly12Ala
		G12C	c.34G>T	p.Gly12Cys
		G12D	c.35G>A	p.Gly12Asp
		G12R	c.34G>C	p.Gly12Arg
		G12S	c.34G>A	p.Gly12Ser
		G12V	c.35G>T	p.Gly12Val
	G13X	G13A	c.38G>C	p.Gly13Ala
		G13C	c.37G>T	p.Gly13Cys
		G13D	c.38G>A	p.Gly13Asp
		G13R	c.37G>C	p.Gly13Arg
		G13S	c.37G>A	p.Gly13Ser
		G13V	c.38G>T	p.Gly13Val
Ekzon 3	A59X	A59E	c.176C>A	p.Ala59Glu
		A59G	c.176C>G	p.Ala59Gly
		A59S	c.175G>T	p.Ala59Ser
		A59T	c.175G>A	p.Ala59Thr
	Q61X	Q61E	c.181C>G	p.Gln61Glu
		Q61Hc	c.183A>C	p.Gln61His
		Q61Ht	c.183A>T	p.Gln61His
		Q61K	c.181C>A	p.Gln61Lys
		Q61L	c.182A>T	p.Gln61Leu
		Q61P	c.182A>C	p.Gln61Pro
		Q61R	c.182A>G	p.Gln61Arg
Ekzon 4	K117X	K117Nc	c.351A>C	p.Lys117Asn
		K117Nt	c.351A>T	p.Lys117Asn
	A146X	A146P	c.436G>C	p.Ala146Pro
		A146T	c.436G>A	p.Ala146Thr
		A146V	c.437C>T	p.Ala146Val

cobas KRAS Mutation Test v2 (LSR) kiti içerisinde MMX-1, MMX-2 ve MMX-3 olmak üzere üç ayrı reaksiyon karışımı, MgAc, Sample diluent ve MC pozitif kontrol tüpleri hazır şekilde çıkmaktadır. Örnek sayısına göre üç ayrı miks tablo 7’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 7: KRAS çalışma karışımının hazırlanması

		Örnek sayısı *									
		1	2	3	6	9	12	15	18	21	24
MMX	20 µL	80	100	120	180	240	300	360	420	480	540
MgAc	7 µL	28	35	42	63	84	105	126	147	168	189
Herbir çalışma MMX'i için toplam hacim (µl)		108	135	162	243	324	405	486	567	648	729

* Hacim hesaplaması örnek sayısı + 2 kontrol + 1 fazla hacim olarak belirlenmektedir.

Hazırlanan 3 ayrı miks cobas 4800 System Microwell Plate (AD-Plate)'e her bir kuyucukta 25 µl miks olacak şekilde dağıtılmıştır. Örnek ve kontroller tablo 8'deki A/01 kuyucuğuna, A/02 kuyucuğuna ve A/03 kuyucuğuna 25'er µl Mutant kontrol (MC), B/01 kuyucuğuna, B/02 kuyucuğuna, B/03 kuyucuğuna 25'er µl sample diluent (NEG), C/01 kuyucuğuna, C/02 kuyucuğuna, C/03 kuyucuğuna 25'er µl olgu cfDNA'sı ve geri kalan kuyucuklara sıralı şekilde olgu cfDNA'ları (Sample 1, Sample 2, ...) yüklenmiştir.

Tablo 8: KRAS mikslarının AD-Plate yükleme pozisyonları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Mutant Control MMx1	Mutant Control MMx2	Mutant Control MMx3	Sample 7 MMx1	Sample 7 MMx2	Sample 7 MMx3	Sample 15 MMx1	Sample 15 MMx2	Sample 15 MMx3	Sample 23 MMx1	Sample 23 MMx2	Sample 23 MMx3
B	Specimen Diluent MMx1	Specimen Diluent MMx2	Specimen Diluent MMx3	Sample 8 MMx1	Sample 8 MMx2	Sample 8 MMx3	Sample 16 MMx1	Sample 16 MMx2	Sample 16 MMx3	Sample 24 MMx1	Sample 24 MMx2	Sample 24 MMx3
C	Sample 1 MMx1	Sample 1 MMx2	Sample 1 MMx3	Sample 9 MMx1	Sample 9 MMx2	Sample 9 MMx3	Sample 17 MMx1	Sample 17 MMx2	Sample 17 MMx3	Sample 25 MMx1	Sample 25 MMx2	Sample 25 MMx3
D	Sample 2 MMx1	Sample 2 MMx2	Sample 2 MMx3	Sample 10 MMx1	Sample 10 MMx2	Sample 10 MMx3	Sample 18 MMx1	Sample 18 MMx2	Sample 18 MMx3	Sample 26 MMx1	Sample 26 MMx2	Sample 26 MMx3
E	Sample 3 MMx1	Sample 3 MMx2	Sample 3 MMx3	Sample 11 MMx1	Sample 11 MMx2	Sample 11 MMx3	Sample 19 MMx1	Sample 19 MMx2	Sample 19 MMx3	Sample 27 MMx1	Sample 27 MMx2	Sample 27 MMx3
F	Sample 4 MMx1	Sample 4 MMx2	Sample 4 MMx3	Sample 12 MMx1	Sample 12 MMx2	Sample 12 MMx3	Sample 20 MMx1	Sample 20 MMx2	Sample 20 MMx3	Sample 28 MMx1	Sample 28 MMx2	Sample 28 MMx3
G	Sample 5 MMx1	Sample 5 MMx2	Sample 5 MMx3	Sample 13 MMx1	Sample 13 MMx2	Sample 13 MMx3	Sample 21 MMx1	Sample 21 MMx2	Sample 21 MMx3	Sample 29 MMx1	Sample 29 MMx2	Sample 29 MMx3
H	Sample 6 MMx1	Sample 6 MMx2	Sample 6 MMx3	Sample 14 MMx1	Sample 14 MMx2	Sample 14 MMx3	Sample 22 MMx1	Sample 22 MMx2	Sample 22 MMx3	Sample 30 MMx1	Sample 30 MMx2	Sample 30 MMx3

Yükleme işlemi ardından AD-Plate tüm kuyucukların üzeri ışık geçirgen seal ile hava geçirmeyecek şekilde kapatıldıktan sonra 2000xg'de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. cobas z 480 cihazı açılıp cobas 4800 system User-Defined Workflow

(UDF) software başlatılmış AD-Plate cihaza yerleştirilip AS-PCR_Profile_96w protokolü seçilerek çalışma başlatılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen .ixo uzantılı veri dosyası internet üzerinden tedarikçi firmanın vermiş olduğu analiz linkinden online olarak analiz edilerek tüm olgularda mevcut mutasyonlar Semikantitatif değerleri (SQI) ile birlikte kaydedilmiştir.

- ***BRAF / NRAS* mutasyonlarının belirlenmesi**

BRAF ve *NRAS* onkogenlerinde sık gözlemlenen 36 mutasyon *BRAF*/*NRAS* Mutation Test v2 (LSR) (Roche) ticari kiti kullanılarak araştırılmıştır. Kit içeriği *BRAF* genine ait klinikle ilişkili 11 ayrı mutasyonu (Tablo 10) ve *NRAS* genine ait klinikle ilişkili 25 ayrı mutasyonu (Tablo 9) tespit etmektedir.

Tablo 9: Araştırılan *NRAS* geni mutasyonları

Ekzon	Rapor edilmiş mutasyon	Mutasyon	Nükleotid sekans değişimi
2	G12X	G12A	c.35G>C
2	G12X	G12C	c.34G>T
2	G12X	G12D	c.35G>A
2	G12X	G12R	c.34G>C
2	G12X	G12S	c.34G>A
2	G12X	G12V	c.35G>T
2	G13X	G13A	c.38G>C
2	G13X	G13C	c.37G>T
2	G13X	G13D	c.38G>A
2	G13X	G13R	c.37G>C
2	G13X	G13S	c.37G>A
2	G13X	G13V	c.38G>T
2	A18T	A18T	c.52G>A
3	Q61X	Q61Ht	c.183A>T
3	Q61X	Q61Hc	c.183A>C
3	Q61X	Q61K	c.181C>A
3	Q61X	Q61L	c.182A>T
3	Q61X	Q61P	c.182A>C
3	Q61X	Q61R	c.182A>G
3	Other NRAS Ex3/4	A59D	c.176C>A
3	Other NRAS Ex3/4	A59T	c.175G>A
3	Other NRAS Ex3/4	K117Nc	c.351G>C
3	Other NRAS Ex3/4	K117Nt	c.351G>T
3	Other NRAS Ex3/4	A146T	c.436G>A
3	Other NRAS Ex3/4	A146V	c.437C>T

Tablo 10: Araştırılan *BRAF* geni mutasyonları

Ekzon	Rapor edilmiş mutasyon	Mutasyon	Nükleotid sekans değişimi
11	BRAF Exon 11	G466A	c.1397G>C
11	BRAF Exon 11	G466V	c.1397G>T
11	BRAF Exon 11	G469A	c.1406G>C
11	BRAF Exon 11	G469R	c.1405G>A
11	BRAF Exon 11	G469V	c.1406G>T
15	BRAF V600E/E2/D	V600E	c.1799T>A
15	BRAF V600E/E2/D	V600E2	c.1799_1800TG>AA
15	BRAF V600E/E2/D	V600D	c.1799_1800TG>AT
15	BRAF V600K	V600K	c.1798_1799GT>AA
15	BRAF V600R	V600R	c.1798_1799GT>AG
15	BRAF K601E	K601E	c.1801A>G

BRAF/NRAS Mutation Test (LSR) kiti içerisinde MMX-1, MMX-2 ve MMX-3 olmak üzere üç ayrı reaksiyon karışımı, MgAc, Sample diluent ve MC pozitif kontrol tüpleri hazır şekilde çıkmaktadır. Örnek sayısına göre üç ayrı karışım tablo 11’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 11: BRAF / NRAS çalışma miksi hazırlanması

		Örnek sayısı *									
		1	2	3	6	9	12	15	18	21	24
MMX	20 µL	80	100	120	180	240	300	360	420	480	540
MgAc	6.5 µL	26	32.5	39	58.5	78	97.5	117	136.5	156	175.5
Herbir çalışma MMX’i için toplam hacim (µl)		106	132.5	159	238.5	318	397.5	477	556.5	636	715.5

* Hacim hesaplaması örnek sayısı + 2 kontrol + 1 fazla hacim olarak belirlenmektedir.

Hazırlanan 3 ayrı miks cobas 4800 System Microwell Plate (AD-Plate)’e her bir kuyucukta 25 µl miks olacak şekilde dağıtılmıştır. Örnek ve kontroller; tablo 12’deki A/01 kuyucuğuna, A/02 kuyucuğuna ve A/03 kuyucuğuna 25’er µl Mutant kontrol (MC), B/01 kuyucuğuna, B/02 kuyucuğuna, B/03 kuyucuğuna 25’er µl sample diluent (NEG), C/01 kuyucuğuna, C/02 kuyucuğuna, C/03 kuyucuğuna 25’er µl olgu cfDNA’sı ve geri kalan kuyucuklara sıralı şekilde olgu cfDNA’ları (Sample 1, Sample 2, ...) yüklenmiştir.

Tablo 12: BRAF / NRAS mikslarının AD-Plate yükleme pozisyonları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Mutant Control MMx1	Mutant Control MMx2	Mutant Control MMx3	Sample 7 MMx1	Sample 7 MMx2	Sample 7 MMx3	Sample 15 MMx1	Sample 15 MMx2	Sample 15 MMx3	Sample 23 MMx1	Sample 23 MMx2	Sample 23 MMx3
B	Specimen Diluent MMx1	Specimen Diluent MMx2	Specimen Diluent MMx3	Sample 8 MMx1	Sample 8 MMx2	Sample 8 MMx3	Sample 16 MMx1	Sample 16 MMx2	Sample 16 MMx3	Sample 24 MMx1	Sample 24 MMx2	Sample 24 MMx3
C	Sample 1 MMx1	Sample 1 MMx2	Sample 1 MMx3	Sample 9 MMx1	Sample 9 MMx2	Sample 9 MMx3	Sample 17 MMx1	Sample 17 MMx2	Sample 17 MMx3	Sample 25 MMx1	Sample 25 MMx2	Sample 25 MMx3
D	Sample 2 MMx1	Sample 2 MMx2	Sample 2 MMx3	Sample 10 MMx1	Sample 10 MMx2	Sample 10 MMx3	Sample 18 MMx1	Sample 18 MMx2	Sample 18 MMx3	Sample 26 MMx1	Sample 26 MMx2	Sample 26 MMx3
E	Sample 3 MMx1	Sample 3 MMx2	Sample 3 MMx3	Sample 11 MMx1	Sample 11 MMx2	Sample 11 MMx3	Sample 19 MMx1	Sample 19 MMx2	Sample 19 MMx3	Sample 27 MMx1	Sample 27 MMx2	Sample 27 MMx3
F	Sample 4 MMx1	Sample 4 MMx2	Sample 4 MMx3	Sample 12 MMx1	Sample 12 MMx2	Sample 12 MMx3	Sample 20 MMx1	Sample 20 MMx2	Sample 20 MMx3	Sample 28 MMx1	Sample 28 MMx2	Sample 28 MMx3
G	Sample 5 MMx1	Sample 5 MMx2	Sample 5 MMx3	Sample 13 MMx1	Sample 13 MMx2	Sample 13 MMx3	Sample 21 MMx1	Sample 21 MMx2	Sample 21 MMx3	Sample 29 MMx1	Sample 29 MMx2	Sample 29 MMx3
H	Sample 6 MMx1	Sample 6 MMx2	Sample 6 MMx3	Sample 14 MMx1	Sample 14 MMx2	Sample 14 MMx3	Sample 22 MMx1	Sample 22 MMx2	Sample 22 MMx3	Sample 30 MMx1	Sample 30 MMx2	Sample 30 MMx3

Yükleme işlemi ardından AD-Plate tüm kuyucukların üzeri ışık geçirgen seal ile hava sızdırmayacak şekilde kapatıldıktan sonra 2000xg’de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. cobas z 480 cihazı açılıp cobas 4800 system User-Defined Workflow (UDF) software başlatılmış AD-Plate cihaza yerleştirilip AS-PCR_Profile_96w protokolü seçilerek çalışma başlatılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen .ixo uzantılı veri dosyası internet üzerinden tedarikçi firmanın vermiş olduğu analiz linkinden online olarak analiz edilerek tüm olgularda mevcut mutasyonlar Semikantitatif değerleri (SQI) ile birlikte kaydedilmiştir.

- **PIK3CA mutasyonlarının belirlenmesi**

PIK3CA onkogeninin 1., 4., 7., 9. ve 20. ekzonlarında sık gözlemlenen klinik öneme sahip olduğu bildirilmiş 17 ayrı mutasyon cobas PIK3CA Mutation Test (Roche) ticari kiti kullanılarak araştırılmıştır. Araştırılan mutasyonlar tablo 13’te gösterilmiştir.

Tablo 13: Araştırılan *PIK3CA* geni mutasyonları

Ekzon	Mutasyon	Nükleotid değişimi	Kozmik ID
1	R88Q	263 G>A	746
4	N345K	1035 T>A	754
7	C420R	1258 T>C	757
9	E542K	1624 G>A	760
	E545A	1634 A>C	12458
	E545D	1635 G>T	765
	E545G	1634 A>G	764
	E545K	1633 G>A	763
	Q546E	1636 C>G	6147
	Q546K	1636 C>A	766
	Q546L	1637 A>T	25041
	Q546R	1637 A>G	12459
20	H1047L	3140 A>T	776
	H1047R	3140 A>G	775
	H1047Y	3139 C>T	774
	H1049R	3145 G>C	12597
	M1043I	3129 G>T	773

cobas PIK3CA Mutation Test kiti içerisinde PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2 ve PIK3CA MMX-3 olmak üzere üç ayrı reaksiyon karışımı, MGAC, Sample diluent ve PIK3CA MC pozitif kontrol tüpleri hazır şekilde çıkmaktadır. Örnek sayısına göre üç ayrı karışım tablo 14'te gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 14: PIK3CA çalışma karışımının hazırlanması

		Örnek sayısı *									
		1	2	3	6	9	12	15	18	21	24
MMX	20 µL	80	100	120	180	240	300	360	420	480	540
MgAc	7 µL	28	35	42	63	84	105	126	147	168	189
Herbir çalışma MMX'i için toplam hacim (µl)		108	135	162	243	324	405	486	567	648	729

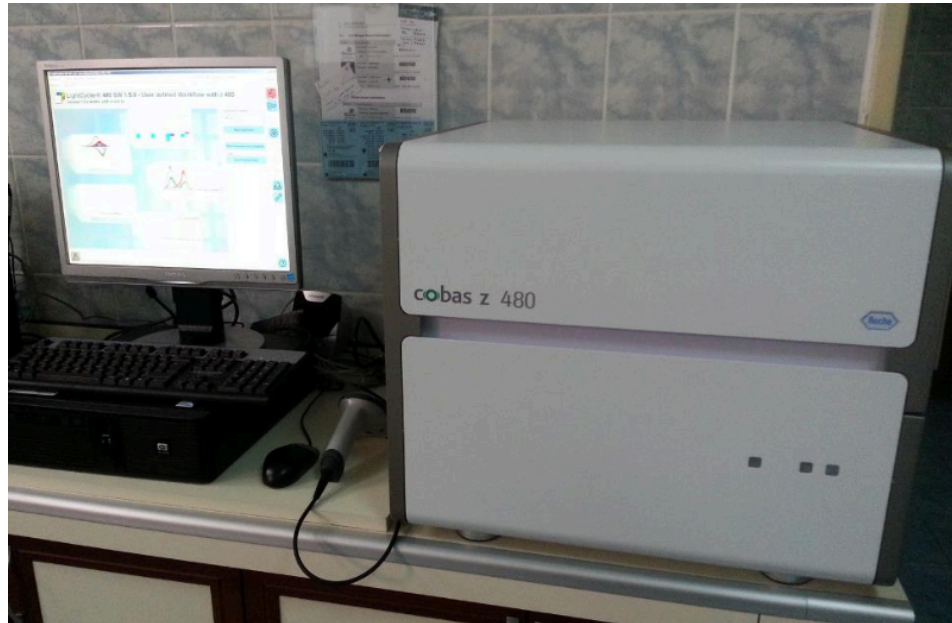
* Hacim hesaplaması örnek sayısı + 2 kontrol + 1 fazla hacim olarak belirlenmektedir.

Hazırlanan 3 ayrı miks cobas 4800 System Microwell Plate (AD-Plate)'e her bir kuyucukta 25 µl miks olacak şekilde dağıtılmıştır. Örnek ve kontroller; tablo 15'teki A/01 kuyucuğuna, A/02 kuyucuğuna ve A/03 kuyucuğuna 25'er µl PIK3CA Mutant kontrol (MC), B/01 kuyucuğuna, B/02 kuyucuğuna, B/03 kuyucuğuna 25'er µl sample diluent (NEG), C/01 kuyucuğuna, C/02 kuyucuğuna, C/03 kuyucuğuna 25'er µl olgu cfDNA'sı ve geri kalan kuyucuklara sıralı şekilde olgu cfDNA'ları (Sample 1, Sample 2, ...) yüklenmiştir.

Tablo 15: PIK3CA karışımının AD-Plate yükleme pozisyonları

Row / Column	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MC MMX-1	MC MMX-2	MC MMX-3	S7 MMX-1	S7 MMX-2	S7 MMX-3	S15 MMX-1	S15 MMX-2	S15 MMX-3	S23 MMX-1	S23 MMX-2	S23 MMX-3
B	NEG MMX-1	NEG MMX-2	NEG MMX-3	S8 MMX-1	S8 MMX-2	S8 MMX-3	S16 MMX-1	S16 MMX-2	S16 MMX-3	S24 MMX-1	S24 MMX-2	S24 MMX-3
C	S1 MMX-1	S1 MMX-2	S1 MMX-3	S9 MMX-1	S9 MMX-2	S9 MMX-3	S17 MMX-1	S17 MMX-2	S17 MMX-3	S25 MMX-1	S25 MMX-2	S25 MMX-3
D	S2 MMX-1	S2 MMX-2	S2 MMX-3	S10 MMX-1	S10 MMX-2	S10 MMX-3	S18 MMX-1	S18 MMX-2	S18 MMX-3	S26 MMX-1	S26 MMX-2	S26 MMX-3
E	S3 MMX-1	S3 MMX-2	S3 MMX-3	S11 MMX-1	S11 MMX-2	S11 MMX-3	S19 MMX-1	S19 MMX-2	S19 MMX-3	S27 MMX-1	S27 MMX-2	S27 MMX-3
F	S4 MMX-1	S4 MMX-2	S4 MMX-3	S12 MMX-1	S12 MMX-2	S12 MMX-3	S20 MMX-1	S20 MMX-2	S20 MMX-3	S28 MMX-1	S28 MMX-2	S28 MMX-3
G	S5 MMX-1	S5 MMX-2	S5 MMX-3	S13 MMX-1	S13 MMX-2	S13 MMX-3	S21 MMX-1	S21 MMX-2	S21 MMX-3	S29 MMX-1	S29 MMX-2	S29 MMX-3
H	S6 MMX-1	S6 MMX-2	S6 MMX-3	S14 MMX-1	S14 MMX-2	S14 MMX-3	S22 MMX-1	S22 MMX-2	S22 MMX-3	S30 MMX-1	S30 MMX-2	S30 MMX-3

Yükleme işlemi ardından AD-Plate tüm kuyucukların üzeri ışık geçirgen seal ile hava sızdırmayacak şekilde kapatıldıktan sonra 2000xg’de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Son olarak cobas z 480 cihazı açılıp cobas 4800 software başlatılmış AD-Plate cihaza yerleştirilip PIK3CA PCR protokolü seçilerek çalışma başlatılmıştır. Çalışma sonunda tüm olgularda mevcut mutasyonlar programdan alınarak kaydedilmiştir.



Resim 2: cobas z 480 (Roche)

Çalışma cobas z 480 (Roche) Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) cihazında gerçekleştirilmiştir (Resim 2).

3.4 Verilerin toplanması

Olguları tanımlayıcı özellikleri, klinik tanı ve tedavi kayıtları, PET/BT görüntü ve raporları Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi veri tabanından, ilgili Anabilim Dalı başkanlıklarından ve hasta veya hasta yakınlarından temin edilerek kaydedilmiştir.

EGFR ve *PIK3CA* gen mutasyonları doğrudan cobas 4800 software programından analiz gerektirmeksizin sonuç raporu şeklinde alınmıştır. KRAS, NRAS ve BRAF mutasyon sonuçları ise User-Defined Workflow (UDF) software programından .ixo dosyası şeklinde alınıp <http://oncologyresearchkits.roche.com/data-analysis> internet linkinden online olarak analiz edilmiş elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir. Elde edilen mutasyonlar tedavi öncesi ve sonrası mutasyonun varlığı veya yokluğu ayrıca semi kantitatif değer SQI değişimleri ile değerlendirmeye alınmıştır. SQI; zaman içinde mutasyon yükü değişimlerinin mutant cfDNA miktarının yarı kantitatif ölçümüyle elde edilen bir değerdir. SQI değerindeki bir artış, hedef mutasyon miktarındaki bir artışı belirtirken, SQI değerindeki bir düşüş, hedef mutasyonun toplam miktarındaki bir azalmaya işaret etmektedir.

Akciğer içinde primer tümörün konumlandığı bölgeler; sağ akciğer üst lob, orta lob ve alt lob, sol akciğer üst ve alt lob olarak ayrıma tabi tutulmuştur. Ayrıca bu bölgelerin bazı segmentlerindeki nispeten yoğun konumlanmalar gösterdikleri özelliklere göre ayrıca incelenmiştir. Şekil 1, 2, 3, 4, 5 ve 6'da olgulara ait primer tümörlerin büyüklük ve şekilleri dikkate alınmaksızın PET/BT görüntülerinden elde edilen yaklaşık konumları akciğerin lob ve segmentlerini iki boyutlu şekilde gösteren sembolik akciğer resmi üzerinde gösterilmiştir. Primer tümörün yerleşimi merkezi ve periferik olmak üzere 2 grupta incelenmiş ve diğer özelliklerle karşılaştırılarak analiz edilmiştir. PET/BT görüntüleri karşıdan, yandan ve alttan olmak üzere akciğeri üç boyuttan inceleyerek primer tümörü en iyi gösterecek şekilde ilgili Anabilim Dalı öğretim üyeleri tarafından hazırlanmıştır.

3.5 Verilerin analizi

Elde edilen tanımlayıcı ve kategorik veriler IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programı kullanarak değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler olarak birim sayısı (n), yüzde (%), olarak verilmiş, kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde Pearson Ki-Kare ve Fisher's exact testi kullanılmıştır. Birbiri ile ilişkili olabilecek çok çeşitte ve az sayıda verinin bulunması sebebiyle istatistik programdan elde edilen veriler ön analiz olarak değerlendirilip bunun üzerine anlamlı olduğunu düşündüğümüz çıkarımlar birleştirilerek sayı (n), ve yüzde (%) ile gösterilerek değerlendirilmiştir.



Bulgular

4.1 Olguların tanımlayıcı özellikleri

Akciğer adenokarsinomu tanısı almış, birinci basamak tedavi öncesi ve sonrası periferik kan örnekleri temin edilen 11'i kadın 41'i erkek toplam 52 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların yaş ortalaması $64,24 \pm 8,1$ 'dir. Hiç sigara veya tütün ürünü kullanmamış olgu sayısı 14 (%27), diğer olgular bırakmış veya halen aktif sigara kullanıcısıdır. Olguların %83'ü ileri evrede (Evre III ve IV) tanı almış iken geri kalanı erken evre tanılıdır. Olguların yaklaşık yarısında yakın akraba kanser geçmişi mevcuttur. Olguların %65'i şehir ortamında yaşamakta ve genellikle yıpratıcı mesleklerde çalışmaktadır. Olguların %65'i ilkokul ve altı düzeyde eğitime sahiptir. Hastalara ait tanımlayıcı özellikler tablo 16'da gösterilmiştir.

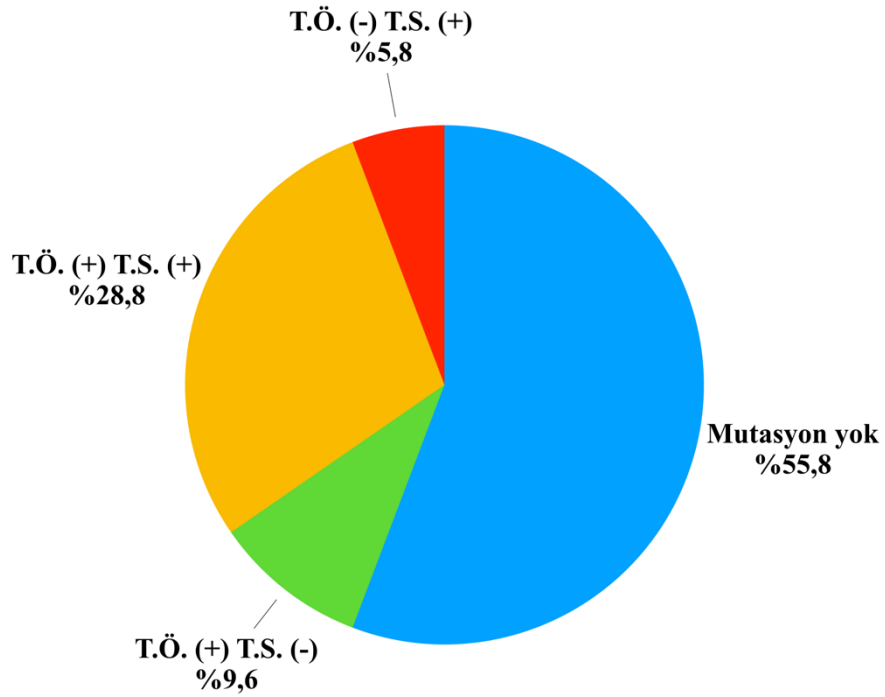
Tablo 16: Olgulara ait tanımlayıcı özellikler

Özellik	Alt özellik	Sayı (n)	Yüzde (%)
Cinsiyet	Kadın	11	%21
	Erkek	41	%79
Yaş	60>	14	%27
	60-69	25	%48
	>69	13	%25
Evre	I	2	%4
	II	7	%13
	III	17	%33
	IV	26	%50
Sigara kullanımı	Hiç içmemiş	15	%29
	Kullanıcı	37	%71
Yaşam alanı	Şehir	34	%65
	Doğa	18	%35
Eğitim durumu	İlkokul ve altı	34	%65
	Ortaokul ve lise	16	%31
	Yüksek öğretim	2	%4

Erkek olguların yaklaşık %83'i sigara kullanıcısı iken kadın olguların %27'si sigara kullanıcısıdır. Sürrenal bez metastazı bulunan olguların yaklaşık % 90'ı sigara kullanıcısıdır. Kadın olguların yaklaşık %55'i III. evrede tanı almışken erkek olguların yaklaşık %53'ü metastatik ileri evrede tanı almıştır.

4.2 Tespit edilen onkogen mutasyonları birliktelikleri ve değişimleri

Toplam 52 olgunun 29'unda tedavi öncesi veya sonrası mutasyon tespit edilmemiştir. Tedavi öncesinde 20 olguda mutasyon mevcut iken, tedavi sonrası bu olguların 5'inde mutasyonlar ortadan kalkmıştır. Tedavi öncesi mutasyonu bulunmayan 3 olguda tedavi sonrası mutasyon tespit edilmiştir. Toplam 15 olguda tedavi öncesi tespit edilen mutasyonlar tedavi sonrası da tespit edilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası olgularda belirlenen mutasyon değişimleri Grafik 2'de gösterilmiştir.

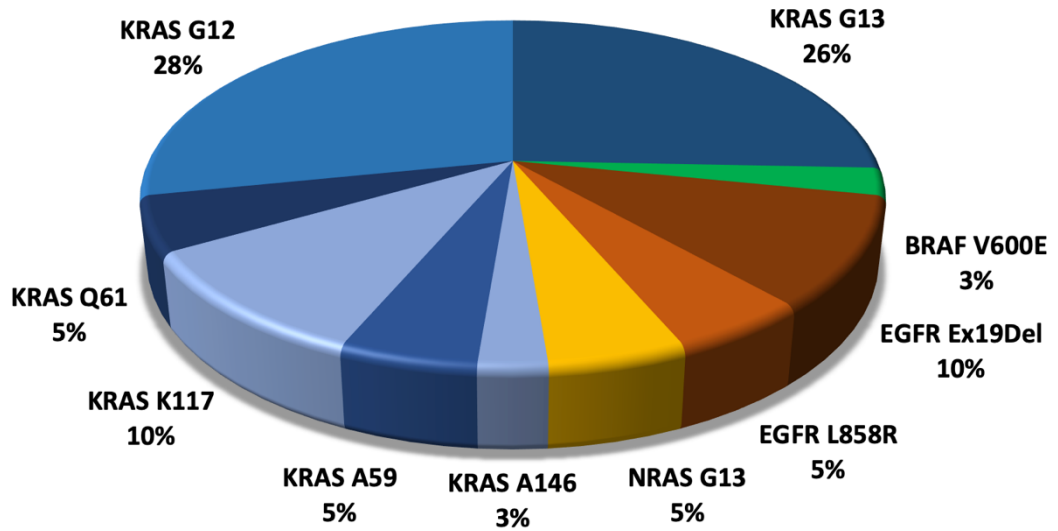


T.Ö. : Tedavi öncesi. T.S. : Tedavi sonrası (+) : Mutasyon var (-) : Mutasyon yok

Grafik 2: Tedavi öncesi ve sonrası olgularda mutasyon değişimleri

Tedavi öncesi sadece NRAS mutasyonu bulunan bir olguda tedavi sonrası KRAS mutasyonları ortaya çıkmıştır. Tedavi öncesi EGFR Ex19Del mutasyonu ve KRAS K117X mutasyonu bulunan 1 olgu ve EGFR Ex19Del mutasyonu ve KRAS G12X mutasyonu bulunan 1 olguda EGFR Ex19Del mutasyonları tedavi sonrası tespit edilmemiştir. KRAS mutasyonları tedavi sonrası da tespit edilmiştir. KRAS G12X mutasyonu bulunan 8 olgunun tamamı tedavi öncesi tespit edilmiş bunlardan 4'ünde tedavi sonrası mutasyon ortadan kalkmıştır.

Olguların 23'ünde tedavi öncesi ve/veya sonrası en az bir mutasyon olmak üzere EGFR, KRAS, NRAS ve BRAF genlerinde toplam 39 mutasyon tespit edilmiştir. Hiçbir olguda PIK3CA geni mutasyonları tespit edilmemiştir. Olguların 18'inde en az 1 KRAS mutasyonu bulunmak üzere kodon 12 mutasyonu 11 adet, kodon 13 mutasyonu 10 adet, kodon 117 mutasyonu 4 adet, kodon 59 mutasyonu 2 adet, kodon 61 mutasyonu 2 adet ve kodon 146 mutasyonu 1 adet, toplam 29 KRAS mutasyonu tespit edilmiştir. Olguların 6'sında 4'ü ekzon 19 delesyonu ve 2'si L858R nokta mutasyonu olmak üzere toplam 6 EGFR mutasyonu tespit edilmiştir. Bir olguda tedavi öncesi 1 BRAF V600E mutasyonu tespit edilirken yine bir olguda tedavi öncesi ve sonrası birer NRAS kodon 13 mutasyonu tespit edilmiştir. Mutasyonların tüm mutasyonlar içindeki oranları grafik 3'te gösterilmiştir.



Grafik 3: Tespit edilen mutasyonların tüm mutasyonlar içindeki oranları

Bir olguda NRAS mutasyonu eşliğinde iki ayrı KRAS mutasyonu, 2 olguda EGFR mutasyonu eşliğinde birbirinden farklı KRAS mutasyonları, 2 olguda KRAS onkogenine ait farklı mutasyonlardan ikişer adet tespit edilmiştir. 18 olguda tedavi öncesi ve/veya sonrası en az bir KRAS mutasyonu saptanmıştır. 29 olguda mutasyon tespit edilememiştir. Olgularda belirlenen tedavi öncesi ve sonrası mutasyonlar ve SQI değerleri tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17 : Olgulara göre tespit edilen mutasyonlar

Olgu ID	Tespit edilen mutasyonlar ve SQI değerleri	
	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası
P05	KRAS G13X (SQI: 17,7)	KRAS G13X (SQI: 14,2)
P07	-	KRAS G13X (SQI: 16,2)
	-	KRAS Q61X (SQI: 14,5)
P09	KRAS G12X (SQI: 16,1)	KRAS G12X (SQI: 16,9)
P10	EGFR L858R (SQI: 7,39)	-
P11	KRAS G12X (SQI: 9,7)	-
P14	EGFR L858R (SQI: 7,84)	-
P16	KRAS G12X (SQI: 12,8)	KRAS G12X (SQI: 15,7)
P17	KRAS G12X (SQI: 8,6)	-
P18	EGFR Ex19Del (SQI: 9,08)	-
P19	KRAS G12X (SQI: 14,5)	KRAS G12X (SQI: 20,7)
P20	EGFR Ex19Del (SQI: 13,93)	-
	KRAS K117X (SQI: 13,7)	KRAS K117X (SQI: 14,1)
P21	-	KRAS A146X (SQI: 10,3)
P24	NRAS G13X (SQI: 14,4)	NRAS G13X (SQI: 11,1)
	-	KRAS K117X (SQI: 12,4)
	-	KRAS A59X (SQI: 13,5)
P25	-	KRAS Q61X (SQI: 14,6)
P26	EGFR Ex19Del (SQI: 12,89)	-
	KRAS G13X (SQI: 12,7)	KRAS G13X (SQI: 7,5)
P28	KRAS K117X (SQI: 12,5)	-
	KRAS A59X (SQI: 13,2)	-
P34	KRAS G13X (SQI: 16,1)	KRAS G13X (SQI:8,4)
P38	KRAS G12X (SQI: 6,8)	KRAS G12X (SQI: 7,6)
P43	KRAS G12X (SQI: 9,4)	-
P45	BRAF V600E (8,8)	-
P46	KRAS G13X (SQI: 10,6)	KRAS G13X (SQI: 8,8)
P48	EGFR Ex19Del (SQI: 10,11)	-
P50	KRAS G12X (SQI: 12,5)	-
* P1, P2, P3, P4, P6, P8, P12, P13, P15, P22, P23, P27, P29, P30, P31, P32, P33, P35, P36, P37, P39, P40, P41, P42, P44, P47, P49, P51 ve P52 mutasyon tespit edilmeyen olgulardır.		

Tedavi öncesi 20 olguda en az bir mutasyon olmak üzere toplam 23 mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonların 8'i KRAS G12X mutasyonu, 4'ü KRAS G13X mutasyonu, 4'ü EGFR Ex19Del mutasyonu, 2'si EGFR L858R mutasyonu, 2'si KRAS K117X mutasyonu, 1'i KRAS A59X mutasyonu, 1'i NRAS G13X mutasyonu ve 1'i BRAF V600E mutasyonudur. Geri kalan 32 olguda mutasyon tespit edilmemiştir.

Tedavi sonrası 13 olguda toplam 16 mutasyon tespit edilmiştir. Bunların 5'i KRAS G13X mutasyonu, 4'ü KRAS G12X mutasyonu, 2'si KRAS K117X mutasyonu, 2'si KRAS Q61X mutasyonu, 1'i KRAS A59X mutasyonu, 1'i KRAS A146X mutasyonu, 1'i NRAS G13X mutasyonudur. Tedavi öncesi mutasyon tespit edilemeyen 3 olguda tedavi sonrası bir KRAS G13X ve KRAS Q61X birlikteliği, bir KRAS Q61X mutasyonu ve bir KRAS A146X mutasyonu tespit edilmiştir. NRAS G13X mutasyonu bulunan bir olguda tedavi sonrası bu mutasyona ek KRAS A59X ve KRAS K117X mutasyonları gözlemlenmiştir. Tedavi öncesi EGFR mutasyonları bulunan 6 olgunun tamamında tedavi sonrası EGFR mutasyonu tespit edilmemiş ve bunlardan KRAS mutasyonu birlikteliği gösteren 2 olgunun KRAS mutasyonu SQI değişimleri gözlemlenmiştir. KRAS G12X mutasyonu bulunan 4 olguda tedavi sonrası mutasyon tespit edilmemiştir. Tedavi öncesi KRAS A59X ve KRAS K117X mutasyonu birlikteliği gösteren bir olgu ve BRAF V600E mutasyonu içeren bir olguda tedavi sonrası mutasyon tespit edilmemiştir. Tedavi öncesi ve sonrası KRAS G12X mutasyonu içeren 4 olguda, KRAS G13X mutasyonu içeren 4 olguda, KRAS K117X mutasyonu içeren 1 olguda ve NRAS G13X mutasyonu içeren 1 olguda SQI değerleri değişimleri gözlemlenmiştir.

4.3 Cinsiyet, yaş, tanı evresi ve sigara kullanımına göre mutasyon dağılımı

EGFR L858R mutasyonu bulunan 2 olgu mevcuttur ve bu olguların ikisi de erkek ve sigara kullanıcısıdır. EGFR Ex19Del mutasyonu bulunan 4 olgudan 3'ü kadın ve hiç sigara içmemiş, 1'i sigara kullanan bir erkek olgudur. EGFR mutasyonu içeren olguların yarısı IV. evre olgularıdır. EGFR Ex19Del mutasyonu ile KRAS G13X mutasyonu birlikteliği gösteren bir kadın olgu dışında KRAS mutasyonu tespit edilen 17 olgunun tamamı erkektir. Sigara kullanmayan ve KRAS mutasyonu tespit edilen 6 olgunun 5'i erkek olgulardır. Ayrıca toplamda sigara kullanmayan 7 erkek olgu mevcuttur ve bunların 5'i KRAS mutasyonu tespit edilen olgulardır. KRAS mutasyonu içeren olguların yarıdan fazlası tanıda IV. evrede tespit edilen olgulardır. NRAS mutasyonu tespit edilen 1 olgu mevcuttur ve bu olgu sigara kullanıcısı, III. evre, 60 yaş altı bir erkek olgudur. Yine BRAF mutasyonu tespit edilen 1 olgu mevcuttur ve bu olgu sigara kullanmayan, IV. evre, 70 yaş üstü bir kadın olgudur. Mutasyon tespit edilmeyen 29 olgunun 24'ü ileri evre, 23'ü sigara kullanıcısı, 22'si erkek ve 21'i 60 yaş ve üzeri olgulardır (Tablo 18).

Tablo 18: Cinsiyet, yaş, tanı evresi ve sigara kullanımına göre mutasyon dağılımı

Özellik	Alt özellik	Mutasyon				
		EGFR (6)	KRAS (18)*	NRAS (1)	BRAF (1)	Yok (29)
Cinsiyet	Kadın	3	1	-	1	7
	Erkek	3	17	1	-	22
Yaş	60>	2	5	1	-	8
	60-69	2	8	-	-	16
	>69	2	5	-	1	5
Evre	I	1	-	-	-	1
	II	1	3	-	-	3
	III	1	5	1	-	10
	IV	3	10	-	1	14
Sigara kullanımı	Hiç içmemiş	3	6	-	1	6
	Kullanıcı	3	12	1	-	23

(n) olgu sayısı

* KRAS mutasyonu eşliğinde 2'si EGFR ve 1'i NRAS mutasyonu içeren 3 olgu sayıya dahil edilmiştir.

4.4 Primer tümörün konumuna göre mutasyonlar ve metastazlar

Primer tümörleri sağ akciğerde bulunan 29 olgunun 10'u üst lobda, 1'i orta lobda ve 4'ü alt lobda olmak üzere toplam 15'inde mutasyon tespit edilmemiştir ve 8'i üst lobda 2'si orta lobda ve 4'ü alt lobda bulunmak üzere toplam 14'ünde en az 1 mutasyon tespit edilmiştir. Primer tümörleri sol akciğerde bulunan 23 olgunun 11'i üst lobda ve 3'ü alt lobda olmak üzere toplam 14'ünde mutasyon tespit edilmemiştir. Mutasyon tespit edilen 9 olgunun tamamı üst lobdadır ve en az 1 mutasyon tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonların bulundukları akciğer lobları tablo 19'da gösterilmiştir.

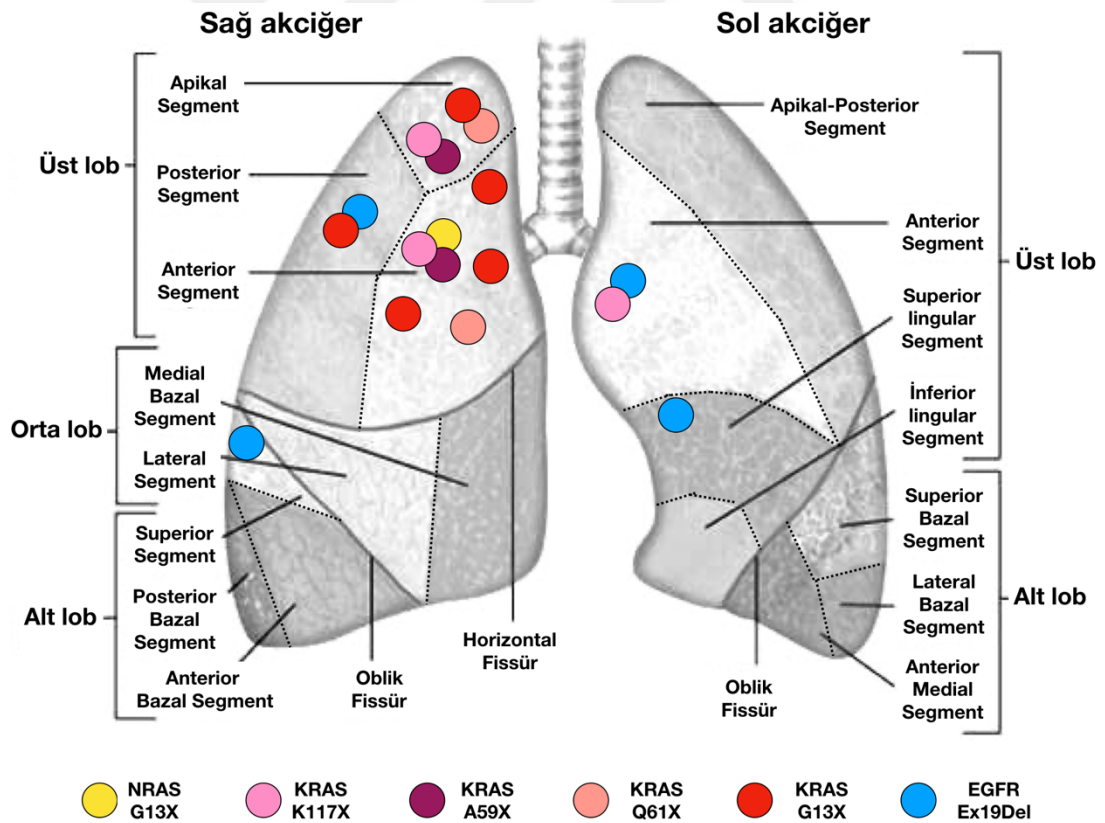
Tablo 19: Akciğer loblarına göre tespit edilen mutasyonlar

Akciğer	Lob	Mutasyon				
		EGFR (6)	KRAS (18)*	NRAS (1)	BRAF (1)	Yok (29)
Sağ	Üst	1	8	1	-	10
	Orta	-	2	-	-	1
	Alt	2	2	-	-	4
Sol	Üst	3	6	-	1	11
	Alt	-	-	-	-	3

(n) olgu sayısı

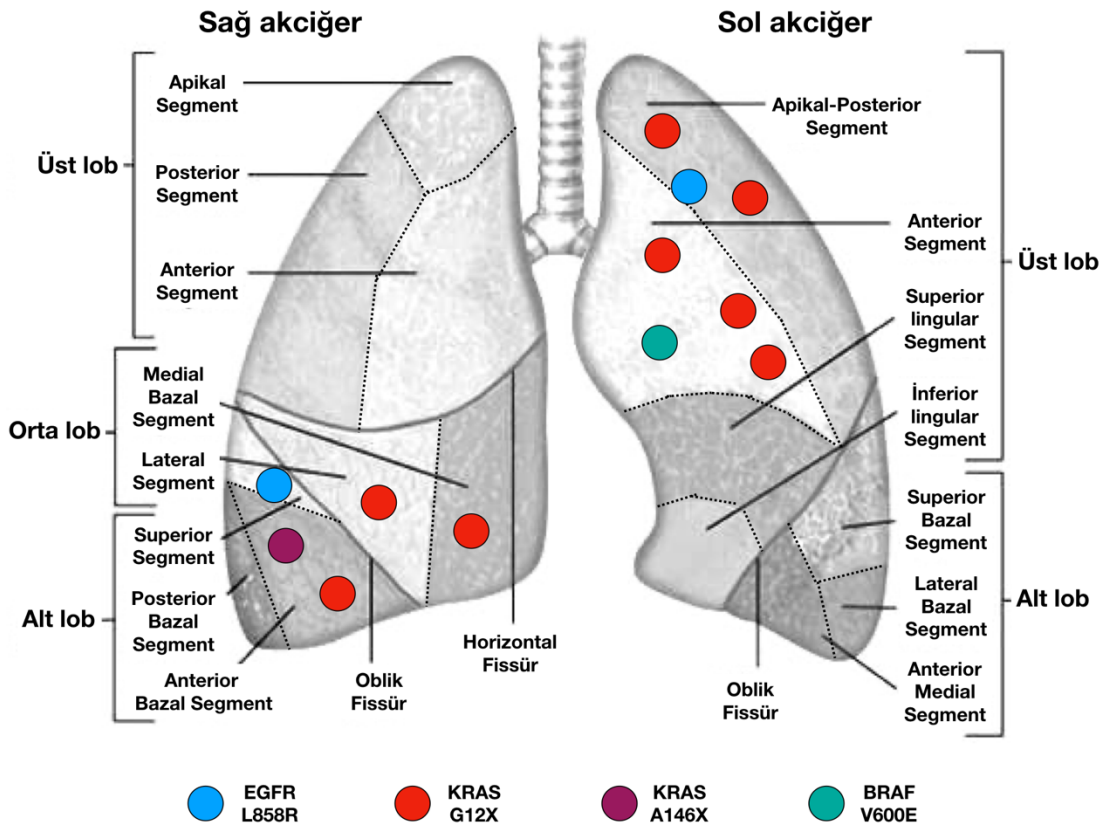
* KRAS mutasyonu eşliğinde 2'si EGFR ve 1'i NRAS mutasyonu içeren 3 olgu sayıya dahil edilmiştir.

Akciğer sağ üst lob ve sol üst lobda yoğunlaşan mutasyonlara sahip ve/veya birden çok mutasyon içeren olguların primer tümör konumları şekil 1’de gösterilmiştir ($P < 0.001$). EGFR Ex19Del mutasyonu içeren bir olgunun primer tümörü akciğer sağ alt lob süperior segmente tespit edilmiştir. Bu olgu dışındaki EGFR Ex19Del, KRAS G13X, KRAS A59X, KRAS Q61X, KRAS K117X ve NRAS G13X mutasyonlarını içeren tüm olguların primer tümörleri sağ üst lob veya sol üst lobda konumlanmaktadır. Sağ akciğer üst lob apikal segmentte primer tümörü bulunan iki olgudan birisi KRAS G13X ve KRAS Q61X mutasyonu birlikteliği diğeri KRAS K117X ve KRAS A59X mutasyonu birlikteliği göstermektedir. Sağ akciğer üst lob anterior segmentte primer tümörü bulunan 5 olgudan birisi NRAS G13X mutasyonu eşliğinde KRAS K117X ve KRAS A59X mutasyonlarını içermekte, 3 olgu KRAS G13X mutasyonu içermekte ve 1 olgu KRAS Q61X mutasyonu içermektedir. Sağ akciğer üst lob posterior segmentte primer tümörü bulunan bir olguda EGFR Ex19Del ve KRAS G13X mutasyonu birlikteliği gözlemlenmiştir (Şekil 1).



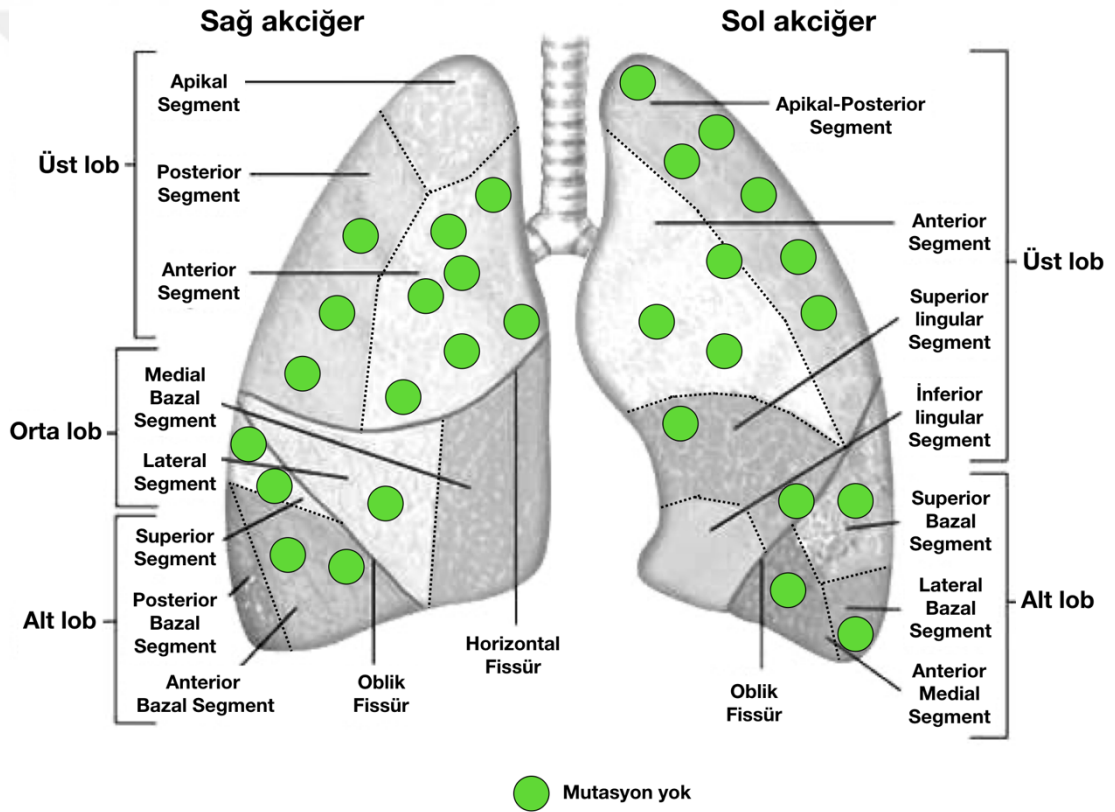
Şekil 1: Birliktelik gösteren mutasyonlar ve primer tümör konumları

Şekil 1’de gösterilen mutasyonların dışında kalan EGFR L858R, BRAF V600E, KRAS G12X ve KRAS A146X mutasyonlarını içeren olguların primer tümör konumları Şekil 2’de gösterilmiştir. KRAS G12X mutasyonunu içeren 8 olgu mevcuttur. Bu olgulardan 2’si sağ akciğer orta lob, 1’i sağ akciğer alt lob ve 5’i sol akciğer üst lobda primer tümörü bulunan olgulardır. EGFR L858R mutasyonu içeren 2 olgu mevcuttur. Bu olgulardan 1’inin primer tümörü sağ akciğer alt lobda diğerinin primer tümörü ise sol akciğer üst lobda bulunmaktadır. KRAS A146X mutasyonu içeren 1 olgu mevcuttur ve bu olgunun primer tümörü sağ akciğer alt lobda gözlemlenmiştir. BRAF V600E mutasyonu içeren 1 olgu mevcuttur ve bu olgunun primer tümörü sol akciğer üst lobda yerleşimlidir. EGFR L858R, BRAF V600E, KRAS G12X ve A146X mutasyonlarını içeren hiçbir olgunun primer tümörü sağ akciğer üst lob ve sol akciğer alt lobda bulunmamaktadır ayrıca bu olgularda çoklu mutasyon birliktelikleri gözlemlenmemiştir ($P < 0.001$) (Şekil 2).



Şekil 2: Birliktelik göstermeyen mutasyonlar ve primer tümör konumları

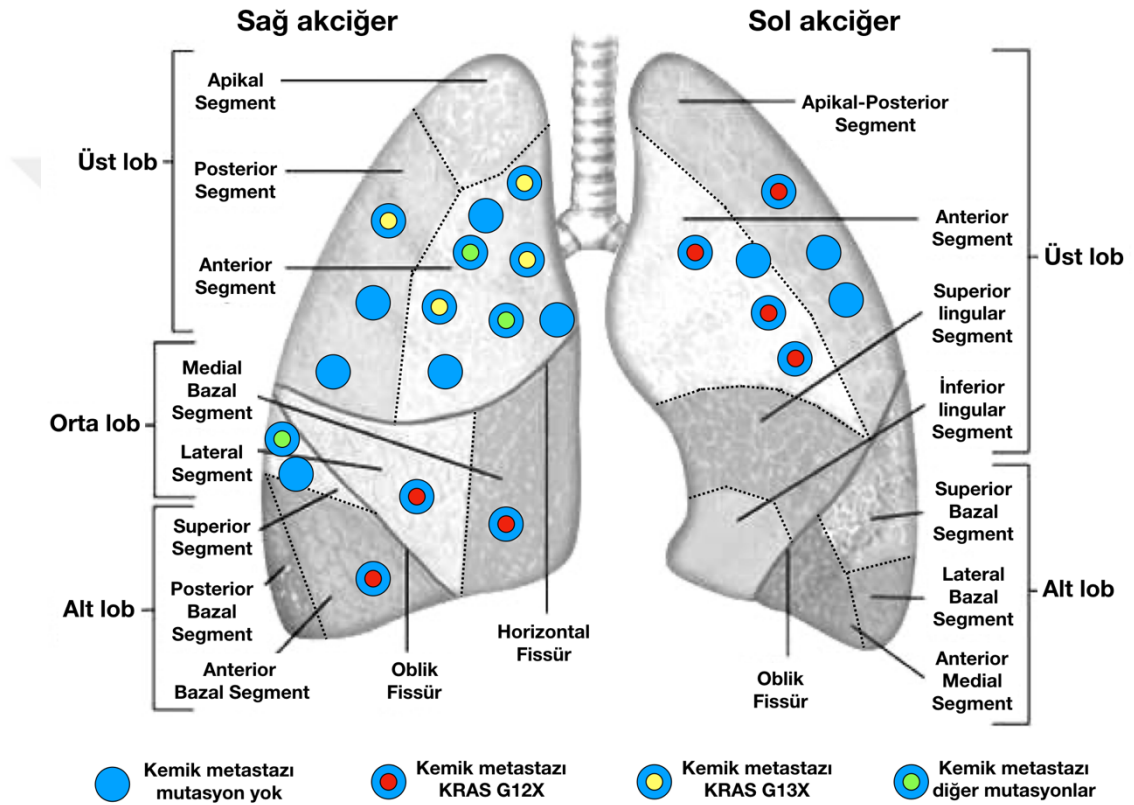
Araştırılan onkogen mutasyonlarından hiçbirini içermeyen olguların yaklaşık primer tümör lokalizasyonları şekil 3’de gösterilmiştir. Sağ akciğer üst lob apikal segment, sağ akciğer alt lob posterior bazal segment ve sol akciğer üst lob inferior lingular segment dışında tüm lob ve segmentlerde mutasyonu bulunmayan en az bir olgunun primer tümörü mevcuttur. Sağ akciğer üst lob anterior segmentte 7, üst lob posterior segmentte 3, orta lob lateral segmentte 1, alt lob superior segmentte 2, alt lob anterior bazal segmentte 2 ve sol akciğer üst lob apikal-posterior segmentte 6, üst lob anterior segmentte 3, üst lob superior lingular segmentte 2, alt lob superior bazal segmentte 1, lateral bazal segmentte 1, anterior medial segmentte 1 olmak üzere toplam 29 olgunun primer tümörü konumlanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3: Mutasyon içermeyen olguların primer tümör konumları

Tanı esnasında 26 olgu ve tedavi sonrası 5 olgu olmak üzere toplam 31 olguda en az bir organa olmak üzere uzak metastazlar gözlemlenmiştir. Bu olgulardan 23'ünde kemik metastazı gözlenirken bu olguların %70'inin primer tümörünün sağ akciğerde konumlandığı tespit edilmiştir ($P < 0.01$). KRAS kodon 12 mutasyonunu içeren olgular hariç diğer tüm mutasyon içeren olgular sağ akciğerde ve özellikle sağ üst lobda

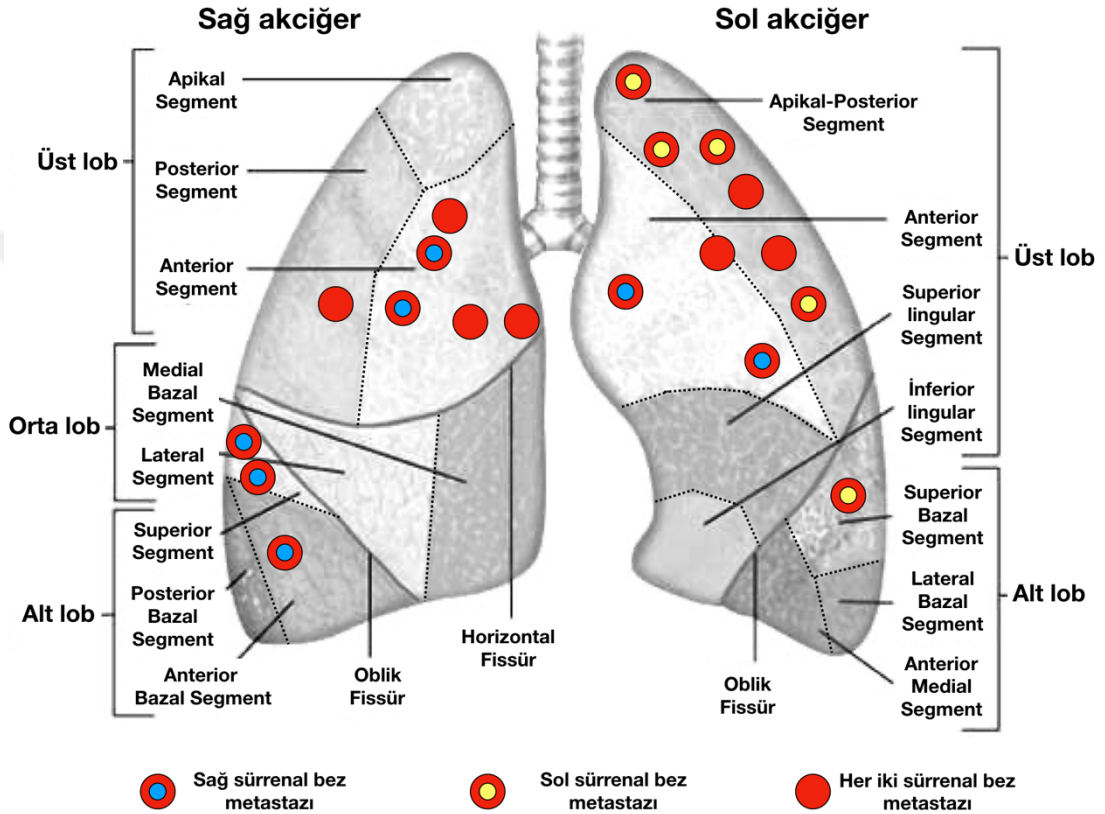
konumlanmışlardır. KRAS kodon 12 mutasyonu içeren 7 olgunun primer tümörleri sağ akciğer alt ve orta lob, sol akciğer üst lobda gözlemlenmiştir. KRAS kodon 13, 59, 61 ve 117 mutasyonları, NRAS G13X mutasyonu ve EGFR Ex19Del mutasyonu içeren olgular primer tümörü sadece sağ akciğer üst lobda bulunan olgulardır. EGFR L858R mutasyonu bulunan bir olgunun primer tümörü sağ akciğer alt lobda gözlemlenmiştir. İçerdikleri mutasyonlara göre kemik metastazı gösteren olguların primer tümör konumları şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4: Kemik metastazı gözlenen olguların primer tümör konumları

Uzak metastaz gösteren 31 olgudan 19’u sürrenal bez metastazı gerçekleştirmiştir. Sağ ve sol akciğer arasında sürrenal bezlere metastaz açısından sayısal olarak bir fark yokken, sadece sağ sürrenal bezde metastazı bulunan olguların çoğunlukla sağ akciğerde primer tümörü bulunan olgular olduğu ve sadece sol sürrenal bezde metastazı bulunan olguların çoğunlukla sol akciğerde primer tümörü bulunan olgular olduğu gözlemlenmiştir ($P < 0.05$). Sol akciğer apikal-posterior segmentte primer tümörü bulunan 6 olgunun tamamı sol sürrenal bezde metastazı bulunan olgulardır. Sağ akciğer alt lobda primer tümörü bulunan 3 olgunun tamamı yalnız sağ sürrenal

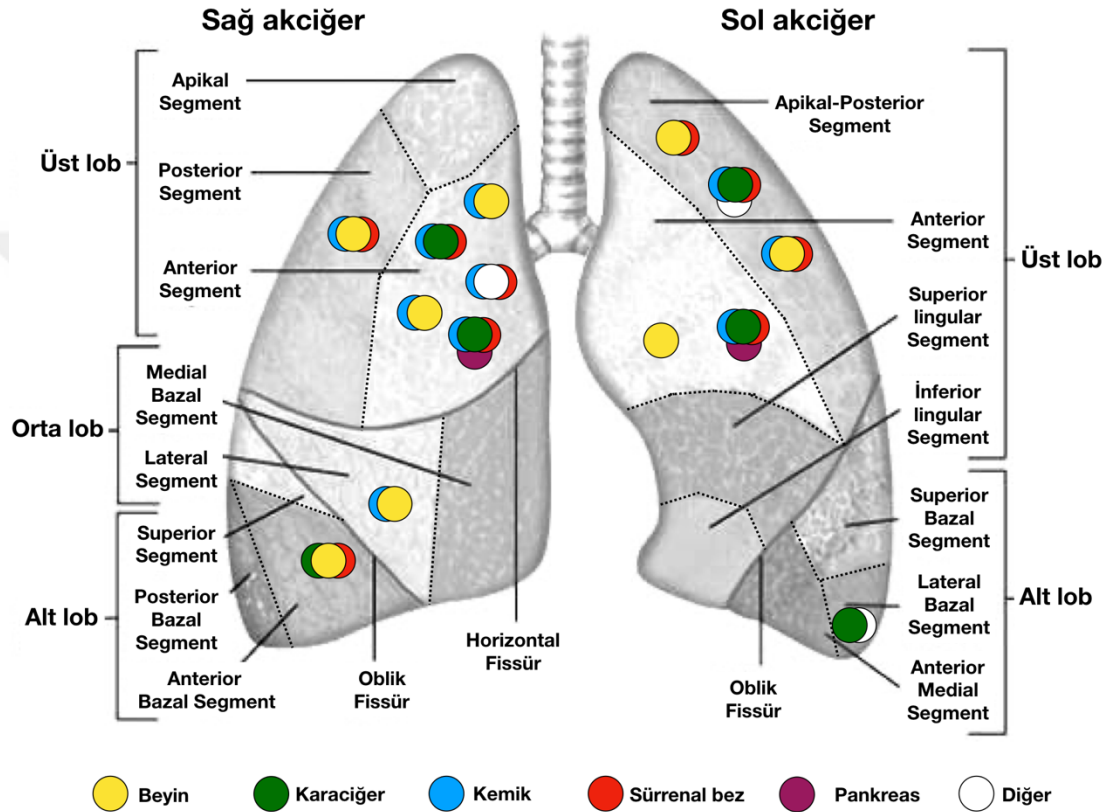
bezde metastazı bulunan olgulardır. Sürrenal bez metastazı bulunan ve sağ akciğerde primer tümörü bulunan olguların tamamı sağ sürrenal bezde metastaz göstermiştir. Kemik metastazı gösteren olguların %61'inde mutasyon saptanmışken sürrenal bez metastazı gösteren olguların %26'sında mutasyon gözlenmiştir. Sağ sürrenal, sol sürrenal ve her iki sürrenal beze metastaz gerçekleştiren olguların primer tümör konumları Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Sürrenal bez metastazlarına göre primer tümör konumları

Uzak metastaz gösteren 31 olgudan BRAF mutasyonu gösterip sadece beyin metastazı gösteren 1 olgu ve mutasyonu bulunmayıp karaciğer ve dalak metastazı gösteren 1 olgu hariç tüm olgularda kemik veya sürrenal bez metastazı gözlenmiştir. Bu 29 olgunun 17'sinde sadece kemik ve/veya sürrenal bez metastazı mevcutken kemik ve/veya sürrenal bez metastazı beraberinde başka organlarda metastazları bulunan 12 olgu mevcuttur. Bu olgulardan 7'si kemik ve sürrenal bez eşliğinde ilave metastazları bulunan olgularken 5'i ya kemik ya da sürrenal bez eşliğinde ilave metastazı bulunan olgulardır. Kemik ve/veya sürrenal bez metastazı eşliğinde 6 olguda beyin, 4 olguda karaciğer 1 olguda hem karaciğer hem beyin ve 1 olguda kolon ardından prostat

metastazı gözlenmiştir. Kemik ve sürrenal bez eşliğinde karaciğer ve pankreas metastazı gösteren 2 olgu KRAS mutasyonu bulunan primer tümörü merkezi yerleşimli olgulardır. Sadece kemik ve beyin metastazı gösteren 3 olgu periferik yerleşimli ve KRAS mutasyonu bulunan olgulardır. Kemik veya sürrenal bez metastazı dışında metastazları bulunan 14 olgunun primer tümör yerleşimleri şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6: Beyin, karaciğer ve diğer organ metastazlarının konumları

Diğer organ metastazları böbrek, kolon, dalak ve prostat metastazlarını içermektedir. Kolon ve prostat metastazı primer tümörü merkezi yerleşimli ve sağ üst lobda bulunan aynı zamanda KRAS G13X mutasyonu bulunan olguda tespit edilmiştir.

4.5 Primer tümörün yerleşimine göre mutasyonlar ve metastazlar

Tüm olgularımızdan 41’inin primer tümörü akciğer içinde periferik bir yerleşim göstermektedir. Bu olgulardan 19’unda en az bir mutasyon tespit edilirken 22’sinde mutasyon tespit edilmemiştir. Merkezi yerleşimli 11 olgu mevcutken bunların 4’ünde mutasyon tespit edilmiş 7’sinde mutasyon tespit edilememiştir. (Tablo 20).

Tablo 20: Primer tümörün yerleşimine göre mutasyon ve metastaz durumları

Özellik	Yerleşim	Sayı (n) Yüzde %	Mutasyon	Metastaz		
				Yok (n)	Akciğer içi (n)	Uzak (n)
Tümör yerleşimi	Merkezi	(11) %21	Var	-	-	4
			Yok	-	7	-
	Periferik	(41) %79	Var	7	-	12
			Yok	7	-	15

Merkezi yerleşimli ve mutasyon içeren 4 olguda KRAS mutasyonları tespit edilmiştir. Bu olguların tamamı sağ sürrenal bez metastazı gösterirken KRAS G12X ve KRAS Q61X mutasyonu içeren 2 olgu ilaveten sol sürrenal, kemik, karaciğer ve pankreas metastazları, KRAS G13X mutasyonu içeren bir olgu ilaveten sol sürrenal, kemik, kolon ve prostat metastazı ve KRAS K117X mutasyonu ve EGFR Ex19Del mutasyonu içeren bir olgu sadece sağ sürrenalde metastaz göstermiştir.

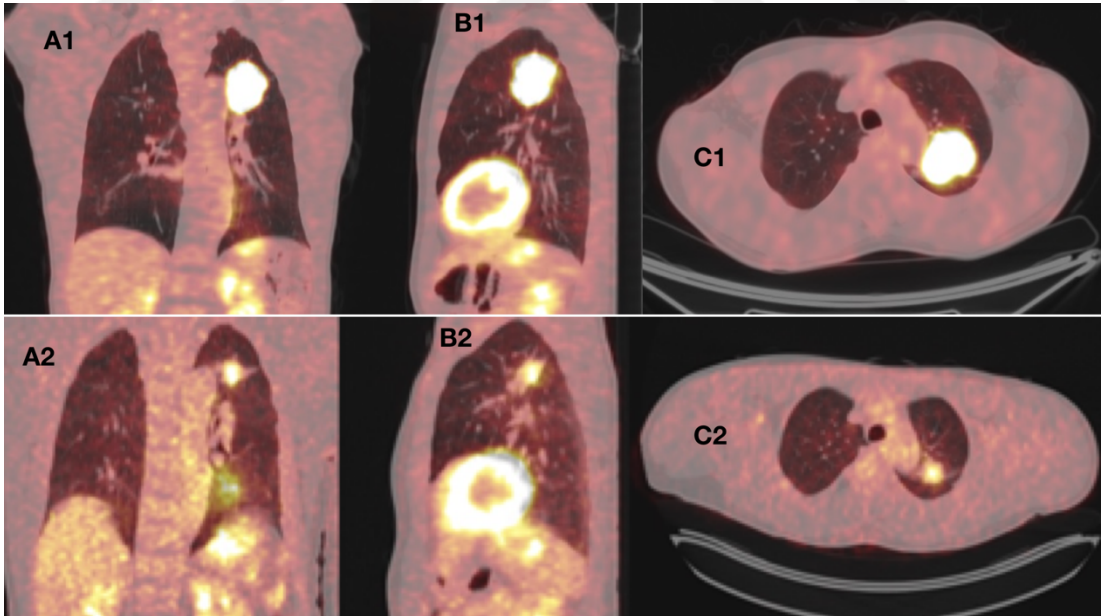
Periferik yerleşimli olgulardan mutasyon içermeyen ve uzak metastazı mevcut 15 olgunun 12'si sürrenal bezlerde metastaz gerçekleştirmiştir. Bu olguların 6'sında primer tümör akciğer sol üst apikal-posterior segmentinde yerleşmiş ve özellikle sol sürrenal bezde metastaz gerçekleştirmiştir. Metastazı mevcut ve mutasyon içeren 12 olgunun 11'i kemik metastazı gösterirken bunların 6'sında KRAS G12X mutasyonu gözlemlenmiştir. Metastaz tespit edilmemiş 14 olgu birinci basamak tedavi ile primer tümörü regrese olmuş veya tam yanıt alınmış olgulardır. Bu olgular tedaviye yanıt verdiklerinden muhtemel oluşturabilecekleri metastazlar gözlemlenememiştir. Bu olguların tamamı periferik yerleşimli olmak üzere 7'sinde mutasyon mevcut, 7'sinde mutasyon mevcut değildir. Mutasyon tespit edilmeyen 7 olgunun 5'i cerrahi müdahale ile 2'si kemoterapi ve biri kemoterapi radyoterapi kombinasyonu ile tedavi edilmiştir. Mutasyon içeren 7 olguda ise 3'ü EGFR mutasyonları varlığı sebebiyle hedefe yönelik tedavi ile KRAS G12X ve KRAS A146X mutasyonu bulunan 2 olgu cerrahi müdahale ile ve KRAS G13X, KRAS A59X, KRAS Q61X ve KRAS K117X mutasyonları bulunan 2 olgu birbirinden farklı kombine kemoterapiler ile tedavi edilmiştir.

Merkezi yerleşimli, akciğer içi metastaz göstermiş ve mutasyon içermeyen 7 olgunun tamamı benzer prognoz göstermiştir. Olguların tamamında tümör akciğer içinde yayılarak akciğerin işlevini yitirmesine sebep olmuş ve tedaviye yanıt alınamayan bu vakalar ölümle sonuçlanmıştır ($P < 0.001$) (Tablo 20).

4.6 Onkogen değişimlerine göre tedavi yanıtı ve yeni oluşumlar

Tedavi öncesi ve sonrası en az bir mutasyonu bulunan 23 olgu değerlendirmeye alınmıştır. Bu olgulardan 13'ü tedavi öncesi mutasyon bulunan ve tedavi sonrası en az bir mutasyonu ortadan kalkmış olgulardır. Tedavi öncesi mutasyonu mevcut olup tedavi sonrası aynı mutasyonu koruyan olgu sayısı 7'dir ve bu olgularda SQI değerlerinde değişimler gözlenmiştir. Tedavi öncesi mutasyonu bulunmayan ve tedavi sonrası mutasyon tespit edilen 3 olgu mevcuttur.

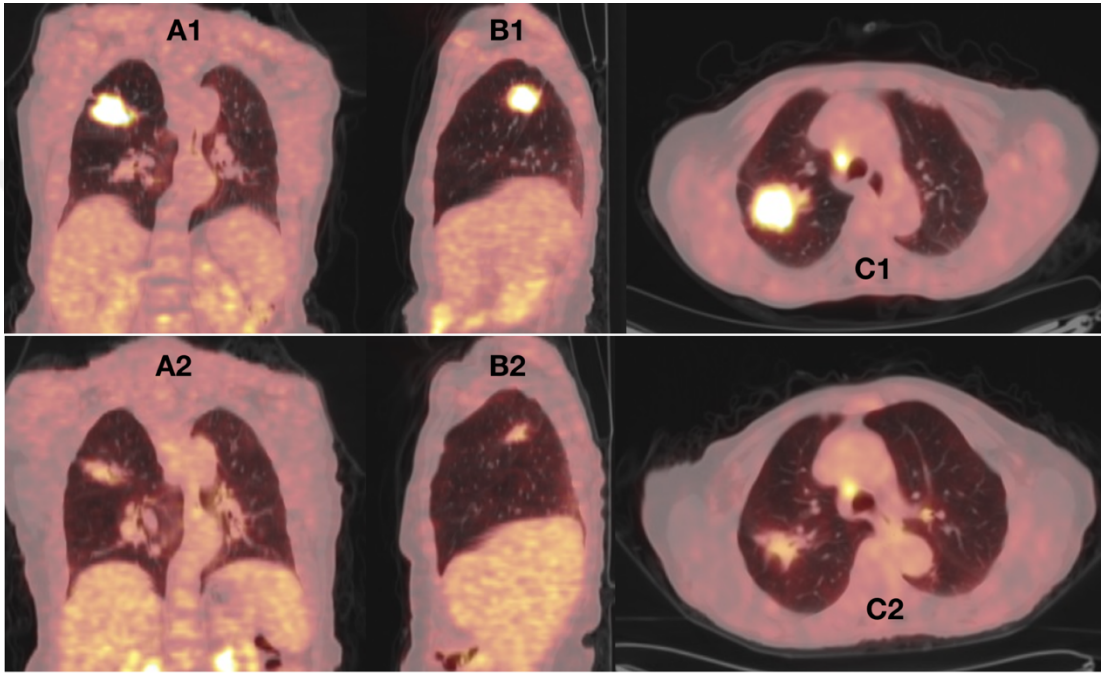
Tedavi öncesi EGFR mutasyonları bulunan 6 olgu mevcuttur ve bu olguların tamamında tedavi sonrası EGFR mutasyonu gözlemlenmemiştir. EGFR L858R mutasyonu içeren 2 olgu mevcuttur. Bu olgulardan birisi metastatik ileri evre olup akciğer sağ alt lobda lezyon, sağ sürrenal bezde metastaz ve yaygın kemik metastazları göstermektedir. Uygulanan birinci basamak tedavi sonrası primer tümöründe regresyon gözlemlense de diğer bölgelerdeki progresyon sonucu ölüm oluşmuştur. Diğer EGFR L858R mutasyonu içeren olgu ise erken evrede saptanmıştır. Akciğer sol üst lobdaki primer lezyon tedavi sonrası regrese olmuş ve olgu tedaviye tama yakın yanıt vermiştir (Resim 3)



A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan B2 : Tedavi sonrası yandan C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 3: EGFR L858R içeren olgunun PET/BT görüntüsü

EGFR Ex19Del mutasyonu içeren 4 olgu mevcuttur ve bu olgulardan 3'ü resim 3'te sunulan olguya benzer görüntü ve tedavi yanıtları sergilemiştir. Bu 3 olgudan birisi tedavi öncesi EGFR Ex19Del mutasyonun beraberinde KRAS G13X mutasyonu içermektedir. Bu olguda tedavi sonrası EGFR Ex19Del mutasyonu ortadan kalkarken KRAS G13X mutasyonu mevcudiyetini sürdürmekle birlikte SQI değerinde belirgin bir düşüş göstermiştir. Tedavi öncesi SQI : 12,5 iken tedavi sonrası SQI : 7,5'e düşerek %40'lık bir gerileme kaydetmiştir (Resim 4).

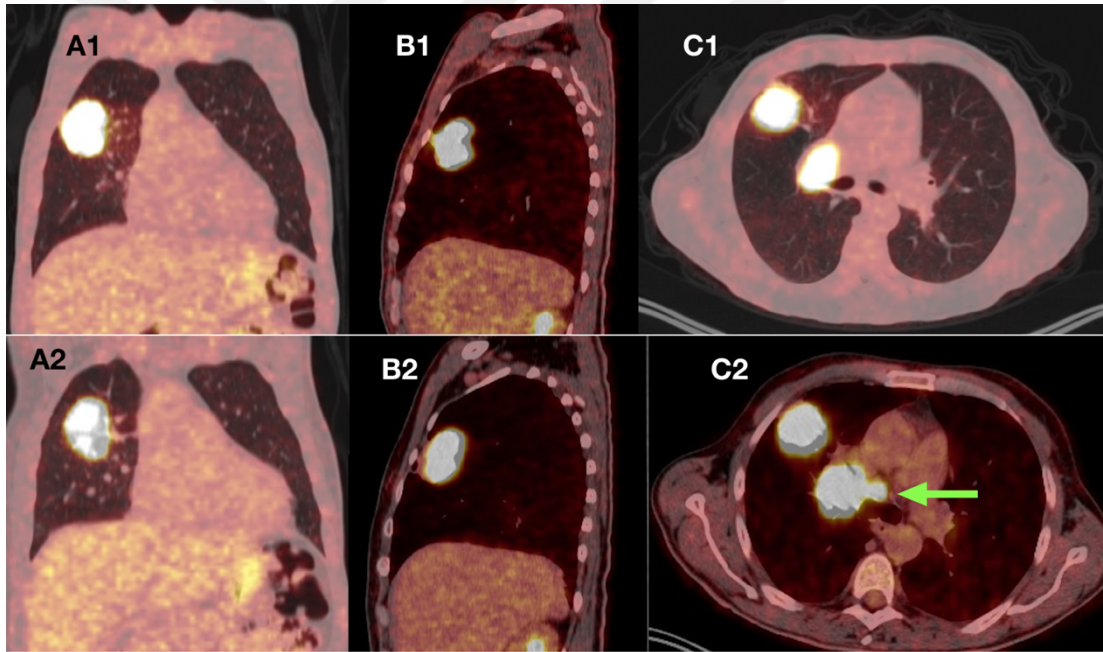


A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 4: EGFR Ex19Del ve KRAS G13X içeren olgunun PET/BT görüntüsü

EGFR Ex19Del mutasyonu beraberinde KRAS K117X mutasyonu içeren bir olgu mevcuttur. Bu olgu sol akciğer üst lobda mediastene invaze, fissür aşımı yapmış 10x8x8 cm santral kitle lezyonu ve sağ sürrenalde metastaza sahiptir. Tedavi sonrası EGFR Ex19Del mutasyonu tespit edilemeyen olguda KRAS K117X mutasyonu SQI değerinde artış gözlemlenmiştir. Olgunun primer tümöründe metabolik regresyon gözlenmiş olsada genel olarak progresyon gözlenmesi ardından vaka ölümle sonuçlanmıştır.

EGFR Ex19Del mutasyonu beraberinde KRAS K117X mutasyonu içeren bir olgu dışında KRAS K117X mutasyonu içeren 2 olgu daha mevcuttur. Bu 2 olgunun ikisinde de KRAS A59X mutasyonu birlikteliği gösterirken birisinde ayrıca NRAS G13X mutasyonu da tespit edilmiştir. Bu olgulardan metastazı mevcut olmayan ve tedavi öncesi KRAS K117X ve KRAS A59X mutasyonu içeren olguda tedavi sonrası primer tümöründe regresyon gözlemlenmiş ve tedavi öncesi tespit edilen mutasyonlar tedavi sonrası tespit edilememiştir. Tedavi öncesi metastaz içermeyen ve sadece NRAS G13X mutasyonu içeren olgu da ise tedavi sonrası primer tümörde bir miktar regresyon eşliğinde NRAS G13X SQI değerinde azalma gözlemlenmiş yeni gelişen akciğer sağ hiler bölge oluşumu, sağ sürrenal bez metastazı, kemik metastazı ve karaciğer metastazıyla birlikte KRAS K117X ve KRAS A59X mutasyonları ortaya çıkmıştır. Olguda akciğer içi yeni gelişen oluşum yeşil ok ile gösterilmiştir (Resim 5).

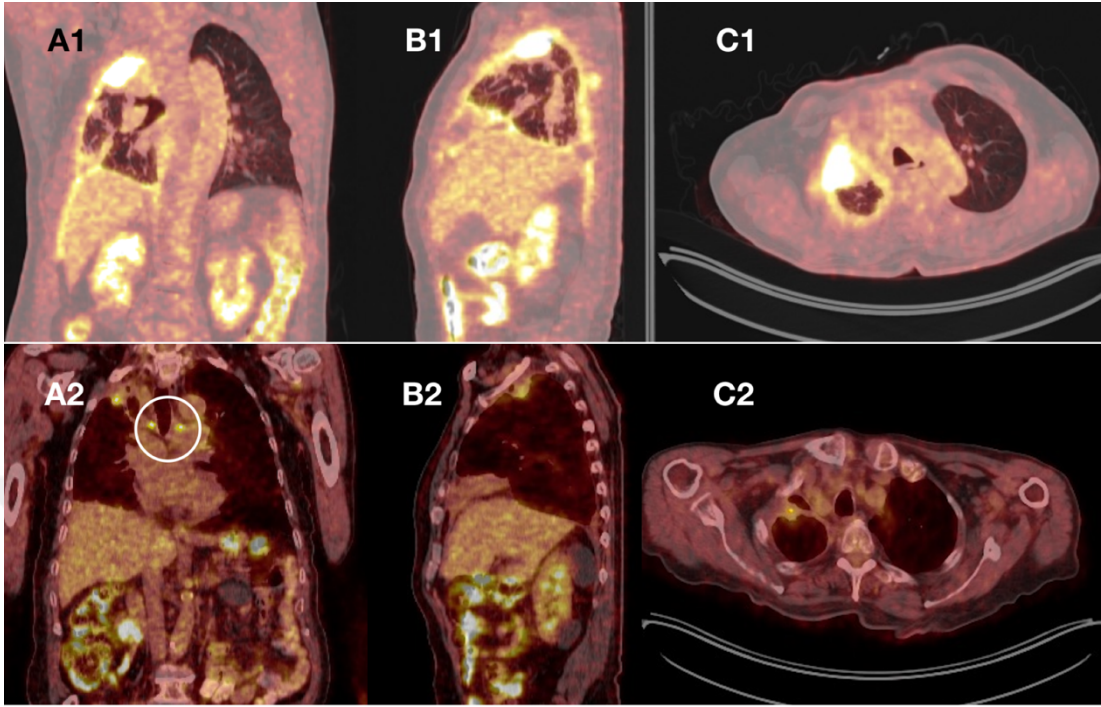


A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 5: NRAS G13X içeren olgunun PET/BT görüntüsü

EGFR Ex19Del mutasyonu beraberinde KRAS G13X mutasyonu içeren bir olgu dışında KRAS G13X mutasyonu içeren 4 olgu daha mevcuttur. Bu olgulardan birinde ayrıca KRAS Q61X mutasyonu mevcuttur. Olguda tedavi sonrası primer lezyonda tama yakın bir yanıt oluşurken mediastinal bilateral lenf nodlarında (Resim 6 A2

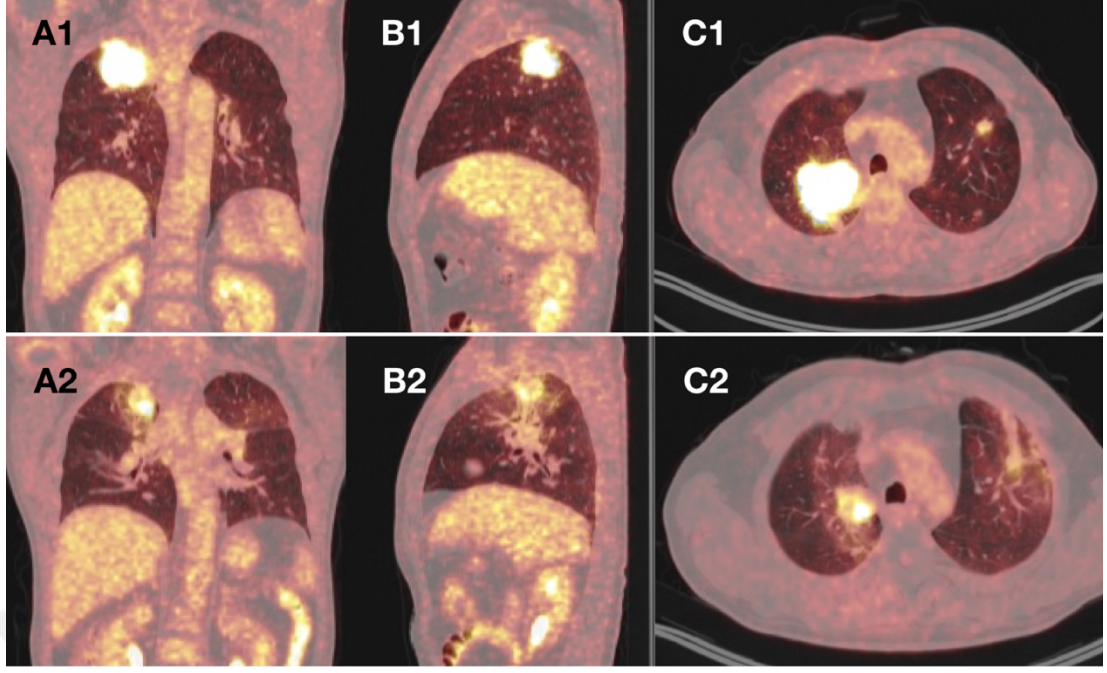
görüntüsü) progresyon gözlenmiş ayrıca tedavi öncesi mevcut olmayan KRAS G13X ve Q61X mutasyonları tedavi sonrası tespit edilmiştir (Resim 6).



A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 6: KRAS G13X ve Q61X içeren olgunun PET/BT görüntüsü

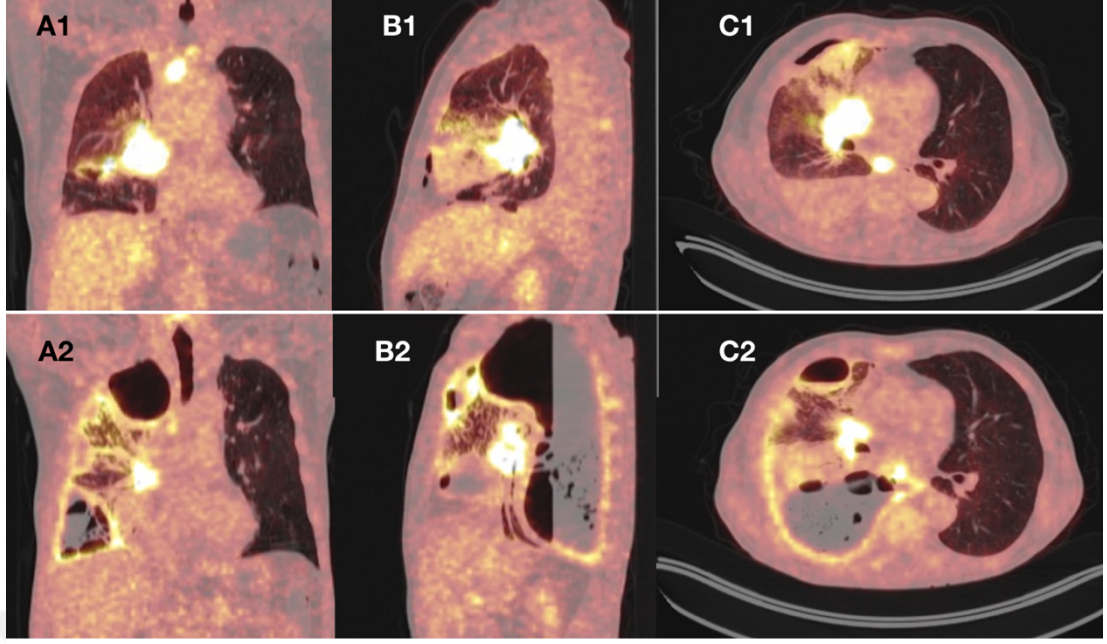
KRAS G13X mutasyonu içeren diğer 3 olgu ise tedavi öncesi ve sonrası sadece KRAS G13X mutasyonu içermektedir ve primer tümörleri sağ akciğer üst lobda bulunmaktadır. Merkezi yerleşimli primer tümöre sahip bir olgu lokal ileri evre olarak tanı almış tedavi sonrası primer tümöründe minimal regresyon ve KRAS G13X mutasyonu SQI değerinde az miktarda azalma kaydetmiştir fakat tedavi sonrası kemik, sağ sürrenal bez, kolon ve prostat metastazları ortaya çıkmıştır. Diğer 2 olgu ise periferik yerleşimli primer tümöre sahip metastatik ileri evre olgulardır. Olgulardan birisinde tedavi öncesi hem kemik hem beyin metastazı mevcuttur ve tedavi sonrası metastazları stabil ve primer tümöründe minimal bir regresyon mevcuttur. Diğer olguda ise tedavi öncesi sadece kemik metastazı mevcutken, tedavi sonrası beyin metastazı gerçekleşmiştir. Olgunun primer tümörü tedavi sonrası tama yakın regrese olmuş ve KRAS G13X SQI değeri benzer şekilde düşüş göstermiştir. KRAS G13X SQI değeri 16,1 değerinden 8,4 değerine gerilemiş yaklaşık olarak %48 oranında düşüş göstermiştir (Resim 7).



A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 7: KRAS G13X içeren olgunun PET/BT görüntüsü

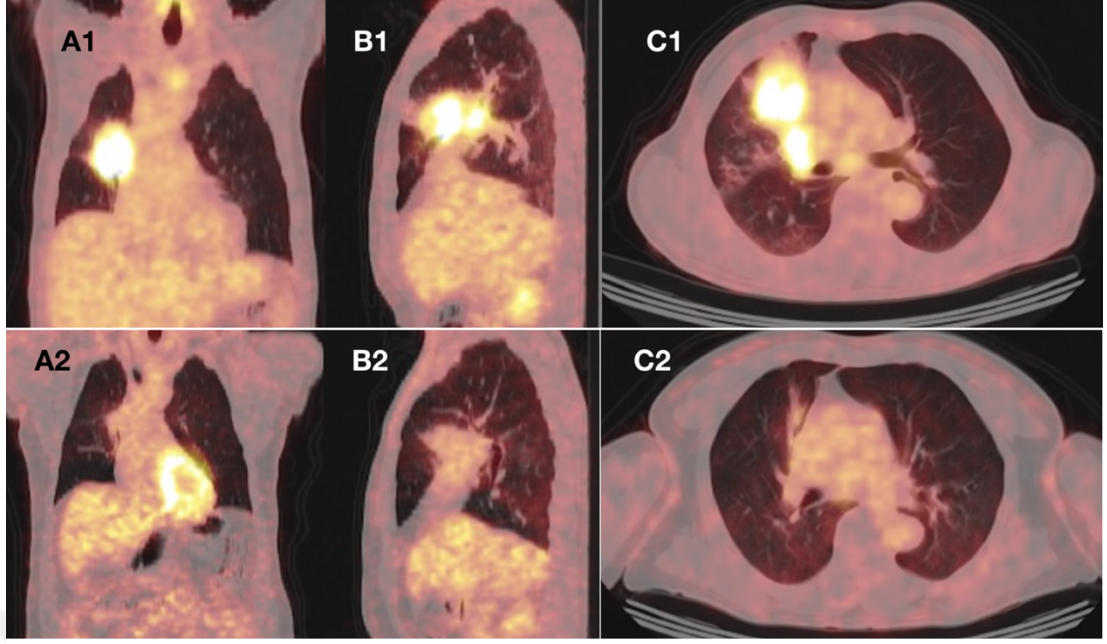
Sadece KRAS Q61X mutasyonu içeren bir olgu mevcuttur. Bu olgu primer tümörü sağ akciğer üst lob merkezi yerleşimli metastatik ileri evre bir olgudur. Tedavi öncesinde kemik, sürrenal bez ve pankreas başında metastaz barındıran olguda KRAS Q61X mutasyonu saptanmamıştır. Tedavi sonrası primer tümöründe, pankreas başı lezyonunda ve kemik lezyonlarında belirgin regresyon gözlenirken sol sürrenal bezde bulunan metastatik lezyonda boyutsal ve metabolik tam yanıt alınmıştır. Bununla birlikte olguda tedavi sonrası KRAS Q61X mutasyonu saptanmış ayrıca pankreas gövde bölgesinde yeni gelişen lezyon ve karaciğer hipodens hipermetabolik lezyon ortaya çıkmıştır. (Resim 8).



A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 8: KRAS Q61X içeren olgunun PET/BT görüntüsü

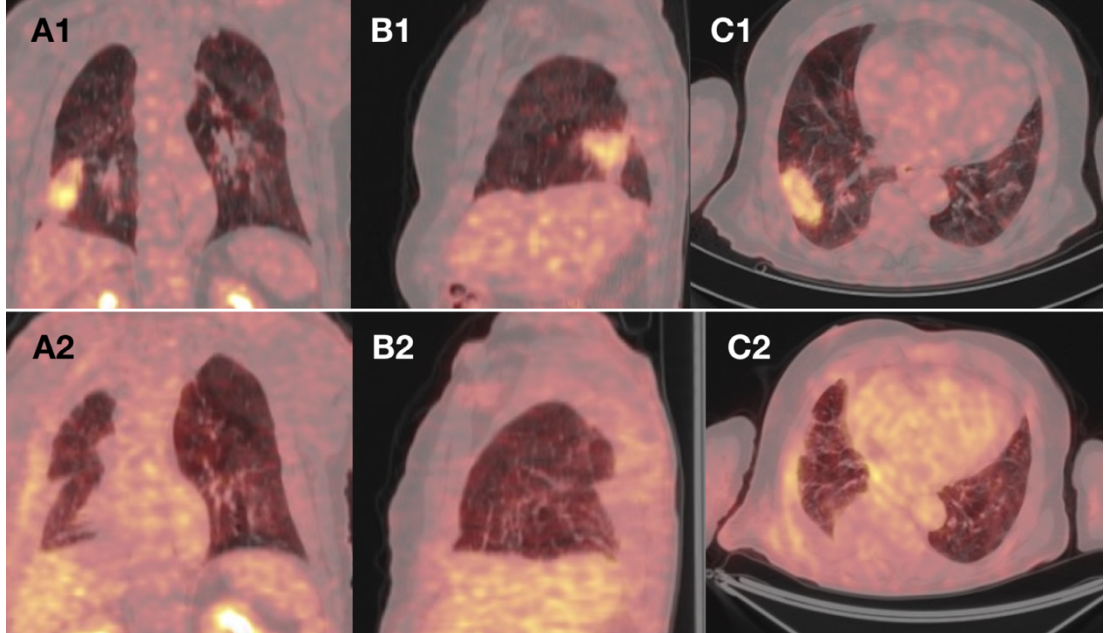
Tedavi öncesi ve sonrası KRAS G12X mutasyonu içeren 8 olgu mevcuttur. Olguların tamamında tedavi öncesi KRAS G12X mutasyonu saptanırken 4'ünde tedavi sonrası KRAS G12X mutasyonu ortadan kalkmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası KRAS G12X mutasyonu saptanan 4 olgunun tamamı kemik metastazı gösteren metastatik ileri evre olgulardır. Bu olgulardan 2'sinin ayrıca sürrenal bezler ve karaciğer metastazlarında mevcuttur. Bu 4 olgunun tamamı tedavi sonrası progresyon göstermiş olup KRAS G12X mutasyonu SQI değerlerinde yükselme gözlenmiştir. Tedavi sonrası mutasyon saptanmayan 4 olgu mevcuttur. Bu olgulardan birisi erken evre olup cerrahi müdahale ile primer tümörü çıkarılan olgudur. Diğer 3 olgudan 2'si lokal ileri evre olgulardır ve birisine kemoterapi diğerine ise cerrahi müdahale ve kemoterapi uygulanmıştır; ancak 2'i olguda da tedavi sonrası kemik metastazları ortaya çıkmıştır. Metastatik ileri evre olan son olgu ise kemik beraberinde beyin metastazları göstermektedir. Cerrahi müdahale ve radyoterapininde dahil olduğu birinci basamak tedavi sonrası olguda hem primer tümör hemde metastaz odakları regrese olmuştur (Resim 9).



A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 9: KRAS G12X içeren olgunun PET/BT görüntüsü

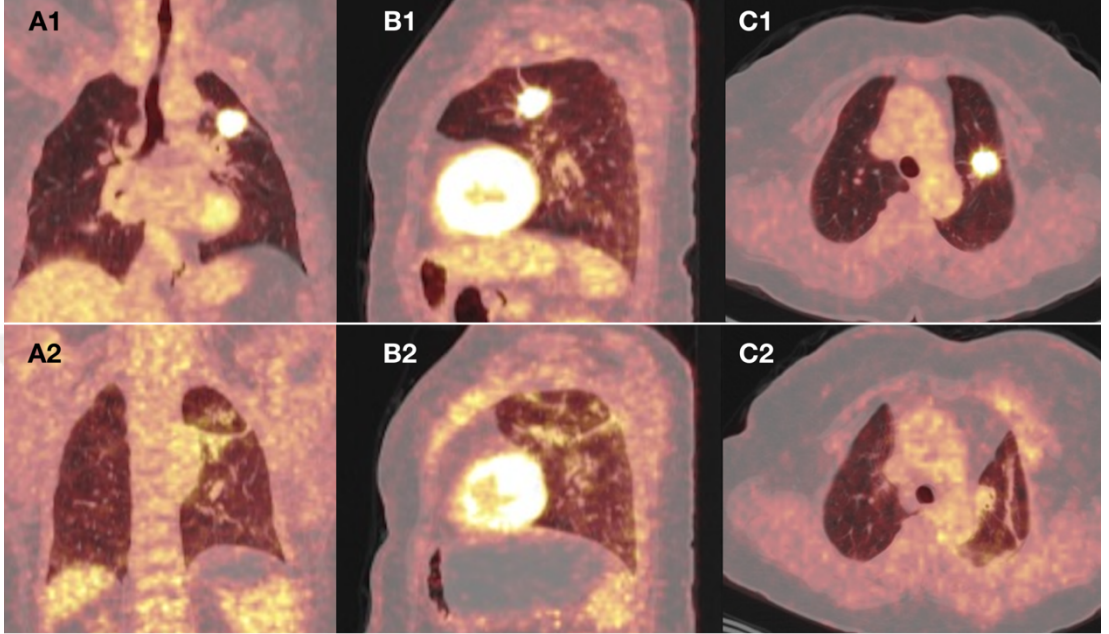
KRAS A146X mutasyonu içeren bir olgu mevcuttur. Erken evrede tanı alan olguda cerrahi işlem uygulanmıştır. KRAS A146X mutasyonu tedavi sonrası ortaya çıkmıştır. Tedavi sonrası sağ hemitoraksta yeni gelişen plevral efüzyon mevcuttur.



A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 10: KRAS A146X içeren olgunun PET/BT görüntüsü

BRAF V600E mutasyonu içeren bir olgu mevcuttur (Resim 11). Olgu beyin metastazına sahip ileri evre olgusudur. Tedavi öncesi tespit edilen BRAF V600E mutasyonu tedavi sonrası tespit edilmemiştir. Aynı zamanda tedavi sonrası olguya ait primer tümör ve metastaz kemoterapi ve radyoterapi yoluyla regrese olmuştur.



A1 : Tedavi öncesi karşıdan, B1 : Tedavi öncesi yandan, C1 : Tedavi öncesi aşağıdan
A2 : Tedavi sonrası karşıdan, B2 : Tedavi sonrası yandan, C2 : Tedavi sonrası aşağıdan

Resim 11: BRAF V600E içeren olgunun PET/BT görüntüsü

Tartışma

Dünya genelinde en yüksek mortaliteye sahip kanser türü olan akciğer kanseri genellikle ileri evrelerde farkedilmesi ve tedavi yanıtlarının genellikle kötü olması sebebiyle önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Akciğer kanserinin en büyük alt grubu akciğer adenokarsinomudur ve yaklaşık yarısında onkogen mutasyonları tespit edilmektedir (Aisner, vd., 2016, Barlesi, vd., 2016, Pathak, vd., 2017, Calvayrac, vd., 2017, Cicek, vd., 2018). Günümüzde onkogen mutasyonların sonucu oluşan onkoproteinlere karşı hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi tedavi başarısını yükseltmiş olsa da direnç mutasyonları ve tümör heterojenitesi sebebiyle başarı belli bir seviyede kalmıştır. Ayrıca onkogen tespitinin invaziv bir işlem olan tümör biyopsisiyle yapılması tedavi sürecinde tümörün moleküler ilerleyişinin izlenmesini neredeyse imkansız kılmaktadır. Günümüzde önemini artırmaya başlayan likit biyopsi uygulamaları olgulara ait tüm tümöral oluşumlar hakkında moleküler bilgi veren ve tümörün moleküler monitörizasyonuna katkı sağlayan bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Tedavi sırasında istenilen zaman ve sıklıkta uygulanabilir olması tümörün moleküler evrimini, tedaviye olan yansımalarını anlamamız açısından umut vadetmektedir. Ayrıca moleküler gelişimin anlaşılmasına başlaması tedavi seçeneklerinin artmasına ve başarının yükselmesine katkı sağlayacaktır. Tüm bunlarla birlikte görüntüleme yöntemlerinin moleküler monitörizasyonla birleştirilerek tanının, tedavinin ve prognoz tayininin daha başarılı yapılması muhtemeldir.

Bu tez çalışmasında akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık yarısında gözlemlenen hedefe yönelik tedavi ve prognoz tayininde önemli yeri olan onkogenlerin yaklaşık %80'nini kapsayan *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını periferik kan cfDNA likit biyopsisinden tedavi öncesi ve tedavi sonrası değişimlerini belirledik ayrıca primer tümörün pozisyonu ve yerleşimiyle ilişkisini, metastaz ilişkilerini ve tedavi yanıtlarına etkilerini araştırdık.

Çalışmaya dahil edilen toplam 52 olgunun %21 kadındır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 verilerine göre ülkemizde içinde bulunduğu bölgede kadınlarda akciğer kanseri görülme sıklığı %20-30 arasında değişmektedir. Bu veriler ışığında kadın ve erkek olgu sayılarımız literatüre benzer bir oran göstermektedir. Bulgularımızda cinsiyet açısından öne çıkan en önemli unsur, kadın olgu sayımız az olmasına ramen *EGFR* mutasyonu tespit edilen olguların yarısının kadın olgular olmasıdır. Literatüre

bakıldığında Zang ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları EGFR mutasyonlarının asya kökenli ve kafkas kökenli olgulardaki prevalansını değerlendirdikleri çalışmada EGFR mutasyonlarının kafkas kökenli olgularda yüksek oranda akciğer adenokarsinomlarında ve erkeklerin 2,5 katı oranda kadınlarda gözlemlendiği bildirilmektedir. Ayrıca Barlesi ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada EGFR mutasyon sıklığının KHDAK olgularında %11, adenokarsinom alt tipinde %12 kadınlarda %21 ve hiç sigara kullanmamış olgularda %44 olarak göstermektedir. Bizim bulgularımız adenokarsinom alt tipinde %11,5, kadınlarda %27 ve hiç sigara kullanmayanlarda %33 ile benzer bir profil sergilemektedir. *EGFR* mutasyonlarının kadın olgularda daha fazla oranda gözlenmesi cinsiyet ilişkili fenotipin *EGFR* mutasyonu oluşturmaya yatkınlık oluşturabileceğini düşündürmektedir; ancak sigara kullanımının toplumsal değer yargılarına göre şekillenebilecek olması olgularımızın bulunduğu yaş grubunda kadınların genelde sigara kullanma alışkanlıklarının düşük seviyede olması sigara kullanımı ve *EGFR* mutasyonu ilişkisini desteklememektedir.

Literatürde akciğer kanserinin başta sigara kullanımı olmak üzere ileri yaş, mesleki karsinojen maruziyeti, hava kirliliği, iyonize radyasyon, biyolojik kanserojenlere maruz kalma ve genetik yatkınlık gibi birçok nedenle ortaya çıktığı gösterilmektedir (Cruz, vd., 2011, Field, vd., 2012, Coté, vd., 2012, de Groot, vd., 2018). Bulgularımız ortalama 64 yaş, %71 sigara kullanımı, %65 şehir yaşamı ve stresli meslek ve %50 oranında yakın akrabada kanser ile literatürü destekler niteliktedir. Ayrıca bulgularımızda sürrenal bez metastazı mevcut olgularda sigara kullanım hikayesi bulunan olguların oranı %90 olarak gözlenmiştir. Gleeson ve arkadaşlarının 2014 yılında sürrenal bez metastazı gösteren akciğer kanserli olgularla yaptığı araştırmada olguların %92,8'inde sigara kullanımının mevcut olduğu gözlenmiştir ve bizim bulgumuza benzerlik göstermektedir.

Literatürde KHDAK olgularında onkogen mutasyonlarının görülme sıklıkları tümör biyopsisi örneklerinden elde edilen verilere dayanarak gösterilmektedir. Mutasyon sıklıkları Asyalı ve Kafkas kökenli olmaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Tartışmamızda bizim de olgularımızın içinde bulunduğu Kafkas kökenli olguların verileri baz alınarak değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir. Agyeman ve arkadaşlarının 2018 yılında 2078 ileri evre KHDAK olgusuyla yaptıkları çalışmada *EGFR* mutasyon oranını %12 ve *KRAS* mutasyon oranını %29 olarak göstermektedir. Barlesi ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları 13425 akciğer adenokarsinomlu olguyla

yaptıkları çalışmada *EGFR* mutasyon oranı %12, *KRAS* mutasyon oranı %32, *BRAF* mutasyon oranı %2 ve *PIK3CA* mutasyon oranı %2 olarak saptanmıştır. Ohashi ve arkadaşlarının 2013 yılında 4562 akciğer kanserli olgu ile yaptıkları araştırmada *NRAS* mutasyon sıklığı yaklaşık %1 olarak tespit edilmiştir. Bizim de 2015 yılında KHDAK olgularının tümör kesitlerinde yapmış olduğumuz çalışmada sırasıyla *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* ve *NRAS* gen mutasyonları %8,7, %28,7, %1,2, %7,5 ve %1,2 olarak tespit edilmiştir (Çalışkan, vd., 2015). Literatürde Kafkas kökenli olgularda tümör biyopsisinden yapılan çok sayıdaki çalışma benzer sonuçları göstermektedir. Çalışmamızda olguların %11'inde *EGFR* mutasyonu, %35'inde *KRAS* mutasyonu, %2'sinde *BRAF* ve %2'sinde *NRAS* mutasyonu tespit edilmiştir. Çalışmamız *EGFR* mutasyon sıklığı literatüre benzerlik göstermektedir; ancak *KRAS* mutasyon sıklığının bir miktar daha yüksek olması farklılık göstermektedir. Bu farklılık literatürde bildirilen *KRAS* mutasyonlarının sık gözlenen *KRAS* kodon 12, 13 ve 61 mutasyonlarını içermesinden kaynaklandığını gözlemledik. Sadece bu üç mutasyon tipi düşünüldüğünde oranımız %27 seviyesine inmektedir ve bu durum literatüre benzerlik göstermektedir. Oranımızın %35 seviyelerinde çıkmasına sebep olan ve tümör biyopsisi ile araştırıldığında çok nadir gözlemlenen *KRAS* kodon 59, 117 ve 146 mutasyonlarının (Haigis, 2017) yaklaşık %7,5 oranında mevcudiyetidir. Tümörün heterojen yapısı sebebiyle bu klonların genellikle tümör biyopsisinin alındığı bölgelerden uzak bir konumda veya merkezi olması düşünülebilir. Bu mutasyonları içeren klonların nekroz ve apoptozise daha çok uğrayarak kan dolaşımına daha çok DNA bırakmış olabileceklerini düşünmekteyiz. Bu nadir mutasyonları içeren olgu sayısı 4 tür ve bu olguların 3'ünde primer tümör merkezi nekrozedir. Bir olgu mutasyonları tedavi sonrası tespit edilmiş erken evre bir olgudur. Tedavinin ilerleyen safhalarında tümör merkezinde nekrozla birlikte mutasyonların ortadan kalkmasını beklemekteyiz. Bu öngörüler ışığında bu mutasyonların tümörün erken evrelerinde ortaya çıkabileceğini zamanla daha agresif ve baskın klonların ön plana çıkarak bu klonları çevreleyip, bastırıp nekroz ve apoptoza yönlendirmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bu durumun mutasyonların tümör biyopsisinde çok az cfDNA örneklerinde ise yüksek oranda gözlenebilmesine sebep olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca tümör biyopsisi sadece örneğin alındığı bölgeyi yansıtmakta akciğer içi yeni oluşumlar ve uzak metastazlar hakkında genetik bir bilgi sunmamaktadır. Bu sebeple mutasyonların tümör biyopsisinde nadir tespit edilmesi muhtemeldir. Tespit etmiş

olduğumuz bu mutasyonların invaziv yeteneği yüksek klonlarda bulunduğu ve akciğer içi diğer oluşumlar veya uzak metastazlardan kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir. Ancak bu mutasyonları içeren olgularımızdan biri hariç metastatik olmayan lokalize ileri evre veya erken evre olgularıdır. Metastatik ileri evre olan tek olgu sadece sağ sürrenal bez metastazı bulunan olgudur. Sürrenal bez metastazı bulunan diğer hiçbir olguda bu nadir mutasyonlar saptanmamıştır. Likit biyopsi çalışmalarıyla tümörün moleküler evrimi içerisinde kendini gösteren çok sayıda mutasyonun tespiti ve bu mutasyonların klinik yansımalarının ortaya konabileceğini düşünmekteyiz.

Akciğer adenokarsinomlarında genel olarak likit biyopsi ile yapılan seri biyopsiler dahil çalışmaların büyük çoğunluğu hedefe yönelik tedavi seçeneği sunan *EGFR* mutasyonlarına ve bu tedavilere karşı oluşan direnç mekanizmaları üzerine yoğunlaşmaktadır (Pinsolle, vd, 2019, Voigt, vd., 2020, Iwama, vd., 2019, Malapelle ve Rolfo, 2019). Benzer şekilde *BRAF* V600E mutasyonu *ALK* ve *ROS1* yeniden düzenlenmeleri hedefe yönelik tedavi açısından önemli olduklarından yoğunlukla çalışılmakta ve takip edilmektedir. *KRAS* mutasyonları hedefe yönelik tedavilere direnç oluşturma ve prognostik belirteç olarak değerlendirmelere alınmakta birçok çalışmada *KRAS* mutant veya yabanıl tip olarak ya da *KRAS* kodon 12, 13 ve 61 mutasyonları olarak tartışılmaktadır (Camps vd., 2005, Gautschi vd., 2007, Suda, vd., 2010, Wang vd., 2010, Nygaard vd., 2013, Kim vd., 2013, Dowler Nygaard vd., 2014, Rizzo vd., 2016, Lai vd., 2018, Liu vd., 2019, El Osta vd., 2019). Literatürde henüz *KRAS* kodon 59, 117 ve 146 mutasyonlarının akciğer adenokarsinomlarındaki mutasyon sıklığı ve klinik önemine dair bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda 3 olguda (%6) kodon 117, 2 olguda (%4) kodon 59 ve 1 olguda (%2) kodon 146 mutasyonu saptanmıştır. Benzer şekilde akciğer adenokarsinomlarında nadir gözlemlenen mutasyonlardan olan *NRAS* kodon 13 mutasyonu çalışmamızda %2 oranında tespit edilmiştir. Likit biyopsi çalışmalarının sonuçları biriktikçe bu mutasyonlara dair bilgilerin daha çok gün yüzüne çıkacağını düşünmekteyiz.

Mutasyon birliktelikleri açısından bakıldığında çalışmamızda 5 olguda mutasyon birliktelikleri gözlemlenmiştir. *KRAS* K117X mutasyonu bulunan 3 olgunun 1'inde *EGFR* Ex19Del mutasyonu, 1'inde *KRAS* A59X mutasyonu ve 1'inde *NRAS* G13X mutasyonu eşliğinde *KRAS* A59X mutasyonu gözlemlenmiştir. Hiçbir olguda tek başına tespit edilmemiş olan bu mutasyonun yüksek heterojenite içeren tümörlerde ortaya çıktığı fikrini akla getirmektedir. Benzer şekilde *KRAS* G13X mutasyonu

bulunan 2 olgunun 1'inde *EGFR* Ex19Del mutasyonu ve 1'inde *KRAS* Q61X mutasyonu birlikteliği gözlenmiştir. *KRAS* G13X ve *EGFR* Ex19Del mutasyonlarının *KRAS* K117X mutasyonu gibi heterojenitesi yüksek tümörlere özgü olabileceği fikrini oluşturmaktadır. Ayrıca *KRAS* A59X mutasyonu sadece *KRAS* K117X mutasyonu ile birliktelik göstermiştir tekbaşına hiçbir olguda gözlemlenmemiştir. Bu iki mutasyonun aynı klondan kaynaklandığı ve birlikte mutasyona uğradıkları düşünülebileceği gibi çok yakın lokalizasyonda bulunmaları mikro çevre etkisiyle bu iki mutasyonu içeren farklı klonların oluşmuş olabileceği düşünülebilir. Literatürde bu mutasyon birliktelikleriyle ilgili bilgi mevcut değildir. *EGFR* L858R mutasyonu, *BRAF* V600E mutasyonu, *KRAS* G12X ve A146X mutasyonları diğer mutasyonlarla birliktelik göstermemiştir. Bu mutasyonları içeren olguların primer tümörlerinin daha az heterojen olduğunu düşünmekteyiz.

Nadir gözlemlenen *NRAS* G13X mutasyonu çalışmamızda 1 olguda tedavi öncesinde tespit edilmiş tedavi sonrası bu mutasyona ek olarak olguda *KRAS* kodon 59 ve 117 mutasyonları ortaya çıkmıştır. *NRAS* mutasyonunun *KRAS*'ın bu nadir mutasyonlarının öncesinde olguda tespit edilmesi evrimsel olarak daha önde olabileceğini düşündürürken tedavi etkisiyle klonal baskınlık değişikliklerinin sessiz seyreden *KRAS* mutasyonlarının kendisini göstermesine sebep olmuş olabileceği de muhtemel görünmektedir. Olguda tedavi sonrası *NRAS* mutasyonu SQI değerinde bir miktar azalma gözlenmiştir. Bunun eşliğinde primer tümörde boyutsal ve metabolik bir miktar regresyon gözlenirken sağ hiler bölgede yeni oluşum tespit edilmiştir (Resim 5); ayrıca bu yeni oluşumla birlikte *KRAS* kodon 59 ve 117 mutasyonları ve uzak metastazlar ortaya çıkmıştır. Mutasyonlarının menşeinin bu yeni oluşum mu yoksa uzak metastazlar mı olduğu sorusu akla gelmektedir. Diğer *KRAS* kodon 59 ve 117 mutasyonları içeren olguyla birlikte düşünüldüğünde diğer olguda uzak metastaz mevcut değildir ve tedavi sonrası bu mutasyonlar ortadan kalkmıştır. Bu sebeple bu mutasyonların metastazlara atfedilmesi olası gibi görünmemektedir. Akciğer içi sağ hiler bölge yeni oluşumunun mutasyonların muhtemel kaynağı olduğunu düşünmekteyiz. Likit biyopsi çalışmalarıyla mutasyon değişimlerinin yeni oluşumlarla olan ilişkisi ve bunların klinik yansımalarına dair bilgiler arttıkça yeni tedavi stratejilerinin ortaya çıkabileceğini düşünmekteyiz.

Mutasyon değişimleri açısından bakıldığında tedavi öncesi *EGFR* mutasyonu içeren 6 olgu, *KRAS* kodon 12 mutasyonu içeren 4 olguda, *KRAS* kodon 59 ve 117 mutasyonu

birlikteliği gösteren 1 olguda ve *BRAF* V600E mutasyonu gösteren 1 olguda tedavi sonrası mutasyon tespit edilmemiştir. Tedavi öncesi mutasyonu bulunmayan 3 olguda *KRAS* kodon 13, 61 ve 146 mutasyonları ve tedavi öncesi *NRAS* mutasyonu bulunan 1 olguda tedavi sonrası *KRAS* kodon 59 ve 117 mutasyonları tespit edilmiştir. Bu veriler bize tedavinin tümör üzerinde güçlü moleküler etkiler veya klonlar arası yapay seçim oluşturduğu bilgisini sunmaktadır. Kabaca bakıldığında iyi prognoz beklentisi bulunan mutasyonların ortadan kalktığı kötü prognozla ilişkilendirilen mutasyonların tedavi sonrası ortaya çıktığı gözlenmektedir. Tedavi çeşidine göre dirençli ve hassas tümörlerin mutasyonlara göre identifikasyonu, mutasyonların likit biyopsi ile takibi ve uzun süreli tümör davranışlarının belirlenmesi klinisyene prognoz tayini ve tedavi seçimi açısından önemli avantajlar sağlayabilecektir.

Literatürde akciğer adenokarsinomlarında likit biyopsi ile elde edilen onkogen mutasyon değişim ve birlikteliklerinin görüntüleme verileriyle, metastazlarla, tedavi yanıtıyla, primer tümörün lokalizasyonu ve pozisyonuyla karşılaştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Rizzo ve arkadaşlarının 2016 yılında küçük hücreli dışı akciğer kanserinde bilgisayarlı tomografi özellikleri ile *EGFR*, *ALK*, *KRAS* mutasyonları arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri çalışmada *EGFR* mutasyonları için hava bronkogramı, plevralretraksiyon, küçük lezyon boyutu, fibrozis yokluğu ilişkisi, *ALK* yeniden düzenlenmeleri için plöleffüzyon ve *KRAS* mutasyonları için yuvarlak lezyon şekli, tümör dışı loblarda nodüller ilişkisi kurulmuştur. Çalışmada akciğer loblarına göre bir ayırım yapılmış fakat istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Tümörler merkezi ve periferik yerleşimli olarak ayrılmış; fakat mutasyonlarla ilişkisi tartışılmamıştır. Çalışmada mutasyonlar var veya yok olarak değerlendirilmiş mutasyon çeşidine göre bir ayırım yapılmamıştır. Ayrıca metastazlar ve tedavi yanıtları ile ilgili bilgi mevcut değildir. Bunların dışında tümör biyopsisi örneklerinden çalışılmış olduğu için mutasyonlar sadece biyopsinin alındığı bölgeyi yansıtmakta intratümöral heterojeniteyi, nodüller ve metastaz odaklarındaki genetik yapıyı yansıtamamaktadır. Ancak tümörün mutasyonlara göre oluşturdukları görüntüler hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bu bilgiler tümör monitörizasyonuna ve prognoz tayinine önemli katkılar sağlayabilecek niteliktedir. Yine Rizzo ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları ve bir önceki çalışmalarıyla dış merkez doğrulaması yaptıkları çalışmada *EGFR* ve *KRAS* mutasyonu içeren tümörlerin tomografik özelliklerini teyit etmişlerdir. Ancak yine tümörleri akciğer loblarına göre

ve merkezi veya periferik olmalarına göre ayrıma tabi tutmuşlar fakat mutasyonlara göre değerlendirmeye almamışlardır. Snoeckx ve ark. 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada Kistik hava boşluğu ilişkili akciğer kanserli 13 olgudan 11’inde adenokarsinom tespit etmişler 10’unda mutasyon taraması yapılmış 5’inde mutasyon tespit etmişlerdir. Olguların 2’sinde *KRAS* kodon 12 mutasyonu, 1’inde *EGFR* ekzon 18 mutasyonu, 1’inde *ALK* ve 1’inde *ROS1* tespit etmişlerdir. Ancak akciğer içi yerleşim ve pozisyonları ile ilgili bir ayırım yapmamışlardır.

Olguların akciğer içi primer tümör lokalizasyonları bakımından çalışmamızda sol akciğer üst lob konumlu *EGFR* Ex19Del mutasyonu ve *KRAS* K117X mutasyonu birlikteliği gösteren bir olgu hariç tutulduğunda *NRAS* kodon 13 , *KRAS* kodon 13, 59, 61, ve 117 mutasyonlarını içeren tüm olgular sağ akciğer üst lobda primer tümörü bulunan olgulardır ve çoklu mutasyon tespit edilen olguların tamamının primer tümörü bu lobda bulunmaktadır (Şekil 1). *KRAS* kodon 12 ve 146 mutasyonları sol üst, sağ orta ve alt loblarda primer tümörü bulunan olgularda gözlemlenmiştir (Şekil 2). Primer tümörü sağ akciğer üst lobda bulunan bir olgu hariç tüm *EGFR* mutasyonu bulunan olgular ve *BRAF* mutasyonu bulunan olgu sağ akciğer alt lob ve sol akciğer üst lobda primer tümörü bulunan olgulardır (Şekil 1 ve 2). Sağ akciğer üst lobda yoğunlaşan çok sayıda mutasyon ve mutasyon birliktelikleri bu lobun diğer loblara nispeten daha çok mutasyonlara açık ve heterojeniteye meyilli olduğunu düşündürmektedir. Akciğerde skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomların konum etkisi (side effect) ile farklı bölge ve genitörlerden kaynaklanması, kolon kanserlerinde sağ ve sol kolonların farklı özellikler sergilemesi gibi sağ akciğer üst lob bölgesinin özel bir karakteristiği olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca primer tümör merkezi nekroze olguların çoğunun bu lobda bulunması, nadir gözlemlenen *KRAS* mutasyonlarının primer tümörü bu lobda bulunan olgularda gözlenmesi ve akciğer adenokarsinomlarında en çok gözlemlenen *KRAS* kodon 12 mutasyonlarının çalışmamızda bu lobda tespit edilmemiş olması ayrıca kötü prognozla ilişkilendirilen *KRAS* kodon 13 ve 61 mutasyonlarının tamamının ve kemik metastazı gösteren olguların yaklaşık yarısının bu lobda primer tümörü bulunan olgularda saptanmış olması düşüncelerimizi destekler niteliktedir. Sağ ana bronşun 12-16 mm çapında ve sol ana bronşun 10-14 mm çapında genişliğe sahip olması ayrıca sağ ana bronşun karina ile daha geniş bir açı göstermesi sol akciğere nispeten sağ akciğerin dış ortamla daha yüksek etkileşime sahip olduğunu düşündürmektedir öyle ki trakeaya kaçan yabancı cisimlerin % 75’i sağ ana bronşa

gitmektedir. Sigara ve kanserojen gazlar gibi dış etkilere nispeten daha fazla etkilenen bu bölgede epigenetik değişikliklerin özelleşmesi muhtemeldir. Nispeten daha yüksek çevresel etki ve epigenetik farklılıkların tümörögenез açısından da loblar arasında farklar oluşabileceğini, tümör heterojenitesi ve genetik instabilite açısından loblar arası önemli farkların oluşabileceğini düşünmekteyiz. Sağ akciğer üst lobun yüksek genetik instabilite ve tümör heterojenitesine sahip olduğunu düşünmekle birlikte gelecekte bu loba özgü tedavi stratejilerinin özelleşebileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde akciğer kanseri vakalarında özellikle kemik, beyin, sürrenal bez ve karaciğer uzak metastazlarının sıklıkla gözlendiği gösterilmektedir (Quint, vd., 1996, Lohinai, vd., 2017). Çalışmamızda kemik metastazı bulunan 23 olgu, sürrenal bez metastazı bulunan 19 olgu, beyin metastazı bulunan 8 olgu ve karaciğer metastazı bulunan 5 olgu mevcuttur. Çalışmamız en çok gözlemlenen uzak metastazlar açısından literatürle benzerlik göstermektedir. KHDAK olgularının %30-45'inde kemik metastazları gözlenmekte ölüm sonrası otopsi örneklerinde %36 oranında kemik metastazı varlığı gösterilmektedir (Coleman, 2006, Jauković, vd., 2006, Tsuya, vd., 2007, Tamura, vd., 2015). Çalışmamızda %44 oranında kemik metastazı bulunan olgu mevcuttur ve literatüre benzerlik göstermektedir. Renaud ve arkadaşlarının ayrıca Guan ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmalarda *EGFR* mutasyonu bulunan olguların anlamlı şekilde kemik metastazları gösterdikleri gösterilmiştir benzer şekilde 2018 yılında Kuijpers ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma bu sonucu destekler niteliktedir. Çalışmamızda metastatik evrede tanı alan ve *EGFR* mutasyonu bulunan 3 olgu mevcuttur ve bu olguların 2'sinde kemik metastazı mevcuttur. Bulgumuz literatürü destekler niteliktedir fakat olgu sayımızın azlığı genelleme yapmamız açısından yetersiz görünmektedir. Yi ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada *EGFR*'nin osteoklast farklılaşması ve sağ kalımında RANK sinyal yolağıyla çapraz konuşmalar gerçekleştirerek önemli rol oynadığı gösterilmiştir. *EGFR* mutasyonlarının kemikte etkin rol oynayan RANK sinyal yolağını aktive ederek metastaz oluşumunda etken olduğu akla gelmektedir. Kuijpers ve arkadaşlarının 2018 yılındaki yayınlarında önerdikleri şekilde *EGFR* inhibitörleri yanında RANK inhibitörlerinin tedaviye dahil edilmesiyle metastaz oluşumunun engellenebileceği veya metastaz bölgesinde sitostatik etkinin oluşturulabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde primer tümörün akciğer içi yerleşimi ve mutasyonlarına göre kemik metastazlarını gösteren bir çalışma mevcut değildir. Toplamda 23 olgumuzda kemik metastazı mevcuttur ve bu olguların %70'i sağ akciğerde, %48'i sağ akciğer üst lobda lokalizedir. Olguların %61'inde mutasyon mevcuttur. *EGFR* L858R mutasyonu içeren bir olgu hariç mutasyon bulunan olguların tamamında *KRAS* mutasyonu gözlenmiştir. Bir olgu hariç *KRAS* G12X mutasyonu bulunan olguların tamamında kemik metastazı mevcuttur ve bu olgular sağ akciğer üst lob dışında primer tümörü bulunan olgulardır. Diğer *KRAS* mutasyonlarına sahip olguların yaklaşık yarısında kemik metastazı gözlemlenmiştir. Bu olguların tamamı sağ akciğer üst lobda primer tümörü bulunan olgulardır (Şekil 4). Bu durum primer tümörün akciğer içinde bulunduğu bölgeye göre farklı kemik metastazı afinitesi gösterebileceğini ve bu bölgelerde aynı genin farklı bölgelerinde mutasyonların oluşabileceği fikri akla gelmektedir. Xi ve Chen'in 2014 yılındaki derlemelerinde akciğer kanserlerinde kemik metastazlarının WNT sinyal yolağıyla ilişkili olabileceğini göstermişlerdir. Pacheco-Pinedo ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada *KRAS* mutasyonlarının WNT sinyal yolağında anlamlı aktivasyon artışına sebep olarak akciğer tümör gelişiminde rol oynadığını fare deneyleri ile göstermişlerdir. Günümüzde kemik metastazı oluşumunun moleküler mekanizmaları hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Gelecekte primer tümörün bölgesine ve içerdiği mutasyona göre kemik metastazı gerçekleştirme mekanizmalarının ortaya konması kemik metastazını önleyici stratejilerin geliştirilebileceğini böylece tedavi başarısının artırılabilceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda sürrenal bez metastaz oranı yaklaşık %37'dir. Sürrenal bez metastazı bulunan olguların %63'ünde mutasyon saptanmamış ve primer tümörleri sağ ve sol akciğere yaklaşık olarak eşit sayıda dağılmıştır. Ancak sağ sürrenal bez metastazı gösteren olguların primer tümörlerinin özellikle sağ akciğerde bulunması ve sol sürrenal bez metastazı bulunan olguların primer tümörlerinin özellikle sol akciğerde bulunması dikkat çekmektedir (Şekil 5). Ayrıca sol akciğer üst lob apikal-posterior segmentte primer tümörü bulunan 6 olgunun sol sürrenal bezde metastaz oluşturmaları ve sağ akciğer alt lobda primer tümörü bulunan 3 olgunun sağ sürrenal beze metastaz gerçekleştirmiş olması dikkat çekicidir. Bu durum bir şekilde bu loblar ve özellikle bu bölgeler arasında aynı taraftaki sürrenal beze karşı bir afinitenin var olabileceğini düşündürmektedir. Kemik metastazlarına benzer şekilde bu bölgelerin sürrenal bezlere metastaz yapma mekanizmalarının ortaya çıkarılabilmesi, farklarının ortaya

konabilmesi metastaz önleyici tedavi stratejilerin geliştirilmesi tedaviye önemli katkılar sağlayabilecektir.

Çalışmamızda olguların yaklaşık %15'inde beyin metastazı, %10'unda karaciğer metastazı, %4'ünde pankreas metastazı ve %4'ünde böbrek, kolon, dalak ve prostat metastazları gözlenmiştir. Bu metastazlar açısından akciğerler ve loblarına göre anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. *BRAF* mutasyonu gösterip sadece beyin metastazı gösteren 1 olgu ve mutasyonu bulunmayıp karaciğer ve dalak metastazı gösteren 1 olgu hariç tüm olgularda kemik veya sürrenal bez metastazı gözlenmiştir. Bu metastazların genel olarak kemik ve sürrenal bez metastazlarına primer tümörün yerleşim şekli veya moleküler yapısına bağlı olarak eşlik ediyor olabileceğini düşünmekteyiz. Örneğin 2 olgumuzda pankreas metastazı gözlenmiştir. Bu iki olgu da kemik, sürrenal bez ve karaciğer metastazıda mevcuttur. İki olgu da primer tümörü merkezi yerleşimli olgulardır. Daha çok veri ile her primer tümörün konum, pozisyon ve moleküler varyasyonlarına göre belli bir metastaz profilinin olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki olguların %79'u primer tümörü periferik yerleşimli olgulardır. Bu olguların %46'sında mutasyon gözlenirken primer tümörü merkezi yerleşimli olguların %36'sında mutasyon gözlenmiştir. Primer tümörü periferik yerleşimli olgularda mutasyon varlığına bakılmaksızın yoğun bir metastaz eğilimi göze çarpmaktadır. Mutasyon içeren primer tümörü periferik yerleşimli olguların %92'si kemik metastazı gösterirken mutasyon içermeyen olguların %80'i sürrenal bez metastazı göstermişlerdir. Mutasyon içermeyen primer tümörü periferik yerleşimli ve sürrenal bez metastazı göstermiş olguların %50'sinde primer tümör sol akciğer apikal-posterior segmentinde gözlemlenmiştir. Primer tümörü merkezi yerleşimli olgularda ise uzak metastaz sadece mutasyonu bulunan olgularda gözlemlenmiş mutasyon bulunmayan olgularda ise primer tümör akciğer içi yayılım göstererek akciğerin işlevini kaybetmesine vakaların ölümle sonuçlanmasına sebep olmuştur. Mutasyon bulunmayan olguların akciğer içiyle sınırlı kalmaları ve mutasyon içerenlerin *KRAS* mutasyonlarıyla birlikte en az 3 farklı organada metastaz göstermeleri genetik yapının metastaz yapma açısından farklılıklar yaratabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde akciğer kanserinde primer tümörlerin merkezi ve periferik yerleşimli olmalarına dair çalışmalar skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom ayrımı üzerine yoğunlaşmıştır (Krimsky, vd.,2016, Funai, vd., 2003, Mizushima, vd., 2000,

Nagashima, vd., 2012). Akciğer adenokarsinomlarında tümörün periferik veya merkezi olmasına göre mutasyon, metastaz ve prognoz değerlendirmesi yapan çalışma literatürde mevcut değildir. Primer tümörün merkezi veya periferik yerleşimli olmasına göre olguların tedavi yanıtları, mutasyon içerikleri, metastazları ve primer tümör lokalizasyonları açısından farklılıklar oluşturduğunu gözlemledik. Tanıda tümör yerleşiminin dikkate alınması heterojen yapı sergileyen akciğer kanserlerinde daha iyi tedavi stratejileri geliştirilmesine yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

Tedavi yanıtları açısından olgular değerlendirmeye alındığında genel olarak *EGFR* ve *BRAF* mutasyonu bulunan olguların tedaviye iyi yanıt verdikleri gözlenmiştir. *KRAS* mutasyonları açısından genel olarak kodon 12, 59, 117 ve 146 mutasyonları içeren olguların diğer *KRAS* mutasyonları ve *NRAS* mutasyonu bulunan olgulara göre daha iyi tedavi yanıtı verdikleri gözlenmiştir. Izar ve arkadaşlarının 2014 yılında 312 akciğer adenokarsinomlu olgunun *EGFR* ve *KRAS* mutasyonlarını prognostik verilerle retrospektif olarak değerlendirdikleri çalışmada *EGFR* mutasyonu bulunan olguların *KRAS* mutasyonu bulunan olgulardan belirgin şekilde daha iyi prognoza sahip olduğunu ve akciğer adenokarsinomları içerisinde farklı alt gruplar olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca *KRAS* mutasyonlarının da birbirinden farklı sağkalım gösterdiğini, kodon 13 ve 61 mutasyonlarının kodon 12 mutasyonlarından daha kötü prognoza sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamız olguların sağkalımlarını uzun süreli takibe almadığından birinci basamak tedaviye verilen yanıtlar değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmamızda benzer şekilde çok ileri safhaya gelmiş bir olgu dışında *EGFR* mutasyonu mevcut olguların *KRAS* mutasyonu bulunan olgulara göre tedaviye iyi yanıtlar verdiğini gözlenmiştir. *KRAS* mutasyonları açısından benzer şekilde kodon 12 mutasyonu bulunan olgular kodon 13 ve 61 mutasyonu bulunan olgulardan daha iyi tedavi yanıtı göstermiştir. Izar ve arkadaşlarının çalışmasında ayrıca *KRAS* kodon 12 mutasyonlarının sentezlenen aminoasitlere göre değişik prognoz gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Kullanmış olduğumuz moleküler teknik sebebiyle kodon içi mutasyon farkları tespit edilememiştir. Bu sebeple farklı aminoasit oluşturan baz değişimleri arasında bir karşılaştırmaya yapılamamıştır. Bu çalışma tümör dokusu örneklerinden yapıldığı için mutasyon birliktelikleri ve değişimlerini göstermediği gibi kodon 12, 13 ve 61 dışındaki *KRAS* kodonlarında mutasyon saptayamamıştır. Çalışmamızda *KRAS* kodon 59, 117 ve 146 mutasyonlarını saptanmış ve çok ileri safhaya gelmiş bir olgu hariç tedaviye iyi

yanıtlar verdiklerini gözlenmiştir. Ayrıca sadece *EGFR* mutasyonu bulunan olgular tedaviye tama yakın yanıt vermişler, *EGFR* mutasyonu eşliğinde *KRAS* kodon 117 mutasyonu bulunan bir olgunun hastalığın aşırı ilerlemiş olması sebebiyle tedaviye yanıt vermemiş, *EGFR* mutasyonu ve *KRAS* kodon 13 mutasyonu bulunan bir olgunun kemik metastazı da bulunduruyor olmasına rağmen tama yakın yanıt verdiğini gözlemlenmiştir (Resim 4). Bu bulgular ışığında mutasyon birlikteliklerinin ve farklı kodon mutasyonlarının farklı tedavi yanıtlarına yol açabileceğini düşünmekteyiz. Katado ve arkadaşlarının 2016 yılında yine tümör biyopsilerinden yapmış oldukları çalışmada olguların 5 yıllık sağkalımlarını kodon 12 mutasyonları için %67 kodon 61 için %43 ve kodon 13 için % 19 olarak saptanmıştır. Izar ve arkadaşlarının ve bizim çalışmamıza benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışmalarında *KRAS* kodon 146 mutasyonunda tespit etmişler fakat değerlendirmeye almamışlardır. Schildgen ve arkadaşlarının 2016 yılındaki çalışmalarında 951 akciğer adenokarsinomlu olgunun tümör biyopsi örneklerinden *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* ve *ALK* mutasyonları çalışılmış *KRAS* kodon 59, 117 ve 146 mutasyonları tespit edilememiştir. Tümör biyopsisi sebebiyle çok nadir tespit edilen bu mutasyonların doğal olarak klinik yansımaları literatürde mevcut değildir. Likit biyopsi çalışmalarıyla muhtemel daha fazla örnekleme klinikteki karşılıklarının zamanla ortaya konabileceğini düşünmekteyiz.

EGFR mutasyonu içeren 6 olgunun tümünde tedavi sonrası bu mutasyonlar ortadan kalkmıştır. Genel olarak *EGFR* mutasyonu bulunan olgular tedaviye olumlu yanıtlar vermişlerdir. Karachaliou ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada *EGFR* Ex19Del mutasyonu ve L858R mutasyonunu cfDNA örneklerinde incelemiş, L858R mutasyonu bulunan olguların belirgin şekilde ortalama sağ kalımın düşük olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada *EGFR* mutasyonu bulunan olguların mutasyona uğrayan ekzona göre farklı değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir. Olgu sayımız az olsa da çok ileri safhaya gelmiş bir olgu dışında *EGFR* Ex19Del mutasyonu bulunan olguların tedaviye belirgin şekilde iyi yanıt verdikleri gözlemlenmiştir. Resim 4'te *EGFR* Ex19Del mutasyonu içeren olgumuzun PET/BT görüntüsü sunulmuştur. Bu olguda tama yakın tedavi yanıtı alınmıştır. *EGFR* L858R mutasyonu bulunan 2 olgudan birisi erken evre olup tedaviye tam yanıt vermiştir. Bu olgunun PET/BT görüntüsü resim 3'te gösterilmiştir. Diğer olguda tedavi sonrası *EGFR* mutasyonu ortadan kalksada olguda genel bir progresyon oluşmuş ve vaka ölümle sonuçlanmıştır. *EGFR* L858R

mutasyonu içeren olgular için yetersiz örneklemimiz bulunması sebebiyle literatürle ilişki kurulamamıştır.

Karachaliou ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında *EGFR* mutasyonlarının *KRAS* mutasyonlarına göre ve *KRAS* kodon 12 mutasyonlarının diğer *KRAS* mutasyonlarına göre daha iyi prognozla ilişkili olduğu bildirilmekte ve bizim verilerimizle uyum göstermektedir. Bu sebeple bu mutasyonları içeren olguların çoğu tedaviden fayda görmüşler ve tedavi sonrası mutasyonları ortadan kalkmış veya SQI değeri gerilemesi göstermişlerdir. Resim 9'da tedavi öncesi *KRAS* G12X mutasyonu içeren ve tedavi sonrası bu mutasyonun tespit edilemediği ve tedavi iyi yanıt vermiş olan bir olgumuza ait PET/BT görüntüsü verilmiştir. Benzer şekilde literatürde kötü prognozla ilişkilendirilen *KRAS* kodon 13 ve 61 mutasyonu içeren olguların çoğu kötü tedavi yanıtı vermiş mutasyonların bir kısmı tedavi sonrası ortaya çıkmıştır. Resim 6'da *KRAS* G13X ve Q61X mutasyonu içeren olgunun PET/BT görüntüsü sunulmuştur. Olguda tedavi sonrası primer lezyonda tama yakın bir yanıt oluşurken mediastinal bilateral lenf nodlarında progresyon gözlenmiş ayrıca tedavi öncesi mevcut olmayan *KRAS* G13X ve Q61X mutasyonları tedavi sonrası tespit edilmiştir. Olguda metastaz odağının bulunmaması bu mutasyonların yeni oluşum gösteren bilateral lenf nodlarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Olgunun primer tümöründe baskın olan klonların tedavi etkisiyle gerilemesi ile kötü prognoz göstergesi *KRAS* kodon 13 ve 61 mutasyonlarını içeren ve uygulanan tedaviye dirençli klonların ön plana çıkarak yeni oluşumlar göstermiş olmaları muhtemeldir. Resim 7'de sadece *KRAS* G13X mutasyonu içeren bir olgumuzun PET/BT görüntüsü sunulmuştur. Olguda tedavi sonrası primer tümörde belirgin bir regresyon gözlenmiş ancak beyin metastazı ve ilave kemik metastazları ortaya çıkmıştır. Resim 8'de sadece *KRAS* Q61X mutasyonu bulunan olgunun PET/BT görüntüsü sunulmuştur. Bu olguda primer tümör ve metastazlarda tedavi sonrası regresyon gözlenirse de tedavi sonrası pankreas gövde bölümünde ve karaciğerde hiper metabolik lezyonlar oluşmuştur. *KRAS* kodon 146 mutasyonunu içeren bir olgu mevcuttur (Resim 10). Bu olgu erken evre olgusudur ve olguya cerrahi müdahale ve adjuvan komoterapi uygulanmıştır. Olguda tedavi öncesi mutasyon saptanmazken tedavi sonrası *KRAS* kodon 146 mutasyonu tespit edilmiştir. Operasyon bölgesi komşuluğunda operasyona sekonder düşük SUV değerli FDG tutulumu ve sağ hemitoraksta yeni gelişen plevral efüzyon gözlenmiştir. Olgu takip altındadır ve yeni ortaya çıkan *KRAS* kodon 146 mutasyonu sebebiyle tarafımızda

progresyon bekleklentisi mevcuttur. *KRAS* kodon 13, 61 ve 146 mutasyonlarının tedavi sonrası ortaya çıkmaları sebebiyle tedaviye dirençli klonlardan kaynaklanıyor olabileceklerini ve yeni oluşumların altında yatan neden olabileceklerini düşünmekteyiz. Elde ettiğimiz veriler moleküler değişikliklerin dinamik yapıya sahip olduklarını veya tümör heterojenitesi sebebiyle tedavi esnasında kimi mutasyonların ortadan kalkabileceğini, kimi mutasyonların ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Bu sebeple olguların tedavi boyunca moleküler takibinin yapılmasının tedavi başarısına önemli katkılar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Robinson ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları vaka sunumunda *BRAF* V600E mutasyonu bulunan akciğer adenokarsinomlu olgunun yalnızca beyin metastazı gösterdiği hedefe yönelik tedavi ile tama yakın yanıt alındığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da *BRAF* V600E mutasyonu bulunan bir olgu mevcuttur benzer şekilde sadece beyin metastazı gösteren bu olgu kemoterapi ve radyoterapi ile tama yakın tedavi yanıtı göstermiştir (Resim 11). Gautschi, ve arkadaşlarının 2015 yılında 35 akciğer adenokarsinomlu ve *BRAF* mutasyonu bulunan olguyla yaptıkları hedefe yönelik tedavi çalışmasında uzak metastazı bulunan toplam 6 olgu mevcuttur ve bu olguların tamamı beyin metastazı gösteren olgulardır. Bu durum *BRAF* mutasyonu bulunan olguların beyin metastazına yatkın olabilecekleri sonucunu akla getirmektedir. Var ise altında yatan mekanizmanın keşfedilmesiyle *BRAF* mutasyonu bulunan olguların beyin metastazını engelleyici önlemlerin alınarak tedavi başarısının yükseltilmesi muhtemeldir.

Literatürde akciğer adenokarsinomlu olguların onkogen mutasyonları ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur fakat bu çalışmaların çok büyük çoğunluğu tümör biyopsisi örnekleriyle yapıldığından tümörün moleküler evrimi, mekansal ve zamansal tümör heterojenitesi gibi moleküler değişim ve dönüşümleri yansıtmayıp anlık durumu ve sadece biyopsinin alındığı bölge hakkında bilgi verebilmektedir. Bu sebeple çoklu mutasyon birliktelikleri, mutasyon değişimleri ve bunların fenotipe yansımaları hakkında bilgi sunamamaktadır. Günümüzde likit biyopsi henüz rüştünü ispat edememiş olsa da tümörün tedavi boyunca moleküler monitörizasyonunu sağlaması ile gelecekte tümör hakkında daha geniş ve detaylı bilgiler elde etmemiz açısından önemli bir olanak olarak karşımıza çıkmaktadır. Akciğer adenokarsinomlu olgularda likit biyopsi ile yapılan çalışmalar genellikle hedefe yönelik tedavi ilişkili genetik değişiklikler üzerine yoğunlaşmaktadır. Çalışmalar genellikle mutasyonu var olan

olguların tümör yükü değişimleri ve tedavi ilişkisi tedavi direncine sebep olan mutasyonlar, cerrahi sonrası nüks, minimal rezidüel hastalık takibi veya farklı terapötik ajanlara ve kombinasyonlarına bağlı tedavi yanıtları üzerine yoğunlaşmaktadır. Giderek artan sayıdaki seri likit biyopsi çalışmalarıyla tümörün moleküler evrimi, heterojenitesi, pozisyon etkisiyle oluşan farklı fenotiplerin identifikasyonu, metastaz ilişkileri ve birçok özelliğın yakın gelecekte ortaya konabileceğini düşünmekteyiz.



Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda akciğer adenokarsinom tanısı alan olguların tedavi öncesi tanımlayıcı özellikleri, onkolojik görüntüleme verileri, periferik kan plazma cfDNA örneklerinden araştırılan onkogen mutasyonları kaydedilerek tedavi sonrası tedavi yanıtları, onkolojik görüntüleme veri değişiklikleri ve mutasyon değişiklikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar genel hatlarıyla aşağıda sıralanmıştır.

1. Olguların tanımlayıcı özellikleri açısından literatürle benzerlik gösteren ileri yaş, sigara kullanımı, stresli ve yoğun yaşam ve meslek, yakın akraba kanser geçmişi, kadınlarda erkeklere göre yüksek *EGFR* mutasyonu sıklığı ve sigara kullanıcılarında yüksek sürrenal bez metastazı gözlenmiştir.
2. Mutasyon sıklıkları açısından literatüre benzer mutasyon sıklıkları gözlenirken, literatürde belirtilmeyen *KRAS* geninin nadir mutasyonları yüksek sıklıkta tespit edilmiş mutasyon birliktelikleri, akciğer içi konum ve radyolojik özellikleri bakımından farklılıkları tespit edilmiştir.
3. Mutasyon birliktelikleri açısından literatürde henüz gösterilmemiş olan *KRAS* geninin farklı kodonlarının mutasyon birliktelikleri ve mutasyon birlikteliklerinin akciğerin belli bir bölgesinde yoğunlaşmış olduğunu tespit edilmiştir.
4. Mutasyon değişimleri açısından literatüre benzer olarak *EGFR* ve literatürde diğer *KRAS* mutasyonlarından daha iyi prognoz gösterdiği belirtilen *KRAS* kodon 12 mutasyonlarının tedavi sonrası ortadan kalkma veya SQI değerlerinde azalmalar gözlenmiştir. Yine literatürde daha kötü prognozla ilişkilendirilen *KRAS* kodon 13 ve 61 mutasyonlarının tedavi sonrası ortaya çıktığını veya olgularda progresyonlara eşlik ettiği gözlemlenmiştir.
5. Primer tümörlerin akciğer içi pozisyonları açısından literatürde bulunmayan, sağ akciğer üst lobda primer tümörü bulunan olguların diğer loblarda primer tümörü bulunanlara göre çoklu mutasyon içerenlerin sadece bu lobda bulunduğu, yüksek mutasyon sıklığı, yüksek kemik metastazı sıklığı ve *KRAS*'ın kodon 12 ve 146 dışındaki tüm *KRAS* mutasyonlarının bu lobda primer tümörü bulunan olgularda bulunduğu tespit edilmiştir.
6. Metastaz durumları açısından kemik metastazı gösteren olguların yoğunlukla sağ akciğerde bulunduğu ve yaklaşık yarısının sağ üst lobda bulunduğu, yüksek

oranda mutasyon gösterdiği ve özellikle *KRAS* mutasyonlarının kemik metastazlarıyla birliktelik gösterdiği gözlemlenmiştir. Sürrenal bez metastazları açısından sağ akciğerde primer tümörü bulunan olguların çoğunlukla sağ sürrenal beze, sol akciğerde primer tümörü bulunan olguların çoğunlukla sol sürrenal beze metastaz gerçekleştirdikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca sol akciğer apikal-posterior segmentteki 6 olgunu tümünde sol sürrenal beze metastaz saptanmışken sağ akciğer alt lobdaki 3 olgunun tamamının sağ sürrenal beze metastaz gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir.

7. Literatürde yeterli bilgi bulunmayan primer tümörün akciğer içi yerleşimi açısından primer tümörü periferik yerleşimli olguların metastaz sıklığının yüksek olduğu merkezi yerleşimli olgularda mutasyon bulunmayan 7 olgunun tamamının metastaz göstermeyerek akciğerin işlevini tamamen kaybetmesiyle sonuçlanan prognoz gösterdikleri tespit edilmiştir.
8. Olguların tedavi yanıtları açısından literatüre benzer şekilde EGFR mutasyonları bulunan olguların *KRAS* mutasyonu bulunan olgulara göre tedaviye daha iyi yanıt verdikleri ve *KRAS* kodon 12 mutasyonu içeren olguların kodon 13 ve 61 mutasyonu bulunan olgulara göre daha iyi yanıt verdikleri gözlenmiştir. Literatürde bulunmayan *KRAS* kodon 59, 117 ve 146 mutasyonları ve *NRAS* kodon 13 mutasyonlarını içeren olguların ise genel olarak iyi yanıtlar verdikleri gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda 52 olgu değerlendirmeye alınmış çok sayıdaki özelliğin az sayıda örnekleme bulunması sebebiyle bazı bulgular teyide muhtaç şekilde kalmıştır. Ancak örneklem sayısı daha yüksek özellikler açısından anlamlı kabul edilebilecek sonuçlar elde etmiştir. Sağ akciğer üst lobun diğer akciğer bölgelerine göre belirgin farklar barındırdığı tespit edilmiştir. Bu lobda primer tümörü bulunan olguların özellikle bir kategorizasyona tabi tutularak en iyi tedavi seçeneğinin belirlenmesinin tedavi başarısına katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. *KRAS* mutasyonu bulunan olguların mutasyon bulunan kodona göre değerlendirmeye tabi tutularak daha spesifik tedavi seçeneklerinin oluşturulmasının tedaviye katkı sağlayabileceği muhtemel görülmektedir. Primer tümörün bulunduğu bölge veya mutasyon içeriğine göre metastaz oluşturma afinitesi göstermesi bu özelliklere sahip olguların metastaz yapma mekanizmalarının ortaya konarak bu metastazların engellenebilmesi kanserin ilerleyişini engelleyerek tedavi başarısına katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda akciğer kanseri tedavisinde primer tümörün pozisyonunun, yerleşim şeklinin, mutasyon profilinin ve metastaz eğilimlerinin dikkate alınmasının heterojen yapı sergileyen bu kanser tipinde daha özelleşmiş tedavi yaklaşımları ve daha öngörülebilir prognozların oluşturulabileceğini düşünmekteyiz.



Kaynaklar

- Agyeman, A., Vallejo, J. J., Myers, A., & Blumenthal, G. M. (2018). Meta-analysis exploring the effect of oncogenic driver mutations on outcome of metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC) patients (pts) treated with immune checkpoint inhibitors (ICI) or docetaxel (doc).
- Aisner, D., Sholl, L. M., Berry, L. D., Haura, E. B., Ramalingam, S. S., Glisson, B. S., ... & Politi, K. A. (2016). Effect of expanded genomic testing in lung adenocarcinoma (LUCA) on survival benefit: The Lung Cancer Mutation Consortium II (LCMC II) experience.
- Alar, T., & Şahin, M. E. (2012). Akciğer Kanseri: Birinci Basamakta Tanı, Tedavi ve Korunma. *Smyrna Tıp Dergisi*, 68-74.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition.
- Alberg, A. J., Ford, J. G., & Samet, J. M. (2007). Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 132(3), 29S-55S.
- Almendo Navarro, V., Cheng, Y. K., Randles, A., Itzkovitz, S., Marusyk, A., Ametller, E., ... & Rye, I. H. (2014). Inference of Tumor Evolution during Chemotherapy by Computational Modeling and In Situ Analysis of Genetic and Phenotypic Cellular Diversity. *Cell Reports*, 2014, vol. 6, num. 3, p. 514-527.
- Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü (NIH) (2019 30 Eylül) Erişim adresi: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>
- Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J. P., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., ... & Escande, F. (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet*, 387(10026), 1415-1426.
- Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J., & Siu, L. L. (2013). Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, 501(7467), 355-364.
- Brandao, G. D. A., Brega, E. F., & Spatz, A. (2012). The role of molecular pathology in non-small-cell lung carcinoma—now and in the future. *Current Oncology*, 19(Suppl 1), S24.

- Brose, M. S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., ... & Roth, J. A. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer research*, 62(23), 6997-7000.
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255(5505), 197.
- Calvayrac, O., Pradines, A., Pons, E., Mazieres, J., & Guibert, N. (2017). Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. *European Respiratory Journal*, 49(4), 1601734.
- Campbell, J. D., Mazzilli, S. A., Reid, M. E., Dhillon, S. S., Platero, S., Beane, J., & Spira, A. E. (2016). The case for a pre-cancer genome atlas (PCGA). *Cancer Prevention Research*, 9(2), 119-124.
- Camps, C., Sirera, R., Bremnes, R., Blasco, A., Sancho, E., Bayo, P., ... & Rosell, R. (2005). Is there a prognostic role of K-ras point mutations in the serum of patients with advanced non-small cell lung cancer?. *Lung cancer*, 50(3), 339-346.
- Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H., & Goeddel, D. V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature*, 302(5903), 33.
- Cheng, H., Xu, X., Costa, D. B., Powell, C. A., & Halmos, B. (2010). Molecular testing in lung cancer: the time is now. *Current oncology reports*, 12(5), 335-348.
- Cheng, L., Alexander, R. E., MacLennan, G. T., Cummings, O. W., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., ... & Zhang, S. (2012). Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Modern Pathology*, 25(3), 347.
- Cicek, Y., Kosar, P. A., & Öztürk, Ö. (2018). Molecular genetics of lung cancer. *Eurasian Journal of Pulmonology*, 20(3), 111.
- Coleman, R. E. (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clinical cancer research*, 12(20), 6243s-6249s.
- Cooper G.M. (2016), Hücre, Moleküler Yaklaşım. İzmir: İzmir Tıp Kitap Evi
- Corces, M. R., Buenrostro, J. D., Wu, B., Greenside, P. G., Chan, S. M., Koenig, J. L., ... & Majeti, R. (2016). Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nature genetics*, 48(10), 1193.

- Costa, D. B., Halmos, B., Kumar, A., Schumer, S. T., Huberman, M. S., Boggon, T. J., ... & Kobayashi, S. (2007). BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS medicine*, 4(10), e315.
- Coté, M. L., Liu, M., Bonassi, S., Neri, M., Schwartz, A. G., Christiani, D. C., ... & Andrew, A. S. (2012). Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *European Journal of Cancer*, 48(13), 1957-1968.
- Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 605-644.
- Çalışkan, M., Bozkurt, G., Meydan, N., Meteoglu, İ., & Günel, N. S. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Onkogen Mutasyonlarının Araştırılması. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(3), 322-328.
- Dacic, S. (2011). Molecular diagnostics of lung carcinomas. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(5), 622-629.
- Davidson, D. D., & Cheng, L. (2019). Perspectives of lung cancer control and molecular prevention.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... & Davis, N. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949.
- de Bruin, E. C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D. C., Yates, L., ... & Grönroos, E. (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*, 346(6206), 251-256
- de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W., & Munden, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. *Translational lung cancer research*, 7(3), 220.
- Diaz Jr, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology*, 32(6), 579.
- Diaz Jr, L. A., Williams, R. T., Wu, J., Kinde, I., Hecht, J. R., Berlin, J., ... & Kinzler, K. W. (2012). The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*, 486(7404), 537.
- Dowler Nygaard, A., Spindler, K. L. G., Pallisgaard, N., Andersen, R. F., & Jakobsen, A. (2014). Levels of cell-free DNA and plasma KRAS during treatment of advanced NSCLC. *Oncology reports*, 31(2), 969-974.

- Dünya Sağlık Örgütü. Kanser insidans ve mortalite istatistikleri (2019 30 Eylül)
Erişim adresi: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>
- Dünya Sağlık Örgütü. Kanser. Genel bakış. (2019 30 Eylül) Erişim adresi:
https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- El Osta, B., Behera, M., Kim, S., Berry, L. D., Sica, G., Pillai, R. N., ... & Sholl, L. M. (2019). Characteristics and Outcomes of Patients With Metastatic KRAS-Mutant Lung Adenocarcinomas: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(5), 876-889.
- Endo, K., Oriuchi, N., Higuchi, T., Iida, Y., Hanaoka, H., Miyakubo, M., ... & Koyama, K. (2006). PET and PET/CT using 18 F-FDG in the diagnosis and management of cancer patients. *International journal of clinical oncology*, 11(4), 286-296.
- Enön, S., Tokat, A. O., & Güngör, A. (2005). The superiorities of invasive procedures in nodal staging of non-small cell lung cancers. *Tuberkuloz ve toraks*, 53(4), 401-406.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, 61(5), 759-767.
- Field, R. W., & Withers, B. L. (2012). Occupational and environmental causes of lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 33(4), 681-703.
- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921), 436.
- Funai, K., Yokose, T., Ishii, G. I., Araki, K., Yoshida, J., Nishimura, M., ... & Ochiai, A. (2003). Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *The American journal of surgical pathology*, 27(7), 978-984.
- Gao, R., Davis, A., McDonald, T. O., Sei, E., Shi, X., Wang, Y., ... & Meric-Bernstam, F. (2016). Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer. *Nature genetics*, 48(10), 1119.
- Gardefors, K. (2007). The Effects of PIK3CA Mutations on the Function and Structure of the Phosphatidylinositol 3-kinase p110 α Catalytic Subunit in Breast Cancer. Project in Microbial Biotechnology, Department of Biomedicine and Surgery Division of Oncology Faculty of Health Sciences Linköpings Universitet.

- Gautschi, O., Huegli, B., Ziegler, A., Gugger, M., Heighway, J., Ratschiller, D., ... & Gandara, D. R. (2007). Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer letters*, 254(2), 265-273.
- Gautschi, O., Milia, J., Cabarro, B., Bluthgen, M. V., Besse, B., Smit, E. F., ... & Oulkhovir, Y. (2015). Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer results from the European EURAF cohort. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(10), 1451-1457.
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., ... & Varela, I. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England journal of medicine*, 366(10), 883-892.
- Gleeson, F. C., Kipp, B. R., Levy, M. J., Voss, J. S., Campion, M. B., Minot, D. M., ... & Kerr, S. E. (2014). Lung cancer adrenal gland metastasis: optimal fine-needle aspirate and touch preparation smear cellularity characteristics for successful theranostic next-generation sequencing. *Cancer cytopathology*, 122(11), 822-832.
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306.
- Greaves, M. (2015). Evolutionary determinants of cancer. *Cancer discovery*, 5(8), 806-820.
- Guan, J., Chen, M., Xiao, N., Li, L., Zhang, Y., Li, Q., ... & Chen, L. (2016). EGFR mutations are associated with higher incidence of distant metastases and smaller tumor size in patients with non-small-cell lung cancer based on PET/CT scan. *Medical Oncology*, 33(1), 1.
- Haigis, K. M. (2017). KRAS alleles: the devil is in the detail. *Trends in cancer*, 3(10), 686-697.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Heppner, G. H. (1984). Tumor heterogeneity. *Cancer research*, 44(6), 2259-2265.
- Hirsch, F. R., Wynes, M. W., Gandara, D. R., & Bunn, P. A. (2010). The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(20), 4909-4911.

- Horii, A., Nakatsuru, S., Miyoshi, Y., Ichii, S., Nagase, H., Ando, H., ... & Nakamura, Y. (1992). Frequent somatic mutations of the APC gene in human pancreatic cancer. *Cancer research*, 52(23), 6696-6698.
- Hu, Z., Sun, R., & Curtis, C. (2017). A population genetics perspective on the determinants of intra-tumor heterogeneity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1867(2), 109-126.
- Ilić, M., & Hofman, P. (2016). Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy?. *Translational lung cancer research*, 5(4), 420.
- Ilie, M., Hofman, V., Long, E., Bordone, O., Selva, E., Washetine, K., ... & Hofman, P. (2014). Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine?. *Annals of translational medicine*, 2(11).
- Izar, B., Zhou, H., Heist, R. S., Azzoli, C. G., Muzikansky, A., Scribner, E. E., ... & Lanuti, M. (2014). The prognostic impact of KRAS, its codon and amino acid specific mutations, on survival in resected stage I lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(9), 1363-1369.
- Iwama, E., Sakai, K., Hidaka, N., Inoue, K., Fujii, A., Nakagaki, N., ... & Harada, T. (2019). Longitudinal monitoring of somatic genetic alterations in circulating cell-free DNA during treatment with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer*.
- Jauković, L., Ajdinović, B., Janković, Z., & Dugonjić, S. (2006). Incidence and imaging characteristics of skeletal metastases detected by bone scintigraphy in lung cancer patients. *Vojnosanitetski pregled*, 63(12), 1001-1005.
- Johnson, D., Shah, P., Collins, P., & Wigley, C. (2005). Pleura, lungs, trachea and bronchi. *Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 39th ed. Elsevier Churchill Livingstone, 1063-1080.
- Kadota, K., Sima, C. S., Arcila, M. E., Hedvat, C., Kris, M. G., Jones, D. R., ... & Travis, W. D. (2016). KRAS Mutation is a Significant Prognostic Factor in Early Stage Lung Adenocarcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 40(12), 1579.
- Karachaliou, N., Mayo-de las Casas, C., Queralt, C., de Aguirre, I., Melloni, B., Cardenal, F., ... & Ponce-Aix, S. (2015). Association of EGFR L858R

mutation in circulating free DNA with survival in the EURTAC trial. *JAMA oncology*, 1(2), 149-157.

- Karakas, B., Bachman, K. E., & Park, B. H. (2006). Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *British journal of cancer*, 94(4), 455.
- Karapinar, K., Aydogmus, U., Cansever, L., Kocaturk, C., Saydam, O., & Bedirhan, M. A. (2015). Factors affecting postoperative morbidity and mortality in patients who received neoadjuvant therapy for lung cancer. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 6, 299-302.
- Kılıç, C. (2016). Akciğerlerin Anatomisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, DOI: 10.4328/JCAM.964.
- Kim, H., Zheng, S., Amini, S. S., Virk, S. M., Mikkelsen, T., Brat, D. J., ... & Sloan, A. E. (2015). Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome research*, 25(3), 316-327.
- Kim, S. T., Sung, J. S., Jo, U. H., Park, K. H., Shin, S. W., & Kim, Y. H. (2013). Can mutations of EGFR and KRAS in serum be predictive and prognostic markers in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)?. *Medical Oncology*, 30(1), 328.
- Kobayashi, M., Sonobe, M., Takahashi, T., Yoshizawa, A., Ishikawa, M., Kikuchi, R., ... & Date, H. (2011). Clinical significance of BRAF gene mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer research*, 31(12), 4619-4623.
- Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., & Mitsudomi, T. (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer research*, 64(24), 8919-8923.
- Krimsky, W., Muganlinskaya, N., Sarkar, S., Vulchi, M., Patel, P., Rao, S., ... & Harley, D. (2016). The changing anatomic position of squamous cell carcinoma of the lung—a new conundrum. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 6(6), 33299.

- Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast, R. C., Gansler, T. S., Holland, J. F., & Frei, E. (2003). *Cancer medicine 6 (Vol. 2)*. Hamilton, ON: BC Decker.
- Kuijpers, C. C. H. J., Hendriks, L. E. L., Derks, J. L., Dingemans, A. C., van Lindert, A. S. R., van den Heuvel, M. M., ... & Willems, S. M. (2018). Association of molecular status and metastatic organs at diagnosis in patients with stage IV non-squamous non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 121, 76-81.
- Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L., (2000), *Temel Patoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri
- Lai, J., Du, B., Wang, Y., Wu, R., & Yu, Z. (2018). Next-generation sequencing of circulating tumor DNA for detection of gene mutations in lung cancer: implications for precision treatment. *OncoTargets and therapy*, 11, 9111.
- Lardinois, D., Weder, W., Hany, T. F., Kamel, E. M., Korom, S., Seifert, B., ... & Steinert, H. C. (2003). Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computed tomography. *New England Journal of Medicine*, 348(25), 2500-2507.
- Liu, W. J., Du, Y., Wen, R., Yang, M., & Xu, J. (2019). Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 107438.
- Liu, Z., & Roberts, T. M. (2006). Human Tumor Mutants in PI3K p110 α Subunit. *Cell cycle*, 5(7), 675-677.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., ... & Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Lohinai, Z., Klikovits, T., Moldvay, J., Ostoros, G., Raso, E., Timar, J., ... & Renyi-Vamos, F. (2017). KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. *Scientific reports*, 7, 39721.
- Malapelle, U., & Rolfo, C. (2019). Liquid biopsy as a follow-up tool: Comment on longitudinal monitoring of somatic genetic alterations in circulating cell-free DNA during treatment with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer*.

- Maley, C. C., Galipeau, P. C., Finley, J. C., Wongsurawat, V. J., Li, X., Sanchez, C. A., ... & Reid, B. J. (2006). Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nature genetics*, 38(4), 468.
- Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., ... & Buttitta, F. (2011). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*, 29(26), 3574-3579.
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., & Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes & cancer*, 2(3), 232-260.
- McPherson, A., Roth, A., Laks, E., Masud, T., Bashashati, A., Zhang, A. W., ... & Prentice, L. M. (2016). Divergent modes of clonal spread and intraperitoneal mixing in high-grade serous ovarian cancer. *Nature genetics*, 48(7), 758.
- Mitelman, F. (1994). Chromosomes, genes, and cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 44(3), 133-135.
- Mizushima, Y., Yamashita, R., Kusajima, Y., & Sugiyama, S. (2000). Prognostic comparison between peripheral and central types of squamous cell carcinoma of the lung in patients undergoing surgical resection. *Oncology reports*, 7(2), 319-341.
- Mroz, E. A., Tward, A. M., Hammon, R. J., Ren, Y., & Rocco, J. W. (2015). Intra-tumor genetic heterogeneity and mortality in head and neck cancer: analysis of data from the Cancer Genome Atlas. *PLoS medicine*, 12(2), e1001786.
- Nagashima, T., Sakao, Y., Mun, M., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Masuda, M., & Okumura, S. (2012). A clinicopathological study of resected small-sized squamous cell carcinomas of the peripheral lung: prognostic significance of serum carcinoembryonic antigen levels. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, oa-12.
- Nakatsuru, S., Yanagisawa, A., Ichii, S., Tahara, E., Kato, Y., Nakamura, Y., & Horii, A. (1992). Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Human molecular genetics*, 1(8), 559-563.

- Nanda, M. S., Sameer, A. S., Syeed, N., Shah, Z. A., Murtaza, I., Siddiqi, M. A., & Ali, A. (2010). Genetic aberrations of the K-ras proto-oncogene in bladder cancer in Kashmiri population. *Urology journal*, 7(3), 168-173.
- Naoki, K., Chen, T. H., Richards, W. G., Sugarbaker, D. J., & Meyerson, M. (2002). Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer research*, 62(23), 7001-7003.
- Nilsson, R. J. A., Karachaliou, N., Berenguer, J., Gimenez-Capitan, A., Schellen, P., Teixido, C., ... & van Keulen, M. (2016). Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(1), 1066.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23-28.
- Nussbaum, R.L., Mcinnes, R.R., Willard, H.F., (2006), Thompson&Thompson Tibbi Genetik, Güneş Kitabevi.
- Nygaard, A. D., Spindler, K. L. G., Pallisgaard, N., Andersen, R. F., & Jakobsen, A. (2013). The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, 79(3), 312-317.
- Ohashi, K., Sequist, L. V., Arcila, M. E., Lovly, C. M., Chen, X., Rudin, C. M., ... & Pan, Y. (2013). Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clinical Cancer Research*, 19(9), 2584-2591.
- Pacheco-Pinedo, E. C., Durham, A. C., Stewart, K. M., Goss, A. M., Lu, M. M., DeMayo, F. J., & Morrissey, E. E. (2011). Wnt/ β -catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium. *The Journal of clinical investigation*, 121(5), 1935-1945.
- Paik, P. K., Arcila, M. E., Fara, M., Sima, C. S., Miller, V. A., Kris, M. G., ... & Riely, G. J. (2011). Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *Journal of clinical oncology*, 29(15), 2046.
- Pathak, A., Rajappa, S., & Gore, A. (2017). Oncogenic drivers in nonsmall cell lung cancer and resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Indian journal of cancer*, 54(5), 1.

- Pinsolle, J., Mcleer-Florin, A., Levra, M. G., De Fraipont, F., Emprou, C., Gobbini, E., & Toffart, A. C. (2019). Translating Systems Medicine into Clinical Practice: Examples from Pulmonary Medicine with Genetic Disorders, Infections, Inflammations, Cancer Genesis, and Treatment Implication of Molecular Alterations in Non-Small-Cell Lung Cancers and Personalized Medicine. *Frontiers in medicine*, 6.
- Quint, L. E., Tummala, S., Brisson, L. J., Francis, I. R., Krupnick, A. S., Kazerooni, E. A., ... & Orringer, M. B. (1996). Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *The Annals of thoracic surgery*, 62(1), 246-250.
- Renaud, S., Seitlinger, J., Falcoz, P. E., Schaeffer, M., Voegeli, A. C., Legrain, M., ... & Massard, G. (2016). Specific KRAS amino acid substitutions and EGFR mutations predict site-specific recurrence and metastasis following non-small-cell lung cancer surgery. *British journal of cancer*, 115(3), 346-353.
- Riely, G. J., Marks, J., & Pao, W. (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(2), 201-205.
- Rizzo, S., Petrella, F., Buscarino, V., De Maria, F., Raimondi, S., Barberis, M., ... & Spaggiari, L. (2016). CT radiogenomic characterization of EGFR, K-RAS, and ALK mutations in non-small cell lung cancer. *European radiology*, 26(1), 32-42.
- Rizzo, S., Raimondi, S., de Jong, E. E., van Elmpt, W., De Piano, F., Petrella, F., ... & Lambin, P. (2019). Genomics of non-small cell lung cancer (NSCLC): Association between CT-based imaging features and EGFR and K-RAS mutations in 122 patients—An external validation. *European journal of radiology*, 110, 148-155.
- Robinson, S. D., O'Shaughnessy, J. A., Cowey, C. L., & Konduri, K. (2014). BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma with metastases to the brain responding to treatment with vemurafenib. *Lung cancer*, 85(2), 326-330.
- Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı Türkiye Kanser İstatistikleri (2019 30 Eylül) Erişim adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2014-yili-turkiye-kanser-istatistikleri.html>

- Schildgen, V., Lüsebrink, J., Schildgen, O., Stoelben, E., & Brockmann, M. (2016). Epidemiology of driver mutations in lung cancer in a German tertiary hospital in patients with testing indication. *Personalized medicine*, 13(4), 315-323.
- Schubbert, S., Shannon, K., & Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 295.
- Sharma, S. V., Haber, D. A., & Settleman, J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature reviews cancer*, 10(4), 241.
- Shlush, L. I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W. C., Brandwein, J. M., Gupta, V., ... & McLeod, J. L. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, 506(7488), 328.
- Sholl, L. M., Aisner, D. L., Allen, T. C., Beasley, M. B., Cagle, P. T., Capelozzi, V. L., ... & Mino-Kenudson, M. (2016). Liquid biopsy in lung cancer: a perspective from members of the pulmonary pathology society. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 140(8), 825-829.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.
- Silvestri, G. A., Tanoue, L. T., Margolis, M. L., Barker, J., & Detterbeck, F. (2003). The noninvasive staging of non-small cell lung cancer: the guidelines. *Chest*, 123(1), 147S-156S.
- Sinnatamby, C. S. (2006). Upper limb. Last's anatomy: regional and applied, 11th edn. Elsevier/Churchill Livingstone, Edinburgh, 78-81.
- Snoeckx, A., Reyntiens, P., Pauwels, P., Van Schil, P. E., Parizel, P. M., & Van Meerbeeck, J. P. (2019). Molecular profiling in lung cancer associated with cystic airspaces. *Acta Clinica Belgica*, 1-4.
- Steiling, K., Ryan, J., Brody, J. S., & Spira, A. (2008). The field of tissue injury in the lung and airway. *Cancer prevention research*, 1(6), 396-403.
- Strachan, T., & Read, A. P. (1999). Molecular pathology. *Human molecular genetics*, 3.
- Suda, K., Tomizawa, K., & Mitsudomi, T. (2010). Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(1), 49-60.

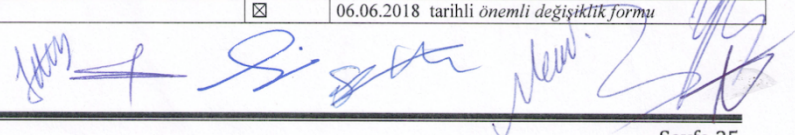
- Tamura, T., Kurishima, K., Nakazawa, K., Kagohashi, K., Ishikawa, H., Satoh, H., & Hizawa, N. (2015). Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer. *Molecular and clinical oncology*, 3(1), 217-221.
- Teixeira, V. H., Pipinikas, C. P., Pennycuick, A., Lee-Six, H., Chandrasekharan, D., Beane, J., ... & Ntoliou, P. (2019). Deciphering the genomic, epigenomic, and transcriptomic landscapes of pre-invasive lung cancer lesions. *Nature medicine*, 25(3), 517.
- Tomasetti, C., Vogelstein, B., & Parmigiani, G. (2013). Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 1999-2004.
- Travis, W. D. (2004). World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer. International Academy of Pathology International Association for the Study of Lung Cancer. Pathology and genetics of tumors of lung, pleura, thymus and heart.
- Tsao, J. L., Yatabe, Y., Salovaara, R., Järvinen, H. J., Mecklin, J. P., Aaltonen, L. A., ... & Shibata, D. (2000). Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1236-1241.
- Tsuya, A., Kurata, T., Tamura, K., & Fukuoka, M. (2007). Skeletal metastases in non-small cell lung cancer: a retrospective study. *Lung cancer*, 57(2), 229-232.
- Tunçel, N., Aydın, S., & Zeytinoğlu, M. (2006). İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi.
- Tuononen, K., Mäki-Nevala, S., Sarhadi, V. K., Wirtanen, A., Rönty, M., Salmenkivi, K., ... & Ellonen, P. (2013). Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma—superiority of NGS. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 52(5), 503-511.
- Turna, A., Ak, G., Kömürçüoğlu, E. B., Yurt, S., & Yılmaz, Ü. (2017). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sekizinci evreleme ve uygulamadaki etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 25 (3): 484-498.
- Turnpenny, P. D., & Ellard, S. (2005). *Emery's Elements of Medical Genetics*. Elsevier Health Sciences.

- Venook, A. P., Niedzwiecki, D., Innocenti, F., Fruth, B., Greene, C., O'Neil, B. H., ... & Meyerhardt, J. A. (2016). Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance).
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789.
- Voigt, W., Manegold, C., Pilz, L., Wu, Y. L., Müllauer, L., Pirker, R., ... & Prosch, H. (2020). Beyond tissue biopsy: a diagnostic framework to address tumor heterogeneity in lung cancer. *Current opinion in oncology*, 32(1), 68-77.
- Wang, S., An, T., Wang, J., Zhao, J., Wang, Z., Zhuo, M., ... & Duan, J. (2010). Potential clinical significance of a plasma-based kras mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(4), 1324-1330.
- Wang, X., Wang, M., MacLennan, G. T., Abdul-Karim, F. W., Eble, J. N., Jones, T. D., ... & Lopez-Beltran, A. (2009). Evidence for common clonal origin of multifocal lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(8), 560-570.
- Wangsa, D., Chowdhury, S. A., Ryott, M., Gertz, E. M., Elmberger, G., Auer, G., ... & Schwartz, R. (2016). Phylogenetic analysis of multiple FISH markers in oral tongue squamous cell carcinoma suggests that a diverse distribution of copy number changes is associated with poor prognosis. *International journal of cancer*, 138(1), 98-109.
- Watzinger, F., & Lion, T. (1999). RAS family. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Wong, S. Q., Li, J., Tan, A. Y., Vedururu, R., Pang, J. M. B., Do, H., ... & Fox, S. B. (2014). Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC medical genomics*, 7(1), 23.
- Xi, Y., & Chen, Y. (2014). Wnt signaling pathway: Implications for therapy in lung cancer and bone metastasis. *Cancer letters*, 353(1), 8-16.
- Yi, T., Lee, H. L., Cha, J. H., Ko, S. I., Kim, H. J., Shin, H. I., ... & Baek, J. H. (2008). Epidermal growth factor receptor regulates osteoclast differentiation and

- survival through cross-talking with RANK signaling. *Journal of cellular physiology*, 217(2), 409-422.
- Zhang, Y. L., Yuan, J. Q., Wang, K. F., Fu, X. H., Han, X. R., Threapleton, D., ... & Tang, J. L. (2016). The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(48), 78985.
- Zhang, J., Fujimoto, J., Zhang, J., Wedge, D. C., Song, X., Zhang, J., ... & Gold, K. A. (2014). Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*, 346(6206), 256-259.
- Zhao, L., & Vogt, P. K. (2008). Helical domain and kinase domain mutations in p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2652-2657.

Ekler

Etik Kurul Onay Belgesi

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ		AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU		ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ		
Sayı: 2018/11		Tarih: 07.06.2018				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Akciğer adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası EGFR ve KRAS gen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması" yerine "Akciğer adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması"				
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2016/981				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Nur Selvi GÜNEL				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Ün. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı AD-İZMİR				
	DESTEKLEYİCİ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Projeleri Alt Komisyonu (APAK)- İzmir				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Projeleri Alt Komisyonu (APAK)- İzmir				
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Tüm gözlemsel çalışmalar (gözlemsel tıbbi cihaz ve gözlemsel ilaç çalışmaları hariç) ☐				
		Anket çalışmaları ☐				
		Dosya ve görüntü kayıtları kullanılarak yapılan retrospektif arşiv taramaları ve benzeri gözlemsel çalışmalar ☐				
Kan, idrar, doku, görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene, tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle yapılacak çalışmalar ☐						
Hücre veya doku kültürü çalışmaları ☐						
Gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan ve tanımlamaya yönelik olarak genetik materyalle yapılacak araştırmalar ☒						
Hemşirelik faaliyetlerinin sınırı içerisinde yapılacak araştırmalar ☐						
Gıda katkı maddeleriyle yapılacak diyet çalışmaları ☐						
Egzersiz gibi vücut fizyolojisi ile ilgili araştırmalar ☐						
Antropometrik ölçümlere dayalı yapılan çalışmalar ☐						
Yaşam alışkanlıklarının değerlendirilmesi araştırmaları gibi insana bir hekimin doğrudan müdahalesini gerektirmeden yapılacak olan tüm araştırmalar ☐						
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒ ADÜTF ve EÜTF	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-		Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
DİĞER:	☒	06.06.2018 tarihli önemli değişiklik formu				
						
Sayfa 35						
Adres : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN						
Tel : 256- 225 31 66						
Faks : 256-212 31 69						
Web : http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/ e-posta: goetik@adu.edu.tr						



I.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU



Sayı: 2018/11

Tarih: 07.06.2018

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:18 Tarih: 07.06.2018	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na 13.10.2016 tarihinde şartlı (APAK) onay verilen; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nur Selvi GÜNEL'in "Akciğer adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası EGFR ve KRAS gen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması" konulu araştırmasının 06.06.2018 tarihli <i>Önemli Değişiklik Formu</i> ve ekleri görüşüldü. <i>Önemli Değişiklik Formunda</i>; çalışmanın kapsamında incelenen onkogen sayısının artırılmasının planlandığı, bu nedenle yeni bütçe oluşturulmuş ve destekleyici tarafından karşılanacağı ve çalışmayı tam yansıması açısından yeni başlığın "Akciğer adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması" olarak değiştirildiği ve ilgili belgelerinin yeniden düzenlenerek dosyaya konulduğu görülmüş olup, uygun bulunmuştur. Konu hakkında bilgi edinilmiş olup, çalışmanın bu haliyle yapılması uygun bulunmuştur. Ayrıca çalışmanın destekleyicisi olarak Ege Ün.T.F.Bil.Araş.Projeleri Alt Kurulu (APAK) onay belgesinin alındığı ve dosyaya konulduğu görülmüş olup, şartı kaldırılmıştır. Yine sorumlu araştırmacıya; <i>Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde taahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te), BGOF (Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-gönüllüler tarafından bizzat kendilerinin kendi adı-soyadını yazması ve imzalamasının sağlanması ile adreslerinin eksiksiz olarak formlara yazılmasına dikkat edilmedir.) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına</i> ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.
------------------------	--	---

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.M. Selim ÖZKÖK							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
1. Prof.Dr.M.Selim ÖZKÖK /Başkan	Adli Tıp	ADÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Mazeretli
2.Doç.Dr.Tolga ÜNÜVAR/ Başkan Yardımcısı	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	ADÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
3.Doç.Dr.Murat TELLİ/ Raportör	Tıbbi Mikrobiyoloji	ADÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
4. Doç.Dr.Aylin ERYILMAZ	KBB Hastalıkları	ADÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
5.Dr.Öğr. Üyesi Sibel ŞEKER	Ebelik	ADÜ Sağ.Bil.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
6.Dr.Öğr. Üyesi Onur YAZICI	Göğüs Hastalıkları	ADÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
7..Dr. Öğr.Üyesi Çağdaş Öykü MEMİŞ	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	ADÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
8.Dr. Öğr.Üyesi Yasemin ÖZKAN	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	ADÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
9.Dr.Öğr.Üyesi Serkan Fazlı ÇELİK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	ADÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

*Toplantıda bulunma

Sayfa 36

Adres : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN	
Tel : 256- 225 31 66	
Faks : 256-212 31 69	
Web : http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/	e-posta: goetik@adu.edu.tr

Gönüllü onam formu

Akciğer Adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması

GENETİK ÇALIŞMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (FORM 4)

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Akciğer vücudumuzun oksijen gereksinimini sağlayan organımızdır. Her organ gibi akciğerimiz de birçok hücreden oluşur. Bu hücreler akciğerin normal olarak görevini yapabilmesi için ihtiyaç doğrultusunda bölünerek çoğalırlar. Akciğer kanseri, yapısal olarak normal akciğer dokusundan olan hücrelerin ihtiyaç ve kontrol dışı çoğalarak akciğer içinde bir kitle (tümör) oluşturmasıdır. Burada oluşan kitle öncelikle bulunduğu ortamda büyür, daha ileriki aşamalarda ise çevre dokulara veya dolaşım yoluyla uzak organlara yayılarak (karaciğer, kemik, beyin vb. gibi) hasara yol açarlar. Bu yayılmaya metastaz adı verilir. Akciğer kanserleri mikroskop altında izlenen hücrelerin görüntüsüne göre iki ana gruba ayrılır. 1. Küçük hücreli akciğer kanseri 2. Küçük hücreli-dışı akciğer kanseri. Akciğer kanserinde tümör oluşumu hücrelerin yaşamasın, başkalaşmasını ve çoğalmasını yöneten kalıtsal (genetik) yapıda (DNA) değişikliklerle gerçekleşir. Bu genetik değişiklikleri bulmak ve tedaviye göre değişim gösterip göstermediklerini tespit etmek üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi "Akciğer Adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması" dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni sizde Akciğer Kanseri tanısının konulmuş olmasıdır. Ege üniversitesi ve Adnan Menderes Üniversitesi bu hastalığın ortaya çıkmasına sebep olan genler (kalıtsal yapının işlevsel bölümleri) ile ilgili bir araştırma gerçekleştirecektir. Katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir. Araştırmaya katılacak gönüllü sayısı 100 dür.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Dr. Gökay Bozkurt tarafından veya onun görevlendireceği bir sağlık personeli tarafından 5-10 ml kanınız alınıp cfDNA'sı elde edilecek ardından genetik değişiklikler bakımından incelenecek ve bulgular kaydedilecektir. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde

Akciğer Adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması

enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Ebeveynlerinizden size aktarılan veya çocuklarınıza aktardığınız genetik (kalıtsal) bilgi yaşamınız boyunca tüm hücrelerinizde aynıdır fakat tümör hücrelerinde meydana gelen genetik değişiklikler sadece tümör dokusunda mevcuttur ve tanı ve tedaviye yön verebilen genetik belirteçlerdir. Uygulanan tedavi sonunda başarı yani tümör hücrelerinin yok edilmesi gerçekleştiğinde bu genetik değişikliklerde tümörle birlikte ortadan kalkarlar. Bu değişiklikler ebeveynlerinizden size aktarılmamıştır ve çocuklarınıza aktarılmayacaktır. Çalışmamızda sadece tümör dokusunda gerçekleşen ve kanserleşmeye neden olan genetik değişiklikler araştırılacaktır, Tümöre ait genetik değişiklikler henüz ortaya konmamış riskler içerebilir. Bu risklerden en az oranda zarar görmenizi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili genetik hastalığın nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenebilecek bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirsiniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

Kan Örneklerinin Saklanması

Sizden alınan örneklerin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örnekleri bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

Veya

Bu bilimsel araştırma sırasında alınan kan örneklerinin tamamı kullanılmayıp bir bölümü benzeri araştırmalarda kullanılmak üzere saklanabilir. Lütfen aşağıdaki 2 cümleyi okuyarak uygun olanını işaretleyiniz:

() Kan ve DNA örneklerinin sadece bu çalışmayla ilgili olarak kullanılmasını istiyorum. Çalışma bitiminde kalan örneklerin uygun şekilde yok edilmesini istiyorum.

() Kan ve DNA örnekleri bu çalışmada kullanıldığı gibi gelecekteki hastalığımla ilgili diğer bilimsel çalışmalarda kullanılabilir. Ancak kalan örneklerimin hastalığım dışındaki başka bir araştırmada kullanılmasını uygun bulmuyorum.

Akciğer Adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Prof. Dr. Gökay Bozkurt tarafından Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD' da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimalla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Gökay Bozkurt'u 0532549[REDACTED]'ten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN	İMZASI
--	--------

**Akciğer Adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon
değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması**

ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

Olgu rapor formu

OLGU RAPOR FORMU

TARİH	
HASTA ADI-SOYADI	
DOĞUM YILI	
CİNSİYET	
MESLEK	
TANI VE TARİHİ	
DOSYA NO	
EK HASTALIK	
UYGULANAN TEDAVİ	
SONUÇ	

Teşekkür

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleri ile en iyi şekilde yetişmemi ve gelişmemi sağlayan, tez çalışmamın tüm aşamalarında yoğun ilgi ve emeğiyle doktora eğitimimi tamamlamamı sağlayan değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e,

Uzun yıllar birlikte çalışma ve bir çok şeyi paylaşma şansı yakaladığım, hayatımın son on yılında hem akademik hem de sosyal büyük etkileri bulunan, ister akademik ister hayata dayır olsun her tür durumda sevgi, bilgi, deneyim ve destekleriyle hep yanımda olduğunu hissettiren, eğitime ve tezime yaptığı katkılarla en iyi şekilde yetişmemi ve gelişmemi sağlayan manevi ağabeyim olarak hissettiğim Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Gökay BOZKURT'a

Hem bilimsel hem de hayata dayır bilgi ve deneyimleriyle eğitim ve öğretimime yeri doldurulamaz katkılar sağlayan, bir çok konuda kendisini örnek aldığım, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölüm Başkanı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilimsel ve manevi desteğini her zaman hissettiğim saygı değer hocam Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'na

İyi bir eğitim almamda büyük katkıları bulunan, her türlü sorun ve zorlukta bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Buket KOSOVA, Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI, Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ, Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ, Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI ve Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER'e

Uzaktan olmalarına rağmen gerektiğinde bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Tuğçe BALCI, Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül DALMIZRAK ve Dr. Öğr. Üyesi Çağdaş AKTAN'a

Doktora tezime ve diğer akademik çalışmalarımda büyük katkıları bulunan Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU ve Uzman Dr. Ayşe DÖNDÜ'ye

Tezime yaptıkları değerli katkılardan dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nezihe MEYDAN ve Prof. Dr. Sabri BARUTCA, Nükleer Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yakup YÜREKLİ ve Dr. Öğr. Üyesi Arzu CENGİZ'e

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Duygu AYGÜNEŞ, Dr. Çağla KAYABAŞI, Dr. Besra ÖZMEN YELKEN, Dr. Zeynep MUTLU, Dr. Zeka ABBASZADE ve Dr. Onur ÇAĞLAR'a Gerektiğinde özveriyle yardımına koşan sevgili arkadaşlarım ve meslektaşlarım Bakiye GÖKER BAĞCA, Buket ÖZEL ve Sezgi KIPÇAK ve Cansu ÇALIŞKAN KURT ve Latife Merve OKTAY'a

Karmaşık sekreteryaya işlemlerini benim için kolaylaştıran bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Murat TUNÇER ve Bahar BİLGİLİ'ye

Varlıklarıyla hayatıma anlam katan, yeri doldurulamaz destekleriyle yüksek lisans ve doktora eğitimimde önemli pay sahibi olan sevgili annem Sevil ÖZLEM, sevgili babam Prof. Dr. Mehmet Besim ÖZLEM ve canım eşim Dr. Öğr. Üyesi Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN'a, manevi desteklerini hep hissettiğim başta canım annem Feda ÇALIŞKAN olmak üzere tüm aileme

Projemize verdikleri destekten dolayı Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Altkomisyonu'na ve bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği 2017-TIP-007 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 20.02.2020

Metin ÇALIŞKAN

Özgeçmiş

Adı, Soyadı : Metin ÇALIŞKAN
E-mail : metincaliskan58@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum ve tez	Mezuniyet tarihi
	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tez: Akciğer Adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması Danışman: Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL	2015-Halen
Doktora		
	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tez : Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tanılı Hastalara Ait Parafin Blok Kesitlerinde <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>HER2</i> ve <i>NRAS</i> Gen Mutasyonlarının Araştırılması Danışman: Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL Eş Danışman: Prof. Dr. Gökay BOZKURT	2013-2015
Yüksek Lisans		
	Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü TÜBİTAK-BİDEB 2209 : Resveratrol'ün HL- 60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) Hücre Hattında <i>Aml1/Eto</i> ve <i>Pml/Rara</i> Füzyon Genlerinin İfadesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması Danışman: Prof. Dr. Celal ÜLGER	2009-2013
Lisans		

AKADEMİK YAYINLAR

MAKALELER

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1. Orenay-Boyacioglu, S., **Caliskan, M.**, Boyacioglu, O., Coskunoglu, A., Bozkurt, G., & Cam, F. S. (2019). Chronic tinnitus and BDNF/GDNF CpG promoter methylations: a case-control study. *Molecular Biology Reports*, 1-8.
2. **Caliskan, M.**, Orenay-Boyacioglu, S., Dondu, A. (2019). Roles of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms in early- and late-onset obsessive-compulsive disorder. *Indian Journal of Psychiatry* 61(2), 161-166
3. **Çalışkan, M.**, Güler, H., & Çetintaş, V. B. (2017). Current updates on microRNAs as regulators of chemoresistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1000-1012.

Ulusal dergilerde yayınlanan makaleler

1. **Çalışkan M.**, Bozkurt G., Meydan N., Meteoğlu İ., Selvi Günel N. (2018). Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Onkogen Mutasyonlarının Araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, cilt.25, ss.322-328
2. Erdem, A. O., Özkısacık, S., **Çalışkan, M.**, Çulhacı, N., Yazıcı, M. (2018). Hipospadiaslı hastaların sünnet derilerinde tiroid hormonu reseptörü gen mutasyonu var mıdır?. *Çocuk Cerrahisi Dergisi*. 32(2), 66-70
3. Özer, E. K., Kurtgöz, S., Göktaş, M. T., Karaca, R. Ö., **Çalışkan, M.**, Barışkaner, H., & İskit, A. B. (2017). Alterations in Hepatic Gene Expressions of CYP2C11, CYP2C6V, and CYP2D3 Enzymes in Endotoxemic Rats. *Dahili ve Cerrahi Bilimler Yogun Bakim Dergisi*, 8(2), 50

Diğer dergilerde yayınlanan özet makaleler

1. Seda, O. B., **Metin, C.**, & Ayse, D. (2019). GDNF Gene rs2910702, rs3096140, and rs3812047 polymorphisms in early and late-onset patients with obsessive-compulsive disorder, Presented at the 10th International Congress on Psychopharmacology & 6th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology. *Klinik Psikofarmakoloji Bulteni*, 29, 454-454.

PROJELER

1. Mevsimsel Olan, Mevsimsel Olmayan Ve Bipolar Depresyon İle Sirkadian Ritim, Melatonin Ve Clock Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Doğan Bilge, Araştırmacı: Örenay Boyacıoğlu Seda, **Çalışkan Metin**, 02/03/2018 (Devam Ediyor)
2. Fonksiyonel konstipasyonu olan çocuklarda serotonin, ghrelin, motilin gen ve reseptör polimorfizmlerinin değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Eevli Murat, Araştırmacı: Bengü Arslan, Araştırmacı: Doğan Güzide, Araştırmacı: Örenay Boyacıoğlu Seda, Araştırmacı: **Çalışkan Metin**, 20/09/2018 (Devam ediyor)
3. Obsesif Kompulsif Bozuklukta Histon Deastilasyonunun Rolü, Tübitak Projesi, Araştırmacı: Örenay Boyacıoğlu Seda, Araştırmacı: **Çalışkan Metin**, Yürütücü: Döndü Ayşe, 15/10/2018 (Devam Ediyor)
4. Mevsimsel Olan, Mevsimsel Olmayan ve Bipolar Depresyon İle Dopamin, Serotonin ve Vitamin D Gen Metilasyonları Arasındaki İlişki, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Şair Yaşan Bilge, Araştırmacı: Örenay Boyacıoğlu Seda, Araştırmacı: **Çalışkan Metin**, 02/03/2018 (Devam Ediyor)
5. Akciğer Adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası EGFR ve KRAS gen mutasyon değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Selvi Günel Nur, Araştırmacı: Bozkurt Gökay, Araştırmacı: Meydan Nezih, Araştırmacı: Örenay Boyacıoğlu Seda, Araştırmacı: **Çalışkan Metin**, Araştırmacı: Barutça Sabri, 29/06/2017 (Devam Ediyor)
6. Çölyak hastası çocuklarda mikroRNA ekspresyon profillemesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Örenay Boyacıoğlu Seda, Araştırmacı: **Çalışkan Metin**, Araştırmacı: Kasap Elmas, Araştırmacı: Ayhan Semin, Araştırmacı: Doğan Güzide, Yürütücü: Kasırğa Hasan Erhun, 26/09/2016 (Devam Ediyor)
7. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tanılı Hastalara Ait Parafin Blok Kesitlerinde EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA, HER2 ve NRAS Gen Mutasyonlarının Araştırılması Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli yüksek lisans tez projesi, Yürütücü:

Selvi Günel Nur, Araştırmacı: Bozkurt Gökay, Araştırmacı: Meydan Nezih, Araştırmacı: Meteöglü İbrahim, Araştırmacı: **Çalışkan Metin**, 2014 (Sonuçlandı)

8. Resveratrol'un HL-60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) Hücre Hattında Aml1/Eto ve Pml/Rar α Füzyon Genlerinin İfadesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması 2209- Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projesi, Yürütücü: **Çalışkan Metin**, 2012 (Sonuçlandı)

9. Hipospadiaslı ve Normal Sünnet Derisinde EGF, Tiroglobulin, Kalsitonin, Tiroid Hormon Reseptör Düzeyi ve Tiroid Hormon Reseptörü Gen Mutasyonu Varlığının Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: **Çalışkan Metin**, 2011 (Sonuçlandı)

BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. Örenay Boyacıoğlu Seda, **Çalışkan Metin**, Korkmaz Mehmet, Bozkurt Gökay (2018). Screening for DNA Mismatch Repair Genes Mutation in Turkish Patients With HNPCC\ Lynch Syndrome by Next Generation Sequencing. Human Genome and Health The First International Conference in Georgia (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4192367)

2. Örenay Boyacıoğlu Seda, **Çalışkan Metin**, Korkmaz Mehmet, Bozkurt Gökay (2017). CALR and JAK2 mutation status in Turkish patients with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. Human Genome and Health The First International Conference in Georgia (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4192363)

3. Örenay Boyacıoğlu Seda, **Çalışkan Metin**, Korkmaz Mehmet, Bozkurt Gökay (2018). Mutations of maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes in early-onset type 2 diabetes mellitus in Turkish patients. Human Genome and Health The First International Conference in Georgia (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4192366)

4. **Çalışkan M**, Bozkurt G., Meydan N., Meteöglü İ., Selvi Günel N., "Determination of EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA, HER2 and NRAS Gene Mutations in Parafin Block Sections from Patients Diagnosed with Non- Small Cell Lung Cancer", VI. International Congress of Molecular Medicine (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- 1. Çalışkan Metin**, Bozkurt Gökay, Örenay Boyacıoğlu Seda, Selvi Günel Nur, Meydan Nezih, Barutca Sabri (2019). Akciğer adenokarsinomlu olgularda birinci basamak tedavi sonrası onkogen değişimlerinin periferik kan serbest DNA (cfDNA) örneklerinden araştırılması. 5. Ege Hematoloji-Onkoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4869261)
- 2. Seda Örenay Boyacıoğlu, Metin Çalışkan**, Güzide Doğan Pediatrik Çölyak Hastalığı ile ARID1A, CTBP1 ve NSD1 Kromatin Remodelleme Gen Ekspresyonları Arasında Bir İlişki Var mıdır? Sağlık Bilimleri Üniversitesi 3. Gastroenteroloji Günleri 19-20 Nisan 2019 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- 3. Örenay Boyacıoğlu Seda, Çalışkan Metin**, Boyacıoğlu Olcay, Coşkunoğlu Aysun, Bozkurt Gökay, Çam Fethi Sırrı. (2019). Chronic Tinnitus and BDNF/GDNF Promoter Methylations. Erciyes Tıp Genetik Günleri (Özet Bildiri/Poster)
- 4. Döndü Ayşe, Örenay Boyacıoğlu Seda, Çalışkan Metin**. (2018). Obsesif Kompulsif Bozukluk ile APOE (Apolipoprotein-E) Gen Polimorfizmleri arasındaki ilişki. 54. Ulusal Psikiyatri Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4398040)
- 5. Doğan Güzide, Örenay Boyacıoğlu Seda, Çalışkan Metin**, Kasap Elmas, Ayhan Semin, Kasırga Hasan Erhun (2018). Çölyak Hastası Çocuklarda MikroRNA Ekspresyon Profillemesi. 12. Ulusal Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4192359)
- 6. Çalışkan Metin**, Döndü Ayşe, Örenay Boyacıoğlu Seda (2018). Erken ve Geç Obsesif Kompulsif Bozuklukta Metilenetetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Polimorfizmlerinin Rolü. 10. Ulusal Anksiyete Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4181941)