



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Likit Biyopsi
Yöntemi İle 19 Gende (AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR,
ERBB2, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS,
NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RICTOR, ROS1) Somatik
Mutasyonların Taranması**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÇAĞRI DOĞAN

SAMSUN

2020



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Likit Biyopsi
Yöntemi İle 19 Gende (AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR,
ERBB2, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS,
NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RICTOR, ROS1) Somatik
Mutasyonların Taranması**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÇAĞRI DOĞAN

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğrt. Üy. Ümmet ABUR

SAMSUN

2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimin süresince yanımda olup bana destek veren ve yetişmemde büyük katkıları olan hocam Prof. Dr. M. Gönül OĐUR ve tez danışmanım Dr. Öğrt. Üyesi. Ümmet ABUR ve hocalarım Dr. Öğrt. Üyesi Engin ALTUNDAĐ, Dr. Öğrt. Üyesi Ömer Salih AKAR, Dr. Öğrt. Üyesi Ayşegül YILMAZ ve asistanlık sürecinde beraber çalıştığım Araş. Gör. Dr Hacer Ukba KINA'ya ve tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük katkı ve desteği olan başardığım ve başaracağım güzel eserlerde en büyük tebrikleri hak eden annem, babam ve kardeşime ve hayatıma renk katan en zorlu zamanlarda omuzlarımdaki yükü hafifleten biricik eşime teşekkürler ederim.

ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ		
Adı Soyadı: Çağrı DOĞAN Doğum Tarihi/Yeri: 01.07.1989/ ADIYAMAN		
Öğrenim Durumu:		
Derece	Okul	Yıl
İlk/Orta	Özel Açı Koleji	2003
Lise	Adana Fen Lisesi	2006
Lisans/Yüksek lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	2014
Görevler:		
Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Doktor	Ağrı Eleşkirt Devlet Hastanesi	2014
Projelerde Yaptığı Görevler : - Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler : - Yayınlar : -		

BEYAN

“Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Likit Biyopsi Yöntemi İle 19 Gende (AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RICTOR, ROS1) Somatik Mutasyonların Taranması” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarında likit biyopsi yöntemi ile gözlenen mutasyonların sıklık ve dağılımının belirlenmesi, klinik parametreler ile ilişkisi, tedavi direnci ve sağ kalım açısından öneminin saptanması amaçlandı.

HASTALAR VE YÖNTEM: 42 yeni tanı ve 58 progrese/nüks (EGFR mutant veya EGFR vahşi tip) olmak üzere 100 KHDAK hastası çalışmaya dahil edildi. Hastalardan alınan kan numunelerinden cfDNA izolasyonu yapıldı ve yeni nesil dizileme (NGS) platformunda AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RICTOR, ROS1 genlerindeki hotspot bölge mutasyonları tarandı.

BULGULAR: 66 erkek, 34 kadın hasta mevcuttu ve hastaların yaş ortalaması 63.7 ± 9.7 idi. Tüm hastalar evre 4 idi. Multimetastatik hastaların ortalama genel sağ kalım (GSK) süresi, oligometastatik hastaların ortalama GSK süresinden anlamlı kısaydı. Multimetastatik hastalardan elde edilen ortalama cfDNA miktarı, uzak organ metastazı olmayan hastaların ortalama cfDNA miktarından anlamlı fazlaydı. 100 hastanın 25'inde (%25) bir veya birden fazla gende 34 patojenik mutasyon (PM) saptandı. En sık mutasyon saptanan genler EGFR (n=18 PM) (%52,9) iken sonrasında KRAS (n=7 PM (%20,5), PIK3CA 5 PM (%14,5) idi. EGFR geninde en sık saptanan mutasyonlar ekzon 19 delesyonları (%33) ve T790M mutasyonu (%22) idi. Progresyon/nüks gösteren EGFR vahşi tip hastalarda PM saptanan hastaların ortalama GSK PM saptanmayan hastalara göre anlamlı kısa bulundu.

TARTIŞMA VE SONUÇ: Çalışmamızda KHDAK oluşumuna ve/veya ilaç direncine yol açan heterojen gen mutasyonlarının saptanmasında NGS temelli likit biyopsi yönteminin avantajlı olduğu görülmüştür. İleri evre hastalarda ki uzak metastazların cfDNA miktarında artışa neden olması likit biyopsi yönteminin gelecekte hasta takibinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Likit biyopsi, KHDAK, cfDNA

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

AIM: In the present study, we aimed to determine the frequency and distribution of mutations observed with liquid biopsy method in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, to determine their importance in terms of clinical resistance, treatment resistance and survival.

PATIENTS AND METHOD: 100 NSCLC patients, including 42 new diagnoses and 58 progressive/relapsed (EGFR mutant or EGFR wild type) were included in the study. cfDNA isolation was performed from the blood samples taken from the patients and AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RICTOR, ROS1 genes hotspot zone mutations were screened in the new generation sequencing (NGS) platform.

RESULTS: There were 66 male and 34 female patients, and the mean age of the patients was 63.7 ± 9.7 . All patients were in stage 4. The mean overall survival (OS) of multimetastatic patients was significantly shorter than the oligometastatic patients. The mean of obtained cfDNA amount was significantly higher in multimetastatic patients than the patients without distant organ metastasis. In 25 (25%) of 100 patients, 34 pathogenic mutations (PM) were detected in one or more genes. Genes with the most frequent mutations were EGFR (n = 18 PM) (52.9%), following KRAS (n = 7 PM (20.5%), PIK3CA 5 PM (14.5%). The most common mutations detected in the EGFR gene were exon 19 deletions (33%) and T790M mutation (22%). The OS means of patients with progression/recurrence and EGFR wild type patients with PM was significantly lower than those without PM.

DISCUSSION AND CONCLUSION: In the present study, NGS-based liquid biopsy method was found to be advantageous in detecting heterogeneous gene mutations leading to NSCLC formation and / or drug resistance. The distant metastases in advanced-stage patients cause an increase in the amount of cfDNA suggests that the liquid biopsy method may be used in future patient monitoring.

Liquid biopsy, NSCLC, cfDNA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZGEÇMİŞ.....	ii
BEYAN.....	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO VE ŞEKİLLER	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akciğer Kanseri.....	3
2.2. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji	3
2.3. Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	4
2.4. Akciğer Kanseri Histopatolojisi	4
2.4.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri.....	4
2.4.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	5
2.6. Akciğer Kanseri Tanı	7
2.7. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserin de Genetik Alterasyonlar	9
2.7.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR).....	10
2.7.2. Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)	12
2.7.3. Mezenşimal–epitelyal dönüştürücü (MET).....	12
2.7.4. Anaplastik lenfoma kinaz (ALK)	13
2.7.6. ROS proto-onkogen 1 (ROS 1).....	13
2.7.7. Östrojen reseptör alfa (ESR1).....	14
2.7.8. Fibroblast büyüme faktörü reseptör -1 (FGFR1).....	14
2.7.8. B-Raf proto-onkogen (BRAF).....	14
2.7.9. Mitojen-aktive edici protein kinaz 1 (MAP2K1).....	14

2.7.10. Fosfatidil inozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subünit alfa (PIK3CA)/ V-akt murine timoma viral onkogen homolog 1 (AKT1)/ fosfataz ve tensin homolog (PTEN) yolağı mutasyonları	15
2.7.11. Kirsten sıçan sarkoma 2 viral onkogen homolog (KRAS)	15
2.7.12. Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog (NRAS).....	16
2.7.13. Discoidin domain reseptör 2 (DDR2)	16
2.7.14. KIT	16
2.7.15. Nörotrofik reseptör tirozinaz kinaz 1 (NTRK1)	16
2.7.16. Trombosit derive büyüme faktörü reseptörü alfa (PDGFRA)	17
2.7.17. Rapamycin insensitive companion of mTOR (RICTOR)	17
2.8. Akciğer Kanseri Tarama	17
2.9. Akciğer Kanseri Evreleme ve Prognoz	19
2.10. Akciğer Kanseri Tedavi.....	23
2.11. Likit Biyopsi.....	25
2.11.1. Akciğer Kanseri likit biyopsinin kullanım alanları.....	27
2.11.1.1. Tanıda cfDNA	27
2.11.1.2. Hastalık Prognozunda cfDNA	27
2.11.1.3. Rekürrens ve minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesi ..	28
2.11.1.4. Kazanılmış direnç ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesi.....	29
3. HASTALAR VE YÖNTEM	30
4. BULGULAR.....	55
5. TARTIŞMA.....	75
6.SONUÇ.....	88
7. KAYNAKLAR	90
8. EKLER.....	102

KISALTMALAR

AAK: Akciğer Adenokarsinom

AF: Allel fraksiyonu

AK: Akciğer Kanseri

AKT1: V-akt murine timoma viral onkogen homolog 1

ALK: Anaplastik lenfoma kinaz

ASHK: Akciğer skuamöz hücreli kanser

BHAK: Büyük hücreli akciğer kanseri

BRAF: B-Raf proto-onkogen

cfDNA: Serbest hücresiz DNA

CTC: Dolaşan tümör hücreleri

ctDNA: Circulating tumor DNA

ddPCR: Digital droplet polimeraz zincir reaksiyonu

DDR2: Discoidin domain reseptör 2

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ERBB2: Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

ESR1: Östrojen reseptör alfa

FGFR1: Fibroblast büyüme faktörü reseptör 1

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü

IGV: Integrative Genomics Viewer

KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

KHDAK-ASO: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri-adeno-skuamöz hücreli olmayan

KIT: Protoonkogen tirozin protein kinaz Kit

KRAS: Kirsten sıçan sarkoma 2 viral onkogen homolog

MAF: Minimal allel fraksiyonu

MAP2K1: Mitojen-aktive edici protein kinaz 1
mEGFR: EGFR geni mutant
MET: Mezenşimal–epitelyal dönüştürücü
NGS: Yeni nesil sekanlama
NNK: 4-(metilnitrosamin)-1-(3-piridil)-1-bütanon
NRAS: Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog
NTRK1: Nörotrofik reseptör tirozinaz kinaz 1
GSK: Genel sağ kalım
PDGFRA: Trombosit derive büyüme faktörü reseptörü alfa
PET: Pozitron emisyon tomografi
PFS: Hastaliksız sağ kalımını
PIK3CA: Fosfatidil inozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subünit alfa
PTEN: Fosfataz ve tensin homolog
QCI: QIAGEN Clinical Insight Analyze
RAF1: Raf proto-oncogene serine/threonine protein kinase
RICTOR: Rapamycin insensitive companion of mTOR
ROS 1: ROS proto-onkogen 1
RT: Radyoterapi
TK: Tirozin kinaz
TKI: Tirozin kinaz inhibitörü
TSNAs: Sigara spesifik N-nitrosaminler
TTF-1: Tiroid transkriptör faktör -1
vEGFR: Vahşi tip EGFR

TABLO VE ŞEKİLLER

Şekiller:

Şekil-1: EGFR Aktive Edici Mutasyonları	11
Şekil-2: EGFR TKİ İlaçlar ve Etki Mekanizmaları	12
Şekil 3: Akciğer Kanseri Taramasında Düşük Doz Bilgisayar Tomografi ve Göğüs Grafisinin Mortaliteye Etkisi	19
Şekil 4: Bead Konsantrasyonu Ölçümü Chartı	50
Şekil-5: KHDAK Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı	55
Şekil-6: KHDAK Hastalarının Yaşa Göre Dağılımı	55
Şekil-7: KHDAK Hastalarının Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımı	56
Şekil 8: Hastaların Başvuru Anında Metastatik Odaklara Göre Dağılımı	57
Şekil 9: Patojenik Mutasyon Saptanan Hastalarda Uzak Organ Metastaz Dağılımı	58
Şekil-10: Patojenik Mutasyon Saptanan Genler Ve Mutasyon Dağılımı	59
Şekil 11: EGFR Mutasyonları Ekzon Dağılımı	64
Şekil 12: EGFR Geni Mutasyon Dağılımı	64
Şekil 13: KRAS Geni Mutasyonları Ekzon Dağılımı	66
Şekil 14: KRAS Geni Mutasyon Dağılımı	66
Şekil 15: PIK3CA Mutasyonları Ekzon Dağılımı	67
Şekil 16: PIK3CA Geni Mutasyonları Dağılımı	67
Şekil 17: Yeni Tanı Hastalarda Mutasyon Dağılımı	68
Şekil 18: Progrese/nüks Hastaların Mutasyon Şeması	69
Şekil 19: Progrese/Nüks Hastalarının Tanı Anı Likit Biyopsi Öncesi EGFR Sonuçları	70
Şekil 20: Progresyon/Nüks Hastalarında Saptanan Direnç Mutasyonları	72
Şekil 21: Sigara Kullanmayan Hastaların Mutasyon Dağılımı	73
Şekil 22: Sigara Kullanan Hastaların Mutasyon Dağılımı	74

Tablolar:

Tablo 1: Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi T Belirteci	20
Tablo 2: Belirteci Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi N belirteci	21
Tablo 3: Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi M belirteci.....	21
Tablo 4: TNM Evrelemesi	22
Tablo 5: FDA Onaylı Akciğer Kanseri Tedavisinde Hedefe Yönelik İlaçlar	25
Tablo 6: GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel İçeriği Tablosu	33
Tablo 7: Fragmantasyon, End-Repair, A- Addition Miksi Hazırlama Tablosu	34
Tablo 8: Adaptör Bağlanma Miksi Hazırlama Tablosu	34
Tablo 9: Forward Hedef Zenginleştirme PCR Reaksiyon Miksi Hazırlama Tablosu	35
Tablo 10: Reverse Hedef Zenginleştirme PCR Reaksiyon Miksi Hazırlama Tablosu	35
Tablo 11: Thermalcycler Tablosu	36
Tablo 12: Universal PCR Miksi Hazırlama Tablosu	37
Tablo 13: Universal PCR Thermalcycler Döngüsü Tablosu	37
Tablo 14: AIT Panel Hedef Zenginleştirme PCR Miksi Hazırlama Tablosu	39
Tablo 15: AIT Panel Hedef Zenginleştirme PCR Thermalcycler Döngüsü	39
Tablo 16: AIT Panel GeneRead DNA Library Q Kit İçeriği	40
Tablo 17: AIT Panel GeneRead Size Selection Q Kit İçeriği	41
Tablo 18: AIT Panel MMA Master Miks Hazırlama Tablosu	41
Tablo 19: AIT Panel MMC Master Miks Hazırlama Tablosu	42
Tablo 20: AIT Panel Rotor Adaptör Hazırlama Tablosu	42
Tablo 21: AIT Panel Kütüphane DNA Çoğaltma Miksi Hazırlama Tablosu	43
Tablo 22: AIT Panel QIAcube Cihazı Yükleme Tablosu	43
Tablo 23: Klonal Çoğaltma Kiti içeriği.....	44
Tablo 24: Kütüphane Ürünleri Konsantrasyon Ayarlama Tablosu	45
Tablo 25: Primer Loaded PCR Beads ve Buffer E Hacim Tablosu.....	46
Tablo 26: GeneRead Workdeck 1 Hazırlama Tablosu	47
Tablo 27: Deep Well PCR Programı.....	48
Tablo 28: Rotor Adaptörlerin Enrichment Kolonlara Yerleşim Tablosu	49
Tablo 29: Sekans Aşaması Kullanılan Kit İçeriği Tablosu	51
Tablo 30: Patojenik Mutasyonların Tiplerine Göre Dağılımı	60
Tablo 31: Patojenik Mutasyon Saptanan Hastalar Genel Tablo	61
Tablo 32: T790M ve T790A Mutasyonu Saptanan Hasta Tablosu	65
Tablo33: Progresyon/Nüks Nedeniyle Başvuran Likit Biyopside Patojenik Mutasyon Saptanan Hastaların Mutasyon Dağılımı	71
Tablo 34: Sigara Kullanmayan Hastaların Mutasyonları.....	73
Tablo 35: Sigara Kullanan Hastaların Mutasyonları.....	74

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri (AK), kanser nedenli ölümlerin en sık nedenidir (1). 2018 yılında dünya çapında 2.1 milyon kişi AK tanısı almış ve AK nedeniyle 1,8 milyon hasta hayatını kaybetmiştir (1). AK hastaların yarısından fazlası 55-74 yaş arası bireyler olup; akciğer kanseri teşhisi medyanı 70 yaşdır (2). Tüm evreler birlikte düşünüldüğünde AK hastalarının 5 yıllık sağ kalımı %19 dur (3).

Hastalığın etiolojisinde en çok suçlanan etken sigara kullanımınıdır ve hastaların %85'i hayatlarının bir döneminde sigara kullanmış yada kullanmaktadır (4). AK tanısında doku biyopsisi hali hazırda en çok kullanılan yöntem olup histopatolojik ve genetik analizler için biyopsi materyali sıkça kullanılmaktadır (5).

AK histopatolojik olarak Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) (%80-85) ve Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) (%15-20) olarak iki ana alt gruba ayrılmaktadır (6).

Son yıllarda gelişen teknoloji ve hedefe yönelik ilaçlar sayesinde KHDAK tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. KHDAK hastalarında başta Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geni mutasyonları ve amplifikasyonu (%15-40) (7), Kirsten sıçan sarkoma 2 viral onkogen homolog (KRAS) geni mutasyonları (%15-25) (8), Fosfatidil inozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subünit alfa (PIK3CA) geni mutasyonları (%3) , B-Raf proto-onkogen (BRAF) geni mutasyonları, Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog (NRAS) geni mutasyonları, Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) geni ve ROS proto-onkogen 1 (ROS 1) geni yeniden düzenlenimleri, Mezenşimal–epitelyal dönüştürücü (MET) geni amplifikasyonu gibi pek çok genetik değişiklik saptanmıştır (6).

Halihazırda EGFR duyarlılık mutasyonları için EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), ALK ve ROS-1 yeniden düzenlenimleri ve MET geni amplifikasyonu için crizotinib, BRAF V600E mutasyonu için ise dabrafenib gibi birçok hedefe yönelik ilaçlar kullanılmaktadır (6). Hedefe yönelik ilaçlar

hastaların hastalısız sağ kalımını (PFS) ve genel sağ kalımlarına (GSK) olumlu etkileri olmakta ve klasik kemoterapatlere nazaran daha kolay tolere edilebilmektedir. Fakat her ne kadar tedavide olumlu etkileri olsa da bir süre sonra ilaç kullanımına bağlı direnç mutasyonları gelişebilmekte ve hastalık tekrardan progresyona uğramaktadır (6).

Doku biyopsisinin tekrarının zor olması, primer tümördeki ve metastatik odaklardaki genetik değişimleri her zaman yeterli seviyede gösterememesi, bazı tümörlerin biyopsi için ulaşılamayacak yerlerde olması son yıllarda yeni bir yöntem olan likit biyopsiyi kanser tanı ve teşhisinde ön plana çıkarmaktadır (9, 10). Likit biyopsi yöntemi genel olarak periferik kandan dolaşan serbest hücresiz DNA (cfDNA) materyalini izole edip sekanslama işlemlerine dayanmaktadır (10). Yeni nesil sekanslama (NGS) ve digital droplet polimeraz zincir reaksiyonu (ddPCR) likit biyopside en sık kullanılan yöntemlerdir.

Bu çalışmada KHDAK hastalarında likit biyopsi yöntemi ile gözlenen mutasyonların sıklık ve dağılımının belirlenmesi, klinik parametreler ile ilişkisi ile birlikte tedavi direnci ve sağkalım açısından öneminin saptanması amaçlandı. Çalışmaya Ocak 2019 – Kasım 2019 tarihleri arasında KHDAK tanısı almış veya takipte olan, likit biyopsi yöntemi ile NGS platformunda EGFR, ROS1, ALK, BRAF, KRAS, MET, PIK3CA, NRAS, Discoidin domain reseptör 2 (DDR2), Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (ERBB2), Östrojen reseptör alfa (ESR1), Fibroblast büyüme faktörü reseptör 1 (FGFR1), KIT, Mitojen-aktive edici protein kinaz 1 (MAP2K1), Nörotrofik reseptör tirozinaz kinaz 1 (NTRK1), Trombosit derive büyüme faktörü reseptörü alfa (PDGFRA), Fosfataz ve tensin homolog (PTEN), Rapamycin insensitive companion of mTOR (RICTOR), V-akt murine timoma viral onkogen homolog 1 (AKT1), genlerdeki hedef mutasyonlar çalışılan 100 hasta dahil edildi. Bu hastalarda saptanan mutasyonların sıklık ve dağılımı incelendi. Ayrıca bu mutasyonların başvuru anındaki yaş, cinsiyet, histopatolojik tip, evre, metastaz odak sayısı, cfDNA miktarı, tedavi direnci ve genel sağkalım ile ilişkisi değerlendirildi ve literatür ile tartışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri hem kadın hem erkek cinsiyette kanser nedenli ölümlerin en sık nedenidir (1). Akciğer kanseri genetik ve epigenetik birçok aşamadan oluşan nihayetinde normal akciğer epitelinin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanan bir hastalıktır (11). Genelde akciğer bronş ve küçük hava yolları epitelinden köken almaktadır. Sigara kullanımı hastalığın etiolojisinde sıklıkla suçlanmakla beraber hastaların %15-20'si hayat boyunca hiç sigara kullanmamış olması hava kirliliği, pasif içicilik gibi çevresel nedenleri ve genetik nedenleri (EGFR mutasyonları, ALK yeniden düzenlenimi vb.) ön plana çıkarmaktadır. Yeni gelişen genetik testler ve hedefe yönelik ilaçlar hastalığın tanı, takip, prognoz tayini ve tedavisinde köklü değişikliklere yol açmaktadır (6).

2.2. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji

2018 yılında dünya çapında 2.1 milyon kişi akciğer kanseri tanısı aldı ve akciğer kanseri nedeniyle 1,8 milyon kişi hayatını kaybetti (1). Tüm evreler birlikte düşünüldüğünde akciğer kanseri hastalarının 5 yıllık sağ kalımı %19 olup agresif bir seyir göstermektedir. (3). Akciğer kanserinde tanı/ölümlerin %90'ı 55 yaş üzerindeki hastalarda görülmekte olup AK tanısı medyan yaşı 70 dir. 40 yaş altı AK hasta nadiren görülmektedir. (2). Hastaların yarıdan fazlası hastalığın ileri evrelerinde tanı alıyor olması tedavi seçeneklerini azaltmakta ve hastalık prognozunu kötü yönde etkilemektedir (12). Günümüzde gelişmiş ülkelerde AK insidansı azalma eğiliminde olsa da gelişmekte olan ülkelerde AK insidansı hala artmaktadır. Bu durumun başlıca nedeni olarak sigara tüketiminin gelişmekte olan ülkelerde hala artmakta olması gösterilebilir (13). Tüm dünyada AK erkeklerde hala daha sık görülmektedir. Ancak erkeklerde AK insidansı azalma eğiliminde iken; kadınlarda AK insidansı artmakta bazı ülkelerde plato çizmektedir. Bu duruma neden olarak kadınlardaki sigara kullanma pikinin erkeklerden birkaç on yıl sonra gerçekleşmiş olması gösterilebilir (13).

2.3. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanseri oluşumunda hayat tarzı ve dış etken suçlanmakta ve bunların başında sigara kullanımı gelmektedir. Hastaların %85 i hayatlarında belli bir dönem sigara kullanmış kişilerden oluşmaktadır (4). Sigara dumanında 50'den fazla kanserojen madde tanımlanmış olup bunlarında başında sigara-specific N-nitrosaminler (TSNAs) gelmektedir. TSNA ailesinden 4-(metilnitrosamin)-1-(3 piridil)-1-bütanon (NNK) KRAS geninde aktivasyon mutasyonlarına yol açmaktadır (14) . Kanser gelişme riski sigara içme süresi ve diğer kanserojenlere maruziyetin artması ile ilişkilidir. Hayat boyunca hiç sigara kullanmamış akciğer kanseri hastalarında esas neden bilinmemekle birlikte çevresel kirlilik ve pasif içicilik suçlanmaktadır.

Sigara kullanımı dışında asbest maruziyeti, iyonizan radyasyon, non-hodking lenfoma (15) veya meme kanseri öyküsü (16), polihidrokarbon maruziyeti (4), pulmoner fibrozis, insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu, alkol tüketimi (17, 18) suçlanmaktadır. Fiziksel aktivitenin AK ile ilişkisi net bilinmemekle beraber bazı çalışmalarda fiziksel aktivite artışıyla AK riski arasında ters ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (19).

2.4. Akciğer Kanseri Histopatolojisi

Akciğer kanseri akciğer epitelinden köken almaktadır ve histolojik, klinik ve nöroendokrin karakterine göre 2 ana alt tipe ayrılır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) (%80-85) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) (%15-20) (6).

2.4.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri hastaların %15-20'si KHAK alt tipindedir (20). Hastaların neredeyse hepsi sigara kullanım öyküsüne sahiptir (21). Tüm dünyada KHAK insidansı azalmakta iken; kadınlardaki insidansı artmakta ve erkek/kadın oranı 1:1 olarak gözlenmektedir (21). Genel olarak klasik kemoterapatik ilaçlara iyi yanıt vermelerine karşın hastaların çoğu rekürren kanserden ölmektedir (22). Patolojik incelemelerde az sitoplazmalı küçük yuvarlak hücreler, yüksek mitotik index, belirgin olmayan hücre sınırları, granüler kromatik ve nükleolusların azalmış/yok olması göze çarpmaktadır

(23). İmmün reaktif boyalar ile keratin,epitel membran antijeni ve tiroid transkriptör faktör -1 (TTF-1) pozitif boyanır (22). Çoğu KHAK nöroendokrin diferansiyasyon geçirdiği için çoğunlukla kromogranin 1, nöronspesifik enolaz, snaptofizin pozitif boyanırlar ve hastaların %30'unda aynı anda KHDAK dönüşümü de görülmektedir (22). Neredeyse tüm KHAK hastalarında TP53 ve RB genlerinde inaktive edici mutasyonlar vardır (24). Bunun dışında NOTCH geni inaktive edici mutasyonları (%25) ve SOX2 geni amplifikasyonu (%27) gözlenmektedir (24). EGFR geni mutasyon ve amplifikasyonu sadece %5 hastada gözlenmektedir (6).

2.4.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Akciğer kanserinin en sık görülen alt tipidir (%80-85). KHDAK 60 aylık sağ kalım evre 1B'de %68 iken evre 4A-4B de %0-10 dur ve kötü prognoz olarak kabul edilmektedir (25). KHDAK hastalarında alt tiplerinden adenokarsinoma (AAK) ve skuamöz hücreli kanser (ASHK) diğer alt tiplerden daha sıktır. Büyük hücreli akciğer kanseri , bronkoalveolar akciğer kanseri ve adenoskuamöz akciğer kanseri alt tiplerine ise daha az rastlanır (6).

2.4.2.1.Akciğer adenokarsinom (AAK)

Akciğer kanserinin en yaygın alt tipi olup tüm AK hastalarının %40 akciğer adenokarsinom tanısı almaktadır (26). Akciğer kanseri tanısı almış sigara kullanmayan, genç kadın hastaların %62'si akciğer adenokarsinomudur (13). Küçük hava yollarında lokalize alveoler hücrelerden köken almaktadır. İmmünohistokimyasal boyamalarda napsin A ve tiroid transkriptör faktör -1 (TTF-1) pozitif boyanır. Adenokarsinom hücreleri genellikle grandüler ve küçük periferik nodüller olarak gözlenirler. Alveollerde preküsör lezyon olarak başlayan süreç sırasıyla atipik adenomatöz hiperplazi, adenomatöz karsinoma in situ ve adenokarsinom aşamalarında geçerek malignite sürecinin tamamlamaktadır. EGFR, KRAS, MAP2K1, BRAF, ALK, ROS-1, RET genlerindeki mutasyonlar daha çok AAK alt tipinde gözlenmektedir (6).

2.4.2.2. Akciğer skuamöz hücreli karsinom (ASHK)

Skuamöz hücreli karsinoma tüm akciğer kanseri vakalarının %25-30'unu oluşturmaktadır (27). Majör bronşiyal epitelde preneoplastik lezyon olarak başladığı düşünülmektedir. İmmünohistokimyasal boyalar ile boyandığında genellikle sitokeratin 5/6(CK-5, CK6), p40, desmoglain-3 pozitif boyamaktadır. Sırasıyla bazal hücreli hiperplazi, skuamöz metaplazi, displazi ve son olarak karsinoma in situ evrelerinden geçerek yıllar süren bir dönüşüm geçirmektedir. Hiperplazi ve skuamöz metaplazi preneoplastik lezyonlar sayılmazken displazi ve karsinoma in situ progresyon gösterdikleri zaman neoplaziye yol açabilen preneoplastik lezyonlardır (28). Displazi ilerledikçe atipik hücreler artmakta, epitelin alt 2/3'lük kısmında mitozlar görülmekte iken yüzeysel kısımda matürasyon görülmemektedir (29). Karsinoma insitu'da ise hücresel atipi artmakta, hücre kalabalığı belirginleşmekte, mitotik indeks belirginleşmekte ve lezyonlar tüm epiteli kaplamaktadır (30). Skuamöz hücreli karsinomda sitoplazma/nükleus oranı artmış düz geniş hücreler görünür. Ayrıca bu hücrelerin içinde keratinden meydana gelmiş desmozomlar ve keratin incileri bulunmaktadı. Bu değişimler iyi diferansiye olmuş tümörlerde daha belirgin olarak görülmektedir. FGFR-1, TP53, RB, PIK3CA adenokarsinom alt tipi ile kıyaslandığında daha çok skuamöz hücreli karsinom alt tipinde rastlanmaktadır (6)

2.4.2.3. Büyük hücreli akciğer kanseri (BHAK)

Büyük hücreli akciğer kanseri ilk defa 1991 yılında tanımlanmış olup KHDAK kanserlerinin endokrinolojik bulguları olan yüksek gradeli bir alt tipidir (31). BHAK akciğer kanseri hastalarının %3'ünde saptanmakta (32) olup hastaların geneli sigara kullanan erkeklerdir ve ortalama yaşı 62 olarak bildirilmektedir (33). BHAK'in skuamöz hücreli akciğer kanseri ve akciğer adenokarsinomun az diferansiye olmuş formu olabileceği ve bu yüzden de köken aldığı hücrelerin multiple karakterde olduğu ileri sürülmüştür. Tanımlayıcı özellikler arasında büyük soluk lekelerle sahip sitoplazma, yuvarlaktan çokgene kadar tabakalı hücreler ve belirgin nükleolilere sahip veziküler çekirdek bulunmaktadır.

2.6. Akciğer Kanseri Tanı

Akciğer kanseri teşhisi birçok adımdan oluşan komplike bir süreçtir. Hastanın klinik bulguları, görüntüleme yöntemleri ve doku biyopsisi en temel tanı araçları olup hepsi birden hastayı değerlendirmede kullanılmaktadır. Doku biyopsisi sayesinde akciğer kanserinin alt grupları belirlenmekte, gerektiği durumlarda genetik testler yapılabilmektedir. Histopatolojik sonuçlar ve genetik alterasyonlar tedavi protokolünü ve hastalık seyrini direkt olarak etkilemektedir.

Akciğer kanseri tanısında kullanılan girişimsel olmayan yöntemler:

- **Toraks direkt X-ray** grafisi tıp alanında çok uzun yıllardır kullanılması, işlemlerin kısa ve sonuçların hızlı olmasının en önemli avantajıdır. Klinisyenlerin torakstaki anormal yapıları değerlendirmede çoğunlukla ilk başvurduğu testtir.
- **Toraks BT X-ray** ışınları kullanılarak görüntüler alınan görüntüleme yöntemlerinden biridir. Klinik tabloya yol açan primer kitlenin boyut ve şeklini ortaya koyabildiği gibi mediastinal bölgedeki yapılara ve lenf nodlarına yayılımını değerlendirmede sıklıkla kullanılmaktadır. Kanser hastalarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılır.
- **Pozitron emisyon tomografi (PET)** diğer kanserlerde de olduğu gibi primer tümörü yerini, tümör yayılımını, evresinin belirlenmesinde, tedaviye yanıtta ve nüks eden lezyonların değerlendirilmesinde önem arz etmektedir. Hastaya 18-florodeoksiglukoz hastaya damar yoluyla verilir ve pozitron emisyon tomografisinde görüntüler elde edilir. Yöntemin en büyük kısıtlılığı 3 boyutlu görüntü verememesidir. PET-BT beraber olan yöntemler tanıda daha etkili olabilmektedir. Enfeksiyon ve yara iyileşmesi dokuda glukoz tutulumunu artırarak yanlış pozitifliklere yol açabilmektedir.
- **Manyetik rezonans görüntüleme (MRI)** radyo dalgaları ve yüksek manyetik alanı kullanıldığı görüntüleme yöntemidir. Özellikle yumuşak dokulardaki lezyonları değerlendirmede tercih edilmektedir. Akciğer

kanseri hastalarında beyin ve spinal kord metastazlarını değerlendirmede tercih edilmektedir.

Akciğer kanseri tanısında kullanılan girişimsel yöntemler:

- **Balgam sitolojisi** balgam içerisinde kanser hücrelerinin aranması esasına dayanmaktadır. Büyük hava yollarında meydana gelen tümörleri değerlendirmede (özellikle skuamöz hücreli akciğer kanseri) yardımcı olabilmektedir.
- **Torasentez** Akciğer etrafında sıvı biriktiği durumlarda girişimsel yöntemler ile sıvı boşaltılıp kanser hücreleri toplanan sıvıda aranmaktadır.
- **İnce iğne biyopsisi** özellikle akciğer yakınlarındaki lenf nodlarını değerlendirmede tercih edilmektedir. Alınabilen örnek miktarı sınırlı olduğu için yanlış negatif sonuç verme olasılığı daha yüksektir. **Core biyopsi** daha büyük iğneler kullanılıp bir işlemde daha fazla aspirat alınabilmektedir.
- **Bronkoskopi** büyük hava yollarındaki lezyonların ve tıkanıklıkların değerlendirilmesinde kullanılmakta ve işlem sırasında örnek alma imkanı sunmaktadır.
- **Endobronşial ultrasonografi** akciğer ve diğer yapılar arasındaki lenf nodlarını görüntülemek ve gerekirse biyopsiye yardımcı olmak için kullanılır.
- **Transözefagial ultrasonografi** özofagus etrafındaki lenf nodlarına metastaz olup olmadığını değerlendirmede ve istendiği takdirde biyopsiye yol göstermesi için kullanılmaktadır.
- **Mediastinoskopi/mediastinotomi** iki akciğer arasında kalan bölümdeki lezyon ve lenf nodlarını değerlendirmek için sol 2-3. kostalar arasına 5 cm kesi açılarak bu alana ulaşılmaktadır. Mediastinal yapıları değerlendirmenin yanında gerektiğinde biyopsi alma imkanı da sağlamaktadır.

- **Torakoskopi** toraks duvarı direkt geçilerek her iki plevrayı da plevra görüntülenme imkanı sunmaktadır. Biyopsi alma imkanı sunmanın yanında bazı vakalarda tedavi aracı olarak da kullanılmaktadır (34).

2.7. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserin de Genetik Alterasyonlar

KHDAK genetik alterasyonlar açısından karmaşık ve heterojen bir yapıya sahip olup alt tiplere ve sigara kullanımına göre dağılımları değişebilmektedir. Pek çok protoonkogen ve tümör supressör gen akciğer karsinogenezinde önemli yer tutmakta ve bunun yanında belirli genlerdeki belirli mutasyonların KHDAK hastalarında sıkça saptandığı görülmektedir. Bu alterasyonların başında EGFR, ALK, ROS1, MET, RET gibi tirozin kinaz aktivitesi olan reseptörler ve KRAS, PIK3CA, BRAF gibi bu reseptör yollarının alt düzenleyicileri gösterilebilir. Ayrıca EGFR, KRAS, ALK, ROS1, RET, BRAF genlerinin mutasyonları AAK alt tipinde daha sık iken FGFR1, AKT1, DDR2, PIK3CA ve MET genlerinde meydana gelen mutasyonlar sıklıkla SHAK alt tipinde karşımıza çıkmaktadır (35).

Öte yandan KHDAK hastalarında sık görülmesi ve/veya hedefe yönelik akıllı ilaç seçeneği sunması ve/veya ilaç direncinde sorumlu olması nedeni ile birkaç bazı genlerin KHDAK hastalarının tedavi ve takibinde önem arz etmektedir. EGFR geni patojenik alterasyonları KHDAK hastalarının %20-50'sinde saptanması ve hedefe yönelik ilaç seçeneği sunması nedeniyle başlıca değerlendirilmesi gereken genlerdir. Sigara kullanmayan, asya kökenli, AAK subtipindeki genç kadın hastalarda daha sık gözlenmektedir(7). KRAS geni mutasyonları KHDAK hastalarında %25-40 oranında görülen sık alterasyonlardan biridir. Batı toplumunda asya toplumuna nazaran daha sık görülmekte ve sigara kullanmış hastalardaki sıklığı artmaktadır (8, 36-38). PIK3CA geni mutasyonları ise KHDAK hastalarının %3'ünde saptanmaktadır ve sıklıklar SHAK hastalarında gözlenmektedir (1). BRAF geni KHDAK hastalarında sıklığı %3 olarak bildirilmektedir ve bu gendeki mutasyonları hedefleyen akıllı ilaçlar bulunmaktadır (8).

Sigara kullanımı akciğer kanseri gelişiminde suçlanan etkenlerin başında olup ve kanser gelişim sürecinde önemli etkileri olduğu gösterilmiştir.

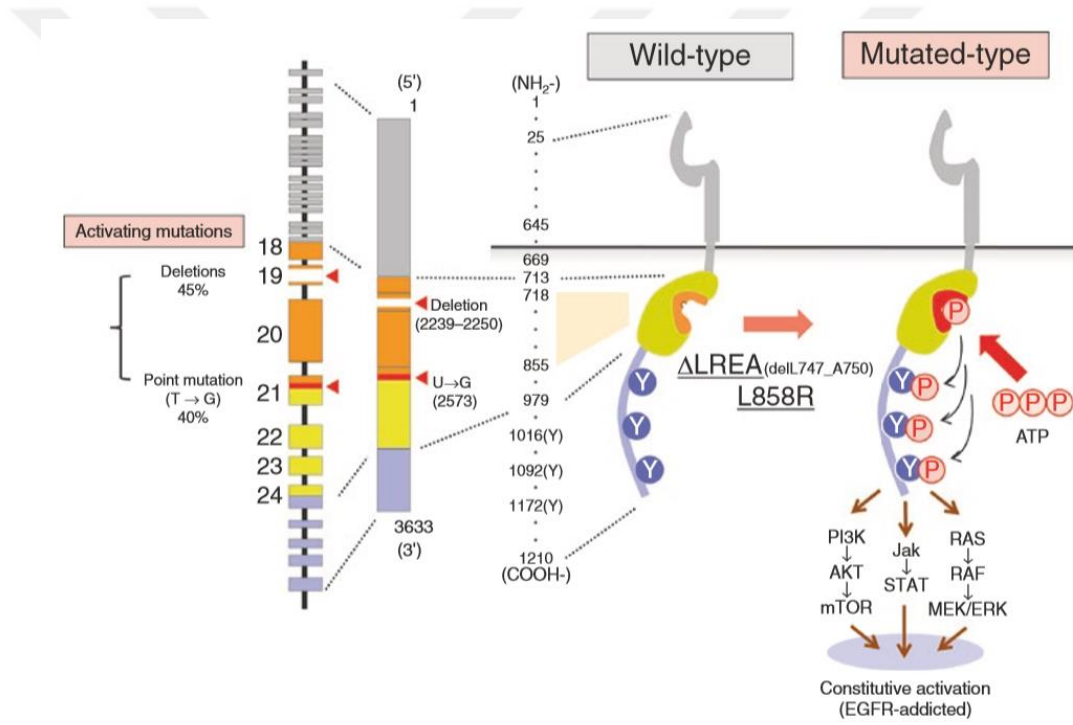
Düzenli sigara kullanıcısı KHDAK hastalarında mutasyon yükü sigara kullanmayan hastalara oranla 10 kat daha fazla olduğu ve sigara kullanımı süresi ile mutasyon yükünün körele olduğu gösterilmiştir (39). Sigara kullanan hastalarda C>A transversiyonu daha sık iken sigara kullanmayan hastalarda C>T transisyonu daha sık gözlenmektedir (39, 40). Ayrıca sigara kullanan hastalarda KRAS, TP53, BRAF, STK11 ve JAK2/3 genlerinde mutasyon sıklığı artmış iken; sigara kullanmayan hastalarda EGFR, ALK, ROS1, PTEN, RET genlerinde daha sık mutasyon saptanmaktadır (7, 39, 41, 42).

2.7.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)

EGFR, human epidermal growth factor reseptor (HER) ailesine dahil tirozin kinaz (TK) aktivitesi olan transmembran bir reseptördür. Erb-1 ya da HER1 olarak da bilinmektedir. Membran dışındaki parçası EGF ve TNF-alfa ile aktive edilmektedir. EGFR ligandları ile bağlandıktan sonra heterodimer yapıdan homodimer yapıya geçer. HER tirozin kinaz reseptör ailesi üyelerinin, hücre gelişimi, hücre proliferasyonu ve hücre hayatta kalması gibi birçok önemli görevi bulunmaktadır (43).

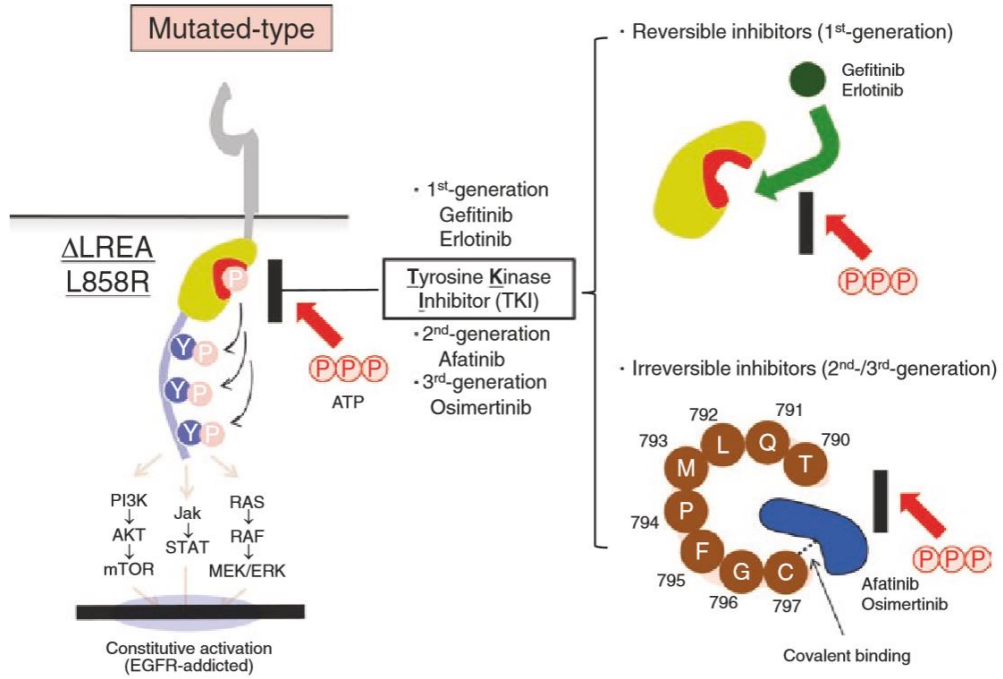
EGFR geni 28 ekzondan oluşmaktadır. 18-21.ekzonlar adenozin trifosfat (ATP) bağımlı tirozin kinaz domainini kodlamaktadır (44, 45). Bu ekzonlarda meydana gelen aktivasyon mutasyonları ligand bağımsız otoaktivasyona yol açarak hücre proliferasyonu artışına, apoptozisin engellenmesine, kanserogeneze ve nihayetinde metastazlara yol açmaktadır (46) (47) (**Şekil-1**). KHDAK hastalarının %20-50'sinde EGFR mutasyonları gözlenmektedir. Sigara kullanamayan, kadın cinsiyet, adenokarsinom subtipi ve asya kökenli KHDAK hastalarında EGFR geni mutasyonlarına daha sık rastlanmaktadır (7). EGFR geninde en sık görülen iki mutasyon sırasıyla ekzon 19 delesyonu (%45-50) ve ekzon 21'de ki L858R (%45) nokta mutasyonudur (7, 48). Bu mutasyonlar TKİ ilaçlara duyarlılık ile ilişkilidir (49). TKİ ilaçlar, EGF reseptörünün TK domainindeki ATP bağımlı domaini için ATP ile yarışarak protein fosforilasyonunu azaltır. Birinci nesil TKİ'ler (erlotinib, gefitinib) reversibl inhibisyon yaparken; ikinci nesil TKİ'ler (afatinib, dacomitinib) ve

üçüncü nesil (osimertinib) irreversibl inhibisyon yapar (**Şekil-2**). Birçok klinik çalışmada KHDAK hastalarının kemoterapatik ilaçlar ile kıyaslandığında, TKİ ilaçlara çok daha iyi yanıt verdiği ve progresyonsuz sağkalım (PS) süresinin uzadığını gösterilmiştir (50-54). TKİ ilaçlar, PFS'yi uzatıp daha konforlu tedavi süreci sunsa da ortalama 10-14 ay içerisinde hastaların büyük çoğunluğu TKİ ilaçlara direnç geliştirmektedir. İlaç direncinin başlıca nedeni ekzon 20'de ki T790M (%50-60) mutasyondur (6). Üçüncü nesil TKİ olan osimertinib T790M direnç mutasyonu olan hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Yakın zamanda FDA onay ile osimertinib KHDAK hastalığı tedavisinde birinci basamakta kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil-1: EGFR Aktive Edici Mutasyonları

Molecular Diagnosis and Targeting for Thoracic and Gastrointestinal Malignancy In: Molecular Diagnosis and Targeting for Lung Cancer 2018. İsimli kaynaktan alınmıştır (47)



Şekil-2: EGFR TKİ İlaçlar ve Etki Mekanizmaları

Molecular Diagnosis and Targeting for Thoracic and Gastrointestinal Malignancy In: Molecular Diagnosis and Targeting for Lung Cancer 2018. İsimli kaynaktan alınmıştır (47)

2.7.2. Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)

HER ailesinin diğer bir üyesi olan HER2 (ErbB2) ligandı olmayan bir reseptördür diğer HER proteinlerinin aktif kompleksleri ile heterodimerize olabilmektedir. HER2 reseptörü amplifikasyonları özellikle meme kanserlerinin %15-20 kadarında saptanmakta ve bu hastalar trastuzumab tedavisine iyi yanıt vermektedir. Akciğer kanseri hastalarının sadece %1,5 Erbb2 mutasyonu saptanmıştır (55) ve hastaların çoğunluğu sigara kullanmayan kadınlar olup saptanan mutasyonların %96'sı ekzon 20 insersiyonlarıdır (56). KHDAK hastalarında ERBB2 ekzon 20 insersiyonlarının da afatinib kullanıldığı ve iyi yanıt aldığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (57, 58)

2.7.3. Mezenşimal-epitelyal dönüştürücü (MET)

Hepatosit büyüme faktör (HGF) reseptörü olarak da bilinen MET bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. MET reseptörü uyarılması hücre

büyümesi, anjiyogenezis, hücre migrasyonu ve invazyon yol açan sinyal yollarını başlatmaktadır (59, 60). KHDAK vakalarında MET reseptörü ve diğer tirozin kinaz reseptörleri özellikle EGFR/HER ailesi arasında çapraz reaksiyonlar sonucunda oluşan ilaç direncinden bahsedilmektedir (61). MET geni 14. ekzonun da meydana gelen mutasyonlar sonucu, genin negatif regülatörü olan Casitas B-lineage lymphoma-E3 (CBL-E3) bağlanma bölgesi kaybı olmakta bunun sonucunda MET genin aşırı aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar akciğer adenokarsinomlarında da %3.5 sıklıkta görülür kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (62). Ayrıca MET geni amplifikasyonu TKİ kullanmamış KHDAK hastalarının %2-4 ünde, EGFR mutasyonu pozitif TKİ kullanmış hastaların %5-20'sinde saptanmıştır (63). Son zamanlarda KHDAK hastalarında MET geni mutasyonları ve amplifikasyonu dışında füzyonları da rapor edilmiştir (64).

2.7.4. Anaplastik lenfoma kinaz (ALK)

ALK geni yeniden düzenlenimleri, KHDAK hastalarının %2-8'inde saptanmaktadır (65). Bu hastalar genellikle sigara içmemiş, genç, erkek akciğer adenokarsinomu hastalarıdır ve neredeyse hiçbir hastada ALK yeniden düzenlenimleri ile EGFR/KRAS mutasyonu birlikteliği gözlenmemiştir (6). ALK geni yeniden düzenlenimleri, ALK geni ile birçok gen arasındaki translokasyonlarla oluşsa da genellikle Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 4 (EML4) geni ile translokasyonu sonucunda oluşmaktadır. ALK-EML4 kimerik geni ürünleri sonucu hücrede persiste mitojenik sinyaller ve malign değişimler tetiklenir (66). ALK yeniden düzenlenimi saptanan hastalarda ilk basamak tedavide crizotinib ikinci basamakta ise alectinib kullanılmaktadır (6).

2.7.6. ROS proto-onkogen 1 (ROS 1)

ROS-1 geni normalde akciğer dokusunda ifadesi olmayan bir genidir. Bu genin yeniden düzenlenimleri KHDAK hastalarının %1-2'sinde saptanmaktadır (66). Genellikle genç, sigara kullanmaya ve AAK tanısı almış hastalarda gözlenmektedir (66). ROS1 geni füzyonları devamlı kinaz aktivitesine yol açarak JAK/STAT, PI3K/AKT/MTOR ve MAPK/ERK uyarır,

bunun sonucu olarak hücrede proliferasyon artışı ve malign dönüşüm meydana gelir (67-70). ROS1 mutant hastalar TKİ olan crizotinib den fayda görmektedir.

2.7.7. Östrojen reseptör alfa (ESR1)

Östrojen reseptörleri (ER) akciğer kanseri (AK) dokusunda ve akciğer kanseri hücre hatlarında gözlenmiş (71) olup AK patogenezin de önemli rolü olduğunu tahmin edilmektedir. Bazı çalışmalarda östrojenin KHDAK hastalarında prognoz üzerinde negatif etkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (71, 72)

2.7.8. Fibroblast büyüme faktörü reseptör -1 (FGFR1)

FGFR1 geni amplifikasyonları KHAK hastalarında kötü prognozla ilişkilendirilmiş olup hastaların %20'sine saptanmaktadır (66). Hastaların çoğunluğu sigara kullanmaktadır. FGFR1 ve FGFR3 genlerinin işlev artırıcı mutasyonları KHDAK hastalarının %5'inde,ASHK hastalarının ise %3'ünde görülmektedir (6).

2.7.8. B-Raf proto-onkogen (BRAF)

BRAF gen ürünü serin-treonin kinaz aktivitesine olan bir proteindir. KRAS yolağının alt düzenleyici olan bu protein aynı zamanda MAP2K1'i aktive etmekte ve bu sayede hücre büyümesi ve çoğalmasında önemli rol almaktadır (73). KHDAK hastalarının %3'ünden BRAF geninde nokta mutasyonları gözlenir (8). BRAF geni ekzon 15'teki kinaz domainini etkileyen V600E mutasyonu KHDAK hastalarında gözlenen BRAF mutasyonlarının %50'sini oluşturur (66). V600E mutasyonunu sırasıyla ekzon 11'deki G469A ve ekzon 15 D594G mutasyonları takip etmektedir (66). Dabrafenib BRAF geni V600E mutasyonu pozitif KDHAK hastaların ilk basamak tedavisinde FDA onayı ile kullanıma girmiştir.

2.7.9. Mitojen-aktive edici protein kinaz 1 (MAP2K1)

MAP2K1 geni MEK1 geni olarak da bilinen serin-treonin kinaz aktivitesi olan ve RAS geni yolağında alt düzenleyicilerden biridir. MEK1 ayrıca BRAF yolağının alt düzenleyicilerinden olan MAPK2 ve MAPK3 ü

aktivite etmektedir. KHDAK hastalarının %1 inde gözlenmiş olup mutasyonları ekzon 2 deki aktivite artırıcı mutasyonlardır (66).

2.7.10. Fosfatidil inozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subünit alfa (PIK3CA)/ V-akt murine timoma viral onkogen homolog 1 (AKT1)/ fosfataz ve tensin homolog (PTEN) yolağı mutasyonları

PIK3CA birçok tümör dokusunda sıklıkla izole edilmektedir (74). Akciğer kanseri hastalarında ise AAK hastalarının yaklaşık olarak %4'ünde, ASHK hastalarının %16'sında saptanmaktadır ve genelde diğer sürücü mutasyonlar ile beraberlik gösterir (1). Mutasyonların %75'i helikal bölgesini (ekzon 9) ve kinaz bölgesi (ekzon 20) kodlayan ekzonlarda toplanmıştır (74). AKT-1, PI3K yolağının alt mediatörlerinden biridir ve mutasyonları AAK hastalarının %1'inde saptanmaktadır (6, 74). PTEN geni kodladığı protein ve lipitler ile PI3K/AKT yolağının negatif regülasyonunu yapmaktadır (6). KHDAK hastalarının sadece %5'in de gözlenmektedir ve sıklığı ASHK alt tipi ve sigara kullanımı öyküsü ile ilişkilidir (75).

2.7.11. Kirsten sıçan sarkoma 2 viral onkogen homolog (KRAS)

KRAS, G proteini kodlayan RAS ailesinin (HRAS, NRAS) bir üyesidir. Kodladığı G proteini hücrenin çoğalması ve farklılaşmasından için gereklidir (76). İnaktive halde iken guanozin difosfat (GDP) ile bağlı halde olan RAS proteini guanozin trifosfat (GTP) ile bağlanınca aktive hale gelir ve RAS/RAF/MEK/MAPK yolağı ve PI3K/AKT/mTOR yolağını aktive eder (77). KRAS, EGFR de dahil olmak üzere hücre büyümesi üzerine etkili birçok reseptörün alt sinyal yolağında kritik rol oynar, genin aktive edici mutasyonları büyüme faktörü (BF) aracılı sinyal yolağında BF ihtiyacını ortadan kaldırır (66). KRAS geni mutasyonları AAK hastalarında en sık gözlenen mutasyondur (%25-40) (8, 36, 37). KRAS geni mutasyon sıklığı Batı toplumlarında Asya toplumuna göre daha sıktır (38) . Sigara kullanan erkek hastalarda KRAS mutasyonu görülme sıklığını artırmaktadır (8, 36, 38). Ayrıca sigara kullananlarda G>T transversiyonu daha sık iken; kullanmayanlarda G>A transisyonu daha sıktır (78). KRAS mutasyonları EGFR mutasyonlarında ayrı olabileceği gibi EGFR mutasyonları ile berabere

olabilmekte ve birliktelikleri halinde EGFR TKİ ilaçlara direnç gelişmesine yol açmaktadır. KRAS mutasyonları sırasıyla en sık ekzon 12, ekzon 13 ve ekzon 61 de gözlenmektedir (66)

2.7.12. Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog (NRAS)

RAS ailesinin bir üyesidir. GTPase aktivitesi bulunur. KHDAK hastalarının yaklaşık %1'inde gözlenmektedir mutasyonları genelde A>T transversiyonları şeklinde olup sırasıyla ekzon 3 ve ekzon 2 de gözlenmektedir (79). Literatürde kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini öne süren çalışmalar bulunmaktadır (79)

2.7.13. Discoidin domain reseptör 2 (DDR2)

DDR 2 tirozin kinaz aktivitesi olan EGFR ailesine ait bir hücre yüzey reseptörü kodlamaktadır. Hücre çoğalması, migrasyonu ve metalloproteaz aktivitesinde bulunmaktadır. DDR2 mutasyonları KHDAK hastalarının %3'ünde gözlenmektedir (80). Literatürde prognoz üzerine etkisi olmadığı öne sürülmektedir.

2.7.14. KIT

KIT geni tip3 reseptör tirozin kinaz reseptörü olup kanser gelişiminde önemli rol üstlenmektedir (81). Genellikle kök hücre faktörü (SCF) ile uyarılır ve vücut için önemli birçok süreçte (örn: fertilité, homeostazis, melanogenez, hematogenez vs) kritik rol almaktadır (82). Mutasyonları özellikle hematolojik kanserler, kolorektal kanserler, meme kanseri, akciğer kanseri, nöroblastoma ve jinekolojik kanserlerde saptanmaktadır (83). KIT geninde meydana gelen aktive edici mutasyonlar, EGFR ve KRAS yolaklarını bypass edip EGFR TKİ ve crizotinibe karşı ilaç direncine yol açtığı daha önce gösterilmiştir (84-86).

2.7.15. Nörotrofik reseptör tirozinaz kinaz 1 (NTRK1)

NTRK, tropomiyozin tirozin kinaz reseptör kodlamaktadır. KHDAK hastaların %3'ünde NTRK geni füzyonlarına rastlanmaktadır (87). Füzyon partnerleri genellikle Myosin phosphatase Rho-interacting protein (MPRIP) ve CD74 genleridir (6). Entrectinib ve Larotrectinib klinik deneme aşamasında olan seçici TKİ ilaçlardır.

2.7.16. Trombosit derive büyüme faktörü reseptörü alfa (PDGFRA)

PDGF geni alfa ve beta alt grupları olan tirozin kinaz reseptörleri kodlamaktadır. Sağlıklı hücrede hücre proliferasyonu, büyümesi ve migrasyonun yanında anijogeneziste rol almaktadır. PDGFRA aşırı aktivasyonuna yol açan mutasyon ve yeniden düzenlenimler tümörögenез ve tümör progresyonuna yol açmaktadır (88). KHDAK hastalarında PDGFRA mutasyonunu sıklığını %2 olarak gösteren çalışmalar mevcuttur (89) PDGF geninin aşırı aktivasyonuna yol açan mutasyonlar genellikle miyeloproliferatif hastalıklar, prostat kanseri ,meme kanseri ve KHDAK gibi solid tümörlerde gösterilmiştir.

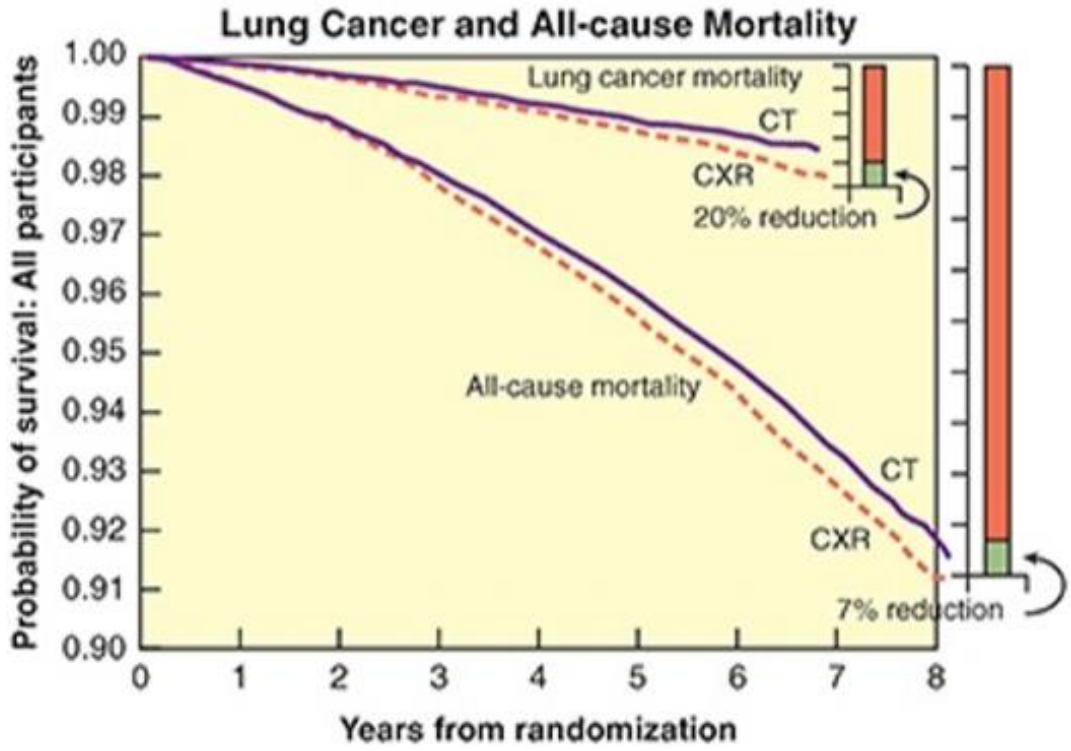
2.7.17. Rapamycin insensitive companion of mTOR (RICTOR)

RICTOR mTOR2 kompleksinin bir komponenti olup aktin organizasyonunu düzenleyip hücre hayatta kalmasını ve çoğalmasını düzenlemektedir. mTOR bağımsız füzyonlar kanser hücrelerinin migrasyonu, çoğalması ve hayatta kalmasında rol almaktadır (90). RICTOR gen mutasyonu KHDAK, kolon kanseri, meme kanseride dahil olmak üzere tüm kanserlerde saptanmaktadır. KHDAK hastalarının %3,18'inde RICTOR geninde patojenik alterasyonlar saptanmıştır.

2.8. Akciğer Kanseri Tarama

Geçen birkaç on yılda KHDAK hastalığının tanı ve tedavisinde büyük gelişmeler yaşanmasına rağmen KHDAK hastalığının 5 yıllık sağ kalımı %19 dur (6). 5 yıllık sağ kalımın bu kadar düşük olmasında ki en önemli nedenlerinden biri AK hastalarının %60'ının lokal yada sistemik ileri evrelerde tanı almasıdır ve tanı anında cerrahi tedavi seçeneğinin bu hastalar için mümkün olmamasıdır (91). Bu durum hastalığın erken evrelerinde tanı imkanı sağlayacak tarama testi gerekliliğini doğurmaktadır. Tarama testi

olarak kullanılması amacıyla daha önce toraks grafisi, balgam sitolojisi ve bu iki yöntemi beraber kullanılarak risk grupları taranmış ve bu yöntemlerin mortalite üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermiş ve bu yöntemler tarama testi olarak başarısız kabul edilmiştir (92-94). Öte yandan düşük doz bilgisayarlı tomografisi (DDBT) ile yapılan taramalar sonuçları göğüs radyografisini (GRG) tarama sonuçları ile kıyaslandığı zaman DDBT'sinin akciğer kanseri nedeniyle mortalitede %20 ve toplam mortalite %7 azalma sağladığı görülmüştür (95) (Şekil-3). Bu sonuçlara dayanarak 55-80 yaş aralığında olup sigara kullanan yada eski sigara kullanıcısı (≤ 15 önce sigara kullanmayı bırakmış, ≥ 30 yıl/paket sigara kullanmış) kişilerin DDBT ile yıllık olarak taranması önerilmektedir (96). Son yıllarda erken tanının önemi ve tarama için hala çok uygun bir testin olmaması nedeniyle moleküler tarama oldukça sık çalışılan bir alan olmuştur. Özellikle cfDNA miktarının KHK'de tarama testi olarak kullanılabileceğini gösteren metaanaliz çalışmaları mevcuttur (97, 98) .



Şekil 3: Akciğer Kanseri Taramasında Düşük Doz Bilgisayar Tomografi ve Göğüs Grafisinin Mortaliteye Etkisi

(National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al. alınmıştır (95))

CXR: Göğüs X-Ray grafisi CT: Bilgisayar Tomografi

2.9. Akciğer Kanserinde Evreleme ve Prognoz

Akciğer kanseri genelde TNM sistemine göre evrelendirilir. T tümörün büyüklüğünü ve derecesini, N tümörün yakındaki etkilenmiş lenf nodu (LN) sayısını, M ise metastazı belirtir.

Tablo 1: Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi T Belirteci

T _x		Tümör varlığının balgam örneği veya bronş yıkması ile elde edilen hücreler ile gösterildiği; primer tümörün değerlendirilemediği, bronkoskopi veya görüntüleme yöntemi ile gösterilemeyen tümör.
T ₀		Primer tümöre ait bulgu yok.
T _{is}		Karsinoma insitu.
T ₁		En büyük yerinde 3cm veya daha küçük büyüklükte, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopide lobar bronşta invazyon bulgusu olmayan tümör (ana bronşta değil) ¹
	T _{1mi}	Minimal invaziv adenokarsinoma ²
	T _{1a}	En büyük çapı ≤1cm olan tümör
	T _{1b}	En büyük çapı >1cm ama ≤2cm olan tümör
	T _{1c}	En büyük çapı >2cm ama ≤3cm olan tümör
T ₂		Çapı >3cm ama ≤5cm; veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör. <ul style="list-style-type: none">• Karinayı içermeyen, karinaya olan uzaklığına bakılmaksızın ana bronşu tutmuş tümör• Visseral plevraya invaze• Akciğerin bir parçasında yada tümünde, hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile ilişkili tümör.
	T _{2a}	En büyük çapı >3cm ama ≤4 cm olan tümör
	T _{2b}	En büyük çapı >4cm ama ≤5 cm olan tümör
T ₃		En büyük çapı >5cm ama ≤7 cm olan tümör veya göğüs duvarı (üst sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, perietal perikadiyumdan en az birine direk invaze tümör; veya primer tümör ile aynı lobta tümörden ayrılmış nodül/nodüller
T ₄		7cm den büyük tümör yada diafragma, mediastinum, kalp, büyük arterler, recurrent larngal sinir, özefagus, vertebra gövdesi, karina; primer tümörden farklı ipsilateral loblardaki nodül/nodüller
1-Ana bronşun proksimalinde , bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayımı da evre T1a olarak sınıflandırılır. 2- ≤3cm boyutta lepidemik paterni baskın ≤5mm invazyon yapmış solit adenokarsinoma		

Tablo 2: Belirteci Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi N belirteci

N _x		Bölgesel lenf nodları değerlendirilmedi
N ₀		Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N ₁		ynı taraf peribronşiyal lenf nodu ve/veya aynı taraf hilar lenf nodu ve intrapulmoner lenf nodu metastazı, direkt metastaslarda dahil
N ₂		Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodu metastazı
N ₃		Karşı taraf mediastinal, karşı taraf hilar, aynı taraf veya karşı taraf dalak veya supraklavikular lenf nodu metastazı

Tablo 3: Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi M belirteci

M ₀		Uzak metastaz yok
M ₁		Uzak metastaz var
	M _{1a}	Karşı taraf lobta ayrı nodüller, plevra veya perikardiyal lenf nodu metastazı veya maling plevra veya perikardiyal efüzyon
	M _{1b}	Toraks dışı tek organda tek metastaz
	M _{1c}	Toraks dışında bir/birden fazla organda birden fazla metastatik odak

Tablo 4: TNM Evrelemesi

Evre	T	N	M
Gizli kanser	T _x	N ₀	M ₀
IA ₁	T _{1mi}	N ₀	M ₀
	T _{1a}	N ₀	M ₀
IA ₂	T _{1b}	N ₀	M ₀
IA ₃	T _{1c}	N ₀	M ₀
IB	T _{2a}	N ₀	M ₀
IIA	T _{2b}	N ₀	M ₀
IIB	T _{1a}	N ₁	M ₀
	T _{1b}	N ₁	M ₀
	T _{1c}	N ₁	M ₀
	T _{2a}	N ₁	M ₀
	T _{2b}	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₀	M ₀
IIIA	T _{1a}	N ₂	M ₀
	T _{1b}	N ₂	M ₀
	T _{1c}	N ₂	M ₀
	T _{2a}	N ₂	M ₀
	T _{2b}	N ₂	M ₀
	T ₃	N ₁	M ₀
	T ₄	N ₀	M ₀
	T ₄	N ₁	M ₀
IIIB	T _{1a}	N ₃	M ₀
	T _{1b}	N ₃	M ₀
	T _{1c}	N ₃	M ₀
	T _{2a}	N ₃	M ₀
	T _{2b}	N ₃	M ₀
	T ₃	N ₂	M ₀
	T ₄	N ₂	M ₀
	T ₄	N ₂	M ₀
IIIC	T ₃	N ₃	M ₀
	T ₄	N ₃	M ₀
IVA	Herhangi T	Herhangi N	Herhangi M _{1a}
	Herhangi T	Herhangi N	Herhangi M _{1b}
IVB	Herhangi T	Herhangi N	Herhangi M _{1c}

2.10. Akciğer Kanseri Tedavi

KDHAK kemoterapi ve radyoterapiye nispeten dirençli kanser türüdür. Cerrahi rezeksiyon standart radikal terapidir ama sadece evre 1-2 ve sınırlı olarak evre 3A da kullanılabilir (99).

Evre 4 hastalarda cerrahi tedavi palyatif tedavi amacıyla kullanılabilir. Kemoterapi evre 1-2 de adjuvan terapi evre 3A de ise neoadjuvan terapi olarak kullanılmaktadır (100, 101). İleri evre akciğer kanseri hastalarda (evre 3B, evre 4) kemoterapi birinci basamak tedavi olarak kullanılır ve 1 yıllık sağ-kalımı olumlu yönde etkilemektedir (102).

KHDAK tedavisinde ilk basamak tedavi platin bazlı ilaçlar (cisplatin, carboplatin) ile diğer kemoterapötik ilaçlar ile (mitotik ağ ipliğine etki edenler (docetaxel, paclitaxel, vinorelbine), gemcitabine veya pemetrexed) kombinasyonundan oluşmaktadır (6, 103). Pemetrexed ASHK tedavisinde etkili olmadığı için kullanılmamaktadır (104). Skuamöz hücre histolojisindeki hastalarda carboplatin, paclitaxel, nab-paclitaxel veya gemcitabine kullanılmaktadır (6).

Radyoterapi (RT) erken evre kanserlerde sağlık koşulları nedeniyle cerrahi tedavinin kontraendike olduğu veya primer kitleye cerrahi olarak ulaşılamadığı hastalarda kullanılmaktadır (105). RT cerrahi ile tümör dokusu tam olarak çıkarılmadığı durumlarda zaten kullanılmaktadır. Evre 3A hasta cerrahi tedavi için uygun değilse kemoradyoterapi önerilmektedir. Evre 3B de ilk basamak tedavi olarak kemoradyoterapi önerilmektedir (106). Evre 4 hastalarda tümör tam olarak rezekte edilemeyecek durumdadır ve kemoterapi ilk basamak tedavidir. İleri evre hastalarda RT ve cerrahi müdahale sadece palyatif tedavi amacıyla önerilmektedir (107).

İleri evre akciğer kanseri hastalarının kemoterapi rejimlerine son yıllarda hedefe yönelik ilaçlar da eklenmektedir. EGFR geninde aktivasyona yol açan mutasyon (başlıca ekzon 19 delesyonları ve L858R mutasyonu)

pozitif olan hastalarda tedavi amacıyla 1. nesil TKİ (erlotinib, gefitinib) ve 2. nesil TKİ (afatinib, dacomitinib) ve 20. ekzonda oluşan T790M direnç mutasyonu için osimertinib kullanılmaktadır (50, 53, 108-110). Bevacizumab anti EGFR monoklonal antikorudur ve ASHK dışı KHDAK hastalarında kemoterapi ile kombine olarak kullanımına onay verilmiştir (111). ALK-EML4 füzyonu KHDAK hastalarının %4'ünde görülmekte ve ALK/MET/ROS1 inhibitörü olan crizotinib tedavisine yanıt vermektedir (112). AAK hastaların %1-2'sinde gözlenen BRAF geni V600E mutasyonuna yönelik dabrafenib ve MEK geni inhibitörü olan trametinib kombinasyonu kullanılmakta ve sağkalımda olumlu etkiler gözlenmektedir (113). Hedefe yönelik ilaçlar daha az yan etkileri olması ve PFS üzerine olumlu etkileri nedeniyle klasik kemoterapatlere tercih edilmiş olsalar da bu ilaçlara karşı gelişen direnç mutasyonlarından dolayı etkileri sınırlı kalmaktadır (114, 115). EGFR TKİ ilaçlara karşı direnç geliştiren EGFR mutant hastaların %50'sinde T790M mutasyonu saptanmaktadır (115, 116). Daha az sıklıkta saptanan mutasyonlar MET geni amplifikasyonu ve EGFR sinyal yolağı alt düzenleyici mutasyonlarıdır (117). EGFR TKİ ilaç direncinde olduğu gibi ALK yeniden düzenlenimi pozitif hastalarda da crizotinib direnci gelişmektedir. Başlıca neden ALK geninde meydana gelen ek mutasyonlardır (118). Crizotinib direnci gelişen hastaların tedavilerinde 2. nesil (ceritinib, alectinib ve brigatinib) ALK inhibitörleri kullanılmaktadır (119). Bu genler dışında Amerikan gıda ve ilaç idaresi (FDA) tarafından onay almış 20 civarında hedefe yönelik ilaç bulunmaktadır (Tablo-5).

Kanser hastalığı tedavisinde immün kontrol noktalarının inhibisyonu özellikle KHDAK hastalarında yüz güldürücü sonuçlar vermektedir (120). Özellikle akciğer kanserinde programlı hücre ölümü proteini-1 (PD-1) antikorları (Nivolumab, Pembrolizumab) ve bu proteinin ligandı olan PD-L1 antikorları (Atezolizumab) ön plana çıkmaktadır (47).

Tablo 5: FDA Onaylı Akciğer Kanseri Tedavisinde Hedefe Yönelik İlaçlar

Gen Adı	İlaçlar
ALK	Crizotinib, Alectinib, Brigatinib, Ceritinib,
BRAF	Dabrafenib(V600E), Trametinib
EGFR	Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, Osimertinib, Cetuximab, Necitumumab
FGFR	Nintedanib
HER2/3/4	Afatinib
MET(amplifikasyon,exon 14 skiping)	Crizotinib
PD-1	Nivolumab, Pembrolizumab
PDGFR	Nintedanib
PD-L1	Atezolizumab, Durvalumab
ROS-1	Ceritinib, Crizotinib
VEGF	Bevacizumab, Ramucirumab
VEGFR	Nintedanib, Ramucirumab (VEGFR2)

2.11. Likit Biyopsi

Likit biyopsinin komponentlerinden olan kanda dolaşan tümör hücrelerinin ve serbest tümör DNA'sının varlıkları uzun yıllardır bilinmekte olsa da klinik kullanımı teknik kısıtlılıklar nedeniyle son yıllara kadar çok etkin biçimde yapılamamıştır. Gelişen teknoloji ile kanda dolaşan tümör hücrelerinin ve genetik materyallerin izolasyonunun mümkün hale gelmesiyle kanda dolaşan tümör hücreleri (CTC) ve hücresez serbest DNA (cfDNA) kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir

Dolaşan tümör hücreleri yüz yılı geçkin süredir bilinmektedir. Solid kanserlerde her gün yüzbinlerce kanser hücresi kan dolaşımına çıkmaktadır (121). Kanda dolaşan tümör hücrelerinin varlığı primer odağın metastaz yapmaya başladığını gösteren önemli belirteçlerden biridir.

Hücresez serbest DNA ve nükleik asitlerin dolaşımdaki varlıkları ilk defa 1948 yılında Mandel ve Meatis tarafından gösterilmiştir (122). Bu konu hakkında uzun yıllar çok bir ilerleme kaydedilmemiş olsa da cfDNA miktarının kanser hastalarında yükselmiş olduğu 1977 yılında gösterilmiştir (123). cfDNA'in bir komponenti olan ve circulating tumor DNA (ctDNA) olarak da bilinen komponent 1994 yılında KRAS ve NRAS mutasyonlarının

pankreas kanserli ve akut miyeloid lösemili iki ayrı hasta gösterilmesi ile tanımlanmış oldu (124, 125).

cfDNA nekroz, apopitoz ve hücrede aktif salınım ile dolaşıma çıkmaktadır. cfDNA fragmanları genellikle 70-200 bp uzunluğunda olup genelde apoptozis sonucu oluştuğu düşünülürken, kanser hastalarının bazılarında nekrotik doku kaynaklı daha uzun fragmanlar dolaşıma çıktığı varsayılmaktadır (126-128) . Bazal cf-DNA miktarı hematopoetik sistem gibi hücre sirkülasyonun fazla olduğu sistemlerden kaynaklanır (128). cfDNA miktarı genellikle kanser hastalarında yükselmekle beraber diabetes mellitüs, sistemik lupus eritematozus, gebelik, sepsis ve miyokart enfarktüsü gibi kronik ve akut hücre yıkımı ve yapımıyla giden süreçlerde de artmakta ve cfDNA yüksekliğini kanser hastalığına özgül olmaktan çıkarmaktadır (129, 130).

1977 de DNA dizilemesi için Sanger sekanslama (131) kullanıldığından beri biyoteknoloji alanında birçok gelişme kat edildi . Bu ilerlemeler büyük ölçekte sekanslama gerektiren projeleri daha ucuz ve hızlı yapabilme gereksinimi doğurmaktadır. Yeni nesil sekanslama teknikleri günümüzdeki bu ihtiyaçları gidermektedir. Yeni nesil sekanslama özellikle kanser genomunda sanger sekanslamaya göre somatik mozaisizmi saptamadaki hassasiyeti, nükleotid sekansını, kopya sayısı değişimlerini ve yapısal yeniden düzenlenimleri aynı anda saptayabilmesi ile ön plana çıkmaktadır (132, 133). Likit biyopside kullanılan diğer bir yöntem ise ddPCR yöntemidir. NGS ve ddPCR kıyaslandığında ddPCR daha sensitif olmasına rağmen aynı anda sadece bilinen birkaç mutasyona bakabiliyorken; NGS yöntemi ile bilinen/bilinmeyen birçok mutasyona açık bölge aynı anda değerlendirilebilmektedir. ddPCR belli başlı mutasyonların ön plana çıktığı kanserlerde, tedaviye cevap/takip durumu ve minimal rezidüel hastalık araştırılırken ön plana çıkarken, NGS kişisel tedavi rejimi belirlemede ve ilaç direncinde daha sık kullanılmaktadır. Kliniğimiz tanı merkezi olarak hizmet vermekte olup hastalarımız çoğunluğu ilaç direnci etiyolojisi ile tarafımıza yönlendirilmektedir. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda NGS tabanlı sistemler tercih edilmiştir.

2.11.1. Akciğer Kanserinde likit biyopsinin kullanım alanları

2.11.1.1. Tanıda cfDNA

Kanser tedavisinin tümör üstündeki baskısı farklı lezyonlarda ya da aynı lezyonda bağımsız olarak farklı direnç mekanizmaları barındıran subklonların oluşmasına yol açabilmektedir (9, 134, 135). Bu durum tümör heterojenitesine olarak adlandırılmaktadır (135). Hedefe yönelik tedavilerin en büyük limitasyonunu tümör dokusu heterojenitesidir (136).

Son zamanlarda yapılan birçok meta-analiz ve çalışmalarda plazma bazlı EGFR testlerinin KHDAK hastalarında tanısal değeri olabileceğini vurgulanmaktadır (137-139). EGFR mutasyonları tespiti için yeterli doku materyali olmayan ya da doku biyopsisi yapılamayan hastaların tanısında, plazma ya da serumdan elde edilen cfDNA bazlı çalışmalar yardımcı olabilir. Literatürde digital droplet PCR yöntemi ile yapılan analizlerde SHAK-dışı KHDAK hastalarında EGFR geninde en sık görülen iki mutasyonun (ekzon 19 delesyonları, L858R) %100 spesifite ve %74-82 sensitivite ile saptandığı bildirilmiş ayrıca doku biyopsisi ve plazma bazlı EGFR testleri arasında yüksek uyumluluk saptanmıştır (140, 141). Yeni nesil dizileme yöntemi ile yapılan analizlerde de doku biyopsisi sonuçları ve plazma bazlı testler arasında %71 konkordans sağlanmış ve her ne sebeple olursa olsun genetik testler için yeterli doku olmayan hastalarda likit biyopsinin ile seçenek olabileceği öne sürülmüştür (142).

2.11.1.2. Hastalık Prognozunda cfDNA

KHDAK hastalarında hastalık seyrini etkileyen birçok faktör olması nedeniyle prognozu tahmininde bulunmak oldukça zordur. Bu faktörler başlıca çevresel etkenler, tümöre bağlı etkenler ve hastaya bağlı etkenler olarak 3 guruba ayrılabilir (6). Hali hazırda KHDAK hastalarının prognoz tayininde yaş, performans durumu(143, 144), kilo kaybı, tümör çapı ve nodal invazyon varlığı (143) prognoz tayini için kullanılan belirteçlerdir. Bu

belirteçlere ek olarak likit biyopsinin ve cfDNA'nın KHDAK hastalığında prognostik değeri olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu kapsamda Wang ve ark çalışmasında (145) 1.nesil TKİ direnci olan hastalarda T790M mutasyonu saptamak amacıyla ddPCR ve dPCR cihazları kıyaslanmış olup tedavisi sırasında T790M mutasyonu allel fraksiyonu artan hastaların T790M allel fraksiyonu daha az artan hastalara göre daha iyi progresyonsuz sağkalım (PFS) ve genel sağ kalım gösterdiği ve T790M pozitif hastaların T790M negatif hastalara göre daha iyi sonuçlarını elde etmiştir. Başka bir çalışmada da (146) NGS yöntemi kullanılmış olup çalışan ekip metastatik KHDAK hastalarında cfDNA seviyeleri yüksek olan hastaların kandaki varyant sayılarına bakılmaksızın kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda gösterildiği gibi cfDNA miktarındaki artış KHDAK hastalarında prognostik faktör olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

2.11.1.3. Rekürrens ve minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesi

Likit biyopsinin başka bir potansiyel kullanım alanı ise cerrahi tedavi ya da kür sağlayıcı başka tedavilerden sonra minimal hastalık takibi yapılabilmesi veya rekürrensin değerlendirilebilmesidir. Uzun süredir rezidüel hastalığı olan hastalar klinik ve patolojik özelliklerine göre değerlendiriliyordu ve TNM sistemi bu sistemde önemli yere sahipti. Yüksek riskli hastalar tamamen iyileşmiş ve tedavi ihtiyacı olmasa bile adjuvan kemoterapi kullanımı söz konusuydu. Son yıllarda farklı kanser türlerinden hastalarda yapılan çalışmalarda likit biyopsi yönteminin minimal rezidüel hastalık ve rekürrens açısından kullanılabileceği gösterilmiştir. Erken evre meme kanseri hastalarında yapılan çalışmada (147) cerrahi tedavi öncesinde ve sonrasında kan alınmış ve cerrahi sonrası ctDNA tespit edilen hastaların 4 kat daha fazla relaps geliştirdiği gösterilmiştir. Diehl ve ark (148) kolorektal kanser hastaları ile yaptıkları çalışmada ise cerrahi sonrası likit biyopside ctDNA tespit edilen hastaların 5 yıllık takiplerde relaps geliştirdiği ctDNA negatif hastaların ise 5 yıllık takipte bile relaps geliştirmedeği gösterilmiştir. Sozzi ve ark (149) çalışmasında likit biyopside KRAS gibi patojenik mutasyonların KHDAK hastalarında tekrardan tespit edilmesinin relaps gelişimi ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir. Bu çalışmalar ışığında likit biyopsi yönteminin gerek ctDNA varlığı ile gerekse patojenik mutasyon takibi yapılarak kanser hastalarının rekürrens ya da minimal rezidüel hastalık takibinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

2.11.1.4. Kazanılmış direnç ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesi

Hedefe yönelik ilaçlarında birinci basamak tedavide yer almaya başlamasıyla beraber KHDAK tedavisindeki ilerlemeler hız kazanmıştır. Bu gelişmelere rağmen birçok hastada tedavi süreci sonunda kür sağlamak mümkün olmamaktadır. Bu durumun başlıca nedeni tedavi sırasında gelişen ilaç direncidir. İlaç direnci çoğu zaman klonal heterojenite ve seçim sonucunda meydana gelmektedir. Doku biyopsisi tümör genotiplenmesinde altın standart olmasına rağmen gerek doku materyalinin azlığı gerekse tümör heterojenitesinden dolayı ilaç direncine yol açan mutasyonları göstermekte eksik kalabilmektedir (9, 150). Örnek olarak 1.nesil EGFR TKİ tedavisi alan KHDAK hastalarında tedavinin 10-12.ayında TKİ ilaçlara direnç gelişmektedir. İlaç direncinin en sık nedeni EGFR geninde (%50) T790M mutasyonu gelişmesidir (6).Bu mutasyona yönelik 3.nesil TKİ olan osimertinib hali hazırda kullanılmakta ve etkili sonuçlar alınmaktadır. Ama osimertinib tedavisindeki hastalarda da tedavi sürecinde ilaç direnci gelişmekte ve bunun başlıca nedeni EGFR geninde meydana gelen C797S mutasyonudur (151). Sadece EGFR geninde meydana gelen mutasyonları tespit edebilmek için 3 defa doku biyopsisi alınması gerekmekte iken likit biyopsi yöntemi ile periferik kandan kolaylıkla birçok gendeki çokça çeşitli mutasyonları aynı anda inceleme fırsatı yakalanmaktadır. Bu avantajı nedeniyle KHDAK tedavi sürecinde likit biyopsi yöntemi sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışma retrospektif bir çalışma olup Ocak 2019-Kasım 2019 tarihleri arasında Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı alan veya takip edilen likit biyopsi için tarafımıza yönlendirilen ve genetik analizleri tamamlanan 100 (yeni tanı n=42 progrese/nüks n=58) ardışık hasta dahil edildi. Hastaların klinik bilgileri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleus bilgi sistemi ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı hasta dosya arşivinden elde edildi.

Hastaların başvuru anındaki radyolojik görüntüleme (PET, BT ve MR) verileri incelenerek literatürdeki daha önceki çalışmalar temelinde metastaz odak sayılarına göre uzak organ metastazı yok, oligometastatik (1-3 uzak metastatik odak) ve multimetastatik (≥ 3 uzak metastatik odak) olarak 3 gruba ayrıldı (152).

Her hastadan 2 adet Paxgene tüpüne (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Switzerland) toplamda 30 ml olacak şekilde taze kan alındı. Alınan materyalden QIAamp Circulating Nucleic Acid kiti (Qiagen, Hilden, Germany) ve QIAvac 24 Plus izolasyon sistemi (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak cfDNA izolasyonu yapıldı. Qubit™ dsDNA HS Assay kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak ölçümleri yapıldı. Miktarı ve kalitesi çalışma için uygun olan materyaller aşağıda detaylıca anlatılan protokoller kullanılarak çalışıldı.

Çalışma sonrasında hastaların NGS verilerinin kalite analizleri QIAGEN Clinical Insight Analyze (QCI) programı kullanılarak yapıldı. Bu analizde özellikle tüm ve hedef bölge okuma sayıları, kalite skoru (Q score ≥ 25), forward/reverse okuma dengesi ve hedef bölgelerin okuma derinliği ($\geq 500x$) parametreleri veri kalitesini değerlendirmek için kriter olarak alındı. Saptanan varyantların doğruluğu değerlendirme açısından "Track Viwer" ve Integrative Genomics Viewer "IGV" programları kullanıldı. Allel fraksiyonu $\geq 1\%$ olan varyantlar değerlendirilmeye alındı (153, 154). Varyantların klinik olarak anlamlandırılması ve patojenisitesinin belirlenmesi amacıyla başta QIAGEN

Clinical Insight Analyze programı olmak üzere COSMIC, ClinVar ve veri tabanları ACMG/AMP guiedline'ı kullanıldı. Ayrıca in silico analizler için Mutation Taster, Provean, Varsome ve SIFT programlarından yararlanıldı.

Çalışmamızda likit biyopsi yöntemi ile 19 gendeki (AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RICTOR, ROS1) genetik varyasyonların sıklık ve dağılımı ile bu varyasyonların hastalık prognozu üzerine etkileri incelendi. Bu hastalarda saptanan mutasyonların sıklık ve dağılımı incelendi. Ayrıca bu mutasyonların başvuru anındaki yaş, cinsiyet, histopatolojik tip, evre, metastaz odak sayısı, cfDNA miktarı, tedavi direnci ve genel sağkalım ile ilişkisi değerlendirildi.

3.1. cfDNA İzolasyonu

Kan plazma örneklerinden, serbest tümör DNA'sı izolasyonu için QIAamp Circulating Nucleic Acid kiti ve QIAvac 24 Plus izolasyon sistemi kullanıldı.

Kullanılacak tamponlar ve hazırlanışları

- ACW1 tamponu
- ACB tamponu
- ACW2 tamponu
- Carrier RNA'nın ACL Buffer'a eklenmesi

cfDNA izolasyon protokolü

- Her hastadan 2 adet Paxgene tüpüne toplamda 30 ml olacak şekilde taze kan alındı.
- Alınan kanlar santifüj edildi.
- Süpernatanttan 4 ml alınıp Proteinase K ve ACL Buffer ile karıştırıldı.
- Su banyosunda 60 °C'de 30 dk inkübasyon yapıldı.

- İnkübasyon sonrasında ACB buffer eklendi ve -20 °C' de 5dk inkübe edildi.
- QIAmp Mini kolonlarını QIAvac üzerindeki VacConnector'lara yerleştirildi.
- Lizat+ACB buffer karışımın vakum pompa yardımı ile filtreden geçirildi.
- Sırasıyla ACW1, ACW2 ve %96 lık etanol kolonlardan geçirildi.
- Kolonlar 2 ml collection tüplere yerleştirildi ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı.
- Kolonları yeni bir collection tüpe alındı ve ısıtıcı blokta 56°C'de 10 dk inkübe edildi.
- Kolonlar yeni 1,5 ml'lik elüsyon tüplerine yerleştirildi AVE Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.
- Daha sonra 14000 rpmde 2 dk santrifüj yapıldı.

3.2. cfDNA Ölçümü

Qubit ile DNA ölçümünde Qubit™ dsDNA HS Assay Kit kullanıldı.

- Her bir numune 0,5 ml tüplere alındı.
- Qubit™ dsDNA HS reagent, Qubit™ dsDNA HS buffer kullanılarak 1/200 oranında seyreltildi. Qubit çalışma solüsyonu hazırlandı.
- Son volüm 200 µl olacak şekilde uygun hacim tüplere aktarıldı.
- Qubit® 3.0 Fluorometer cihazında (Qubit 3.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sırasıyla DNA, dsDNA High Sensitivity protokolleri seçildi.
- Numunelerde 2 µl örnek alınarak DNA ölçümü yapıldı değerler kaydedildi.

Qubit ölçümünde cfDNA konsantrasyonu 2ng/ µl altında olan hastalar GeneRead QIAact Actionable Insights Tumor Panel'ine (AIT panel) alındı. 2ng/ µl üstünde konsantrasyonu olan hastalar GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel'ine (LUNG UMI panel) alındı.

3.3. Fragmantasyon, End-Repair, A- Addition

GeneReader cihazında sekans analizi için hazır panel “GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel” kiti kullanılır.

Tablo 6: GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel İçeriği Tablosu

GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel	
Number of reactions	24
GeneRead QIAact DNA UMI Library Preparation and Target Enrichment Reagents (Kit Box 1)*	
QIAact Lung DNA UMI Target Enrichment Panel and QIAact Adapters (Kit Box 2)*	

GeneRead QIAact DNA UMI Library Preparation and Target Enrichment Reagents*	
Number of reactions	24
Fragmentation Buffer, 10x	65 µl
Fragmentation Enzyme Mix	130 µl
FERA Solution	20 µl
Ligation Buffer, 5x	260 µl
Ligation Solution	200 µl
DNA Ligase	130 µl
Nuclease-Free Water	2 x 2 ml
TEPCR Buffer, 5x	220 µl
UPCR Buffer, 5x	220 µl
HotStarTaq® DNA Polymerase	2 x 50 µl
One bottle containing QIAseq Beads (provided in separate cold-packed shipment)	10 ml

QIAact Lung DNA UMI Target Enrichment Panel and QIAact Adapters *	
Number of reactions	24
GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel Forward Primers	130 µl
GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel Reverse Primers	130 µl
QIAact Adapters (contains 12 tubes with each tube corresponding to one - specific 9 bp sample bar code; each tube can process up to 2 samples)	10 µl
GeneReader™ TE-PCR Primer	40 µl
GeneReader Universal PCR Primer A	40 µl
GeneReader Universal PCR Primer B	40 µl

- Örnek DNA’lar 10 ng/µl olacak şekilde seyreltildi.
- Her bir örnek için PCR tüpüne 4 µl dilüe edilmiş, 16 µl DNA Master miks ve 5 µl Fragmentation Enzyme Mix’i aktarıldı.

Tablo 7: Fragmantasyon, End-Repair, A- Addition Miksi Hazırlama Tablosu

	1 reaksiyon hacmi	6 reaksiyon hacmi	12 reaksiyon hacmi
İçerik	Hacim (µl)	Hacim (µl)	Hacim (µl)
DNA*	4	-	-
Fragmentation Buffer, 10x	2,5	16,2	31,2
Nuclease-Free Su	12,75	82,9	159,4
FERA Solution	0,75	4,9	9,4
Toplam	20	104	200

3.4. Adaptör Bağlanması

Aşağıdaki tabloya göre reaksiyon miksi hazırlandı.

Tablo 8: Adaptör Bağlanma Miksi Hazırlama Tablosu

	1 reaksiyon	6 reaksiyon	12 reaksiyon
İçerik	Hacim (µl)	Hacim (µl)	Hacim (µl)
Ligation Buffer, 5x	10	65	125
DNA ligase	5	32,5	62,5
Ligation solution (PEG6000, 50%)	7,2	46,8	90
Toplam	22,2	144,3	277,5

- Her bir örnek için QIAact Adapter'dan 2,8 µl alınarak PCR tüpüne aktarıldı.
- Her bir PCR ürününden 25 µl alınıp, adaptör içeren PCR tüplerine aktarıldı sonra içerisine 22,2 µl ligation master miksi eklendi. İnkübasyon yapıldı. QIAseq Bead'ler ile temizlik işlemine geçildi.
- 50µl ligasyon ürünü LoBind tüpe aktarılıp 50 µl nukleaz free su eklendi.
- Üzerine 100 ul QIAseq Beads eklendi ve inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası süpernetant tüpten uzaklaştırıldı.
- 200µl %80 etanol yıkama yapıldı ve süpernatatn uzaklaştırıldı.
- DNA hedef boncuklarını 52µl nuclease-free su ile dilüe edildi.
- 50µl süpernatantı, Lobind tüpe aktarıldı.

- 50µl QIAseq Beads'i 50µl DNA solüsyonu üzerine eklendi.
- İnkübasyon sonrası süpernatantı uzaklaştırıldı.
- 2 defa 200µl %80 etanol ile yıkama işlemi yapıldı.
- Hedef DNA boncukları 22 µl nuclease-free su ile dilüe edildi.
- Her bir örnek için bir adet forward target enrichment PCR, bir adet reverse target, enrichment PCR için kullanılmak üzere 2 adet PCR stribi hazırlanıp 9.4µl süpernatantı bu PCR tüplerine aktarıldı ve hedef zenginleştirme PCR kurulumuna geçildi.

3.5. Ürün Zenginleştirme

Forward Target Enrichment PCR ve Reverse Target Enrichment PCR için 2 farklı master miksi aşağıda belirtilen tablolara göre hazırlandı.

Tablo 9: Forward Hedef Zenginleştirme PCR Reaksiyon Miksi Hazırlama Tablosu

	1 reaksiyon	6 reaksiyon	12 reaksiyon
İçerik	Hacim (µl)	Hacim (µl)	Hacim (µl)
DNA kitaplığı (34. Maddedeki)	9,4	-	-
TEPCR Buffer, 5x	4,0	26,0	50,0
GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel Forward Primers	5,0	32,5	62,5
GeneReader TE-PCR Primer	0,8	5,2	10,0
HotStarTaq DNA Polymerase	0,8	5,2	10,0
Toplam	20,0	68,9	132,5

Tablo 10: Reverse Hedef Zenginleştirme PCR Reaksiyon Miksi Hazırlama Tablosu

	1 reaksiyon	6 reaksiyon	12 reaksiyon
İçerik	Hacim (µl)	Hacim (µl)	Hacim (µl)
DNA kitaplığı (34. Maddedeki)	9,4	-	-
TEPCR Buffer, 5x	4,0	26,0	50,0
GeneRead QIAact Lung DNA UMI Panel Reverse Primers	5,0	32,5	62,5
GeneReader TE-PCR Primer	0,8	5,2	10,0
HotStarTaq DNA Polymerase	0,8	5,2	10,0
Toplam	20,0	68,9	132,5

- Her bir hazırlanan hedef zenginleştirme miksinden, daha önce her bir örnek için 2 adet PCR tüpüne dağıtılarak 9,4 µl saflaştırılmış DNA kütüphanesi üzerine 10,6 µl eklendi.
- Thermalcycler aşağıdaki tablodaki gibi programlandı.

Tablo 11: Thermalcycler Tablosu

Basamak	Süre	Derece
İlk denaturasyon	13 dakika	95°C
	2 dakika	98°C
8 döngü	15 saniye	98°C
	10 dakika	68°C
1 döngü	5 dakika	72°C
1 döngü	5 dakika	4°C
Bekleme	∞*	4°C

- Reaksiyon sonrası QIAseq Bead'ler ile temizlik işlemine geçildi.
- Forward ve reverse target enrichment PCR ürünlerini bir araya getirilerek 40 µl' yi temiz bir LoBind (1,5 ml) tüpe aktararak 100 µl' ye tamamlandı.
- Dilüe edilen 100 µl ürününün üzerine 100 µl QIAseq Beads eklendi ve 5 dk inkübasyona bırakıldı. Sonra süpernatant tüpten uzaklaştırıldı.
- %80 etanol eklenip yıkama yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Etanolü uzaklaştırılması için boncukların 10 dakika kurumaya bırakıldı.
- DNA boncuklarını 16µl nuclease-free su ile dilüe edildi.
- 13,4 µl süpernatantı temiz bir PCR tüpüne ya da PCR plate kuyusuna aktarıldı ve Universal PCR amplifikasyon kurulumuna geçildi.

3.6. Universal PCR oęaltması

Aşağıdaki tabloya göre mikster hazırlandı.

Tablo 12: Universal PCR Miksi Hazırlama Tablosu

	1 rnek	6 örnek	12 rnek
İçerik	Hacim (µl)	Hacim (µl)	Hacim (µl)
Zenginleştirilmiş DNA (48. maddede ki)	13.4	-	-
UPCR Buffer, 5x	4,0	26,0	50,0
IL-Universal Primer	0.8	5,2	10,0
IL-S502 Index Primer	0.8	5,2	10,0
Hot Start Taq DNA polimeraz	1	6,5	12,5
Toplam	20	42,9	82,5

- Zenginleştirilmiş DNA içeren PCR tüplerine hazırlanan master miksten 6,6 µl eklenerek santrifüj edildi.

Thermalcycluser cihazı aşağıdaki programa göre kuruldu.

Tablo 13: Universal PCR Thermalcycluser Döngüsü Tablosu

Basamak		Derece	Süre
1	İlk Denaturasyon	95°C	13 dakika
2		98°C	2 dakika
3	21 döngü	98°C	15 saniye
		60°C	2 dakika
4	1 döngü	72°C	5 dakika
5	Hold	4 °C	5 dakika
6		4 °C	∞

- Reaksiyon sonrası QIAseq Bead'ler ile temizlik işlemine geçildi.
- Universal PCR sonrası 20 µl PCR reaksiyonunu LoBind tüpüne aktarıldı ve üzerine 80 µl Nucleaz içermeyen su eklendi.
- 100µl QIAseq Beads 100µl dilue edilmiş PCR solusyonuna eklendi. İnkübasyon sonrası süpernatant tüpten uzaklaştırıldı.
- 200µl %80 etanol eklenip yıkamandı spernatatn uzaklaştırıldı.
- DNA kitaplık boncukları dilüe edildi28 ul supernatantı temiz biz 1.5ml lobind tp içerisine veya PCR tüpüne aktarıldı.

AIT panelde LUNG UMI panelinden farklı olarak 3.1 cfDNA izolasyon ve 3.2 Qubit ölçümünden sonra 3.3, 3.4, 3.5 3.6 yerine 3.7 klonal çoğaltma aşamasına kadar aşağıdaki basamaklar takip edildi. Diğer basamaklar her iki panel içinde ortaktır.

Hedef Zenginleştirme

- GeneRead QIAact Actionable Insights Tumor Panel (cat.No: 181910) (A1-A2-A3-A4 primerlerini içerir)
- GeneRead DNaseq Panel PCR Kit V2 (Cat No: 181940 12 reaksiyon; Cat No: 181942 96 reaksiyon) (DNA Polimeraz ve Master Mix içerir)
- Agentcourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter Cat No: A63880)
- Manyetik Stand
- 1.5 ml LoBind Tüp
- 0.2 ml PCR tüp
- QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200) (Cat No./ID: 929002)
- QX DNA Size Marker 50-800 bp (50 µl) (Cat No: 929561)
- QX Alignment Marker 15 bp/3 kb (1,5 ml) (cat no: 929522)
- QX Nitrogen Cylinder (6 adet) (cat No: 929705)

DNA Dilüsyonu Hazırlanması

- DNA dilüsyon hazırlığına geçmeden önce GeneRead QIAact Actionable Insights Tumor Panel ve GeneRead DNaseq Panel PCR Kit V2 kitini – 20 °C'den çıkarıp, soğuk blokta PCR kabinine koyuldu.
- DNA materyali LoBind tüp içerisinde Dnase-free su ile 2,5 ng/µl'ye dilue edildi.

Hedef Zenginleştirme PCR Hazırlığı

- QIAact Panel Primer mix ve DNA seq panel PCR kiti kullanıldı.
- PCR Miksleri ilerdeki tabloya göre hazırlandı.

Tablo 14: AIT Panel Hedef Zenginleştirme PCR Miksi Hazırlama Tablosu

İçerik	Örnek (µl)
GeneRead DNA seq Panel 5x PCR Buffer*	4,4
Primer mix pool A1-A4 (2x)**	11,0
GeneRead HotStart Taq DNA Polymerase*	1,5
Dnase-free su*	0,7
Toplam Hacim	17,6

- Her bir PCR miksinden 16µl ilgili kuyular dağıtıldı.
- Her PCR Reaksiyon tüpüne önceden konsantrasyonları ayarlanmış 4µl DNA dağıtıldı ve thermalcycler'a yüklendi.

Tablo 15: AIT Panel Hedef Zenginleştirme PCR Thermalcycler Döngüsü

Zaman	Sıcaklık	Döngü
15 dakika	95°C	1
15 saniye	95°C	26
4 dakika	60°C	
10 dakika	72°C	1
Bekleme	4°C	∞

PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

- Her örnek tek PCR tüpünde birleştirildi ve toplam hacim yaklaşık 80µl olacak şekilde ayarlandı.
- Her örnekten 80µl'yi 1,5ml'lik LoBind tüpe aktarıldı.
- 72µl Agencourt AMPure XP Beads'i 80µl PCR ürünü üzerine eklendi.
- Tüpler spin yapıldı ve beadlere dokunmadan 140µl süpernatant'ı yeni bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatant üzerine 128µl Agencourt AMPure XP Beads eklenildi.

- Tüpler spin yapıldı ve beadlere dokunmadan 140µl süpernatant'ı yeni bir tüpe aktarıldı.
- 400µl taze hazırlanmış %80'lik etil alkol eklenildi ve spin yapıldı.
- Bu aşama 2 defa tekrar edildi.
- Hedef DNA beadlerini 28µl sterile su ile dilüe edildi. 25µl süpernatantı temiz bir LoBind tüpe aktarıldı.
- Zenginleştirilmiş DNA miktarını QIAxcel Advanced cihazında QX DNA High Resolution Kit kullanarak ölçüldü.

KİTAPLIK HAZIRLIĞI

Library Prep aşamasında aşağıda belirtilen kitler kullanılmaktadır.

Tablo 16: AIT Panel GeneRead DNA Library Q Kit İçeriği

GeneRead DNA Library Q Kit*	
End Repair Buffer, 10x	200 µl
Ligation Buffer, 2x	2 x 1.25 ml
End Repair Enzyme Mix	150 µl
Ligation + Nick Repair Enzyme Mix	250 µl
RNase-Free Water	3 x 1.9 ml
dNTP Mix (10 mM)	2 x 55 µl
Universal Adapter Q, 2.5 µM	252 µl
Adapter Q BC1, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC2, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC3, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC4, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC5, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC6, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC7, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC8, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC9, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC10, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC11, 2.5 µM [†]	22 µl
Adapter Q BC12, 2.5 µM [†]	22 µl
Primer Mix, Library Amplification	70 µl
Multiplex PCR Mastermix	2 x 850 µl

Tablo 17: AIT Panel GeneRead Size Selection Q Kit İeriđi

GeneRead Size Selection Q Kit*	
Buffer EBA, Elution Buffer	70 ml
Diluent (for 80% ethanol formulation)	3 x 25 ml
Buffer SB2, Size Selection Buffer	2 x 60 ml
MinElute® Spin Columns	2 x 50 tubes
Collection Tubes, 1.5 ml†	4 x 50 tubes

Örneklere Barkod Bağlanması

- DNA konantrasyonları GeneRead Workbook'a girilerek **5ng/μl olacak şekilde** RB tüp içerisinde dilüsyonları yapıldı.
- Her örnek için 1'er adet Sample Tube RB ye 5ng/μl'ye seyreltilen DNA'dan 8 ul bu tüpe konuldu.
- DNA ve barkod adaptörlerinin uygun birleşmesi için her örnek tüpe koyulup spin yapıldı.

MMA Master Miks Hazırlığı

End-repair için, GeneRead DNA Library Q kit içerisinde bulunan 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aşığıdaki tabloyu kullanarak reaksiyon miksi hazırlandı.

Tablo 18: AIT Panel MMA Master Miks Hazırlama Tablosu

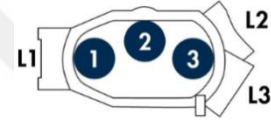
Örnek sayısı	RNase-Free Water	End-Repair Buffer	End-Repair Enzyme Mix	Universal Adaptor
2	23	9,0	7,2	11,5
3	29	11,7	9,3	14,9
4	36	14,4	11,5	18,4
5	43	17,1	13,7	21,9
6	50	19,8	15,8	25,3
7	57	22,5	18,0	28,8
8	63	25,2	20,1	32,2
9	70	27,9	22,3	35,7
10	77	30,6	24,5	39,1
12	91	36	28,8	46,0

MMC Master Miks Hazırlığı

Adaptör bağlanması için GeneRead DNA Library Q kit içerisinde bulunan 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aşağıdaki tabloyu kullanarak reaksiyon miksi hazırlandı.

Tablo 19: AIT Panel MMC Master Miks Hazırlama Tablosu

Örnek	RNAse-Free	Ligation Buffer	Ligation + Nick Repair Enzyme	dNTP
2	25	101	10,1	2,5
3	36	144	14,4	3,6
4	47	187	18,7	4,7
5	58	231	23,1	5,8
6	68	274	27,4	6,8
7	79	317	31,7	7,9
8	90	360	36,0	9,0
9	101	403	40,3	10,1
10	112	447	44,7	11,2
12	133	533	53,3	13,3



Rotor Adaptörlerinin Hazırlığı

- 1 adet Minelute spin kolon alındı ve adaptörün 1 pozisyonuna Minelute Spin kolonu yerleştirildi.
- Rotor adaptörün 2 pozisyonu boş bırakıldı.
- Rotor Adaptör ile birlikte sağlanan 1,5ml'lik elüsyon tüpleri 3. pozisyona yerleştirildi.
- Reaksiyon şişeleri aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Tablo 20: AIT Panel Rotor Adaptör Hazırlama Tablosu

Pozisyon	Reaktif	Örnek Hacim	Başına	Şişe başına Rezerve
1	Buffer SB2	800µl		2500µl
2	Diluent (%80)	1600µl		2500µl
3	Diluent (%80)	1600µl		2500µl
4	Buffer EBA	200µl		2500µl

Kütüphane DNA'nın Çoğaltılması

Aşağıdaki tabloya göre mastermix hazırlandı ve DNA materyalleri ile karıştırıldı ve karışım termacycler'a yüklendi.

Tablo 21: AIT Panel Kütüphane DNA Çoğaltma Miksi Hazırlama Tablosu

İçerik	Hacim / Reaksiyon (µl)
Multiplex PCR Master Mix	25
Primer Mix, Library Amplification	1
Rnase-free Water	7
Library DNA	17
Toplam Reaksiyon Hacmi	50 (33 µl mix + 17 µl DNA)

Kitaplık Ürünlerinin Temizliği

PCR ürünleri sample tube RB'ye alındı. 1 basamak üstteki rotor adaptör hazırlığı tekrarlandı. Reaksiyon şişeleri hazırlandı. Aşağıdaki tabloya göre reaktifler ve PCR materyali QIAcube cihazına yüklendi. Cleanup programı seçildi.

Tablo 22: AIT Panel QIAcube Cihazı Yükleme Tablosu

Pozisyon	Reaktif	ÖrnekBaşına Hacim	Şişe	Başına
1	Buffer SB2	400µl	2500µl	
2	-	-	-	
3	Diluent(Etanol)	1600µl	2500µl	
4	Buffer EBA	100µl	2500µl	

3.7. Klonal oęaltma

Aşağıdaki kitler kullanılmaktadır.

Tablo 23: Klonal oęaltma Kiti ierięi

GeneRead Clonal Amp Q Kit Box 1*	
Master Mix	4 x 1600 μ l
Primer Mix	4 x 650 μ l
Enrichment Buffer	1 x 12 ml

GeneRead Clonal Amp Q Kit Box 2†	
Primer Loaded PCR Beads	1 x 1000 μ l
Super A Beads	4 x 600 μ l
Denaturation Solution	1 x 7.5 ml

GeneRead Clonal Amp Q Kit Box 3*	
Oil Mix	1 x 18 ml
Buffer T	1 x 12 ml
Buffer B	1 x 14 ml
Buffer E	1 x 8 ml
Buffer N	1 x 37 ml
Buffer A	1 x 90 ml
Buffer D	1 x 100 ml
Enrichment Column	4
Tube 10 ml	12
PCR Plate	4
8-strip PCR tubes	4
Sealing Film	4
Color Chart	1

3.8. Kitaplık rnnn Konstrasyon Ayarlanması

Amplifikasyona girecek her RNEK için; 100pg/ μ l konsantrasyona ulaşacak şekilde, gerekli kitaplık ve dilsyon tamponunun (Buffer D) miktarını hesaplandı. Hesaplama için aşağıdaki rnek exel tablosundan yararlanıldı.

Tablo 24: Kütüphane Ürünleri Konsantrasyon Ayarlama Tablosu

Sample #	Sample ID	Barcode assigned	Concentration from LP (ng/µl)	Sample volume for 100 pg/µl in 100 µl	Buffer D to add to fill 100 µl	Final volume of sample at 100 pg/µl	Volume for the pooling
1	example	BC1	2,5	4,0	96,0	100,0	10
2	example	BC2	5	2,0	98,0	100,0	10

- Kitaplık ve Buffer D'yi 1,5 ml'lik ependorf tüpte birleştirilip vortex yapıldı.

3.9.Kitaplıkların Havuzlanması

Havuzlanacak her barkodlanmış kitaplığı 100pg/µl olacak şekilde eşit hacimde 1,5ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.

3.10. Örneklerin Hazırlanması

Uygun hacimdeki 100pg/µl kitaplık havuzunu (4µl) ve Buffer D'yi (496µl), uygun DNA konsantrasyonuna ulaşmak için (0,8pg), 2ml'lik screwcap CB tüpe karıştırıp vortexlendi.

3.11 Emülsiyon Oluşturulması

3.11.1 Primer Yüklü PCR Beadlerinin Ön İşlemi

Aşağıdaki tablo, 2ml'lik LoBind tüpe konacak uygun Primer Loaded PCR Beads ve Buffer E hacimlerini göstermektedir.

- Miks hazırlığı için gerekli reaktifler *GeneRead Clonal Amp. Q Kit Box2 ve GeneRead Clonal Amp. Q Kit Box3 dir.

Tablo 25: Primer Loaded PCR Beads ve Buffer E Hacim Tablosu

Reaktif	1 kitaplık havuzu için	2 kitaplık havuzu için	3 kitaplık havuzu için
Primer Loaded PCR Beads*	210µl	420µl	630µl
Buffer E**	290µl	580µl	870µl
Toplam	500µl	1000µl	1500µl

- Pelet oluşumu sağlandı ve süpernatantı atıldı.
- 1ml Denaturation Solution eklendi santrifüj yapıldı.
- Pelet oluşumu sağlandı ve süpernatantı atıldı.
- 750µl Buffer T eklendi santrifüj yapıldı.
- Pelet oluşumu sağlandı ve süpernatantı atıldı.
- 750µl Buffer T eklendi santrifüj yapıldı.
- Aşağıdaki tabloyu kullanarak gerekli Buffer E ve Buffer B'yi tüpe eklendi ve tüm tüp içeriğini 2 ml screwcap CB tüpe aktarıldı. Bir kitaplık havuzu için $n \times (\text{Buffer E } (250\mu\text{l}) + \text{Buffer B } (250\mu\text{l}))$ kullanılmaktadır.

3.11.2 Reaktiflerin Hazırlanması

Her bir kitaplık havuzu için tek bir Master Mix tüpü (GeneRead Clonal Amp. Q Kit Box1) ve tek bir Primer Mix tüpü (GeneRead Clonal Amp.Q Kit Box1) kullanıldı. Her bir kitaplık için 3500 µl Oil Mix'li 10ml'lik Sarsted tüpe koyuldu.

3.11.3 GeneRead QIAcube Workdeck 1 Hazırlığı

Kitaplık havuzları için:

$n \times$ (1*500 µl örnek tüpü, 1*3500 µl Oil mix tüpü, 1*500 µl primer loaded PCR beads tüpü, 1*1600 µl master mix tüpü, 1*650 µl primer tüpü, 2* boş 2 ml screw tüpü, 1* PCR plağı, 3*1000 µl pipet ucu) gerekmektedir.

Tablo 26: GeneRead Workdeck 1 Hazırlama Tablosu

Qiacube Protocol	Adımlar
A	2 ml tüpleri (4 pozisyon) (Dilue Library Pool)
B	10 ml tüpleri (4 pozisyon)
C	10 ml tüpleri (4 pozisyon)
D	1 tip rack (200 ul, 1000 ul, 1000 ul wide)
E	1 tip rack (200 ul, 1000 ul, 1000 ul wide)
F	2 ml tüpleri (1 pozisyon)
G	2 ml tüpleri, soğutma (4 pozisyon)
H	2 ml tüpleri, soğutma (4 pozisyon)
J	2 ml tüpleri, soğutma (4 pozisyon) (screw)
K	2 ml tüpleri, soğutma (4 pozisyon) (screw)
L	96 well PCR plate (1 pozisyon)
M	96 well PCR plate (1 pozisyon)
N	2 ml tüpleri (4 pozisyon)

Reaktifler yukardaki tablolara göre hazırlanıp GeneRead Workdeck 1 oluşturuldu ve GeneRead Qiacube cihazına yüklenip Make Droplets'ı programı çalıştırıldı.

3.11.4 PCR Plate Yerleştirilmesi

PCR plate'ini Deep Well PCR cihazına koyulup PCR programı başlatıldı.

Tablo 27: Deep Well PCR Programı

Time	Temperature	Number of cycles
6 minutes	94°C	1
15 seconds	94°C	
30 seconds	57°C	60
60 seconds	70°C	
2 minutes	72°C	1
Hold	4°C	∞
Lid	105°C	-

PCR ürünleri 'Emulsion Breaking ve pooling' aşaması ile GeneRead Qiacube cihazına alındı.

3.12 Emülsiyon Break Aşaması

- Her bir Library Pool u için, 2 adet 10 ml tüpün içine 10'ar ml Buffer A eklendi.
- Her bir Library Pool u için, 3 adet 2 ml eteksiz Sarsted CB tüpün içine 2 ml Buffer N eklendi.
- GeneRead QIAcube Workdeck 1 hazırlığına geçildi
- Aşağıdaki formüle göre sarf ve reaktifleri hazırlandı.
n x (2x10 ml Buffer A tüpü, 3x2 ml Buffer N tüpü, 3x200 µl uçları, 8xwide bore 100 µluç, 4x rotor adaptör, 1x PCR emulsion ürünleri, 1x enrichment kolon)
- Enrichment kolonları rotor adaptörlere aşağıdaki tanımlamaya göre yerleştirildi.

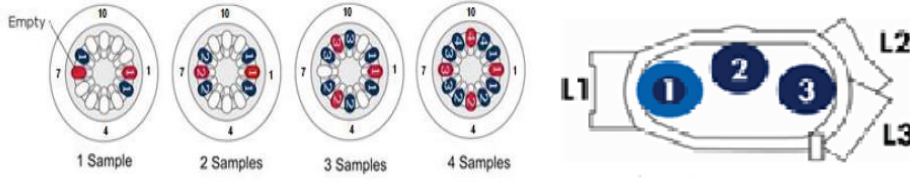
1 pool, Rotor Adaptor 1

2 pool, Rotor Adaptor 1 ve 7

3 pool, Rotor Adaptor 1, 5 ve 9

4 pool, Rotor Adaptor 1, 4, 7 ve 10

Tablo 28: Rotor Adaptörlerin Enrichment Kolonlara Yerleşim Tablosu



- GeneRead WorkDeck 1'i GeneRead QIAcube cihazına yerleştirildi.
- GeneRead QIAcube ekranında 'Breaking and Pool'u seçilip Emulsion Breaking ve pooling aşaması beklendi.

3.13 Bead Zenginleştirilmesi

3.13.1 Super A Bead Ön işleme

- Super A bead'i (X15000 g) 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatantı uzaklaştırıldı.
- Tüpe 550 ul Enrichment Buffer eklenip vorteks ve santrifüj yapıldı.
- Süpernatantı uzaklaştırıldı ve 200 ul Super A bead süspansiyonun kalmasını sağlandı.

3.13.2 Reaktiflerin Hazırlanması

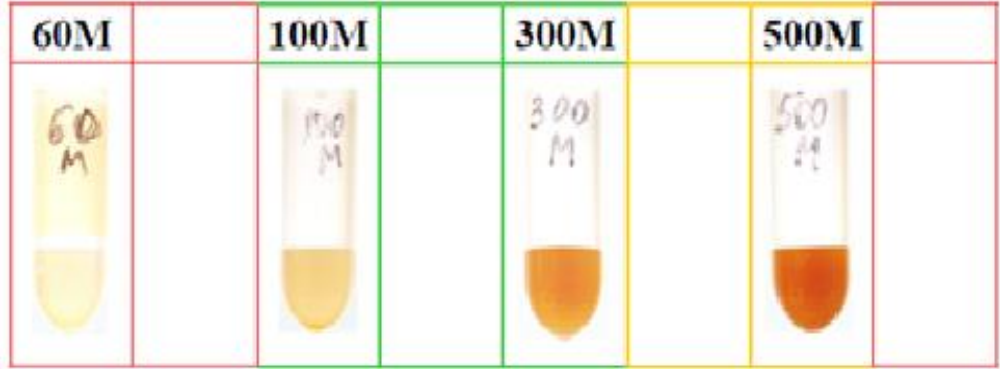
- Her bir library pool için, 950 ul Enrichment Buffer'ı 2 ml screw cap CB tüpe eklendi 900 ul Buffer B eklendi. 900 ul Buffer N eklendi. 425 ul Buffer T eklendi. 550 ul Denaturasyon Solusyonu eklendi.

3.13.3 GeneRead QIAcube Workdeck 2 Hazırlığı

- QIAcube GeneReader cihazı tarafından verilen direktiflere uyarak Workdeck 2'yi hazırlandı.
- Magnet station cover'ı uzaklaştırıldı ve 8-strip PCR tüplerini alındı. library pooları homojen hale getirildi. Poolar 2 ml Lobind endorf tüpe aktarıldı.

3.13.4 Bead Konsantrasyonu Ölçümü

- Sekans için uygun aralıkta bead miktarını belirlemek Color Chart yöntemi kullanılır.
- Yaklaşık 400µl Buffer T içinde bulunan, 2ml LoBind tüpe aktarılan her library pool tüpünü manyetik rack'a yerleştirildi. Pellet oluşturulup süpernatant atıldı.
- 500µl Buffer T eklenip her bir pool'u Colour Chart ile değerlendirildi. 140M altı library pooları çalışmanın kalanına dahil edilmeyip 140M-300M arası library poolar ile çalışmaya alındı.



Şekil 4: Bead Konsantrasyonu Ölçümü Chartı

3.14 Sekans Aşaması

Sekans aşamasında aşağıda belirtilen kitler kullanılmaktadır.

Tablo 29: Sekans Aşaması Kullanılan Kit İçeriği Tablosu

GeneRead UMI Advanced Sequencing Q Flow Cell (3)	
Component	
Flow Cell	3
Sealing Tape	3
Cleave Additive M	3

GeneRead UMI Advanced Sequencing Q Wash Buffers (9)	
Component	
Wash Buffer 9	1 x 650 ml
Wash Buffer 11	1 x 1000 ml
Maintenance Wash Buffer	1 x 900 ml

GeneRead UMI Advanced Sequencing Q Buffers		
Color of lid label	Component	
Green	Cleave Premix	3 x 16.3 ml
Purple	FPF Buffer	6 x 16.3 ml
White	Extend Additive P	1 x 140 µl
White	Buffer P	3 x 2 ml
White	Buffer T	3 x 2 ml

GeneRead UMI Advanced Sequencing Q Add-Ons		
Color	Component	
Pink lid label	Extend Premix A1 UMI	3 x 15.97 ml
Red cap	Extend A2	3 x 162 µl
Light blue lid label	Extend Premix B1 UMI	3 x 15.97 ml
Blue cap	Extend B2	3 x 162 µl
Clear cap	Pol Extend	3 x 354 µl
Yellow lid label	Image Premix	3 x 16.3 ml
Blue cap	Sequencing Primer	1 x 20 µl

3.14.1 Sekans Primer'in Ön Hazırlığı ve Hibridizasyonu

- Generead UMI Advance Sequencing Add Ons Kit içerisindeki Sequencing Primer'dan 2µl ve 198µl Buffer T Sample Tube RB'ye alındı. Vorteks, spin yapıldı.
- Bu arada 2 adet thermomikser'i aşağıdaki şekilde hazırlandı:
- Thermomikser: 95°C, 950 rpm

- Thermomikser: 25°C, 950 rpm
- LoBind tüpte bulunan her bir Library pool tüpünde pellet oluşumu sağlandı süpernatant atıldı.
- Tüp içerisine önceden dilue edilmiş 100µl Sekans Primeri eklenildi.
- Thermomikserde 95°C, 950 rpm'de 5 dakika inkübe edildi.
- Thermomikserde 25°C, 950 rpm'de 10 dakika inkübe edildi.
- Tüpte pellet oluşumu sağlandı süpernatantı atıldı.
- Tüp içerisine 500µl Buffer T eklenildi.
- Tüpte pellet oluşumu sağlandı süpernatantı atıldı.
- Tüp içerisine 500µl Buffer P eklenildi.
- Tüpte pellet oluşumu sağlandı süpernatantı atıldı.
- Tüp içerisine 500µl Buffer P eklenildi.
- Tüpte pellet oluşumu sağlandı süpernatantı atıldı.
- Tüp içerisine 11 µl (ayrı bir tüpte 2 ml'lik tüpte 29 mg EDC ve 17 mg NHS karışımına, 1,5ml Buffer P eklenerek(hazırlanan karışımdan eklendi.

3.14.2 Flowcell Hazırlanması

- Pipetaj yapılmış (15 µl) bead'i Flowcell'e yüklenilip İnkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon bitiminde; Flow Cell'deki seali çıkartıldı ve Flow Cell'in tek bir girişinden 2x100µl Buffer P bağlanmamış bead'leri uzaklaştırıldı.
- Flow Cell, GeneReader cihazında sekanslama için hazır hale gelmiş oldu.

3.14.3 Reaktiflerin Hazırlığı

- Flow Cell'in 1 saatlik inkübasyonu sırasında reaktif hazırlığı kısmı yapıldı.
- Aşağıdaki görsellerde hangi reaktifin nereye pipetleneceğini gösterildi.
- Reaktif Hazırlığı işlemini bitirdikten sonra; Flow Cell'in 1 saatlik inkübasyon süresine de dikkat ederek, GeneReader cihazını hazırlanıldı.
- 1 Flow Cell Kullanımı: Tek bir Flow Cell kullanımında aşağıdaki reaktif hazırlama protokolünü kullanınız.

- 162 µl Extend A2 UMI , 162 µl Pol Extend ve 15µl Extend Additive P'yi; Extend Premix A1 UMI tüpüne eklenildi.
- 162 µl Extend B2 UMI, 162 µl Pol Extend ve 15µl Extend Additive P'yi; Extend Premix B1 tüpüne eklenildi.
- 1 tüp Cleave Additive M powderi Cleavage Premix tüpüne eklenildi. Daha sonra tüpte kalanı almak için 500 µl hazırlanmış Cleavage Premix'i Cleave Additive M tüpünün içine eklenildi. Kısaca vortexlenip. Tüpteki 500 µl'yi tekrar hazırladığınız Cleavage Premix tüpüne eklenildi.

3.14.4 GeneReader Hazırlığı

- GeneReader software'ini açılıp cihaz içi gerekli yıkamalar yapıldı
- GeneReader software'de, Run Setup simgesine tıklayın. Ekrandaki yönergeleri izlendi.
- Wash Bufferlar barcodları okutularak tanımlandı ve 9 ve 11 pozisyonlarına yerleştirildi.
- Reagentlar ın tanımlanması için, 'Add Reagent' seçilip ve 2 farklı kit barcodu burda cihaza tanıtıldı:
 1. Generead UMI Advanced Seq Q Buffer
 2. Generead UMI Sequence Q Add-on Kit
- Prime başlatılır, prime tamamlandıktan 1 saat içerisinde Flow cell yüklenildi.

Etik Onay

Çalışmaya başlamadan önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır. (Onay tarihi 14.11.2019 Sayı B.30.2.ODM.0.20.08/861)

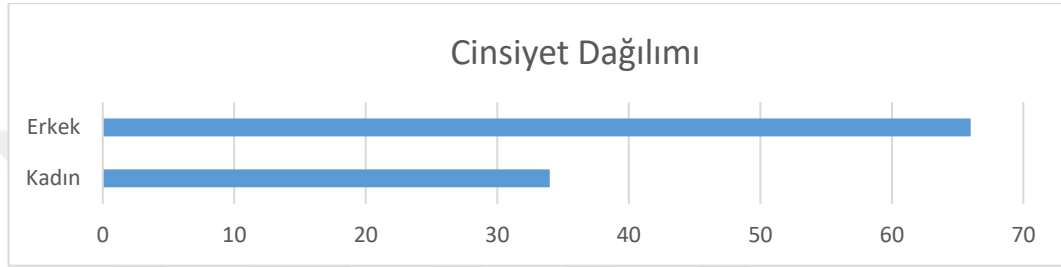
İstatistiksel Değerlendirme:

Hastaların bulgu ve sonuçları, SPSS (Statistical Package For Science Studies) For Windows 15,0 İstatistik Paket programı ile değerlendirilmiş veriler ortalama \pm SD ve ortanca (min.- maks.) olarak belirtilmiştir. İstatistiksel yöntem olarak Kruskal_Wallis varyasyon analizi, Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ($p \leq 0,016$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi), Kaplan-Meier sağ kalım analizi ($p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir), log rank testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

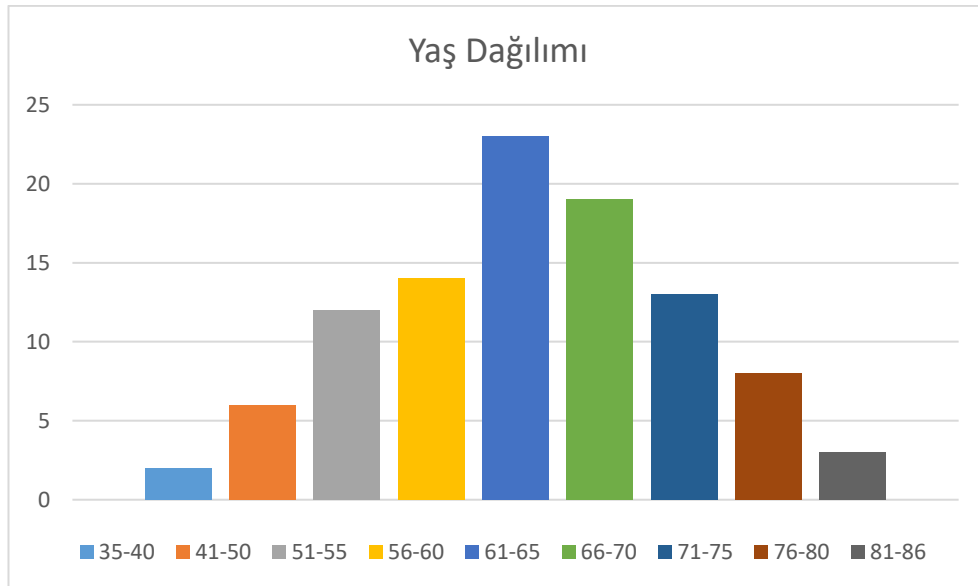
Bu çalışmada Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri tanılı 100 hastanın verileri değerlendirildi.

Çalışmaya alınan hastaların 66 (%66)'sı erkek; 34 (%34)'ü kadındı. Erkek/Kadın oranı 1,9'du (**Şekil-5**).



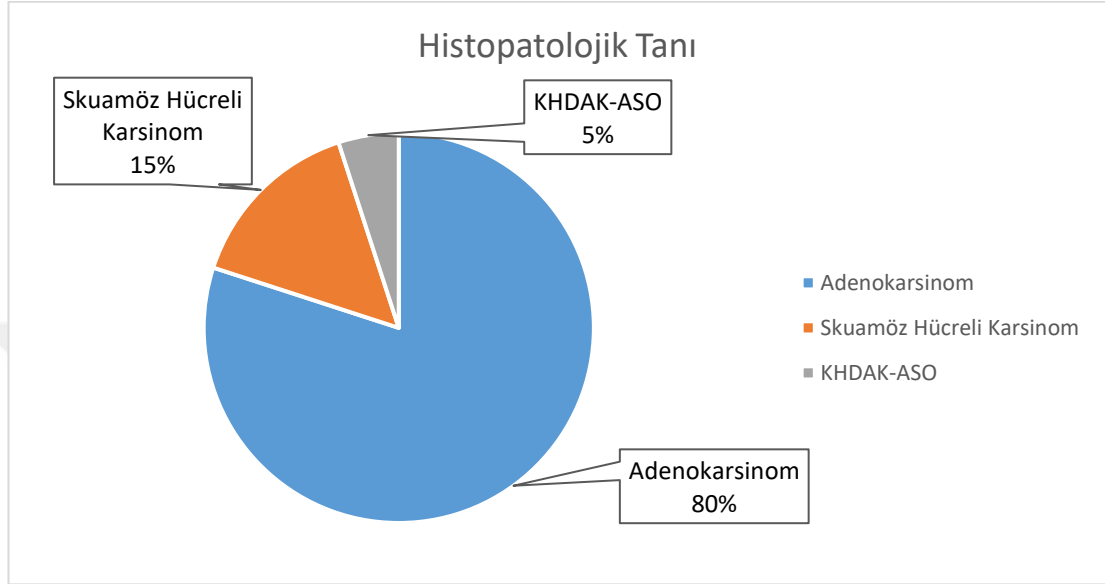
Şekil-5: KHDAK Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı

Hastaların başvuru anındaki yaş ortalaması 63.7 ± 9.7 , ortanca yaş ise 65 idi. En büyük hasta 86 yaşında en küçük yaş 37 yaşında idi (**Şekil-6**).



Şekil-6: KHDAK Hastalarının Yaşa Göre Dağılımı

Hastalarımızın tümünün (%100) histopatolojik tanısı KHDAK olup; hastaların %80'i adenokarsinom, %15'i skuamöz hücreli karsinom ve %5'i adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom olmayan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK-ASO) alt tipindeydi (**Şekil-7**).



Şekil-7: KHDAK Hastalarının Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımı

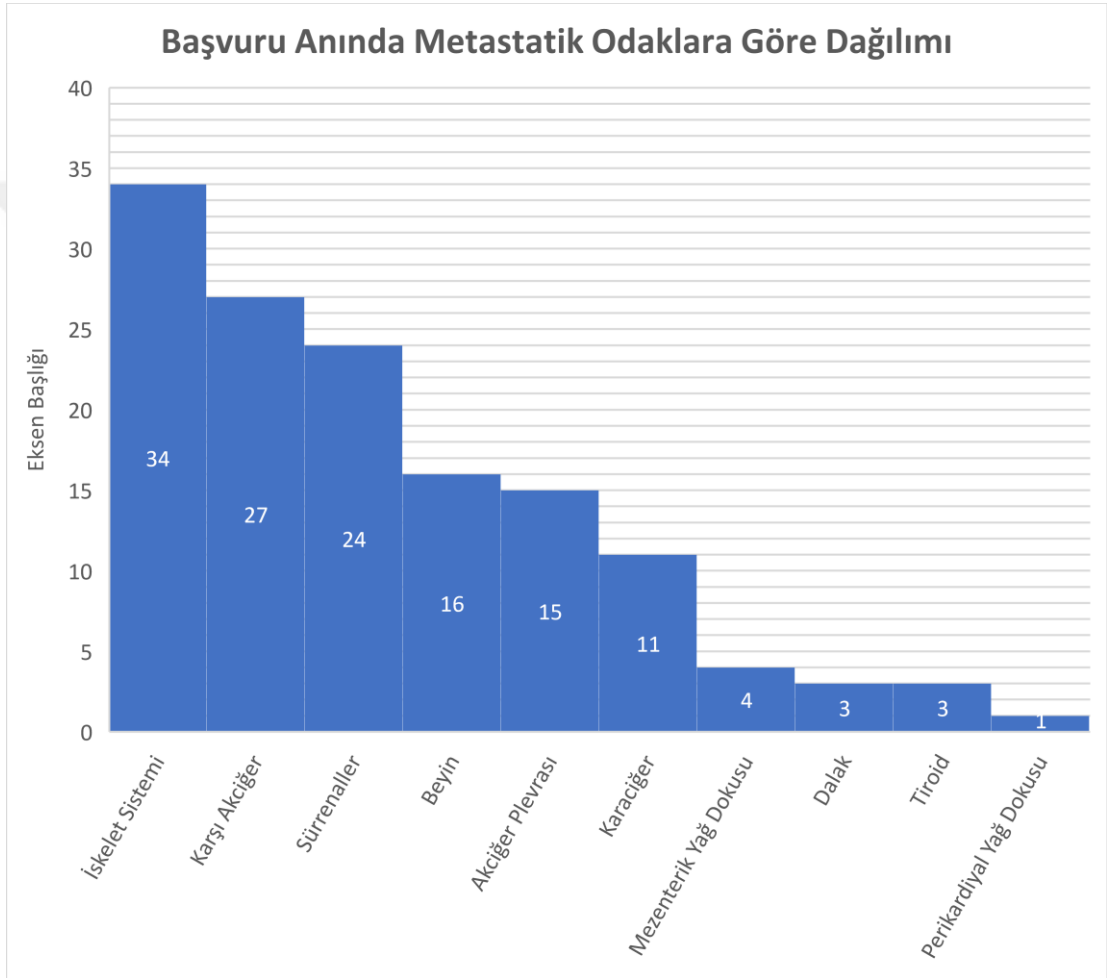
Hastaların tümü (%100; n=100) tanı anında TNM evrelemesine göre Evre IV idi.

Başvuru anında hastalar (42 yeni tanı ve 58 tedavi sonrası takipli) metastatik odaklar açısından incelendiğinde 82 hastada uzak organ metastazı vardı. En sık metastaz iskelet sistemine (%41,5; n=34) idi. 18 hastanın ise uzak metastazı bulunmuyordu. (**Şekil-8**)

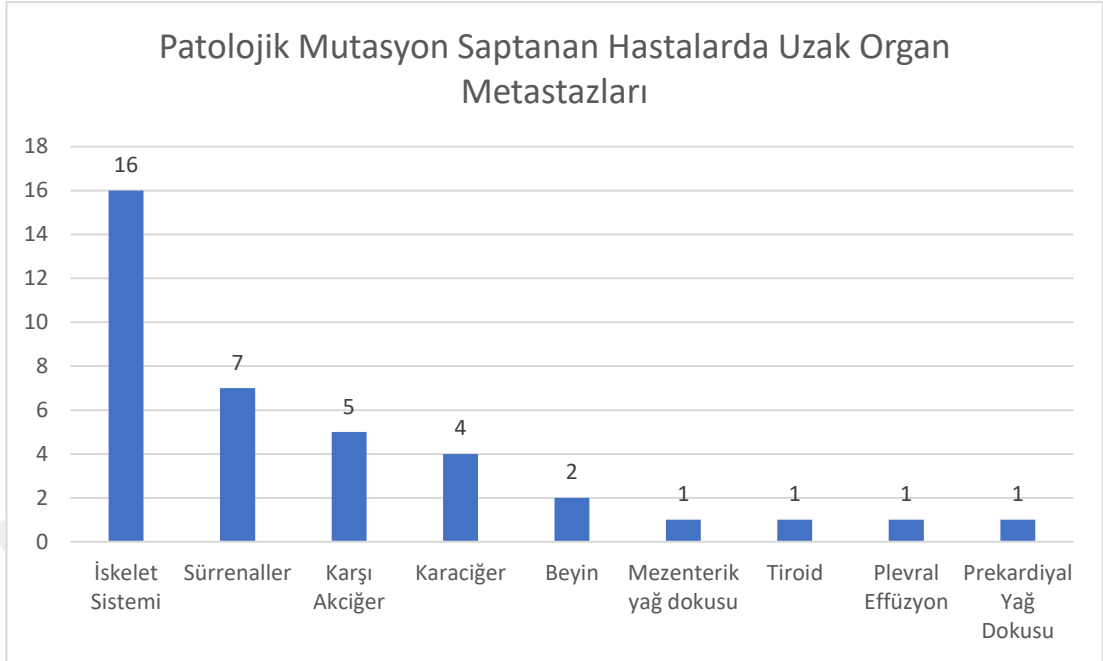
Ayrıca patojenik mutasyon saptanan 25 hastanın uzak organ metastazları incelendiğinde sırasıyla en sık metastaz iskelet sistemine (n=16), sürrenal bezlere (n=7), karşı akciğere (n=5), karaciğere (n=4), beyne (n=2) olduğu gözlemlendi. (**Şekil-9**)

Hastalar uzak organ metastaz odak sayısına göre gruplandırıldığında 71 hasta oligometastatik, 11 hasta multimetastatik, 18 hasta ise uzak organ

metastazı yok grubunda idi. Uzak organ metastazı olmayan hastaların hepsi hayatta idi. Oligometastatik hastaların GSK ortalaması $49.5 \pm 5,7$ ay iken, multimetastatik hastaların GSK ortalaması $17.2 \pm 5,5$ ay idi. Tüm gruplar arasında ortalama GSK açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (**p 0,017**) (**p 0,000**) (**p0,001**).



Şekil 8: Hastaların Başvuru Anında Metastatik Odaklara Göre Dağılımı



Şekil 9: Patojenik Mutasyon Saptanan Hastalarda Uzak Organ Metastaz Dağılımı

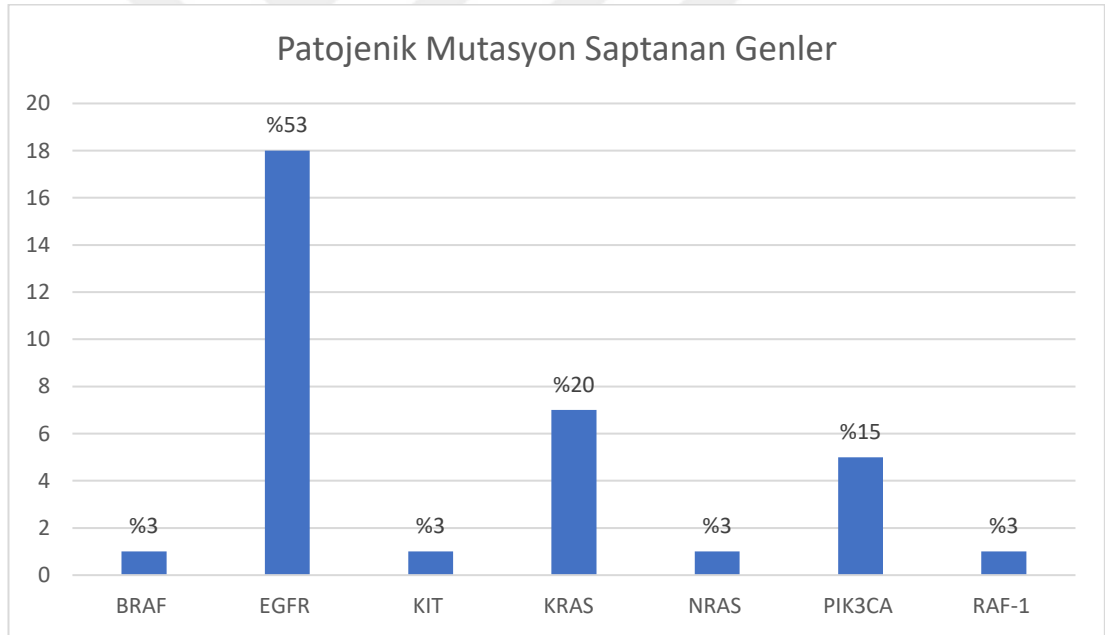
Hastalardan likit biyopsi ile elde edilen cfDNA miktarı ortalaması $4.8 \text{ ng} \pm 5.3$ nanogram (ng) idi.

Başvuru anındaki hastaların uzak organ metastaz odak sayısı ve cfDNA ortalaması birlikte incelendi. Uzak organ metastazı olmayan hastaların cfDNA ortalaması $3,8 \pm 1 \text{ ng}$ (1,1-18,1) iken, oligometastatik hastaların ortalaması $4,4 \pm 0,4 \text{ ng}$ (1,1-20,1) ve multimetastatik hastaların ortalaması $10 \pm 3,9 \text{ ng}$ (2-40) olarak bulundu. Multimetastatik hastaların cfDNA miktarı ortalaması, uzak organ metastazı olmayan hastaların cfDNA miktarı ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı (**p 0,01**).

Çalışmamızda daha önce kanser gelişiminde rol aldığı gösterilmiş olan genlerin hotspot bölgeleri likit biyopsi yöntemi ile değerlendirildi ve 25 (%25) hastada toplamda 34 patojenik mutasyon (PM) saptandı. 75 (%75) hastada ise patojenik mutasyon saptanmadı. PM saptanan genler BRAF, EGFR, KIT, KRAS, NRAS, PIK3CA, RAF1 genleri idi. 12 hastada EGFR geninde toplam

18 (%52,9) PM, 7 hastada KRAS geninde toplam 7 (%20,5) PM, 4 hastada PIK3CA geninde toplam 5 (%14,5) PM saptandı. Geri kalan 4 hastada BRAF (%2,9), KIT (%3), NRAS (%2,9), RAF1 (%2,9) geninde 1'er tane PM saptandı (**Şekil-10**). Ayrıca 25 hastada saptanan 34 patojenik mutasyonun allel fraksiyonu ortalaması %8,3 (%1-%71) olarak saptandı.

Saptanan toplam 34 patojenik mutasyon tiplerine göre sınıflandırıldığında 23 (%71)'ü tek nükleotid değişimi (SNV), 11'i ise SNV dışı patojenik mutasyondur. SNV dışı 11 mutasyonun ise 5 (%15)'i delesyon, 1'i duplikasyon, 2'si insersiyon ve 3 (%9)'ü insersiyon-delesyon birlikteliği (indel) idi. PM saptanan 25 hastanın, 15 (%60)'inde sadece SNV saptanırken, 5 (%20) hastada sadece SNV dışı mutasyonlar, 5(%20) hastada da SNV ve SNV dışı mutasyon birlikteliği saptandı. (**Tablo-30**)



Şekil-10: Patojenik Mutasyon Saptanan Genler Ve Mutasyon Dağılımı

Patojenik mutasyon saptanan hastaların 21 (%84)'inin histopatolojik tanısı adenokarsinom iken, geri kalan 4 hastanın histopatolojik tanısı skuamöz hücreli karsinom (2 hasta) (%8) ve KHDAK-ASO (2 hasta) (%8) idi (**Tablo-30**)

Tablo 30: Patojenik Mutasyonların Tiplerine Göre Dağılımı

Hasta No	His. Tip	EGFR	KIT	BRAF	PIK3CA	RAF-1	KRAS	NRAS
1	Adenokarsinom						SNV	
6	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
8	Adenokarsinom					SNV		
10	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
16	KHDAK-ASO			SNV				
22	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
28	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
36	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar					SNV	
44	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
47	Adenokarsinom						SNV	
48	Adenokarsinom						SNV	
60	Adenokarsinom						SNV	
69	Adenokarsinom		SNV					
73	Skvamöz hücreli karsinom				SNV dışı mutasyonlar			
74	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar			SNV dışı mutasyonlar			
75	Adenokarsinom							SNV
76	Skvamöz hücreli karsinom				SNV			
82	Adenokarsinom						SNV	
88	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
90	Adenokarsinom						SNV	
95	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
97	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
98	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
99	Adenokarsinom	SNV dışı mutasyonlar						
100	Adenokarsinom				SNV dışı mutasyonlar			

Adenokarsinom
Skvamöz hücreli karsinom
KHDAK-ASO
SNV
SNV dışı mutasyonlar

Patojenik mutasyon saptanan 25 hastanın 17 (%68)'sinde sadece 1 PM var iken 8 (%32) hastada 6'sı aynı gende 2'si farklı gende olmak üzere birden fazla PM saptandı. **(Tablo-31)**

Tablo 31: Patojenik Mutasyon Saptanan Hastalar Genel Tablo

Hasta No	Tanı Zamanı	HisPat Tip	Metastatik Durum	Mutasyon ve Allel Fraksiyonu
Tek Patojenik Mutasyonu Olan Hastalar				
16	YT	KHDAK-ASO	O M	BRAF:c.1406G>C,p.G469A[%1]
6	P/N	ASHK	O M	EGFR:c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA,p.E746_T751del[%1]
28	P/N	AAK	O M	EGFR:c.2300_2308dupCCAGCGTGG,p.A767_V769dup[%8]
44	YT	AAK	O M	EGFR:c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC,p.E746_A750del[%10]
97	P/N	AAK	U M Y	EGFR:c.2368A>G,p.T790A[%1]
1	YT	AAK	U M Y	KRAS:c.34G>T,p.G12C [%6,5]
47	YT	AAK	M M	KRAS:c.34G>T,p.G12C[%32]
60	YT	AAK	M M	KRAS:c.34G>T,p.G12C[%13]
82	YT	AAK	O M	KRAS:c.34G>T,p.G12C[%3]
90	P/N	AAK	O M	KRAS:c.34G>T,p.G12C[%3,5]
48	YT	AAK	O M	KRAS:c.37G>T,p.G13C[%14]
69	YT	AAK	O M	KIT:c.1675G>T,p.V559F[%9]
75	P/N	AAK	O M	NRAS:c.183A>T,p.Q61H[%5]
76	P/N	KHDAK-ASO	O M	PIK3CA:c.1624G>A,p.E542K[%4]
73	P/N	ASHK	O M	PIK3CA:c.1134_1135insTCGAACATAGA,p.P381fs*11[%25]
100	YT	AAK	O M	PIK3CA:c.1658_1659delGTinsC,p.S553fs*7[%1]
8	YT	AAK	O M	RAF1:c.770C>T,Pp:S257L[%7,5]

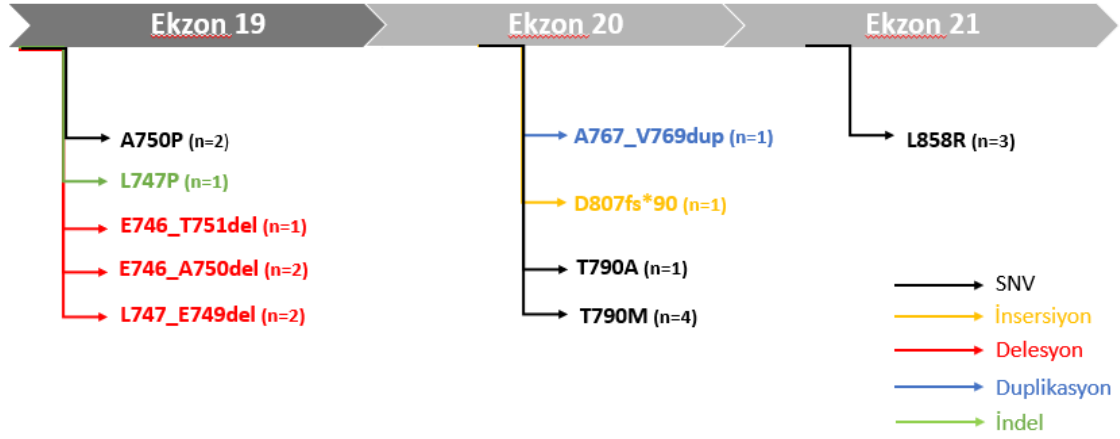
Tablo 31 (Devam): Patojenik Mutasyon Saptanan Hastalar Genel Tablo

Hasta No	Tanı Zamanı	HisPat Tip	Metastatik Durum	Mutasyon ve Allel Fraksiyonu
Birden Fazla Patojenik Mutasyonu Olan Hastalar				
10	P/N	AAK	O M	EGFR:c.2236_2244delGAATTAAGA,p.L747_E749del[%1]
				EGFRc.2248G>Cp.A750P[%1]
22	P/N	AAK	O M	EGFR:c.2369C>T,p.T790M[%10]
				EGFR:c.2573T>G,p.L858R[%71]
36	YT	AAK	O M	EGFR:c.2239_2240delTTinsCC,p.L747P[%13]
				KRAS:c.179G>A,p.G60D[%1]
88	P/N	AAK	O M	EGFR:c.2369C>T,p.T790M[%5]
				EGFR:c.2573T>G,p.L858R[%10]
95	P/N	AAK	O M	EGFR:c.2369C>T,p.T790M[%1]
				EGFRc.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC,p.E746_A750del[%3,5]
98	P/N	AAK	O M	EGFR:c.2369C>T,p.T790M[%1,5]
				EGFR:c.2573T>G,p.L858R[%5,5]
99	P/N	AAK	O M	EGFR:c.2236_2244delGAATTAAGA,p.L747_E749del[%1]
				EGFRc.2248G>Cp.A750P[%1]
74	YT	AAK	U M Y	EGFR:c.2415_2416insA,p.D807fs*90[%3]
				PIK3CA:c.1634A>C,p.E545A[%1]
				PIK3CAc.1658_1659delGTinsC,p.S553fs*7[%1]

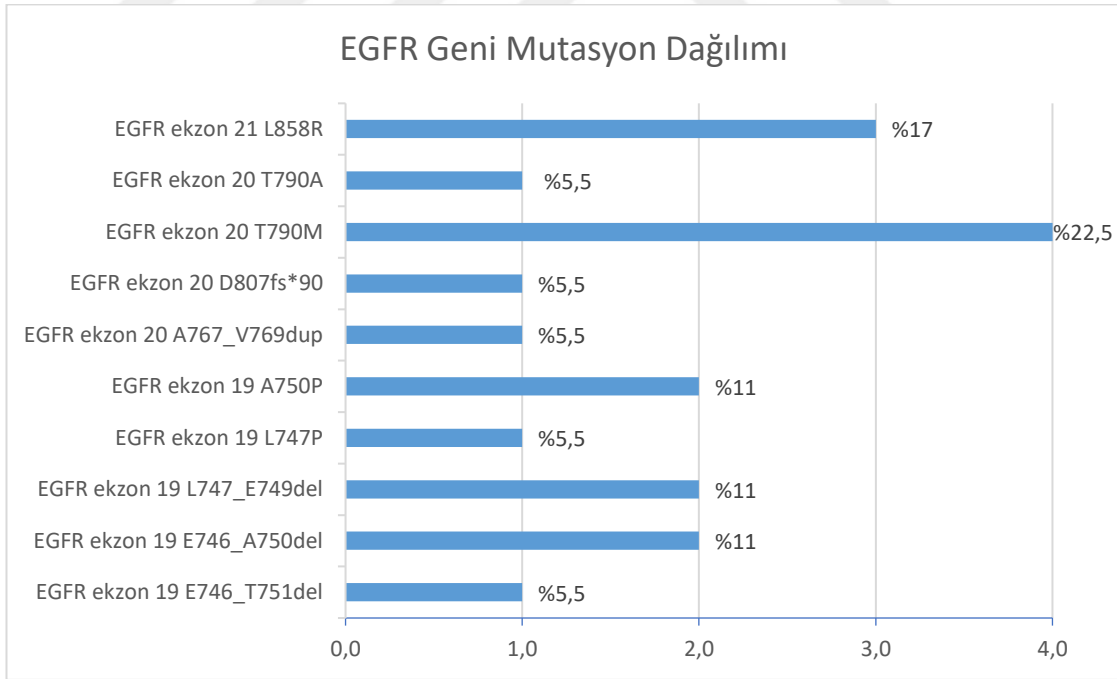
Hastaların 12 (%12)'sinde EGFR geninde 18 PM saptandı. Hastaların 4'ünde tek başına EGFR geninde; 8 hastada ise (6 hastada EGFR geninde; 2 hastada EGFR geni ile birlikte KRAS ve PIK3CA genlerinde) birden fazla

PM saptandı. Bu mutasyonlar EGFR geninin 19, 20 ve 21. ekzonlarında idi. Ekzon 19 da delesyonlar (E746_T751del (n=1), E746_A750del (n=2), L747_E749del (n=2), L747P (n=1)) ve A750P(n=2) nokta mutasyonu, ekzon 20 de T790M(n=4), T790A(n=1), A767_V769dup(n=1) ve D807fs*90 (n=1) mutasyonları, ekzon 21 de ise sadece L858R (n=3) nokta mutasyonu saptandı. EGFR geninde en sık ekzon 19 delesyonları (%33) ve ikinci sıklıkla ekzon-20 T790M (%22) nokta mutasyonu saptandı (**Şekil-12**)(**Şekil-13**). A750P mutasyonu 2 hastada ekzon 19 delesyonu ile beraber gözlemlendi. EGFR geninde mutasyon saptanan hastaların 3'ü (%25) yeni tanı hastası iken; geri kalan 9 (%75) hastadan 1'i klasik kemoterapi diğer 8 hasta ise 1. nesil EGFR TKİ tedavisi altında progresyon/nüks gelişmesi nedeniyle tarafımıza başvurmuştu (**Tablo-31**).

Ayrıca 4 hastada T790M mutasyonu pozitif saptandı ve hastaların hepsi progresyon/nüks nedeniyle başvurmuştu. Hastaların yaş ortalaması $61,75 \pm 6,7$ (52-67) iken erkek/kadın oranı 1 idi. Hastaların tamamı AAK histopatolojik tanısı almıştı. Ortalama cfDNA miktarları $4,3 \pm 2,7$ (2-8) olarak saptandı. Tüm hastalar ortalama 9 aydır erlotinib kullanıyordu. Hastaların tümü hayatta idi ve ortalama sağ kalım süresi 18 ± 6 ay idi. En sık uzak organ metastazı iskelet sistemine (n=3) idi. Hastaların tanı anındaki EGFR duyarlılık mutasyonlarına bakıldığında en sık L858R mutasyonu (n=3) gözlemlendi. Ayrıca 1 hastamızda da T790 bölgesinde treoinin alanine dönmesi sonucu oluşan T790A mutasyonu saptanmıştı (**Tablo-32**).



Şekil 11: EGFR Mutasyonları Ekzon Dağılımı



Şekil 12: EGFR Geni Mutasyon Dağılımı

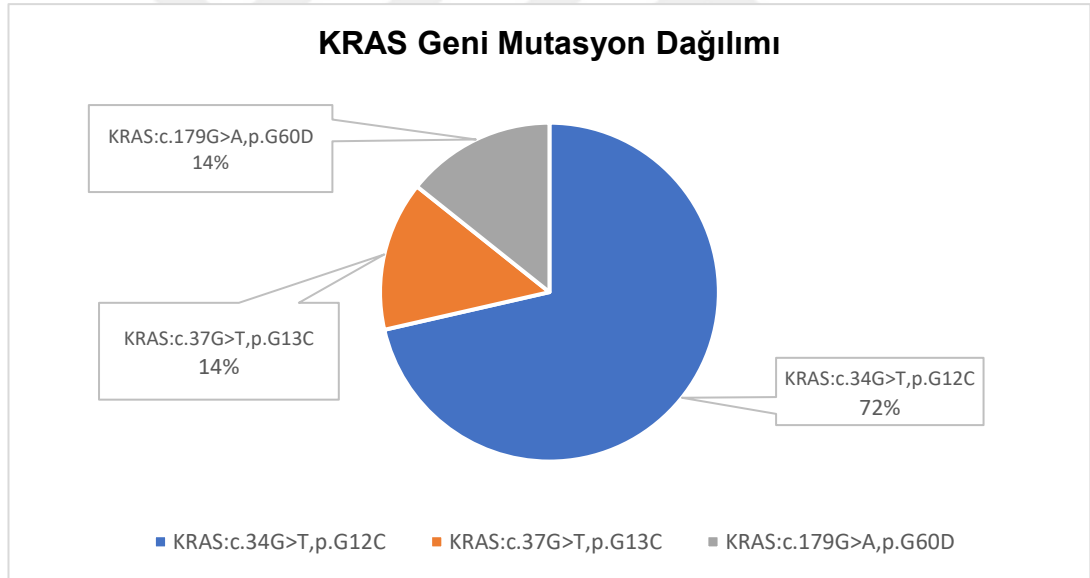
Tablo 32: T790M ve T790A Mutasyonu Saptanan Hasta Tablosu

Direnç Mut	EGFR Mutasyonu	Cinsiyet	Yaş	His. Pat.Tip.	cfDNA kons.	Metastatik Odaklar		TKİ Kullanım Süresi	Kullanılan TKİ İlaç
T790M	L858R	E	65	AAK	8	Karşı Ac	Kemik	6	Erlotinib
T790M	L858R	K	52	AAK	2	Karşı Ac		12	Erlotinib
T790M	Ekzon 19del	E	67	AAK	4,75	Sürrrenal	Kemik	9	Erlotinib
T790M	L858R	K	63	AAK	2,5	Karaciğer	Kemik	9	Erlotinib
T790A	L858R	K	73	AAK	1,6	-	-	24	Erlotinib

Hastaları 7'sinde KRAS geninde toplamda 7 tane PM saptandı. Bir hasta dışındaki hastalarda KRAS mutasyonları tek başına gözlemlendi. Bu mutasyonlar ekzon 2 ve ekzon 3'de saptandı. Ekzon-2 de G12C(n=5) ve G13C(n=1) nokta mutasyonu, ekzon-3 de G60D(n=1) nokta mutasyonu saptandı (**Şekil-14**)(**Şekil-15**).Bir hastada (EGFR TKİ duyarlılık mutasyonun ve KRAS direnç mutasyonu birlikteliği KRAS: Ekzon-3 G60D, EGFR: Ekzon-19 L747P) gözlenmiş oldu. KRAS geninde mutasyon saptanan hastaların 6'sı (%85) yeni tanı, 1'i (%15) ise klasik kemoterapi altında progresyon/nüks nedeniyle başvurmuştu (**Tablo-31**)



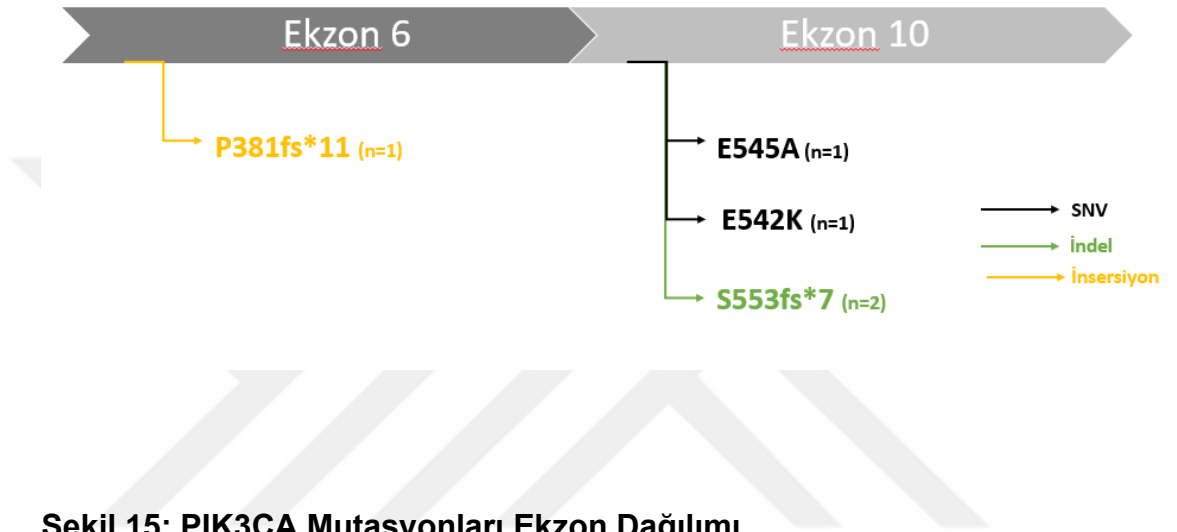
Şekil 13: KRAS Geni Mutasyonları Ekzon Dağılımı



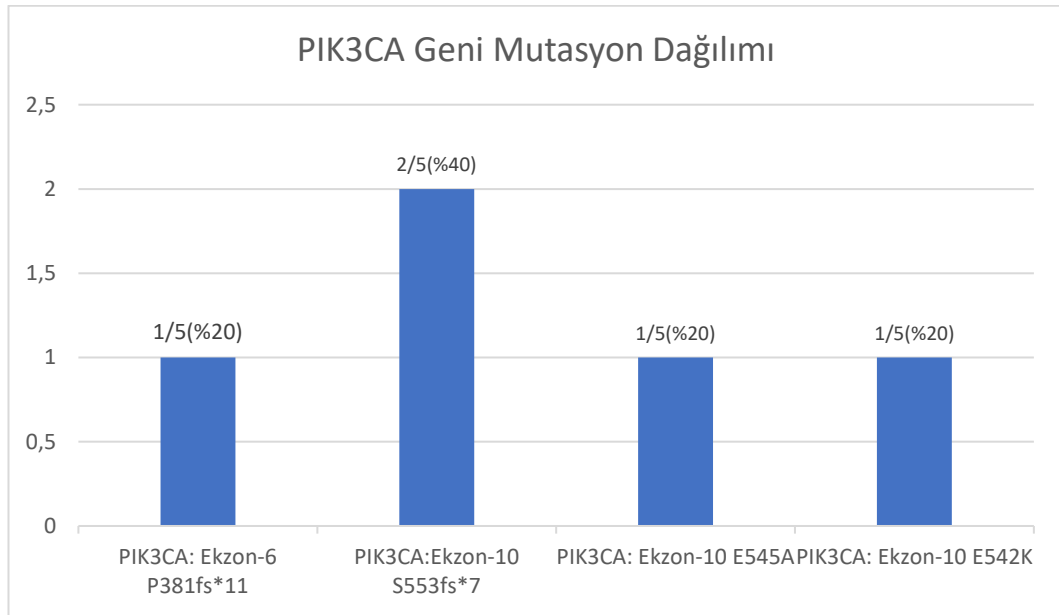
Şekil 14: KRAS Geni Mutasyon Dağılımı

Hastaların 4'ünde (%4) PIK3CA geninde 5 tane PM saptandı. 3 hastada PIK3CA geninde tek başına mutasyon gözlenirken, 1 hastada PIK3CA genindeki 2 farklı mutasyona ek olarak EGFR geninde de 1 mutasyon saptandı (**Tablo-31**). Ekzon 6 da P381fs*(n=1) nokta mutasyonu ve ekzon 10 da (E545A (n=1), E542K(n=1), S553fs7(n=2) mutasyonları saptandı (**Şekil-16**). PIK3CA geninde mutasyon saptanan hastaların 2

(%50)'si yeni tanı almış iken; geriye kalan 2 hastadan 1'i klasik kematerapi rejimi altında diğer hasta ise 1.nesil TKİ tedavisi altında yeni metastazlar ve mevcut odaklarda progresyon gelişmesi nedeniyle kliniğimize yönlendirilmişti (Tablo-31).



Şekil 15: PIK3CA Mutasyonları Ekzon Dağılımı

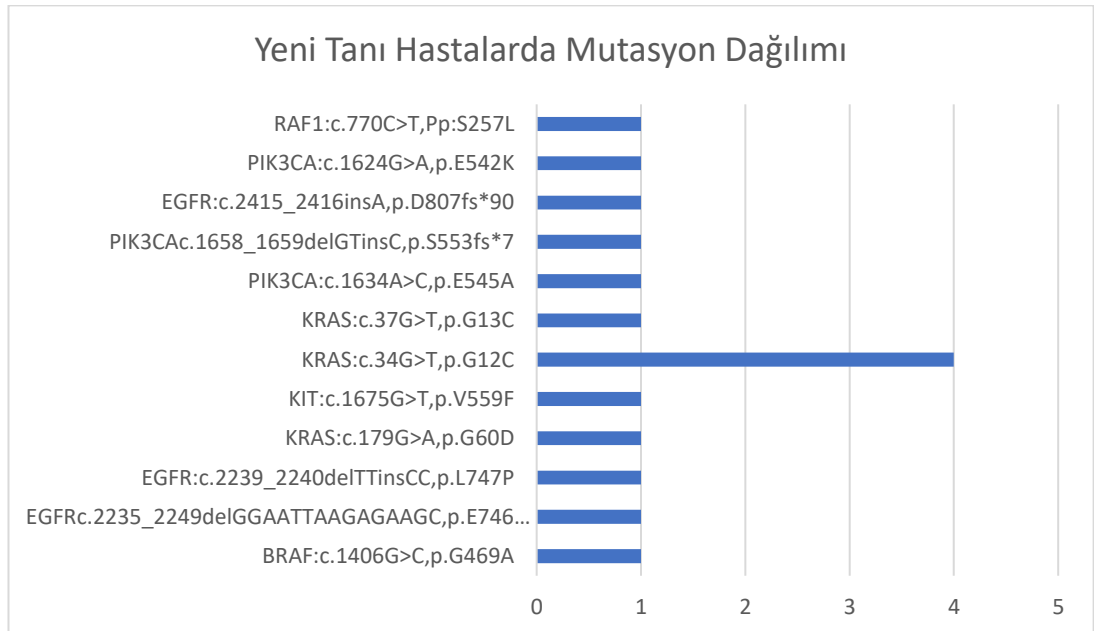


Şekil 16: PIK3CA Geni Mutasyonları Dağılımı

Ayrıca yeni tanı 3 hastada tek başına RAF1: c.770C>T,p:S257L geninde (%1), BRAF:c.1406G>C,p.G469A (%1) geninde, KIT:c.1675G>T,p.V559F (%1) geninde PM saptandı ve 1 progrese/nüks hastada ise NRAS:c.183A>T,p.Q61H (%1) geninde PM saptadı (**Tablo-31**).

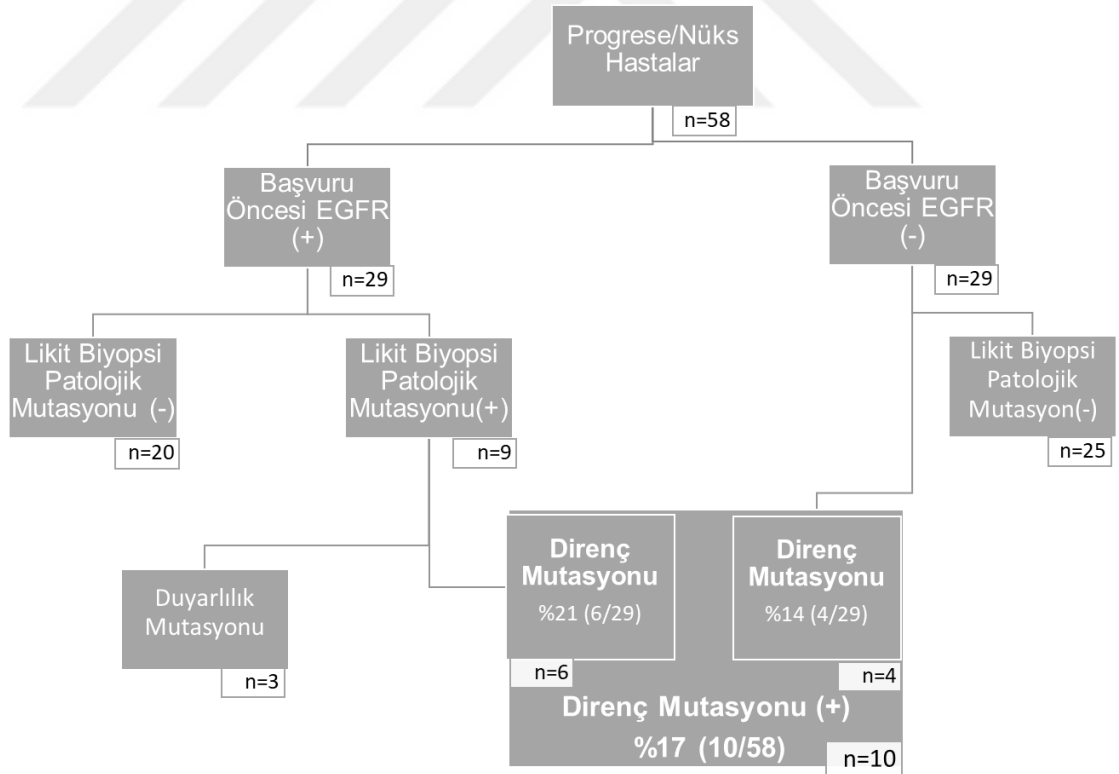
Başvuru anında hastalarımızın 42 tanesi yeni tanı almış iken; 58 hasta daha önceki tarihlerde KHDAK tanısı almış nüks ve/veya progresyon gelişmesi nedeniyle bölümümüze yönlendirilmiş hastalardı.

Yeni tanı almış 42 hastanın 12'sinde (%28) toplam 15 patojenik mutasyon saptandı. 30'unda (%72) patojenik mutasyon saptanmadı. Patojenik mutasyon saptanan yeni tanı hastaların 10'unda sadece 1 PM saptanırken; 2 hastada farklı genlerde birden fazla mutasyon birlikteliği saptandı (**Tablo-31**). Yeni tanı almış hastalarda saptanan patojenik mutasyonların dağılımı 6'sı (%14) KRAS geninde, 3'ü EGFR geninde (%7), 3'ü PIK3CA geninde (%4,5), 1'i RAF1 geninde (%2), 1'i KIT geninde (%2), 1'i BRAF geninde (%2) idi. En sık gözlenen PM mutasyon KRAS geninde ekzon-2 de G12C mutasyonuydu (**Şekil-18**)



Şekil 17: Yeni Tanı Hastalarda Mutasyon Dağılımı

Progresyon/nüks nedeniyle tarafımıza yönlendirilen 58 hastanın 29 (%50)'unda başvuru öncesinde EGFR aktive edici mutasyonu (mEGFR) (ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonu) pozitif ve bu hastaların hepsi 1. Nesil TKİ ilaçları kullanmaktaydı; geriye kalan 29 hasta EGFR geni vahşi tip (vEGFR) olarak raporlanmış ve hastalar klasik kemoterapatik ilaçlar kullanmıştı (**Şekil-19**). Biz bu 58 hastaya progrese/nüks anında likit biyopsi paneli uyguladık ve hastaların 13'ünde (%22) PM saptanmış olup; 10 hastada (%76) yeni gelişen direnç mutasyonu (en sık EGFR: Ekzon-20 T790M) ve 3 hastada (%24) ise akciğer kanseri tanı anında bilinen EGFR TKİ duyarlılık mutasyonu tekrar saptandı (**Şekil-20**)(**Tablo-33**). Direnç mutasyonu saptanan 10 hastanın 6'sı başvuru öncesinde mEGFR olan grupta (n=29) iken, 4'ü ise başvuru öncesinde vEGFR grubunda (n=29) idi. (**Şekil-18**)

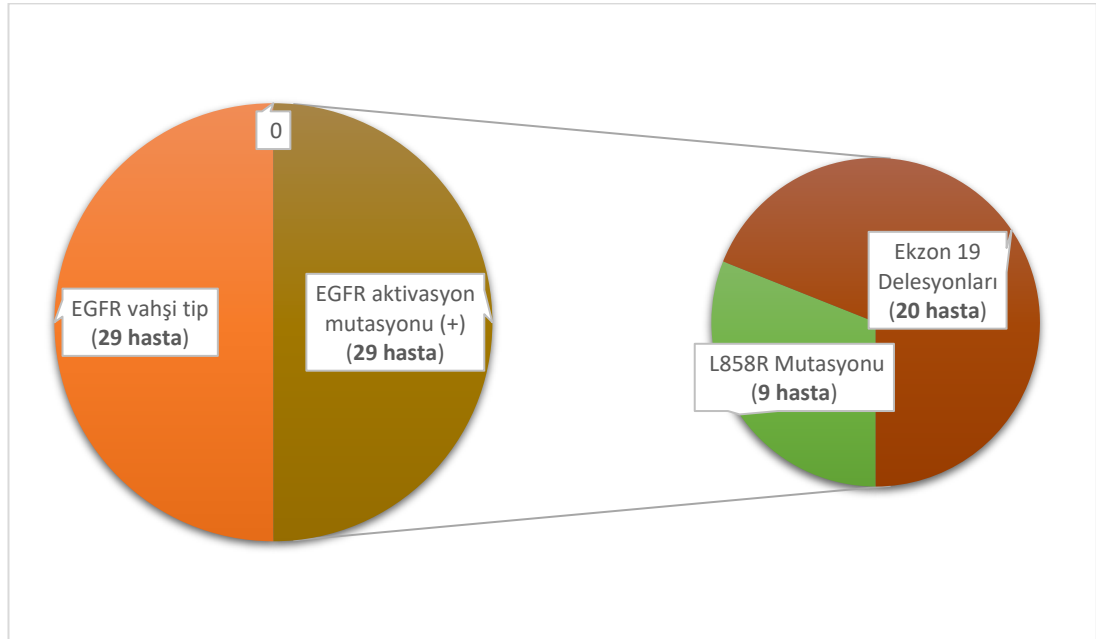


Şekil 18: Progrese/nüks Hastaların Mutasyon Şeması

Başvuru öncesinde mEGFR olan 29 P/N hastasının GSK ortalaması $73.2 \pm 4,9$ ay iken; vEGFR olan 29 hastanın GSK ortalaması $45,7 \pm 6,2$ ay idi. Başvuru öncesinde mEGFR olan hastaların GSK ortalaması daha uzun görünmekle beraber iki grup açısından GSK açısından anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

Başvuru öncesinde mEGFR olan 29 hastadan direnç mutasyonu saptanan 6 hastanın hepsi hayatta idi. Geri kalan ve direnç mutasyonu saptanmayan 23 hastanın ise 19'u hayatta ve 4'ü exitus durumunda idi. İki grup arasında GSK açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

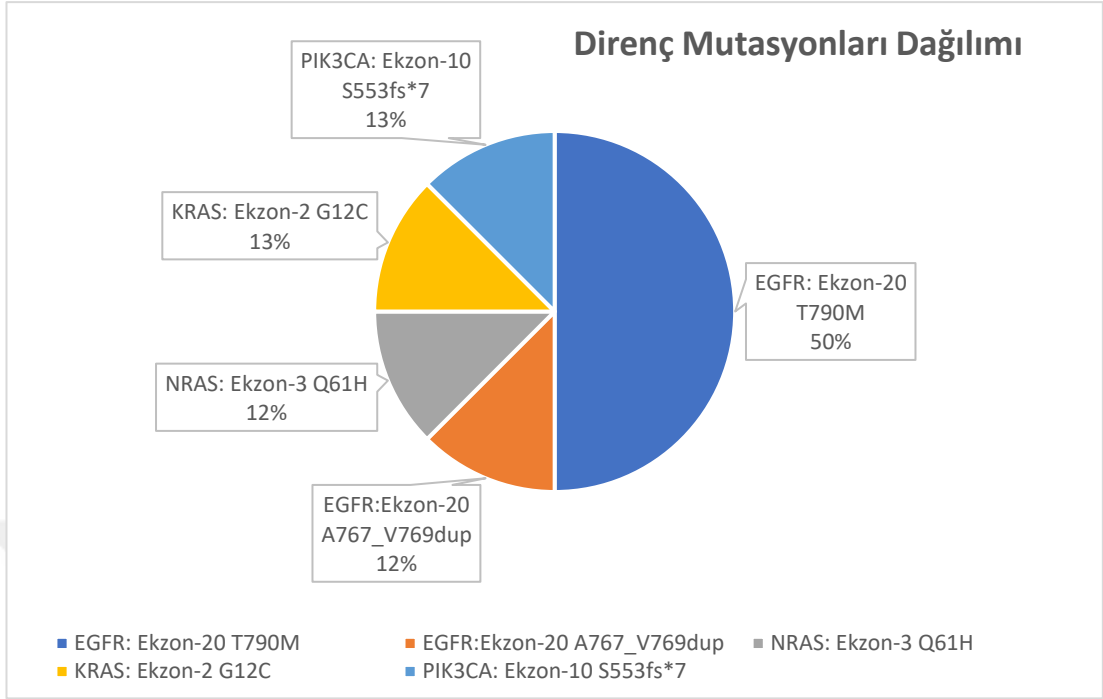
Başvuru öncesinde vEGFR olarak değerlendirilen 29 hastadan direnç mutasyonu saptanan 4 hastanın GSK ortalaması $16,5 \pm 0,5$ ay iken geri kalan direnç mutasyonu negatif 25 hastanın GSK ortalaması $48,7 \pm 6,6$ ay idi. İki grup arasında GSK açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p 0,001$).



Şekil 19: Progrese/Nüks Hastalarının Tanı Anı Likit Biyopsi Öncesi EGFR Sonuçları

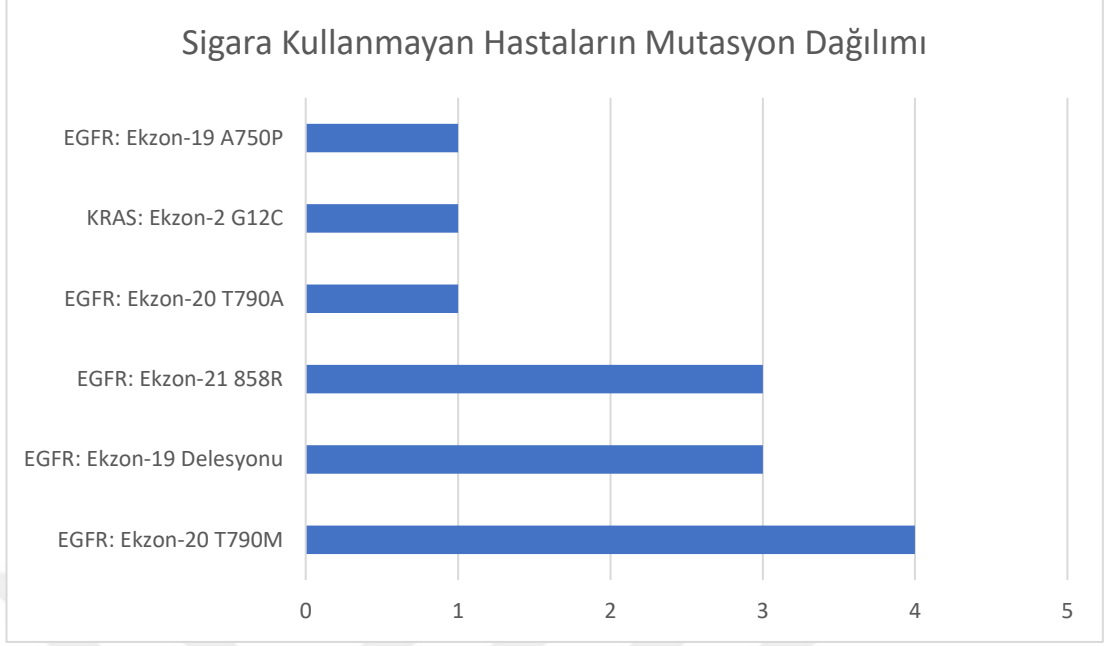
Tablo33: Progresyon/Nüks Nedeniyle Başvuran Likit Biyopside Patojenik Mutasyon Saptanan Hastaların Mutasyon Dağılımı

Hasta No	Önceki EGFR Analizi	Likit Biyopsi Sonucu	Kullandığı İlaç
6	EGFR: Ekzon 19 Del	EGFR: Ekzon-19 E746_T751del	1.Nesil TKİ
10	EGFR: Ekzon 19 Del	EGFR: Ekzon-19 L747_E749del EGFR: Ekzon-19 A750P	1.Nesil TKİ
22	EGFR: Ekzon 21 L858R	EGFR: Ekzon-21 L858R EGFR: Ekzon-20 T790M	1.Nesil TKİ
28	EGFR (wt)	EGFR:Ekzon-20 A767_V769dup	Klasik Kemoterapi
73	EGFR (wt)	PIK3CA: Ekzon-6 P381fs*11	Klasik Kemoterapi
75	EGFR (wt)	NRAS: Ekzon-3 Q61H	Klasik Kemoterapi
88	EGFR: Ekzon 21 L858R	EGFR: Ekzon-21 L858R EGFR: Ekzon-20 T790M	1.Nesil TKİ
90	EGFR (wt)	KRAS: Ekzon-2 G12C	Klasik Kemoterapi
95	EGFR: Ekzon 19 Del	EGFR: Ekzon-19 E746_A750del EGFR: Ekzon-20 T790M	1.Nesil TKİ
97	EGFR: Ekzon 21 L858R	EGFR: Ekzon-20 T790A	1.Nesil TKİ
98	EGFR: Ekzon 21 L858R	EGFR: Ekzon-21 L858R EGFR: Ekzon-20 T790M	1.Nesil TKİ
99	EGFR: Ekzon 19 Del	EGFR: Ekzon-19 L747_E749del EGFR: Ekzon-19 A750P	1.Nesil TKİ
100	EGFR: Ekzon 21 L858R	PIK3CA: Ekzon-10 S553fs*7	1.Nesil TKİ



Şekil 20: Progresyon/Nüks Hastalarında Saptanan Direnç Mutasyonları

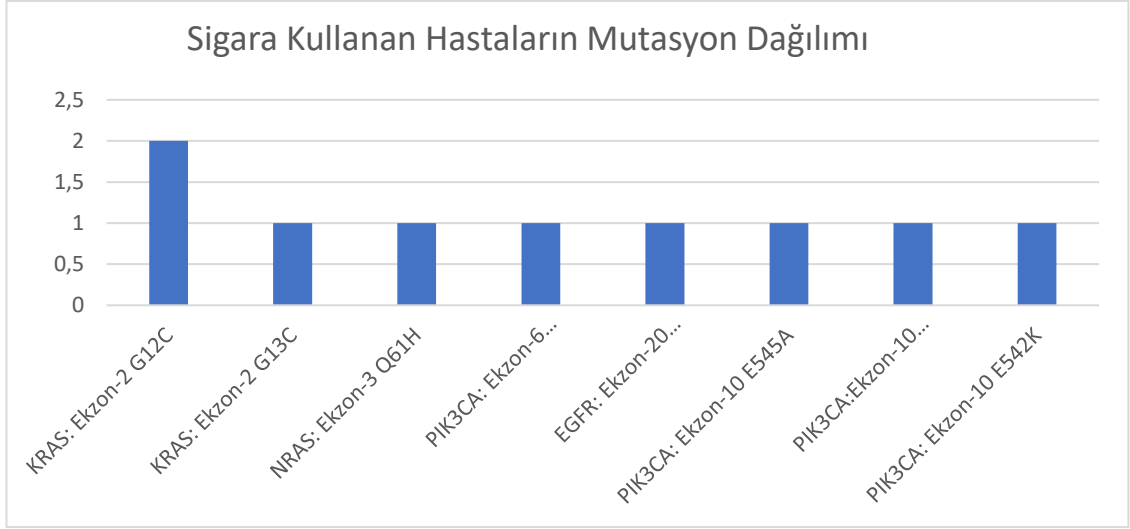
Çalışmaya katılan 100 hastanın 66'sının sigara kullanım verilerine ulaşılabildi. 66 hastanın 29 (%43)'ü hayat boyunca hiç sigara kullanmamıştı. Sigara kullandığı bilinen 37 (%57) hastanın ortalama sigara kullanımı 44 paket/yıl idi. Sigara kullanmayan 29 hastanın 8'inde (%27) toplam 13 patojenik mutasyon (12 mutasyon EGFR (%92), 1 mutasyon KRAS (%8)) (**Şekil-21)** (**Tablo-34**) saptandı. Sigara kullanan 37 hastanın 7 (%19)'sinde toplam 9 patojenik mutasyon saptandı. Hastalarda PIK3CA (n=3)(%43) ve KRAS(n=3)(%43) genlerinde mutasyon saptandı (**Şekil-22)**(**Tablo-35**). Saptanan mutasyonların hepsi direnç mutasyonuydu.



Şekil 21: Sigara Kullanmayan Hastaların Mutasyon Dağılımı

Tablo 34: Sigara Kullanmayan Hastaların Mutasyonları

Hasta No	Mutasyon-1	Mutasyon-2
10	EGFR: Ekzon-19 L747_E749del	EGFR: Ekzon-19 A750P
22	EGFR: Ekzon-21 L858R	EGFR: Ekzon-20 T790M
44	EGFR: Ekzon-19 E746_A750del	-
82	KRAS: Ekzon-2 G12C	-
88	EGFR: Ekzon-21 L858R	EGFR: Ekzon-20 T790M
95	EGFR: Ekzon-19 E746_A750del	EGFR: Ekzon-20 T790M
97	EGFR: Ekzon-20 T790A	-
98	EGFR: Ekzon-21 L858R	EGFR: Ekzon-20 T790M



Şekil 22: Sigara Kullanan Hastaların Mutasyon Dağılımı

Tablo 35: Sigara Kullanan Hastaların Mutasyonları

Hasta No	Mutasyon-1	Mutasyon-2	Mutasyon-3
1	KRAS: Ekzon-2 G12C	-	-
48	KRAS: Ekzon-2 G13C	-	-
60	KRAS: Ekzon-2 G12C	-	-
73	PIK3CA: Ekzon-6 P381fs*11	-	-
74	EGFR: Ekzon-20 D807fs*90	PIK3CA: Ekzon-10 E545A	PIK3CA:Ekzon-10 S553fs*7
75	NRAS: Ekzon-3 Q61H	-	-
76	PIK3CA: Ekzon-10 E542K	-	-

Uzak organ metastazı olmayan hastaların %16'sında (3/18), oligometastatik hastaların %26,7'sinde (19/71) ve multimetastatik hastaların %27,7(3/11) patojenik mutasyon saptandı. Uzak organ metastazı olmayan hastalarda KRAS (n=1), PIK3CA (n=1) ve EGFR (n=2); oligometastatik hastalarda EGFR (n=10), KRAS (n=3), PIK3CA (n=3), KIT (n=1), NRAS (n=1), BRAF (n=1) ve RAF1 (n=1) genlerinde birlikte veya tek başına PM saptandı. Multimetastatik hastalarda ise KRAS (n=3) geninde tek başına PM mutasyonu saptandı. Multimetastatik hastaların hepsinde aynı mutasyon saptanmıştı (KRAS: G12C).

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri dünyada kanser nedenli ölümlerin en sık nedeni olup gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler için en önemli sağlık sorunlarından biridir (1). Yıllar içerisinde akciğer kanserinin 5 yıllık sağ-kalım oranı %16 dan %19'a çıkmış olsa da hala agresif seyreden bir tümördür (3). Günümüzde özellikle hedefe yönelik tedaviler hastalık prognozuna ve hasta konforuna olumlu katkılar sağlamaktadır. Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan hedefe yönelik ilaçların başında gelen 1.nesil TKİ ilaçların (erlotinib ve gefitinib) klasik kemoterapatlere göre daha uzun hastalısız sağkalım (PFS) ile ilişkilendirilmiş ve bu nedenle KHDAK hastalarında birinci basamak tedavide 2016 yılında Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) onayı almıştır. (50) (155). Yine 3.nesil bir TKİ ilacı olan osimertinib ilk olarak EGFR T790M direnç mutasyonu pozitif hastalarda kullanım endikasyonu almıştır. Bununla birlikte yakın zamanda yapılan çalışmalar sonucunda 1. ve 2. nesil EGFR TKİ ve klasik kemoteraplere göre PFS ve GSK'de anlamlı artış sağladığı gösterildiğinden EGFR aktive edici mutasyonu pozitif olan KHDAK hastalarında birinci basamak tedavide de FDA onayı almıştır (156). Diğer bir hedefe yönelik ilaç olarak crizotinib (ALK füzyonu, ROS1 füzyonu ve MET geni amplifikasyonundan) ROS1 yeniden düzenlenimi olan hastalarda klasik kemoteraplere göre PFS artışı sağladığı gösterilmiştir (157). Ek olarak dabrafenib ise BRAF V600E mutasyonu pozitif KHDAK hastalarda birinci basamak tedavide kullanılan diğer bir hedefe yönelik ilaçtır (6). Bu gelişmelerle birlikte 2019 yılında yayınlanan NCCN kılavuzun da metastatik KHDAK hastalarında EGFR, ALK, ROS1 ve BRAF genlerine yönelik genetik incelemelerin mutlaka yapılması önerilmektedir. Ayrıca NTRK füzyonları, MET amplifikasyonu ve ekzon 14 atlama mutasyonu, RET geni yeniden düzenlenimleri, HER2 mutasyonları ve tümör mutasyon yüküne bakılmasının faydalı olabileceği belirtilmektedir (158). KHDAK tedavisinde moleküler genetik alanında yaşanan gelişmeler tanı, takip ve tedavi sonrası tekrarlayan biyopsi ihtiyaç doğurmaktadır. Ancak akciğerden çok sayıda ve tekrarlayan biyopsi örneği almak invaziv bir işlem olup birçok komplikasyona sebebiyet

vermekte ve kimi zaman alınan doku materyali söz konusu moleküler genetik çalışmalar için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle invaziv olmayan, kolay tekrarlanabilen, tümör heterojenitesini ve/veya direnç mutasyonlarını en iyi gösteren, likit biyopsi yöntemi moleküler genetik incelemeler için sıkça kullanılmaya başlanmıştır (135, 159). Özellikle metastatik tümörlerde likit biyopsi ve doku biyopsisi arasındaki konkordans %80'lere ulaşmaktadır. KHDAK hastaların %30-40'ı tanı anında metastaz geliştirmesi sebebiyle likit biyopsi yönteminin bu kanser tipinde sıkça tanıda bile tercih edilmesine olanak sağlamaktadır (160). Son yıllarda teknolojik gelişmeler ile birlikte NGS sisteminin kısa bir sürede pek çok gendeki mutasyonları tespit edebilmesi, çok düşük mozaisizimi ve heterojeniteyi kolayca saptaması (0,001-0,0001) neden ile kanserde diğer yöntemlere göre (rt-PCR, ddPCR vb) hızla kullanım alanı bulmuştur.

Bu çalışmada likit biyopsi yöntemi ile NGS platformunda çalışılan KHDAK tanısı almış ve takipte olan 100 hasta değerlendirildi. Moleküler genetik sonuçları ile klinik veriler karşılaştırılıp literatür ile tartışıldı.

Akciğer kanseri genellikle ileri yaş bireylerde gözlenmekte ve tanı yaşı medyanı 70 olup hastaların yarısından fazlası 55-74 yaş aralığındadır (2).Kliniğimize yönlendirilen hastaların %66'sı erkek, %34'ü kadındı. Hastaların tanı anındaki yaş ortalaması $63,7 \pm 9,7$ olup ortanca yaş 65 (37-84) idi ve hastaların yarısından fazlası (%56) 55-70 yaş aralığındaydı. Ülkemizde yapılan Büyükşimşek ve ark. çalışmasında (161) hastaların %80'i erkek, %20'si kadın ve ortanca yaş ise 59,3 (26-79) iken; Sağ ve ark. çalışmasında ise (162) %74,2'si erkek %25,8'i kadın ve ortalama yaş 60 olarak raporlanmıştır. Bulgularımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

KHDAK tedavi ve takibinde histopatolojik tanı önem arz etmektedir. Yang ve ark. 5628 akciğer kanseri hastası ile yaptıkları çalışmada (163) hastaların %53 AAK, %28 ASHK ve %17 KHDAK-ASO olarak raporlanmıştır. Scheffler ve ark. çalışmasında (164) 1144 hastanın doku biyopsisi materyalinden yaptıkları çalışmada hastaların %75'i AAK, %16'sı ASHK ve %9'unun ise doku kaynaklı histolojik tanısı koyulamamıştı. Büyükkışımşek ve ark. likit biyopsi yöntemi ile yaptıkları çalışmada (161) 100 KHDAK hastasının %73'ü AAK, %14'ü ASHK ve %13'ü KHDAK-ASO alt tipinde idi. Bizim çalışmamızda hastalar likit biyopsi yöntemi ile çalışılmış ve hastalarımızın %80'i AAK, %15'i ASHK ve %5'i KHDAK-ASO alt tipinde gözlenmiştir. AAK tanılı hasta frekansı (%80) literatürdeki frekans aralığından (%53-75) yüksek, KHDAK-ASO frekansı (%5) ise literatürdeki frekans aralığından (%9- 17) düşük olarak gözlenmektedir. Birimize gelen hastalarımızın çoğunlukla yeni tanıda değil progresyon/nüks aşamasında hedefe yönelik tedavi için başvurmaları AAK frekansını artırmış KHDAK-ASO frekansını ise azaltmış olabilir.

Çalışmamızda metastaz odakları görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilip dağılımı incelendiğinde en sık uzak organ metastazının iskelet sistemine (%34) ve karşı akciğere (%27) olduğu gözlenmiştir. Sonrasında sıklık sırasına göre, adrenal kortekslere (%24), beyine (%16), akciğer plevrasına (%15), karaciğere (%11) ve en az perikardiyal yağ dokusuna (%1) metastaz olduğu gözlemlendi. Ünal ve arkadaşlarının 48 hastalık çalışmasında (165) uzak organ metastazı sırasıyla iskelet sistemi (%43,8), karşı akciğer (%37,5), beyin (%22,9), adrenal bezler (%20,8), akciğer plevrası (16,7) ve karaciğer (%14,6) olarak raporlanmıştır. Oikawa ve arkadaşlarının (166) 1994 akciğer hastası ile yaptıkları çalışmada hastaların 1555'i KHDAK hastasıydı ve uzak organ metastazı sırasıyla karşı akciğer, kemik, beyin, karaciğer ve adrenal bezler olarak sıralanmıştır. Çalışmamıza benzer olarak literatürde de en sık metastaz odaklarının iskelet sistemi ve karşı akciğer dokusu olduğu görülmüştür. Diğer organlarında metastaz görülme sıklıkları literatürdeki çalışmalar arasında ve bizim çalışmamızda değişkenlik göstermekteydi. Bunu sebebi hastaların başvuru anındaki evre ve *stage*

durumu, görüntüleme yöntemlerinin farklılıkları, hasta popülasyonun ırk ve coğrafi farklılıkları ve tümör mutasyon heterojenitesi sebep olarak düşünülebilir.

cfDNA konsantrasyonu ile metastaz odağı ilişkisine bakıldığında Newman ve ark. (167) ile Zhu ve ark. çalışmalarında (168) cfDNA konsantrasyonu ve metastatik odak sayısı arasında pozitif bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca Diaz-Montero ve arkadaşları gruplayarak yaptıkları bir çalışmada (169) bir organda 5 odak ya da ≥ 3 uzak organ metastazı ile cfDNA miktarı arasında doğrusal bir ilişki saptamışlardır. Çalışmamızda da cfDNA konsantrasyonu ile hastaların metastatik odak sayısı gruplandırılarak karşılaştırılmıştır. Multimetastatik (>3 uzak organ metastazı) olan hastaların cfDNA miktarı, uzak organ metastazı olmayan hastalara göre anlamlı yüksek saptanmıştır. Bu bulgular literatür ile uyumludur.

Çalışmamızda uzak organ metastazı ile GSK ilişkisi incelendiğinde uzak organ metastazı odak sayısı arttıkça ortalama GSK süresi anlamlı olarak kısalıyordu. Çalışmamız ile uyumlu olarak literatürde Zhu ve ark. (168) çalışmasında ve Xu ve arkadaşlarının çalışmalarında (170) KHDAK hastalarında metastatik odak sayısı ve GSK arasında negatif korelasyon raporlanmıştır.

Çalışmamıza patojenik mutasyon saptama oranı %25dir. Patojenik mutasyon saptanan hastaların %84'ü AAK, %8'i ASHK ve %8'i KHDAK-ASO alt tipinde idi. Büyükkışık ve ark. çalışmasında (161) 100 KHDAK hastası çalışmaya dahil edilmiş likit biyopsi yöntemi kullanılmış ve hastaların %42'sinde PM saptanmıştır. PM saptanan hastaların %70'inin adenokarsinom tanılı olduğu raporlanmıştır. Ottestad ve arkadaşlarının çalışmasında (171) likit biyopsi yöntemi ile çalışılan hastaların %52'sinde PM saptanmıştır; PM saptanan hastaların %50'si ASHK ve %33 ise AAK tanılı olarak raporlanmıştır. Sabari ve ark. çalışmasında (172) likit biyopsi yöntemi ile hastaların %45,7'sinde patojenik mutasyon rapor etmişlerdir. PM saptama oranının cfDNA miktarı ve eldesinin cerrahi tedavi ve kemoterapatik ilaç

kullanımı ile yakından ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (172). Bizim çalışmamıza dahil edilen hastaların %58'i daha önce hedefe yönelik ya da klasik kemoterapötik ilaçlar kullanmış takipteki hastalardan oluşmakta idi. Benzer çalışmalara göre daha düşük oranda patojenik mutasyon saptamamıza neden olmuş olabilir. Ayrıca çalışmamızda PM saptanan hastaların histopatolojik tanı dağılımı literatür ile uyumluydu.

Çalışmamızda MAF değeri %1 edilmiş ve saptanan 34 patojenik mutasyonun allel fraksiyonu ortalaması $8,3 \pm 13,13$ olarak saptanmıştır. Ottestad ve ark (171) yaptıkları çalışmada MAF değeri belirlememiş onun yerine okuma sayılarının baz almışlardır çalışmalarında AF ortalaması %24 (%1,4-73,8) olup mutasyon saptama oranı %52 olarak raporlanmıştır. Sabari ve ark. (172)yaptıkları çalışmada MAF olarak %0,1 i belirlemiş olup çalışmalarındaki PM saptama oranı %45 olarak raporlanmıştır. Chen ve ark yaptıkları çalışmada MAF olarak %0,1'i seçmiş ve mutasyon saptama oranı %62 olarak raporlamışlardır(173). Bizim çalışmamızda MAF %1 olarak seçilmiş olması mutasyon saptama oranımızın literatüre göre az olmasını açıklayan diğer bir neden olarak düşünülmektedir.

EGFR geni mutasyonları birçok kanser türünde saptanmış olup yapılan çalışmalarda KHDAK hastalarının %10-40'ında gözlemlendiği bildirilmiştir (6). Dogan ve ark. çalışmasında (174) 3029 adenokarsinom tanılı hastanın doku biyopsisi materyalinden yaptıkları incelemede EGFR geni mutasyon sıklığını %20 dir. Sağ ve ark. 132 hastalık çalışmasında (162) hastaların doku biyopsisi materyalinden yapılan incelemede EGFR sıklığı %14,39 olarak raporlanmıştır. Midha ve ark. yaptığı meta analizde (175) Avrupa da KHDAK hastalarında EGFR geni varyasyonu %15 (7-37) olarak gözlenirken; Asya-pasific genelinde bu sıklık %47 (40-64) olarak karşımıza çıkmaktadır. Chen ve ark. likit biyopsi yöntemi ile yaptıkları çalışmasında (173) EGFR mutasyon sıklığı %31 olarak raporlanmıştır. Büyükşimşek ve ark. likit biyopsi yöntemi ile yaptıkları çalışmada (161) 100 KHDAK hastasında EGFR geni sıklığını %31 olarak raporlamıştır. Villafior ve ark. likit biyopsi ile yaptıkları çalışmada (142) EGFR sıklığını %10 olarak

raporlamıştır. Bizim çalışmamızda ise 100 KHDAK hastanın 12'sinde (%12) EGFR geninde en az bir PM saptandı. Bu oran asya popülasyonunda yapılan çalışmalara göre düşük iken Avrupa popülasyonunda yapılan çalışmaların frekans aralığında idi. EGFR geni mutasyon saptanma oranının literatürdeki çalışmalarda ve bizim çalışmamızda değişkenlik göstermesi çalışmaya alınan hasta sayıları ve çalışmaya dahil etme kriterleri (histopatolojik tip, evre, tanı, tedavi direnci vb.), incelenen materyal farklılığından (FFPE, likit biyopsi) ve ırk gibi faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. EGFR geni sıklığı açısından çalışmamız optimal verilere sahip değildir çünkü hastalarımız doku biyopsisi yapılmış ancak başarılı olunamamış birçok hasta içermektedir bu nedenle verdiğimiz frekans verisi görece düşük kalmış olabilir.

Çalışmamız da likit biyopsi sonucunda EGFR geninde sıklık sırasına göre ekzon 19 mutasyonları (%44), ekzon-20 T790 mutasyonları (%27) ve ekzon-21 L858R mutasyonu (%16) saptandı. Ünal ve ark. çalışmasında (165) saptanan EGFR mutasyonlarının %50'si ekzon-20 T790M, %38'i ekzon-19 delesyonları ve %12'si ekzon-21 L858R mutasyonu olarak raporlanmıştır. Sağ ve ark. çalışmasında ekzon-19 delesyonlarını ve L858R mutasyonunu sıklığı sırasıyla %47,32 ve %31,58 olarak raporlanmıştır (162). Chen ve arkadaşlarının çalışmasında ise EGFR mutasyonları içerisinde ekzon-19 delesyonu %44, L858R mutasyonu ise % 47 oranında raporlanmıştır (176). Dogan ve ark. çalışmasında (174) ekzon-19 delesyonları %59 iken; L858R mutasyonu sıklığı %41 olarak raporlanmıştır. Literatür verileri ile uyumlu olarak çalışmamızda en sık ekzon 19 mutasyonları gözlenirken bazı çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda L858R mutasyonu daha az sıklıkta (%16 vs %32-47) gözlenmiştir. Ancak ülkemizde yapılan Ünal ve ark. çalışmasında ekzon 19 ve L858R mutasyon dağılımı bizim çalışmamız ile benzerdi.

KRAS geni mutasyonları KHDAK hastalarında kötü prognoz ile ilgili olup sıklığı etnisiteye göre değişmektedir. Batı toplumlarında (%25-50) asya toplumuna (%5-15) göre daha sık gözlenmektedir ve en sık görülen KRAS mutasyonu G12C dir (177-179). Dogan ve ark. ABD'de yaptıkları 3026

hastanın doku biyopsisi materyalinden yaptıkları içeren çalışmada (174) KRAS sıklığı %22 (670/3026) iken en sık mutasyon G12C idi. O'Byrne ve arkadaşlarının (180) 395 hastanın doku biyopsisi materyalinden yaptıkları yaptıkları çalışmada KRAS sıklığını %19 raporlanmıştır. Yoshizawa ve ark. (181) ise 440 asya kökenli hastanın doku biyopsisi materyalinden yaptıkları yaptıkları çalışmada KRAS mutasyon sıklığını %13,3 olarak raporlamıştır. Bhaumik ve arkadaşlarının Hindistanda yaptıkları çalışmada 204 KHDAAK hastasının doku biyopsisi materyalinden yaptıkları değerlendirilmiş olup KRAS geni mutasyon sıklığı %7,7 iken G12C en sık mutasyon olarak raporlanmıştır (182). Jing ve arkadaşlarının 112 KHDAAK hastasının doku biyopsisi materyalinden yaptıkları çalışmada KRAS geni sıklığı %8,93 iken G12D en sık mutasyon olarak raporlanmıştır (183). Sasaki ve arkadaşlarının 2007 yılında 195 KHDAAK hastasının doku biyopsisi materyalinden yaptıkları çalışmada RAS mutasyon sıklığını %11,1 (21/190) olarak bulmuştur (184). Büyüksimşek ve ark. likit biyopsi ile yaptıkları çalışmada (161) KRAS geni sıklığı %9 olarak raporlanmıştır. Chen ve ark. yaptıkları çalışmada (173) KHDAAK hastalarında likit biyopsi ile KRAS geni sıklığı %7 olarak raporlanmıştır. Bizim çalışmamızda hastalarımızın %7'sinde (7/100) KRAS geninde patojenik mutasyon saptandı. Çalışmaya dahil olan hastaların 58'inin eski tanı progrese/nüks hastalar olduğu göz önüne alındığı zaman yeni tanı KHDAAK hastalarında KRAS geni sıklığı %14(6/42) olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda KRAS geninin mutasyon sıklığı ve asya toplumlarına benzer, batı toplumlarına göre ise düşük gözlenmektedir. Çalışmamızda KRAS genide literatür ile uyumlu olarak en sık G12C (%71) mutasyonu saptandı.

PIK3CA genide EGFR sinyal yolağında görevli alt düzenleyicilerden biridir. PI3K/Akt/mTOR yolağı ile hücre çoğalması ve sağ kalımında önemli rol üstlenmektedir (185). KHDAAK hastalarında kötü prognoz ile ilişkilendirilen çalışmalar mevcuttur (186). Scheffler ve ark. çalışmasında 1144 KHDAAK hastanın doku biyopsisi materyalinden yapılan çalışmada PIK3CA sıklığı %3,7 olarak saptanmış ve en sık mutasyon ise E545K olarak raporlanmıştır (164). Kawano ve arkadaşlarının 235 KHDAAK hastasının doku biyopsisi

materyalinden yaptığı çalışmada(187) PIK3CA mutasyon sıklığı %3,4 iken E542K olarak raporlanmıştır. Jing ve arkadaşlarının 112 KHDAK hastasının doku biyopsisi materyalinden yaptıkları çalışmada (183) PIK3CA mutasyon sıklığı %5,36 iken E545K en sık gözlenen mutasyon olmuştur. Çalışmamızda PIK3CA mutasyonu hastaların %4'ünde gözlemlendi. Bulunan mutasyonların %60'ı insersiyon ve/veya delesyonlar sonucu oluşan çerçeve kayması mutasyon, %40'ı yanlış anlamlı mutasyonlardı. En sık S553fs* mutasyonu saptanmıştır. Bulgularımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

BRAF aktive edici mutasyonları KHDAK hastaların %3'ünde saptanmaktadır. BRAF V600E mutasyonu en sık saptanan mutasyondur (8, 73, 74). Bhaumik ve arkadaşlarının çalışmasında 204 KHDAK hastasının doku biyopsisi materyalini değerlendirilmiş ve BRAF gen mutasyonu %1,5 olarak raporlanmıştır (182). Jing ve arkadaşlarının 112 KHDAK hasta üstünde yaptıkları çalışmada doku biyopsisi materyalinden ve BRAF mutasyon sıklığı %1,79 olarak raporlanmıştır (183). Brustugun ve arkadaşlarının çalışmasında 979 hastanın doku biyopsisi materyalinden incelenmiş ve BRAF mutasyon sıklığı %1,7 olarak raporlanmıştır (188). Wen ve ark. (189) Çinde yaptıkları 1200 KHDAK hastasının doku biyopsisi materyalinden yaptıkları çalışmada BRAF geni sıklığı %4,4 olarak raporlanmıştır. Papadopoulou ve ark. yaptıklarının (190) likit biyopsi ile yaptıkları çalışmada V600E mutasyonu sıklığı %1,5 olarak raporlanmıştır. Bizim çalışmamızda 1 hastada (%1) BRAF geninde V600E mutasyonu saptanmıştır. Bulgularımız literatür ile uyumludur.

NRAS; RAS ailesinin bir üyesi olup GTPase aktivitesine sahiptir. KHDAK hastalarının yaklaşık %1'inde gözlenmek olup literatürde kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini öne süren çalışmalar bulunmaktadır mutasyonlar sıklıkla ekzon 12, 13 ve 61 de saptanmaktadır (68). Jing ve arkadaşlarının 112 KHDAK hasta üstünde yaptıkları çalışmada doku biyopsisi materyalinden kullanılmış ve NRAS mutasyon sıklığı %1,79 olarak raporlanmıştır (183). Sasaki ve arkadaşlarının 2007 yılında 195 KHDAK hastasının doku biyopsisi

materyalinden yaptıkları çalışmada NRAS mutasyon sıklığını %0,51 (1/195) olarak bulmuştur (184). . Papadopoulou ve ark. yaptıklarının (190) likit biyopsi ile yaptıkları çalışmada 50 KHDAK hastasından 1'inde (%2) NRAS geninde mutasyon (G13S) saptamıştır. Bizim çalışmamızda 1 hastamızda (%1) NRAS Q61H mutasyonu saptanmış olup verilerimizin literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

KIT geni mutasyonları özellikle hematolojik kanserler, kolorektal kanserler, meme kanseri, akciğer kanseri, nöroblastoma ve jinekolojik kanserlerde saptanmaktadır (83). Masago ve ark. (191)15 EGFR TKİ dirençli KHDAK hastasının doku biyopsisi ile yaptıkları çalışmada 2 hastada (%13) KIT geni aktive edici mutasyonu saptamıştır. Xu ve ark. çalışmasında 402 KHDAK hastasında KIT geni mutasyon sıklığını %3,42 (14/402) en sık mutasyon olarak T84M olarak raporlamışlardır. Bizim çalışmamızda hastamız yeni tanı AAK hastası olan 1 hastada (%1) KIT geninde V559F mutasyonu saptandı. KIT geninin inhibitör bölgesinde fonksiyon kaybına yol açarak KIT geninde işlev kazanımına yol açmaktadır (192). Çalışmamıza dahil edilen hastalar literatürdeki çalışmalara göre az olmakla beraber çalışmamızda literatüre yakın bulgular elde edilmiştir.

RAF1 proto onkogeni serin/treonin kinaz aktivitesine sahip olup RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolağının önemli bir üyesidir. Hücre proliferasyonu ve gelişmesinde önemli role sahiptir (193). Noeparast ve ark. (194) 41 KHDAK hastasının doku biyopsisi materyalinden yaptıkları çalışmada 2 hastada (%5) RAF1 geninde mutasyon saptamıştır. İmielinski ve ark. (195) KHDAK hastalarında likit biyopsi yöntemi ile yaptıkları çalışmada RAF1 geni mutasyon sıklığını %1 olarak (p.S257) raporlamıştır. Bizim çalışmamızda da çalışmamıza dahil edilen hastalardan sadece 1 hastada (%1) RAF-1 mutasyonu (RAF1:S257L) saptandı. Literatür taramamızda KHDAK dahil olmak üzere diğer kanser türlerinde de RAF1 geni mutasyonlarının KHDAK hastalarında nadir olduğu gözlemlendi. Mutasyonları nadir gözlenen bir gen olmasına rağmen bulgularımızın literatürdeki bilgiler ile uyumlu olduğunu görüldü. Bu genin mutasyonları hakkında daha fazla

çalışma yapılması kanser genetiğinin daha detaylı anlaşılmasını sağlayacak ve kansere karşı daha iyi mücadele edilmesine olanak sağlayacaktır.

Progresyon/nüks kabul edilen 58 hastanın başvuru öncesi doku biyopsisi materyalinden yapılan moleküler genetik incelemelerine göre hastaların %50'si (29/58) mEGFR iken geriye kalan 29 hasta (%50) vEGFR idi.

Progrese/nüks nedeniyle gelen 29 mEGFR hastanın %21'inde (6/29) progresyon/nüksü açıklayabilecek direnç mutasyonu saptandı. Bu mutasyonlar sıklık sırasına göre %66'sında EGFR: T790M (4/6), %17'sinde EGFR: T790A (1/6), %17'sinde PIK3CA: S553fs*7 (1/6) saptandı. EGFR TKİ kullanan hastaların %60-70'i tedaviye iyi yanıt vermektedir. Tedaviye yanıt veren hastaların hemen hemen tümünde ilerleyen dönemde EGFR TKİ karşı kazanılmış direnç gelişmektedir. Bu ilaç direncinin en sık sebebi EGFR geninde sonradan meydana gelen mutasyonlardır. (EGFR: T790M (%50-60) ve diğer EGFR mutasyonları (Ekzon 20 insersiyonu vb.) Bunlar mutasyonlar dışında PIK3CA geni mutasyonları, KRAS geni mutasyonları, BRAF geni mutasyonları, MET geni amplifikasyonları ve KHDAK alt tipinden KHAK tipine dönüşüm gibi mekanizmalar EGFR TKİ'lara karşı kazanılmış dirence yol açmaktadır (6). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak EGFR TKİ ilaçlara direnç geliştiren hastalarda en sık T790M mutasyonu (%67) saptandı. Çalışmamızın kısıtlıklarından biri bu hasta grubunda EGFR, MET ve ERBB2 geni amplifikasyonlarına bakılamamasıdır. Ayrıca progresyon/nüks kriterleri açısından tedavi öncesi hastaların tümör boyutu ve odak sayıları hakkında bilgilere ulaşamadı. Bu yüzden progrese/nüks hastaların NCCN guideline a uygun bir hasta seçimi mümkün olmamıştır.

Literatürde yapılan çalışmalarda T790M pozitif hastaların negatif hastalara göre GSK'ı anlamlı yüksek iken bizim çalışmamızda T790M mutasyonu pozitif saptadığımız hastaların 3.nesil TKİ tedavisine yeni başlanmış olması nedeniyle çalışmamızın bu kısmı henüz olgunlaşmamıştır. Bu hastaların 3.nesil TKİ tedavi süreci takip edilmektedir.

Progrese/nüks nedeniyle gelen 29 vEGFR hastasının 4'ünde (%12) klasik kemoterapi tedavisi altında direnç mutasyonu (primer ya da kazanılmış) saptandı. Bu mutasyonlar sırası ile (EGFR: A767_V769dup (n=1), PIK3CA: P381fs*11 (n=1), NRAS: Q61H (n=1), KRAS: G12C (n=1)) idi. Direnç mutasyonu pozitif hastaların GSK ortalaması $16,5\pm 0,5$ ay iken; direnç mutasyonu saptamayan 25 hastanın GSK ortalaması $48,7\pm 6,6$ ay idi. Direnç mutasyonu pozitif hastaların ortalama GSK süresi mutasyon saptanmayanlara göre anlamlı kısa saptandı. Çalışmamız ile uyumlu olarak Ying ve arkadaşlarının (196) yaptıkları çalışmada KRAS mutasyonunun kötü prognoz ile ilişki olduğu ortaya koyulmuştur. Sun ve arkadaşlarının 484 hastalık çalışmasında (197) KRAS mutasyonları bağımsız olarak kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ve ilaç direnci üzerinde olumsuz etkileri olabileceği öne sürülmüştür. Pan ve arkadaşlarının 41 çalışmayı içeren metaanalizinde (198) KRAS mutasyonların GSK, PFS ve EGFR TKİ ve kemoterapik ilaç direnci üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının (186) ve Ludovini ve arkadaşlarının (199) çalışmalarında KRAS ve/veya PIK3CA mutant hastaların GSK ve PFS değerlerini bu genler açısından vahşi tip olan hastalara göre anlamlı şekilde kısa bulmuşlardır. Ohashi ve arkadaşlarının çalışmasında (79) NRAS mutasyonların kötü prognoz ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Hastalarımızda saptanan mutasyonların hepsi tümör hücrelerini apoptozisten koruyan, proliferasyon avantajı sağlayan ve agresif tümör oluşumuna neden olan mutasyonlardır. Bu bilgiler direnç mutasyonu pozitif hastaların GSK ortalamasına daha kısa olmasını açıklamaktadır. Bulgularımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

P/N hastalarından mEGFR(n=29) hastaların ortalama GSK süresi $73,2\pm 4,9$ ay iken; vEGFR (n=29) olan hastaların ortalama GSK süresi $45,7\pm 6,2$ ay idi (p 0,081). EGFR vahşi tip olan hastaların GSK süresi, mEGFR hastaların ortalama GSK süresine göre daha kısa olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Benzer şekilde Inoue ve ark.

(200), Maemondo ve ark. (54) ve Zhou ve ark. çalışmaların da EGFR TKİ ilaçların GSK üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Ancak 1.nesil TKİ ilaçların literatürde GSK süresine etkisi tartışmalı olmak ile uzamış PFS açısında (50, 51, 201, 202) görüş birliği mevcuttur. Sonuçlarımız literatürle uyumludur.

Sigara kullanımı akciğer kanseri riskini artıran en önemli engellenebilir etkidir. Akciğer kanseri hastalarının % 80'i sigara kullanan ya da hayatlarının bir döneminde sigara kullanmış hastalardan oluşmaktadır (6). Sigara kullanımı ile akciğer kanserlerinde gözlenen mutasyonlar ilgi çeken bir araştırma alanı olmuştur. Sigara kullanan ve kullanmayan hastalarda EGFR ve KRAS geni PM sıklığını karşılaştıran çalışmalarda sigara kullanan hastalarda genellikle KRAS geninde PM saptanmış iken sigara kullanmayan hastalarda EGFR geninde PM saptanmıştır. Bu çalışmalardan Dogan ve ark. (174), O'Bryne ve ark. (180) ve Yoshizawa ve ark (181) yaptıkları çalışmalarda sigara içenlerle içmeyenler karşılaştırıldığında EGFR geninde sırasıyla %11 vs %43, %9 vs %39, %30 vs %59 olmak üzere sigara içmeyenlerde daha yüksek oranlarda saptanmışken KRAS geninde bu oranlar sırasıyla %34 vs %6, %21 vs %8, %15-%6 oranlarında olmak üzere sigara içenlerde daha yüksek saptanmıştır. Scheffler ve ark. çalışmasında (164) PIK3CA mutasyonlarının sigara kullanan hastalarda sigara kullanmayan hastalara göre daha sık gözleendiği (%92-%8) bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir. EGFR geni mutasyonları sigara kullanmayan hastaların %24'ünde saptanırken kullanan hastaların %3'ünde saptanmıştır. KRAS geni mutasyonları ise sigara kullanmayanların %3,5'inde saptanırken kullananların %8'inde saptanmıştır. Sigara kullanmayan hastaların hiçbirinde PIK3CA mutasyonu saptanmazken kullanan hastaların %8'inde saptanmıştır.

Yeni tanı hastaların %4,7'inde (2/42) birden fazla patojenik mutasyon beraberliği saptanmış olup her iki hastamızda da EGFR TKİ duyarlılık mutasyonu ve EGFR TKİ direnç mutasyonu birlikteliği gözlenmiştir. (EGFR:D807fs*90, PIK3CA:E545A, PIK3CA:S553fs*7)-(EGFR:L747P,

KRAS:G60D). Hastalardan birisinde tanı anından kısa bir süre sonra exitus hali gözlenmiş olup diğer hastada çalışmamız boyunca klasik kemoterapetik rejimleri ile tedavi uygulanmasına rağmen hastalık üstünde istenen kontrol sağlanamamıştır. NGS sisteminde aynı anda birçok sürücü gen ve mutasyon aynı anda incelenebilmektedir. Bu sayede kimi zaman kanser hastalarına hedefe yönelik ilaç kullanma imkanına sağlanabildiği gibi kimi zaman da ek mutasyonlardan dolayı tedavi etkisi azalmış olan ilaçlardan kaçınılmaktadır. Bu sayede ilaç nedeni oluşabilecek zaman kayıplarının ve gereksiz ilaç kullanımının önüne geçilmiş olmaktadır.



6.SONUÇ

1. KHDAK tanılı 100 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların 66(%66)'sı erkek, 34(%34)'ü kadın hasta idi. Erkek/kadın oranı 1,9 idi.
2. Hastaların ortalama yaşı $63,7 \pm 9.7$ (37-86) iken ortanca yaş 65 idi.
3. Çalışmaya katılan hastalarda %80'i akciğer adenokarsinom, %15'i akciğer skuamöz hücreli karsinom ve %5'i adenokarsinom ve skuzmöz hücreli karsinom olmayan KHDAK tanısı almıştı.
4. Likit biyopsi sonucunda hastaların %25'inde patojenik sürücü mutasyon saptandı. patojenik sürücü mutasyon saptanan hastaların %84 (21/25) AAK, %8(2/25) ASHK ve %8 (2/25) KHDAK-ASO tanısında idi. 12 hastada EGFR geninde, 7 hastada KRAS geninde, 4 hastada PIK3CA geninde, 1'er hastada ise ayrı ayrı NRAS, BRAF, KIT, RAF1 genlerinde PM saptandı.
5. Likit biyopsi sonunca panel içersin de ki 7 gende (BRAF (1/34), EGFR (18/32), KIT (1/34), KRAS (7/34), NRAS (1/34), PIK3CA (5/34), RAF-1 (1/34)) 34 tane patojenik mutasyon saptandı. En sık patojenik mutasyon saptanan gen EGFR (18/32) geni idi.
6. EGFR geninde saptanan mutasyonların hepsi 19,20 ve 21.ekzonlarda olup en sık saptanan mutasyon ekzon 19 delesyonları idi. 4 hastada T790M mutasyonu saptandı.
7. KRAS geninde 7 PM (G12C, G13C, G60D) saptandı. En sık saptanan mutasyon G12C mutasyonu idi.
8. PIK3CA geninde 5 PM (P381fs*11 (1), E545A(1), E542K(1), S553fs*7 (2)) saptandı.
9. Geriye kalan PM'lar RAF1: S257L (1), BRAF: G469A (1), KIT: V559F(1), NRAS: Q61H (1) mutasyonları idi.
- 10.Hastaların PET ve MRI sonuçları incelendiği zaman en sık metastaz hastaların %34'inde saptanan kemik metastazıydı. Daha sonrasında sınırsız akciğer metastazı (%27), adrenal korteks metastazı (%24), beyin (%16), akciğer plevrasına metastaz (%15) ve karaciğer metastazı (%11) olarak sıralandı

- 11.Çalışmaya dahil edilen hastalardan mutimetastatik hasta grubunda olanların ortalama GSK süreleri oligometastatik gruptaki hastaların ortalamasında anlamlı kısa idi.
- 12.Multimetastatik hastaların ortalama cfDNA miktarı uzak organ metastazı olmayan hastaların ortalamasından anlamlı fazla idi.
- 13.Başvuru anında hastaların %42'si yeni tanı KHDAK hastası iken %58'i daha önce KHDAK tanısı almış tedavi sırasında progresyon veya nüks gelişmesi nedeniyle tarafımıza gelmişti. Yeni tanı hastalarda en sık KRAS geninde G12C mutasyonu saptanırken; progresyon/nüks nedeniyle gelen hastalarda en sık EGFR geninde mutasyon saptandı. Direnç mutasyonları arasında en sık T790M mutasyonu gözlemlendi.
- 14.Daha önce EGFR TKİ ilaç kullanan 29 hasta ile klasik kemoterapi rejimi uygulanan 29 hasta arasında sağ-kalım bakımında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,005$).
- 15.Tanı anında EGFR aktive edici mutasyon negatif olup klasik kemoterapi rejimi uygulanan 29 hastadan 4'ünde likit biyopsi sonucunda direnç mutasyonu saptandı. Direnç mutasyonu pozitif hastaların ortalama GSK'sı direnç mutasyonu negatif olan hastalardan anlamlı olarak kısa çıktı.
- 16.Çalışmamıza katılan 100 hastadan 66'sının sigara kullanım verilerine ulaşılabildi. Sigara kullanan hastaların %19'unda (7/37) PM saptandı. En sık PM saptanan genler KRAS ve PIK3CA idi. Sigara kullanmayan hastaların %29'unda PM saptanırken; en sık mutasyon EGFR geninde (%92) gözlemlendi.

7. KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol.* 2016;893:1-19.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
4. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003;123(1 Suppl):21S-49S.
5. Diamantis A, Magiorkinis E, Koutselini H. Fine-needle aspiration (FNA) biopsy: historical aspects. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(2):191-7.
6. Devita VTL, T. S.; Rosenberg, A. S. *Cancer Principle&Practice of Oncology.* 11 ed. United States of America: Wolters Kluwer; 2019.
7. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba, II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(5):339-46.
8. Schmid K, Oehl N, Wrba F, Pirker R, Pirker C, Filipits M. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clin Cancer Res.* 2009;15(14):4554-60.
9. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
10. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(8):472-84.
11. Wistuba, II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:331-48.
12. Ost DE, Jim Yeung SC, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013;143(5 Suppl):e121S-e41S.
13. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):778-90.
14. Hoffmann D, Djordjevic MV, Rivenson A, Zang E, Desai D, Amin S. A study of tobacco carcinogenesis. II. Relative potencies of tobacco-specific N-nitrosamines as inducers of lung tumours in A/J mice. *Cancer Lett.* 1993;71(1-3):25-30.
15. Lorigan P, Radford J, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2005;6(10):773-9.
16. Huang YJ, Huang TW, Lin FH, Chung CH, Tsao CH, Chien WC. Radiation Therapy for Invasive Breast Cancer Increases the Risk of Second Primary Lung Cancer: A Nationwide Population-Based Cohort Analysis. *J Thorac Oncol.* 2017;12(5):782-90.
17. Drummond MB, Lambert AA, Hussien AF, Lin CT, Merlo CA, Wise RA, et al. HIV Infection Is Independently Associated with Increased CT Scan Lung Density. *Acad Radiol.* 2017;24(2):137-45.
18. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(1):5-8.

19. Tardon A, Lee WJ, Delgado-Rodriguez M, Dosemeci M, Albanes D, Hoover R, et al. Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2005;16(4):389-97.
20. Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, Borghaei H, Chow LQ, Downey RJ, et al. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(1):78-98.
21. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol*. 2006;24(28):4539-44.
22. Stupp R, Monnerat C, Turrisi AT, 3rd, Perry MC, Leyvraz S. Small cell lung cancer: state of the art and future perspectives. *Lung Cancer*. 2004;45(1):105-17.
23. Zakowski MF. Pathology of small cell carcinoma of the lung. *Semin Oncol*. 2003;30(1):3-8.
24. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretic L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47-53.
25. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):39-51.
26. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1240-2.
27. Takamochi K, Ohmiya H, Itoh M, Mogushi K, Saito T, Hara K, et al. Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *BMC Cancer*. 2016;16(1):760.
28. Jeremy George P, Banerjee AK, Read CA, O'Sullivan C, Falzon M, Pezzella F, et al. Surveillance for the detection of early lung cancer in patients with bronchial dysplasia. *Thorax*. 2007;62(1):43-50.
29. Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol*. 2001;54(4):257-71.
30. Lantuejoul S, Salameire D, Salon C, Brambilla E. Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology*. 2009;54(1):43-54.
31. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, Hitchcock CL, Cutler GB, Jr., Nieman L, et al. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. *Am J Surg Pathol*. 1991;15(6):529-53.
32. Fasano M, Della Corte CM, Papaccio F, Ciardiello F, Morgillo F. Pulmonary Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma: From Epidemiology to Therapy. *J Thorac Oncol*. 2015;10(8):1133-41.
33. Asamura H, Kameya T, Matsuno Y, Noguchi M, Tada H, Ishikawa Y, et al. Neuroendocrine neoplasms of the lung: a prognostic spectrum. *J Clin Oncol*. 2006;24(1):70-6.
34. Rodriguez-Panadero F, Janssen JP, Astoul P. Thoracoscopy: general overview and place in the diagnosis and management of pleural effusion. *Eur Respir J*. 2006;28(2):409-22.
35. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*. 2013;82(2):179-89.
36. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455(7216):1069-75.
37. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol*. 2011;22(12):2616-24.

38. Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1647-53.
39. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell.* 2012;150(6):1121-34.
40. Lee W, Jiang Z, Liu J, Haverty PM, Guan Y, Stinson J, et al. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature.* 2010;465(7297):473-7.
41. An SJ, Chen ZH, Su J, Zhang XC, Zhong WZ, Yang JJ, et al. Identification of enriched driver gene alterations in subgroups of non-small cell lung cancer patients based on histology and smoking status. *PLoS One.* 2012;7(6):e40109.
42. Seo JS, Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee JK, Bleazard T, et al. The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res.* 2012;22(11):2109-19.
43. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-6.
44. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304(5676):1497-500.
45. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350(21):2129-39.
46. Engebraaten O, Bjerkvig R, Pedersen PH, Laerum OD. Effects of EGF, bFGF, NGF and PDGF(bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities of human brain-tumour biopsies in vitro. *Int J Cancer.* 1993;53(2):209-14.
47. Yoneda KT, F. . Molecular Diagnosis and Targeting for Thoracic and Gastrointestinal Malignancy In: *Molecular Diagnosis and Targeting for Lung Cancer 2018.*
48. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):587-95.
49. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(36):13306-11.
50. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2011;12(8):735-42.
51. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(3):239-46.
52. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361(10):947-57.
53. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):121-8.

54. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isoke H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010;362(25):2380-8.
55. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majumdar K, Suzuki M, Lee H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2005;65(5):1642-6.
56. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(18):4910-8.
57. Mazieres J, Barlesi F, Filleron T, Besse B, Monnet I, Beau-Faller M, et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol.* 2016;27(2):281-6.
58. De Greve J, Teugels E, Geers C, Decoster L, Galdermans D, De Mey J, et al. Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung Cancer.* 2012;76(1):123-7.
59. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3(1 Suppl):S7-S19.
60. Gual P, Giordano S, Williams TA, Rocchi S, Van Obberghen E, Comoglio PM. Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene.* 2000;19(12):1509-18.
61. Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem.* 2000;275(12):8806-11.
62. Tong JH, Yeung SF, Chan AW, Chung LY, Chau SL, Lung RW, et al. MET Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):3048-56.
63. Cappuzzo F, Janne PA, Skokan M, Finocchiaro G, Rossi E, Ligorio C, et al. MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2009;20(2):298-304.
64. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun.* 2014;5:4846.
65. Facchinetti F, Tiseo M, Di Maio M, Graziano P, Bria E, Rossi G, et al. Tackling ALK in non-small cell lung cancer: the role of novel inhibitors. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):301-21.
66. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013;5 Suppl 5:S479-90.
67. Lin JJ, Shaw AT. Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(11):1611-25.
68. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist.* 2013;18(7):865-75.
69. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(15):4040-5.
70. Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1795(1):37-52.
71. Kawai H, Ishii A, Washiya K, Konno T, Kon H, Yamaya C, et al. Estrogen receptor alpha and beta are prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(14):5084-9.
72. Slatore CG, Chien JW, Au DH, Satia JA, White E. Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study. *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1540-6.

73. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
74. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304(5670):554.
75. Jin G, Kim MJ, Jeon HS, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. 2010;69(3):279-83.
76. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11-22.
77. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(7):517-31.
78. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18):5731-4.
79. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Lovly CM, Chen X, Rudin CM, et al. Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clin Cancer Res*. 2013;19(9):2584-91.
80. König K, Peifer M, Fassunke J, Ihle MA, Kunstlinger H, Heydt C, et al. Implementation of Amplicon Parallel Sequencing Leads to Improvement of Diagnosis and Therapy of Lung Cancer Patients. *J Thorac Oncol*. 2015;10(7):1049-57.
81. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(10):1037-51.
82. Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood*. 2002;100(2):661-5.
83. Hubbard SR. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(6):464-71.
84. Dziadziuszko R, Le AT, Wrona A, Jassem J, Camidge DR, Varella-Garcia M, et al. An Activating KIT Mutation Induces Crizotinib Resistance in ROS1-Positive Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(8):1273-81.
85. Davies KD, Mahale S, Astling DP, Aisner DL, Le AT, Hinz TK, et al. Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013;8(12):e82236.
86. Cargnelutti M, Corso S, Pergolizzi M, Mevellec L, Aisner DL, Dziadziuszko R, et al. Activation of RAS family members confers resistance to ROS1 targeting drugs. *Oncotarget*. 2015;6(7):5182-94.
87. Farago AF, Azzoli CG. Beyond ALK and ROS1: RET, NTRK, EGFR and BRAF gene rearrangements in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6(5):550-9.
88. Wang P, Song L, Ge H, Jin P, Jiang Y, Hu W, et al. Crenolanib, a PDGFR inhibitor, suppresses lung cancer cell proliferation and inhibits tumor growth in vivo. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1761-8.
89. Xu C, Wang W, Zhang Q, Zhuang W, Zhu Y, Chen Y, et al. PDGFRA Defines a Unique Molecular Subtypes of Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *IASLC 19th World Conference on Lung Cancer; Canada/Toronto2018*. p. 720.
90. Willems L, Tamburini J, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep*. 2012;14(2):129-38.
91. Olak J, Ng A. Diagnosis and Treatment of Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. 1996;1(4):201-9.

92. Marcus PM, Bergstralh EJ, Zweig MH, Harris A, Offord KP, Fontana RS. Extended lung cancer incidence follow-up in the Mayo Lung Project and overdiagnosis. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(11):748-56.
93. Manser RL, Irving LB, Stone C, Byrnes G, Abramson M, Campbell D. Screening for lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004(1):CD001991.
94. Doria-Rose VP, Marcus PM, Szabo E, Tockman MS, Melamed MR, Prorok PC. Randomized controlled trials of the efficacy of lung cancer screening by sputum cytology revisited: a combined mortality analysis from the Johns Hopkins Lung Project and the Memorial Sloan-Kettering Lung Study. *Cancer.* 2009;115(21):5007-17.
95. National Lung Screening Trial Research T, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011;365(5):395-409.
96. Moyer VA, Force USPST. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2014;160(5):330-8.
97. Zhang R, Shao F, Wu X, Ying K. Value of quantitative analysis of circulating cell free DNA as a screening tool for lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer.* 2010;69(2):225-31.
98. Jiang T, Zhai C, Su C, Ren S, Zhou C. The diagnostic value of circulating cell free DNA quantification in non-small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer.* 2016;100:63-70.
99. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K, American College of Chest P. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007;132(3 Suppl):234S-42S.
100. Group NM-aC. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet.* 2010.
101. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008;26(21):3552-9.
102. Group NM-AC. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2008;26(28):4617-25.
103. Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer.* 2011;71(1):3-10.
104. Scagliotti G, Hanna N, Fossella F, Sugarman K, Blatter J, Peterson P, et al. The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies. *Oncologist.* 2009;14(3):253-63.
105. Rowell NP, Williams CJ. Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review. *Thorax.* 2001;56(8):628-38.
106. Robinson LA, Ruckdeschel JC, Wagner H, Jr., Stevens CW, American College of Chest P. Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007;132(3 Suppl):243S-65S.
107. Lester JF, Macbeth FR, Toy E, Coles B. Palliative radiotherapy regimens for non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(4):CD002143.
108. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, et al. Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J Clin Oncol.* 2018;36(22):2244-50.

109. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;376(7):629-40.
110. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 2013;31(27):3327-34.
111. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(24):2542-50.
112. Forde PM, Rudin CM. Crizotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(8):1195-201.
113. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland A, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1307-16.
114. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1734-9.
115. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005;352(8):786-92.
116. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011;3(75):75ra26.
117. Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(8):473-81.
118. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med.* 2012;4(120):120ra17.
119. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2016;6(10):1118-33.
120. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011;480(7378):480-9.
121. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14608-13.
122. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l' homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-3.
123. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50.
124. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994;86(4):774-9.
125. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3(1):67-71.
126. Jiang P, Chan CW, Chan KC, Cheng SH, Wong J, Wong VW, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(11):E1317-25.

127. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659-65.
128. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas.* 1998;17(1):89-97.
129. Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest.* 1990;86(1):69-74.
130. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care.* 2006;10(2):R60.
131. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
132. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Samps N, Graves T, et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature.* 2008;453(7191):56-64.
133. Campbell PJ, Pleasance ED, Stephens PJ, Dicks E, Rance R, Goodhead I, et al. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13081-6.
134. Goyal L, Saha SK, Liu LY, Siravegna G, Leshchiner I, Ahronian LG, et al. Polyclonal Secondary FGFR2 Mutations Drive Acquired Resistance to FGFR Inhibition in Patients with FGFR2 Fusion-Positive Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov.* 2017;7(3):252-63.
135. Burrell RA, Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Mol Oncol.* 2014;8(6):1095-111.
136. Garraway LA, Janne PA. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov.* 2012;2(3):214-26.
137. Wu Y, Liu H, Shi X, Song Y. Can EGFR mutations in plasma or serum be predictive markers of non-small-cell lung cancer? A meta-analysis. *Lung Cancer.* 2015;88(3):246-53.
138. Qian X, Liu J, Sun Y, Wang M, Lei H, Luo G, et al. Circulating cell-free DNA has a high degree of specificity to detect exon 19 deletions and the single-point substitution mutation L858R in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016;7(20):29154-65.
139. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2014;4:6269.
140. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O'Connell A, Feeney N, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2(8):1014-22.
141. Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, Grohe C, Yokoi T, et al. ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The ASSESS Study. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1682-9.
142. Villaflor V, Won B, Nagy R, Banks K, Lanman RB, Talasz A, et al. Biopsy-free circulating tumor DNA assay identifies actionable mutations in lung cancer. *Oncotarget.* 2016;7(41):66880-91.
143. Crvenkova S. Prognostic Factors and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Chemoradiotherapy. *Open Access Maced J Med Sci.* 2015;3(1):75-9.
144. Abbasi S, Badheeb A. Prognostic Factors in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients: Patient Characteristics and Type of Chemotherapy. *Lung Cancer Int.* 2011;2011:152125.

145. Wang W, Song Z, Zhang Y. A Comparison of ddPCR and ARMS for detecting EGFR T790M status in ctDNA from advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Cancer Med.* 2017;6(1):154-62.
146. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res.* 2016;22(23):5772-82.
147. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015;7(302):302ra133.
148. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985-90.
149. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61(12):4675-8.
150. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun.* 2016;7:11815.
151. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med.* 2015;21(6):560-2.
152. Horner-Rieber J, Bernhardt D, Blanck O, Duma M, Eich HT, Gerum S, et al. Long-term Follow-up and Patterns of Recurrence of Patients With Oligometastatic NSCLC Treated With Pulmonary SBRT. *Clin Lung Cancer.* 2019;20(6):e667-e77.
153. Petrackova A, Vasinek M, Sedlarikova L, Dyskova T, Schneiderova P, Novosad T, et al. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. *Front Oncol.* 2019;9:851.
154. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19(1):4-23.
155. Khozin S, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Boyd K, Murgo A, et al. U.S. Food and Drug Administration approval summary: Erlotinib for the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 19 deletions or exon 21 (L858R) substitution mutations. *Oncologist.* 2014;19(7):774-9.
156. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2020;382(1):41-50.
157. Xu H, Zhang Q, Liang L, Li J, Liu Z, Li W, et al. Crizotinib vs platinum-based chemotherapy as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer with different ROS1 fusion variants. *Cancer Med.* 2020.
158. Ettinger DS, Aisner DL, Wood DE, Akerley W, Bauman J, Chang JY, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16(7):807-21.
159. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790M Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third-Generation EGFR Inhibitor. *Cancer Discov.* 2015;5(7):713-22.
160. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, et al. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: a study of 25 population-based cancer

- registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44(4):388-96.
161. Buyuksimsek M, Togun M, Oguz KI, Bisgin A, Boga I, Tohumcuoglu M, et al. Results of Liquid Biopsy Studies by Next Generation Sequencing in Patients with Advanced Stage Non-small Cell Lung Cancer: Single Center Experience from Turkey. *Balkan J Med Genet*. 2019;22(2):17-24.
162. Sag SO, Gorukmez O, Ture M, Gorukmez O, Deligonul A, Sahinturk S, et al. Spectrum of EGFR gene mutations and ALK rearrangements in lung cancer patients in Turkey. *Springerplus*. 2016;5:482.
163. Yang P, Allen MS, Aubry MC, Wampfler JA, Marks RS, Edell ES, et al. Clinical features of 5,628 primary lung cancer patients: experience at Mayo Clinic from 1997 to 2003. *Chest*. 2005;128(1):452-62.
164. Scheffler M, Bos M, Gardizi M, Konig K, Michels S, Fassunke J, et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget*. 2015;6(2):1315-26.
165. Unal O.U, Oztop I, Calibasi G, Baskin Y, Koca D, N D. Relationship between Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Clinicopathological Features in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer in Western Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(6):3705-9.
166. Oikawa A, Takahashi H, Ishikawa H, Kurishima K, Kagohashi K, Satoh H. Application of conditional probability analysis to distant metastases from lung cancer. *Oncol Lett*. 2012;3(3):629-34.
167. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20(5):548-54.
168. Zhu YJ, Zhang HB, Liu YH, Zhang FL, Zhu YZ, Li Y, et al. Quantitative cell-free circulating EGFR mutation concentration is correlated with tumor burden in advanced NSCLC patients. *Lung Cancer*. 2017;109:124-7.
169. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(1):49-59.
170. Xu Z, Yang Q, Chen X, Zheng L, Zhang L, Yu Y, et al. Clinical associations and prognostic value of site-specific metastases in non-small cell lung cancer: A population-based study. *Oncol Lett*. 2019;17(6):5590-600.
171. Ottestad AL, Wahl SGF, Gronberg BH, Skorpen F, Dai HY. The relevance of tumor mutation profiling in interpretation of NGS data from cell-free DNA in non-small cell lung cancer patients. *Exp Mol Pathol*. 2020;112:104347.
172. Sabari JK, Offin M, Stephens D, Ni A, Lee A, Pavlakis N, et al. A Prospective Study of Circulating Tumor DNA to Guide Matched Targeted Therapy in Lung Cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(6):575-83.
173. Chen KZ, Lou F, Yang F, Zhang JB, Ye H, Chen W, et al. Circulating Tumor DNA Detection in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing. *Sci Rep*. 2016;6:31985.
174. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res*. 2012;18(22):6169-77.

175. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res.* 2015;5(9):2892-911.
176. Chen C, Zhang J, Huang K, Shen Q, Teng X. Comparison of clinicopathologic characteristics between patients with EGFR exon 19 deletion and EGFR L858R mutation in lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 2018;11(9):4644-9.
177. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990;323(9):561-5.
178. Ricciuti B, Leonardi GC, Metro G, Grignani F, Paglialunga L, Bellezza G, et al. Targeting the KRAS variant for treatment of non-small cell lung cancer: potential therapeutic applications. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(1):53-68.
179. Roman M, Baraibar I, Lopez I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer.* 2018;17(1):33.
180. O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol.* 2011;12(8):795-805.
181. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, et al. Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol.* 2013;8(1):52-61.
182. Bhaumik S, Ahmad F, Das BR. Somatic mutation analysis of KRAS, BRAF, HER2 and PTEN in EGFR mutation-negative non-small cell lung carcinoma: determination of frequency, distribution pattern and identification of novel deletion in HER2 gene from Indian patients. *Med Oncol.* 2016;33(10):117.
183. Jing C, Mao X, Wang Z, Sun K, Ma R, Wu J, et al. Nextgeneration sequencingbased detection of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA, Her2 and TP53 mutations in patients with nonsmall cell lung cancer. *Mol Med Rep.* 2018;18(2):2191-7.
184. Sasaki H, Okuda K, Kawano O, Endo K, Yukiue H, Yokoyama T, et al. Nras and Kras mutation in Japanese lung cancer patients: Genotyping analysis using LightCycler. *Oncol Rep.* 2007;18(3):623-8.
185. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):a011189.
186. Zhao J, Han Y, Li J, Chai R, Bai C. Prognostic value of KRAS/TP53/PIK3CA in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2019;17(3):3233-40.
187. Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2006;54(2):209-15.
188. Brustugun OT, Khattak AM, Tromborg AK, Beigi M, Beiske K, Lund-Iversen M, et al. BRAF-mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2014;84(1):36-8.
189. Wen S, Dai L, Wang L, Wang W, Wu D, Wang K, et al. Genomic Signature of Driver Genes Identified by Target Next-Generation Sequencing in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist.* 2019;24(11):e1070-e81.
190. Papadopoulou E, Tsoulou N, Tsantikidi K, Metaxa-Mariatou V, Stamou PE, Kladi-Skandalis A, et al. Clinical feasibility of NGS liquid biopsy analysis in NSCLC patients. *PLoS One.* 2019;14(12):e0226853.
191. Masago K, Fujita S, Muraki M, Hata A, Okuda C, Otsuka K, et al. Next-generation sequencing of tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small-cell lung cancers in patients harboring epidermal growth factor-activating mutations. *BMC Cancer.* 2015;15:908.

192. Xu C, Wang W, Zhang W, Zhu Y, Chen Y, Fang M, et al. Molecular Spectrum of KIT Mutations Detection in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients. IASLC 19th World Conference on Lung Cancer; Canada, Toronto: Journal of Thoracic Oncology; 2018. p. 913.
193. Cobb MH, Hepler JE, Cheng M, Robbins D. The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2. *Semin Cancer Biol.* 1994;5(4):261-8.
194. Noeparast A, Giron P, Noor A, Bahadur Shahi R, De Brakeleer S, Eggermont C, et al. CRAF mutations in lung cancer can be oncogenic and predict sensitivity to combined type II RAF and MEK inhibition. *Oncogene.* 2019;38(31):5933-41.
195. Imielinski M, Greulich H, Kaplan B, Araujo L, Amann J, Horn L, et al. Oncogenic and sorafenib-sensitive ARAF mutations in lung adenocarcinoma. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1582-6.
196. Ying M, Zhu XX, Zhao Y, Li DH, Chen LH. KRAS Mutation as a Biomarker for Survival in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer, A Meta-Analysis of 12 Randomized Trials. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(10):4439-45.
197. Sun JM, Hwang DW, Ahn JS, Ahn MJ, Park K. Prognostic and predictive value of KRAS mutations in advanced non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2013;8(5):e64816.
198. Pan W, Yang Y, Zhu H, Zhang Y, Zhou R, Sun X. KRAS mutation is a weak, but valid predictor for poor prognosis and treatment outcomes in NSCLC: A meta-analysis of 41 studies. *Oncotarget.* 2016;7(7):8373-88.
199. Ludovini V, Bianconi F, Pistola L, Chiari R, Minotti V, Colella R, et al. Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6(4):707-15.
200. Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naive non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Ann Oncol.* 2013;24(1):54-9.
201. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Final overall survival results from a randomised, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802). *Ann Oncol.* 2015;26(9):1877-83.
202. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(2):123-32.

8. EKLER

