

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE
'EPİTELYAL BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ' (EGFR) GEN
VARYASYONLARININ, MUTASYONLARININ VE
SERUM EGFR DÜZEYLERİNİN
SAĞKALIM İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR ELVİN HEKİMOĞLU
TEZ DANIŞMANI: PROF DR AKİF TURNA

İSTANBUL - 2014

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	2
KISALTMALAR.....	3
1. GİRİŞ.....	4
2. GENEL BİLGİLER.....	6
3. HASTALAR VE YÖNTEMLER.....	18
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA.....	36
6. KAYNAKÇA.....	42
7. ÖZET.....	48
8. SUMMARY.....	50

TEŞEKKÜR

Toraks kelimesini ilk duyduğumda 10 yaşındaydım, bir daha da hiç unutmadım. 1987 şubatında ambulans sirenleriyle girdiğimiz Ankara İbni Sina Hastanesi acilindeki günboyu bekleyişim sırasında aldığım karar, beni bugün bu yazıyı yazma noktasına kadar getirmiş bulunuyor. Anne babamın hayatını bize geri veren ‘göğüs cerrahisi’ camiasına duyduğum minnet borcunu ne yaparsam yapayım ödemek mümkün olmasa da, bugünlerde birilerine, bir nefes vermiş olmanın bir nebze rahatlığıyla, doğup büyüdüğüm Cerrahpaşa’dan ayrılırken, içim biraz daha hafiflemiş durumda.

Öncelikle anne ve babama yaptığı müdahalelerle iyi ki vardı dediğim aile dostu
Göğüs Cerrahisi Op Dr Kadir KOÇ’a,

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım,
cerrahi eğitimime büyük katkısı olan Prof Dr Kamil KAYNAK’a

Bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim, cerrahi eğitimimde büyük payı olan, tezimi hazırlamam sırasında yardımlarını esirgemeyen ağabeyim Prof Dr Akif TURNA’ya,
Tecrübelerini paylaşarak yetişmemde çok önemli emekleri olan uzman ağabeylerim
Op Dr Ahmet DEMİRKAYA ve Op Dr Ezel ERŞEN’e,

Bilgi ve deneyimlerinden çok şey öğrendiğim Anestezi ekibinden Prof Dr Hülya EROLÇAY, Doç Dr Lale YÜCEYAR, Uzman Dr Cem SAYILGAN ve tüm anestezi asistanlarına,

Asistanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum
Op Dr Burcu KILIÇ, Op Dr Gökçe CANGEL, Op Dr Serkan ÖZKUL, Op Dr Osman YAKŞI, Dr Nurlan ALİZADE ve Dr Mehlika İŞCAN’a ve diğer servislerdeki asistan arkadaşlarıma,

Gerek gün içinde gerekse nöbet şartlarında acı tatlı birçok zamanda beraber çalıştığımız
kliniğimizdeki bütün hemşire, personel ve sekreter arkadaşlarıma,

Fakültemiz bünyesinde çalışan bütün servis, ameliyathane ve yoğun bakım hemşire,
anestezi teknisyeni ve personel arkadaşlarıma,

Bana her zaman anne şefkatiyle yaklaşan ve yanımda olan
Leyla AKGÜL ve Hülya TULPAR’a,

Özellikle son dönemde yaşadığı bütün sıkıntılara rağmen özverisinde hiçbir değişiklik olmayan canım anneme,

Bu zorlu sürecin her bir gününü büyük bir sabırla, tamı tamına benimle birlikte yaşayan canım babam ATİ’me sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr Elvin HEKİMOĞLU
Cerrahpaşa, Kasım 2014

KISALTMALAR

ADK:Adenokarsinom

AJCC: American Joint Committee on Cancer

BAK: Bronkoalveolar karsinom

BHK: Büyük Hücreli Karsinom

DNA: Deoksiribonükleaz

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ELISA: Enzim-linked immunosorbent assay

EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

PCR:Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA:Ribonükleik asit

SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom

TKI: Tirozin Kinaz İnhibitörü

1.GİRİŞ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Tanı olanaklarının gelişmesi ve sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilmektedir.

Akciğer kanserleri gelişmiş ülkelerde en sık görülen ve ölümcül seyreden kanserlerdir(1). Akciğer kanseri halen tüm dünyada kanserler arasında %12.8 oranında görülürken, tüm kanser ölümlerinin %17.8'ini oluşturmaktadır(1).

Akciğer kanserlerinin büyük bir çoğunluğu epitel hücrelerinden köken alan karsinomlardır(2). Akciğer karsinomları küçük hücreli dışı (%80,4) ve küçük hücreli (%16,8) olarak iki ana gruba ayrılmıştır(2). Akciğer kanserinin tedavisinde uygulanacak işleme karar verilirken; kanserin histopatolojik tipi, mevcut evresi ve hastanın performans durumu göz önüne alınmaktadır. Sıklıkla uygulanan tedavi yöntemleri; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi olmasına karşın, cerrahi tedavi ile elde edilen sonuçlar en başarılı olmaktadır. Cerrahi tedavinin amacı tam bir rezeksiyondur(3).

Son yıllarda akciğer kanserlerinin tedavisi için, çeşitli moleküler düzeyde hedefe yönelik kanser tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri vakalarından çoğunda epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) aşırı ifadesi (ekspresyonu) görülür. EGFR intrasellüler tirozin kinaz bölgesi içeren membrana bağlı bir proteindir.(4) Bu bölge aktive olduğunda birçok yolu tetikleyerek çeşitli hücre proliferasyon sinyallerinin gelişmesine neden olur. Son 10 yıldaki bulgulara göre tirozin kinaz bölgesindeki mutasyonlar bu yolun kalıcı aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır(4). Bu nedenle epidermal büyüme faktörü reseptöründe bulunan tirozin kinazı hedefleyen ilaçlar (erlotinib,gefitinib) geliştirilmiştir. Tirozin kinaz kanser ilaçlarının gelişimi için mükemmel bir hedef olarak görülmektedir. İn vivo modeller kullanılarak birçok ümit verici sitotoksik aktivite gösterilmektedir(5).

Tirozin kinaz inhibitörleri ileri evre akciğer kanseri olgularının prognoz ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır(6).

Son altmış yıldır akciğer kanserinde hastalık gelişiminin kalıtsal bir temele oturduğu belirtilmektedir. EGFR gen mutasyonları yada bu mutasyonları etkilerini gösteren moleküller hücre proliferasyonuna, apoptoz inhibisyonuna ve metastaza neden olabilecek aktivasyonlara yol açabilir(7). EGFR mutasyon görüntüleme testi, akciğer kanseri teşhislerinde anahtar rol oynamaktadır. Hedefe yönelik geliştirilen bu metodlar ile spesifik olarak en sık görülen EGFR mutasyonları belirlenmektedir(8).

Bu çalışmada, ilgili gen mutasyonları akciğer kanserli hastaların kan ve akciğer tümörü dokuları incelenecektir. Akciğer kanserine ait risk durumları, EGFR'nin ilgili gen varyasyonları, bu varyasyonların ve serum EGFR düzeylerinin klinik diğer parametrelerle ilişkileri değerlendirilmeye çalışılacaktır. Ayrıca, hem hastaların kanlarından elde edilecek deoksiribonükleik asit (DNA) materyalindeki, hem de aynı hastaların tümör dokularından elde edilecek DNA materyalinde araştırılacak özellikle EGFR'nin 19. 20. ve 21. ekzonlarındaki mutasyonların önemi irdelenecektir.

Bu çalışmanın amacı EGFR geninin 19,20,21. ekzonlarındaki mutasyonlar ile, serum EGFR seviyeleri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri arasındaki olası ilişkiyi belirlemektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

2.1.1.Epidemiyoloji

Akciğer kanseri dünyada yaygın olarak görülen kanser türlerinden biri olup kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebebi olarak bilinmektedir. Yirminci yüzyılın başlarında nadir bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmıştır(9).

ABDde 2002 yılında 169,400 kişi akciğer kanseri tanısı almış, 2003 yılında 154,900 kişi bu hastalığı yakalanmıştır. Yaklaşık 1 milyon kişinin her yıl tüm dünyada bu hastalıktan öldüğü tahmin edilmektedir. Akciğer kanseri ABD’de halen kansere bağlı ölüm sebeplerinden hem erkeklerde hem de kadınlarda birinci sırada yer almaktadır(10). Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin %31’i, kadınlarda %22’si akciğer kanserine bağlıdır. Akciğer kanseri diğer en sık görülen üç kanserden (kolon, meme ve prostat kanseri) daha fazla ölüm nedenidir(10).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre akciğer kanseri sıklığı batı ve güney bölgelerimizde en yüksek (Akdeniz 41.0/100.000, Ege ve İç Anadolu 39.5/100.000) Güneydoğu ve Doğu bölgelerimizde en düşük (17.7/100.000 ve 11.7/100.000) değerlerdedir(11). Günümüzde dünyada karşılaşılan en sık kanser türü olan akciğer kanserinin yıllık yeni olgu sayısı bir milyondan fazladır(11). Bu rakam tüm yeni kanser olgularının %12.8’dir ve her yıl %3 artmaktadır (11). Önlenabilir bir hastalık olmasına rağmen gelecekte tüm dünya gibi, ülkemizde de akciğer kanseri epidemisi kaçınılmaz gibi gözükmektedir. Bu nedenle akciğer kanserinin baskın risk faktörü olan sigara tüketiminin ortadan kaldırılması şarttır(11).

Ülkemizde akciğer kanseri erkeklerde %26.3 oranı ile birinci, kadınlarda %4.5 ile sekizinci sırada yer almaktadır(12).

2.1.2 Akciğer Kanserinde Patoloji

Akciğer tümörlerinin histolojik sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2004 yılında yeniden düzenlenmiştir(13).(Tablo 1)

Tablo 1

Skvamöz hücreli karsinom	-Papiller -Berrak hücreli -Küçük hücreli -Bazaloid
Küçük hücreli karsinom	-Kombine küçük hücreli karsinom
Adenokarsinom	-Adenokarsinom, mikst subtip -Asiner adenokarsinom -Papiller adenokarsinom -Bronkoalveoler karsinom -Müsinöz -Nonmüsinöz -Mikst -Müsin salgılayan solid adenokarsinom -Fetal -Kolloid -Müsinöz kistadenokarsinom -Taşlı yüzük adenokarsinom -Berrak hücreli adenokarsinom
Büyük hücreli (BH) karsinom	-BH Nöroendokrin karsinom -BH Kombine nöroendokrin karsinom -Bazaloid karsinom -Lenfoepitelyoma benzeri karsinom -Berrak hücreli karsinom -Rabdoid fenotipinde BH karsinom
Adenoskvamöz karsinom	
Sarkomatoid karsinom	-Pleomorfik karsinom -İğ hücreli karsinom -Dev hücreli karsinom -Karsinosarkom -Pulmoner blastom
Karsinoid tümör	-Tipik karsinoid -Atipik karsinoid

Tükrük bezi tipindeki karsinomlar	-Mukoepidermoid karsinom -Adenoidkistik karsinom -Epitelyal-miyoepitelyal karsinom
Preinvaziv lezyonlar	-Skvamöz hücreli insitu karsinom -Atipik adenomatöz hiperplazi -Diffüz idiyopatik pulmoner -Nöroendokrin hücre hiperplazisi

2.1.2.1. Skvamöz hücreli karsinom (SHK)

Skvamöz hücreli karsinom (SHK) akciğer karsinomları arasında ülkemizde en sık görülen karsinom türüdür(14). Çeşitli serilerde %30–35 oranında saptanır. Erkeklerde sıklıkla. Etiyolojisinde sigara içiminin önemli etkisi vardır(15).Tümör çoğunlukla ana bronş kökenli santral yerleşimlidir. Periferik lokalizasyonlu lezyonlar genellikle nedbe ile birlikte. İn situ lezyon bronş mukozasında kabalaşma şeklinde görülür(16). Bronş içerisine doğru polipoid tarzda gelişme, yüzeyde ülserasyon görülebilir. Sitolojik olarak bol intrasellüler keratin, iyi gelişmiş desmosomlar, intrasitoplazmik tonofilament demetleri görülür(16). Akciğerin skuamöz hücreli karsinomları, diğer karsinom tipleri ile karşılaştırıldığında toraks ile sınırlı kalma eğilimindedir ve uzak organ metastazları diğerlerine göre daha nadirdir. Ancak metastaz yaptığında prognozu kötüdür(17).

2.1.2.2. Adenokarsinom(ADK)

KHDAK'nin %25 ini oluşturur. Sigara içimi ile daha az bağlantılı tümör tipidir. Olguların 3/4'ü periferik yerleşimlidir, nadiren santralde yer alırlar(18). Periferik olanlar plevrayı çeker, kalınlaştırır ve invaze edebilir(18). Bu makroskopik olarak malign mezotelyoma ile karışmaya yol açabilir. Adenokarsinomlar papiller,bronkoalveolar (BAK), münin içeren solid, karışık,asiner adenokarsinomlar olarak alt gruplara ayrılır(18).

Tümörde değişik düzeylerde glandüler diferansiyasyon görülür. Papiller yapılar, psammom cisimcikleri görülebilir(16). Tümör hücrelerinin nükleolusları belirgin, vesi-

küler nukleuslu, geniş soluk ya da eosinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Müsin damlaları içerebilir(16). En önemli özellik, gerçek lümen oluşumudur. İnter veya intrasellüler boşluklar, iyi gelişmiş dezmosomal bağlantılar mevcuttur. Sitoplazmada tonofilament demetleri vardır(16).

Adenokarsinomların en önemli tanısal özelliği müsin üretimi yapan bez yapısını içermeleridir(18). Müsin içermesi kötü prognoz göstergesidir. Akciğer adenokarsinomları en sık karaciğer, adrenaller, kemik ve merkezi sinir sistemine metastaz yapar(18).

2.1.2.3. Büyük Hücreli Karsinom(BHK)

KHDAK'nin yaklaşık %10nu büyük hücreli karsinom (BHK) oluşturur. BHKlar hücrel herhangi bir farklılaşma göstermediği için indifferansiye karsinom olarak da adlandırılır(18). Kötü diferansiye bir tümör, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK), SHK veya ADK belirleyici özelliklerin hiçbirine uymuyorsa BHK olarak sınıflandırılabilir. Genellikle periferik yerleşimlidir(18).

2.1.2.4 Küçük Hücreli Karsinom (KHAK)

Çoğunlukla büyük bronşlardan kaynaklanır ve %25 oranında görülür. Genellikle bronş duvarını infiltre ederek lümeni daraltırlar(16). Erken safhada mediastinal ve hilar lenf bezlerine metastaz yaptıklarından, tanı anında nadiren lokalizedirler(16). Sitolojik olarak dar sitoplazmalı, organelden fakir hücrelerdir(16). İnce sitoplazmik uzantıları mevcuttur(16). Sitoplazmada nöroendokrin salgı özelliği bulunan yoğun granüller görülür. Bu nedenle bronş mukozasında normal olarak bulunan Kulchitsky hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir(16).

2.1.3. Akciğer Kanserinde Evreleme

American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre le Cancer tarafından uluslararası akciğer evreleme sisteminde T faktörlerinin belirlenmesi yeniden revize edilmiştir(Tablo 2).

AJCC 7. TNM evrelemesine göre bölgesel lenf bezi sınıflaması Tablo 3'e görülmektedir.

Tablo 2 : AJCC 7. TNM Evreleme Sistemi

T: Primer tümör
Tx: Primer tümör değerlendirilemedi ya da balgam sitolojisinde veya bronşiyal lavajda malign hücreler tespit edildi ancak görüntüleme yöntemleriyle veya bronkoskopi ile gösterilemedi.
T0: Primer tümöre ait bir bulgu yok.
T1: Tümörün en büyük çapı 3cm veya daha küçük, akciğer veya visseral plevrayla çevrilmiş, bronkoskopiye lobler bronştan daha proksimale ulaşmamış (ana bronşta tümör yok). T1a: Tümörün en büyük çapı 2cm veya daha küçük T1b: Tümörün en büyük çapı 2cm'den daha büyük fakat 3cm'e eşit veya daha küçük
T2: Tümörün en büyük çapı 3cm'den büyük fakat 7cm'den daha büyük değil; veya tümör aşağıdaki durumlardan birine sahip <ul style="list-style-type: none">• Karinadan 2cm veya daha uzak noktada ana bronş tutulmuş• Visseral plevra invazyonu var• Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni T2a: Tümörün en büyük çapı 3cm'den daha büyük fakat 5cm'e eşit veya daha küçük T2b: Tümörün en büyük çapı 5cm'den daha büyük fakat 7cm'e eşit veya daha küçük
T3: Tümörün çapı 7cm'den büyük veya aşağıdaki durumlardan birine sahip <ul style="list-style-type: none">• Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikard invazyonu• Tümör ana bronşta karinayı tutmadan 2cm'den daha yakın mesafede• Akciğerin tamamını kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni• Tümörle aynı lobta satellit nodül
T4: Aşağıdaki yapıları invaze eden herhangi bir büyüklükteki tümör <ul style="list-style-type: none">• Mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra gövdesi, karina• Primer tümörle aynı akciğerde fakat ayrı lobta satellit nodül.
N: Bölgesel lenf nodları
Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1: Ipsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler ve intrapulmoner lenf nodlarında metastaz
N2: Ipsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarında metastaz
N3: Kontralateral mediastinal ve/veya hiler, ipsilateral ve/veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf nodlarında metastaz
M: Uzak metastaz
M0: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz var M1a: Kontralateral akciğerde metastatik nodül; malign plevral veya perikardial effüzyon veya plevrada tümör nodülleri M1b: Uzak organ metastazı

Tablo 3 : Bölgesel Lenf Bezi Sınıflaması

Superior Mediastinal Lenf Nodları		
İstasyon 1	Alt servikal, supraklavikular ve sternal çentik lenf nodları	Üst Zon
İstasyon 2	Üst paratrakeal lenf nodları	
İstasyon 3	Prevasküler ve retrotrakeal lenf nodları	
İstasyon 4	Alt paratrakeal lenf nodları	
Aortik lenf nodları		
İstasyon 5	Subaortik (Aortikopulmoner pencere) lenf nodları	Aortikopulmoner Zon
İstasyon 6	Paraaortik lenf nodları (Asendan aorta veya frenik)	
İnferior Mediastinal Lenf Nodları		
İstasyon 7	Subkarinal lenf nodları	Subkarinal Zon
İstasyon 8	Paraözefajial lenf nodları	Alt Zon
İstasyon 9	Pulmoner ligaman lenf nodları	
N1 lenf nodları		
İstasyon 10	Hiler lenf nodları	Hiler Zon
İstasyon 11	İnterlobar lenf nodları	
İstasyon 12	Lobar lenf nodları	Periferel Zon
İstasyon 13	Segmental lenf nodları	
İstasyon 14	Subsegmental lenf nodları	

7. Evrelemede T, N ve M faktörlerine göre evreler Tablo 4’de görülmektedir

Tablo 4. AJCC 7. Yeni TNM Evrelemesine göre evreler:

T/M	Subgroup	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
	T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T2	T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
	T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
T3	T3 _{>7}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 _{Inv}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 _{Satell}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
T4	T4 _{Inv}	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
	T4 _{Ipsi Nod}	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
M1	M1a _{Contra Nod}	IV	IV	IV	IV
	M1a _{Pl Disem}	IV	IV	IV	IV
	M1b	IV	IV	IV	IV

2.1.4 Epidermal büyüme faktör reseptörü

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü, proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen sinyallerin iletim yollarını kontrol eden hücre yüzey reseptörü tirozin kinazların ErbB ailesinin bir parçasıdır(19).

Bu transmembran reseptörler hücre yüzeyinde monomerler olarak varlıklarını sürdürürler. Bu reseptörler hücre üstündeki bir protein (“ligand” olarak adlandırılır) bağlandığında aktive olur(20). EGFR için bilinen ligandlar epidermal büyüme faktörü “EGF”, epiregulin ve transforme edici büyüme faktörü alfa’dır(20). Normal, dinlenme halindeki EGFR, “bloke” bir durumdadır: dimerize olamaz, çünkü reseptörün hücre dışı kısmında yerleşik dimerizasyon kolları o şekilde katlanmıştır olduğundan molekülün yüzeyinde görünmez(20).

Ligand bağlanma uyum için gerekli değişiklikleri harekete geçirir; molekülün hücre dışı kısmı açılır ve dimerizasyon kolları açığa çıkar, böylece dimerizasyon gerçekleşir(20). Homodimerizasyon, EGFR'nin bir başka EGFR ile bir araya gelmesidir(20). Bir başka bağlanan molekül örneği daha (örneğin Her2 ya da Her3) devreye girerse, bu sürece heterodimerizasyon denir. "Dimerizasyon" reseptörün "aktivasyon" u anlamına gelir(20).

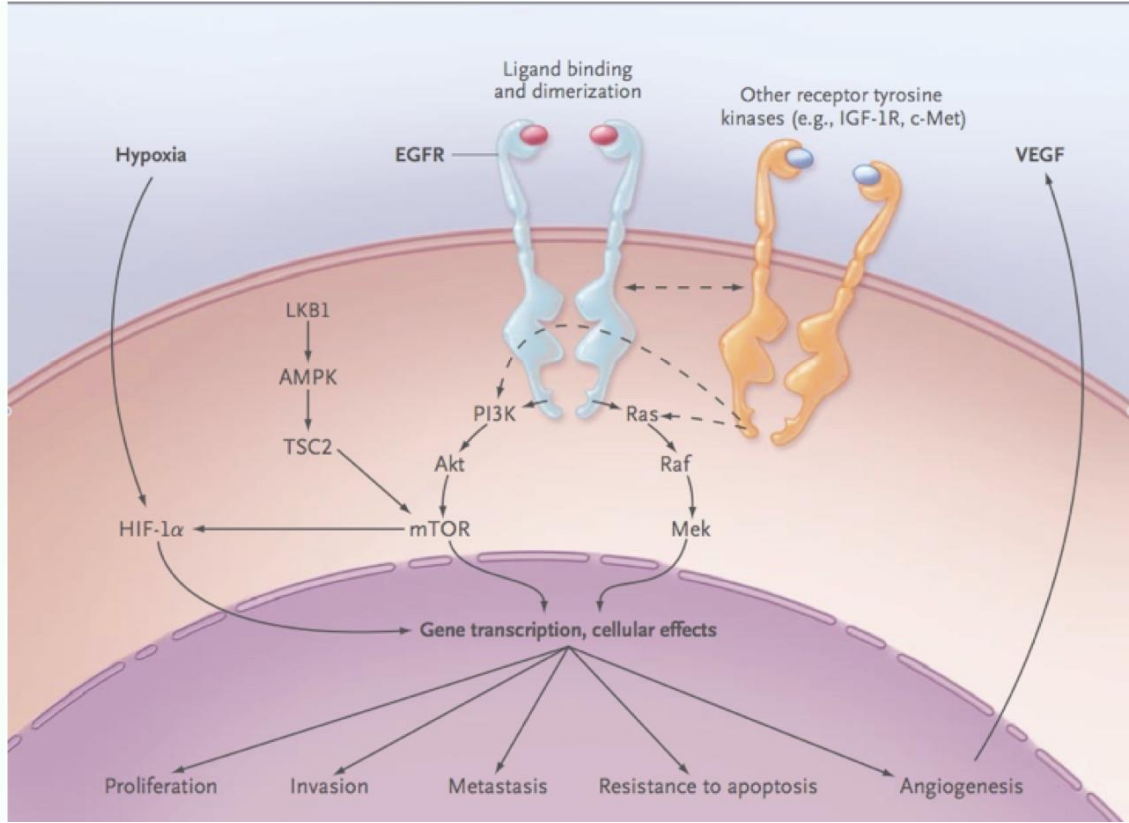
Aktif durum, ATP'den bir fosfat grubunun reseptörün sitoplazmik kuyruğuna, özellikle, bu kuyruktaki tirozin kalıntılarına, transfer olabilmesi anlamına gelir(tirozin transfosforilasyon)(20). Reseptörün aktivasyonu, reseptörün ATP bağlayan yarığın dimerizasyon süreciyle kendini açması, böylece ATP'nin reseptöre girebilmesi ve kinazın fosfat transfer etmesine izin verilmesi anlamına gelir(20).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü'nü engellemenin bir yolu, ATP bağlayan yarığa girmek için ATP ile yarışan küçük bir moleküler molekül yaratmaktır. Bu yolla, reseptörün kinaz aktivitesi bloke edilir(20). Tirozin kinaz inhibitörleri' (TKI'ler) gefitinib ve erlotinib, böylece aktiviteyi bloke eder (21).

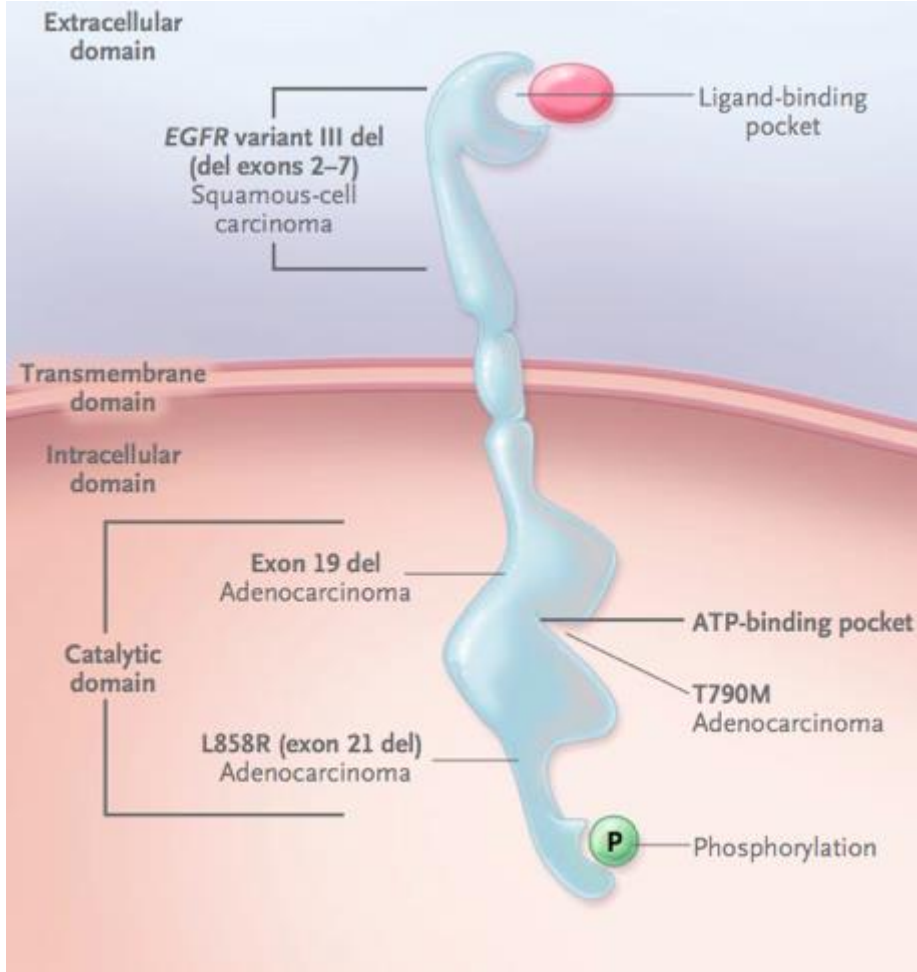
Seçilmemiş küçük hücreli dışı akciğer kanserli (NSCLC) hastaların bu TKI'lerle tedavisi hayal kırıklığı yaratan sonuçlar vermişti(20). Bununla birlikte, bir alt grup hasta tedaviye mükemmel cevap verdi. 2004 yılında bu cevap veren hastaların, kinazın ATP bağlayan bölgesi içinde ya da yakınında lokalize, aktive eden mutasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir(20).

Epidermal büyüme faktör reseptör ekspresyonunun akciğer, kolon, böbrek, baş boyun kanserleri gibi bazı kanser türlerinde arttığı ve ekspresyon artışının malign hücrelerin proliferasyonunu hızlandırdığı, apoptozdan kaçışa, hücre göçü ve angiogeneze sebep olduğu bildirilmiştir(4,21) (Şekil 1)

Şekil 1: EGFR molekülü ve hücre içi sinyal sistemi



Şekil 2: En sık görülen EGFR mutasyonları, ekzon 19 del ve L858R (ekzon 21 del)



EGFR'deki somatik mutasyonlar sıklıkla adenokarsinomlarda kanserlerde tespit edilmektedir(22).Son zamanlarda yapılan çalışmalarda EGFR tirozin kinaz dizini 18,19,20,21 ekzonlardaki mutasyonların küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarının %10-15'inde görüldüğü bildirilmiştir(22).

Bu mutasyonların farklı ülkelerdeki hastalarda, hem bireylerin genetik haplotiplerine hem de o ülkede akciğer kanserine en sık neden olan etkene (örneğin;sigara) bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Ülkemizde ise, akciğer tümörlerinde EGFR reseptörünün hangi ekzonunda daha çok mutasyon olduğu henüz ortaya koyulamamıştır.

Tirozin kinaz inhibitör duyarlılığı ve direncinin biyolojik mekanizmasını açıklamaya çalışan pek çok araştırma yapılmıştır(22). Çeşitli çalışmalarda EGFR gen mutasyonlarının özellikle ekzon 19'daki delesyonların ve bu ekzona olan eklenmelerin (ing; 'insertion') sigara içmeyen bireylerde tirozin kinaz inhibisyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (22).

Bu duyarlı mutasyonların başlıcaları 19.ekzon delesyonu (Del 19), 21.ekzonun L858R değişimi 18.ekzondaki bazı değişimler olarak sayılabilir(23).

Şekil 3. Akciğer adenokarsinomunda EGFR mutasyonları

AA	688	728	729	761	762	823	824	875
	Exon 18		Exon 19		Exon 20		Exon 21	
Mutations (%)*	G719A (0.77)		All deletions (46%)		T790M (4.1)*		L858R (37.5)	
	G719S (0.47)		E746_A750 (39.4)		S768I ((0.55)		L861Q (1.12)	
	G719C (0.26)		L747_P753>S (1.4)		All insertions (1.45)			
	All others (0.91)		L747_A750>P (0.81)		V769_D770insASV (.14)			
			L747_T751 (.96)		D770_N771insSVD (.11)			
			E746_S752>V (.49)					
			L747_S752 (.44)					
			E746_751 (.29)					
			All insertions (0.20)					

EGFR gen mutasyonlarının, tümörü tamamen çıkarılan akciğer kanserli hastalarda sağkalımı belirleyici bir faktör olabileceği (24) ve ameliyat sonrasında uygulanacak adjuvan kemoterapinin tümör dokusunda saptanan EGFR mutasyonuna göre belirlenmesi gerektiğine dair yayınlar (24,25) ve hatta bu konuda, dünyadaki en yaygın kanser tedavi rehber belirleme kuruluşu olan National Comprehensive Cancer Network (NCCN)'in çıkardığı rehber bulunmaktadır.(26) Bu nedenle, tümör dokusunda EGFR gen mutasyonunu belirlemek, hastaların ameliyat sonrası seyir ve tedavilerini belirlemede rehber olabilecektir(26).

EGFR'nin serum düzeylerinin ölçülebilir ve tespit edilebilir olmasına bağlı olarak bazı çalışmalarda böbrek, akciğer, mide gibi çeşitli kanser tiplerinin agresif türlerinde serum EGFR miktarının değiştiği bilgisine ulaşılmıştır(27,28).617 küçük hücre dışı

akciğer kanseri olgusundaki tümör örnekleri incelendiğinde %21 EGFR mutasyonuna rastlandı. Bu mutasyonlar büyük oranda sigara içmeyen, doğu Asya kökenli adenokarsinom olgularına aitti(29). Bizim de çalışmamıza dahil ettiğimiz EGFR mutasyonları araştırılan 35 olgunun büyük çoğunluğunda tümör histopatolojisinin adenokarsinom olduğu görülmektedir.

EGFR Tirozin kinaz inhibitörlerinin hücre proliferasyonunu, hücre göçünü ve matriks metolloproteazların sentezini inhibe ettiği çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir(30). Ancak bu durumlar karşısında EGFR ekspresyonunun önemi ve fonksiyonu henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (31).Bu nedenle EGFR'nin potansiyel klinik öneminin aydınlığa kavuşturulması ve bu süreçler zarfında EGFR'nin verdiği yanıtın tespit edilmesi amacıyla EGFR ekspresyon düzeylerinin immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi gerekliliği kanısına varılmıştır(31).

Duyarlı EGFR mutasyonu olan ve TKI tedavisi altında bulunan beyaz ve Asya ırkına mensup metastatik akciğer kanseri hastalarında sırasıyla ortalama progresyonsuz sağkalım erlotinib için 9.7-13.1 ay iken, gefitinib için 9.2-10.8 ay olarak bildirilmiştir(32,33). Bu nedenle birçok çalışmada tümör örneğinin EGFR durumunun belirlenmesi ve bu hastalarda oral TKI başlanmasını tavsiye edilmektedir (32,33).

Kanserde risk belirleme parametrelerinden biri olabileceği düşünülen gen mutasyonu çalışmaları pek çok yaygın kanser tipleri üzerinde yürütülmektedir. Ayrıca, EGFR mutasyonlarının opere edilerek tüm patolojik piyesin elde edildiği hastalarda, evreleme ile ilişkisi, ameliyat sonrası kullanılan adjuvan tedavinin etkinliğini belirlemedeki rolü ve prognostik önemi tam olarak anlaşılamamıştır..

Yukarıda da özetlendiği gibi, küçük hücre dışı akciğer kanseri tanısı almış EGFR mutasyonu saptanan hastalarda hedefe yönelik tedavilerin kullanılarak sağkalımın artırıldığına dair pek çok çalışma mevcuttur.Bu çalışmaların ışığında kliniğimizde opere olan akciğer kanseri hastalarında onkolojik tedaviye cevabı ve sağkalımı artırmaya yönelik mutasyon analizlerini yapmayı amaçladık.

3.HASTALAR VE YÖNTEMLER

Kliniğimizde Eylül 2001 ile Haziran 2013 arasında opere edilen toplam 387 hasta bulunmaktadır. Bu hastaların yaş ortalaması 59.9+-9.608 idi. Hastaların 324 (%83.8)'ü erkek, 63 (%16.2)'sı kadın idi. Preoperatif solunum kapasitesine göre zprlu ekspiratuar hacmin ilk saniyedeki değeri (FEV1) değeri minimum 1050 ml maksimum 4180 ml (ortalama 2318 ml) arasında değişmekteydi. Hastalara uygulanan cerrahi işlemlere bakıldığında 254 hastaya(%65.6), lobektomi, 90 hastaya (%23.3) pnömonektomi, 15 hastaya (%3.9) bilobektomi, 3 hastaya (%0.8) sleeve rezeksiyon ve 25 hastaya(%6.2) diğer rezeksiyonlar uygulandı. Postoperatif histopatolojilerine göre 169 hasta (%43.8) skuamöz hücreli karsinom, 127 hasta (%32.8) adenokarsinom, 12 hasta (%2.6) büyük hücreli karsinom ve 79 hasta(%20.8) diğer hücre tiplerine göre rapor edildi.

Birinci kontrol grubu olarak, herhangi bir patolojik bulgusu, benign ya da selim tümörü ve tercihen ailesinde tümör hikayesi olmayan 48 sağlıklı birey ile Haziran 2010 ile Haziran 2013 tarihleri arasında kliniğimize başvurmuş, küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı koyulmuş ve opere edilmiş 36 hasta çalışmaya dahil edildi. Bir hastanın peroperatif dönemde inoperabl olması nedeniyle çalışmaya dahil edilmeyerek kalan 35 hasta irdelendi. Hastaların 29'u (%82.9) erkek, 6'sı (%17.1) kadın idi. Yaş ortalaması 60.1 idi (41-79 yaş arası). Kan ve doku örnekleri İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim dalı tarafından çalışıldı. Akciğer kanseri dışındaki diğer maligneteleri içeren örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Cinsiyet,yaş, alınan örneğin yeri örnek tipi ve histolojisi gibi bilgiler içeren bir form bu örneklerle beraber gönderildi.

3.1.Kontrol ve hasta seçiminde izlenen kriterler:

Kontrol Grubu: Herhangi bir patolojik bulgusu, daha önceden bilinen benign ya da selim tümörü, tercihen ailesinde tümör hikayesi olmayan bireyler kontrol grubuna alındı.

.Akciğer Kanserli hasta grubu:

Radyolojik ve histopatolojik tanı ile tümör varlığı ortaya konmuş olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Bu hastalarda mediastinal lenf düğümü tutulumunu ortaya koymak için uygulanan mediastinoskopinin sonucu, yapılan ameliyat, çıkan materyalin patolojik incelemesi sonucu ortaya konan tümörün 7. evreleme sistemine göre son evresi (pTNM), patolojik incelemelerde bulunan tümörün grade'i, vasküler, lenfatik ve perinöral tutulum gibi parametreler kaydedildi.

İlgili gen varyasyonlarının saptanması için ilk kademedede aşağıda belirlenen klinik kriterlere dayanılarak 35 akciğer kanserli hasta grubu çalışmaya dahil edildi. Çalışmada akciğer hasta grubunun serumdaki EGFR düzeylerine de bakıldı ve sEGFR düzeyleri, 48 sağlıklı bireylerin sEGFR düzeyi ile karşılaştırıldı. Bireylere ait doku örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı, serum örneklerinde ise epidermal büyüme faktör reseptör düzeyi tayini yapıldı.

3.2.DNA saflık tayini:

DNA örnekleri Tris-EDTA içerisinde 1/100 oranında sulandırılır. 260 nm’de DNA’nın ve 280 nm’de Ribonükleik asit (RNA) ve proteinin vermiş olduğu absorbans Tris-Etilendiamin tetraasetik asit (Tris-EDTA) ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü. İkiyüzaltmış nm’de okunan absorbans/280nm’de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı. O.D.260/ O.D.280 oranı 1,7-1,8 olarak okunan DNA’lar saf olarak kabul edildi.

3.3.Mutasyonların Analizi :

Öncelikle hasta kanından ve tümörden elde edilen örneklerden DNA’sı izole edildi. DNA bir çoğul Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) reaksiyonu ile amplifiye edilen, ilgili test için PCR primerleri ve protokolleri önceden hazırlandı. Amplifikasyon şartları maksimum özgüllüğün ve hassasiyetin sağlanması için optimizasyon yapıldı. Cihazdan alınan PCR ürünleri INFINITI cihazına alındı, cihaza çipler tanıtılarak cihazın otomatik olarak verdiği mutasyon sonuçları alındı.

Tümör dokusundaki EGFR geninin 18 ila 21. ekzonları arasında yapılacak incelemeler sonucunda elde edilen sonuçlar kaydedildi. Aynı zamanda kanser hastalarına ve sağlıklı kontrollerden alınan kanların serumları ayrıldı ve ELISA yöntemiyle EGFR düzeylerine bakıldı.

Hastaların, ameliyattan sonra gelişen morbiditeleri ile takip edilecek hastalarda 1 yıl boyunca gelişmesi muhtemel nüks, metastaz ve komplikasyonlar ile, adjuvan kemo-terapi alıp almadıkları kaydedildi. Ayrıca, hastaların çıkarılan piyeslerinden patolojik inceleme sonucu ortaya konmuş klinik-patolojik evreleri (pTNM) ile , damar invazyonu, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, tümörün grade’ı gibi tüm histopatolojik parametreler de analiz amacı ile kaydedildi.

3.4.Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatiksel Yöntemler:

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SSPS 15.0 paket programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p=0.05$ olarak alındı.

Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarının değerlendirilmesinde, anatomik (TNM) ve patolojik ve immünohistokimyasal parametreler ile gen mutasyonları arasındaki muhtemel bağıntılar için Ki kare testi kullanıldı. ELISA sonuçları Mann-Whitney U testi ile incelendi. Yukarıda bahsedilen parametreler ile sağkalım arasındaki bağıntılar ise, orta ve uzun dönemde takip edilen hastaların bu takip parametreleri ve 'Kaplan-Meier' testi ile bulunan sağkalımlara etkisi tek parametrelili test olarak 'log-rank' testi kullanıldı.

4.BULGULAR

Kliniğimizde Eylül 2011 ile Haziran 2013 arasında opere edilen toplam 387 hasta bulunmaktadır. Bu hastaların yaş ortalaması 59.9 ± 9.6 idi. Hastaların %83'ü erkek, %16'sı kadın idi. Preoperatif solunum kapasitesine göre FEV1 değeri minimum 1050 ml maksimum 4180 ml (ortalama 2318 ml) arasında değişmekteydi. Hastalara uygulanan cerrahi işlemlere bakıldığında 254 hastaya (%65.6), lobektomi, 90 hastaya (%23.3) pnömonektomi, 15 hastaya (%3.9) bilobektomi, 3 hastaya (%0.8) sleeve rezeksiyon ve 25 hastaya(%6.2) diğer rezeksiyonlar uygulandı. Postoperatif histopatolojilerine göre 169 hasta (%43.8) skuamöz hücreli karsinom, 127 hasta (%32.8) adenokarsinom, 12 hasta (%2.6) büyük hücreli karsinom ve 79 hasta (%20.8) diğer hücre tiplerine göre rapor edildi.

Şubat 2011 ile Temmuz 2013 arasında opere edilen 36 olgu çalışmaya alındı. Bütün hastalara rezeksiyon öncesinde mediastinal lenf nodu örnekleme için mediastinoskopi uygulandı. Rezeksiyon aşamasına geçildiğinde bir olgu (%2.8) operasyon sırasında birden çok istasyonda mediastinal lenf nodu metastazı (multipl N2) saptanması nedeni ile inoperabl olarak değerlendirildi, diğer tüm olgulara lobektomi, bilobektomi veya pnömonektomi işlemlerinden biri uygulandı.

Çalışmaya alınan hastaların ve kontrol grubunun cinsiyeleri, yaş ortalaması aşağıda verilmiştir (Tablo 5). Olguların 29'u erkek (%82.9), 6'sı kadın (%17.1) idi. Ortalama yaşı 60.1 (41-79) idi. Her iki grup, cinsiyet ve yaş açısından eşit olarak dağılım göstermektedir ($p > 0.05$).

Tablo 5. Çalışma Gruplarına ait Veriler ;

	Hasta sayısı	Yüzde (%)
Hasta		
Erkek	29	82,9
Kadın	6	17,1
Kontrol		
Kadın	40	83,3
Erkek	8	16,7
Yaş Ortalaması (yıl)		
Hasta	60,1 (41-79)	
Kontrol	55,6 (34-83)	

Hastaların akciğer tümörlerinin histopatolojik dağılımı Tablo 6 da gösterilmektedir. En sık görülen histoloji %55.6 ile adenokarsinom idi. Bunun ardından %27.8 ile skuamöz hücreli karsinom gelmekte idi.

Tablo 6. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarına ait tümör histolojik tipleri

Histolojik Tip	Frekans	Yüzde (%)
Adenokarsinom	20	55,6
Skuamöz hücreli karsinom	10	27,8
Pleomorfik karsinom	2	5,6
Büyük hücreli karsinom	1	2,8
Nöroendokrin karsinom	1	2,8
Sarkomatoid karsinom	1	2,8
Altıtip belirtilemeyen	1	2,8

Hastaların postoperatif dönemde T evrelemesine göre; 4 hasta (%11.4) T1A, 9 hasta (%25.7) T1B, 4 hasta (%11.4) T2A, 6 hasta (%17.1) T2B, 10 hasta (%28.6) T3 olarak evrelendirildi(Tablo7).

Tablo 7. Postoperatif Cerrahi Patolojik T Evrelemesi (pT)

T Faktörü	Hasta sayısı	Yüzde
0	2	5,7
1A	4	11,4
1B	9	25,7
2A	4	11,4
2B	6	17,1
3	10	28,6
Total	35	100,0

Postoperatif N evrelemesine göre 20 hasta (%57.2) N0, 12 hasta (%34.3) N1, 3 hasta (%8.5) N2 olarak evrelendirildi(Tablo8).

Tablo 8. N evresine göre hastalar (pN)

Parametre	Hasta sayısı	Yüzde
N0	20	57,2
N1	12	34,3
N2	3	8.5
Total	35	100,0

Perinöral İnvazyon:

Toplamda 35 hastanın postoperatif patoloji sonuçları incelendiğinde 21 hastada (%60) perinöral invazyon mevcut iken, 13 hastada (%37.1) perinöral invazyon izlenmedi (Tablo 9).

Tablo 9. Perinöral invazyon durumuna göre olgular

Parametre	Hasta sayısı	Yüzde
Perinöral invazyon yok	13	37,1
Perinöral invazyon var	21	60,0
Total	34	97,1
Bakılmayan	1	2,9
Total	35	100,0

Lenfatik inazyon:

Lenfatik invazyon bakımından değerlendirildiğinde 29 hastada(%82.9) lenfatik invazyon saptanırken, 5 hastada (%14.3) saptanmadı (Tablo 10).

Tablo 10. Lenfatik invazyon durumuna gore olgular

Parametre	Hasta sayısı	Yüzde
Lenfatik invazyon yok	5	14,3
Lenfatik invazyon var	29	82,9
Total	34	97,1
Bakılmayan	1	2,9
Total	35	100,0

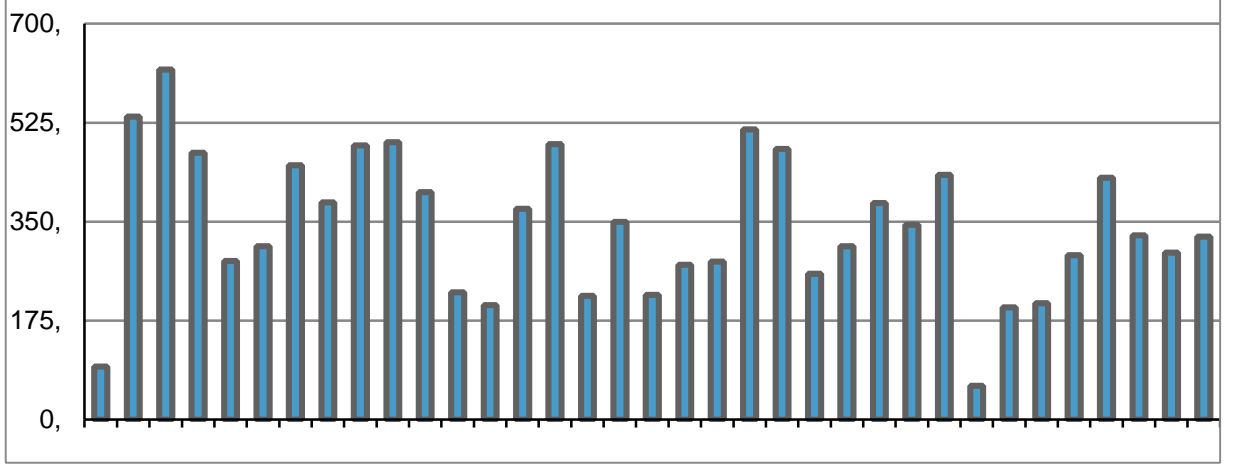
Vasküler İnvazyon:

Vasküler invazyon bakımından değerlendirildiğinde 24 hastada (%68.6) vasküler invazyon izlenirken, 10 hastada(%28.6) vasküler invazyon izlenmedi (Tablo 11)

Tablo11. Tümördeki vasküler invazyon durumuna göre olgular

Parametre	Hasta sayısı	Yüzde
Vasküler İnvazyon var	10	28,6
Vasküler invazyon yok	24	68,6
Total	34	97,1
Bakılmayan	1	2,9
Total	35	100,0

Şekil 4. Serum EGFR düzeylerinin hastalara göre dağılımı



Serum EGFR konsantrasyonunun ortalama $341,5 \pm 125,4$ pg/ml olduğu görülmektedir. Minimum konsantrasyon 93.7 pg/ml iken maksimum saptanan değer 619 pg/ml'dir. Şekil 4'de hastaların serumlarında saptanan EGFR düzeyleri grafik olarak gösterilmektedir.

Yaptığımız çalışma sonucunda küçük hücreli dışı akciğer kanseri tümör dokularında, EGFR geninin 19-20 ve 21. Ekzonlarında aminoasit değişimlerine neden olabilen önemli mutasyonlar belirlendi. 21 örneğin 6'sına ait olmak üzere her üç ekzonda 10 farklı mutasyon bölgesinde toplam 17 mutasyon saptandı (Tablo 12 ve Tablo 13).

Tablo 12. Olgular ve Saptanan Mutasyonlar;

Olgular	Mutasyon	Aminoasit Değişimi 1	Aminoasit Değişimi 2
Olgu 1	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 2	2237-MT(19.ekzon)	Glu746Thr751delinsVal	E746_T751>V
		Glu746Thr751delinsValAla	E746_T751>VA

		Glu746Ser752delinsVal	E746_S752>V
	2303-MT (20.ekzon)	Met766_Ala767insAlle	M766_A767insAl
		Ser768lle	S768I
	2320-MA (20.ekzon)	Asn771_His773dupAsnProHis	N771_H773insNPH
		Val774Met	V774M
Olgu 3	Mutasyon saptan- madı	-	
Olgu 4	2375-MC (20.ekzon)	Leu792Pro	L792P
	2237-MT(19.ekzon)	Glu746_Thr751delinsVal	E746_T751>V
		Glu746_Thr751delinsValAla	E746_T751>VA
		Glu746_Ser752delinsVal	E746_S752>V
	2303-MT(20.ekzon)	Met766_Ala767insAlle	M766_A767insAl
Ser768lle		S768I	
Olgu 5	Mutasyon saptan- madı	-	
Olgu 6	2237-MT(19.ekzon)	Glu746Thr751delinsVal	E746_T751>V
		Glu746Thr751delinsValAla	E746_T751>VA
		Glu746Ser752delinsVal	E746_S752>V
	2303-MT(20.ekzon)	Met766_Ala767insAlle	M766_A767insAl
		Ser768lle	S768I
Olgu 7	Mutasyon saptan- madı	-	

Olgu 8	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 9	2237-MT (19.ekzon)	Glu746_Thr751delinsVal	E746_T751>V
		Glu746_Thr751delinsValAla	E746_T751>VA
		Glu746_Ser752delinsVal	E746_S752>V
	2291-MT (20.ekzon)	Glu762insGluAlaPheGln	E762insEAFQ
	2303-MT(20.ekzon)	Met766_Ala767insAlle	M766_A767insAl
		Ser768lle	S768I
	2305-MA (20.ekzon)	Val769Met	V769M
	2309-MC(20.ekzon)	Asp770insAlaSerVal	D770insASR
		Ala767_Val769dupAlaSerVal	A767_V769insASV
	2320-MA (20.ekzon)	Asn771_His773dupAsnProHis	N771_H773insNPH
		Val774Met	V774M
2582-MG (Ekson 21)	Leu861Arg	L861R	
Olgu 10	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 11	Mutasyon saptanmadı	-	

Olgu 12	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 13	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 14	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 15	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 16	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 17	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 18	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 19	2582-MA (21.ekzon)	Leu861Gln	L861Q
Olgu 20	Mutasyon saptanmadı	-	
Olgu 21	2375-MC (20.ekzon)	Leu792Pro	L792P

Olguların tümör örneklerinde yukarıda da görüldüğü gibi 20. Ekzona ait olduğu görülen 11 mutasyon (%64.7) saptandı.

Ondokuzuncu ekzona ait tek bir mutasyon tipi saptandı. 2237-MT (E746 T751>V, E746 T751VA, E746 S752>V) bölgesinde 4 örnekte (%23.5) mutasyon saptanırken 17 örnekte hiçbir mutasyon saptanamadı.

Beş örnekte (%23.8) 20. Ekzonun 7 farklı bölgesinde mutasyonlar saptandı. Örneklerin birinde 20. Ekzona ait 5 bölgede mutasyon saptadık ve bu mutasyonlar-

dan ikisi sırasıyla Leu792Pro ve Va1769Met aminoasit değişimine neden olan 2375-MC (L792P) ve 2305- MA (V769M) bölgelerinde idi.

21. ekzonun ise 2582-MG (L861R) ve 2582-MA (L861Q) bölgelerinde sırasıyla Leu861Arg ve Leu861Gln aminoasit değişimine neden olan 2 mutasyon (%11.7) tespit edildi.

Mutasyonlar dökümente edildiğinde 19.ekzon'da mutasyon bulunan 4 örnek (%19 olduğu) 20. Ekzonda 5 bölgede mutasyonu olan 1 örnek (%4.8) 2 bölgede mutasyonu olan 2 örnek (%4.8) ve 1 bölgede mutasyonu olan 3 örnek(%14.3) olduğu, 21. Ekzonda ise 1 bölgede mutasyonu olan 2 örnek (%9.5) olduğu gözlemlendi.

İrdelenen 19,20 ve 21. Ekzonlarda saptanan mutasyon sayısına göre olguların dökümü Tablo 13'te verilmektedir.

Tablo 13: Tüm Hastalarda İzlenen Mutasyonlar :

		MUTASYON BÖLGELERİNE GÖRE ÖRNEK SAYISI				
Ekson	Toplam Mutasyon sayısı	1 Bölgede Mutasyon Bulunan	2 Bölgede Mutasyon Bulunan	3 Bölgede Mutasyon Bulunan	4 Bölgede Mutasyon Bulunan	5 Bölgede Mutasyon Bulunan
EGFR 19.ekzon Mutasyonları	4	4	-	-	-	-
EGFR 20.ekzon Mutasyonları	11	2	2	-	-	1
EGFR 21.ekzon Mutasyonları	2	2	-	-	-	-

Tümör dokusu alınan hastaların aynı zamanda serum EGFR düzeylerinin ortalama $341,5 \pm 125,4$ pg/ml olduğu, sağlıklı kontrollerin serum EGFR düzeyinin ise ortalama $574,9 \pm 126,0$ pg/ml olduğu saptandı bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. (Tablo 14; $p < 0,001$).

Tablo 14. Hasta ve Kontrol grubuna ait Serum EGFR düzeyleri ;

Hasta/Kontrol Grup	(N)	Ortalama Değer Standart Sapma	p değeri*
Hasta Grubu	36 %42,9	$341,5 \pm 125,4$ pg/ml	$p < 0,001$ *
Kontrol Grubu	48 %57,1	$574,9 \pm 126,0$ pg/ml	

Herhangi bir EGFR mutasyonu saptanması ile hastaların sigara içimi ya da cinsiyet arasında bir bağıntı bulunamadı (Tablo 15; sırası ile $p = 0,864$ ve $p = 0,763$). Ayrıca, hastaların tümörlerinde saptanan mutasyonlar ile serum EGFR düzeyleri arasında anlamlı bir bağıntı bulunamadı (Tablo 16: $p = 0,74$)

Tablo 15. Hasta Özellikleri ve Adenokarsinomlu hastalardaki EGFR Mutasyonları Arasındaki İlişki ;

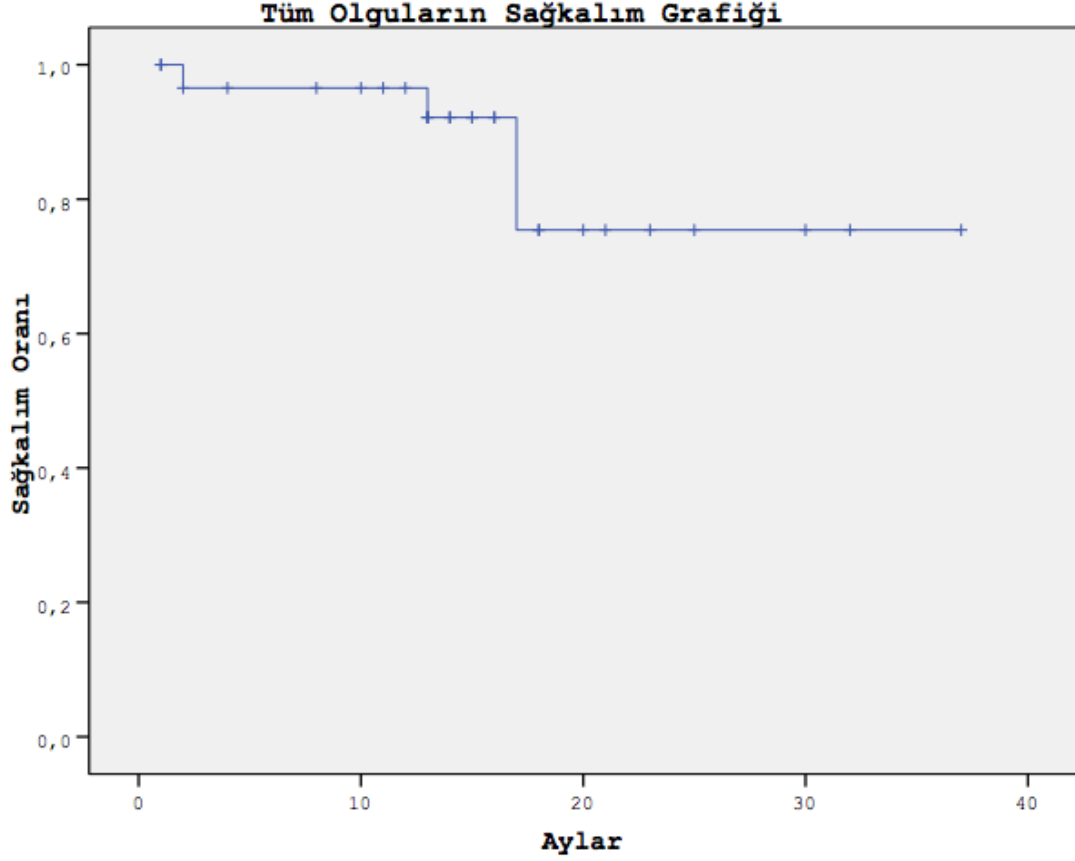
	EGFR mutasyonu olan hasta sayısı	Mutasyon olmayan hastalar	P değeri
Sigara İçen	5	12	0.864
Sigara İçmeyen	1	3	
Kadın	1	1	0.763
Erkek	4	12	

Tablo 16 : EGFR Mutasyonu Saptanan ve Saptanmayan Hastalarda serum EGFR Düzeyleri ;

Mutasyonu olanlarda EGFR düzeyi (Ortalama pg/ml ± SS)	Mutasyonu olmayanlarda EGFR Düzeyi (Ortalama pg/ml± SS)	T testi p değeri
328.2 ± 145.3	353.2 ± 160.3	0.74

Tüm olguların (35 hasta) Kaplan-Meier yöntemi ile saptanan sağkalımları Şekil 5'te görülmektedir.

Şekil 5. Tüm olguların sağkalımı

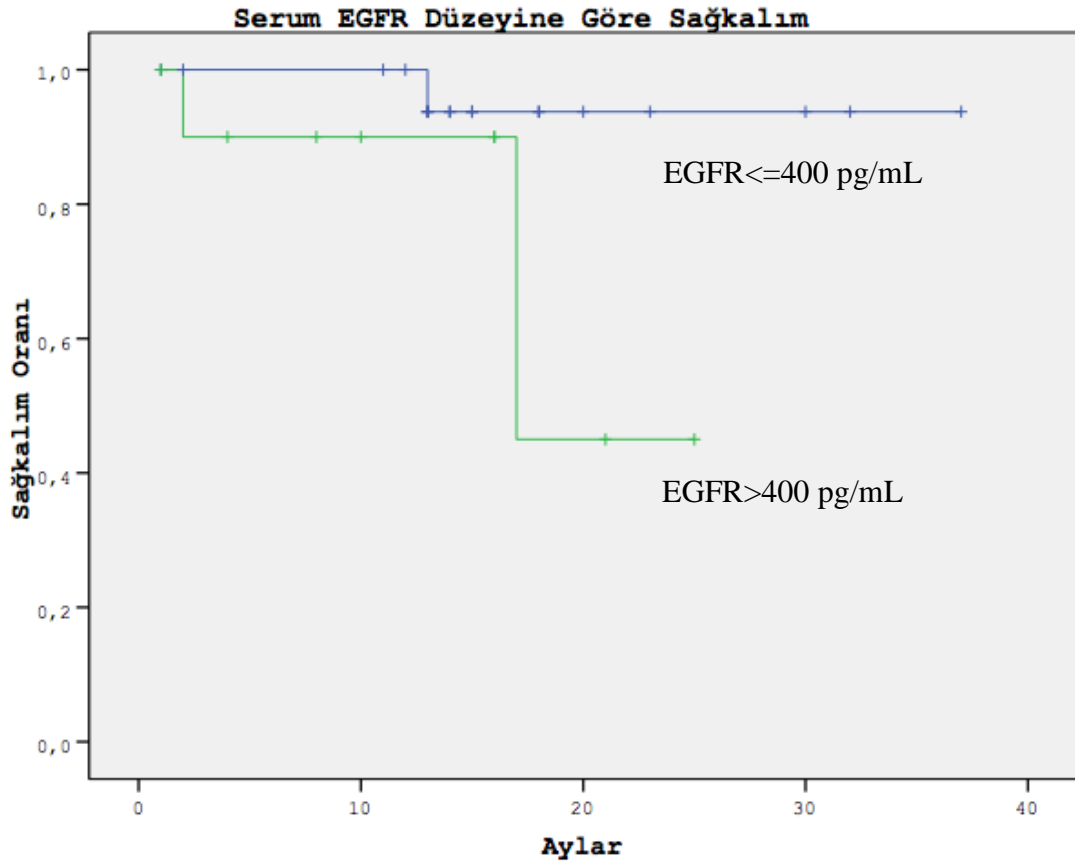


Yüksek (> 400 pg/ml) ve düşük EGFR düzeyli (<=400 pg/ml) olgularda sağkalım:

Serum EGFR düzeylerine göre 3 yıllık sağkalımın %45 olduğu görüldü. Ortanca sağkalım süresi 19 ay olarak bulundu(%95 güvenlik aralığı 14-24 ay)

Düşük EGFR 400 pg/ml olan olgularda ortanca sağkalım süresi 23 ay (%95 güvenlik aralığı 18-29 ay) bulunurken, yüksek EGFR 400 pg/ml düzeyinde sağkalımın 17 ay (%95 güvenlik aralığı 6-29 ay) olduğu görüldü.

Şekil 6: Düşük ve yüksek EGFR düzeyli olgularda sağkalım:



5.TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, EGFR düzeyinin ve EGFR mutasyonlarının akciğer kanserinde önemli bir belirteç olabileceği düşünülebilir. Ancak, çalışmamızda, EGFR mutasyonu ile serum EGFR düzeyleri arasında anlamlı bir bağlantı saptayamadık.

Günümüzde KHDAK'lerde, özellikle de adenokarsinomlarda hedefe yönelik tedavi rejimleri uygulanmaya başlanmıştır. Son 10 yılda akciğer kanserlerinin moleküler patogenezi ile ilgili önemli gelişmeler olmuş ve bu durum yeni tedavi seçeneklerini ortaya çıkarmıştır. 617 küçük hücre dışı akciğer kanseri olgusundaki tümör örnekleri incelendiğinde %21 EGFR mutasyonuna rastlandı. Bu mutasyonlar büyük oranda sigara içmeyen, doğu Asya kökenli adenokarsinom olgularına aitti(29). Akciğer kanserlerinin en sık görülen morfolojik tipi olan adenokarsinomlarda epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) geninde çeşitli somatik mutasyonların tespit edilmesi ile tirozin kinaz inhibitörleri tedavide kullanılmaya başlamıştır(34).

Tüm dünyada EGFR mutasyonu Kuzey Amerika ve Avrupa'da %10-15, Afrika-Amerika'da %19 ve Doğu Asya'da %30 oranında bildirilmiştir(24,25). İleri evre küçük hücre dışı akciğer kanserinin hedefe yönelik ajanlarla tedavisinden önce standart kemo-terapi rejimiyle ortalama sağkalım yaklaşık 10 ay olarak verilmektedir(26).Hedefe yönelik ajanlar olarak geliştirilen gefitinib ve erlotinib EGFRnin tirozin kinaz bölgesini inhibitörleridir(27,28). EGFRde meydana gelen somatik mutasyonların gefitinib ve erlotinib tedavisine cevapta yakın ilişkili olduğu izlenmiştir (30,31).

Tirozin kinaz inhibitörlerine (TKİ) yanıt veren hastaların yaklaşık %80'inde mutasyon saptanır iken, dirençli hastaların hemen hemen hiçbirinde mutasyon saptanmamıştır(34). Bu durum hedefe yönelik tedavi için uygun hastaları belirlemede EGFR mutasyonunun varlığının gösterilmesini gerekli kılmaktadır(34).Akciğer adenokarsinomlarında EGFR geninde en sık rastlanan mutasyonlar ekzon 19'daki kısa delesyonlar ve ekzon 21'de 858. kodondaki lösin aminoasiti yerine arjinin geçmesine neden olan nokta mutasyonudur. Bu mutasyonlar somatik mutasyonlar olduğundan, varlığının araştırılabilmesi için tümör dokusu gereklidir(34).

Peng ve ark yapmış olduğu çalışmada; birden fazla EGFR mutasyonu olan hastalarda tirozin kinaz inhibitörlerinin etkisi araştırılmıştır(35). 686 skuamöz hücreli olmayan akciğer kanseri hastasında 443 EGFR mutasyonu izlenmiş,bunlardan 421'i single mutasyon olarak belirlenmiştir(35). En sık mutasyon görülen lokalizasyon 19.ekzon

(%38) olarak bulunmuştur. Diğer mutasyonlar sırasıyla 18. Ekzonda 10 (%2.4), 20. Ekzonda 114 (%27.0) ve 21. Ekzonda 135 (%32.0) olarak bulunmuştur(35). Bu mutasyonlardan 22 hastada (%5.0) kompleks EGFR mutasyonu saptanmış, kompleks mutasyon saptanan hastalardan 20 vakada hücre tipinin adenokarsinom olduğu belirtilmiş ve bunlardan 5 vakanın ağır sigara içicisi olduğu izlenmiştir. L858R veya 19. Ekzon delesyonu olarak saptanan kompleks mutasyonlar EGFR-tirozin kinaz inhibitörleri tedavisine daha yüksek cevap geliştirmiş ve bu hasta grubunda prognoz daha iyi seyrettiği gösterilmiştir(35).

Souquet ve ark yapmış olduğu çalışmada 753 hastadan 792 örnek incelendi. Örneklerin %80inin adenokarsinoma olduğu görülmüştür(6). 124 örnekte (%15.7) toplam 133 mutasyon saptanmıştır. Beklendiği üzere mutasyonlar sigara içicisi olmayan (%60) ve kadının (%63) hastalarda daha sıktır(6). Bu mutasyonların büyük çoğunluğunun 19. Ekzonda (%47.3) ve 21.ekzonda(%24.8) olduğu izlenmiştir(6) .L858R(%30.1) ve 19. Ekzonda delesyon (%61.2) en sık görülmektedir. Altı hastada 18.ekzonda 10 (%7.5) mutasyon saptanmıştır(6). Bu çalışmada EGFR mutasyonu saptanan 121 hastadan 85'i tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilmiştir(6). Erlotinib (%43.5) ve gefitinib (%55.3) kullanılmıştır. Progresyonsuz sağkalım açısından bakıldığında tedavi edici molekül tipi bakımından(erlotinib için 13 ay veya gefitinib için 10 ay) anlamlı fark bulunmamıştır(6). Toplam progresyonsuz sağkalımın 13 ay olduğu görülmüştür. 19. ve 21. Ekzondaki mutasyonlar irdelendiğinde ortalama progresyonsuz sağkalım açısından fark bulunmamıştır. Ancak 18.ekzonda mutasyonu bulunan hastalarda sağkalımın daha kötü olduğu izlenmiştir(6).

Noronha ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada 111 küçük hücre dışı akciğer kanseri hastası ele alınmış, 39 hastada EGFR mutasyonu tespit edilmiştir(36). Bu hastaların 35'inde sigara öyküsü bulunmaz iken, 27 hastanın kadın olduğu belirtilmektedir. 39 akciğer kanser hastasında bulunan mutasyonların 19'u(%74) 19.ekzona ait çerçeve kayması mutasyonları, 18'i (%23) 21.ekzona ait L858R, 1'i (%2.5) ise 18.ekzona ait G719C nokta mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir(36). EGFR mutasyonu olan hastalarda progresyonsuz sağkalım EGFR (-) olan hastalarla kıyaslandığında anlamlı derecede uzun olarak bulunmuştur(36). Buna göre çalışmanın yapıldığı Hint toplumunda EGFR mutasyonu olan hastalarda, EGFR hedefine yönelik tedavilerle progresyonsuz sağkalım, toplam sağkalım ve cevap oranı daha iyi olarak kaydedilmiştir(36).

19.ekzon delesyonu ve 21.ekzondaki mutasyonlar en sık karşılaşılan EGFR mutasyonlarıdır.Literatüre göre;batı toplumlarında(Amerika ve Avrupa); 19.ekzondaki çerçeve kayması %45-54, 21.ekzondaki L858R %40, 20.ekzondaki diğer mutasyonlar %4-9 oranında görülmektedir(33). Bu durumda EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine yüksek cevap beklenmektedir. Won ve ark. gefitinib veya erlotinib tedavisi alan 19.ekzon delesyonu veya L858R mutasyonuna sahip 87 hastayı incelemişlerdir(37). Buna göre tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavi edilen 19.ekzon delesyonu olan ileri evre akciğer kanseri hastalarında progresyonsuz sağkalımın L858R mutasyonu olanlara kıyasla daha uzun olduğu bildirilmiştir(37).Benzer bir çalışmada Jackman ve ark tirozin kinaz inhibitörü tedavisi alan 36 küçük hücre dışı akciğer kanseri hastasında en sık mutasyon tipinin exon 19daki çerçeve kayması olduğu (22 hasta,%61) bildirilmiştir(38). 21.ekzondaki L858R nokta mutasyonu 10 hastada (%28) izlenmiştir(38).Çalışmaya göre 19.ekzon delesyonu olanların L858R mutasyonu olanlara göre daha uzun sağkalımının bulunduğu gösterilmiştir(38).Zhang ve ark da bir metaanaliz çalışmasına göre aynı sonuçlara ulaşmıştır(39). Bizim çalışmamızda da mutasyonlar sırayla en sık 20. ve 19.ekzondarda saptanmıştır. Bu açıdan hastalarımızda saptanan mutasyonlar, literatür ile karşılaştırıldığında, batı toplumlarındaki mutasyonlara benzemektedir.

IPASS çalışmasında tirozin kinaz inhibitörleri ile yapılan ilk basamak tedavisi sonrasında 19. Ekzonda delesyon ve 21. ekzonda L858R mutasyonu izlenen hastalarda progresyonsuz sağkalımda önemli bir değişiklik saptanmamıştır(40). Ancak toplam cevap oranına bakıldığında 19. ekzon delesyonu olan grupta %84.8 iken, L858R mutasyonu olan grupta %60.9 olması nedeniyle ilacın 19. Ekzonda delesyon olan grupta daha iyi etki oluşturduğu söylenebilir(40).

Martinez-Navarro ve ark 69 hastanın 8'inde (%11.6) EGFR mutasyonu saptadılar(41). Hücre tipine bakıldığında 7'sinin adenokarsinom, 1'inin bronkoalveolar karsinom olduğu görülmüştür. Hastaların 5'i kadın, 3'ü erkek idi. Saptanan mutasyonların 7'si ekzon 19da birinin ekzon 21de L858R mutasyonu olduğu belirtilmiştir(41). Mutasyon saptanan bütün hastalar tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavi edilmiştir. Bu hastalarda ortalama sağkalımın 39.5 ay olduğu görülmüştür. (%95 CI 22-57) (41).

Biz hastalarımızı primer tedavi olarak tedavi ettiğimiz için, bugün EGFR mutasyonu olan hastalarda ilk seri tedavi olarak uygulanması kabul edilen bu ilaçları kullanmadık. Ancak, irdelediğimiz, ve tümöründe EGFR mutasyonu/delesyonu saptadığı-

mız olgularda ileride gelişebilecek olan tekrarlama ve/veya metastazlarda bu ilaçların kullanımı düşünülebilir.

Doğan ve ark 42 KHDAK'li hastayı EGFR (19. Ekzon delesyonu, 21. Ekzon L858R nokta mutasyonu), KRAS ve braf mutasyon oranlarının yanısıra bunların sağkalım ve tedavi yanıtı ile ilişkisini retrospektif olarak değerlendirmiştir(42). EGFR, KRAS ve BRAF mutasyonları, erlotinib tedavisi, progresyona kadar geçen süre ve toplam sağkalım açısından değerlendirildiğinde mutasyon oranları EGFR 19, ekzon delesyonu için %7.4; KRAS kodon 61 delesyonu için %4.76 ve BRAF V600E mutasyonu için %2,38 olarak saptanmıştır(42). Hiçbirinde EGFR 21.ekzon nokta mutasyonu ve farklı mutasyonların birlikteliği saptanmamıştır(42). Ortanca takip süresi 26 ay (5-83) olup erlotinib alanlarda 43 ay (23-83), diğerlerinde ise 23 ay (5-61)saptanmıştır. On (23.8%) hasta erlotinib almış, Erlotinib alanlarla almayanlar arasında sağkalım farkı saptanmıştır (28 ± 3 aya karşılık 15 ± 4 ay, $p= 0.05$)(42). Mutasyonu olanlarda progresyona kadar geçen süre ve toplam sağkalım daha uzun bulunmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.119$ ve $p= 0.06$) (42).

Bizim irdelememizde, EGFR mutasyonları ile hasta cinsiyeti ya da sigara içimi arasında bir ilişki saptanamadı. Bizim bulgularımıza ve bazı diğer çalışmalara bakıldığında, cinsiyet ve sigara içimine bakılmaksızın tüm hastalarda EGFR mutasyonunun araştırılmasının gerektiği, böylece, EGFR mutasyonuna yönelik olan ilaçlardan yararlanabilecek tüm hastaların saptanabileceği düşünülebilir.

Yapılan bazı çalışmalarda serum EGFR düzeyinin hasta ve kontroller arasında anlamlı bir farklılık bulunamasa da düşünceler sEGFR düzeyinin lenf nodu metastazı ile ilişkili olabileceği yönündedir. Lewintre ve ark. çalışmasında, 308 ileri evre küçük hücre dışı akciğer kanseri hastası ve 109 sağlıklı kontrol grubunda sEGFR konsantrasyonu çalışılmıştır(43). sEGFR konsantrasyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. skuamöz hücreli karsinomlu veya ilerleyici hastalığı olan hastaların sEGFR düzeyi, adenokarsinomlu hastalarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu ancak bu farkın anlamlı olmadığını bildirmişlerdir(43). Serum EGFR düzeyi hassas fakat spesifik olmayan bir belirteçtir. Serum EGFR düzeyi ile hasta cinsiyeti, tümörün evresi veya tümörün lokalizasyonu gibi klinik özellikler arasında önemli bağlantı bulunamamıştır(43). Çalışmamıza göre düşük serum EGFR düzeyinin ileri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinde azalan sağkalım ile ilişkili olduğu yönündedir. Bu bulgular serum EGFR kon-

santrasyonunun değerli prognostik bilgiler verebileceğini göstermektedir. Ancak çalışmamız serum çözünmüş EGFR düzeyinin prognostik önemini opere edilmiş olgularda gösteren ilk çalışmadır. Yüksek EGFR düzeyinin neden daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu bilinmemektedir. Yüksek EGFR düzeyi, tümör hücrelerinde daha iyi bir diferansiyasyonu gösteriyor, tümör apoptozis engellenmesi, angiogenez, metastaz, proliferasyon gibi süreçler ile doğrudan ilgisi olan EGFR'nin daha az mutasyonu ile dolayısı ile bu süreçlerin daha az işlemesi ile yüksek EGFR düzeyi arasında bir ilişki bulunuyor olabilir. Çalışmamızda yaptığımız analizde hastalarda mutasyon bulunup bulunmamasının sağkalımı etkilemediğini gösterdik. Ancak, başka çalışmalarda mutasyon ile sağkalım arasında fark olduğu bildirilmiştir (36-37). Bu durum, çalışmamızdaki olgu sayısının görece azlığına bağlı olabilir. EGFR'den başka son yıllarda araştırılan ve var olan mutasyonlu hücrelerde etkisini gösteren antitümör ilaçların yapıldığı moleküller de bulunmaktadır. Bunların başlıcaları, ALK, MET, ROS, FGFR ve DDR2'dir. DDR2 mutasyonları akciğer skuamöz hücreli karsinomların %4'ünde izlenmektedir ve kinaz inhibitörü dasatinibe hassastır(44).

ALK(anaplastik lenfoma kinaz) bir tirozin kinaz reseptörüdür. ALK'ı hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri ALK pozitif küçük hücre dışı akciğer kanseri olgularında kullanılmaktadır(45). ALK'nın insandaki ligandı bilinmemektedir, Enzim ilk olarak anaplastik büyük hücreli lenfomada t (2;5) (p23;q35) kromozom translokasyondan kaynaklanan kimerik bir protein olarak bulunmuştur. 2007'de küçük hücre dışı akciğer kanserinde farklı bir ALK translokasyonu bulundu(46). Kromozomda yerleşik ALK'nin bir parçası, inversionuyla aynı gende yerleşik bir başka genin parçasıyla birleşir. Bu gen EML-4 genidir. ALK geninin tirozin kinaz-kodlayan domain'i EML-4 geninin dimerizasyon domain kodu taşıyan parçasıyla birleşir(20). Böylece, bir tirozin kinaz domain'i bir de dimerizasyon domain'i içeren yeni bir "füzyon" protein üretilir. Bu yeni genin transkripti gerçekleşir gerçekleşmez dimerizasyon meydana gelir ve yeni protein aktive olur(20). EML4-ALK füzyon geni akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %3-5'inde tespit edilmiştir(20) Zhang ve ark 103 khdak hastasında yapmış olduğu çalışmaya göre 12 tümörde EML4-ALK füzyon genine rastladı. Buna göre EML4-ALK adenokarsinom olgularında %16.1, sigara içmeyen olgularda %19.2 ve EGFR/KRAS mutasyonu bulunmayan adenokarsinom hastalarında %42.8 oranında görüldü(47).

EGFR mutasyonları ve ALK yeniden düzenlemeleri dışında MET, ROS, FGFR ve DDR2 gibi diğer onkogenler bu alanda önemli rolü olduğu belirtilmiştir. Yakın gelecek-

te küçük hücre dışı akciğer kanserli bir çok hastanın tümör genotipleme ile belirlenmiş kendi spesifik tedavisi olacağı öngörülebilir.

Çalışmamızda, sağkalım analizimiz için gerekli olan takiplere devam edilmektedir. En az 1 yıl sonra sağkalım verilerinin elde edilmesi ile bu konuda mümkün olan bağıntı araştırılabilecektir.

Sonuç olarak çalışmamızda, opere edilen akciğer kanserli adenokarsinom hücre tipli olgularımızda yaklaşık %20 oranında EGFR mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonu olan olgular ile olmayan olgularda hasta takiplerinde bir sağkalım farkı bulunamamıştır. Ancak serum EGFR düzeyleri, sağlıklı olgularda hastalara göre, daha yüksek bulunmuştur. İleri çalışmalarda serum veya diğer vücut sıvılarındaki EGFR düzeylerinin tanısında kullanılması düşünülebilir. Bundan başka, serum EGFR düzeyi yüksek (>400 pg/ml olan olguların sağkalımları düşük olan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olması dahi belirgin olarak daha iyi bulunmuştur. Bu çalışmada araştırdığımız konuların daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara ve daha uzun takibe gerek duyulmaktadır.

6. KAYNAKÇA

1. Minna JD, Pass H, Glatstein E, et al. Cancer of the lung. In: Devita VTY, Hellmann S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology* Philadelphia: Lippincott, 1989, 591-705
2. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. *Lung cancer*. *Cancer*. 1995 Jan 1;75(1 Suppl):191-202. PMID 8000996
3. Shields TW: *Surgical Treatment of Non small cell lung cancer* General Thoracic Surgery, Baltimore, Philadelphia, London; Lippincott William and Wilkins, 7. Ed: TW Shields: 2009 Chapter 110, 1391
4. Pao W, Miller VA: Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: Current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*. 2005 23:2556-2568
5. Workman P, Brunton VG, Robins DJ CRC Department of Medical Oncology, University of Glasgow, Bearsden, UK. *Seminars in Cancer Biology* [1992, 3(6):369-381]
6. Myriam Locatelli-Sanchez • Se´bastien Couraud • Dominique Arpin • Robert Riou • Pierre-Paul Bringuier • Pierre-Jean Souquet Routine EGFR Molecular Analysis in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients is Feasible: Exons 18–21 Sequencing Results of 753 Patients and Subsequent Clinical Outcomes; *Lung* (2013) 191:491–49 DOI 10.1007/s00408-013-9482-4
7. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2890-6
8. Ellison G¹, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R.Í; EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples; *J Clin Pathol*. 2013 Feb;66(2):79-89. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201194. Epub 2012 Nov 21.
9. Akciğer kanserinde epidemiyoloji *Toraks Dergisi*; toraksdergisi.org/pdf

10. Jemal A, Thomas Murray T et al. Cancer Statistics, 2002 CA Cancer J Clin 2002, 52:35-47
11. H. Ahu HAYRETDAG, Atila AKKOÇLU Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci 2006;2(12):58-65
12. Kanser Bildirimlerinin Değerlendirilmesi 1993-1994. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, Yayın No:582, Ankara 1997
13. Travis WD, Brambilla E, Muller-Mermelink HK, Harris CC. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Volume 10, IARC Pres, 2004: 1-344.
14. Yaman M. Akciğer Kanseri. In:Erk M. Göğüs Hastalıkları 11. Cilt,Istanbul 2001; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayın No:237,753 805
15. Churg A. Pathology of the Lung. Thurlbeck W M,Tumors of Lung. 1th Ed, New York: Thieme Medical Publishers, 1988: 311-423.
16. Akciğer kanseri ders notları; celalkarlikaya.trakya.edu.tr
17. Sternberg SS. Diagnostic surgical pathology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999;1074-8.
18. Küçük Hücre dışı Akciğer Kanserinde Radyoterapi sonrasında tedavi etkinliğinin PET/BT ile ilişkilendirilmesi; library.cu.edu.tr/tezler/8451.pdf
19. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer2007;7:169-81.
20. Mutations in lung cancer with clinical significance Patrick Pauwels
21. Mendelsohn J, Baselga J: Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. J Clin Oncol. 2003, 21:2787-2799.
22. 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:/2129_39.
23. He M et al (2012) EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitive EGFR mutations in lung adenocarcinoma Clin Cancer Res 18 (6): 1790-1797

24. Lee KH, Min HS, Han SW, Oh DY, Lee SH, Kim DW, Im SA, Chung DH, Kim TY, Kim TY, Heo DS, Bang YJ, Sung SW, Kim JH. Lung Cancer 2007;
25. Yoo SB, Chung JH, Lee HJ, Lee CT, Jheon S, Sung SW. Epidermal growth factor receptor mutation and p53 overexpression during the multistage progression of small adenocarcinoma of the lung. J Thorac Oncol 2010;5:964-969.
26. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Non-Small Cell Lung Cancer.V.2.2010.
27. Sasaki H, Yukive H, Mizuno K, et al. Elevated serum epidermal growth factor receptor levels is correlated with lymph node metastasis in lung cancer. Int J Clin Oncol 2003;8:79–82.
28. Choi JH, Oh JY, Ruy SK, et al. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of gastric carcinoma patients. Cancer 1997;79:1879–83.
29. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T *et al.* Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339–346.
30. Liu Z, Klominek J. Inhibition of proliferation, migration, and matrix metalloprotease production in malignant mesothelioma cells by tyrosine-kinase inhibitors. *Neoplasia* 2004;6:705—12.
31. Lewis F, Jackson P, Lane S, Coast G, Hanby A. Testing for HER 2 in breast cancer. *Histopathology* 2004;45:207—17.
32. Institut National du Cancer (INCA) (2010) Cancer du poumonnon a` petites cellules. Formes localise´es non opé´rables localement avance´es et me´tastatiques. Recommandations & re´fe´rentiels. www.e-cancer.fr. Accessed 30 May 2013
33. Keedy VL et al (2011) American Society of Clinical Oncologyprovisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation testing for patients with advanced non-small cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol* 29(15):2121–2127
34. Zafer Küçükodacı, İsmail Yılmaz, Ufuk Berber, Dilaver Demirel; Küçük hücre dışı akciğer kanserinde mediastinoskopik doku biyopsisi ile ince iğne aspirasyon sitolojisinin kombinasyonunun hedefe yönelik tedaviye katkısı; 10.5606/tgkdc.dergisi.2013.7585

35. Liang Peng, Zhi-Gang Song & Shun-Chang Jiao Efficacy analysis of tyrosine kinase inhibitors on rare non-small cell lung cancer patients harboring complex EGFR mutations; *Scientific Reports*; Article number 6104
36. Vanita Noronha, Kumar Prabhaskar, Abhishek Thavamani, Anuradha Chougule, Nilendu Purandare, Amit Joshi, Rashmi Sharma, Saral Desai, Nirmla Jambekar, Amit Dutt, Rita Mulherkar; *EGFR Mutations in Indian Lung Cancer Patients: Clinical Correlation and Outcome to EGFR Targeted Therapy*; April 19, 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0061561
37. Won YW¹, Han JY, Lee GK, Park SY, Lim KY, Yoon KA, Yun T, Kim HT, Lee JS.; Comparison of clinical outcome of patients with non-small-cell lung cancer harbouring epidermal growth factor receptor exon 19 or exon 21 mutations; *J Clin Pathol.* 2011 Nov;64(11):947-52. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200169. Epub 2011 Jul 1.
38. Jackman DM¹, Yeap BY, Sequist LV, Lindeman N, Holmes AJ, Joshi VA, Bell DW, Huberman MS, Halmos B, Rabin MS, Haber DA, Lynch TJ, Meyerson M, Johnson BE, Jänne PA.; Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib; *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 1;12(13):3908-14.
39. Yaxiong Zhang, Jin Sheng, Shiyang Kang, Wenfeng Fang, Yue Yan, Zhihuang Hu, Shaodong Hong, Xuan Wu, Tao Qin, Wenhua Liang, Li Zhang; Patients with Exon 19 Deletion Were Associated with Longer Progression-Free Survival Compared to Those with L858R Mutation after First-Line EGFR-TKIs for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis; September 15, 2011 DOI: 10.1371/journal.pone.0107161
40. Fukuoka M. *et al.* Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J. Clin. Oncol.* 29, 2866–2874 (2011)
41. Martínez-Navarro EM¹, Rebollo J, González-Manzano R, Sureda M, Evgenyeva E, Valenzuela B, Fernández FJ, Forteza J, Brugarolas A. Clin Transl Oncol. ,Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in a series of non-

small-cell lung cancer (NSCLC) patients and response rate to EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors (TKIs), 2011 Nov;13(11):812-8. doi: 10.1007/s12094-011-0739-1.

42. Mutlu DOGAN¹, Ahmet DEMIRKAZIK¹, Ajlan TUKUN^{2,3}, Serpil D. SAK⁴, Koray CEYHAN⁴, Bulent YALCIN¹, Hakan AKBULUT¹, Fikri ICLİ¹ Türkiye’de İleri Evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Sık Görülen EGFR, BRAF, KRAS Mutasyonlarının Tedaviye Yanıt ve Prognozla İlişkisi; International Journal of Hematology and Oncology; 2014, Vol 24, Num 3 Page(s): 001-010
43. Jantus-Lewintre E¹, Sirera R, Cabrera A, Blasco A, Caballero C, Iranzo V, Rosell R, Camps C., Analysis of the prognostic value of soluble epidermal growth factor receptor plasma concentration in advanced non-small-cell lung cancer patients, Clin Lung Cancer. 2011 Sep;12(5):320-7. doi:10.1016/j.clcc.2011.03.031. Epub 2011 May 11.
44. Hammerman PS¹, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, Brace LE, Woods BA, Lin W, Zhang J, Deng X, Lim SM, Heynck S, Peifer M, Simard JR, Lawrence MS, Onofrio RC, Salvesen HB, Seidel D, Zander T, Heuckmann JM, Soltermann A, Moch H, Koker M, Leenders F, Gabler F, Querings S, Ansén S, Brambilla E, Brambilla C, Lorimier P, Brustugun OT, Helland A, Petersen I, Clement JH, Groen H, Timens W, Sietsma H, Stoelben E, Wolf J, Beer DG, Tsao MS, Hanna M, Hatton C, Eck MJ, Janne PA, Johnson BE, Winckler W, Greulich H, Bass AJ, Cho J, Rauh D, Gray NS, Wong KK, Haura EB, Thomas RK, Meyerson M.; Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer; Cancer Discov. 2011 Jun;1(1):78-89. doi: 10.1158/2159-8274.CD-11-0005.
45. Hallberg B & Palmer RH (2011) ALK and NSCLC:targeted therapy with ALK inhibitors. F1000 Med Rep 3, 21. doi: 10.3410/M3-21.
46. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in NSCLC. Nature 2007;448:561-6
47. Xuchao Zhang^{1,2}, Shirley Zhang², Xuening Yang^{1,2}, Jinji Yang^{1,2}, Qing Zhou^{1,2}, Lucy Yin², Shejuan An^{1,2}, Jiaying Lin^{1,2}, Shiliang Chen^{1,2}, Zhi Xie^{1,2}, Mike Zhu², Xiaolin Zhang² and Yi-long Wu^{1,2*}, Fusion

of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression, *Molecular Cancer* 2010, 9:188 doi:10.1186/1476-4598-9-188

ÖZET

Giriş: Akciğer kanseri kansere bağlı ölümlerin önemli bir nedenidir. EGFR gen mutasyonları, hücre proliferasyonuna, apoptoz inhibisyonuna ve metastaza neden olabilecek aktivasyonlara yol açabilirler. EGFR mutasyon görüntüleme testi, akciğer kanseri teşhisinde anahtar rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı EGFR geninin 19,20,21, ekzonlarındaki mutasyonlar, serum EGFR seviyeleri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi belirlemektir.

Hastalar ve Yöntemler: Şubat 2011 ile Temmuz 2013 arasında opere edilen 35 olgu çalışmaya alındı. Olguların 29'u erkek (%82.9), 6'sı kadın (%17.1) idi. Ortalama yaşı 60.1 (41-79) idi. . Bütün hastalara rezeksiyon öncesinde mediastinal lenf nodu örnekleme için mediastinoskopi uygulandı. Yapılan rezeksiyonlara bakıldığında 30 hastaya (%85.7) lobektomi, 4 hastaya (%114.4) pnömonektomi ve 1 hastaya (%2.9) bilp-bektomi uygulandı. En sık görülen postoperatif tümör histopatolojisi %55.6 ile adenokarsinom idi. EGFR genindeki 19,20,21. Ekzondaki mutasyonlar mikroarray yöntemiyle analiz edildi. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastaları ve kontrollerde aynı zamanda EGFR serum seviyeleri ELISA testi kullanılarak belirlendi.

Bulgular: Çalışmamızda 19,20,21. Ekzondaki aminoasit değişimine neden olabilecek önemli mutasyonlar taranmıştır. Her 3 ekzona ait 10 farklı mutasyonik bölgede toplam 17 mutasyon saptandı. Bunlardan biri 19. Ekzona ait (2237-MT) E746- T751>V, E746-T751VA, E746-S752>V bölgesindeydi. Örneklerin birinde 20. Ekzona ait 5 farklı bölgede mutasyon saptandı. 21. Ekzonda ise Leu 861 Gln ve Leu 861 Arg aminoasit değişimine neden olan 2 mutasyon saptandı. Çalışmamızda EGFR mutasyonu olan olgular ile olmayan olgularda hasta takiplerinde bir sağkalım farkı bulunamamıştır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerin serum EGFR ortalama düzeyleri sırasıyla 341,49±125,41 pg/ml ve 574,9±125,96 pg/ml olduğu saptanmış, aradaki bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. $p < 0,001$. Düşük EGFR (<400 pg/ml) olan olgularda ortalama sağkalım süresi 23 ay (%95 güvenlik aralığı 18-29 ay) bulunurken, yüksek EGFR (>400 pg/ml) düzeyinde sağkalımın 17 ay (%95 güvenlik aralığı 6-29 ay) olduğu görüldü ($p=0.07$).

Sonuç: Sonuç olarak çalışmamızda, opere edilen akciğer kanserli adenokarsinom hücre tipli olgularımızda yaklaşık %20 oranında EGFR mutasyonu saptanmıştır. EGFR mutasyonu olan olgular ile olmayan olgularda hasta takiplerinde bir sağkalım farkı bulunamamıştır. EGFR düzeylerinin akciğer kanserli olgulardaki sağka-

lımlara etkisinin tam olarak koyulabilmesi için ileri çalışmalara ve daha uzun takibe gerek bulunmaktadır.

SUMMARY

Lung cancer is an important cause of cancer mortality. Mutations of the EGFR gene may cause constitutive activation leading to cell proliferation and the inhibition of apoptosis and metastases. Screening for EGFR mutation plays a key role for managements of lung cancer cases. The aim of our study is to determine a possible relationship between EGFR gene mutations in exon 19,20,21, serum EGFR levels and non small cell lung cancer.

Methods: Our study includes 35 patients; 29 (%82.9) male and 6 (%17.1) female with non small cell lung cancer who underwent surgical resection between February 2011 and July 2013. Mean age of the patients was 60.1(41-79) Mediastinoscopy was performed to all patients prior to the resection. Lobectomy, pneumonectomy and bilobectomy were performed to 30(%85.7), 4(%11.4) and 1 (%2.9) patients respectively. The most common tumour histopathology was adenocarcinoma(%55.6). EGFR gene mutations were analyzed for exon 19,20 and 21 by direct sequencing. In addition, serum EGFR levels were determined by ELISA in non small cell lung cancer patients and control

Results: In our research exon 19,20 and 21 aminoacid substitutions that could cause significant mutations were detected. At exon 19,20 and 21, totally 17 mutations were detected in 10 different regions. One of these mutations were (2237-MT) E746-T751>V, E746-T751VA, E746-S752>V on exon 19. In one sample 5 different regions of exon 20 mutations were detected. On exon 21 two mutations that cause aminoacid changes were detected which includes Leu 861 Gln ve Leu 861 Arg. In our study there was no significant difference in survival rates between the cases who have EGFR mutations or who have not. Serum EGFR average levels of non small cell lung cancer patients and healthy control groups were calculated respectively as, 341,49±125,41 pg/ml ve 574,9±125,96 pg/ml and the difference was found statistically significant ($p<0,001$). According to the EGFR levels survival rate at 3 years was %45 and mean survival time is 19 (%95 confidence interval 14-29 months) and 23 (%95 confidence interval 18-29 months) month in patients with serum EGFR levels higher and lower than 400 pg/ml respectively. The patients who have high serum EGFR levels (>400 pg/ml) have better survival time than the one who have low EGFR levels although the survival difference was not statistically significant($p=0.07$).

Conclusion: Finally in our study we have found %20 EGFR mutations of the tumours of the patients with adenocarcinoma who underwent resection. There was not a

significant difference on survival time between the patients who had mutations or who had not. Further studies and longer follow up time are needed to determine the definitive role of EGFR mutations and serum EGFR levels on survival.