

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER KANSERİ TANILI
HASTALARA AİT PARAFİN BLOK KESİTLERİNDE *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*,
PIK3CA, *HER2* ve *NRAS* GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Yüksek Lisans Öğrencisi

METİN ÇALIŞKAN

DANIŞMANLAR

Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL

Prof. Dr. Gökay BOZKURT

İZMİR

2015

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER KANSERİ TANILI
HASTALARA AİT PARAFİN BLOK KESİTLERİNDE *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*,
PIK3CA, *HER2* ve *NRAS* GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Yüksek Lisans Öğrencisi

METİN ÇALIŞKAN

DANIŞMANLAR

Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL

Prof. Dr. Gökay BOZKURT

İZMİR

2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Yrd.Doç.Dr. Nur SELVİ GÜNEL
(Danışman)



Üye : Prof.Dr. Gökay BOZKURT
(II. Danışman)



Üye : Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ



Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:13.07.2015.....



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince, en iyi şekilde yetişmemi ve gelişmemi sağlayan, tez çalışmamın planlanmasına ve yürütülmesine sabırla ve özveriyle yardımcı olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım **Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL**'e,

Hayata dair her konuda bilgi, deneyim ve destekleriyle yolumu aydınlatan, her durumda yanımda olduğunu hissettiren, eğitimime ve tezime yaptığı katkılarla en iyi şekilde yetişmemi ve gelişmemi sağlayan değerli hocam **Prof. Dr. GökayBOZKURT**'a

Bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ** ve eğitim sürecimde yeri doldurulamaz katkılar sağlayan öğretim üyeleri **Doç. Dr. Zuhal EROĞLU**, **Doç.Dr. Buket KOSOVA CAN** ve **Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI**'ya,

Tezime yaptıkları değerli katkılardan dolayı ADÜ Tıbbi Onkoloji AD öğretim üyesi **Prof. Dr. Nezih MEYDAN**, ADÜ Tıbbi Patoloji AD öğretim üyesi **Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU**, SDÜ Tıbbi Genetik AD öğretim üyesi **Yrd. Doç. Dr. Serkan KURTGÖZ**'e

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında desteklerini gösteren, yardıma ihtiyacım olduğunda yanımda olan **Dr. Ayşegül DALMIZRAK**, **Arş. Gör. Dr. Duygu AYGÜNEŞ**, **Arş. Gör. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ**, **Arş. Gör. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ**, **Arş. Gör. Dr. Aslı TETİK VARDARLI**, **Arş. Gör. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER** ve **Dr. Çağdaş AKTAN**'a

Yüksek lisans sürecimde karşılaştığım her türlü zorlukta desteğini hissettiğim ekip arkadaşlarım **Buket ÖZEL** ve **Sezgi KIPÇAK**'a gerektiğinde özveriyle yardıma koşan sevgili arkadaşlarım ve meslektaşlarım **Özgün ÖZALP**, **Bakiye GÖKER**, **Çağla KAYABAŞI**, **Zeynep MUTLU**, **Cansu ÇALIŞKAN**, **Besra ÖZMEN YELKEN**, **Tuğçe BALCI**, **Zekeriya DÜZGÜN**'e

Bilgi ve tecrübeleriyle karmaşık sekreteryâ işlemlerinde yardımlarını esirgemeyen **Anıl KARAKAŞ** ve **Murat TUNÇER**'e Yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarım **Yeşim CANÖZLER**, **Aylin ÜSKÜPLÜ** ve **Cansu SEVİM**'e

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

Projemize verdikleri destekten dolayı Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Altkomisyonu'na ve bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği 2015-TIP-051 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir 23.06.2015

METİN ÇALIŞKAN

ÖZET

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tanılı Hastalara Ait Parafin Blok Kesitlerinde *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* ve *NRAS* Gen Mutasyonlarının Araştırılması

Günümüzde kalp damar hastalıklarından sonra en fazla mortaliteye sahip olan hastalık kanserdir. Kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni ise Akciğer kanseridir ve bu kanser tipinin yaklaşık % 85'ini Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) oluşturmaktadır. Akciğer kanserinin sessiz seyretmesi sebebiyle hastaların büyük çoğunluğu ileri evrelerde fark edilebilmektedir. İleri evrelerde cerrahi müdahale seçeneği azaldığı gibi kemoterapi ve radyoterapi başarısı da son derece düşük olmaktadır ve aynı kemoterapotik ilaç uygulanmasına rağmen olguların farklı yanıtlar vermesi klinisyeni tedavi seçenekleri açısından zorlamaktadır. Son yıllarda tümör dokusundaki genetik değişikliklerin tespit edilmesi ve bu değişiklikler sonucu oluşan onkoproteinlere karşı baskılayıcı moleküllerin kullanılmasıyla tedavide ilerlemeler kaydedilmiştir. Olgulardaki genetik değişikliklerin belirlenmesi ve kişiye özel tedavinin oluşturulması son derece önemli hale gelmiştir. Ülkemizde Akciğer kanseri tanı ve tedavisi batı toplumları baz alınarak düzenlenmektedir. Türkiye toplumunda genetik değişikliklerin belirlenmesi, oranlarının saptanması ve korelasyonlarının ortaya konması klinisyene tedavide yol gösterici olacağı gibi tanıda öncelikleri belirleme noktasında önemli katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda KHDAK tanılı hastaların tümör parafin bloklarından alınan kesitlerde *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* ve *NRAS* gen mutasyonlarının, sıklıklarının ve korelasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

KHDAK tanılı hastalara ait parafin blok kesitlerinden “AmoyDx FFPE DNA Kit” ticari kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. AmoyDx ticari mutasyon kitleri kullanılarak Cobas z (Roche) Gerçek Zamanlı PCR cihazında mutasyonlar belirlenmiştir.

KHDAK tanısı almış toplam 80 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Olgularda Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (*EGFR*), Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu (*KRAS*), v-Ras Nöroblastom viral onkogen

homoloğu (*NRAS*), v-Raf Murine sarkoma viral onkogen homoloğu (*BRAF*), Fosfatidil inozitol-3-kinaz katalitik alfa polipertid (*PIK3CA*), İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (*HER2*) mutasyonları bakımından araştırılmıştır. Olguların 37(%46,2) sında en az bir mutasyon saptanmıştır. Sırasıyla *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* ve *NRAS* gen mutasyonları 7(%8,7), 23(%28,7), 1(%1,2), 6(%7,5), 0(%0), 1(%1,2) olarak tespit edilmiştir. *HER2* geninde mutasyon saptanmamıştır ayrıca 1(%1,2) olguda *KRAS* ve *PIK3CA* gen mutasyonu birlikteliği gözlenmiştir. Bu sonuçlar Türkiye toplumunun literatürde belirtilen batı toplumlarında araştırılan mutasyonlar açısından benzer bir mutasyon profiline sahip olduğunu göstermektedir. Sadece *PIK3CA* gen mutasyon oranı literatürde belirtilen değerlerin üzerinde tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, ülkemizde KHDAK tanı ve tedavisinde *PIK3CA* gen mutasyonlarının daha fazla dikkate alınması gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca olguların 43(%53,7) ünde araştırılan mutasyonlara rastlanmamıştır. Bu olgulardaki tümör gelişimini tetikleyen moleküler etkenlerin belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: KHDAK; *EGFR*; *KRAS*; *BRAF*; *PIK3CA*; *HER2*; *NRAS*

ABSTRACT

Determination of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* and *NRAS* Gene Mutations in Paraffin Block Sections from Patients Diagnosed with Non-Small Cell Lung Cancer

Nowadays, cancer is a disease with the highest mortality rate after cardiovascular diseases. The leading cause of cancer deaths is lung cancer and %85 of this type of cancer forms of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). The majority of patients can be detected in advanced stages because of the silent course of lung cancer. In advanced stages surgical intervention options are reduced as well as chemotherapy and radiotherapy fail is extremely low, furthermore cases which gives different answers despite the implementation of same chemotherapeutic drugs is forced the clinician in terms of treatment options. Improvements have been recorded in cancer treatment with the identification of genetic changes in tumor tissue and with the use of repressor molecule against onco-proteins resulting from these changes in recent years. The identification of genetic changes in cases and the generation of special personalized treatment have become extremely important. Diagnosis and treatment of lung cancer in our country are organized on the basis of Western society. Determining of genetic changes, detecting of ratio and revealing the correlations in Turkey's society will guide clinicians in treatment as it would be important in determining the priorities in diagnosis. In our study, we aimed to determine *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* and *NRAS* gene mutations as well as the ratio and correlation of these mutations in sections which were taken from the paraffin blocks of tumor of patients with NSCLC.

DNA was isolated from paraffin block sections of patients with NSCLC by use of commercial "AmoyDx FFPE DNA Kit". Mutations were determined using AmoyDx commercial mutation kit with Cobas z (Roche) Real Time PCR instrument.

Total of 80 patients with a diagnosis of NSCLC were included in this study. Cases were investigated for Epidermal Growth Factor Receptor

(*EGFR*), V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*), neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (*NRAS*), v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (*BRAF*), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (*PIK3CA*), human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) mutations. In 46,2% of patients had at least one mutation. Mutations in *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* ve *NRAS* genes were detected as 7(8,7%), 23(28,7%), 1(1,2%), 6(7,5%), 0(%), 1(1,2%) respectively, but no mutation was found in *HER2* gene. In addition, mutations in *KRAS* and *PIK3CA* genes were determined in 1,2% of cases. These results showed that Turkish people has similarity in terms of mutations in Caucasian people. Only mutations in *PIK3CA* gene were detected over given result. We think that mutations in *PIK3CA* gene must be well considered in diagnosis and treatment of NSCLC. Also, no mutation was found in 43(53,7%) of cases. There is a need to investigate molecular factors in these cases which stimulate tumor development.

Keywords: NSCLC; *EGFR*; *KRAS*; *BRAF*; *PIK3CA*; *HER2*; *NRAS*

İçindekiler

BÖLÜM I	1
1.1 Giriş	1
1.2 Genel Bilgiler	3
1.2.1 Kanser	3
1.2.1.1 Kanserin Gelişim Süreci	5
1.2.1.2 Kanser Hücrelerinin Özellikleri	5
1.2.1.3 Kanser ve Genetik Yapısı	7
1.2.1.3.1 Kanser Oluşumunda Etkili Genler	8
1.2.1.3.1.1 Onkogenler	8
1.2.1.3.1.1.1 Onkogenlerin Aktivasyon Mekanizmaları	9
1.2.1.3.1.1.1.1 Nokta Mutasyonları	9
1.2.1.3.1.1.1.2 Gen Amplifikasyonları	10
1.2.1.3.1.1.1.3 Kromozom Yeniden Düzenlenmeleri	11
1.2.1.3.1.1.2 Onkogen Ürünleri	11
1.2.1.3.1.2 Tümör Supresör Genler	12
1.2.1.3.1.3 Stabilite Genleri (Caretakers)	13
1.2.1.4 Akciğer Kanseri	13
1.2.1.4.1 Epidemiyoloji	13
1.2.1.4.2 Etiyoloji	14
1.2.1.4.3 Klinik Belirtiler	15
1.2.1.4.4 Sınıflandırma	15
1.2.1.4.5 Evreleme	16
1.2.1.4.6 Akciger Kanserinde Genetik Değişiklikler	18
BÖLÜM II	23
2.1 Gereç ve Yöntem	23
2.1.1 Örneklerin hazırlanması	23
2.1.2 DNA izolasyonu	23
2.1.2.1 DNA izolasyon protokolü	24
2.1.2.1.1 Deparafinizasyon	24
2.1.2.1.2 Parafin Kesitten DNA izolasyon Protokolü	24
2.1.3 DNA miktarının belirlenmesi ve kalite kontrolü	25
	V

2.1.4 Real-Time PCR aşaması.....	25
2.1.4.1 Dedekte edilen mutasyonlar	26
2.1.4.2 Mutasyon kit içerikleri.....	27
2.1.4.3 PCR karışımları	29
2.1.4.4 PCR protokolleri.....	32
2.1.4.5 Verilerin analiz yöntemleri.....	32
BÖLÜM III	38
3.1 Bulgular.....	38
BÖLÜM IV	45
4.1 Tartışma.....	45
BÖLÜM V	51
5.1 Sonuç ve Öneriler	51
BÖLÜM VI	53
6.1 Kaynaklar	53
6.2 Özgeçmiş.....	61

Şekiller Listesi

Şekil 1	: Kanserin ayırt edici özellikleri	6
Şekil 2	: Onkogen aktivasyon mekanizmaları	9
Şekil 3	: İnsersiyon-Delesyon-Nokta mutasyonları	10
Şekil 4	: N-MYC amplifikasyonu ve oluşturduğu HSR (FISH)	10
Şekil 5	: t(9;22) Bcr/Abl füzyonu oluşumu	11
Şekil 6	: <i>EGFR</i> gen bölgeleri ve klinikle ilgili mutasyonları	19
Şekil 7	: <i>KRAS</i> ve <i>NRAS</i> genindeki klinikle ilgili mutasyonlar	20
Şekil 8	: <i>BRAF</i> genindeki klinikle ilgili mutasyonlar	20
Şekil 9	: PIK3CA geni domainleri ve klinikle ilgili mutasyonlar	22
Şekil 10	: Mikrotom cihazı	23
Şekil 11	: Eksternal kontrol görüntüsü	35
Şekil 12	: İnternal kontroller (kırmızı) ve negatif kontroller (yeşil)	35
Şekil 13	: Mutasyonu olmayan olgu örneği	36
Şekil 14	: Mutasyonu olan olgu örneği	36
Şekil 15	: Grup çalışma toplu görüntüsü	37
Şekil 16	: Gerçek zamanlı PCR cihazı	37

Tablolar Listesi

Tablo 1: Tütün ürünleri dışında kalan Akciğer kanseri nedenleri.....	14
Tablo 2: Akciğer kanseri belirti ve bulguların görülme sıklığı	15
Tablo 3: T,N ve M değerlerine göre evre gruplandırması	16
Tablo 4: Primer tümör değerlendirmesi	17
Tablo 5: Bölgesel lenf nodu değerlendirmesi	17
Tablo 6: Metastaz durumunun değerlendirilmesi.....	17
Tablo 7: “AmoyDx FFPE DNA Kit” ticari kiti içeriği	24
Tablo 8: <i>EGFR</i> geni için araştırılan mutasyonlar	26
Tablo 9: <i>KRAS</i> geni için araştırılan mutasyonlar	26
Tablo 10: <i>NRAS</i> geni için araştırılan mutasyonlar	26
Tablo 11: <i>BRAF</i> geni için araştırılan mutasyonlar	26
Tablo 12: <i>HER2</i> geni için araştırılan mutasyonlar	26
Tablo 13: <i>PIK3CA</i> geni için araştırılan mutasyonlar	27
Tablo 14: AmoyDx <i>EGFR</i> 29 Mutation Detection Kit içeriği	27
Tablo 15: AmoyDx <i>KRAS</i> Mutation Detection Kit içeriği.....	27
Tablo 16: AmoyDx <i>NRAS</i> Mutation Detection Kit içeriği	28
Tablo 17: AmoyDx <i>BRAF</i> V600 Mutations Detection Kit içeriği.....	28
Tablo 18: AmoyDx <i>HER2</i> Mutation Detection Kit içeriği.....	28
Tablo 19: AmoyDx <i>PIK3CA</i> Five Mutations Detection Kit içeriği	28
Tablo 20: <i>EGFR</i> gen mutasyonları için PCR karışımı	29
Tablo 21: <i>KRAS</i> gen mutasyonları için PCR karışımı	29
Tablo 22: <i>NRAS</i> gen mutasyonları için PCR karışımı	30
Tablo 23: <i>BRAF</i> gen mutasyonları için PCR karışımı.....	30
Tablo 24: <i>HER2</i> gen mutasyonları için PCR karışımı.....	31
Tablo 25: <i>PIK3CA</i> gen mutasyonları için PCR karışımı	31

Tablo 26: <i>EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA</i> genleri PCR protokolü	32
Tablo 27: <i>HER2</i> geni PCR protokolü.....	32
Tablo 28: <i>EGFR</i> geni mutasyon analizi	33
Tablo 29: <i>KRAS</i> geni mutasyon analizi	33
Tablo 30: <i>NRAS</i> geni mutasyon analizi	33
Tablo 31: <i>BRAF</i> geni mutasyon analizi	34
Tablo 32: <i>HER2</i> geni mutasyon analizi	34
Tablo 33: <i>PIK3CA</i> geni mutasyon analizi	34
Tablo 34: Olgularda demografik özellikler ve tespit edilen mutasyonlar	40

Grafikler Listesi

Grafik 1	: Dünya genelinde kanser tiplerine göre tanı oranları	3
Grafik 2	: Dünya genelinde kanser tiplerine göre ölüm oranları	4
Grafik 3	: 2015 ABD Kanser istatistiği	4
Grafik 4	: KHDAK 2015 ABD verileri	13
Grafik 5	: Olguların cinsiyet oranı	38
Grafik 6	: Olguların KHDAK alt tipine göre oranları	38
Grafik 7	: Olguların tanı alma yaşları	39
Grafik 8	: Olguların sigara kullanım oranları	39
Grafik 9	: Olgulardaki sağ kalım oranları	40
Grafik 10	: Erkek olgulardaki mutasyon sayıları ve oranları	42
Grafik 11	: Kadın olgulardaki mutasyon sayıları ve oranları	42
Grafik 12	: Cinsiyetlere göre mutasyon sayıları	43
Grafik 13	: Olgularda yaşlara göre mutasyon sayıları	43
Grafik 14	: Mutasyonların tüm olgulardaki oranı	44

Kısaltmalar Listesi

°C : Santigrat

μ : Mikro

ADP: Adenozindifosfat

ATP: Adenozintrifosfat

Akt: Fosfotidilinositol 3-kinaz

ALK: Anaplastik lenfoma kinaz

BCR: Breakpoint cluster region

BRAF: v-Raf Murine sarkoma viral onkogen homologu

cm²: Santimetre kare

DM: Double-minute kromozom

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya sağlık örgütü

EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptörü

Erk: Sinyalle regüle olan ekstraselüler kinaz

FISH: Floresans insitu hibridizasyon

GAP: GTPaz aktive edici protein

GDP: Guanozindifosfat

GEF: Guanin nükleotid değiştirme faktörü

g: Gram

GTP: Guanozintrifosfat

GTPase: Guanozintrifosfataz

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

HSR: Homojen boyanan bölge

Ig: Immunoglobulin / Antikor

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

KRAS: Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu

L: Litre

M: Molar

mRNA: mesajcı Ribonükleik asit

Mut: Mutant tip

MYC: Miyelositomatozis homolog proteini

n: Nano

NRAS: v-Ras Nöroblastom viral onkogen homoloğu

p53: Hücrenin ana denetleyicilerinden biri olan tümör süpresör proteini

PI3K: Fosfatidil inositol-3-kinaz

PIK3CA: Fosfatidil inositol-3-kinaz katalitik alfa polipertid

PIP3: Fosfatidil inositol trifosfat

Rb: Retinoblastom geni

RNase: RNA parçalayıcı enzim

ROS-1: c-ros oncogene 1

rpm: Dakikadaki devir sayısı

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

s: saniye

TK: Tirozin kinaz

wt: Yabanıl tip

BÖLÜM I

1.1 Giriş

Akciğer Kanseri, sessiz seyretmesi sebebiyle yaklaşık %80'i ileri evrelerde teşhis edilebilen, en yüksek mortaliteye sahip kanser tipidir. Yaklaşık %50'si metastatik evrede farkedilebilen Akciğer kanseri olgularının ancak %5'ten azı 5 yıldan fazla hayatta kalabilmektedir. Kanser biyolojisi, tanısı ve tedavisinde son yıllarda ilerlemeler kaydedilmiş, 5 yıllık sağ kalım oranını %66'ya yükseltmiştir. Fakat bu gelişmelerin Akciğer kanserine yansması sınırlı kalmış ve 5 yıllık sağkalım %17'lere ancak ulaşabilmiştir.

Her bir kanser moleküler alt tipi, belirli bir genetik değişiklik veya değişiklikler ile tetiklenmektedir. Akciğer kanserinde tümör oluşumuna sebep olan genetik değişikliklerin belirlenmesi ve bu değişikliklerin sonucu oluşan onkoproteinlere karşı spesifik baskılayıcı moleküllerin kullanılması tedaviye ivme kazandırmıştır. Kanserden kansere ve kanser alt tipinden alt tipine farklılık gösteren genetik değişiklikler Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85 ini oluşturan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde özellikle reseptör tirozin kinazlarda ve bu reseptörlerin düzenlediği hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptoz gibi temel biyolojik süreçleri kontrol eden birçok sinyal ileti yolağında kendini göstermektedir. Özellikle Ras/ERK yolağı ve PI3K/Akt yolağındaki genetik değişiklikler tümör gelişiminde önemli bir yer tutmaktadır.

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ailesinden olan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ve İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER2), birer transmembran tirozin kinaz (TK) reseptörüdür, diferansiyasyon, proliferasyon ve apoptoz gibi hücrede temel biyolojik süreçleri kontrol eden birçok hücre içi sinyal yolağını düzenlemektedir. EGFR'deki tirozin kinaz domaini ekzon 18-24'u kapsar, bu ekzonlardaki en yaygın ve önemli mutasyonlar Akciğer kanseri ile ilişkilendirilmektedir.

Reseptör tirozin kinazların aktive ettiği PI3K/Akt sinyal yolağı üyesi olan Fosfatidil inozitol kinaz (PI3K) birçok hücre fonksiyonunu regüle eden hücre sinyal yolaklarında görevli ikincil mesajcı PIP3'ü üretmektedir. PI3K'ın katalitik alt birimini kodlayan *PIK3CA* genindeki mutasyonlar akciğer, kolon, meme, beyin, karaciğer ve mide gibi birçok kanserde gösterilmiştir.

Reseptör tirozin kinazlardan gelen sinyallerin transdüksiyonunu sağlayan RAS proteinleri küçük GTPaz (Guanin trifosfataz) protein ailesindendir. Ras/ERK sinyal yolağında önemli görev üstlenen RAS proteinleri mutasyonlar sonucu devamlı aktif kalmaktadır böylece sinyal iletimi bozulmakta ve tümör oluşumunu tetiklemektedir. RAS proto-onkogeni mutasyonları insan kanserlerinde en sık görülen genetik değişikliklerdendir. Akciğer kanserinde *KRAS* ve *NRAS* mutasyonları gösterilmiştir. RAF izoformlarından biri olan BRAF, RAS tarafından aşağı yönlü aktive edilen bir serin-treonin kinazdır. *BRAF* mutasyonları Ras/ERK sinyal yolağında hiper aktivasyona sebep olarak hücre sağkalımının ve çoğalmasının artışına sebep olmaktadır. Akciğer karsinomlarında içinde bulunduğu birçok tümörde *BRAF* mutasyonları gösterilmiştir.

Akciğer kanserlerinin yaklaşık yarısında birlikte gözlenmeyen tek bir yönlendirici mutasyon olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır. *KRAS* ve *EGFR* mutasyonlarının birliktelik göstermediği eskiden beri bilinmektedir. Birliktelik göstermeyen diğer mutasyonlar ise *ALK*, *HER2*, *PIK3CA*, *BRAF*, *ROS-1*, *AKT1* mutasyonlarıdır. Ancak Akciğer kanserlerinin yaklaşık yarısında yönlendirici genetik değişiklikler henüz bilinmemektedir.

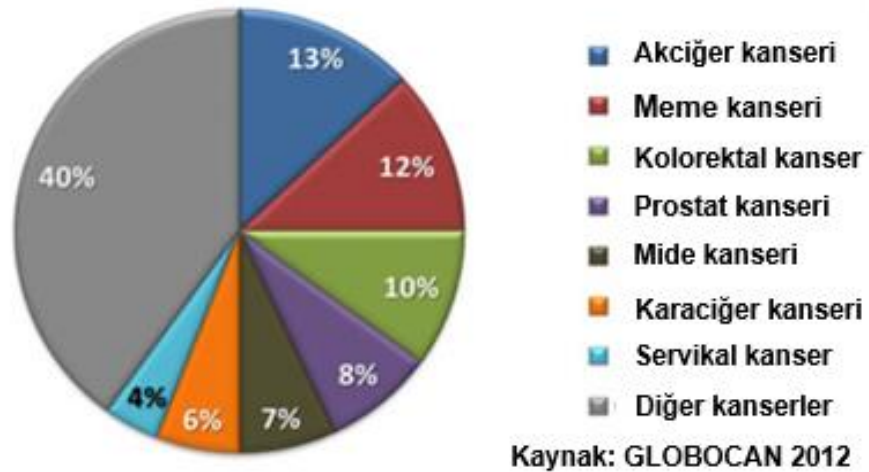
Bu çalışmada KHDAK olgularında tümör gelişimine sebep olan Reseptör tirozin kinaz genlerinden *EGFR* ve *HER2* deki mutasyonlar, PI3K/Akt sinyal yolağındaki *PIK3CA* genindeki mutasyonlar ve Ras/ERK sinyal yolağındaki *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* genlerindeki mutasyonların belirlenmesi, sıklık ve korelasyonlarının ortaya konması amaçlanmıştır. Ülkemizde KHDAK ile ilgili onkogen araştırmaları bir veya birkaç gen ile sınırlı kalmıştır. Çalışmamız Türkiye’de KHDAK’de toplam altı genin bir arada çalışıldığı ilk araştırmadır. Ülkemizde KHDAK mutasyon oranlarının batı toplumlarıyla benzerlik gösterdiği varsayılmakta ve tedavi yaklaşımı buna göre şekillenmektedir. Mutasyon oranlarında gösterilebilecek anlamlı farkların klinisyenlere tanı ve tedavide yön verebileceğini, aynı zamanda mutasyon sıklıkları ve korelasyonlarının belirlenmesi ile de KHDAK hakkında bilgi birikimine katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

1.2 Genel Bilgiler

1.2.1 Kanser

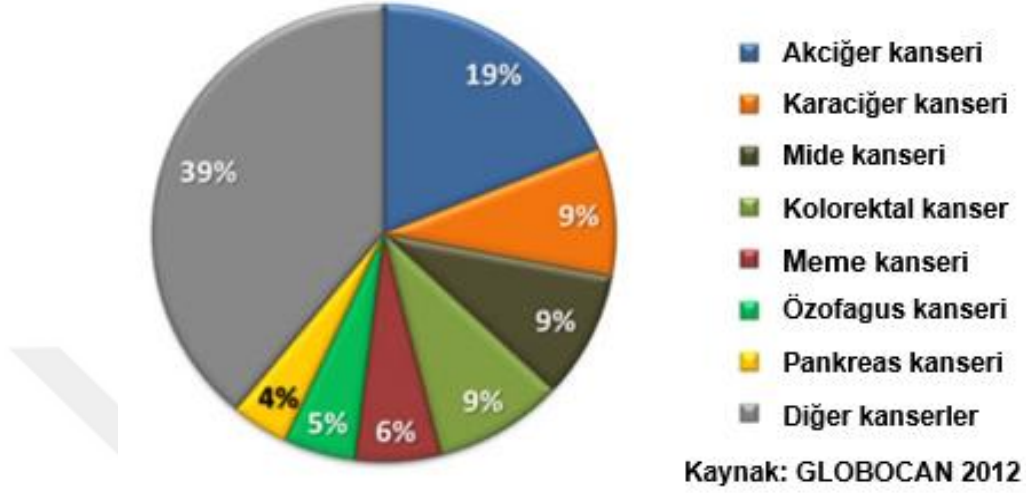
Hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu ve invazyonu ile karakterize bir hastalık olan kanser tıp literatüründe “malign neoplazm” olarak adlandırılmaktadır. Sigara, radyasyon, kimyasallar, virüsler gibi dış etkenlerden kaynaklanabilen kanser kişiye özgü faktörler sonucu da ortaya çıkabilmektedir. Bu faktörler birlikte veya tek başlarına kanseri tetikleyebildikleri gibi hastalık sürecini de hızlandırabilmektedirler. Kontrol dışına çıkmış hücre proliferasyonu kontrol altına alınmadığı takdirde ölümle sonuçlanmaktadır (1). Hücrelerin kontrollü çoğalmasını tümör supresör genler ve proto-onkogenler arası denge sağlamaktadır (1,2). Proto-onkogenlerin genetik değişiklikler sonucu onkogenlere dönüşmesi ve/veya tümör supresör genlerde meydana gelen değişiklikler bu dengeyi bozarak kontrolsüz çoğalmaya ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır (3).

Dünya genelinde kanser önde gelen hastalıklardan biridir. GLOBOCAN'ın 2012 verilerine göre dünya genelinde 14,1 milyon yeni kanser vakası bildirilmektedir.



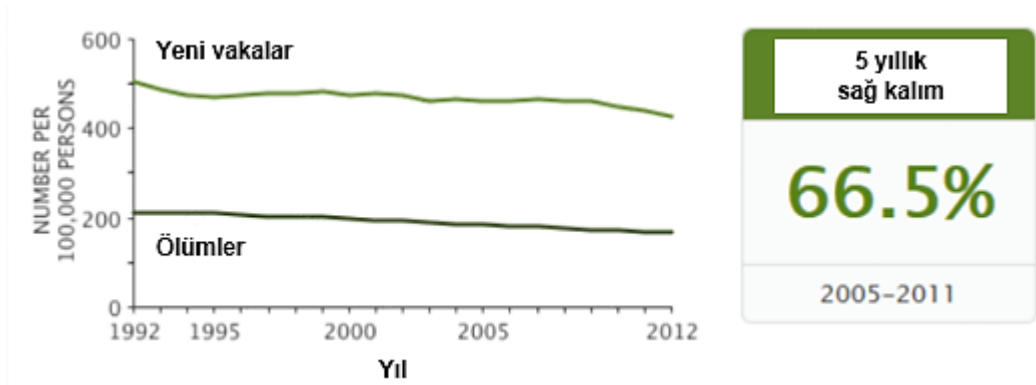
Grafik 1:Dünya genelinde kanser tiplerine göre tanı oranları (Akciğer kanseri %13, Meme kanseri %12, Kolorektal kanser %10, Prostat kanseri %8, Mide kanseri %7, Karaciğer kanseri %6, Servikal kanser %4 ve diğer kanser kanserler %40)

Dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla mortaliteye sahip hastalık kanserdir ve GLOBACAN 2012 verilerine göre 8,2 milyon kansere bağlı ölüm bildirilmektedir.



Grafik 2: Dünya genelinde kanser tiplerine göre ölüm oranları (Akciğer kanseri %19, Karaciğer kanseri %9, Mide kanseri %9, Kolorektal kanser %9, Meme kanseri %6, Özofagus kanseri %5, Pankreas kanseri %4 ve diğer kanser kanserler %39)

Kansere bağlı ölümler Amerika'da kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almakta ve ölüm sebeplerinin %25'ini teşkil etmektedir (4).



Grafik 3: 2015 ABD Kanser istatistiği (2015 verilerine göre 2005 ile 2011 yılları arasında kanser tanısı almış 5 yıllık sağkalımı başaranların oranı %66,5'ler seviyesindedir) (5)

1.2.1.1 Kanserin Gelişim Süreci

Karsinogenez olarak adlandırılan kanser gelişimi çok aşamalı bir süreç olarak nitelendirilmektedir. Radyasyon, virüsler ve kimyasal maddeler gibi birçok karsinojenler tarafından hücrede meydana gelen genetik hasar başlangıçta tek başına tümör oluşumuna yeterli gelmemektedir. Öncelikle genetik hasara sahip olan hücrenin DNA tamiri ve apoptoz gibi mekanizmalardan kurtularak hayatta kalması ve devamında çoğalabilmesi gerekmektedir. Hayatta kalabilen ve çoğalmayı başarabilen anormal hücre popülasyonu doğal seçim ve yeni mutasyonlar sayesinde bulunduğu ortamda avantajlı hale geçmekte ve tümör oluşturma yönünde ilerlemektedir. Bu hücrelerden bazıları yeni mutasyonlar sayesinde çoğalma hızlarını artırarak diğer hücreler üzerinde üstünlük sağlamaktadır. Büyük ölçüde şansa bağlı olan tümör gelişimi, hücresel olayların kontrolünün birbirine bağlı ve karmaşık olmasından dolayı çok sayıdaki mutasyona ihtiyaç duymaktadır. Hücre içi birçok düzenleyici mekanizmayı mutasyonlar sayesinde aşabilen anormal hücreler devamlı çoğaldıklarından bu kez de oksijen ve besin yetersizliği gibi birçok dış sınırlayıcı unsurlarla yüzleşmekte her karşılaştığı engelle karşı ek mutasyonlarla bulunduğu zorluktan kurtulabilmektedir (6).

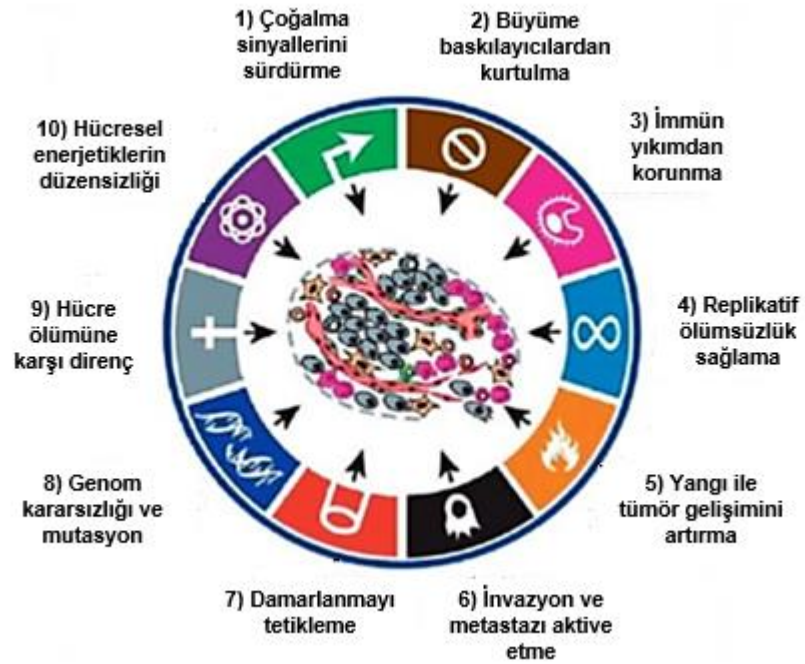
1.2.1.2 Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Çoğalma, farklılaşma ve sağkalımı düzenleyen mekanizmalardaki anormallikler kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerini yansıtmaktadır. Normal hücreler çoğalmayı baskılayıcı faktörlere uyarak çoğalmasını durdururken kanser hücreleri sinyallere tepkisiz kalıp çoğalmaya devam etmektedir. Diğer taraftan normal hücreler çoğalabilmek için büyüme faktörlerine gereksinim duyarken kanser hücrelerin büyüme faktörlerine gereksinimi ya çok az olmakta ya da kendileri büyüme faktörü üreterek devamlı çoğalma sağlamaktadırlar. Ayrıca normal hücreler diğer hücrelerle olan temas sınırlarına göre çoğalmasını ve hareketini kısıtlarken kanser hücreleri bu temasa tepki vermemektedir üstelik salgıladıkları proteazlarla hücre dışı matriksi parçalayarak yayılmaya devam etmekte anjiyogenezi hızlandıran faktörler salgılayarak artan oksijen ve besin ihtiyaçlarını

damarlanma yoluyla karşılayabilmektedir. Kanser hücreleri farklılaşmanın erken aşamalarında kalarak sürekli çoğalma gösterebilmekte ve farklılaşmanın temel öğelerinden biri olan apoptozdan kaçabilmektedir. Normal hücrelerde bulunmayan telomeraz aktivitesi sayesinde sınırsız replikasyon yeteneğine sahip olan kanser hücreleri bu özellikleri sayesinde ölümsüz olarak nitelendirilmektedir (7, 8).

Hanahan ve Weinberg on temel özellik ile kanser hücresinin fenotipini tanımlamışlardır. Bunlar;

1. Çoğalma sinyallerini sürdürme
2. Büyüme baskılayıcılardan kurtulma
3. İmmün yıkımdan korunma
4. Replikatif ölümsüzlük sağlama
5. Yangı ile tümör gelişimini artırma
6. İnvazyon ve metastazı aktive etme
7. Damarlanmayı tetikleme
8. Genom kararsızlığı ve mutasyon
9. Hücre ölümüne karşı direnç
10. Hücresel enerjetiklerin düzensizliği (3).



Şekil 1: Kanser ayırt edici özellikleri (3).

1.2.1.3 Kanser ve Genetik Yapısı

İlk kez 1914'te ortaya konan neoplazinin kazanılmış genetik değişikliklerle oluştuğu ve tek bir hücreden köken aldığı kavramı deneysel verilerle desteklenmiştir. Genetik değişikliklerin genomun farklı organizasyon düzeylerinde kendini göstermesi ve özellikle mitotik aktiviteyi kontrolden çıkarması neoplazinin karakteristik özelliği olarak nitelendirilmektedir (9,10).

Proliferasyonu ve apoptozu kontrol eden çok sayıda ve çeşitte gen bulunmaktadır. Bunlar:

- Proliferasyonda sinyal iletiminden sorumlu proteinleri kodlayan genler,
- Kontakt inhibisyonunda görevli hücre komponentlerini kodlayan genler,
- Mitotik döngü düzenleyicileri kodlayan genler,
- Apoptoz komponentlerini kodlayan genler,
- DNA tamir mekanizmasında görevli proteinleri kodlayan genlerdir.

Sporadik veya herediter olmasına bakılmaksızın, kanser genetik bir hastalık olarak nitelendirilmektedir. Kanseri germ hücrelerinde oluşan tek bir mutasyonla karakterize diğer genetik hastalıklardan ayıran temel özellik çoğunlukla somatik hücrelerde oluşan çok sayıdaki mutasyonun birikmesiyle oluşmasıdır. Neoplastik süreç kanserle ilişkili genlerdeki ilk mutasyon ile başlamakta ve kanser birçok mutasyonun birikmesiyle ortaya çıkabilmektedir. İnsan kanserlerinin çok büyük bir kısmı artmış mutasyon hızına sahip olduklarından, hücreler genetik açıdan kararsızdır. Bazı kanser hücrelerinin bireysel nükleotidlerini etkileyen bölgesel DNA hatalarını onarma yetenekleri kusurludur. Bu hücreler, nokta mutasyonlarının ve küçük bölgesel DNA dizi değişikliklerinin birikimine normal hücrelere göre daha fazla eğilim gösterirler. Kanserle ilişkili genlerdeki mutasyonlar germ hücrelerinde ortaya çıkarsa sonraki nesillerde neoplastik sürecin başlamasına yatkınlık oluşmakta ve tümör oluşumu erken yaşlarda kendini gösterebilmektedir (9, 11, 12).

Neoplazinin malign bir yapıya dönüşebilmesinde diferensiyasyon sıklığı önemli bir yer tutmakta karsinojenler ve hücre içi defektler bu sıklığı artırabilmektedir. Örneğin, Xeroderma Pigmentosum hastalığında ultraviyole ışın etkisiyle mutasyon oluşmakta ve DNA tamir mekanizmaları görevini yerine getirememektedir. DNA tamir mekanizmalarında bozulma ve replikasyon hatalarından kaynaklı kansere yatkınlık gösteren diğer genetik

hastalıklar arasında Bloom Sendromu ve Fankoni Anemisi gösterilmektedir. Bu hastalıklarda gen defekti germ hücreleri yoluyla gelecek nesillere aktarılmakta hem farklı kanserler gelişebilmekte hem de kanser gelişme riski artmaktadır. DNA metabolizmasıyla ilgili bu defektler somatik hücrelerde de gerçekleşebilmekte yeni mutasyonlar yardımıyla diferensiyasyon artarak kanser gelişim riskini yükseltmektedir (6, 11, 13)

1.2.1.3.1 Kanser Oluşumunda Etkili Genler

Kanser; proliferasyon, diferansiyasyon ve sağkalımı denetleyen çok sayıdaki önemli gendeki değişimler ile kendini göstermekte gün geçtikçe keşfedilen gen sayısı artmaktadır. Genel olarak kanser gelişiminde önemli 3 ana gen grubu öne çıkmaktadır (6,7). Bunlar:

- 1- Onkogenler
- 2- Tümör süpresör genler
- 3- Stabilitate genleri

1.2.1.3.1.1 Onkogenler

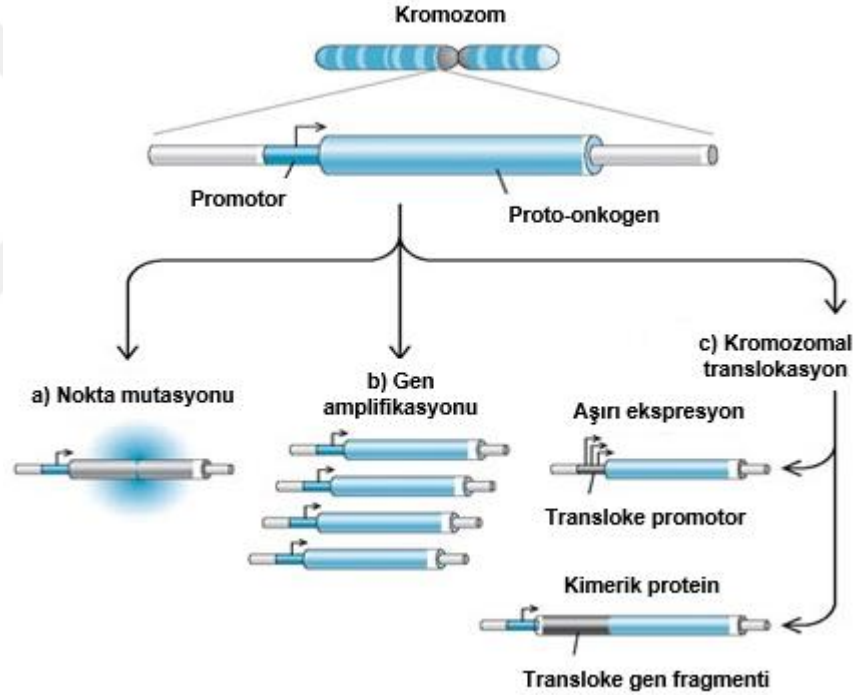
Hücrede özellikle çoğalmayı denetleyen proto-onkogenlerin genellikle onkojenik virüsler yoluyla mutasyona uğramaları sonucu onkogenler oluşmaktadır. Proto-onkogenler hücre için hayati öneme sahip olduklarından başkalaşimleri hücrede önemli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (7).

Hücre membranından başlayarak sitoplazmaya ve oradan çekirdeğe kadar giden karmaşık ve çok aşamalı sinyal iletimi proto-onkogenlerin kontrolünde ilerleyerek temel biyolojik süreçleri düzenlemektedir. Bu kontrol 3 temel noktada fonksiyon göstermektedir. Birincisi, görevli proteindeki serin, tirozin ve treonin aminoasitleri ATP'den fosfat grubu transfer ederek fosforile olmakta konfigürasyonunu değişen proteinler sinyal iletimini sağlamaya yönelik hedef proteinler için bağlanma bölgeleri oluşturarak proteinin kinaz özelliği göstermektedirler. Bunun için en iyi örnek EGF (Epidermal büyüme faktörü) ailesi gösterilmektedir. *EGFR* proto-onkogeninin onkogene dönüşmesi özellikle Akciğer Kanserinde önemli bir yer tutmaktadır. İkincisi, GTPaz özelliği gösteren RAS ailesi proto-onkogenleri sinyal

transdüksiyonunda önemli yer tutmaktadır. Üçüncüsü ise, hücre döngüsü kontrolü, gen ekspresyonu ve DNA replikasyonunda görevli nükleus içinde yerleşmiş olan proteinleri kapsamaktadır (14).

1.2.1.3.1.1.1 Onkogenlerin Aktivasyon Mekanizmaları

Proto-onkogenlerdeki genetik değişiklikler sonucu ortaya çıkan onkogenler aşırı çoğalmayı tetiklemektedirler. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümü kromozom yeniden düzenlenmeleri, gen amplifikasyonları ve mutasyonlar olmak üzere üç önemli mekanizmayla gerçekleşmektedir (15).

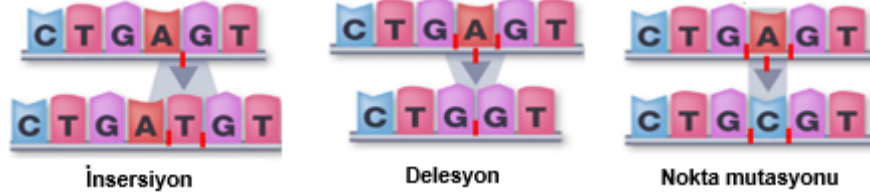


Şekil 2: Onkogen aktivasyon mekanizmaları

1.2.1.3.1.1.1.1 Nokta Mutasyonları

İnsersiyon, delesyon, tek baz değişimi gibi çeşitli mutasyon tipleri proto-onkogenleri onkogenlere dönüştürmekte özellikle tek baz değişimleri üretilen proteindeki tek bir aminoasidi değiştirerek önemli aktivite değişimine sebep olmaktadır. Nokta mutasyonları çoğunlukla *ras* ailesi (*KRAS*, *NRAS* ve

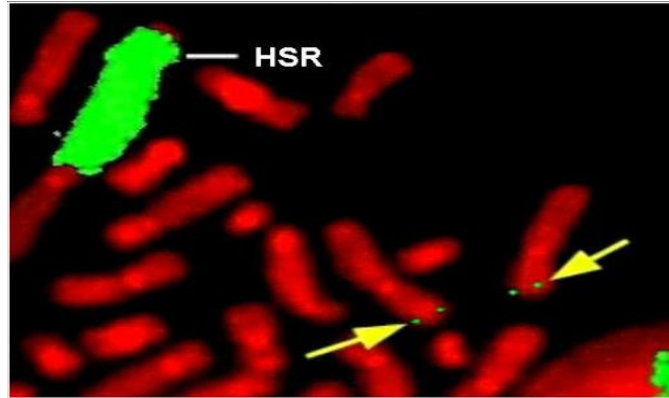
HRAS) proto-onkogenlerinde gözlenmektedir. Birçok kanserde *KRAS* mutasyonları önemli rol oynamakta ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. *EGFR* genindeki delesyon ve insersiyonlar Akciğer Kanseriinde önemli göstergeler olarak bilinmektedir (15).



Şekil 3: İnsersiyon-Delesyon-Nokta mutasyonları

1.2.1.3.1.1.2 Gen Amplifikasyonları

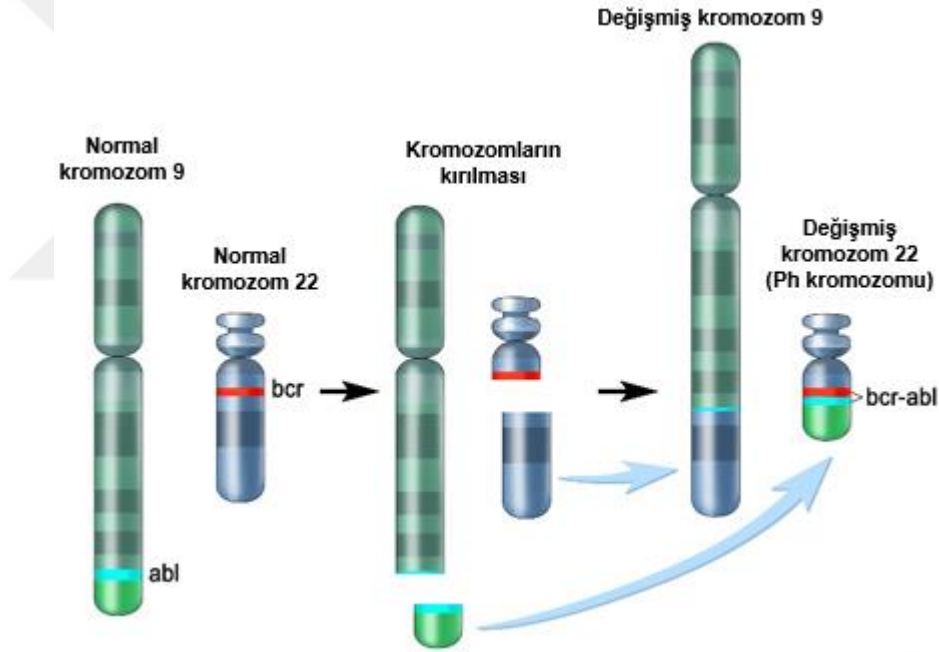
Normalde belli oranda ifade edilen proto-onkogenler, genin çok sayıda kopyasının oluşması sonucu aşırı ifade edilerek neoplaziye neden olmaktadır. Gereğinden fazla replikasyon sonucu oluşan genin yüzlerce kopyasını içeren bölge karyotipte double-minute kromozomlar (DM) veya homojen olarak boya alan bölgeler (HSR) olarak nitelendirilir. Bu durum tümörlerin yaklaşık %10'unda ve genelde geç evrelerinde ortaya çıkmaktadır. Örnek olarak nöroblastom olgularında N-MYC gen amplifikasyonu yaklaşık %30 oranında gözlenmektedir (14,15).



Şekil 4: N-MYC amplifikasyonu ve oluşturduğu HSR (FISH)

1.2.1.3.1.1.1.3 Kromozom Yeniden Düzenlenmeleri

Kromozom düzeyinde meydana gelen yeniden düzenlenmeler hematolojik malignitelerde göze çarpmakta ve genlerde aşırı transkripsiyon veya füzyon gen oluşumuyla aşırı aktif füzyon proteini oluşumuna sebep olmaktadır. Aşırı transkripsiyon immünoglobulin genlerinin veya T-hücre reseptör genlerinin bir proto-onkogenin transkripsiyon kontrol bölgesine transloke olmasıyla ortaya çıkmaktadır. Translokasyon iki gen arasında parça değişimi şeklinde de olabilmekte ve oluşan kimerik gen ürünü tümör gelişimine neden olmaktadır (15). Örneğin, Kronik Miyelositer Lösemide Bcr/Abl füzyon geni 9. kromozom ile 22. Kromozom arasındaki translokasyon sonucu ortaya çıkmakta ve aşırı tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir.



Şekil 5: t(9;22) Bcr/Abl füzyonu oluşumu

1.2.1.3.1.1.2 Onkogen Ürünleri

Büyüme faktörleri ve büyüme faktörü reseptörleri kanserlerde önemli bir yer tutmaktadır. Proliferasyonun başlaması ve sonlanmasında kilit öneme sahiptirler. Büyüme faktör reseptörlerinde bulunan tirozin kinaz domainleri hücre kontrol mekanizmalarının aktivasyonunda belirleyici olmaktadır.

Büyüme faktörü reseptörleri membran boyunca uzanan reseptör tirozin kinazlar ve sitoplazmada yer alan tirozin kinaz reseptörü dışındakiler olarak iki gruba ayrılmaktadırlar.

GTPaz aktivitesi olan proteinler ve sitoplazmik serin tirozin kinazlar olmak üzere hücre içi sinyal iletim faktörleri önemli onkogen ürünleri olarak işlev görmektedirler.

Transkripsiyon faktörler önemli onkogen ürünleridir ve spesifik DNA dizilerine bağlanarak gen ekspresyonunda düzenleyici bir rol oynamaktadırlar.

Hücre ölümünün azalması, hücre bölünmesi ve büyümesiyle sayısı artan hücre döngüsü faktörleri önemli iki kontrol noktasında hücre döngüsüne katkı yapmaktadır. G1 kontrol noktası ve M kontrol noktası hücre döngüsü açısından çok önemlidir ve hücre döngüsü faktörü olan siklin bağımlı kinazlar bu noktalarda kilit role sahiptir (14).

1.2.1.3.1.2 Tümör Supresör Genler

Proliferasyon kontrolü ve inhibisyonunda tümör supresör genler önemli rol oynamaktadır. Tümör supresör genlerin her iki alellinde de başkalaşım veya kayıp olması durumunda işlev göremez hale gelmektedirler. Knudsonun iki vuruş hipotezi olarak bilinen bu durum ilk olarak ender bir çocukluk çağı tümörü olan retinoblastom hastalığında gösterilmiştir. Rb geninde heterozigotluğun kaybıyla hastalık gelişmektedir. Homozigot mutant hale geçiş mitoz esnasında kromozomlarda ayrılamama sonucu kromozomal delesyonlar, kromozom kayıpları, homolog aleller arasındaki dönüşüm gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Germ hücresiyle gelen bir mutant alel kansere yatkınlığı artırırken somatik hücrede meydana gelen diğer alelin kaybıyla kanserleşme tetiklenmiş olmaktadır. DNA tamirinde ve apoptoza yönelmede görevli bir transkripsiyon faktörünü kodlayan p53 tümör supresör geni içinde aynı durum söz konusu olmaktadır (7, 9, 16).

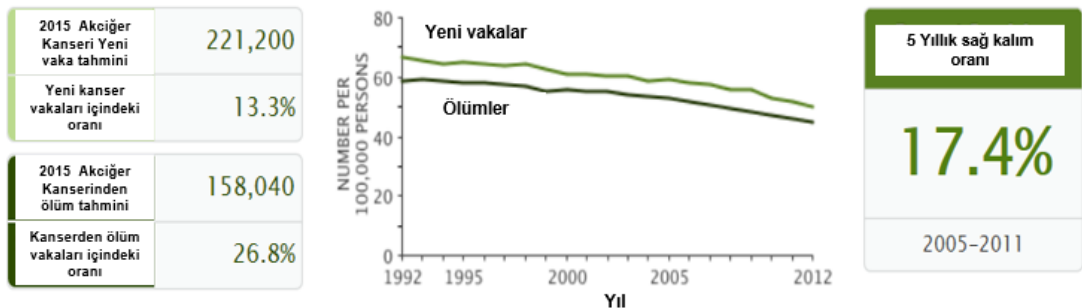
1.2.1.3.1.3 Stabilite Genleri (Caretakers)

DNA'da replikasyon sırasında oluşan hataları ve mutajenlere bağlı ortaya çıkan genetik değişimleri baz çıkarma, nükleotit çıkarma ve yanlış eşleşme tamiri ile düzeltip genomu stabil tutmada stabilite genleri görev almaktadır. Ayrıca stabilite genleri kromozom dağılımı ve mitozda oluşan rekombinasyon gibi makro düzeyindeki kontrol sürecinde de yer almaktadır. Stabilite genleri sayesinde mümkün olan en az mutasyonla genom sabit tutulmaya çalışılmaktadır. Bu genlerde meydana gelen defektler diğer genlerdeki defekt oranını artırarak genomik instabiliteye sebep olmaktadır. Bu işlevin kaybı tümör supresörlerde olduğu gibi genlerin iki alellinde de meydana gelen defekt ile gerçekleşebilmektedir (12)

1.2.1.4 Akciğer Kanseri

1.2.1.4.1 Epidemiyoloji

Akciğer kanseri görülme sıklığı; dünyada erkek ve kadınlarda %13 ile 2. sırada iken ülkemizde erkeklerde %26 oranı ile 1. sırada, kadınlarda ise %5 oranı ile 5. sırada olduğu bildirilmektedir (5). Kansere bağlı ölüm açısından ise dünyada erkeklerde %28, kadınlarda %26 oranı ile 1. sırada bildirilmektedir (17). Her yıl dünya çapında yaklaşık 1,6 milyon yeni akciğer kanseri vakası teşhis edilmekte ve yaklaşık 1,4 milyon akciğer kanserine bağlı ölüm gerçekleşmektedir (18)



Grafik 4: KHD AK 2015 ABD verileri

Kanser biyolojisi, tanısı ve tedavisindeki son yıllardaki gelişmeler 5 yıllık sağkalım oranını %66'ya yükseltmiştir. Fakat bu gelişmelerin en yaygın görülen kanserlerden biri olan akciğer kanserine yansması sınırlı kalmış ve 5 yıllık sağ kalım %17'lere ancak ulaşabilmiştir (5).

1.2.1.4.2 Etiyoloji

Tütünün ve tütün ürünleri kullanımının akciğerde kansere sebep olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Kanserinin akciğerde oluşmasının sebebi %94 oranında tütün ve tütün ürünleri olarak gösterilmektedir. Sigara içenler içmeyenlere göre 24-36 kat daha fazla Akciğer Kanseri riskine sahip olmaktadır, sigara içmeyip dumanına maruz kalanlarda risk %3,5 civarında gözlenmekte ve bu sebepten Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 3000'e yakın akciğer kanseri vakası görülmektedir. Sigara kullanıcısı olan akciğer kanseri hastalarında histopatolojik olarak çoğunlukla küçük hücreli akciğer kanseri ve yassı hücreli akciğer kanseri gösterilmektedir (7).

Tablo 1: Tütün ürünleri dışında kalan Akciğer kanseri nedenleri

Etiyoloji	Açıklama
Hava kirliliği	İnorganik partiküller, dizel yakıt dumanı, metal parçalar, radyonükleid partiküller.
Radon Gazı	Havalandırması yetersiz binalar, madenler.
Radyasyon	Yüksek doz maruziyeti ile risk artar.
Mesleki maruziyet	Tüm akciğer kanseri olguların %9-15'inden sorumludur. Asbest, silika, arsenik, krom, vinil klorür, uranyum en karsinojen olanları.
Kronik akciğer hastalıkları	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), pnömokonyoz, idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF), tüberküloz sekeli.
Beslenme	Düşük karoteonoidler (antioksidan), yüksek yağlı diyet, düşük vücut kitle indeksi.
Genetik yatkınlık	Birinci derece akrabada akciğer kanseri varlığı, sigara içmeyen bir kişide kanser riskini %2,6 artırır.
Onkogen ve tümör supresor genler	Myc ve ras grubu onkogenler ile retinoblastom ve p53 tümör supresor gen mutasyonları akciğer kanserinde sık izlenir.

1.2.1.4.3 Klinik Belirtiler

Akciğer kanseri çoğunlukla hastalık ileri evrelerde tespit edilebilmektedir. Bunun sebebi ileri aşamalara gelmeden veya metastaz yapmadan önce çok az belirti vermesi olarak düşünülmektedir. Akciğer kanserinde belirti ve klinik bulgular, hastalığın yayılım bölgesine göre farklılıklar göstermektedir. Sıklıkla merkezi yerleşimli tümörlerde öksürük bulgusu öne çıkmaktadır.

Tablo 2: Akciğer kanseri belirti ve bulguların görülme sıklığı

Semptom ve bulgular	Görülme sıklığı (%)
Öksürük	45-75
Kilo kaybı	46-68
Nefes darlığı (dispne)	37-60
Göğüs ağrısı (anjina)	27-49
Hemoptizi	27-35
Kemik ağrısı	25
Çomak parmak	20
Ateş	15-20
Kas güçsüzlüğü	10
Süperior vena kava sendromu	4
Disfaji (yutma güçlüğü)	2
Hırıltılı solunum	2

1.2.1.4.4 Sınıflandırma

Akciğer kanserlerinin %85'den fazlasını Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) oluştururken geri kalanını (yaklaşık %15) ise Küçük Hücreli Akciğer kanseri (KHAK) oluşturur. KHDAK non-skuamöz karsinomlar (Adenokarsinom, Büyük Hücreli Karsinom ve diğer subtipler) ve skuamöz hücreli karsinomlar olarak iki grupta incelenmektedir (19).

Adenokarsinomlar Akciğer kanserleri içinde gelişmiş ülkelerde ilk sıradadır ayrıca genç kadın hastalarda ve sigara içmeyenlerde en sık görülen

tümör tipidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Adenokarsinomları 4 ana gruba ayırmakta; ayrıca nadir görülen varyantlarını tanımlamaktadır. Bu gruplar Asiner, Papiller, Bronkoalveoler ve Solid tiptir ve genellikle değişen oranlarda bir arada görülmektedir. Bronkioloalveoler Karsinomda üç alt grup Müsinöz, Nonmüsinöz ve İntermediate form mevcuttur (19).

Skuamöz hücreli karsinom; KHDAK grubunun sık görülen tümörlerindendir. Skuamöz hücreli karsinom alt tipleri olarak Papiller, Şeffaf Hücreli, Küçük Hücreli, Bazaloid morfoloji tanımlanmıştır (20).

1.2.1.4.5 Evreleme

Akciğer kanserinde tedavi seçimi ve prognoz açısından evrelemenin iyi yapılması tedavi başarısını artırmaktadır. Genellikle fizik muayene, anamnez, görüntüleme, laboratuvar tetkikleri ve doku örnekleme yapıldığında hastalığın evresi belirlenebilmektedir. Primer Akciğer kanserli olgularda tanı sırasında TNM evrelendirme sistemi hastalığın anatomik yaygınlığını belirleme açısından önemli bir rehber olarak kullanılmaktadır. TNM evreleme sisteminde (T) primer tümörün büyüklüğünü ve yayılımını, (N) bölgesel lenf nodu tutulumunu ve (M) uzak metastaz varlığını ya da yokluğunu belirtmektedir. T, N, M derecelendirmesi ile hastalığın evresi hakkında evre I ile IV arasında genel tespit yapılmış olmaktadır (21).

Tablo 3: T,N ve M değerlerine göre evre gruplandırması

Gizli karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a, T1b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a, T1b, T2a T2b	N1 N0	M0 M0
Evre IIB	T2b T3	N1 N0	M0 M0
Evre IIIA	T1, T2 T3 T4	N2 N1, N2 N0, N1	M0 M0 M0
Evre IIIB	T4 Herhangi bir T	N2 N3	M0 M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a, M1b

Tablo 4: Primer tümör değerlendirilmesi

Tx	Primer tümörün değerlendirilememesi/malign hücre varlığı ancak görüntülenemeyen tümör
T0	Primer tümör belirtisi yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Çapı ≤ 3 cm, lob bronşundan proksimale invazyonu olmayan
T1a	Çapı ≤ 2 cm
T1b	Çapı > 2 cm fakat ≤ 3 cm
T2	Çapı > 3 cm fakat ≤ 7 cm ya da karinaya ≥ 2 cm uzaklıkta ana bronş tutulumu, visseral plevra invazyonu, hiler bölgeye uzanan ancak tüm akciğer kapsamayan atelektazi
T2a	$3\text{cm} < \text{tümör} \leq 5\text{cm}$
T2b	$5\text{cm} < \text{tümör} \leq 7\text{cm}$
T3	Tümör $> 7\text{cm}$ ya da göğüs duvarı invazyonu, karinayı tutmayan ama 2 cm'den daha yakın, tüm akciğeri kapsayan atelektazi, aynı lobta ayrı tümör nodülleri
T4	Mediasten, kalp, büyük damar, trakea, rekürrens sinir, özofagus, karina invazyonu ya da aynı taraf farklı lobta tümör nodülleri

Tablo 5: Bölgesel lenf nodu değerlendirilmesi

Nx	Lenf nodunun değerlendirilememesi
N0	Lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşial ve/veya hiler ve intrapulmoner lenf nodu metastazı
N2	İpsilateral mediasten ve/veya subkarinal lenf nodu metastazı
N3	Kontrilateral mediastinal, hiler / supraklavikuler / skalen lenf nodu metastazı

Tablo 6: Metastaz durumunun değerlendirilmesi

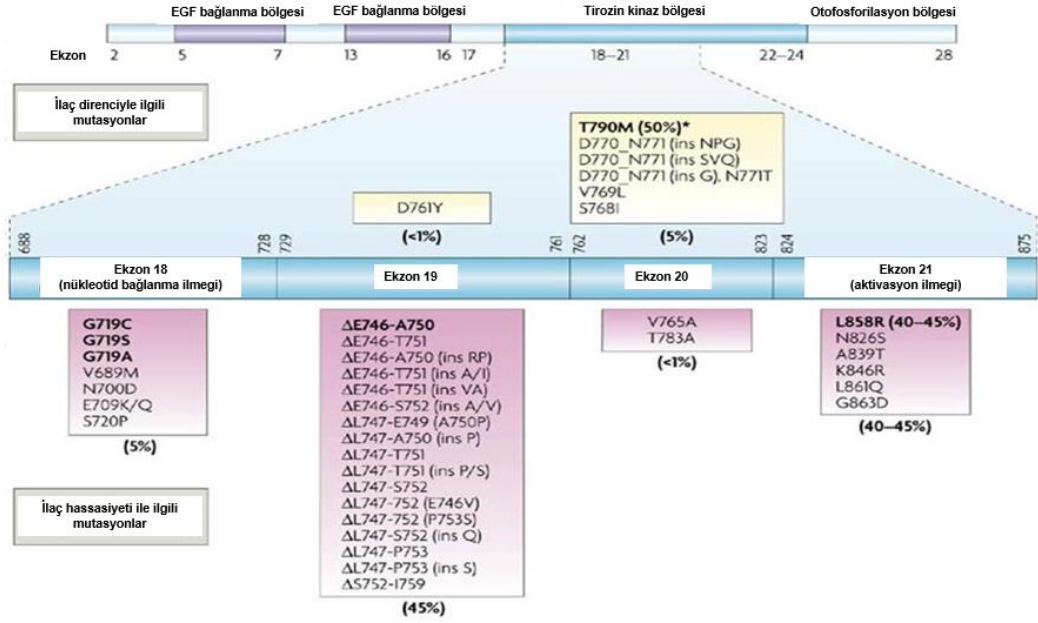
Mx	Uzak metastazın değerlendirilememesi
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Karşı tarafta ayrı tümör nodülleri, plevral nodül veya malign plevral-perikardiyal sıvı
M1b	Uzak metastaz

1.2.1.4.6 Akciğer Kanserinde Genetik Değişiklikler

Akciğer kanserinde moleküler markerler hedeflenmiş tedavilere yanıtta önemli belirleyiciler haline gelmiş ve son zamanlarda hastaya ait tümörde moleküler patolojiye dayalı en iyi tedavi seçeneklerinin belirlenmesi önem kazanmaya başlamıştır. Her bir kanser moleküler alt tipini, belirli bir genetik değişiklik veya değişiklikler tetiklemektedir (22). Genetik değişiklikler sonucu oluşan onkoproteinler Tirozin kinaz inhibitörleri, Monoklonal antikorlar gibi spesifik baskılayıcı moleküller ile hedef alınabilmekte ve kanser gelişimindeki etkinlikleri durdurulabilmektedir. Akciğer kanserinde genetik değişiklikler sonucu oluşan mutant Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörlerinin Tirozin kinaz inhibitörleriyle baskılanması hedeflenmiş tedavilere en iyi örneklerden biridir. Diğer taraftan birçok kanserde olduğu gibi Akciğer kanserinde de *KRAS* gen mutasyonu sonucu oluşan *KRAS* onkoproteinlerini baskılayacak efektif bir baskılayıcı olmaması sebebiyle prognoz kötü yönde ilerlemektedir.

Akciğer kanserinin büyük çoğunluğunu oluşturan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde tümör dokusunda *EGFR*, *ALK*, *ROS1* ve *HER2* gibi reseptör tirozin kinaz genlerinde, *RAS*, *RAF* ve *MEK1* gibi Map Kinaz Sinyal Yolağı üyelerinde ve *PIK3CA*, *AKT1* gibi PI3K/Akt sinyal yolağındaki genlerde mutasyonlar gözlenmekte ve bunlar kanserleşme ile ilişkilendirilmektedir.

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (*EGFR*) bir transmembran tirozin kinaz (TK) reseptörü olarak görev yapmaktadır. Hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptoz gibi temel biyolojik süreçleri kontrol eden birçok sinyal iletim yolağını regüle etmektedir. *EGFR* sinyal yollarındaki anormallikler önemli kanser etkeni olarak gösterilmektedir (22). *EGFR*'deki Tirozin Kinaz domaini ekzon 18-24'u kapsamakta ve bu ekzonlardaki en yaygın ve önemli mutasyonlar Akciğer Kanseri ile ilişkilendirilmektedir. (23). Bu kinaz domaini *EGFR*'nin hücre içi katalitik bölgesidir ve Gefitinib, Erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri (TKIs) tarafından hedeflenebilmektedir (23). *EGFR* Tirozin kinaz inhibitörleri *EGFR*'nin aktivasyonunu önleyerek aşağı doğru sinyal yollarının aktivasyonunu baskılamakta böylece upregüle olan proapoptotik sinyal molekülleri apoptotik yolağın aktivasyonunu sağlamaktadır. (24).

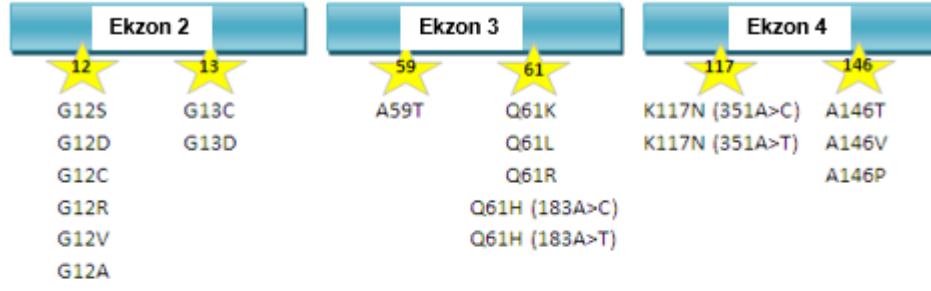


Şekil 6: EGFR gen bölgeleri ve klinikle ilgili mutasyonları

KHDAK hastalarında *EGFR* ekzon 18-21 mutasyonlarının çoğu TKI duyarlı olmakla birlikte, bazı mutasyonlar TKI direnci ile ilişkilendirilmektedir. (23-24). Benzer şekilde, v-Kiras2 Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu (*KRAS*) gibi genlerdeki mutasyonlar sonucu üretilen aktif proteinler *EGFR* sinyal yolağını aşağı yönlü aktifleştirmekte ve TKI direncine sebep olmaktadır (27).

Hücre zarının sitoplazmik kısmına bağlanmak için bir lipid grubu içeren ve monomerik GTP bağlayan GTPazlardan olan RAS proteinleri, *RAS* gen ailesinin üyelerinden Harvey RAS (*HRAS*), Kristen RAS A ve B (*KRAS*) ve nöroblastom RAS (*NRAS*) olmak üzere 4 fonksiyonel gen tarafından ifade edilmektedir. Farklı hücrelerde görev alan birbirine çok benzer ve korunmuş olan RAS proteinleri mitojenik etkinin yanı sıra hücre siklusu kontrolünde de dolaylı olarak rol almaktadır. GDP bağlı iken inaktif olan RAS proteinleri GDP'nin ayrılması ve GTP'nin bağlanmasıyla aktif hale geçmektedir. Mutasyonlar sonucu GTP'den ayrılamayan ve sürekli aktif kalan mutant RAS proteinleri kanser oluşumunu teşvik etmektedir. *RAS* proto-onkogeni mutasyonları insan kanserlerinde en sık görülen genetik değişikliklerdendir (28-31).

KRAS genindeki 19 mutasyon

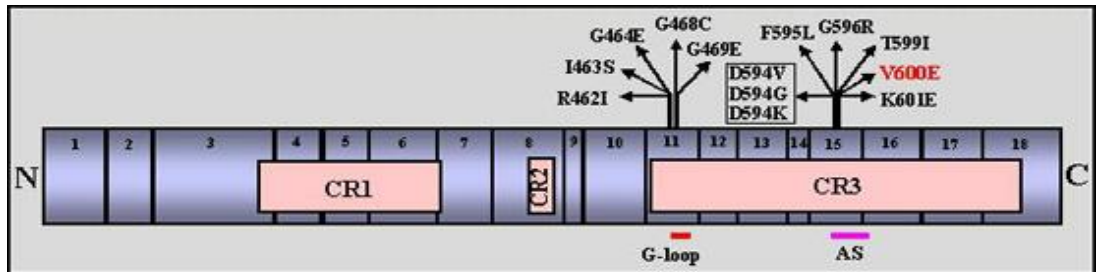


NRAS genindeki 13 mutasyon



Şekil 7: KRAS ve NRAS genindeki klinikle ilgili mutasyonlar

RAF izoformlarından biri olan BRAF, RAS tarafından aşağı yönlü aktive edilen bir serin-treonin kinazdır. RAF ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) i aktive eden mitojen aktive protein kinaz (MAPK)i aktive etmektedir (32). *BRAF* mutasyonları RAS-ERK sinyal yolağında hiperaktivasyona sebep olarak hücre sağkalımının ve çoğalmasının artışına sebep olmaktadır (32,33). Akciğer kansinomlarının da içinde bulunduğu birçok tümörde *BRAF* mutasyonları gösterilmiştir (34, 35, 36).

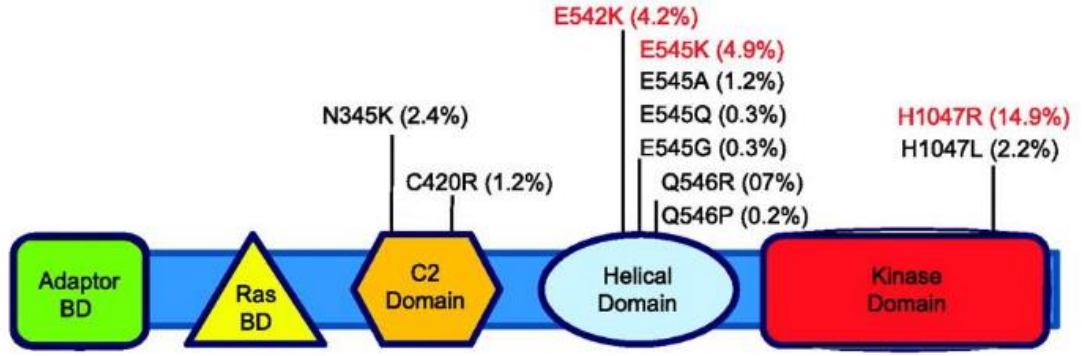


Şekil 8: BRAF genindeki klinikle ilgili mutasyonlar

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarda *EGFR* mutasyonu erkeklerden (%13,0) çok kadınlarda (%37,5), sigara içenlerden (%9,0) çok hiç sigara içmemişlerde (%50,8), asyalı olmayanlardan (%7,9) çok olanlarda (%29,1) ve diğer histolojik alt tiplerden (%2,3) çok adenokarsinomlu hastalarda (%31,3) gözlenmektedir. *KRAS* mutasyonları KHDAK hastalarının %15-30 da görülmektedir. Skuamöz hücreli karsinom hastalarından çok Adenokarsinomlu hastalarda, hiç içmemişlerden çok sigara içenlerde ve Doğu Asyalılardan çok Kafkas kökenlilerde görülmektedir (36). Akciğer karsinomlarının %3 ünde özellikle sigara içen adenokarsinomlu hastalarda V-raf murin sarkoma viral onkogen homologu B1 (*BRAF*) geni mutasyonları bulunmaktadır (37-40). *BRAF*, *EGFR* ve *KRAS* mutasyonları ve *EML4-ALK* gen yeniden düzenlenmesi birbirini dışlayan unsurlar olarak düşünülmektedir (40).

HER2 (ErbB-2) *EGFR* ailesinin bir üyesi olan bir tirozin kinaz reseptörüdür ve Akciğer Kanseri de dâhil olduğu bazı insan kanserlerinin patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (41), KHDAK hastalarında %2-4 oranında *HER2* mutasyonu saptanmaktadır (42). *HER2* mutasyonu sigara içmemiş, kadın hastalarda daha sık görülmektedir (43). Özellikle adenokarsinom alt tipinde görülen *HER2* gen mutasyonu *EGFR*, *ALK* ve *KRAS* mutasyonlarını karşılıklı olarak dışlamaktadır.

PIK3CA, fosfatidil inozitol kinaz(*PI3K*)'ın katalitik alt birimini kodlayan 21 ekzon içeren bir gendir (44). Büyüme faktörlerince uyarılan reseptör tirozin kinazların aktive ettiği *PI3K* birçok hücre fonksiyonunu regüle eden hücre sinyal yollarında görevli ikincil mesajcı *PIP3* ü üretmektedir (47). Akciğer, kolon, meme, beyin, karaciğer ve mide gibi birçok kanser tipinde bu gene ait gen amplifikasyonları, delesyonları ve daha sıklıkla somatik yanlış anlamli mutasyonları tanımlanmıştır (45). Bu mutasyonlar enzimatik fonksiyonda artış dolayısıyla aktif *AKT* sinyal iletimi ve artmış onkogenik transformasyona neden olmaktadır (46). Bu da birçok kanser tipinde mutant *PIK3CA*'nın onkogenik aktivite göstermesine sebep olmaktadır (47). Mutasyonlar sonucu sürekli aktif *PI3K/Akt* yolağına sebep olan *PIK3CA* mutasyonları *EGFR* tirozin kinaz inhibitörlerine karşı gelişen ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir.



Şekil 9: *PIK3CA* geni domainleri ve klinikle ilgili mutasyonlar

Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %40-55'inde birbirini dışlayan tek bir yönlendirici mutasyon olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (48, 49, 50). KRAS ve EGFR mutasyonlarının birbirini dışladığı eskiden beri bilinmektedir. Birbirlerini dışlayan diğer mutasyonlar ise ALK, HER2, PIK3CA, BRAF, ROS-1, AKT1 mutasyonları olarak gösterilmektedir. Ancak adenokarsinomların %40-45'indeki yönlendirici genetik değişiklikler henüz bilinmemektedir.

BÖLÜM II

2.1 Gereç ve Yöntem

2.1.1 Örneklerin hazırlanması

Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji AD laboratuvarı arşivindeki KHDAK tanılı olgulara ait parafin bloklar Adnan Menderes Üniversitesi İnsan Etik Kurulunun 2014/11 nolu kararı ile kullanılmıştır. Laboratuvarda mevcut olan mikrotom aletinde steril mikrotom bıçakları kullanılmış, 5~10 µm kalınlığında ve içeriğinde en az %60 tümör dokusu bulunan 0,5~1 cm² alanında 2-5 kesit alınarak 1,5 ml kapasiteli steril mikro tüplere aktarılmıştır. Alınan örneklerin niteliği ile ilgili bilgilerle birlikte örnekler Tıbbi Genetik AD laboratuvarına teslim edilmiştir.



Şekil 10: Mikrotom cihazı

2.1.2 DNA izolasyonu

Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu “AmoyDx FFPE DNA Kit” ticari kiti ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan izolasyon kiti kuru ortamda ve oda ısısında (15-25°C) muhafaza edilmiştir. DNA kit içeriği Tablo 7 de gösterilmiştir.

Tablo 7: "AmoyDx FFPE DNA Kit" ticari kiti içeriği

DNA Spin Columns	36 adet
Collection Tubes (2 mL)	72 adet
Centrifugal Tubes (1,5 mL)	72 adet
Buffer DTL	10 mL
Proteinase K Solution	900 µL
Buffer DES	800 µL
Buffer DTB	10 mL
Buffer DW1 (konsantre) 17 ml % 96-100'lük etanol eklenir.	13 mL
Buffer DW2 (konsantre) 24 ml % 96-100'lük etanol eklenir.	6 mL
Buffer DTE	8 mL

2.1.2.1 DNA izolasyon protokolü

2.1.2.1.1 Deparafinizasyon

Çalışma grubu olgularının parafin kesit örneklerinden genomik DNA izolasyonu için ilk adım olarak deparafinizasyon yapılmıştır. Deparafinizasyon işlem basamakları aşağıda verilmektedir

1. Olgu tüplerine 1 ml ksilen eklenip 10 saniye vortekslenir.
2. Oda ısısında 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
3. Doku çökeleğine dokunmadan süpernatant çekilerek atılır.
4. Tüp içerisine 1ml %96-100'lük etanol eklenerek 10 s vortekslenir.
5. Oda ısısında 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
6. Doku çökeleğine dokunmadan steril pipetler ile süpernatant atılır.
7. Tüpün kapağı açılarak tüm etanol içeriğinin ortamdan uzaklaştığından emin olana kadar en az 10 dakika oda ısısında inkübe edilir.

2.1.2.1.2 Parafin Kesitten DNA izolasyon Protokolü

KHDAK tanıli olgulara ait deparafinize edilmiş örneklerinden genomik DNA izolasyonu basamakları aşağıda verilmiştir.

1. 180 µL Buffer DTL ve 20 µL Proteinaz K örnek tüpüne eklenir.
2. 56°C'de 1 saat devamlı karıştırılarak inkübe edilir.
3. 10 µL Buffer DES eklenip karışım 1 saat 90°C'de inkübe edilir.
4. 2 µL RNase A eklenerek 5 dakika oda ısısında inkübe edilir.

5. 200 µL Buffer DTB ve 200 µL %96-100'lük etanol eklenir.
6. 5-10 sn spinin ardından tüm lizat 2ml'lik collection tüpü içerisine yerleştirilmiş olan DNA Spin Column filtresine aktarılır ve kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Collection tüp dökülüp DNA Spin Column tekrar yerleştirilir.
8. 600 ml Buffer DW1 eklenip 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Collection tüp dökülüp DNA Spin Column tekrar yerleştirilir.
10. 600 ml Buffer DW2 eklenip 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Collection tüp yenisiyle değiştirilir.
12. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
13. DNA Spin Column 1,5 ml'lik steril mikro tüpe aktarılır
14. 30~100 µL Buffer DTE filtrenin tam ortasına pipetlenir.
15. 5 dakika beklenip tüpler 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
16. Santrifüj sonrası DNA Spin Column atılır ve içerisinde DNA bulunan steril mikro tüpün kapağı kapatılarak ölçüm ve kalite kontrolü yapılacak zamana kadar -20°C'de buzdolabında saklanır.

2.1.3 DNA miktarının belirlenmesi ve kalite kontrolü

İzolasyon sonucu elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları 260 / 280 dalga boylarında absorbans değerlerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Ölçümler her bir örnekten 2ul kullanılarak Nanodrop 2000, Thermo Scientific aletinde gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflığı 260 ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilerek, 260/280 absorbans oranının 1,8-2,0 olanlar çalışmaya alınmıştır.

2.1.4 Gerçek Zamanlı PCR aşaması

Gerçek Zamanlı PCR çalışması Cobas z 480 (ROCHE) cihazında AmoyDx *EGFR* 29 Mutation Detection Kit, AmoyDx *KRAS* Mutation Detection Kit, AmoyDx *BRAF* V600 Mutations Detection Kit, AmoyDx *PIK3CA* Five Mutations Detection Kit, AmoyDx *HER2* Mutation Detection Kit ve AmoyDx *NRAS* Mutation Detection Kit ticari kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.4.1 Dedekte edilen mutasyonlar

EGFR, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *HER2* ve *PIK3CA* genleri için araştırılan mutasyonların listesi Tablo 8 – 13 te gösterilmiştir.

Tablo 8: *EGFR* geni için araştırılan mutasyonlar

E746_A750del (1)	L747_P753>S	L747_T751>S	L858R
E746_A750del (2)	L747_A750>P	L747_T751del	L861Q
E746_T751>I	L747_T751>Q	L747_T751>P	G719A
E746_T751del	L747_E749del	T790M	G719S
E746_T751>A	L747_T751del	S768I	G719C
E746_S752>A	L747_S752del	V769_D770insASV	
E746_S752>V	L747_A750>P	D770_N771insG	
E746_S752>D	L747_P753>Q	H773_V774insH	

Tablo 9: *KRAS* geni için araştırılan mutasyonlar

G12D	G12A	G12V	G12R	G12C
G13C	G13D	A59T	Q61K (181 C>A)	Q61K(182 A>T)
Q61R	A146V	A146T	Q61H(182 A>C)	Q61H(182A>T)
G12S	A146P		K117N(351 A>C)	K117N(351 A>T)

Tablo 10: *NRAS* geni için araştırılan mutasyonlar

G12D	G12C	G12A	G13D	G12V	G13R	G12S	G13V
Q61H		Q61R		Q61K		Q61L	
A59D		K117N(351 A>C)		K117N(351 A>T)		A146T	

Tablo 11: *BRAF* geni için araştırılan mutasyonlar

V600E1 (1799T>A)	V600E2	V600K
V600E1 (1799GT>AA)	V600D1	V600D2

Tablo 12: *HER2* geni için araştırılan mutasyonlar

A775_G776insYVMA (2325_2326 ins12 (tacgtgatggct))		
A775_G776insYVMA (2324_2325 ins12 (atacgtgatggc))		
M774_A775insAYVM	P780_Y781insGSP	G776>VC

Tablo 13: *PIK3CA* geni için araştırılan mutasyonlar

H1047R	H1047L	E542K	E545K	E545D
--------	--------	-------	-------	-------

2.1.4.2 Mutasyon kit içerikleri

EGFR, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *NRAS* ve *HER2* gen mutasyon kiti içerikleri aşağıda Tablo 14-19 da gösterilmiştir.

Tablo 14: AmoyDx *EGFR* 29 Mutation Detection Kit içeriği

19-Del Reaction Mix	1000 µL
L858R Reaction Mix	1000 µL
T790M Reaction Mix	1000 µL
Insertion Reaction Mix	1000 µL
G719X Reaction Mix	1000 µL
S768I Reaction Mix	1000 µL
L861Q Reaction Mix	1000 µL
External control Reaction Mix	1000 µL
<i>EGFR</i> Taq Polymerase	85 µL
<i>EGFR</i> Mixed Standart	500 µL

Tablo 15: AmoyDx *KRAS* Mutation Detection Kit içeriği

<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 1	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 2	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 3	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 4	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 5	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 6	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 7	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 8	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 9	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 10	1200 µL
<i>KRAS</i> 19 Reaction Mix 11	1200 µL
External Control Reaction Mix	1200 µL
Enzyme Mix	140 µL
Positive Control	1000 µL

Tablo 16: AmoyDx *NRAS* Mutation Detection Kit içeriği

<i>NRAS</i> Reaction Mix 1	1100 µL
<i>NRAS</i> Reaction Mix 2	1100 µL
<i>NRAS</i> Reaction Mix 3	1100 µL
<i>NRAS</i> Reaction Mix 4	1100 µL
<i>NRAS</i> Reaction Mix 5	1100 µL
<i>NRAS</i> Reaction Mix 6	1100 µL
<i>NRAS</i> Reaction Mix 7	1100 µL
<i>NRAS</i> External Control Reaction Mix	1100 µL
<i>NRAS</i> Enzyme Mix	85 µL
<i>NRAS</i> Positive Control	500 µL

Tablo 17: AmoyDx *BRAF* V600 Mutations Detection Kit içeriği

V600 Reaction Mix	1150 µL
<i>BRAF</i> Taq DNA Polymerase	20 µL
<i>BRAF</i> Mixed Standart (PC)	250 µL

Tablo 18: AmoyDx *HER2* Mutation Detection Kit içeriği

<i>HER2</i> Reaction Mix 1	1100 µL
<i>HER2</i> Reaction Mix 2	1100 µL
<i>HER2</i> Reaction Mix 3	1100 µL
<i>HER2</i> Enzyme Mix	30 µL
<i>HER2</i> Positive Control	250 µL

Tablo 19: AmoyDx *PIK3CA* Five Mutations Detection Kit içeriği

H1047R Reaction Mix	650 µL
H1047L Reaction Mix	650 µL
E542K Reaction Mix	650 µL
E545K Reaction Mix	650 µL
E545D Reaction Mix	650 µL
<i>PIK3CA</i> External Control Reaction Mix	650 µL
<i>PIK3CA</i> Taq DNA Polymerase	50 µL
<i>PIK3CA</i> Mixed Standard	250 µL

2.1.4.3 PCR karışımları

EGFR gen mutasyonları için PCR karışımları Tablo 20 de gösterilmiştir.

Tablo 20: *EGFR* gen mutasyonları için PCR karışımı

Reaktifler	Miktar
Reaksiyon Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	17,50 µL
<i>EGFR</i> Taq DNA polimeraz (reaksiyon kuyucuğu başına)	0,15 µL
Toplam	17,65 µL

Tüm reaksiyon karışımları ayrı tüplerde olmak üzere toplam 8 karışım hazırlanır ve her karışım miktarı; hasta sayısı, *EGFR* Mixed Standart, negatif kontrol dikkate alınarak belirlenir. Tüm reaksiyon karışımları reaksiyon kuyucuklarına 17,65 µL olacak şekilde dağıtılır. Her hasta için DNA örneğinden 2,35 µL (konsantrasyonu 3-6ng/µL olacak şekilde dilüe edilerek) alınıp her bir reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna eklenir. Her reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna 2,35 µL Mixed standart, bir kuyucuğuna 2,35 µL DNase-free su eklenir.

KRAS gen mutasyonları için PCR karışımı Tablo 21 de gösterilmiştir.

Tablo 21: *KRAS* gen mutasyonları için PCR karışımı

Reaktifler	Miktar
Reaksiyon Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	17,50 µL
<i>KRAS</i> Enzim Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	0,15 µL
Toplam	17,65 µL

Tüm reaksiyon karışımları ayrı tüplerde olmak üzere toplam 8 karışım hazırlanır ve her karışım miktarı; hasta sayısı, negatif kontrol, pozitif kontrol dikkate alınarak belirlenir. Tüm reaksiyon karışımları reaksiyon kuyucuklarına 17,65 µL olacak şekilde dağıtılır. Her hasta için DNA örneğinden 2,35 µL (konsantrasyonu 3-6ng/µL olacak şekilde dilüe edilerek) alınıp her bir reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna eklenir. Her reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna 2,35 µL Mixed standart, bir kuyucuğuna 2,35 µL DNase-free su eklenir.

NRAS gen mutasyonları için PCR karışımı Tablo 22 de gösterilmiştir.

Tablo 22: *NRAS* gen mutasyonları için PCR karışımı

Reaktifler	Miktar
Reaksiyon Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	17,50 µL
<i>NRAS</i> Enzim Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	0,15 µL
Toplam	17,65 µL

Tüm reaksiyon karışımları ayrı tüplerde olmak üzere toplam 8 karışım hazırlanır ve her karışım miktarı; hasta sayısı + negatif kontrol + pozitif kontrol dikkate alınarak belirlenir. Tüm reaksiyon karışımları reaksiyon kuyucuklarına 17,65 µL şekilde dağıtılır. Her hasta için DNA örneğinden 2,35 µL (konsantrasyonu 3-6ng/µL olacak şekilde dilüe edilerek) alınıp her bir reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna eklenir. Her reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna 2,35 µL Mixed standart, bir kuyucuğuna 2,35 µL DNase-free su eklenir.

BRAF gen mutasyonları için PCR karışımı Tablo 23 te gösterilmiştir.

Tablo 23: *BRAF* gen mutasyonları için PCR karışımı

Reaktifler	Miktar
V600 Reaksiyon Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	17,5 µL
<i>BRAF</i> Taq DNA Polimeraz (reaksiyon kuyucuğu başına)	0,2 µL
Toplam	17,7 µL

Reaksiyon karışımı reaksiyon kuyucuklarına 17,7 µL olacak şekilde dağıtılır. Her hasta için DNA örneğinden 2,5 µL (konsantrasyonu 2-15 ng/µL olacak şekilde seyreltilir ve bir reaksiyon kuyucuğuna eklenir. Reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna 2,5 µL *BRAF* Mixed Standart (PC), bir kuyucuğuna 2,5 µL DNase-free su eklenir.

HER2 gen mutasyonları için PCR karışımı Tablo 24 te gösterilmiştir.

Tablo 24: *HER2* gen mutasyonları için PCR karışımı

Reaktifler	Miktar
Reaksiyon Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	35 µL
<i>HER2</i> Enzyme Karışımı(reaksiyon kuyucuğu başına)	0,3 µL
Toplam	35,8 µL

Tüm reaksiyon karışımları için bir karışım, toplam 3 karışım hazırlanır ve her karışım miktarı; hasta sayısı, negatif kontrol, pozitif kontrol dikkate alınarak belirlenir. Tüm reaksiyon karışımları reaksiyon kuyucuklarına 35,8 µL olacak şekilde dağıtılır. Her hasta için DNA örneğinden 5 µL (konsantrasyonu 2-3ng/µL olacak şekilde dilüe edilerek) alınıp her bir reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna eklenir. Her reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna 5 µL DNase-free su ve bir kuyucuğuna 5 µL pozitif kontrol eklenir.

PIK3CA gen mutasyonları için PCR karışımı Tablo 25 te gösterilmiştir.

Tablo 25: *PIK3CA* gen mutasyonları için PCR karışımı

Reaktifler	Miktar
Reaksiyon Karışımı (reaksiyon kuyucuğu başına)	20,0 µL
<i>PIK3CA</i> Taq DNA Polimeraz (reaksiyon kuyucuğu başına)	0,2 µL
Toplam	20,2 µL

Tüm reaksiyon karışımları ayrı tüplerde olmak üzere toplam 8 karışım hazırlanır ve her karışım miktarı; hasta sayısı + *PIK3CA* Mixed Standard + negatif kontrol dikkate alınarak belirlenir. Tüm reaksiyon karışımları reaksiyon kuyucuklarına 20,2 µL olacak şekilde dağıtılır. Her hasta için DNA örneğinden 5 µL (konsantrasyonu 10-15ng/µL olacak şekilde dilüe edilerek) alınıp her bir reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna eklenir. Her reaksiyon karışımının bir kuyucuğuna 5 µL *PIK3CA* Mixed Standard, bir kuyucuğuna 5 µL DNase-free su eklenir.

2.1.4.4 PCR protokolleri

EGFR, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* ve *HER2* genleri için PCR protokolü tablo 26 ve tablo 27 de özetlenmiştir.

Tablo 26: *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* genleri PCR protokolü

Aşama	Isı	Süre	Siklus
1	95 °C	5 dakika	1
2	95 °C 64 °C 72 °C	25 saniye 20 saniye 20 saniye	15
3	93 °C 60 °C 72 °C	25 saniye 35 saniye (Veri toplama) 20 saniye	31

Tablo 27: *HER2* geni PCR protokolü

Aşama	Isı	Süre	Siklus
1	95 °C	5 dakika	1
2	95 °C 64 °C 72 °C	25 saniye 20 saniye 20 saniye	15
3	93 °C 60 °C 72 °C	25 saniye 35 saniye (Veri toplama) 20 saniye	28

2.1.4.5 Verilerin analiz yöntemleri

PCR esnasında mutasyon bölgelerine ve kontrol bölgelerine spesifik Taqman problemlerinin floresan ışıkları (FAM,HEX/VIC) detekte edilir. PCR sonunda her kuyucuk için bir Ct (cycle threshold) değeri belirlenir. Hastaya ait DNA'nın bulunduğu kuyucuktaki Ct değeri negatif kontrol, pozitif kontrol, standartlar ve eksternal kontroller dikkate alınarak değerlendirilir. ΔCt cut-off değeri olguya ait internal kontrol ile olguya ait hedef mutasyon Ct değerinin

mutlak farkı olarak değerlendirilir. Fark belirtilen değerden küçük ise pozitif büyük ise negatif olarak değerlendirilir. Analiz sonunda hastaya ait örnekte mutasyon var veya yok şeklinde kalitatif bir sonuç elde edilir. Analizler internet üzerinden on-line analiz yazılımı kullanılarak yapılır.

EGFR, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* ve *HER2* genleri için mutasyon analizleri tablo 28-33 te gösterilmiştir.

Tablo 28: *EGFR* geni mutasyon analizi

Mutasyon		19-Del	L858R	T790M	İnsersiyonlar	G719X	S768I	L861Q
Kuvvetli Pozitif	Mutant Ct	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26
Zayıf pozitif	Mutant Ct	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$
	ΔCt cut-off	12	11	7	9	7	8	8
Negatif	Mutant Ct	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 28$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$

Tablo 29: *KRAS* geni mutasyon analizi

Mutasyon		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Kuvvetli Pozitif	Mutant Ct	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26
Zayıf pozitif	Mutant Ct	$26 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$
	ΔCt cut-off	9	10	11	10	9	10	9	10	9	10	9
Negatif	Mutant Ct	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$

Tablo 30: *NRAS* geni mutasyon analizi

Mutasyon		1	2	3	4	5	6	7
Kuvvetli Pozitif	Mutant Ct	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26
Zayıf pozitif	Mutant Ct	$26 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$
	ΔCt cut-off	9	10	10	11	9	11	9
Negatif	Mutant Ct	$Ct \geq 28$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 28$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$

Tablo 31: *BRAF* geni mutasyon analizi

Mutasyon		V600
Kuvvetli Pozitif	Mutant Ct	Ct <26
Zayıf pozitif	Mutant Ct	$26 \leq Ct < 28$
	ΔCt cut-off	9
Negatif	Mutant Ct	$Ct \geq 28$

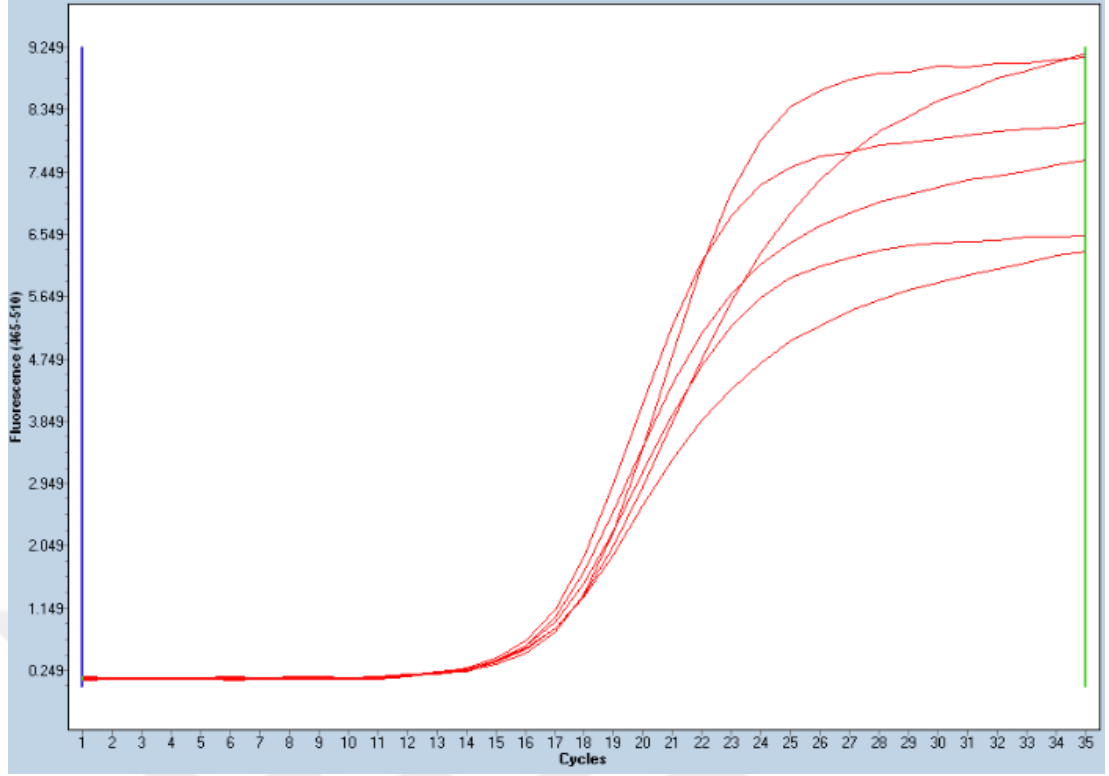
Tablo 32: *HER2* geni mutasyon analizi

Mutasyon		1	2	3
Kuvvetli Pozitif	Mutant Ct	Ct <25	Ct <26	Ct <25
Zayıf pozitif	Mutant Ct	$25 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$25 \leq Ct < 29$
	ΔCt cut-off	11	12	12
Negatif	Mutant Ct	$Ct \geq 28$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$

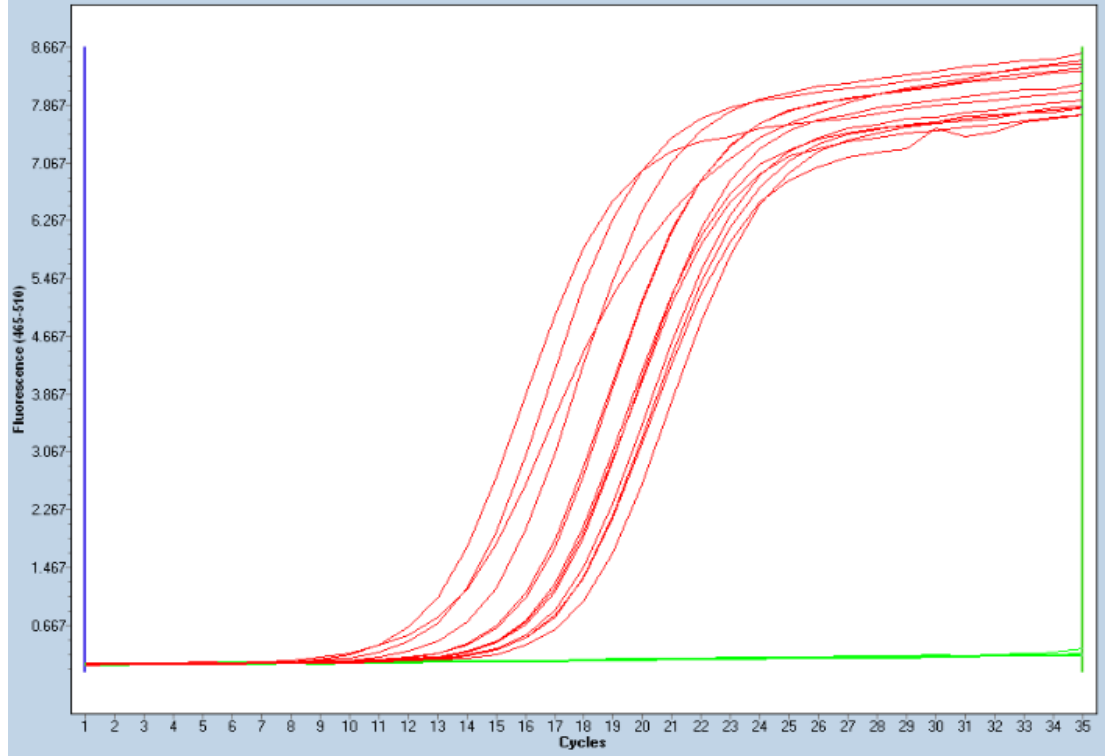
Tablo 33: *PIK3CA* geni mutasyon analizi

Mutasyon		H1047R	H1047L	E542K	E545K	E545D
Kuvvetli Pozitif	Mutant Ct	Ct <25	Ct <26	Ct <25	Ct <26	Ct <26
Zayıf pozitif	Mutant Ct	$25 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 29$	$25 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$	$26 \leq Ct < 29$
	ΔCt cut-off	11	12	12	12	12
Negatif	Mutant Ct	$Ct \geq 28$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$	$Ct \geq 29$

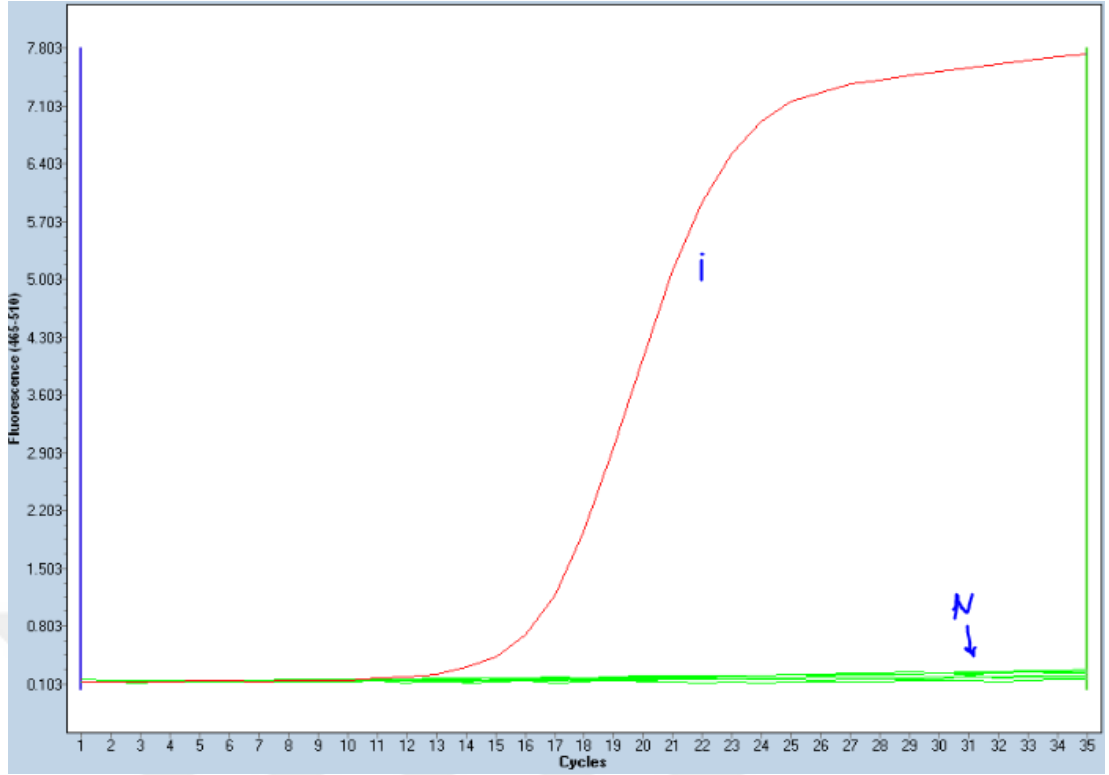
Çalışma sonucu elde edilen Eksternal Kontrol, İnternal kontrol, Pozitif olgu örneği, Negatif olgu örneği, Grup çalışma toplu görüntüsü ve Cobas z Gerçek zamanlı PCR cihazı Şekil 10-15'te gösterilmektedir.



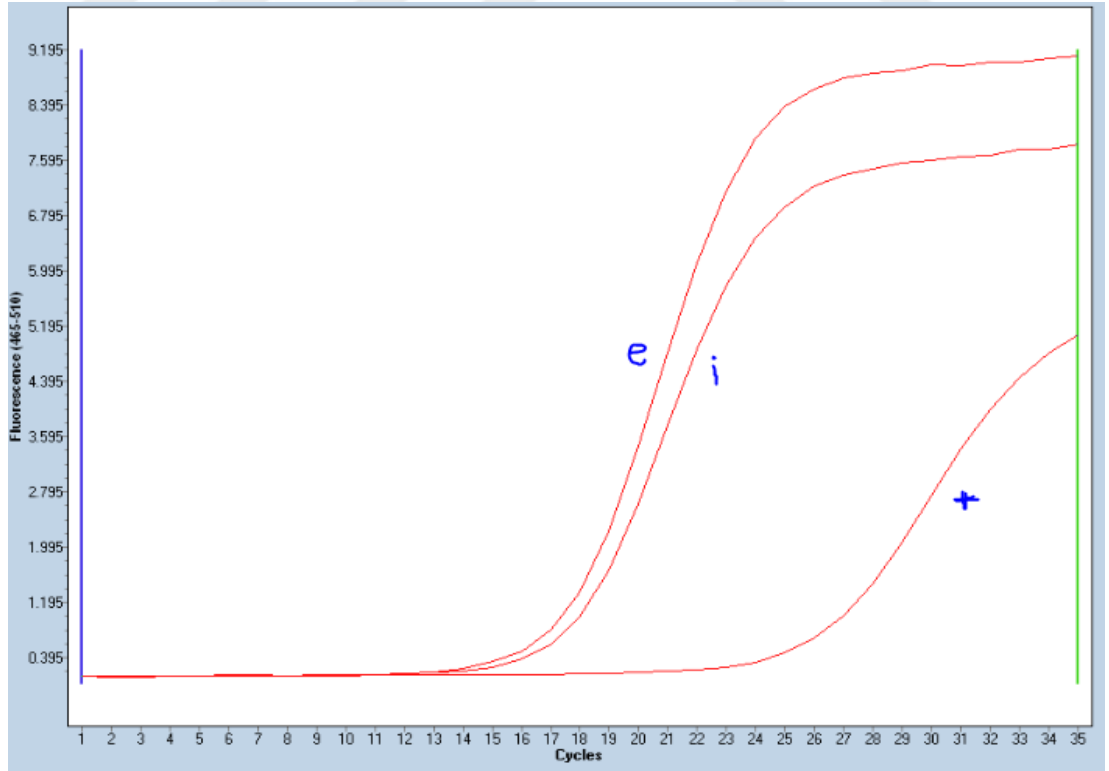
Şekil 11: Eksternal kontrol görüntüsü



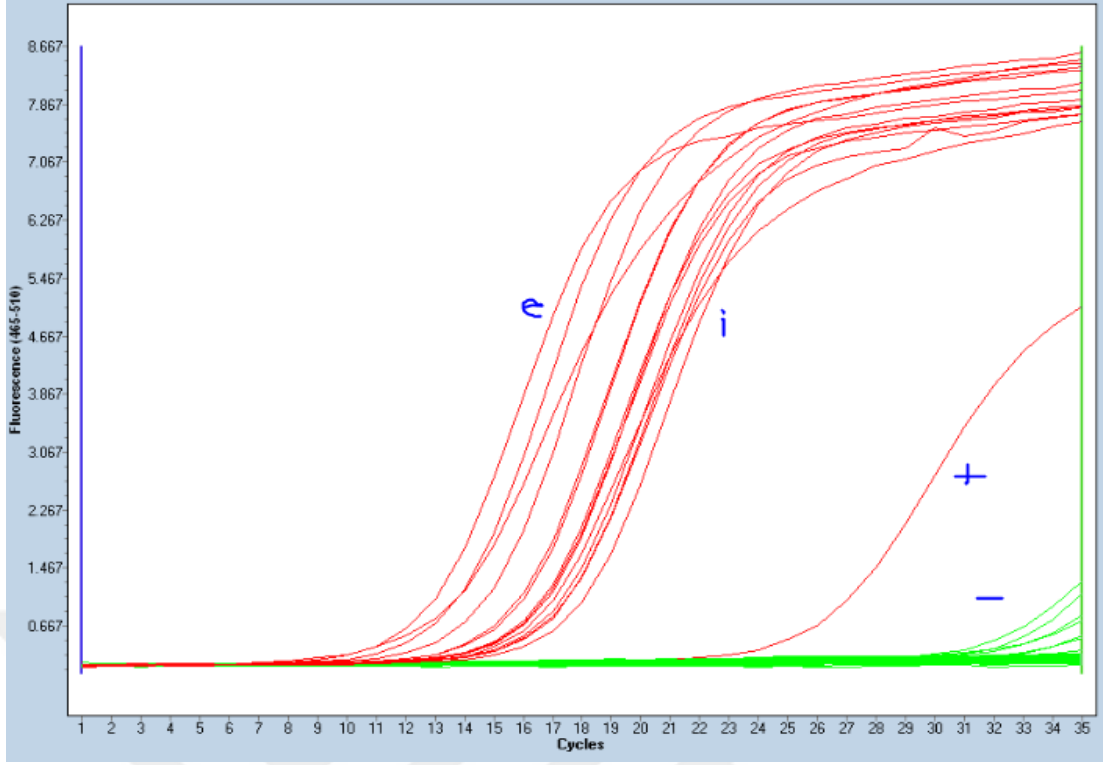
Şekil 12: İnternal kontrollere (kırmızı) ve negatif kontrollere (yeşil)



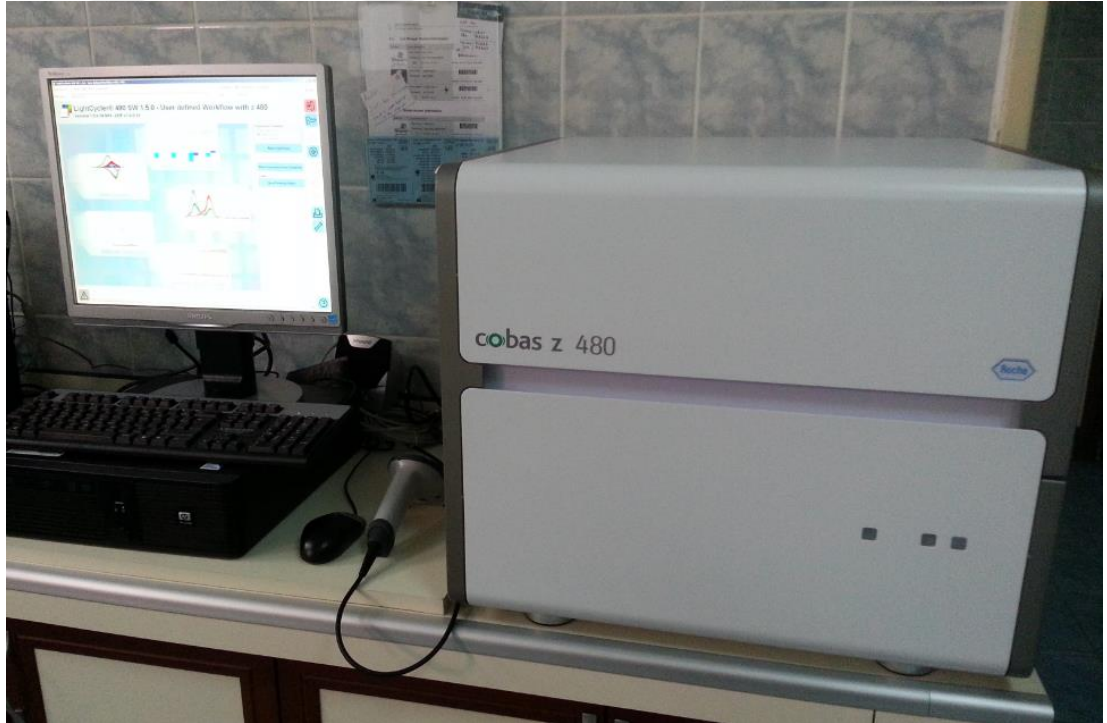
Şekil 13: Mutasyonu olmayan olgu örneği



Şekil 14: Mutasyonu olan olgu örneği



Şekil 15: Grup çalışma toplu görüntüsü

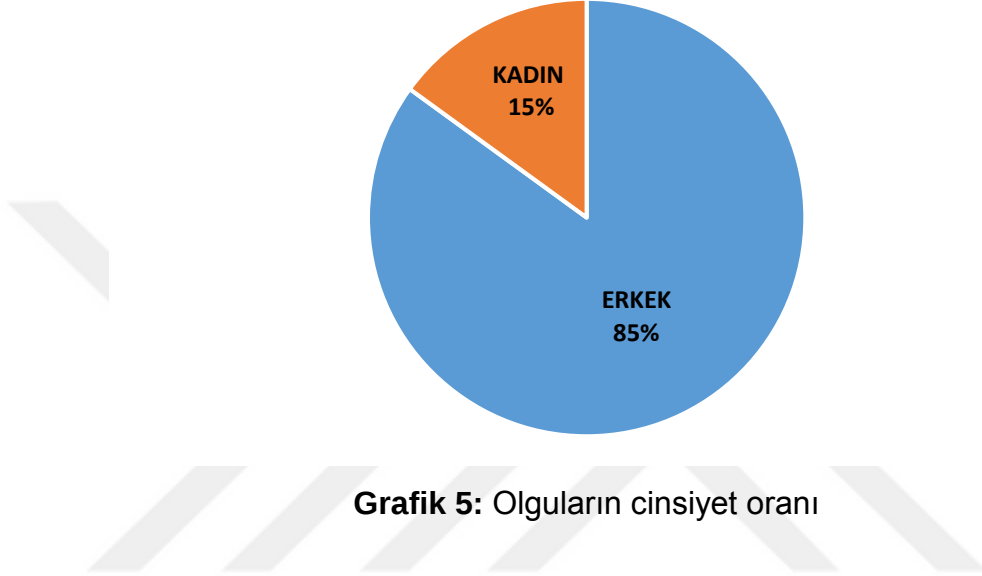


Şekil 16: Gerçek zamanlı PCR cihazı

BÖLÜM III

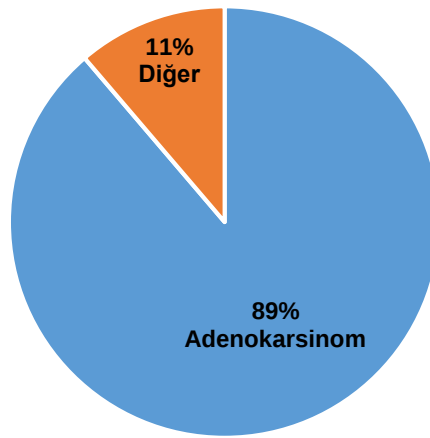
3.1 Bulgular

Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesinde 2013 ve 2014 yıllarında Küçük Hücreli Dışı Akciğeri tanısı almış toplam 80 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Olguların 68'i erkek (%85) ve 12'si kadındır (%15). Olguların cinsiyet oranı grafik 5'te gösterilmiştir.



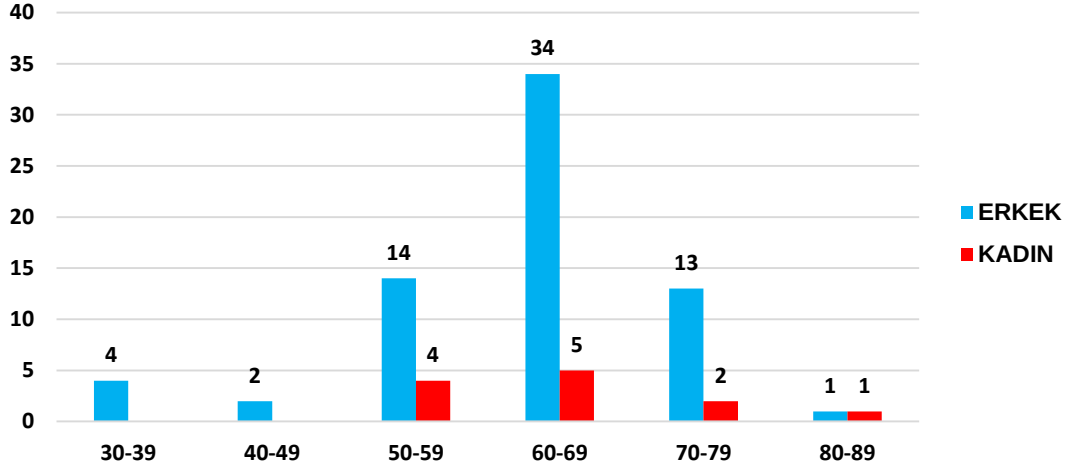
Grafik 5: Olguların cinsiyet oranı

Olguların 71'i (%89) denokarsinom 9'u (%11) adenokarsinom dışında kalan alt tiplere dâhildir. Olguların KHDAK alt tipine göre oranları Grafik 6' da gösterilmiştir.



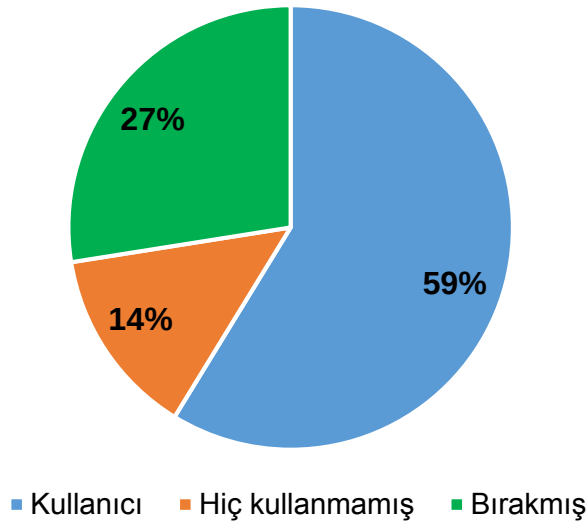
Grafik 6: Olguların KHDAK alt tipine göre oranları

Olguların ortalama yaşı erkeklerde 62, kadınlarda 64'tür. Toplam ortalama yaş 63 tür. Olguların KHDAK tanısı aldıkları yaşlara ve cinsiyetlerine göre 10'ar yıllık gruplar halindeki sayıları Grafik 7'de gösterilmiştir



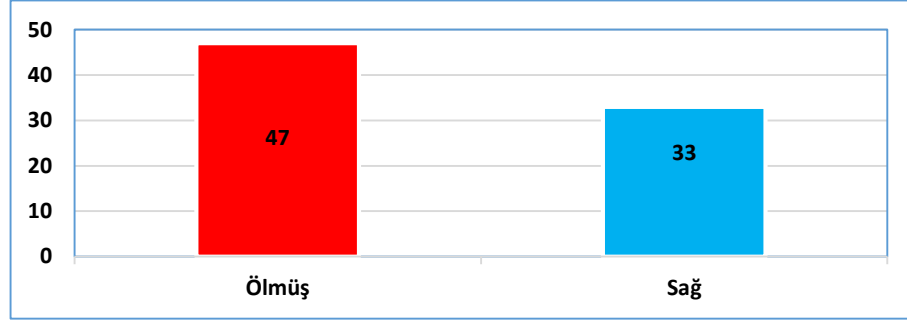
Grafik 7: Olguların tanı alma yaşları

KHDAK tanısı aldıklarında olguların 47'si sigara kullanıcısı, 22'si bırakmış ve 11'i hiç sigara içmemiş olarak kaydedilmiştir. Olguların sigara kullanım oranları Grafik 8'de gösterilmiştir



Grafik 8: Olguların sigara kullanım oranları

2015 yılı Mayıs ayı itibariyle hayatta olan ve vefat eden olguların oranları Grafik 9'da gösterilmiştir.



Grafik 9: Olgulardaki sağ kalım oranları

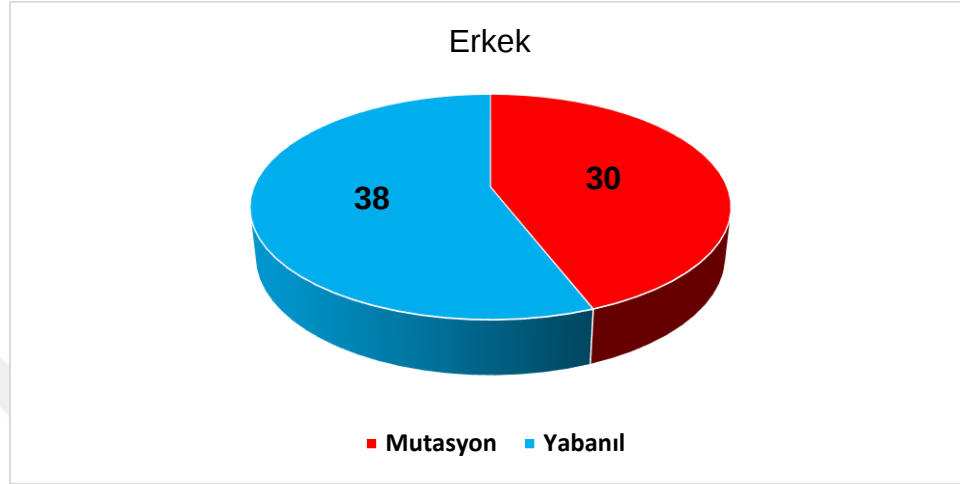
Olgulara çalışma esnasında verilen olgu numaraları, cinsiyetleri, Akciğer Kanseri alt tipi, yaşları ve araştırılan gen mutasyonları Tablo 28 de verilmiştir. Araştırılan gende mutasyonun varlığı (Mut) kısaltması ile mutasyon olmaması durumu (wt) Yabanıl tip kısaltmasıyla verilmiştir.

Tablo 34: Olgularda demografik özellikler ve tespit edilen mutasyonlar

Sıra	Olgu NO	CİNSİYET	ALT TİP	YAŞ	EGFR	KRAS	BRAF	HER2	NRAS	PIKC3A
1	60	ERKEK	ADENOKARSİNOM	32	wt	wt	wt	wt	wt	wt
2	13	ERKEK	ADENOKARSİNOM	35	wt	wt	wt	wt	wt	wt
3	73	ERKEK	ADENOKARSİNOM	35	wt	wt	wt	wt	wt	wt
4	47	ERKEK	ADENOKARSİNOM	38	wt	wt	wt	wt	wt	wt
5	36	ERKEK	ADENOKARSİNOM	48	wt	wt	wt	wt	wt	wt
6	24	ERKEK	ADENOKARSİNOM	49	wt	wt	wt	wt	wt	wt
7	3	ERKEK	ADENOKARSİNOM	50	wt	wt	wt	wt	wt	wt
8	59	ERKEK	ADENOKARSİNOM	51	wt	wt	wt	wt	wt	wt
9	19	ERKEK	ADENOKARSİNOM	55	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
10	26	ERKEK	ADENOKARSİNOM	55	wt	wt	wt	wt	wt	wt
11	76	ERKEK	ADENOKARSİNOM	55	wt	wt	wt	wt	wt	wt
12	77	ERKEK	ADENOKARSİNOM	55	wt	wt	wt	wt	wt	Mut
13	74	ERKEK	ADENOKARSİNOM	56	wt	wt	wt	wt	wt	wt
14	7	ERKEK	ADENOKARSİNOM	57	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
15	14	ERKEK	ADENOKARSİNOM	57	wt	wt	wt	wt	wt	wt
16	27	ERKEK	ADENOKARSİNOM	57	wt	wt	wt	wt	wt	wt
17	65	ERKEK	ADENOKARSİNOM	57	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
18	22	ERKEK	ADENOKARSİNOM	58	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
19	31	ERKEK	ADENOKARSİNOM	58	wt	wt	Mut	wt	wt	wt
20	53	ERKEK	ADENOKARSİNOM	60	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
21	29	ERKEK	ADENOKARSİNOM	61	wt	wt	wt	wt	wt	Mut
22	37	ERKEK	ADENOKARSİNOM	61	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
23	51	ERKEK	ADENOKARSİNOM	62	Mut	wt	wt	wt	wt	wt
24	78	ERKEK	ADENOKARSİNOM	62	Mut	wt	wt	wt	wt	wt
25	10	ERKEK	ADENOKARSİNOM	63	wt	wt	wt	wt	wt	wt

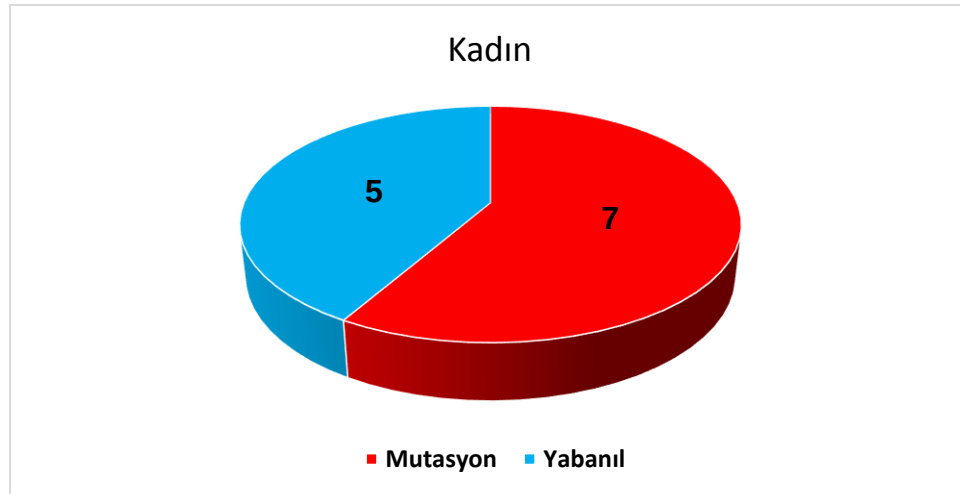
26	18	ERKEK	ADENOKARSİNOM	63	wt	wt	wt	wt	wt	wt
27	25	ERKEK	ADENOKARSİNOM	63	wt	wt	wt	wt	wt	Mut
28	69	ERKEK	ADENOKARSİNOM	63	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
29	79	ERKEK	ADENOKARSİNOM	63	wt	wt	wt	wt	wt	wt
30	9	ERKEK	ADENOKARSİNOM	64	wt	wt	wt	wt	wt	wt
31	32	ERKEK	ADENOKARSİNOM	64	wt	wt	wt	wt	wt	wt
32	43	ERKEK	ADENOKARSİNOM	64	wt	Mut	wt	wt	wt	Mut
33	50	ERKEK	ADENOKARSİNOM	64	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
34	16	ERKEK	ADENOKARSİNOM	65	wt	wt	wt	wt	wt	wt
35	6	ERKEK	ADENOKARSİNOM	66	wt	wt	wt	wt	wt	wt
36	12	ERKEK	ADENOKARSİNOM	66	wt	wt	wt	wt	wt	wt
37	52	ERKEK	ADENOKARSİNOM	66	wt	wt	wt	wt	wt	wt
38	4	ERKEK	ADENOKARSİNOM	68	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
39	8	ERKEK	ADENOKARSİNOM	68	wt	wt	wt	wt	wt	wt
40	30	ERKEK	ADENOKARSİNOM	68	wt	wt	wt	wt	wt	wt
41	34	ERKEK	ADENOKARSİNOM	68	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
42	39	ERKEK	ADENOKARSİNOM	68	wt	wt	wt	wt	wt	wt
43	23	ERKEK	ADENOKARSİNOM	69	wt	wt	wt	wt	wt	wt
44	35	ERKEK	ADENOKARSİNOM	69	wt	wt	wt	wt	wt	wt
45	64	ERKEK	ADENOKARSİNOM	69	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
46	70	ERKEK	ADENOKARSİNOM	69	wt	wt	wt	wt	wt	wt
47	72	ERKEK	ADENOKARSİNOM	69	wt	wt	wt	wt	wt	wt
48	21	ERKEK	ADENOKARSİNOM	70	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
49	46	ERKEK	ADENOKARSİNOM	70	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
50	44	ERKEK	ADENOKARSİNOM	72	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
51	54	ERKEK	ADENOKARSİNOM	72	Mut	wt	wt	wt	wt	wt
52	17	ERKEK	ADENOKARSİNOM	73	wt	wt	wt	wt	wt	wt
53	68	ERKEK	ADENOKARSİNOM	73	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
54	33	ERKEK	ADENOKARSİNOM	74	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
55	45	ERKEK	ADENOKARSİNOM	74	wt	wt	wt	wt	wt	Mut
56	55	ERKEK	ADENOKARSİNOM	75	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
57	2	ERKEK	ADENOKARSİNOM	77	Mut	wt	wt	wt	wt	wt
58	63	ERKEK	ADENOKARSİNOM	77	wt	wt	wt	wt	wt	wt
59	75	ERKEK	ADENOKARSİNOM	77	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
60	40	ERKEK	ADENOKARSİNOM	78	wt	wt	wt	wt	Mut	wt
61	56	ERKEK	ADENOKARSİNOM	85	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
62	5	KADIN	ADENOKARSİNOM	50	Mut	wt	wt	wt	wt	wt
63	61	KADIN	ADENOKARSİNOM	57	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
64	80	KADIN	ADENOKARSİNOM	57	wt	wt	wt	wt	wt	wt
65	42	KADIN	ADENOKARSİNOM	60	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
66	1	KADIN	ADENOKARSİNOM	61	wt	wt	wt	wt	wt	wt
67	15	KADIN	ADENOKARSİNOM	61	wt	wt	wt	wt	wt	wt
68	66	KADIN	ADENOKARSİNOM	64	Mut	wt	wt	wt	wt	wt
69	41	KADIN	ADENOKARSİNOM	74	wt	Mut	wt	wt	wt	wt
70	20	KADIN	ADENOKARSİNOM	79	Mut	wt	wt	wt	wt	wt
71	57	KADIN	ADENOKARSİNOM	81	wt	wt	wt	wt	wt	wt
72	67	ERKEK	DIĞER	54	wt	wt	wt	wt	wt	wt
73	48	ERKEK	DIĞER	60	wt	wt	wt	wt	wt	wt
74	28	ERKEK	DIĞER	61	wt	wt	wt	wt	wt	wt
75	11	ERKEK	DIĞER	65	wt	wt	wt	wt	wt	wt
76	58	ERKEK	DIĞER	65	wt	wt	wt	wt	wt	wt
77	71	ERKEK	DIĞER	65	wt	wt	wt	wt	wt	wt
78	38	ERKEK	DIĞER	68	wt	wt	wt	wt	wt	wt
79	62	KADIN	DIĞER	55	wt	wt	wt	wt	wt	Mut
80	49	KADIN	DIĞER	66	wt	wt	wt	wt	wt	wt

68 Erkek olgunun 30'unda mutasyon tespit edilirken 38'inde araştırılan mutasyonlar saptanmamıştır. Erkek olgulardaki mutasyon sayıları ve oranları grafik 10'da gösterilmiştir



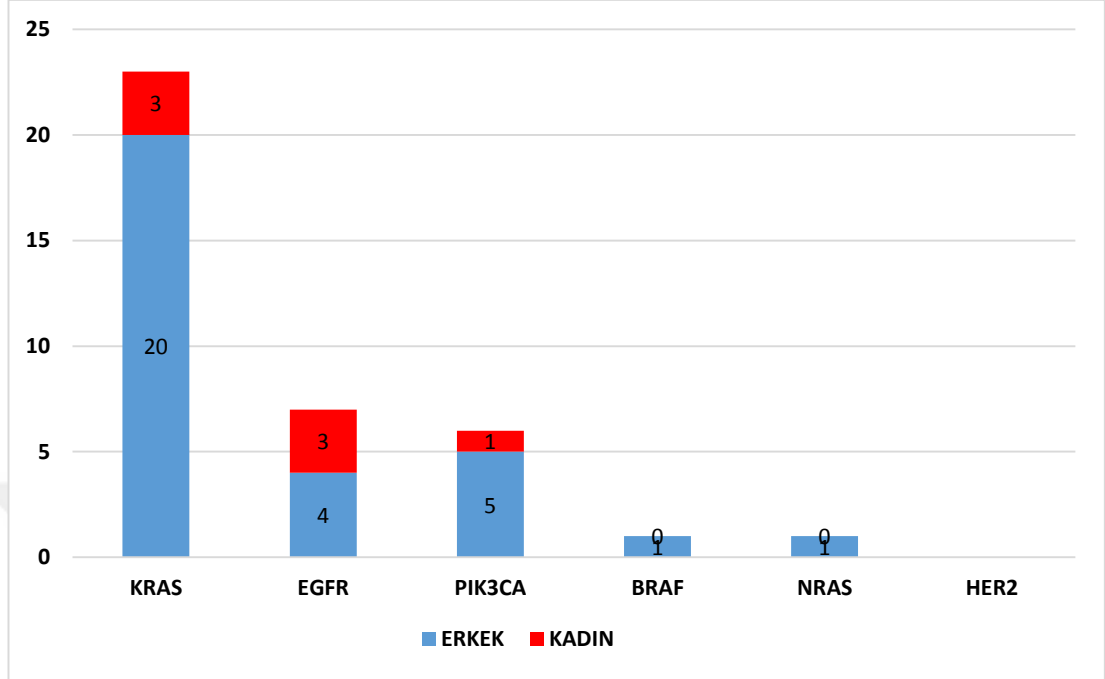
Grafik 10: Erkek olgulardaki mutasyon sayıları

12 Kadın olgunun 7'sinde mutasyon saptanırken 5'inde araştırılan mutasyonlar saptanmamıştır. Kadın olgulardaki mutasyon sayıları ve oranları grafik 11'de gösterilmiştir



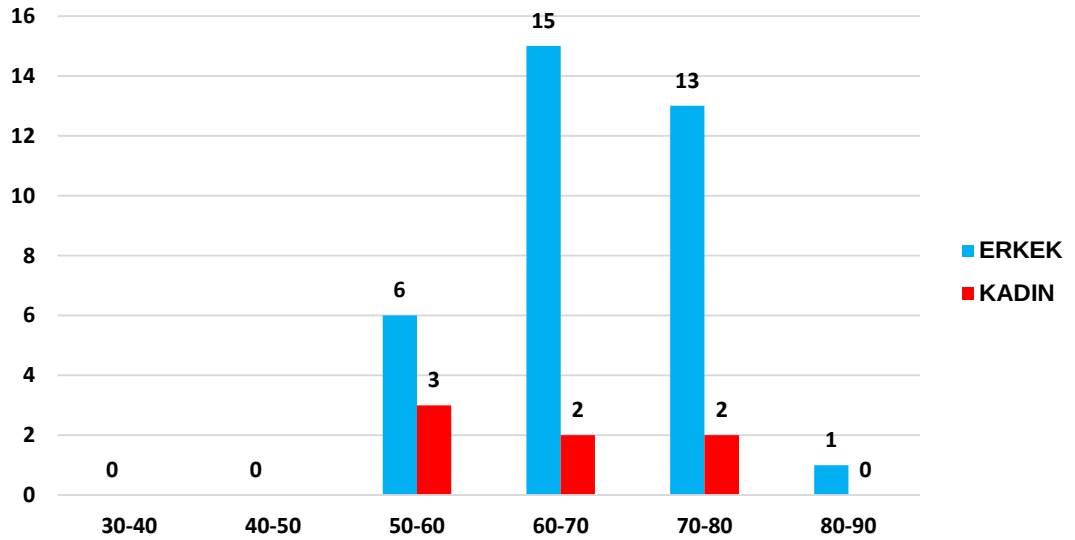
Grafik 11: Kadın olgulardaki mutasyon sayıları

Olguların cinsiyetlerine göre mutasyon sayısı grafik 10'da gösterilmiştir.



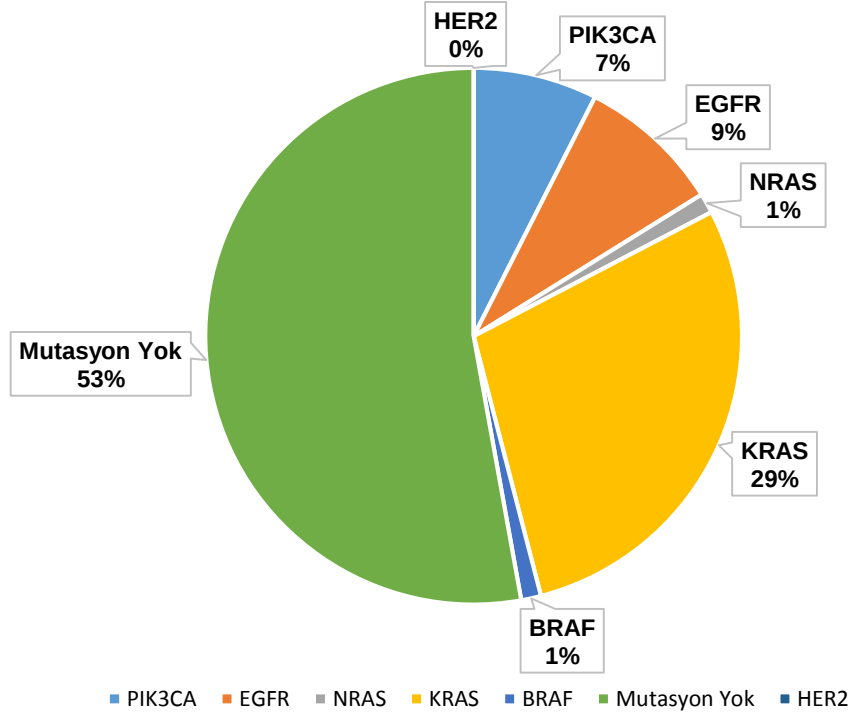
Grafik 12: Cinsiyetlere göre mutasyon sayıları

Olgularda yaşlara göre mutasyon sayıları Grafik 13'te gösterilmiştir



Grafik 13: Olgularda yaşlara göre mutasyon sayıları

Tüm olgulardaki mutasyon oranları grafik 10'da gösterilmiştir



Grafik 14: Mutasyonların tüm olgulardaki oranı

Bir olgu dışında tüm mutasyonlar Adenokarsinomlu olgularda gözlenmiştir. Mutasyon tespit edilen olgulardan 14'ü hiç sigara kullanmamış olgulardır. Olguların toplam 37'sinde toplam 38 gen mutasyonu saptanmıştır. Olgulardan sadece bir tanesinde *PIK3CA* ve *KRAS* gen mutasyonu birlikteliği gözlenmiştir. Gen mutasyonu saptanan diğer olgulardan 23'ünde *KRAS* gen mutasyonu, 7'sinde *EGFR* gen mutasyonu, 6'sında *PIK3CA* gen mutasyonu, 1'inde *NRAS* gen mutasyonu ve 1'inde *BRAF* gen mutasyonu belirlenmiştir. *HER2* gen mutasyonu hiçbir hastada gözlenmemiştir. 43 olguda araştırılan mutasyonlar saptanmamıştır.

BÖLÜM IV

4.1 Tartışma

Kanserler içinde en yüksek mortaliteye sahip olan Akciğer kanserinin yaklaşık %85'ini Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri oluşturmaktadır. Belirtilerin ancak ileri evrelerde ortaya çıkması ve kemoterapötik ilaç tedavisine direnç göstermesi prognozunu kötü seyretmesine sebep olmaktadır. Son yıllarda KHDAK tümör dokularının oluşumunda rol oynayan onkogen ürünlerinin baskılanmasına yönelik spesifik moleküllerin geliştirilmesi giderek önem kazanmaktadır. EGFR tirozin kinaz inhibitörleri KHDAK 'de hedeflenmiş tedavi için iyi bir örnek teşkil etmektedir.

Massachusetts hastanesinde 2000-2003 yılları arasında 275 ileri evre kemoterapi tedavisine direnç gösteren Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hastada tek ajan olarak Gefitinib uygulanmıştır. Hastalardan 25'inde Gefitinib tedavisine olumlu yanıt oluşmuştur. DNA dizi analizi yöntemiyle bu hastalardan 9'unun primer tümör dokusu *EGFR* geninin 28 ekzonu için taranmış ve olgulardan 7'sinde genin tirozin kinaz bölgesinde heterozigot mutasyonlar saptanmıştır. Bu olgularda normal akciğer dokularının *EGFR* geni tirozin kinaz bölgesi için mutasyon içermemesi bu bölgedeki mutasyonlarının tümör oluşumundan sonra ortaya çıktığı düşüncesini desteklemektedir. Bu bulgular sonucu *EGFR* geni tirozin kinaz bölgesinde mutasyon taşıyan KHDAK tanılı hastaların EGFR Tirozin Kinaz inhibitörleri ile tedavi edilebileceğini düşündürmüştür (51). Aynı tarihlerde Paez JG ve arkadaşları KHDAK tanılı 119 olgunun primer tümör dokularında *EGFR* gen mutasyonlarını araştırmış ve 16'sında (%13) mutasyon belirlemişlerdir ayrıca bu mutasyonlarının adenokarsinomlarda, kadınlarda ve uzak doğulularda diğer gruplara oranla daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir (52). Pao ve arkadaşların araştırmasında ise primer KHDAK'de EGFR mutasyonu oranı % 5 olarak bildirilmiştir (53). Bu ve benzeri çalışmalarla, uzak doğulu olgularda *EGFR* geni mutasyonlarının görülme sıklığının daha yüksek olduğunun gösterilmesi üzerine uzak doğulu KHDAK olgularında *EGFR* mutasyonlarının araştırılmasına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır.

KHDAK tanılı olguların *EGFR* geninin Tirozin kinaz bölgesindeki mutasyon sıklığı uzak doğulularda oldukça yüksek gözlenmektedir. Birçok

Çalışmada %17 ile % 42 arasında bir orana sahip olduğu gösterilmiştir. Paez J.G. ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada *EGFR* gen mutasyon oranı Japonlarda %28, Kosaka T ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada %40 olarak tespit edilmiştir. Shigematsu H ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları araştırmalarda Japonlarda %27, Tayvanlılarda %34 ve diğer doğu asyalılarda %30 olarak gözlenmiştir. Japon olgularda Tokumo M ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları araştırmada %32, 2006 yılında Sugio K ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada %42, Nakatani K ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı araştırmada %27, Suzuki M ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada %25, Ichihara S ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada %38 oranında *EGFR* gen mutasyonu saptanmıştır. Bae NC ve arkadaşlarının Koreli olgularda, Wu Li-Yong ve arkadaşlarının Çinli olgularda ve Han Sae-Won ve arkadaşlarının Koreli olgularda yaptıkları araştırmalarda sırasıyla %17, %30, %23 oranında *EGFR* geni tirozin kinaz bölgesi mutasyonu saptanmıştır (52-65). Doğu asya toplumlarında ortalama olarak yaklaşık %30 oranı gözlenmektedir ve bizim çalışmamızdaki %8,7 oranından belirgin şekilde farklıdır. Bu farklılığın etnik kökene dayalı olduğunu düşünmekteyiz.

Amerika Birleşik Devletlerinde Paez J.G. ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada *EGFR* gen mutasyon oranı %2, Pao W ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %5 olarak bulunmuştur. 2005 yılında Shigematsu H ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda Amerika Birleşik Devletlerinde %14, Avustralya’da %8 ve diğer batı toplumlarında %8 oranında tespit edilmiştir. Murray S ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları araştırmalarda Yunanistan’da %12 ek cumhuriyetinde %30 oranında *EGFR* gen mutasyonları tespit edilmiştir (52-65). Diğer birçok çalışmada da benzer oranlar tespit edilmiş olup batı toplumlarında ortalama olarak yaklaşık %10 oranı gözlenmektedir. Bizim alışmamızda incelenmiş olan 80 olgudan yedisinde (7/80) yaklaşık %9 oranında *EGFR* geninde mutasyon belirlenmiştir. Belirlenen bu oran diğer batı toplumlarında KHDAK’li olgularda yapılmış olan çalışmalarda belirlenmiş olan oranlara benzerlik göstermektedir. Beyaz ırka mensup olgularda mutasyon sıklıklarının benzer olabileceğini düşünmekteyiz.

Suudi kökenli KHDAK olgularını çalışan Al-Kuraya ve arkadaşları EGFR gen mutasyonların oranını % 2,9 olarak belirlenmişlerdir (52-65). Yapılan az sayıdaki araştırma Arap kökenlilerde *EGFR* gen mutasyon oranının %2-5 oranında olduğunu göstermektedir ve bizim EGFR gen mutasyonu oranımızdan farklılık göstermektedir. Sami ırkına mensup olan Araplarda mutasyon sıklığının farklı olmasının mümkün olabileceğini düşünmekteyiz.

EGFR gen mutasyonunun toplumdan topluma farklı sıklıklarda gözlenmektedir. Bunun sebebi olarak başta ırksal farklılıkların ve tütün ürünü kullanımının buna sebep olabileceğini düşünmekteyiz. Tütün ve tütün ürünü kullanım alışkanlıklarının toplumdan topluma farklılık göstermesi kullanılan tütünün kalitesi, tütün dumanına maruziyet süresi, kullanan kişilerdeki cinsiyete göre dağılım, tütün kullanımına başlama yaşı gibi birçok tütün kullanım alışkanlığının önemli etkenler olabileceğini düşünmekteyiz. Yaşam tarzı farklılıklarının ve toplumların beslenme alışkanlıklarının diğer bir unsur olabileceğini düşünmekteyiz. Asyalı ve Batılı toplumlar belirgin şekilde farklı beslenme alışkanlıklarına sahiptir, zararlı veya bol miktarda alınan belli besinlerin tümör oluşumunda belli genetik mekanizmaları bozarak bazı genlerdeki mutasyon sıklığının artmasına sebep olabileceğini tahmin etmekteyiz., radon maruziyetidir, kömür dumanı, hava kirliliği, asbest ve Akciğer kanserinde tütün kullanımı dışında birçok etiyolojik faktör tespit edilmiştir ve bu faktörler; kapalı alanda tütün dumanına maruz kalma, pişirme yağı buharı diğer mesleki kanserojen maruziyeti olarak gösterilmektedir (66). Fakat tüm bu etkenlerin mutasyon sıklıklarındaki farkları açıklamakta yetersiz kalmaktadır.

EGFR, *MET* ve *ALK* gibi birçok büyüme faktör reseptöründen aldığı sinyal iletimini aktaran çift yönlü anahtar gibi işlev gören RAS proteinlerine meydana gelen anormallikler başta Gastrointestinal sistem kanserleri olmak üzere birçok kanserde kendini göstermektedir. *KRAS* gen mutasyonları sonucu oluşan *KRAS* onkoproteinleri Akciğer kanserlerinde daha çok Asyalı olmayan sigara kullanıcılarında gözlenmektedir. Asya kökenlilerde %5- %15 civarında tespit edilen *KRAS* gen mutasyonları Asya kökenli olmayan özellikle beyaz ırkta %25-%50 civarında gözlenmektedir ve kötü prognoz göstergesi olarak gösterilmektedir (67,68).

Billah Shahreen ve arkadaşlarının 2011 yılında Amerika Birleşik devletlerinde yaptıkları araştırmada 174 olgunun 41'inde *KRAS* gen mutasyonu tespit edilmiş ve oran %23,6 olarak saptanmıştır (69). Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupada yapılmış birçok çalışma *KRAS* gen mutasyon oranını %20-%40 arasındadır ve bizim çalışmamızda bu oran aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Beyaz ırka mensubiyet sebebiyle oranların benzer çıkmasının olağan olduğunu düşünmekteyiz.

EGFR gen mutasyonlarının aksine *KRAS* gen mutasyon oranı Asyalılarda düşüktür. Batı toplumlarında % 35-40 larda bir sıklıkta görülebilen *KRAS* gen mutasyonları Asyalılarda %10 lar seviyesinde tespit edilmektedir. *EGFR* gen mutasyon sıklığına benzer şekilde *KRAS* gen mutasyonlarında da toplumdan topluma farklı oranların gözlenmesi sigara kullanımı, hava kirliliği, mesleki karsinogen maruziyeti gibi birçok dış etki ve etnik köken ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır fakat henüz bu farklılık tam olarak anlaşılamamıştır (70).

NRAS mutasyonlarıyla ilgili 2013 yılında Kadoaki Ohashi ve çok sayıdaki Amerikalı, Japon, Alman ve İspanyol araştırmacının ortaklaşa yaptıkları bir çalışmada 4562 olgunun 30'unda (%0,7) *NRAS* gen mutasyonu tespit edilmiştir (71). Bu sonuç bizim bulduğumuz oran (%1,2) ile benzerdir. Sonucumuz beyaz ırka mensubiyet sebebiyle benzer bulunmuştur fakat örnek sayımızın bu çalışmaya bakıldığında çok düşük olmasına bağlı olarak yüksek bir sonuç elde etmemize sebep olduğunu düşünmekteyiz.

Kanser oluşumuna sebep olan proteinlerin önemli bir kısmı protein kinaz olarak fonksiyon görmektedir. Mutasyonlar nedeniyle bu proteinlerin aktivitelerinin değişmesi hücre sinyal yollarında bozulmalara sebep olmakta hücre çoğalması, sağkalımı ve invazyonunda önemli anormallikler meydana getirmektedir. Kanser patogenezinde rol oynayan en önemli sinyal yollarından birisi de fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI3K) sinyal yolağıdır. PI3K'lar içinde özellikle sınıf IA PI3K'ların kanser patogenezinde rol oynadıkları bilinmektedir. Sınıf IA PI3K'ların enzimatik fonksiyonundan temel olarak katalitik domaini p110 α izoformu sorumludur. PIK3CA geni tarafından kodlanmaktadır (72). Literatürde PIK3CA geninin KHDAK dâhil pek çok kanser türünde mutasyona uğradığı bildirilmektedir. Çalışmamızda KHDAK

olgularında PIK3CA mutasyon oranı %7,5 olarak tespit edilmiştir ve bu literatürde bildirilen ortalama oranların yaklaşık iki katıdır. Bu oran farkının ırk içi genetik farklılıklardan ve/veya beslenme alışkanlığı gibi toplumlara özgü farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Son yıllarda, bu gen mutasyonları sonucu oluşan onkoproteinleri hedefleyen terapötik ajanların geliştirilmesi üzerinde ilerlemeler kaydedilmiştir ve bu amaç ile bu mutasyonların kinaz aktivasyonuna etkilerini değerlendirebilmek için in vitro çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Eğer bu değişimlerin işlevsel önemi aydınlatılırsa olguların %5-10 gibi bir bölümünde hedefli tedavi şansının gündeme gelebileceğini düşünmekteyiz.

Mutlu Doğan ve arkadaşları 2014 te Türkiye’de ileri evre KHDAK’de EGFR, KRAS ve BRAF mutasyonlarının değerlendirildiği ilk çalışma olarak belirttikleri araştırmada 42 olgu mutasyonlar bakımından taranmış ve EGFR mutasyon oranı %7,1, KRAS mutasyon oranı %4,7, BRAF mutasyon oranı %2,3 olarak tespit edilmiştir (73). KRAS mutasyon oranı aynı mutasyonlar araştırılmasına rağmen literatürle ve bizim çalışmamızla önemli farklılık göstermektedir. Çoğunlukla KRAS gen mutasyonları kodon 12/13 te daha sıklıkla gözlenmektedir fakat bu çalışmada kodon 12/13 mutasyonları gözlenmemiştir. Sadece kodon 61 mutasyonları gösterilmiştir.

Çalışmamıza örnek olarak gösterdiğimiz diğer çalışmaların büyük çoğunluğu DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılan araştırmalardır ve tespit edilen mutasyonların tamamı bizim çalışmamızda araştırdığımız mutasyonlarla aynıdır, bizim çalışmamızda olduğu gibi PCR yöntemiyle yapılan araştırmalar aynı mutasyonları kapsamaktadır.

Çalıştığımız mutasyonların NRAS gen mutasyonu hariç sıklıklarını karşılaştırabileceğimiz bir çalışmada Fransa da yapılmıştır. Fransa’daki çok sayıda merkezin katıldığı 10000 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri olgunun biyomarkerlerinin araştırıldığı çalışmada, F. Barlesi ve ark. Tarafından Amerikan Klinik Onkoloji Derneğinin (ASCO) 2013 Fransa toplantısında sunulmuştur. Bu çalışmada EGFR (%9,4), HER2 (%0,9), KRAS (%26,9), BRAF (%1,6), PIK3CA (%2,6) mutasyonları ve EML4-ALK füzyon geni (%4,0) oranında saptanmıştır. Bizim çalışmamızdaki oranlara PIK3CA gen mutasyonları hariç benzerlik göstermektedir (74).

Batılı olgularda yapılan birçok çalışmada bizim bulgularımıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. *EGFR* gen mutasyonu yaklaşık olarak %2-%15 aralığında saptanmıştır ve bizim bulgumuz %8,7 seviyesindedir. *KRAS* gen mutasyon oranı yaklaşık olarak %20 - %35 oranında gözlenmiştir bizim oranımız ise %28,7 dir. *BRAF*, *NRAS*, *HER2* gen mutasyonları yaklaşık olarak %0 - %5 oranında gösterilmektedir benzer şekilde bizim sonuçlarımız bu oran içerisindedir. Sadece *PIK3CA* gen mutasyon oranında literatürden farklı sonuç elde edilmiştir. *KHDAK* olgularında *PIK3CA* gen mutasyonlarının %1-%5 oranında saptandığı birçok araştırmada gösterilmiştir. Bizim bulgumuz ise %7,5'tir. Bu gen mutasyonlarının Türkiye toplumundaki sıklığının daha fazla çalışma ile gösterilmesi klinisyene tedavi seçenekleri açısından katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2014 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Dr.Sadiye Ekinci Uzmanlık Tezi olarak yaptığı "Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında *pik3ca* mutasyonlarının araştırılması" isimli çalışmada dünya literatüründeki %1-5 oranından farklı olarak ülkemizdeki *PIK3CA* gen mutasyoları oranını %7,5 olarak tespit etmişlerdir. Türkiyede konuyla ilgili yapılmış ilk çalışma olarak nitelendirdikleri bu çalışmayı bizim çalışmamız aynı oran (%7,5) ile desteklemektedir. Yapılacak daha çok çalışma ile desteklenmesi gereken bu sonuçlar ülkemizdeki *KHDAK* teşhis ve tedavisine *PIK3CA* seçeneğinin eklenebileceğini, hedeflenmiş tedavilerin gelişmesiyle yüksek mortaliteli ve kötü prognozlu bu hastalıkta tedavi başarısına %5-10 katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Ülkemizde Akciğer kanseri tanı ve tedavisi batı toplumları örnek alınarak düzenlenmektedir. Yapılacak daha çok araştırma ile toplumumuza özgü genetik değişikliklerin belirlenmesi, oranlarının saptanması ve korelasyonlarının ortaya konması klinisyene tedavide yol gösterici olacağı gibi tanıda öncelikleri belirleme noktasında önemli katkı sağlayacaktır.

BÖLÜM V

5.1 Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda, 80 KHDAK tanısı almış olguda *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* gen mutasyonları araştırılmıştır. Olguların %46,2'sinde yani 37 olguda en az bir mutasyon saptanmıştır. Olguların %8,7'sinde yani 7 olguda *EGFR* gen mutasyonu, %28,7'sinde yani 23 olguda *KRAS* gen mutasyonu, %1,2'sinde yani 1 olguda *BRAF* gen mutasyonu, %7,5'inde yani 6 olguda *PIK3CA* gen mutasyonu, %1,2'sinde yani 1 olguda *NRAS* gen mutasyonu tespit edilmiştir. *HER2* geninde mutasyon saptanmamıştır ayrıca 1 olguda *KRAS* ve *PIK3CA* gen mutasyonu birlikteliği gözlenmiştir. *PIK3CA* gen mutasyon oranı hariç sonuçlarımız literatürde belirtilen batı toplumlarıyla araştırılan mutasyonlar açısından benzerlik göstermektedir. Başta kolorektal kanserler olmak üzere birçok kanserin tanı ve tedavisinde önemli bir belirteç olarak *PIK3CA* gen mutasyonları hem doğu hem de batı toplumlarında %5'in altında bir sıklıkta gözlenmektedir. Çalışmamızda bu genin sıklığı %7,5'tir ve literatürde belirtilen sıklıkların üzerinde tespit edilmiştir. Literatürde bu gibi mutasyon sıklığı farklılıklarının etnik köken, coğrafi özelliklerin etkisi, sosyal yaşam farklılıkları, toplumlara özgü beslenme ve zararlı kimyasallara maruziyetten kaynaklandığı düşünülmüş fakat bu farklılıklar tam olarak anlaşılamamıştır.

Ülkemizde KHDAK olgularında yapılan başka bir çalışmada *PIK3CA* gen mutasyonları açısından bizim oranımızla aynı sonuç bulunmuştur. Konuyla ilgili destekleyici çalışmaların artmasıyla bu gen mutasyonlarının KHDAK tedavisi ve prognoz tayininde de klinisyenlere yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalarda, *PIK3CA* gen mutasyonları Kolorektal kanserlerde ilaç direncini gösteren bir belirteç olarak değerlendirilmesi vurgulanmaktadır. Görülme sıklığının yüksek olması sebebiyle Kolorektal kanserlerde prognoz tahmininde dikkate alınan *PIK3CA* gen mutasyonları literatürdeki sıklığının az olması sebebiyle KHDAK'inde göz ardı edilmektedir. Destekleyici çalışmalarla mutasyon sıklığının literatürdeki sıklığından yüksek olduğunun gösterilmesi ülkemizdeki KHDAK tanı ve tedavisine eklenebileceğini ve klinisyenlere yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda henüz *PIK3CA* gen mutasyonları sonucu

oluşan onkoproteinlere karşı tam olarak etkili bir baskılayıcı ajan bulunamamıştır. Bulunması durumunda ülkemizde KHDAK tanısı alan hastaların tedavisinde %5-10 oranında bir başarı artışı olabileceğini düşünmekteyiz.

Gelecekte *PIK3CA* gen mutasyonuna sahip çok sayıdaki KHDAK olgusu belirleyerek olgulara ait tüm özellikleri, tedaviye verilen cevapları sağkalım durumlarını ve benzeri unsurları karşılaştırmalı olarak araştırıp ülkemizde *PIK3CA* gen mutasyonuna sahip KHDAK'lerinin profilini ortaya koymayı planlamaktayız. Bu profilin ortaya konmasının klinisyene tanı ve tedavide önemli bir yol gösterici olabileceğini, tedavi başarısında önemli artışları beraberinde getirebileceğini düşünmekteyiz.



BÖLÜM VI

6.1 Kaynaklar

1. Canser Research UK Web Sitesi [Internet]. Birleşik Krallık. [Erişim tarihi: 13 Eylül 2014], <http://www.cancerresearchuk.org/>
2. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A et al. Moleküler Hücre Biyolojisi, 6. Baskıdan Çeviri. Geçkil H, Yeşilada Ö, Özmen M. Çeviri Editör(leri). İçinde: Kanser. Palme Yayıncılık, 2011: s. 1107-1150.
3. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144(5): p. 646-74.
4. Society, A.C., Cancer Facts and Figures 2014
5. National Cancer Institute USA Web Sitesi [Internet]. [Erişim tarihi: 2015], <http://www.seer.cancer.gov/>
6. Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, Walter, Peter; 2002, Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition.
7. Cooper, Geoffrey M., 2006, Hücre, Moleküler Yaklaşım.
8. Kumar,V., Cotran,R.S., Robbins, S.L., 2000, Temel Patoloji, 6'ıncı baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
9. Nussbaum, R.L., Mcinnes, R.R., Willard, H.F., 2006, Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi.
10. Mitelman, 1994, Choromosomes, genes and cancer, Cancer , 44: 133.
11. Lodish, Harvey, Berk, Arnold, Zipursky, S. Lawrence, Matsudaira, Paul, Baltimore, David, Darnell, James E., 2000, Molecular Cell Biology, Fourth Edition.
12. Vert, V., Kenneth, W. K., 2004, Cancer genes and the pathways they control, Nature Medicine, 10:789-799, 10p.
13. Franks, L.M., Teich, N.M., 1998, Cellular and molecular biology of cancer, Third Edition, Oxford Uni. Press.
14. Peter, Turnpenny, Sian Ellard, 2005, Emery's Elements of Medical Genetics, Twelfth Edition.

15. Kufe, Pollock, Weichselbaum, Bast, Gansler, Holland, Frei, 2003, Cancer Medicine 6.
16. Strachan, Tom, Read, Andrew, P., 1999, Human Molecular Genetics 2, Garland Science.
17. Eser S, Yakut C, Ozdemir R, et al. Cancer incidence rates in Turkey in 2006: A detailed registry based estimation. Asian Pacific J Cancer Prev 2010; 11: 1731-9.
18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61:69–90.
19. Ece T. Akciğer Kanseri Genel Bakış. Editörler Aydın A, Can G. Akciğer Kanseri Tedavi ve Bakım 1. Baskı: İstanbul, Haziran 2010
20. Travis WD. World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer. International Academy of Pathology International Association for the Study of Lung Cancer. Pathology and Genetics of tumors of lung pleura, thymus and heart. Lyon: IARC press, 2004.
21. Silvestri GA, Tanoue LT, Magolis ML. The noninvasive staging of non-smallcell of lung cancer: the guidelines. Chest. 2003, 123:147-156.
22. Tuononen K, Mäki-Nevala S, Sarhadi VK, Wirtanen A, Rönty M, Salmenkivi K, Andrews JM, Telaranta-Keerie AI, Hannula S, Lagström S, Ellonen P, Knuutila A, Knuutila S: Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma-superiority of NGS. Genes Chromosomes Cancer 2013, 52:503–511.
23. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer 7:169–181.
24. Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, Tenen DG, Kobayashi S. 2007. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. PLoS Med 4:1669–1679; discussion 1680.
25. Wu JY, Wu SG, Yang CH, Gow CH, Chang YL, Yu CJ, Shih JY, Yang PC. 2008. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20

mutations is associated with poor gefitinib treatment response. Clin Cancer Res 14:4877–4882.

26. Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB. 2012. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: Preclinical data and clinical implications. Lancet Oncol 13:e23–e31.

27. Riely GJ, Marks J, Pao W. 2009. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. Proc Am Thorac Soc 6:201–205.

28. Nanda MS, Sameer AS, Syeed N, Shah ZA, Murtaza I, Siddiqi MA, Ali A. Genetic aberrations of the k-ras proto-oncogene in bladder cancer in kashmiri population. Urol J. (2010);7:168-73

29. Watzinger F, Lion T. RAS family Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1999;<http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/Ras.html>.

30. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. Nature. (1983);302:33-7.

31. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer. (2007);7:295-308.

32. Brose M, Volpe P, Feldman M et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res 2002; 62: 6997–7000.

33. Naoki K, Chen T, Richards W et al. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. Cancer Res 2002; 62: 7001–7003.

34. Davies H, Bignell G, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 2002; 417: 949–954.

35. Kobayashi M, Sonobe M, Takahashi T et al. Clinical significance of BRAF gene mutations in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res 2011; 31: 4619–4624.

36. Brandao GD, Brega EF, Spatz A. 2012. The role of molecular pathology in non-small-cell lung carcinoma—Now and in the future. Curr Oncol 19:S24–S32.

37. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber

BL. 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62:6997–7000.

38. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949–954.

39. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, Viola P, Pullara C, Mucilli F, Buttitta F. 2011. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 29:3574– 3579.

40. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, Ladanyi M, Riely GJ. 2011. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 29:2046–2051.

41. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, Lee H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2005;65:1642–6.

42. Buttitta F, Barasi F, Fresu G, et al. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutation are mainly present in adenocarcinoma with bronhioloalveolar features. *Int J Cancer* 2006; dec 1;119:2586-2591.

43. Tomizava k, Soda k, Onozato R, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancer. *Lung Cancer*; 2011;74:139-44.

44. Liu Z., Roberts T. M., “Human Tumor Mutants in the p110alpha Subunit of PI3K”, *Cell cycle*, (2006), 5, (7).

45. Karaks B., Bachman K. E., Park B. H., "Mutation of the PIK3CA Oncogene in Human Cancers", *British Journal of Cancer* (2006) 94, 455–459.
46. Gardefors K., "The Effects of PIK3CA Mutations on the Function and Structure of the Phosphatidylinositol 3-kinase p110 α Catalytic Subunit in Breast Cancer", Project in Microbial Biotechnology, Department of Biomedicine and Surgery Division of Oncology Faculty of Health Sciences Linköpings Universitet, (2007).
47. Zhao L., Vogt P. K., "Helical Domain and Kinase Domain Mutations in p110 of Phosphatidylinositol 3-kinase Induce Gain of Function by Different Mechanisms", *PNAS*, (2008), 105, (7), 2652–2657 .
48. Dacic S. Molecular diagnostics of lung cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:623-829.
49. Hirsch FR, WynesMW, GandaraDR, Bunn PA Jr. The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *ClinCancer Res*. 2010 Oct 15;16:4909-11.
50. Cheng H, Xu X, Costa DB, Powell CA, HalmosB. Molecular testing in lung cancer: the time is now. *Curr Oncol Rep*. 2010 Sep;12:335-48.
51. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. 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): p. 2129-2139.
52. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676): p. 1497- 1500.
53. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. 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): p. 13306-13311.

54. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.* 2004;64(24): p. 8919-8923.
55. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(5): p. 339-346.
56. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, Ichimura K, Tsuda T, Yano M, Tsukuda K, Tabata M, Ueoka H, Tanimoto M, Date H, Gazdar AF, Shimizu N. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3): p. 1167-1173.
57. Sugio K, Uramoto H, Ono K, Oyama T, Hanagiri T, Sugaya M, Ichiki Y, So T, Nakata S, Morita M, Yasumoto K. Mutations within the tyrosine kinase domain of EGFR gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients with a low exposure of tobacco smoking. *Br J Cancer.* 2006;94(6): p. 896- 903.
58. Murray S, Timotheadou E, Linardou H, Vrettou AV, Kostopoulos I, Skrickova J, Papakostantinou C, Christodoulou C, Pectasides D, Samantas E, Papakostas P, Skarlos DV, Kosmidis P, Fountzilas G. Mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain and associations with clinicopathological features in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2006;52(2): p. 225-233.
59. Nakatani K, Takao M, Nishioka J, Yasuda K, Noma K, Hayashi A, Wada H, Nobori T. Association of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer with chemosensitivity to gefitinib in isolated cancer cells from Japanese patients. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2007;16(3): p. 263-270.
60. Al-Kuraya K, Siraj AK, Bavi P, Al-Jommah N, Ezzat A, Sheikh S, Amr S, Al-Dayel F, Simon R, Guido S. High epidermal growth factor

receptor amplification rate but low mutation frequency in Middle East lung cancer population. *Hum Pathol*. 2006;37(4): p. 453-457.

61. Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y, Minna JD, Gazdar AF, Fujisawa T. Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2006;106(10): p. 2200-2207.

62. Ichihara S, Toyooka S, Fujiwara Y, Hotta K, Shigematsu H, Tokumo M, Soh J, Asano H, Ichimura K, Aoe K, Aoe M, Kiura K, Shimizu K, Date H, Shimizu N. The impact of epidermal growth factor receptor gene status on gefitinib-treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(6): p.1239-1247.

63. Bae NC, Chae MH, Lee MH, Kim KM, Lee EB, Kim CH, Park TI, Han SB, Jheon S, Jung TH, Park JY. EGFR, ERBB2, and KRAS mutations in Korean non-small cell lung cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;173(2):107-113.

64. Wu YL, Zhong WZ, Li LY, Zhang XT, Zhang L, Zhou CC, Liu W, Jiang B, Mu XL, Lin JY, Zhou Q, Xu CR, Wang Z, Zhang GC, Mok T. Epidermal growth factor receptor mutations and their correlation with gefitinib therapy in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis based on updated individual patient data from six medical centers in mainland China. *J Thorac Oncol*. 2007;2(5): p. 430-439.

65. Han SW, Jeon YK, Lee KH, Keam B, Hwang PG, Oh DY, Lee SH, Kim DW, Im SA, Chung DH, Heo DS, Bang YJ, Kim TY. Intron 1 CA dinucleotide repeat polymorphism and mutations of epidermal growth factor receptor and gefitinib responsiveness in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(5): p.313-319.

66. Lam WK, White NW, Chan-Yeung MM. Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1045–1057.

67. Karachaliou, N., Mayo, C., Costa, C., Magrí, I., Gimenez-Capitan, A., Molina-Vila, M. A., & Rosell, R. (2013). KRAS mutations in lung cancer. *Clinical lung cancer*, 14(3), 205-214.

68. Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, et al. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy J Clin Oncol 2010; 28:4769-77
69. Billah, Shahreen, et al. "EGFR and KRAS mutations in lung carcinoma." Cancer cytopathology 119.2 (2011): 111-117.
70. Dearden, S., et al. "Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap)." Annals of oncology (2013): mdt205.
71. Ohashi, Kadoaki, et al. "Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations." Clinical Cancer Research 19.9 (2013): 2584-2591.
72. Yamamoto, Hiromasa, et al. "PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers." Cancer research 68.17 (2008): 6913-6921.
73. DOGAN¹, Mutlu, et al. "The Relationship Between Common EGFR, BRAF, KRAS Mutations and Prognosis in Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer with Response to the Treatment in Turkey." International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi 24.1 (2014).
74. Barlesi, Fabrice, et al. "Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts)." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY. Vol. 31. No. 15. 2318 MILL ROAD, STE 800, ALEXANDRIA, VA 22314 USA: AMER SOC CLINICAL ONCOLOGY, 2013.

6.2 Özgeçmiş

1978 yılında Sivas'ta doğdum. Orta ve lise öğrenimimi Sivas Selçuk Anadolu Lisesinde tamamladım. Ön lisans öğrenimimi Adnan Mendres Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Laboratuvar Bölümünde ve lisans eğitimimi Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. 2013 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Yabancı dilim İngilizcedir.

Elektronik Posta: mcalkskan78@hotmail.com

