



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER
KARSİNOMLARINDA BRAF VE HER2
MUTASYONLARININ
İMMUNHİSTOKİMYASAL ANALİZİ VE
KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE
İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ESİN YİĞİTBAŞI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Nesibe KAHRAMAN ÇETİN

AYDIN-2019

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER
KARSİNOMLARINDA BRAF VE HER2
MUTASYONLARININ
İMMUNHİSTOKİMYASAL ANALİZİ VE
KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE
İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. ESİN YİĞİTBAŞI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nesibe KAHRAMAN ÇETİN

AYDIN-2019

*Bu araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TTF-18033** numaralı proje olarak desteklenmiştir.*

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca büyük emeği geçen, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bugüne gelmemi sağlayan, her zaman saygı ve sevgi ile hatırlayacağım değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Nil Çulhacı, Prof. Dr. Füzuan Kacar Döger, Prof. Dr. Canten Tataroğlu, Prof. Dr. İbrahim Meteoğlu, Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim Erdoğan ve yine eğitimimde ve tez hazırlığımda büyük destek ve katkılarından dolayı tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Nesibe Kahraman Çetin'e;

Bugünlere gelmemi sağlayan, koşulsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem, babam ve kardeşime;

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan, teknisyen ve sekreter arkadaşlarıma;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Esin YİĞİTBAŞI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
TABLO DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
RESİM DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Anatomi.....	2
2.2. Embriyoloji.....	5
2.3. Histoloji.....	6
2.4. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	7
2.5. Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	8
2.6. Sınıflandırma.....	10
2.7. Evreleme.....	17
2.8. Akciğer Tümörlerinin Histopatolojik Özellikleri.....	21
2.8.1. Adenokarsinom.....	21
2.8.2. Skuamöz Hücreli Karsinom.....	25

2.8.3. Adenoskuamöz Karsinom.....	25
2.8.4. Nöroendokrin Karsinom.....	26
2.8.5. Karsinoid Tümörler.....	26
2.8.6. Büyük Hücreli Karsinom.....	27
2.9. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Moleküler Biyoloji.....	27
2.9.1. Prognostik Biyobelirteçler.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. BRAF ve HER2 İmmunhistokimyasal Çalışma Prosedürü ve Değerlendirilmesi.....	39
3.2. HER2 Floresan İn-situ Hibridizasyon Uygulanması ve Değerlendirilmesi.....	40
3.3. BRAF Pyrosekans Analizi.....	41
3.4. PCR Analizi.....	43
3.5. Pürifikasyon ve Sekanslama.....	44
3.6. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
7. ÖZET.....	77
8. SUMMARY.....	79
9. KAYNAKLAR.....	81

TABLO DİZİNİ

Tablo I: Akciğer tümörleri sınıflaması (DSÖ, 2015).....	12
Tablo II: Akciğer tümörleri TNM sınıflaması.....	18
Tablo III: Akciğer tümörleri klinik evrelemesi.....	20
Tablo IV: Minimal invaziv adenokarsinom tanı kriterleri.....	22
Tablo V: Adenokarsinoma in situ tanı kriterleri.....	23
Tablo VI: BRAF ekzon ve sekans primerleri.....	44
Tablo VII: Tümör lokalizasyonlarının dağılımı.....	48
Tablo VIII: BRAF mutasyonu bakılan 50 olgunun demografik ve histopatolojik özelliklerine göre analiz tablosu.....	55
Tablo IX: HER2 mutasyonu bakılan 50 olgunun demografik ve histopatolojik özelliklerine göre analiz tablosu.....	56
Tablo X: BRAF mutasyonu saptanan 2 olgunun demografik ve histopatolojik özellikleri.....	58
Tablo XI: HER2 mutasyonu saptanan 5 olgunun demografik ve histopatolojik özellikleri.....	58

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: BRAF sinyal yolağı.....	36
Şekil 2: HER2 sinyal yolağı.....	37
Şekil 3: KHDAK'lerinde histolojik tiplerin şematik dağılımı.....	46
Şekil 4: SHK alt tiplerinin şematik dağılımı.....	47
Şekil 5: ADK alt tiplerinin şematik dağılımı.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADK	Adenokarsinom
AJCC	Amerikan Kanser Birliği
Ark.	Arkadaşları
BHK	Büyük hücreli karsinom
BRAF	B type rapidly accelerated fibrosarcoma
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
EGFR-TKI	EGFR tirozin kinaz inhibitörleri
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
H&E	Hematoksilen&eoizin
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IASCL	Uluslararası akciğer kanseri çalışma grubu
İHK	İmmunhistokimya
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
SHK	Skuamöz hücreli karsinom
TNM	Tümör, lenf nodu, metastaz
UICC	Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği

RESİM DİZİNİ

Resim 1: SHK histolojik alt tipleri.....	58
Resim 2: ADK histolojik alt tipleri.....	59
Resim 3: HER2 FISH pozitif olgunun H&E ve İHK kesitleri.....	60
Resim 4: HER2 FISH pozitif olgunun H&E ve İHK kesitleri.....	61
Resim 5: HER2 FISH pozitif olgunun H&E ve İHK kesitleri.....	62
Resim 6: FISH negatifliği.....	63
Resim 7: İHK'sal BRAF boyanması.....	63

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri tüm dünyada erişkinlerde en sık görülen kanser türü olup, gelişmiş ülkelerde tüm kanserlerin %24'ünü, kansere bağlı ölümlerin de %20'sini oluşturmaktadır (1, 2). Akciğer kanseri, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) olarak iki ana histolojik tipe ayrılır. Kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılık açısından bu iki grup biyolojik olarak farklı davranış gösterir (3). KHDAK tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturur. KHDAK'leri arasında en sık görülen histolojik alt tipler Skuamöz Hücreli Karsinom (SHK) ve Adenokarsinom (ADK)'dur (1, 2).

Akciğer kanseri sıklığı, sigara içme, pasif sigara içiciliği, mesleki ve çevresel faktörler, genetik duyarlılık, yaş, cinsiyet ve etnik köken gibi birçok faktöre bağlıdır. KHDAK prevalansını etkileyen parametreler; çevresel ve genetik faktörleri, büyüme faktörü sinyal yollarındaki anormallikleri, tümör baskılayıcı gen yollarını, apoptoz kaçışını ve epigenetik modifikasyon mekanizmalarını içerir (4). Gen mutasyonu, delesyon ve polimorfizm gibi genetik mekanizmaların farklı bireylerin akciğer kanserine duyarlılığını belirlediği de doğrulanmıştır (5).

Akciğer kanserlerinin beş yıllık sağkalım hızı %15.9 civarında, nüks hızı ise birçok seride %30-50 civarındadır (6-9). Cerrahi tedaviler, sistemik tedavi ve radyoterapideki ilerlemelere rağmen tüm hastalar için sağkalım oranı %15-20'leri aşmamaktadır. Tanı anında hastaların yarısından fazlasının metastatik olduğu düşünülürse, ileri evre hastaların sağkalım oranı çok daha düşüktür (10). Son yıllarda akciğer kanserlerinin kapsamlı gen profilinin ortaya konması, bu tümörlerin oldukça heterojen olduğunu ispatlamıştır. Ayrıca KHDAK'larda özellikle ADK'larda çok sayıda somatik mutasyonun ortaya çıkmasını sağlamıştır (11). Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ve Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) düzenlemelerinde aktive edici mutasyonlar dahil olmak üzere, akciğer kanserlerinin moleküler patogeneze katkıda bulunan onkogenik sürücü mutasyonlarının karakterize edilmesinde ilerleme kaydedilmiştir. Bu, hedefe yönelik terapötiklerin hızlı bir şekilde gelişmesini ve KHDAK tedavisine daha kişisel bir yaklaşım getirilmesini sağlamıştır (12).

Mitojenle aktive olan protein kinaz yolağının tepesindeki bir serin / treonin kinazı kodlayan BRAF (B type Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) genindeki mutasyonlar, KHDAK'da alternatif bir onkojenik sürücü görevi görür. BRAF mutasyonları akciğer ADK tanılı hastaların yaklaşık %3-10'unda görülürken; bu mutasyonların en yaygın olanı BRAF V600E (Val600Glu) mutasyonu, akciğer ADK'ların %1-3'ünde gözlenir (13). BRAF V600E mutasyonunun prognostik etkileri net olmasa da, son çalışmalar bu mutasyonu taşıyan KHDAK'lı hastaları taşımayanlara kıyasla daha kötü klinik gidişat ve platin bazlı kemoterapiye daha düşük yanıt oranlarıyla ilişkilendirmiştir (14).

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2) mutasyonu, akciğer kanserlerinin %2-4'ünü temsil eden nadir bir somatik mutasyondur (14). HER2, ERBB reseptörü tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. HER2'nin onkojenik aktivasyonu, meme, mide, akciğer, mesane, over ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde meydana gelir (15, 16). KHDAK'da, HER2 gen mutasyonları, tirozin kinaz bölgesinin 18-21 ekzonlarında meydana gelir ve tipik olarak sigara içmeyenlerde gelişen ADK histolojisi ile ilişkilidir. HER2 hedefli tedavinin KHDAK için yararı, meme kanseri için olandan çok daha az çalışmada tanımlanmıştır (17).

Günümüzde KHDAK'ların insidansı ve moleküler yapısı bakımından toplumlar arasında farklılıklar görülmektedir. Ülkemizde KHDAK'ların mutasyon profiline dair yeterli veri bulunmamaktadır. Tedavi protokolleri Avrupa ve ABD verilerine göre düzenlenmektedir. Ülkemizde KHDAK'ların moleküler verilerinin oluşturulması, tanı ve tedavi stratejilerinin belirlenmesi ayrıca tedavi başarısının artırılması bakımından önemlidir (18).

Bu çalışmada , KHDAK'larda HER2 ve BRAF mutasyon profilinin belirlenmesi, aynı zamanda BRAF ve HER2 immunhistokimya (İHK)'sal boyanma sonuçlarının demografik ve histopatolojik veriler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1.Akciğer Anatomisi

Akciğerler intratorakal yerleşimli, sağda üç solda iki loba ayrılmış koni biçimli organlardır (19). Hemen altlarında diyafram bulunmaktadır. Erişkin bir erkekte sağ akciğer yaklaşık 625 gram, sol akciğer ise 597 gramdır. Derin bir inspirasyonda akciğerler yaklaşık 3700 cm^3 hava alır. Akciğerler hilus pulmonalis dışında tamamen visseral plevra ile sarılmıştır. Apeks, basis, üç kenar ve iki yüz içerirler (20).

Apeks pulmonalis: Birinci kostal kırıldaktan üç-dört cm üstte, boyun köküne doğru yükselir ve bu bölümünü plevra servikalis örter. Ön yüzü subklavian arter, arka yüzü ganglion servikalis inferior, birinci torakal sinirin ventral ramusu ve interkostalis superior arter; dış yüzü skalenius medius kası; iç yüzü sağda trunkus brakiosefalikus, sağda brakiosefalikal ven ve trakea, solda subklavia sinistra arteri ve sol brakiosefalika veni ile komşudur (19, 21).

Basis pulmonalis: Akciğerlerin alt yüzleri karaciğerden dolayı sağda daha fazla olmak üzere konkavdır ve diyafragmanın üstüne otururlar (19).

Kostal yüz: Toraks duvarının iç yüzüne uyan bir konveksitesi vardır (19, 20).

İç yüz: Arkada vertebral ve önde mediastinal olmak üzere iki kısımdan oluşur. Mediastinal yüzün ortasında, içinde kalbin yer aldığı impressio kardiaka denilen çukur bulunur. Bunun üst arka kısmında ise radiks pulmonalisin yer aldığı hilus vardır. Mediastinal plevranın radiks pulmonalisi sardıktan sonra iki akciğer arasından diyafragma sarkan bu uzantılarına ligamentum pulmonale denir (19, 21).

Alt kenar: Tabanı kostal yüzden ayıran keskin bir kenardır. Alt kenarlar recessus kostodiafragmatikus içine girerler. Resessusun kostal kenarından 10 cm. yukarıdadır (22).

Ön kenar: En keskin kenarlardır. Solda, kalbin ön yüzünde geniş bir çentik bırakır. Kalbin matite alanının bulunduğu bu çentiğe insisura kardiaka denir (19).

Fissur ve loblar: Akciğerler radiks pulmonalise kadar giden derin fissurlarla loblara ayrılmıştır. Visseral plevra fissurların iç yüzüne kadar uzanarak lobları birbirinden ayırır (20).

Sağ akciğer: İki fissurla üç loba ayrılır. Fissura oblika; orta ve alt lobları ayırır. Akciğer arka kenarını dördüncü torakal vertebra düzeyinde keser, mediastinal yüzü çaprazlayıp hilusun altında sonlanır. Fissura horizontalis, üst ve orta lobları birbirinden ayırır, mid-aksiller hatta fissura oblikadan başlar, dördüncü kostal kırırdağın sternal uç noktasında sonlanır (21).

Sol akciğer: Fissura oblika ile alt ve üst olmak üzere iki loba ayrılır. Fissur hilusun üst ve arka kısmından başlar, mediastinal yüzü önden arkaya çaprazlayarak hilusun altında sonlanır. Üst lob fissurun üst ve önünde, alt lob alt ve arkasında bulunur. Üst lobun insisura kardiakanın altında kalan ön bölümüne “lingula” denir (22, 23).

Radiks pulmonis: Hilustan akciğere giren ve çıkan yapıların tamamına verilen addır. Bu oluşumların her iki akciğerdeki dizilimleri farklıdır. Sağ akciğer; bronkus lobaris superior, pulmoner arter, bronkus lobaris medius ve pulmoner venleri içerirken sol akciğer; pulmoner arter, bronkus prinsipalis sinister ve pulmoner venleri içerir (21, 22).

Akciğerin damarlanması: Akciğere hem akciğeri beslemek için (vasa privata), hem de vücuttaki deoksijenize kanı temizlemek için (vasa publica) kan gelir (19, 20).

Pulmoner arter: Venöz kanı akciğerlere getirir, segmental bronkuslarla birlikte dağılır ve akciğeri besler. Bunların kapillerleri ile alveol havası arasında oksijen-karbondioksit değişimi gerçekleşir (19, 21).

Bronşial arterler: Trakeobronşial ağaç, akciğerin kendi dokusu, plevra ve pulmoner damarların duvarlarını beslerler. Sağda bir, solda iki tane bronşial arter vardır. Sağdaki çoğunlukla interkostal arterden çıkar, soldakiler aorta descendensden doğarlar (20).

Pulmoner venler: Oksijenli kanı akciğerden sol atriuma taşırlar. Her bronkopulmoner segment içinde bir ven oluşur. Bu ven bronkusun önündedir. Akciğerlerden sağda ve solda ikişer pulmoner venden çıkar. Pulmoner venler intersegmental düzeydedir (19, 20, 21).

Bronşial venler: Bronkusların büyük dallarından başlarlar. Sağ bronşial ven azigos vene; sol bronşial ven hemiazigos aksesoryus vene dökülür (20, 21).

Akciğerlerin innervasyonu: Akciğer ve visseral plevranın duyu lifleri vagus siniri içinde giderler. Ağrı duyusu yoktur. Solunumun refleks kontrolü, öksürük refleksi ve kan basıncı ayarlanmasında rol oynarlar. Parasempatikler vagus sinirinden, sempatikler ise torakal

birinci-beşinci segmentlerden gelir (19). Akciğerin lenf yolları yüzeysel ve derin iki pleksustan dökülür. Akciğer içinde küçük pulmoner nodlardan geçerek hilusa doğru yönelir. Bronkusların çevresindeki nodi lenfatiki bronkopulmonaleyi geçerek trakeabronkial nodlara ulaşır. Alveollerin duvarında lenf kanalı yoktur (20, 22, 23).

Plevra: Her bir akciğeri ayrı ayrı saran seröz zardır. Toraks duvarı, mediasten ve diyafragmanın üst yüzünü örten kısmına parietal plevra, akciğerlerin dış yüzünü saran kısmına visseral plevra denir. İkisi arasındaki boşluğa “kavum pleuralis” denir. Parietal plevranın kısımları; kostal plevra, mediastinal plevra, servikal plevra, diyafragmatik plevra gibi isimler alırlar (21, 22).

Plevranın arter ve venleri: Parietal plevrayı, interkostal arter, torasika interna arteri, ve frenika superior arterden çıkan dallar besler. Venleri aynı isimli venlere dökülür. Visseral plevrayı bronşial arterin dalları besler. Venleri pulmoner venlere dökülür (19, 20, 21).

Plevranın sinirleri: İnterkostal sinirler, torakoabdominal sinir, subkostal sinir ve frenik sinir dalları parietal plevranın duyusunu taşırlar. Dokunma ve ısı uyarıları parietal plevrada ağrı oluşturur. Visseral plevranın sinirleri plexus pulmonalisten gelir. Visseral plevranın ağrı duyusu yoktur. (19, 20, 24, 25)

Akciğerin segmental anatomisi, radyologlar, bronkoscopistler ve patologlar için lezyonların yerini belirlemede önemlidir (26).

2.2.Embriyoloji

Primordial akciğerler dördüncü haftanın ortalarında primordial farinksin zeminindeki laringotrakeal oluktan ventral bir tomurcuk olarak gelişmeye başlar (27). Oluk derinleşerek bir laringotrakeal divertikül oluşturur ve bu divertikül de, trakeözefageal katlantılar ile ön barsaktan ayrılarak trakeözefageal septumu oluşturur. Bu bölme özofagus ve laringotrakeal tüp oluşumu ile sonuçlanır. Bronş kıkırdağı, düz kas ve diğer bağ dokuları, etrafındaki mezenşimden türetilir (28). Laringotrakeal tübün distal ucunda, dördüncü haftada bir akciğer tomurcuğu gelişerek beşinci haftanın başlarında iki bronşial tomurcuğa ayrılır. Bronşial tomurcuklar büyüyerek primer bronşu oluşturur. Her bir primer bronştan da sekonder bronşları oluşturmak üzere iki yeni bronş tomurcuğu meydana gelir (29, 30).

Akciğer gelişimi dört evreye bölünür. “Psödoglandüler Evre” (5-17. haftalar arası) bronşlar ve terminal bronşioollerin oluşumunu içerir. İkinci evre “Kanaliküler Evre” (16-25. haftalar arası) olup bu evrede bronş ve terminal bronşioollerin lümenleri büyür, respiratuvar bronşiooller ve alveoler kanallar gelişerek akciğer dokusu yüksek oranda damarlı hale gelir. “Terminal Kese Evresi” (24. haftadan doğuma kadar) alveolar kanallardan terminal keselerin (primordial alveoller) oluşumunu içerir (28). Başlangıçta kübik epitel ile kaplı olan terminal keseler 26. hafta civarında epitelin incilmesi ile skuamöz epitele dönüşür. Geç fetal dönemden akciğerlerin olgunlaştığı sekizinci yaşa kadar süren “Alveolar Evre” ise akciğer gelişiminin son evresidir. Bu evrede respiratuvar bronşioollerin ve ilkel alveollerin sayısı artar (31, 32).

Akciğer gelişme evrelerinde ilerlerken, fizyolojik mekanik kuvvetler ve humoral faktörler tarafından modifiye edilmiş karmaşık bir dizi epitelyal-mezenkimal reaksiyonlar meydana gelir. Bu olaylar ana genler (homeobox genleri gibi), nükleer transkripsiyon faktörleri, hormonlar ve büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler gibi diğer mediatörler tarafından denetlenir (26, 27).

2.3.Histoloji

Akciğerler intratorakal yerleşimli, sağda üç solda iki olmak üzere loblara ayrılmış organlardır. Loblar kendi içinde bronkopulmoner segmentlere bölünür. Sağ akciğer on, sol akciğer ise dokuz bronkopulmoner segmentten oluşur (23, 31).

Her lob plevra ile çevrelenmiş fissurlarla ayrılır. Segmentlerin ise bu özelliği bulunmaz. Havayolları, duvarında kas ve döşeyici epitel bulunan tübüler yapılardan oluşur. Bronşlar, çapı bir mm.’den büyük, duvarında kıkırdak bulunan hava yollarıdır. Kıkırdak, bronşların kollabe olmasını önler (33). Bronşiooller ise çapı bir mm.’den küçük hava yollarıdır ve duvarında kıkırdak bulunmaz. Terminal bronşiooller respiratuvar bronşioollerin proksimalinde yer alır ve respirasyona katılmaz. Respiratuvar bronşiooller alveoller ile devam ederler (23). Hava yollarını döşeyen hücreler; bazal hücreler, Kulchitsky hücreleri, silyalı hücreler, seröz hücreler, Klara hücreleri, goblet hücreleri, intermediate hücreler ve fırçamsı hücrelerdir (34). Terminal bronşiole yaklaştıkça, goblet hücreleri ve silyalı hücrelerin sayısı azalır, Klara hücreleri ise artar, mukoza daha az kolumnar daha kuboidal bir görünüm kazanır (31, 35). Klara hücrelerinin sekretuvar fonksiyonları olup bronşiooller hasardan sonra

progenitör hücre gibi hareket ederler. Kulchitsky hücreleri, nöroendokrin sistemin bir parçasıdır ve sıklıkla dallanma alanlarında görülür. Submukozal glandlar, seröz ve muköz hücrelerden oluşur, geniş hava yollarında bulunurlar (34, 35). Geniş hava yollarının duvarlarında ayrıca ganglion, sinir ve bronşial arterler bulunur. Lambert's kanalları, bronşioler ve komşu alveoler parankim arasında ilişki sağlar (36).

Akciğerin fonksiyonel subünitleri olan asinuslar, gaz alışverişinin yapıldığı yerlerdir (36). Alveoller, skuamöz (tip 1 pnömosit) ve kuboidal (tip 2 veya granüler pnömosit) epitelyal hücreler ile döşeli olup, gaz alışverişi tip 1 hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir. Tip 2 hücreler tip 1 hücreler için progenitördür; sürfaktan üretir ve travmadan sonra sayıları artar (31, 35, 36). Makrofajlar alveol yüzeyinde sıklıkla görülür. Alveoler duvar (septa); kapiller damar endoteli, bazal membran ve çevre interstisyel alan ile alveoler epitel ve alveoler makrofajlardan oluşur. Alveoler duvarda çok sayıda Kohn porları bulunur (31, 36). İnterstisyel alan; kollajen, elastik lifler, mezenkimal hücreler ve birkaç inflamatuvar hücre içerir. Yetişkinlerde bu alan normalde belirgin değilken çocuklarda interstisyel genişleme ve artmış sellülarite normal histolojik bulgulardır (26, 31).

2.4.Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri tüm kanserlerin %13'ünü oluşturan, kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %20'sinden sorumlu yaygın görülen bir tümördür. "Global Cancer Istatistics" verilerine göre 2018 yılında tüm dünyada 2,093,876 kişide akciğer kanseri saptanmıştır (37). İnsidans ve mortalitesi bölgeler arasında geniş varyasyonlar göstermektedir. Son 20 yılda Amerika kıtasında akciğer kanserine bağlı ölümler azalmakta iken, Asya kıtasında akciğer kanserine bağlı ölümlerin arttığı bildirilmiştir (38, 39).

Tüm akciğer tümörlerinin %99'unu karsinomlar oluşturur. Akciğer karsinomları pratik olarak KHAK (%20) ve KHDAK (%80) olarak sınıflandırılır. KHDAK'ları da, SHK, ADK, büyük hücreli karsinom ve daha nadir alt tiplere ayrılır. Oldukça nadir görülen sarkomatoid karsinomlar tüm akciğer tümörlerinin %0.3-1.3 kadarını oluşturur (40). Dünya sağlık örgütü (DSÖ)' ne göre en sık görülen karsinom olan SHK, erkeklerde %44 oranında, kadınlarda ise %25 oranında izlenir. ADK oranı kadınlarda %42'lere ulaşırken erkeklerde %28'lik bir oranda kalır. Bazı yayınlarda her iki cinsiyette ADK en sık görülen akciğer kanseri olarak bildirilmiştir (41).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre akciğer kanser sıklığı Ege, İç Anadolu ve Akdeniz bölgesinde en yüksek (39.5-41.0/100.000), Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde ise en düşük oranda (17.7-11.7/100.000) bulunmuştur. Ülkemizde ileri yaş grubunda en sık SHK, genç yaşlarda ise ADK daha fazla izlenmektedir. Kadınlarda, özellikle sigara içimi ile KHAK arasındaki ilişki belirgindir. Türk Toraks Derneği Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu tarafından yapılan ulusal hastane bazlı retrospektif bir çalışmada 11849 akciğer kanserli olgunun %90.4'ü erkek, %9.6'sı kadın, yaş aralığı 46-65 (%56.7), sigara kullanma oranı %90'dır. Olguların evrelere göre dağılımı Evre I'de % 5.6, Evre II'de % 7.7, Evre IIIA'da %14.2, Evre IIIB'de %32.1 ve Evre IV'te %40.4 olup en fazla olgu sayısı evre IV'te bulunmuştur (42, 43).

2.5. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer tümörleri etiyojisinde sigara, hava kirliliği, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, çeşitli mesleki maruziyetler, genetik ve immünolojik faktörler gibi pek çok faktör önemli rol oynamaktadır. Akciğer kanserlerinin %80'i, aktif olarak sigara içen veya önceden sigara içmiş bireylerde görülmektedir (31). Ülkemizde yapılan çalışmalarda akciğer kanserli kadınların %17'sinin, erkeklerin ise %94'ünün sigara içtikleri bildirilmiştir (44). Kanseri gelişimi ile "paket yılı" olarak belirlenen sigara içilme miktarı arasında lineer bir ilişki vardır (45). Sigarada yaklaşık 40.000 tane kimyasal madde tanımlanmış, bunların 60'tan fazlası karsinojen olarak tespit edilmiştir. Sigara içindeki polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), N-nitrozaminler, aromatik aminler ve heterosiklik aminler en önemli karsinojenlerden başlıcalarıdır. N-nitrozaminler, tütün işleme sırasında nikotinden ve alkaloid arekolinden kaynaklanırlar. Nitrozaminler, doğrudan hidroksilasyon ile aktive olurlar ve etkilerini DNA ile bileşik oluşturarak gösterirler. Oluşan bileşik miktarı kullanılan sigara miktarı ile de ilişkilidir (31). Bu bileşikler insan vücudunda belirgin bir değişiklik olmaksızın beş yıl kadar kalabilirler. Yoğun sigara içicilerinde her hücre genomunda 100 kadar mutasyona neden olabilir. PAH, benzopiren ve dimetil benzantrisen de DNA bileşikleri oluşturan karsinojenik maddelerdir (46, 47). Sigara en sık santral hava yolları yerleşimli SHK ve KHAK olmak üzere, tüm ana akciğer kanseri tipleri ile ilişkilidir (48). Ayrıca akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi yöntemlerinden biri olan EGFR - tirozin kinaz inhibitör tedavisi alan sigara içicileri bu tedaviye direnç göstermektedir (49). Çevresel sigara dumanına maruziyet de akciğer kanseri etiyojisinde yer almaktadır. Pasif sigara

içicileri, çevresel dumanı dolaylı olarak inhale ederler. Sigara kullanıcısı olmadığı halde eşi sigara içen kadınlar üzerinde yapılan iki çalışmada, bu kadınların akciğer kanser riskinin %30 daha fazla olduğu gösterilmiştir (50, 51)

Sitokrom P450 enzim sisteminde yer alan aril hidrokarbon hidroksilaz enzimi sigara dumanında yoğun olarak bulunan polisiklik hidrokarbonları aktif karsinojenlere çeviren bir enzimdir. Aril hidrokarbon hidroksilaz enzim aktivitesi yüksek olan kişilerde akciğer kanseri riski artmıştır. Hücre büyümesi ile ilgili işlevleri olan bazı genlerin radyasyon, kimyasal maddeler, virüsler gibi dış etkenlerin etkisiyle değişime uğrayarak onkogen haline gelmesi karsinogeneizde önemlidir (31). Akciğer kanseri ile ilişkili onkogenlerin en önemlileri “myc” (C-myc, L-myc, N-myc) ve “ras” (K-RAS, H-RAS, N-RAS) aileleridir. Retinoblastom ve p53 geni gibi bazı tümör baskılayıcı genlerdeki değişiklikler de akciğer kanserli hastalarda gösterilmiştir. Sigarada bulunan PAH’lar DNA bağlarını parçalar, DNA tamir, apoptoz ve hücre döngüsünü düzenleyen p53 geninde mutasyona neden olur. p53 geni akciğer kanserli hastalarda %50-70 oranında hasarlıdır (52).

Ülkemizde akciğer kanseri oluşumunda rol oynayan bir diğer faktör de asbest maruziyetidir (31). Asbest serpantin ve amfibol olarak iki gruba ayrılır. Serpantin grubu lifler kıvrımlıdır ve en sık bilinen örneği beyaz asbesttir (krizotil asbest). Amfibol grubundaki lifler ise düzdür. Amfibol grubu kendi içinde beş türe ayrılır; krokidolit (mavi asbest), amozit (kahverengi asbest), aktinolit, tremolit, antofilit. Amfibol grubu liflerin fiziksel özelliklerinin ve dokularda uzun süre değişmeden kalabilmesinin toksisitede etkili olduğu kabul edilmektedir. Sigara içen kişilerde asbest ile temas, kanser riskini 90 kat artırmaktadır. Akciğer kanserlerinin %3-4 kadarının asbeste maruz kalınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (53).

Radon gazı, doğada değişik bölgelerde yüksek oranlarda bulunabilmektedir. Özellikle madencilerde görülen bu mesleki maruziyete, ev içi havasından da maruz kalmak mümkündür fakat; madenlerdeki radon konsantrasyonu ev içindeki konsantrasyondan 50-100 kat daha fazladır. ABD’de evlerin %15’inde özellikle bodrum katlarında, güvenilir sınırın üzerinde radon saptanmıştır ve her yıl 15.000 ile 20.000 civarında akciğer kanseri ölüm nedeninin, radon gazına bağlı olduğu tahmin edilmektedir (54, 55).

Beslenme şeklinin de kanser gelişiminde rol oynadığı yapılan son çalışmalarla tesbit edilmiş olup, zengin bir antioksidan kaynağı olan meyve ve sebzelerin, özellikle karotenlerin, akciğer ve diğer kanser riskini azaltarak sağlığa fayda sağladığı düşünülmektedir. C ve E vitaminleri için kansere karşı koruyucu bir rol olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Sigara içme durumuna bakılmaksızın, besinlerdeki toplam veya spesifik yağ oranı ile akciğer kanser riski arasında ilişki gözlenmemiştir. Buna karşılık, kurutulmuş et (örneğin, sosis, preslenmiş ördek ve kurutulmuş domuz eti), kızartmalar ve acı biber, artan akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (56). Prospektif olarak 399.767 katılımcı ve 3137 akciğer kanseri vakasıyla yapılan yedi çalışmanın analizinde, alkolden uzak kalanlara göre en az 30 gram/gün alkol tüketen kişiler arasında biraz daha yüksek bir akciğer kanseri riski belirtilmiştir (57).

Akciğer kanseri ayrıca oksidatif stres, inflamasyon, prokoagülatör bir durumun indüklenmesi ve otonomik sinir sisteminin işlevsizliği nedeniyle çeşitli PAH bileşiklerinden zengin emisyonlar gibi ortam hava kirliliğine sebep olan etkenlere kümülatif maruziyetin uzun vadeli olumsuz etkilerinden biri olabilir. Avrupadaki kentsel hava kirliliğine bağlı akciğer kanseri oranının % 11 olduğu tahmin edilmektedir (58).

2.6.Sınıflandırma

Akciğer kanserleri ilk olarak 1924 yılında Marchesani tarafından dört grup altında (Bazal Hücreli Karsinom, Polimorfosellüler Karsinom, Keratinize Skuamöz Hücreli Karsinom, Silindirik Hücreli Adenokarsinom) toplanmıştır. 1967 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu sınıflamayı temel alarak akciğer kanserlerinde ilk sınıflamayı oluşturmuştur (59). Daha sonraki yıllarda yeni alt tipler tanımlandıkça 1981 ve 1999 yıllarında akciğer kanseri sınıflaması revize edilmiştir. Bu ilk sınıflamalar sadece patoloğlara yönelik iken 2004 yılındaki son sınıflamada klinik ve genetik bilgiler de dikkate alınarak içeriğe eklenmiştir (59, 60, 61)

1967, 1981, 1999 ve 2004 yıllarında yapılan akciğer tümörleri sınıflamalarından sonra kanser genetiği ve kemoterapi konusunda birçok gelişme olmuştur. 2015'te DSÖ yeni sınıflaması yayınlanmıştır (62). Yeni sınıflama 2004 sınıflamasına göre birçok önemli değişiklik içermekte olup, evreleme ve TNM sınıflandırmasında da değişiklikler yapılmıştır. Amerikan Kanser Ortak Komitesi tarafından desteklenen yeni Kanser Evreleme El Kitabı,

hem KHDAK hem de karsinoid tümörleri içeren KHAK için yeni evreleme şemasının uygulanmasını önermektedir (63). Yeni sınıflandırma Tablo I'de verilmiştir.

Önceki DSÖ sınıflamalarında akciğer kanseri tanısı büyük ölçüde hematoksilen eozin boyalı kesitlerin ışık mikroskopu altında incelemesine dayalıydı. İmmünohistokimya ilk defa 1999 DSÖ sınıflamasında yer aldı ve 2004 DSÖ sınıflamasında bile kullanımı Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom, Sarkomatoid Karsinom ve Malign Mezotelyoma ile metastatik karsinomların ayırımıyla sınırlıydı. Ancak 2015 DSÖ sınıflamasının tümünde, sadece küçük biyopsi ve örneklerde değil, rezeksiyon materyallerinde de İHK'nın kullanımı önerilmiştir (64).

Uzun yıllar boyunca, mevcut tedavi seçeneklerine dayanarak, akciğer kanserleri "küçük hücreli" ve "küçük hücreli dışı" olarak sınıflandırılmış olup son zamanlarda kişiselleştirilmiş tıbbın ve hedef tedavilerin gelişmesiyle birlikte bu basitleştirilmiş sınıflama şeması, KHDAK grubunun daha spesifik alt tiplerinin gerekliliği nedeniyle revize edilmiştir (62). Özellikle tirozin kinaz inhibitörleriyle manipülasyona müsait spesifik genetik değişikliklerin keşfedilmesi, eski yaklaşımın gözden geçirilmesini gerekli kılmıştır ve yavaş yavaş akciğer tümörleri için moleküler bir genetik sınıflamanın gelişmesine yol açmıştır. EGFR ve KRAS genlerindeki mutasyonlar ile ALK genlerindeki yeniden düzenlemeler, akciğer kanserinde en sık görülen moleküler değişiklikler arasındadır (65). EGFR gen aktive edici mutasyonlarının mevcudiyeti, tirozin kinaz inhibitörleri ile tedaviye daha iyi bir yanıtla ilişkilidir. EGFR mutasyonu ve ALK yeniden düzenlenimi genellikle sigara içmeyen, daha genç yaşta ve tümörün periferik yerleşimli olduğu hastalarda görülürken, KRAS mutasyonu sigara içen ve hiler yerleşimli tümörü olan hastalarda sıktır (65, 66). ADK'ların yaklaşık %15-30'unda KRAS mutasyonları bulunur ve tirozin kinaz inhibitörlerine karşı bir direnç belirteci olarak kabul edilir (63). Bunların dışında akciğer tümörlerinde tanımlanan diğer genetik değişiklikler BRAF, ERBB2/HER2, PIK3CA, RB, TP53 mutasyonları, MET, MYC, FGFR1 amplifikasyonları, RET, ROS1 (v-ros avian UR2 sarkoma virüs onkogen homolog 1), NTRK1, NRG1 gen yeniden düzenlenimleridir (67). Hedef tedavilere cevap ile daha ileri genetik hedefler belirlenip ilişkilendirildikçe, moleküler testler akciğer kanserinin sınıflandırılmasında daha önemli hale gelecektir.

Akciğer kanserlerinin çoğu için belirlenmiş bir histolojik derecelendirme yoktur. Rezeksiyon materyallerinde tümörlerin yapısal ve/veya nükleer özelliklerine göre derecelendirilmesi önerilmiştir. Halen mevcut anlayışta tümörün dominant olan paterne göre derecelendirilmesi yeterli görülmektedir (64). ADK'ların %70-90'ını mikst tipler oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ADK'ların alt tiplerine göre farklı davranış paterni sergiledikleri, prognozlarının da farklı olduğu anlaşılmıştır (68, 69). Ayrıca farklı alt tipler farklı mutasyonlarla sık birliktelik göstermektedir. Bu nedenle ADK için alt tipin baskın olduğu paternin raporda belirtilmesi önemlidir. Baskın patern belirlenirken tümör içinde alt tiplerin %5'lik paylar halinde semikantitatif olarak hesaplanması ve oran olarak en büyük paydaki alt tip baskın patern olarak belirtilmesi önerilmektedir (70).

Tablo I: Akciğer tümörleri sınıflaması (DSÖ, 2015)

1-Epitelyal Tümörler	
A-Adenokarsinom	
	*Lepidik adenokarsinom
	*Asiner adenokarsinom
	*Papiller adenokarsinom
	*Mikropapiller adenokarsinom
	*Solid adenokarsinom
	*İnvaziv müsinöz adenokarsinom
	-Mikst müsinöz ve non-müsinöz invaziv adenokarsinom

	*Kolloid adenokarsinom
	*Fetal adenokarsinom
	*Enterik adenokarsinom
	*Minimal invaziv adenokarsinom
	-Non müsinöz
	-Müsinöz
	*Preinvaziv lezyonlar
	-Atipik adenomatöz hiperplazi
	-Adenokarsinoma in situ
	Non müsinöz
	Müsinöz
B-Skuamöz hücreli karsinom	
	*Keratinize skuamöz hücreli karsinom
	*Non keratinize skuamöz hücreli karsinom
	*Bazaloid skuamöz hücreli karsinom
	*Preinvaziv lezyonlar
	-Skuamöz hücreli karsinoma in situ
C-Nöroendokrin Tümörler	
	*Küçük hücreli karsinom
	*Büyük hücreli nöroendokrin karsinom

	*Karsinoid Tümörler
	-Tipik karsinoid
	-Atipik karsinoid
	*Preinvaziv lezyonlar
	-Diffüz idiyomatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi
D-Büyük Hücreli Karsinom	
E-Adenoskuamöz Karsinom	
F-Pleomorfik Karsinom	
G-İğsi Hücreli Karsinom	
H-Dev Hücreli Karsinom	
I-Karsinosarkom	
J-Pulmoner Blastom	
K-Sınıflandırılmayan Karsinomlar	
	*Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
	*NUT karsinom
L-Tükrük Bezi Tipi Tümörler	
	*Mukoepidermoid karsinom
	*Adenoid kistik karsinom
	*Epitelyal-myoepitelyal karsinom

	*Pleomorfik adenom
M-Papillomlar	
	*Skvamöz hücreli papillom
	-Ekzofitik
	-İnverted
	*Glanduler papillom
	*Mikst skuamöz hücreli ve glanduler papillom
N-Adenomlar	
	*Sklerozan pnömositoma
	*Alveoler adenom
	*Papiller adenom
	*Müsinöz kistadenom
	*Müköz gland adenomu
2-Mezenkimal Tümörler	
A-Pulmoner Hamartom	
B-Kondrom	
C-PEComatöz Tümörler	
	*Lenfanjioleiomyomatosis
	*PEComa, benign
	-Berrak hücreli tümör

	*PEComa, malign
D-Konjenital Peribronşial Myofibroblastik Tümör	
E-Diffüz Pulmoner Lenfanjiomatozis	
F-İnflamatuvar Myofibroblastik Tümör	
G-Epiteloid Hemanjioendotelyoma	
H-Plevropulmoner Blastom	
I-Sinovyal Sarkom	
J-Pulmoner Arter İntimal Sarkom	
K-EWSR1-CREB1 Translokasyonu İçeren Pulmoner Miksoid Sarkom	
L-Myoepitelyal Tümörler	
	*Myoepitelyoma
	*Myoepitelyal karsinom
3-Lenfohistiositik Tümörler	
A-Mukoza İlişkili Lenfoid Dokunun Ekstranodal Marjinal Zon Lenfoması (MALT Lenfoma)	
B-Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma	
C-Lenfomatid Granülomatozis	
D-İntravasküler Büyük B Hücreli Lenfoma	
E-Pulmoner Langerhans Hücreli Histiositozis	
F-Erdheim-Chester Hastalığı	

4-Ektopik Orijinli Tümörler	
A-Germ Hücreli Tümörler	
	*Teratom, matür
	*Teratom, immatür
B-İntrapulmoner Timoma	
C-Melanom	
D-Meningiom, NOS	
5-Metastatik Tümörler	

2.7.Evreleme

Kanser hastalarını prognoz özelliklerine göre sınıflayarak tedavilerini planlama ihtiyacı nedeniyle bir evreleme sistemine ihtiyaç duyulmuştur. İlk kez Denoix tarafından 1946'da tümörün durumu (T), bölgesel lenf nodu metastazı (N) ve uzak organ metastazı (M) varlığının değerlendirildiği klinik evreleme önerilmiştir (71). 1968'de TNM sistemi "Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği" (UICC) ve 1973'te "Amerikan Kanser Birliği" (AJCC) tarafından akciğer kanserlerine uyarlanmıştır. Bu iki farklı yaklaşım 1986'da AJCC ve UICC'nin toplantılarında yeniden gözden geçirilip "Uluslararası Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi" adı altında tek bir sistem haline getirilmiştir (72). Evreleme sisteminin revizyonu 1997 yılında Mountain tarafından yapılmıştır. IASLC tarafından önerilen ve UICC, AJCC tarafından kabul gören TNM sınıflaması ve evreleme sistemi'nin 8. edisyonu Ocak 2018'den itibaren kullanılmaya başlanmıştır (73).

TNM evreleme sistemi, 8. edisyonda 5 cm'ye kadar tümör çapındaki her cm. başına değişim daha önemli hale gelmiş, tümör çapı her T evresinde tanımlayıcı olarak yer almıştır. Minimal invaziv adenokarsinomun T1a (mi) olarak eklenmiştir. Ana bronş invazyonu, parsiyel veya total atelektazi T2 olarak evrelenirken, diafragma invazyonunun

kötü prognoz göstermesi nedeniyle T4 olarak kabul edilmiştir. Mediastinal plevra invazyonu T tanımlayıcısı olarak kullanılmamaktadır. N evrelemesi aynı şekilde devam etmektedir (73). TNM sınıflaması ve evreleme sistemi, 8. edisyonu Tablo II ve Tablo III'te verilmiştir.

T1 ve T2, tümör boyutuna göre a ve b alt tiplerine ayrıca sınıflandırılmıştır (T1a: <1 cm; T1b: > 1-2 cm; T1c: >2-3 T2a: > 3-4 cm; T2b: > 4-5 cm). 5 cm'den büyük ancak 7cm'yi aşmayan tümörler T3, 7 cm'den büyük tümörler ise T4 sınıfına alınmıştır. Aynı loba multipl tümör nodülleri sınıflandırmada T4'ten T3'e alınmış olup, aynı akciğerde farklı loblardaki çoklu tümör nodülleri ise M1'den T4'e yeniden sınıflandırılmıştır.

M sınıflandırması da yeniden tanımlanmış olup, M1; M1a, M1b ve M1c olarak alt bölümlere ayrılmıştır. Malign plevral ve perikardiyal efüzyonlar T4'ten M1a'ya yeniden sınıflandırılmış; kontralateral akciğerde ayrı tümör nodülleri M1a; uzak metastazlar ise M1b ve M1c olarak kabul edilmiştir (74).

Tablo II: Akciğer tümörleri TNM sınıflaması (AJCC 8. Edisyon)

Tx	Primer tümörün belirlenememesi veya balgam ya da bronş lavajında malign hücrelerin tespit edilip görüntüleme teknikleri ya da bronkoskopi ile tümörün gösterilememesi.
T0	Primer tümör belirtisi yok.
Tis	Karsinoma in situ
T1	En geniş çapı 3 cm ya da daha küçük, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale invazyon göstermeyen tümör (örneğin: ana bronşta olmayan)
T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom
T1a	Tümörün en büyük boyutu 1 cm veya daha küçük
T1b	Tümörün en büyük boyutu 1cm'den büyük ancak

	2 cm'yi aşmaz
T1c	Tümörün en büyük boyutu 2 cm'den büyük ancak 3 cm'yi aşmaz
T2	Tümör çapının 3 cm'den büyük 5 cm'yi aşmaz veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması: -Karşınaya uzaklığına bakılmaksızın ana bronşu invaze eder -Visseral plevrayı invaze eder -Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni
T2a	Tümörün en büyük boyutu 3 cm'den büyük ancak 4 cm'yi aşmaz
T2b	Tümörün en büyük boyutu 4 cm'den büyük ancak 5 cm'yi aşmaz
T3	Tümör 5 cm'den büyük ancak 7 cm'yi aşmaz ya da direkt invazyon yoluyla pariyetal plevra, göğüs duvarı (süperior sulkus tümörü dahil), frenik sinir, pariyetal perikardı invaze eder ya da primer tümör ile aynı lobda nodül (ler)
T4	Tümör 7 cm'den büyük ya da diafragma, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra gövdesi, karınaya invaze ya da primer tümörle aynı taraf akciğerin farklı lobunda nodül (ler)
Nx	Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilemedi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1	Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf nodlarına metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner nodların tutulması
N2	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarına metastaz
N3	Karşı taraf mediastinal veya hiler; aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen lenf nodu metastazı
Mx	Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Karşı lobda ayrı tümör nodül ya da nodüllerinin olması; plevral nodüller veya plevral veya perikardiyal sıvıda malign hücrelerin olması
M1b	Tek bir ekstratorasik organda tek bir metastaz
M1c	Bir veya birden çok organda, çok sayıda ekstratorasik metastaz

Tablo III: Akciğer tümörleri klinik evrelemesi (AJCC 8. Edisyon)

Okkült karsinom: Tx N0 M0	Evre IIIA: T1a-c N2 M0
Evre 0: Tis N0 M0	T3 N1 M0
Evre IA: T1a N0 M0	T4 N0-1 M0
Evre IA1: T1mi N0 M0 T1a N0 M0	Evre IIIB: T1a-c N3 M0
Evre IA2: T1b N0 M0	T2a-b N3 M0
Evre IA3: T1c N0 M0	T3-4 N2 M0
Evre IB: T2a N0 M0	Evre IV Herhangi bir T, herhangi bir N, M1
Evre IIA: T2b N0 M0	Evre IVA Herhangi bir T, herhangi bir N, M1a, M1b
Evre IIB: T1a-c N1 M0 T2a-b N1 M0	Evre IVB Herhangi bir T, herhangi bir N, M1c
T3 N0 M0	

2.8.Akciğer Tümörlerinin Histopatolojik Özellikleri

2.8.1. Adenokarsinom

Tüm akciğer kanserlerinin dünya genelinde yaklaşık % 40-50'sini oluşturur. Doğu ülkelerinde ve ülkemizde ise daha az oranda görülmektedir. Sigara içmeyen, Asyalı kadınlarda daha sık görülür. Daha önceden parankimde var olan skar dokusundan gelişen tümörler “skar karsinomu” olarak adlandırılır. Sıklıkla periferik ve subplevral alanlarda yerleşir (31, 40). Makroskopik olarak, ADK'ların büyük çoğunluğu, beyaz renkte ve antrakotik görünümde olup, değişen boyutlarda tek ve periferik nodüller olarak ortaya çıkarlar. Sınırlar lobüle ya da stellat olabilir ve üstündeki plevra sıklıkla düzensizdir. Diğer makroskopik paternler, multipl nodüler, pnömoni benzeri konsolidasyon alanları ve lenfatik yayılımına bağlı diffüz interstisyel kalınlaşmalardır (2, 31).

Primer pulmoner ADK, glandüler farklılaşma özellikleri gösteren malign epitelyal neoplazm olarak tanımlanır. ADK'nın iyi, orta ve az diferansiye olarak derecelendirilmesi, mevcut glandüler farklılaşma derecesine ve sitolojik atipi derecesine bağlıdır (75). İyi diferansiye neoplazmlar, çevresindeki stromaya invaze atipik hücrelerle kaplı düzgün sınırlı bezlerin çoğalmasa ile karakterize edilir, oysa az diferansiye tümörler, yetersiz veya zayıf glandüler özellikler gösteren solid tümör hücre tabakaları olarak büyür ve hücre içi münin üretiminin gösterilmesi ile ADK olarak tanınır. İyi diferansiye ADK'daki bezler genellikle bol berrak veya eozinofilik sitoplazmalı, bazal yerleşimli nukleuslu, belirgin nukleollü ve sık mitotik şekillerle birlikte uzun kolumnar veya müninöz epitelden oluşur. Orta derecede farklılaşmış ADK'da, glandüler proliferasyon daha gelişigüzel dağılmıştır ve tümör hücreleri daha fazla atipi ve sık mitotik aktivite gösterir (31,61).

ADK; asiner, papiller, lepidik , solid ve kribriform paternleri içeren çeşitli ayırt edici büyüme paternleri gösterebilir. Pulmoner ADK'ların çeşitli morfolojik özellikler ve moleküler anormallikleri olan morfolojik heterojenite gösterdiği iyi bilinmektedir. Aslında,

akciğer ADK'larının çoğunluğu (yaklaşık %80'i) DSÖ tarafından daha önce tanımlanan "mikst" tiptedir. Mikst tip ADK'nın doğru sınıflandırılması, özellikle küçük biyopsi örneklerinde veya sitoloji örneklerinde subjektif olabilir ve yeni hedef tedaviler için yanıt verenler ve yanıt vermeyenler arasında ayırım yapmak için zorluk yaratabilir (76).

ADK'ların mikroskopik olarak 2015 DSÖ sınıflamasına göre; lepidik baskın, asiner baskın, papiller baskın, mikropapiller baskın ve müsün üreten solid ADK olmak üzere 5 ana tipi ve invaziv musinöz, fötal, enterik, kolloid olmak üzere dört varyantı vardır (77).

Lepidik baskın patern; adenokarsinoma in situ, minimal invaziv ADK ve lepidik patern baskın ADK olarak üç şekilde görülür. Adenokarsinoma in situ, atipik tip II pnömositlerin ve/veya Clara hücrelerinin alveol çatısı boyunca ilerlemesiyle oluşur. Bu tümörlerde alveol duvarının elastik yapısında bozulma olmaz. Tümörde invaziv diğer alt tiplerden biri bulunduğu; invazyon alanı beş mm'den az ve tümör çapı ≤ 3 cm ise tümör minimal invaziv ADK olarak; invazyon alanı beş mm'den fazla ise lepidik patern baskın ADK olarak adlandırılır. Ayrıca tümörde lenfovasküler invazyon, plevral invazyon veya nekroz bulunduğu adenokarsinoma in situ ve minimal invaziv ADK terimleri kullanılmaz, tümör lepidik patern baskın ADK olarak kabul edilir (62, 77). Tablo IV'de minimal invaziv adenokarsinom tanı kriterleri, Tablo V'de ise in situ ADK tanı kriterleri verilmiştir.

Tablo IV: Minimal invaziv adenokarsinom tanı kriterleri

Tümör çapı üç cm'e eşit veya daha küçük
Soliter ADK
Lepidik patern predominant
İnvaziv komponent en büyük olduğu yerde 0.5 cm'den küçük
Ölçülen invaziv komponent lepidik patern dışında herhangi bir histolojik subtip olabilir (asiner, papiller, mikropapiller, solid, kolloid, fötal veya invaziv müsünöz adenokarsinom gibi) ve tümör hücreleri myofibroblastik stromayı infiltre etmiştir
Lenfatiklerde, kan damarlarında, hava boşluklarında veya plevrada invazyon varsa; nekroz varsa minimal invaziv tanısı dışlanır

Hücre tipi sıklıkla müsinöz olmayan (tip 2 pnömosit veya clara hücreleri) ancak nadiren müsinöz (nükleusları bazalde sitoplazmik müsin içeren, bazen goblet hücrelerini andıran uzun kolumnar hücreler)

Tablo V: Adenokarsinoma in situ tanı kriterleri

Tümör çapı 3 cm'e eşit veya daha küçük
Soliter ADK
Pür lepidik patern
Stromal, vasküler veya plevral invazyon yok
İnvaziv ADK paternleri yok (asiner, papiller, mikropapiller, solid, kolloid, fütal veya invaziv müsinöz adenokarsinom gibi)
Hava boşlukları yoluyla yayılım yok
Hücre tipi sıklıkla müsinöz olmayan (tip 2 pnömosit veya clara hücreleri) ancak nadiren müsinöz (nükleusları bazalde sitoplazmik müsin içeren, bazen goblet hücrelerini andıran uzun kolumnar hücreler)
Nükleer atipi yoktur veya göze çarpmaz
Sklerozisli/elastozisli septal genişlemeler siktir, özellikle nonmüsinöz adenokarsinoma in situda

Asiner baskın patern, tümör hücreleri ile çevrili oval ya da yuvarlak lümene sahip glandüler yapılar şeklinde izlenir. Neoplastik hücrelerin sitoplazmalarında veya glandüler boşluklarda müsin bulunabilir (62). Bazen tümör hücreleri gerçek bir lümen oluşturmaksızın periferik nükleer polarizasyonla yuvarlak şekilde dizilebilirler. Tümör bazı alanlarda kribriform görünüm oluşturabilir (78).

Papiller baskın patern, santral fibrovasküler bir kor çevresinde dizilim gösteren glandüler hücrelerden meydana gelir ve bu yapılar alveol boşluklarını papiller yapılar halinde doldururlar. Over papiller karsinomlarında gözlenenlere benzer şekilde stromada psammom

cisimleri de bulunabilir (62). Akciğerin gerçek papiller paterne sahip ADK'nın lepidik paternden çok daha fazla morbidite ve mortalite gösterdiğine inanılmaktadır (79). Bu tümörlerde invazyon değerlendirmesi için miyofibroblastik stroma aranmaz (61).

Mikropapiller patern, belirgin bir fibrovasküler kor içermeyen daha küçük papiller yapılar oluşturan, minimal atipi gösteren küçük tümöral hücrelerle karakterizedir (62). Bu tümörlerde stromal ve vasküler invazyon sık görülmektedir. Bazılarında psammom cisimcikleri görülebilir. Müsin üreten solid ADK ile birlikte kötü prognoz gösteren tümörlerdir (31, 61).

Müsin üreten solid patern, belirgin bir glandüler patern göstermeyen tabakalar halindeki poligonal hücrelerden meydana gelirler. Tümör tümüyle solid paternde ise ADK tanısı için en az 2 büyük büyütme alanında 5 tane müsin içeren hücre görülmelidir. Psödostratifiye epitel ve sitolojik atipi görülebilir. Ancak nekroz görülmez ve mitoz hızı düşüktür. SHK ve Büyük Hücreli Karsinom (BHK)'da da müsin üretebildiğinden bu tümörlerle karışabilirler (61, 62).

Fötal adenokarsinom, fotal akciğerin psödoglandüler fazındaki epitelini andıran silyasız glikojenden zengin hücrelerin kompleks glandüler yapılar oluşturmasıyla meydana gelir (62). Düşük dereceli fotal adenokarsinomda düşük nükleer atipi ve morül formasyonu görülür. Yüksek dereceli fotal adenokarsinomda ise belirgin nükleer atipi, morül kaybı ve nekroz görülür (2, 31).

Enterik adenokarsinom terimi asiner, kribriform ve papillotübüler yapılar sergileyen, kolorektal adenokarsinoma benzeyen tümörler için kullanılan bir terimdir (62). Veziküler nükleuslu, eozinofilik, uzun kolumnar hücrelerden oluşur. Heterojen bir ADK'da bu tanıyı vermek için enterik paternin %50'den fazla olması ve gastrointestinal sistem kökenli bir tümörün bulunmadığının gösterilmesi gerekmektedir. Bazı tümörler sadece enterik morfoloji sergilerken, bazıları enterik diferansiyasyon gösterir (2, 31, 61).

Diğer nadir görülen paternler arasında, kolon ve rektum, prostat, meme, uterus, over ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli bölgelerden metastazlara benzeyebilen çarpıcı ve baskın bir kribriform büyüme modeli gösteren tümörler bulunur. Ağırlıklı olarak gastrik ve kolorektal primerlerin metastazları ile karıştırılabilen taşlı yüzük hücrelerinden oluşan tümörler de tarif edilmiştir (74). İHK'sal boyamalar ve klinikopatolojik korelasyon, bir

metastaz durumunu dışlamak için vazgeçilmezdir. İlginç bir şekilde, ALK gen yeniden düzenlemesine sahip ADK'lar sıklıkla taşı yüzük hücre morfolojisine sahiptir (80).

2.8.2. Skuamöz Hücreli Karsinom

Sıklıkla sigara içimi ile yakın ilişkili, genellikle santral yerleşimli ve kaviteleşme gösterebilen akciğer kanseri türüdür. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %20 kadarını oluştururlar. Kitle santral yerleşim gösterdiğinden tipik olarak bronşta total veya subtotal obstrüksiyona neden olan intraluminal polipoid kitle oluştururlar. Kesit yüzleri genellikle solid, sert kıvamlı ve gri - beyaz renklidir (31, 62).

SHK keratinize veya nonkeratinize olabilir. Skuamöz diferansiyasyonu gösteren özellikler; hücreler arası köprüler, keratin inci formasyonu ve tek hücre keratinizasyonudur (81). Bunlar diferansiyasyon derecesine göre farklılık gösterir; iyi diferansiye tümörlerde tipik keratinizasyon belirginken, az diferansiye tümörlerde oldukça fokaldır. Nonkeratinize tipi büyük hücreli karsinomdan ayırmak için İHK'sal boyamalar gereklidir (62).

Bazaloid SHK, lobüler yapı ve periferik palizatlanma gösteren küçük hücrelerin proliferasyonu ile oluşan az diferansiye malign epitelyal tümördür. Bu tümörde hücreler skuamöz morfolojiyi kaybetmiştir ancak İHK'sal olarak skuamöz markerlarla boyanır. Keratinize veya nonkeratinize skuamöz hücre komponenti olan tümörlerde %50'nin üzerinde bazaloid komponent varsa bazaloid SHK olarak adlandırılır (31, 62).

İyi diferansiye tümörler, kaldırım taşı benzeri bir yapıyı benimseyen ve bol eozinofilik sitoplazmalı, yuvarlak oval nükleuslu ve belirgin nükleol içeren hücre tabakalarıyla karakterize edilir. Hücre sınırları iyi tanımlanmıştır ve iyi oluşturulmuş hücreler arası köprüler göstermektedir. Daha az diferansiye tümörlerde, bu özellikler sadece odaksal olarak gözlenebilir ve lezyonlar daha belirgin sitolojik atipi, artmış mitotik aktivite ve sık nekroz ve/veya kanama alanları ile karakterize edilir. Merkezi, komedo tipi nekroz paterni tipik olarak daha yüksek dereceli lezyonlarda görülür (2, 31).

2.8.3. Adenoskuamöz Karsinom

Cerrahi olarak rezeke edilen akciğer kanserlerinin %0.5-3.5 kadarını oluşturur. Hastalar sıklıkla sigara içicisidir. Bu neoplazide SHK ve ADK alanları birbirinden ayrı veya

sıkıca birbirine karışmış haldedir. Bir karsinoma adenoskuamöz demek için tanım olarak her komponent tümörün en az %10'unu oluşturmalıdır. Evreye göre sınıflandırıldığında konvansiyonel SHK veya ADK'dan daha kötü pronozludur (2, 62).

2.8.4 Nöroendokrin Karsinom

Küçük Hücreli Karsinom

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %13'ünü KHAK oluşturmaktadır ve neredeyse hastaların hepsi sigara içicisidir. Birçok KHDAK'larına kıyasla hızlı büyüdüğü için tümör ileri evrede yakalanmaktadır. Nükleer özellikler dışında belirgin nöroendokrin morfoloji göstermeyen tümöral hücrelerin sıkıca biraraya gelerek tabaka benzeri dizilimiyle meydana gelirler (31). Yuva, trabekül, periferal palizatlanma ve rozet formasyonu sık değildir. Tümör hücreleri, dar sitoplazmalı, oval, yuvarlak ya da iğsi nükleuslu, lenfositten daha büyük hücrelerdir. Nükleer kromatin ince granülerdir ve nükleol seçilemez. Hücre sınırları net değildir. Mitoz hızı yüksektir, yaygın nekroz, apoptotik aktivite ve ezilme artefaktı görülebilir (62). KHAK'un prognozu kötü olup ortalama yaşam süresi 12.7 aydır (2).

Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom

Vakaların %90'dan fazlası ağır derece sigara içicisidir. Mikroskopik olarak organoid yuvalar, trabeküler dizilim, rozet benzeri yapılar ve periferal palizatlanma gibi nöroendokrin özellikler gösterir. Tümör hücreleri geniş sitoplazmalı büyük hücrelerdir. Sıklıkla belirgin nükleoller vardır ki bu, KHAK'dan ayırımı kolaylık sağlar. Nekroz sıklıkla geniş alanları kaplar (31, 62). Bu tümör nüks etmeye meyillidir ve KHDAK'lara göre hastaların yaşam süresi daha kısadır (2).

2.8.5. Karsinoid Tümörler

Karsinoid tümörler tüm akciğer tümörlerinin yaklaşık %2 kadarını oluşturur. Tipik karsinoidler genellikle dördüncü-beşinci dekatlarda ortaya çıkarlar. Hastaların az bir kısmı sigara içicisidir. Atipik karsinoidler sık değildir ve tüm pulmoner nöroendokrin tümörlerin %10'unu oluştururlar. Sigara öyküsü atipik karsinoidli hastaların en az yarısında mevcuttur (31). Makroskopik olarak tümör major bronşlarda geliştiğinde polipoid ve endobronşialdir. Mikroskopik olarak; santral karsinoidler, bol granüllü ve eozinofilik sitoplazmalı olup

nükleusları santral veya ekzantrik yerleşimli, yuvarlak, ince granüler kromatinli hücrelerin proliferasyonu şeklindedir. Yuvalar, solid tabakalar, trabeküller, rozetler içeren büyüme paterni gözlenebilir (61, 62). Periferik karsinoidler ise, arada girdap benzeri yapılar içeren iğsi hücrelerden baskın büyüme paterni gösterirler (82).

2.8.6. Büyük Hücreli Karsinom

BHK; KHAK, ADK veya SHK'nin sitolojik, yapısal ve İHK'sal özelliklerini göstermeyen, undiferansiyel bir KHDAK'dır. Birçok hasta sigara içicisidir (31). Tipik olarak periferik kitleler şeklinde prezente olur. Mikroskopik olarak tabakalar veya adalar oluşturan, veziküler nükleuslu, belirgin nükleollü, orta miktarda sitoplazmalı, poligonal hücrelerden oluşmaktadır (62).

BHK; SHK, ADK veya KHAK morfolojisini, skuamöz ve adenokarsinomatöz diferansiyasyonu İHK'sal boyama ve müsin boyası ile kesin ekarte ettikten sonra konulan bir dışlama tanısıdır. Morfolojik ve İHK'sal olarak nöroendokrin marker ekspresyonu olmaması ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom tanısı dışlanır (2, 62).

2.9.KHDAK'larda Moleküler Biyoloji

Proto-onkogenlerin analizi, KHDAK'nin moleküler patogenezi hakkında önemli bilgiler vermiş ve yeni terapötik seçeneklere kapı açmıştır. Şu anda, hemen hemen tüm yeni ADK vakaları, hedeflenebilir bir mutasyonun kanıtı için moleküler testlere tabi tutulmaktadır ve KHDAK'lara immünoterapötik yaklaşımlar da umut vaat etmeye başlamıştır (31). Malign transformasyon için kromozomal seviyede (geniş çapta genomik materyal kaybı veya kazanımı, translokasyonlar veya mikrosatellit instabilite), nükleotid seviyesinde (tek veya çoklu baz değişimi) ve transkriptomlarda (gen ekspresyonunda değişiklik) genetik instabiliteye neden olan değişiklikler oluşmalıdır. Tümör hücreleri birçok genetik anormallik içerir ancak "sürücü mutasyon" olarak adlandırılan belli anormallikler tümör hücrelerinin varlığını sürdürebilmesi için özeldir. Tümör hücreleri bu sürücü mutasyonlara bağımlıdır. Bu mutasyonların inaktivasyonu kanser hücrelerinin ölümüne yol açar. Dolayısıyla bu mutasyonların analizi, akciğer kanserinin kompleks moleküler patogenezi açığa çıkarmaya yardımcı olacaktır (2, 62, 64).

Akciğer kanserinde etkili olan genetik ve epigenetik mekanizmalar temelinde, hücre siklusu ve proliferasyonunu kontrol eden tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, büyümeyi sağlayan onkogen/protoonkogenlerin aktivasyonu, DNA tamir genlerinde değişiklikler veya diğer hücre aşırı büyümesine neden olan genlerin aktivasyonu ile kanser oluşturur(31, 41, 64). Ayrıca telomeraz aktivitesi de kanser hücrelerinin apoptozdan kaçış için sıklıkla başvurduğu yollardan biridir. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'inde sigaraya bağlı oluşan epigenetik mekanizmalar etkilidir. Akciğer kanserli hastaların %15 kadarını ise sigara içmeyen bireyler oluşturur. Akciğer kanseri gelişiminde sigara içen ve içmeyen bireylerdeki kanserler genel olarak farklı mekanizmalar kullanırlar (18).

Normal hücreler mitojenik büyüme sinyali olmadan proliferere olamazlar. Pozitif sinyal kaskadı devamlı büyüme indüklenmesi ile bozulabilir. Tümör hücreleri kendileri de bazen otokrin etki ile büyüme sinyali oluşturabilir. Onkogenlerin aktivasyonu için bir allelde genetik değişiklik (translokasyon, gen amplifikasyonu, nokta mutasyonları, DNA rearanjmanları) olması gereklidir (dominant etki). Akciğer kanserlerinin hemen tümünde onkogen aktivasyonu bulunur (31). Akciğer kanserlerinde sıklıkla aktive olan onkogenler EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML-ALK füzyonu ve BCL'dir (2). EGFR, KRAS ve ALK mutasyonları KHK'da prototip sürücü mutasyonlar olarak kabul edilmiştir. Bu mutasyonların neredeyse tamamen akciğer ADK'ya özel olduğu anlaşılmıştır (64). Bu sürücü mutasyonları gösteren ADK'ların içinde, EGFR veya ALK mutasyonları gösteren ADK'lar, çoğunlukla hiç sigara içmemiş kişilerde ve akciğer parankiminin periferinde gelişir. KRAS mutasyonu gösterenler ise, SHK ve KHAK gibi, sıklıkla sigara içenlerde ve akciğerin hiler bölgesinde görülür. Bu kompleks ilişki, anatomik kompartman modeliyle açıklanmaktadır. Bu model bölge spesifik kök hücre fikriyle desteklenmektedir; bazal hücreler santral havayolu bronşlarının, tip 2 pnömositler ise terminal solunum ünitesinin kök hücresi olarak kabul edilmektedir (62, 64). Akciğer kanserinin moleküler biyolojisini anlamamızı sağlayan son gelişmeler, özellikle mutasyonla onkogen aktivasyonu (EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2), translokasyon (ALK,ROS1, RET) ve amplifikasyon (MET, FGFR1) yeni hedef tedavi imkanları ve tedaviye cevabı öngörebilen moleküler profile sahip tümör alt tiplerini tanıma imkanı sağlamaktadır (2).

2.9.1. Prognostik Biyobelirteçler

EGFR (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü)

EGFR büyüme sinyal iletim yolağında görevli bir tirozin kinaz reseptörüdür. EGFR'yi kodlayan gen 7p24'de yerleşmiştir. EGFR mutasyonları akciğer kanserli hastaların %10-15'inde görülür. EGFR ekzon 19 ve ekzon 21 nokta mutasyonları en yaygın olanıdır ve bunlar tirozin kinaz inhibitörlerine tümör duyarlılığı kazandırır. Ekzon 20 mutasyonları genellikle tirozin kinaz inhibitörlerine karşı dirençlidir. Bu EGFR mutasyonları sigara içmeyenlerde, genç kadınlarda ve Asya kökenli olanlarda sık görülmüştür. Elde edilen bulgular sigara içmeyen asbeste maruz kalan hastaların EGFR mutasyonları gösterebileceğini ve asbestin bu mutasyonların bir nedeni olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir (83).

ErbB ailesi ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 ve ErbB4 olmak üzere dört hücre yüzey reseptöründen oluşmaktadır. Bu reseptörler hücre dışı faktör bağlayıcı bölge, transmembran bölgesi ve tirozin kinaz aktivitesi gösteren hücre içi bölgesi olmak üzere üç bölgeden oluşurlar (84). Bu reseptörlere hücre dışı bir sinyal aracılığı ile ligand bağlandığında aktive olurlar. Ligand bağlanmasından sonra dimerizasyon gerçekleşir. Reseptör dimerize olduğunda hücre içi bölgesinin tirozin kalıntılarına bir ATP bağlanarak fosforile hale gelir. Fosforilasyonu ile aktive edildikten sonra EGFR hücrede hayatta kalma, hücre büyümesi ve tümör ilerlemesine yol açan bir dizi sinyal molekülünü aktifler. Aktive EGFR, RAS/RAF/MAPK, JAK/STAT ve PI-3K/Atk/mTOR sinyal yollarını aktifler ve bu yollar hücre siklusunu başlatacak birçok nükleer proteini aktive eder. KHDAK'larında EGFR mutasyonu hücre içi tirozin bölgesini kodlayan ilk dört ekzonda (ekzon 18-22) meydana gelir. En sık ekzon 19'daki delesyonlar (% 45) izlenir. Akciğer kanserlerinde EGFR mutasyonları çok büyük oranda ADK'da ve çok az miktarda ise adenoskuamöz karsinomalarda görülebilir. EGFR mutasyonları, genç, sigara içmeyen kadınlarda ve histolojik olarak en sık lepidik patern ile mikropapiller patern gösteren ADK'larda görülmektedir. SHK'da ise mutasyonlar oldukça nadir görülürken ekspresyon artışı ve kopya sayısı artışı sıklıkla görülmektedir (85). EGFR'nin hücre içi tirozin kinaz bölgesine karşı ATP ile yarışacak küçük moleküller ile onkojenik EGFR sinyali engellemeyi sağlayan hedefe yönelik tedavi ajanları geliştirilmiştir. Bu bağlamda 2004 yılında yapılan üç ayrı çalışmada EGFR'nin tirozin kinaz bölgesindeki aktivasyon mutasyonu için kullanılan EGFR tirozin kinaz

inhibitörleri (EGFR-TKI) olan gefitinib ve erlotinibe karşı bazı hastaların dramatik cevap vermesi akciğer kanserinde hedefe yönelik tedaviler açısından dönüm noktası olmuştur. Bu çalışmalardan sonra 2004 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından geri dönüşlü EGFR-TKI olan gefitinib ve erlotinibin kullanımı onaylanmıştır (86-88).

Tümörlerde EGFR saptanması immunhistokimyasal olarak, Western blot, ELİSA (enzime bağlı immünosorbent tayini), Floresan aktivasyonlu hücre sınıflama, ligand bağlama yöntemleri kullanılarak protein tayini ile veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Southern blot, FISH yöntemleri ile gen amplifikasyon tayini yapılarak tespit edilebilir (89).

ALK

ALK insülin reseptör ailesinden, 2. kromozomda yerleşmiş bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. Enzim ilk olarak 1994 yılında anaplastik büyük hücreli lenfomada, t(2;5) (p23;q35) kromozom translokasyonundan kaynaklanan kimerik bir protein NPM (nucleophosmin)-ALK olarak bulunmuştur. NPM, ALK'nın en yaygın füzyon partneridir (90). KHDAK'larda, özellikle ADK'da ALK yeniden düzenlenmesinin prognostik önemi tartışmalıdır. Avrupa Torasik Onkoloji Platformu, cerrahi rezeksiyon materyalinden tanı alan ADK tanılı tümörleri ALK İHK veya ALK FISH ile pozitif kabul edilen hastalarda genel sağkalımın daha iyi olduğunu ortaya koymuştur (91). Buna karşılık, Asya ırkında sigara içicisi olmayan akciğer rezeksiyon materyallerinden ADK tanılı hastalar arasında yapılan bazı çalışmalar, ALK pozitiflik durumu ile hastalısız sağkalım arasında negatif ilişki olduğunu göstermiştir (92). Bu keskin fark, çalışma nüfusunun farklı etnik kökeniyle ilişkili olabilir.

KHDAK'de EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) geni ile ALK geni füzyonu sonucu ALK sinyali aktiflenir. EML4-ALK füzyonu KHDAK'ların yaklaşık %3-6 kadarında görülmektedir. EML4-ALK füzyonu sigara öyküsü bulunmayan genç erkeklerde daha sık görülmektedir. Yapılan çalışmalar ALK pozitif KHDAK'larda solid büyüme paterninin, kribriform yapının, müköz hücre varlığının (taşlı yüzük hücresi veya goblet hücresi), yaygın ekstrasellüler mürin birikiminin daha sık görüldüğünü ortaya koymaktadır (93, 94). Lepidik patern ve nükleer pleomorfizm EGFR pozitif tümörlerin aksine ALK pozitif KHDAK'da çok nadir görülmektedir. EML4-ALK translokasyonu bulunan tümörlerde EGFR mutasyonu görülmemektedir (95-97). ALK'nın prognostik rolü, cerrahi tedaviye aday olmayan ileri KHDAK hastalarında da rapor edilmiştir. ALK pozitif KHDAK'li

hastalar, beyin metastazlarında radyoterapiden sonra EGFR, KRAS pozitif tümörlerle karşılaştırıldığında sağkalımda iyileşme sağladığını göstermiştir (98)

KRAS

KRAS; NRAS ve HRAS ile birlikte RAS ailesinin üyesi olup, hücre içi büyüme sinyal iletimini kontrol eden bir protoonkogendir. RAS, guanozin nükleotidlerini (guanozin difosfat [GDP] ve guanozin trifosfat [GTP]) bağlayan küçük G proteini ailesinin bir üyesidir. KRAS'ta en sık aktivasyon mutasyonları oluşur ve bu durumda büyüme sinyali olmadan GTP sürekli aktif durumu ile çoğalma sinyali üretir (99). RAS mutasyonları tüm tümörlerin yaklaşık 1/3'ünde bulunur. Akciğer kanserlerinde oluşan RAS mutasyonlarının %90'ından fazlasını KRAS mutasyonları oluşturur. NRAS ve HRAS mutasyonları ise akciğerde oldukça nadir görülür. KRAS mutasyonu en sık ADK'larda (%25-40) olmak üzere KHK'ların yaklaşık olarak %20-22'sinde görülmektedir. KRAS pozitif KHK hastalarında sıklıkla sigara öyküsü mevcut olmasına karşın sigara ile ilişkisi tam olarak ortaya konulamamıştır. KRAS mutasyonunun yaklaşık %17 kadarında ise sigara öyküsü yoktur (99-102). Retrospektif çalışmaların çoğu KRAS mutasyonları içeren KHK'lı hastalarda kötü bir genel sağkalım arasındaki ilişkiyi bildirmiştir (103). Bununla birlikte, erken dönem rezeke edilmiş KHK'larda platin bazlı adjuvan kemoterapi cevabını karşılaştıran dört denemeyi içeren yakın tarihli bir analiz, KRAS mutasyon durumunun anlamlı bir prognostik belirteç olmadığını göstermiştir (104).

ROS1

ROS1 6q16-6q22 kromozomunda yer alan; reseptör tirozin kinaz, ekstrasellüler domain, hidrofobik transmembran bölgesi ve intrasellüler kinaz domaini içeren, insülin reseptör ailesi ile kısmen ilişkili bir reseptördür. Bu kromozomal bölge, glioblastom, kolanjiyokarsinom ve akciğer ADK dahil olmak üzere farklı malignitelerdeki kromozomal yeniden düzenlemelerinde yer almaktadır (105). ROS1 proteini erişkin insanda en fazla böbrekte bulunmakla birlikte serebellum, periferik nöral dokular, mide, ince barsak ve kolonda da tespit edilmiştir. Fakat normal insan akciğer dokusunda ROS1 proteini yoktur (106).

ROS1 yeniden gen düzenlenmesi ilk olarak 2007'de akciğer ADK'da keşfedilmiştir. 2012 yılında yapılan bir çalışma, büyük bir akciğer ADK kohortunda (n = 1,073) % 2'lik bir ROS1 yeniden düzenleme sıklığını belirlemiştir. Ek olarak, ROS1 düzenlemelerini barındıran hastalarda crizotinib kullanımını araştıran bir faz I çalışmasının ilk sonuçları umut verici olmuştur (107). Günümüzde ROS1 KHDAK'da onaylanmış bir hedef tedavidir. Bir birinci faz çalışmasında, çok hedefli MET/ALK/ROS1 inhibitörü crizotinib ROS1 yeniden gen düzenlenmesi bulunan KHDAK'larda kayda değer etkinlik göstermiş ve sonuç olarak ABD'de FDA tarafından onaylanmıştır. İleri evre KHDAK'da ROS1 geninin test edilmesi rutin olmalıdır (105, 108).

MEK

MEK1, MAPK-1 olarak da adlandırılan serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesi olup RAS alt yolağında görevlidir. Literatürde incelenen 107 ADK'dan ikisinde, kinaz bölgesi olmayan ekzon 2'de MEK mutasyonu saptanmıştır. MEK mutasyonu, diğer mutasyonları dışlayacağından tedavi direnci açısından önemlidir (109).

MET

7q21-q31 kromozomunda bulunan proto-onkogen olan MET, aynı zamanda hepatosit büyüme faktörü reseptörü olarak da bilinen bir membran tirozin kinaz reseptörünü kodlar. Hepatosit büyüme faktörü ligandı bağlandığı zaman reseptör homodimerize olur ve RAS yolağını aktifler. KHDAK'de MET gen amplifikasyonu %1-7 oranında görülür. EGFR tirozin kinaz reseptör direnci mekanizmasında rolü vardır (110).

PI3K/AKT/mTOR

Hücre proliferasyonu, diferansiyasyon, adezyon ve motilitede görev alan bir çeşit sinyal iletim yolağıdır. Bu yolakta meydana gelen değişiklikler hem KHDAK hem de KHAK'larda bildirilmiştir. Bu yolak EGFR, HER2, insülin benzeri büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü ile aktiflenebilir. Yolağın deregülasyonu KHDAK'lerin %50-70 kadarında görülür. Bu yolak EGFR, KRAS, PI3K veya ATK'da oluşan mutasyonlar ile veya tümör baskılayıcı gen olan PTEN'in azalması gibi birden fazla mekanizma ile aktiflenebilir.

PIK3CA mutasyonu KHDAK'nın %1-3 kadarında görülebilir. SHK'larda, ADK'lara göre daha sık görülmektedir (111-113)

RET

RET 10q11.2 kromozomunda yerleşimli nöral krest gelişimi düzenleyen tirozin kinaz reseptörüdür. RET ile ilgili değişikliklerin papiller ve medüller tiroid karsinomlarında rol oynadığı uzun süredir bilinmektedir. Akciğer kanserlerinin çok az bir kısmında (%1-2) KIF5B-RET füzyonu tespit edilmiştir. Bu füzyonun varlığı EGFR, KRAS ve ALK mutasyonlarının varlığını dışlamaktadır (114-116).

BRAF (B type Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)

BRAF, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında görev alan RAS/MAP kinaz sinyal yolağını regüle etmekle görevli RAF kinaz ailesinin bir üyesidir. 7p24 numaralı kromozomda yer alır ve mutasyonu sonucu MAP kinaz ile güçlü bir mitojenik etki oluşturur (117). BRAF mutasyonu, kutanöz malign melanom, papiller tiroid karsinomu, kolorektal karsinom, KHDAK, pleomorfik ksantostositoma dahil olmak üzere çeşitli neoplazmlarda görülmekle birlikte en sık melanomlarda görülür (%50-70). BRAF mutasyonlarının tespiti ayrıca birkaç melanom dışı malignite için tedavilere rehberlik etmektedir. Papiller tiroid karsinomunda BRAF V600E mutasyonlarının tespiti tanısal doğrulama sunar ve daha agresif bir hastalık seyrini öngörür. BRAF V600E mutasyonları olan metastatik kolorektal karsinomlar, daha kötü bir prognoz ve anti-EGFR tedavisine direnç göstermiştir. Preklinik çalışmalar, BRAF V600E mutasyonları olan malign astrositomaların da BRAF inhibitör tedavisi için potansiyel olduğunu göstermiştir. Saçlı hücreli lösemili ve BRAF mutasyonlu akciğer ADK tanısı olan hastalarda da BRAF inhibitör tedavisine yanıtlar bildirilmiştir (118-120). En sık görülen "V600E" mutasyonu melanom olgularındaki BRAF mutasyonlarının yaklaşık %90 kadarını oluşturmaktadır (121). BRAF mutasyonlarının görülme sıklığı melanomlarda en yüksek olduğu için bugüne kadarki klinik çalışmaların büyük kısmı, BRAF'in kendisini veya MEK 1/2 'yi hedef alan, büyüme ile ilişkili olan bu hastalığa odaklanmıştır (122). Mutant BRAF'in, metastatik melanomlu hastalarda RAF inhibitörlerinin umut vaat eden klinik çalışmaları ile birlikte akciğer ADK'da da bir sürücü mutasyon olduğunu ortaya koyan veriler, KHDAK'da BRAF hedefli tedavilere yönelik ileri çalışmalara ivme kazandırmıştır (122).

V600E, akciğer kanserindeki BRAF mutasyonlarının % 50'sinden fazlasını temsil ederken, bu tümör için daha az oranda G469A ve G594G bölgelerinde mutasyon bulunur (117). Bunlardan V600E'ye özgü inhibitör PLX4032 (Vemurafenib), melanom hastalarında ümit verici klinik aktivite gösteren ilk BRAF spesifik inhibitördür. İlginç bir şekilde, BRAF-V600E mutasyonlu bir akciğer ADK vakası bu ilaca cevap vermiştir (119, 123).

Akciğer kanserinde BRAF mutasyonlarının tanımlanması EML4-ALK gibi birçok translokasyonun keşfedilmesine öncülük etse de, henüz sadece birkaç BRAF mutasyonlu akciğer kanseri klinik araştırması tamamlanmıştır. RAS/MAP sinyal yolunun bir üyesi olarak BRAF, KRAS'ın altında yer alır ve doğrudan ERK'i fosforile eden MEK'i fosforile eder. Bu yolak, çoğalma ve hayatta kalma lehine olan genlerin transkripsiyonuyla sonuçlanır (122). Şekil 1'de BRAF sinyal yolağı verilmiştir. İki grup tarafından yapılan prelinik çalışmada, mutant BRAF'ın akciğer ADK'nın başlatılması ve sürdürülmesindeki rolünü onaylamıştır. Ji ve arkadaşları (ark.) tarafından geliştirilen indüklenebilir transjenik BRAF V600E fare modeli, mutant BRAF'ın, akciğer ADK'larının gelişimi için yeterli olduğunu göstermiştir (124). Dankort ve ark. tarafından üretilen BRAF V600E mutasyonu içeren bir fare modeli, benzer şekilde adenomatoz tümörlerin gelişimine yol açmıştır (125).

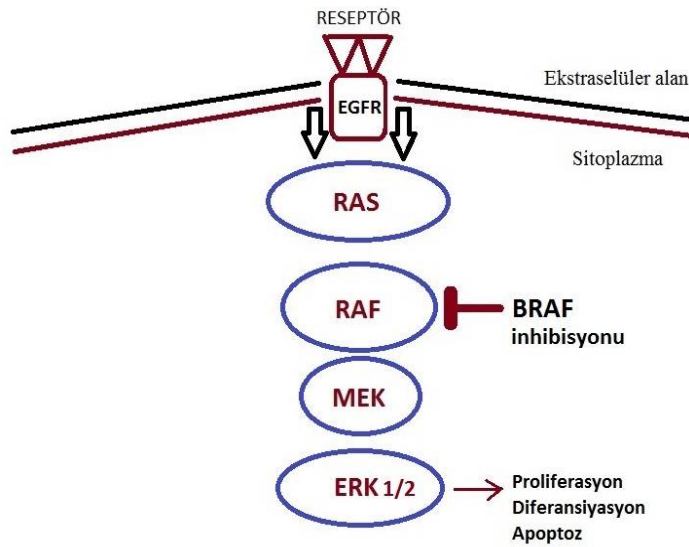
Mutasyonların doğru ve hızlı taranması, akciğer kanserlerinde, özellikle moleküler hedef terapisine uygunluklarının belirlenmesinde önemlidir. BRAF'ı tanımlamak için mevcut standart teknik PCR testidir. Bu teknik, RNA veya DNA'nın patoloji spesmenlerinden izolasyonunu gerektirir, birçok tanısal patoloji laboratuvarında rutin olarak yapılmaz ve bazı önemli sınırlandırmalar bulundurur. Bunlardan bazıları, spesifik dokuların kontaminasyon olasılığı ve sınırlı invaziv prosedürlerle elde edilen, spesifikliği bozabilecek ve yanlış negatif sonuçlara yol açabilecek küçük boyutlu biyopsilerden DNA izolasyonunun zorluğudur (126). Pyrosekans analiz temel olarak DNA sentezi esnasında serbest kalan pirofosfat (PPi) tespitine dayanan bir sistemdir. 1977 yılında Sanger ve ark.'ın uyguladığı dideoksi tekniği elektroporetik bir sistem olarak güvenli olmasına rağmen yüksek maliyet ve iş gücü gerektirmesi ve PCR reaksiyonu sonucu toplam ürün miktarı az olduğunda sistemin çalışmaması gibi dezavantajlar barındırır (127). 1992 yılında Smith ve ark. floresan temelli sekans yöntemini geliştirdiler. Bu yöntem elektroporetik olmayan bir floresan sistemidir. Sistemin temel mantığı, kalıp DNA ipliği üzerine sekans primerinin sentez edilmesi sırasında serbest kalan inorganik pirofosfatların ATP sülfirilaz enzimi ile ADP'nin ATP'ye dönüşümü,

bu esnada lusiferinin oksiferine dönüşümü ile oluşan ışığın okunması sonucunda diagram üzerine piklerin oluşturulması temeline dayanır (128). Bu yöntemde her reaksiyon için ayrı zamanlarda adenin, guanin, timin ve sitozin nükleotidleri ortama verilmektedir. Q24 (Qiagen Heidelberg, Almanya) sekans cihazında hangi nükleotid reaksiyon verir ve ışımaya olursa sistem ilgili nükleotidin pikini vermektedir. Aynı zamanda sistemin daha hızlı çalışması için ortama substrat ilave edilmektedir. Sistemin kalibrasyon ayarı için enzim ve substrat bileşiği ölçümü başlangıçta vermektedir. Bu sonuç, sistemin çalışıp çalışmadığı hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca ortamda reaksiyon sonrası yanlış pik vermemesi ve diğer reaksiyonu etkilememesi için apiraz enzimi ile nükleotid trifosfatları, mono ve di nükleotitfosfatlara (dNTP); ATP ise mono ve di fosfata parçalanmaktadır. Bu durumda yeni dNTP verildiğinde reaksiyon yeniden başlamaktadır (127).

Tümörlü dokuların bir bölümünde onkojenik mutasyonları tespit etmek için İHK'sal boyama yönteminin kullanılması, eşzamanlı morfolojik incelemeye, özellikle tümör hücrelerinin yüzdesinin tahminine ve ayrıca pozitiflik gösteren hücrelerin sayısının ve yoğunluğunun belirlenmesine olanak sağlar. İHK'sal BRAF yoğunluğu, BRAF mutasyon taramasında önemli ek bilgiler sağlayabilir (129). BRAF V600E için İHK, daha hızlı analiz, daha az masraf, daha yüksek doku koruması ve daha geniş laboratuvar kullanılabilirliği gibi güncel moleküler tanı teknikleri üzerinden pratik avantajlar sunar. Ayrıca İHK, BRAF V600E'nin küçük tümör odaklarında teşhisine ve daha önceki PCR tabanlı çalışmalarda da karşılaşılan, moleküler bazlı bir yaklaşım için gerekli olan zahmetli ve pahalı mikrodiseksiyona ihtiyaç duymadan, BRAF genotiplerinin intratümöral heterojenitesinin değerlendirilmesine olanak sağlayabilir. Her ne kadar İHK teknik olarak daha kolay ve mutasyonel analizden daha hızlı bir yöntem olsa da, boyama yoğunluğunun subjektif ölçümü gerçeği ve antikolar arasındaki yanıt değişkenliği, mutasyon analizini hala daha güvenilir bir test yapmaktadır (120).

Epitelyal maligniteler bir dizi BRAF mutasyon prevalansı gösterebilir. 1046 KHDAK olgusunu değerlendiren bir çalışmada, akciğer ADK'larının % 4.9'unun ve akciğer SHK'larının % 0.3'ünün BRAF mutasyonlarına sahip olduğunu tesbit etmiştir (126). Yaş, cinsiyet, ırk, sigara içme öyküsü ve hastalığın evresi gibi klinikopatolojik özellikler açısından, BRAF mutasyonlu KHDAK hastaları, bilinen bir onkogenik sürücü taşımayan hastalara benzer şekildedir. Bununla birlikte, birçok çalışma sigara içmeyenlerde BRAF V600

mutasyonlu KHDAK'larının daha yaygın olduğunu bildirmiştir. Yaşam beklentisi için yapılan bazı çalışmalar BRAF mutasyonlu KHDAK'lı hastaların sonuçlarının, bilinen bir sürücü mutasyonu olmayan hastalara benzer olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, özellikle V600E mutasyonları olan hastalar için daha az yaşam beklentisinin olduğu bildirilmiştir (130).

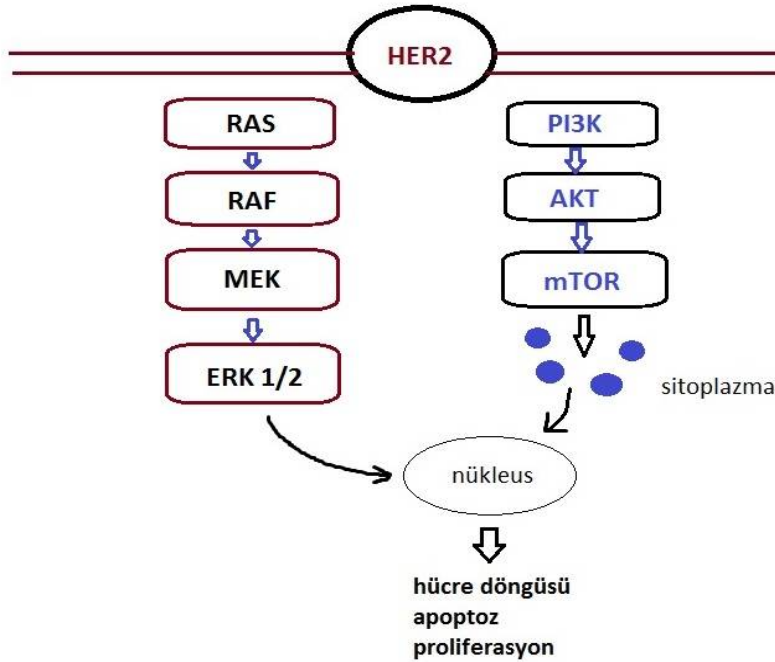


Şekil 1: BRAF sinyal yolağı

HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)

HER2, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran reseptör glikoproteinidir ve meme kanseri, akciğer ADK, kolorektal ve mide kanseri gibi çeşitli solid tümör tiplerinin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynar. HER ailesi sellüler reseptörleri yapısal olarak 4 sınıfa ayrılmaktadır; HER1 (EGFR) (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4). HER2 için bir ligand tanımlanmamasına rağmen, son araştırmalar, HER2'nin, epidermal büyüme faktörü reseptörleri ailesinin diğer üyeleri gibi heterodimerizasyon ortağı olduğunu göstermektedir. HER2 hücre içi alanı tirozin kinaz aktivitesi, hücre proliferasyonu, göç, apoptoz ve farklılaşma ile ilgili sinyal iletim yollarını tetikler (131). Şekil 2'de HER2 sinyal

yolağı verilmiştir.KHDAK'da en yaygın HER2 mutasyonları, ekzon 20 insersiyonu ve hücre dışı bölge mutasyonlarıdır. HER2 amplifikasyonunun, KHDAK'ların % 22,8'inde bulunduğu bildirilmiştir. HER2 aşırı ekspresyonu/amplifikasyonu akciğer ADK'da diğer akciğer karsinomu histolojik tiplerinden daha sık görülmüştür (132). Trastuzumab gibi hedeflenmiş HER2 monoklonal antikorlarının terapötik etkisi, KHDAK'da tam olarak açıklanamamıştır. HER2 için İHK ve FISH şu anda tanısal testler olarak kullanılmaktadır (133). Meme ve mide kanserlerinde, HER2 İHK skoru +2 olan vakalar için ek FISH yöntemi ile konfirme etme gereksinimi doğmaktadır. HER2 İHK skorları 0/1 ve +3 olan olgularda HER2 İHK ve FISH sonuçları arasındaki uyum daha da önemlidir, çünkü bu durumlarda ilave FISH testleri olmadan sonuç doğrulanır (132). Çeşitli çalışmalar, immünohistokimyasal teknikleri kullanarak akciğer kanserlerinde HER2 onkogen ve protein ekspresyonunu değerlendirmiştir. Bu çalışmalar, KHDAK hastalarının %27 - 57'sinde HER2'nin aşırı ekspresyonunu, ve bunlar içinde de ADK'ların en yüksek aşırı ekspresyon oranlarına sahip olduğunu bildirmiştir (133). Frekanstaki bu geniş dağılımın, test metodolojilerindeki ve çalışılan hasta popülasyonlarındaki farklılıklar ile ilişkili olması muhtemeldir. KHDAK'da HER2'nin aşırı ekspresyonu, daha kötü bir sağkalımla ve kısa nüks zamanıyla ilişkilendirilmiştir (134).



Şekil 2: HER2 sinyal yolağı

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma TTF-18033 numaralı proje olarak Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş ve 2018/1344 protokol no ile Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Bkz Ek).

Çalışmamızda Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda KHDAK tanısı alan 121 olguya ait akciğer rezeksiyon materyali değerlendirilmiş; olgulara ait yaş, cinsiyet, tümör tipi ve alt tipi, tümör yerleşimi, odak sayısı, tümör boyutu, bronş cerrahi sınır durumu, tümörün ana bronşa uzaklığı, tümöre karşı oluşan inflamatuvar yanıt, nekroz varlığı, plevranın durumu, tümörün plevraya uzaklığı, lenfovasküler invazyon varlığı, disseke edilen lenf nodu sayısı ve lenf nodlarının durumu, tümörün evresi gibi demografik ve histopatolojik özellikler arşiv raporlarından elde edilmiştir.

Olgularda değerlendirilen parametreler;

- Yaş: tanı anındaki yaşı
- Tümör boyutu: tümörün en büyük boyutu
- Tümör yerleşim yeri: tümörün akciğerdeki yerleşim yerine göre sağ üst/ sağ orta/ sağ alt/ sol üst/ sol alt
- SHK için histolojik alt tip: DSÖ 2015 sınıflamasına göre; keratinize/ non keratinize/ bazaloid
- ADK için histolojik alt tip: DSÖ 2015 sınıflamasına göre; asiner/ lepidik/ solid/ mikropapiller/ papiller/ müsinöz
- Odak sayısı: tek/ multipl
- Bronş cerrahi sınır: negatif/ pozitif
- Tümöre karşı inflamatuvar yanıt: yok/ hafif/ orta/ şiddetli
- Nekroz: var/ yok
- Plevral invazyon: var/ yok
- Lenfovasküler invazyon: var/ yok
- Metastatik lenf nodu: var/ yok
- Metastatik lenf nodunun yeri: peribronşial bölge/ 4 nolu/ 5 nolu/ 7 nolu/ 10 nolu lenf nodu

- T Evresi: DSÖ 2015 TNM evrelendirme sistemine göre T1a, T1b, T2a, T2b, T3, T4
- N Evresi: DSÖ 2015 TNM evrelendirme sistemine göre N0, N1, N2, N3
- İmmunhistokimyasal HER2 ekspresyonu: 0, 1+, 2+, 3+
- FISH yöntemle HER2 ekspresyonu: var/ yok
- İmmunhistokimyasal BRAF ekspresyonu: 0, 1+, 2+, 3+
- Pyrosekans yöntemle BRAF ekspresyonu: var/ yok

Olguların seçimi sırasında, her bir olgunun H&E boyalı tümör preparatları incelenerek tümör hücrelerinin en yoğun ve nekrozun en az olduğu bloklar çalışmaya dahil edilmiştir. Seçilen bu bloklardan hazırlanan hematoxilen-eozin boyalı preparatlar iki gözlemci tarafından tekrar incelenmiş ve DSÖ 2015 kriterlerine göre yeniden histopatolojik tiplendirme yapılmıştır (135).

Olgulara ait parafin bloklardan alınan kesitlere ayrıca İHK'sal HER2 ve BRAF boyaları uygulanmış, 50 olguda moleküler yöntemle BRAF ve HER2 mutasyon analizi yapılmış ve sonuçları diğer parametrelerle karşılaştırılmıştır.

3.1. BRAF ve HER2 İmmunhistokimyasal Çalışma Prosedürü ve Değerlendirilmesi

Formalin fikse parafine gömülü 121 adet dokudan İHK'sal boyama için üç mikronluk ikişerli kesitler alındı. İHK Avidin-Biotin kompleks sistemi (ABC) kullanılarak yapıldı. Hazırlanan kesitler pozitif yüklü poly-L-lysin (MierSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) kaplı lamlara alınarak bir gece 37 derecelik etüvde bekletildi. Seçilen kesitlere İHK'sal HER2 (Dako, A0485, 1:50 dilüsyon) ve BRAF (Medaysis, [F-7]:MC0675, 1:10 dilüsyon) boyaları uygulandı. Otomatik boyama cihazında boyanan preparatlar derecesi giderek artan alkollerden (%96 ve %99.5) sırasıyla beşer dakika geçirildikten sonra 15 dakika ksilolde bekletildi. Son olarak hazırlanan preparatlar kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif boyandığı bilinen dokular ile HER2 ve BRAF için pozitif kontrol değerlendirmesi yapıldı.

İHK'sal HER2 boyanmasının değerlendirilmesinde %10'dan az tümöral hücrede boyanma olması veya membranöz boyanma için skor 0, %10'dan fazla tümöral hücrede soluk membranöz boyanma skor 1+, %10'dan fazla tümöral hücrede zayıf, orta komplet

membranöz boyanma skor 2+, %10'dan fazla hücrede güçlü komplet membranöz boyanma skor 3+ olarak değerlendirildi (132, 136).

İHK'sal BRAF boyanmasının değerlendirilmesinde tümör hücrelerinin güçlü ve diffüz sitoplazmik boyanması 3+, orta derecede veya fokal güçlü boyanma 2+ olarak tanımlandı. İzole nükleer boyanma, tek tük hücrede zayıf boyanma 1+ olarak tanımlandı ve negatif olarak kabul edildi (120).

3.2. HER2 FISH Uygulanması ve Değerlendirilmesi

1. Preparatlar iki-üç mikron kalınlığında kesilmiş olan dokulardan oluşmakta olup 60°C etüvde bir saat bekletildi.
2. Preparatlar deparafinizasyon işlemi için iki kez beşer dakika Ksilen solüsyonunda, iki kez ikişer dakika %96'lık alkolde, iki kez ikişer dakika %70'lik alkolde bekletildikten sonra iki dakika yıkama solüsyonunda bekletildi.
3. Önceden hazırlanan ön yıkama solüsyonu ile doldurulmuş su banyosu 98 dereceye çıkartılıp preparatlar bu solüsyonda 10 dakika bekletildi.
4. Preparatlar soğumak üzere ön yıkama solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
5. Oda sıcaklığındaki yıkama solüsyonu ile preparatlar iki kez üçer dakika yıkandı.
6. Preparatlardaki doku bölgeleri işaretlendi ve hybridizere konularak bu bölgelere pepsin damlatıldı, hybridizerde üzeri kapalı şekilde beş dakika bekletildi.
7. Preparatlar oda sıcaklığındaki yıkama solüsyonunda iki kez üçer dakika yıkandı.
8. Preparatlar iki dakika %70'lik alkolde, iki dakika %85'lik alkolde, iki dakika %96'lık alkolde bekletildi.
9. Preparatlar bir-iki dakika havada kuruduktan sonra üzerlerine 10 mikrolitre -20 derecede prop eklenip lamel ile kapatıldı.
10. Preparatlar hybridizerde 66 derecede 10 dakika, 45 derecede 120 dakika bekletildi.
11. Önceden hazırlanan yıkama solüsyonu (47,5 ml distile su+ 2,5 ml Strigent solüsyonu)'nun bir kısmı 65 derecedeki su banyosu içine konuldu, bir kısmı ise oda sıcaklığında bekletildi.
12. Preparatlar önce oda sıcaklığındaki Strigent yıkama solüsyonunda bir dakika bekletilerek lamellerinden ayrıldı.

13. Daha sonra preparatlar 65 derecedeki strigent solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
14. Preparatlar oda sıcaklığındaki yıkama solüsyonunda iki kez üçer dakika yıkandı.
15. Preparatlar %70'lik alkolde iki dakika, %85'lik alkolde iki dakika, %96'lık alkolde iki dakika bekletildi.
16. Preparatlar beş dakika havada kurmaya bırakıldı.
17. Preparatlara 15 mikrolitre DAPI damlatılarak kapatma işlemi gerçekleştirildi.
18. Preparatlar -20 derecede saklandı.

HER2 amplifikasyonu, prob setleri (PathVysion [Abbott] ve HER2 FISH pharmDx [Dako]) kullanılarak FISH yöntemi ile değerlendirildi.

Olympus BX50 binökleer floresan mikroskopta, triple (dogi/red/green) ve dual (red/green) filtreler altında, her bir dokuda tümör dışı hücre nükleusları sayılmamaya dikkat edilerek en az 20 tümör hücre nükleusu değerlendirilmiştir. Normal interfaz nükleusunda; 2 kırmızı ve 2 yeşil sinyal olması beklenilmektedir. HER2 gen lokusunun amplifiye olduğu nükleuslarda ise; kırmızı sinyalin çoklu kopyaları veya kırmızı sinyal kümelerinin varlığı olarak gözlenecektir. Analiz yapılan 20 interfaz nükleusunun; kırmızı sinyal sayısının toplamının, yeşil sinyal sayısının toplamına bölüldüğünde çıkan değer ikiden küçük ise “amplifikasyon yok”, ikiye eşit veya büyük ise “amplifikasyon var” olarak değerlendirilmiştir.

3.3. BRAF Pyrosekans Analizi

Dokulardan DNA Ekstraksiyonu

Disseke edilen tümör kesitlerinden, standart deparafinizasyon ve rehidratasyon sonrası QIAGEN Therascreen BRAF Pyro Kit (QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanarak aşağıdaki protokole uygun olarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

- 10 mikron kalınlığında alınan doku kesitleri steril 1.5 ml.'lik ependorf tüpe alındı.
- Parafini uzaklaştırmak için tüpe bir ml. ksilen eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
- 14.000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi.
- Pipetleme ile doku pelletine dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

- Ksileni uzaklaştırmak için bir ml. etanol (%96–100) eklenip 15 sn. vortekslendi.
- 14.000 rpm’de iki dakika santrifüj edildi.
- Pipetleme ile doku pelletine dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- Etanolü tamamen uzaklaştırmak için 10 dk. boyunca 56°C’de bekletildi.
- Tamamen kurumuş doku örneğine 180 µl buffer ATL ve 20 µl proteinaz K eklenip 15 sn vortekslendi.
- Doku tamamen eriyene kadar lizis için 56°C’de bir gece bekletildi.
- Gece inkübasyana bırakılan örnekler 90 °C’de bir saat daha bekletildi.
- Örnekler oda sıcaklığına alındı, spin yapıldı ve oda sıcaklığında soğuması için beş dk. bekletildi.
- Örnekler 200 µl buffer AL eklendi, 15 sn. vorteks ve spin yapıldı.
- 300 µl etanol (%96–100) eklendi ve 15 sn. vorteks ve spin yapıldı.
- Her bir hasta için ekstraksiyon kitinin içinde bulunan toplama tüpü ve filtreli tüpten bir adet hazırlandıktan sonra ependorf tüpündeki tüm karışım filtreli tüplere aktarıldı.
- Toplama tüpü ve filtreli tüp 9.000 rpm’de iki dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yeni iki ml.’lik filtreli tüpe yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl Buffer AW1 eklenerek 9.000 rpm’de iki dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yeni iki ml.’lik filtreli tüpe yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 eklenerek 9.000 rpm’de iki dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü yenisi ile değiştirildikten sonra 14.000 rpm’de üç dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak filtreli tüp hasta barkod numarası yazılı steril 1.5 ml’lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 100 µl Buffer ATE ilave edilerek oda ısısında bir dakika beklendi.
- Süre sonunda 14.000 rpm’de bir dakika santrifüj yapılarak filtreli tüpte bulunan sıvının ependorf tüpe geçmesi sağlandı.
- Spin kolonlar atılarak tüplerdeki DNA örnekleri +4 derecede saklandı.

3.4. PCR Analizi

PCR primerleri, Master Mix, CoralLoad ve kitin içindeki H₂O oda sıcaklığına çıkartıldı.

Ardından her bir primer için miks hazırlandı. (2 ayrı primer için 2 ayrı miks: PCR Primer BRAF 600, PCR Primer BRAF 464-469)

Her bir örnek için:

- PyroMark PCR Master Mix 12,5 µl
- CoralLoad Concentrate, 10X 2,5 µl
- PCR Primer 1µl
- H₂O 4 µl kullanılarak miks hazırlandı.

0,2'lik PCR tüplerine 20 µl miks dağıtıldı. Üzerine 5 µl ilgili DNA konuldu. Ardından aşağıdaki PCR protokolü uygulandı:

15 dakika 95 °C 1 cycle

20 saniye 95 °C

30 saniye 53 °C

20 saniye 72 °C 42 cycle

5 dakika 72 °C 1 cycle

İzole edilen DNA örneklerindeki BRAF mutasyonlarını tespit etmek için forward ve reverse primerler kullanılarak genlerin en sık mutasyon görülen ekzon bölgeleri PCR ile bu işlemlerde geçirilerek çoğaltıldı ve sekans analizi ile mutasyon analizi yapıldı. Her işlem için fazladan solüsyon miktarı hazırlanarak pozitif ve negatif kontrol DNA örnekleri (0,4-2 ng'lık)

kullanıldı. BRAF mutasyon analizi BRAF geninin kodon 464-469 ve 600 (lot:148047275 Hielderberg Germany) bölgeleri için pyrosekans yöntemi ile gerçekleştirildi. Pyrosekans sisteminde 15-30 ng. DNA ile çalışılmaktadır. Bu da çok düşük miktardaki DNA ile sonuç verebilmemizi sağlamaktadır. PCR reaksiyon şartları; pyromark PCR master mix 12,5 µl, PCR primer 1 µl steril distile su, 6,5 µl ve kalıp DNA 30 ng olacak şekilde son hacim 25 µl geçmemek şartıyla termalcycle'a konularak protokol uygulandı.

3.5.Pürifikasyon ve Sekanslama

Steril iki ml.'lik plastik tüplere, Streptavidin 2 µl, bağlanma tamponu 40 µl ve steril distile su 28 µl ve PCR ürünlerinden 10 µl eklendi. Orbital shaker ile 10 dk streptavidinin çökmesi engellenerek, kalıp DNA'ya bağlanması sağlandı. Ardından Qiagen vakum sisteminde çektilerle alkol-denatürasyon-yıkama kuyucuklarından geçirilerek plaka içindeki sekans primerlerine bırakıldı. Sekans primerleri ise 24,2 µl annealing tampon ve sekans primeri 0,8 µl olacak şekilde kondu. Plaka 80°C ısı bloğunda 2 dk bekletildi. Q24 cihazına enzim, substrat ve dNTP kondu. Ardından Q24 cihaza yerleştirildi ve sekans işlemi gerçekleştirildi. BRAF kodon ve sekans primerleri Tablo VI'da verilmiştir.

Tablo VI: BRAF ekzon ve sekans primerleri

EKZON	SEKANS PRİMERİ
BRAF kodon 464-469	5''- CAATGGCTCCGGTG-3''
BRAF kodon 600	5''-TGATTTTGGTCTAGCTACA-3''

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS for Windows 20.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler bakımından gruplar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve normal dağılım göstermeyen değişkenler bakımından ise Kruskal Wallis ve Mann Whitney U tesleri ile karşılaştırıldı. Normal dağılan nicel değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama \pm standart sapma, normal dağılmayan nicel değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ise medyan (25-75. persantil) olarak gösterildi. Nitel değişkenler arasındaki ilişki Ki Kare analizi ile incelendi. Bu değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri frekans (%) şeklinde ifade edildi. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

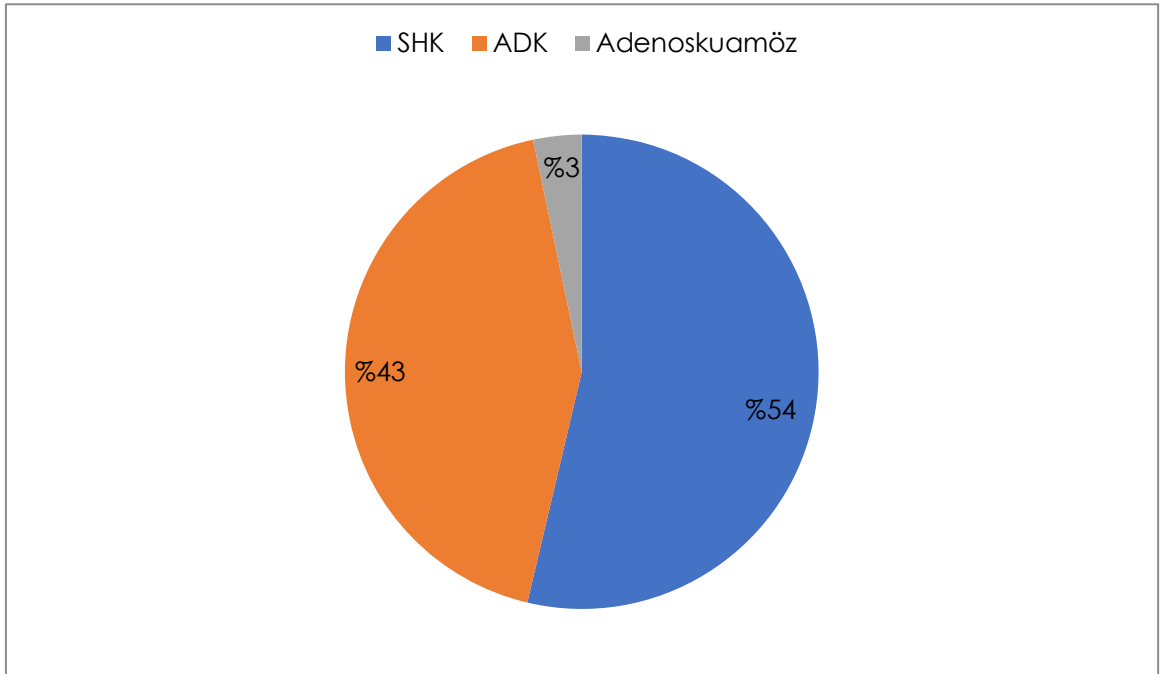
4. BULGULAR

Kurumumuzda KHDAK tanısı alan 121 olguya ait akciğer rezeksiyon materyali çalışmaya alındı; demografik ve histopatolojik özellikleri arşiv raporlarından elde edildi.

İncelenen 121 olgunun 108'i (%89,3) erkek, 13'ü (%10,7) kadındı.

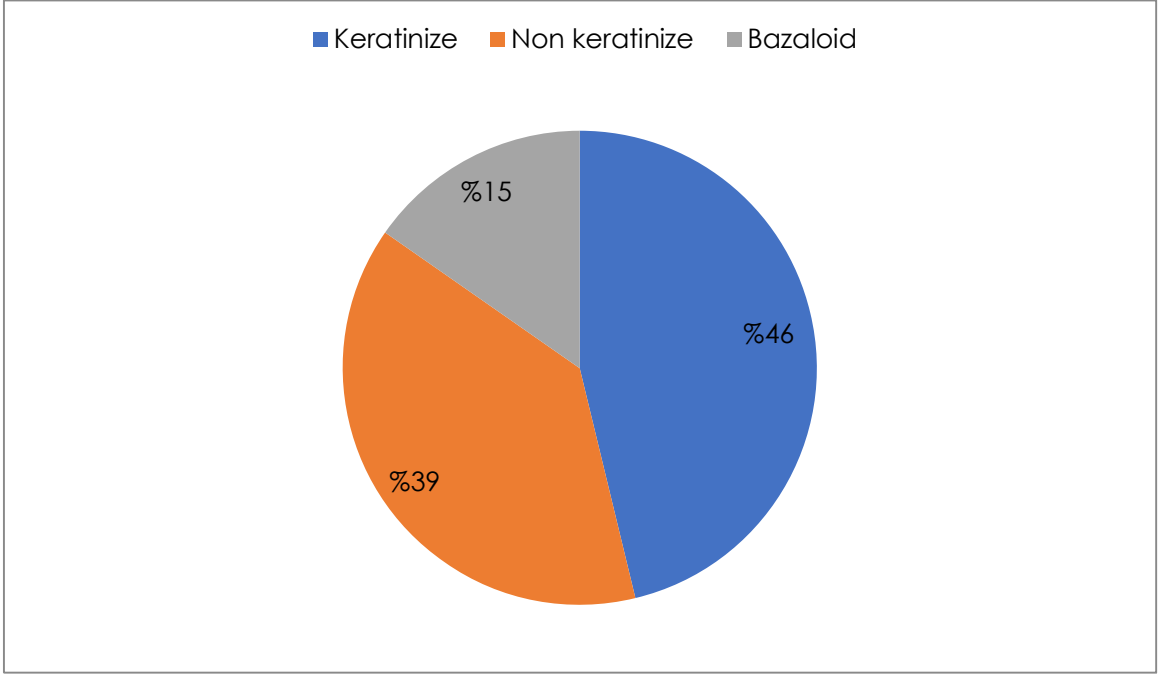
Ortalama yaş 65,5 ($\pm 9,48$)'ti. Minimum yaş 36, maksimum yaş 85'ti.

Olguların 65'i (%53,7) SHK, 52'si (%43) ADK, 4'ü (%3,3) Adenoskuamöz Karsinom tanısı aldı. Adenoskuamöz Karsinom tanılı 4 olgunun 1'inde %70 SHK + %30 ADK; 1'inde %60 SHK + %40 ADK; 2'sinde %90 ADK + %10 SHK şeklinde tümöral dağılım izlendi. Histolojik tiplerin dağılım şeması Şekil 3'te; SHK alt tiplerinin mikroskopik görüntüleri Resim 1'de; ADK alt tiplerinin mikroskopik görüntüleri Resim 2'de verilmiştir.



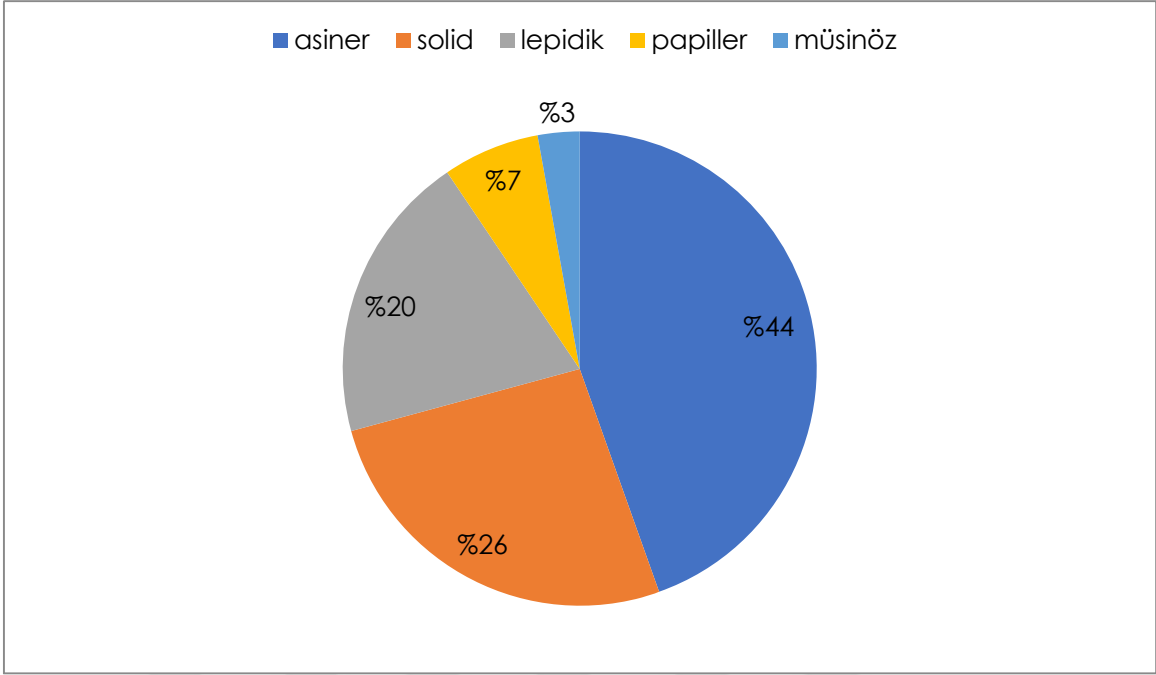
Şekil 3: KHDAK'lerinde histolojik tiplerin şematik dağılımı

Tanı alan 65 SHK olgusundan 25'i (%18,4) keratinize tip, 23'ü (%15,3) non keratinize tip, 17'si (%6,1) bazaloid tip olarak kategorize edildi. SHK alt tiplerinin şematik dağılımı Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4: SHK alt tiplerinin şematik dağılımı

ADK tanılı 52 olgu arasında en sık saptanan Asiner patern olup ort. %44 oranında saptandı. Solid patern ort. %24,94 , Lepidik patern ort. %18,88, Papiller patern ort. %6,34, Müsinöz patern ort. %2,75, Mikropapiller patern ort. %0,61 olarak saptandı. ADK alt tiplerinin şematik dağılımı Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5: ADK alt tiplerinin şematik dağılımı

Tümör lokalizasyonu belirtilen 120 olgunun 38'inde (%31,6) sağ üst lob, 35'inde (%29,1) sağ alt lob, 26'sında (%21,6) sol üst lob, 14'ünde (%11,6) sol alt lob, yedisinde (%5,8) sağ orta lob olarak belirtilmişti. Tümör lokalizasyonlarının tümör tiplerine göre dağılımı Tablo VII'de verilmiştir.

Tablo VII: Tümör lokalizasyonlarının dağılımı

	SHK	ADK
sağ üst	21 (%17,5)	17 (%14,1)
sağ orta	3 (%2,5)	4 (%3,5)
sağ alt	20 (%16,6)	15 (%12,5)
sol üst	14 (%11,6)	12 (%10)
sol alt	7 (%5,8)	7 (%5,8)
belirtilmemiş	0	1 (%0,8)

Tüm olgular arasında tümör boyutu ort. 3,45 cm olup en büyük boyut 10 cm, en küçük boyut 0,3 cm'dir. ADK olgularında tümör boyutu ort. 3,38 cm (en büyük 8,5 cm, en küçük 1 cm; SHK olgularında ise 3,48 cm (en büyük 10 cm, en küçük 0,3 cm)'dir.

Tümöral odak sayısı 115 olguda (%95,1) tek, altı olguda (%4,9) multipldi.

Bronş cerrahi sınır 118 (%97,6) olguda salim iken, iki (%1,7) olguda invaziv tümöral infiltrasyon saptandı. Bir (%0,8) olguda bronş cerrahi sınırdaki karsinoma insitu saptandı.

Olguların 84'ünde (%69,4) inflamatuvar yanıt izlendi, 37'sinde (%30,6) yanıt gözlenmedi.

Olguların 65'inde (%54,1) tümöral alanlarda nekroz vardı. 56 olguda (%45,9) nekroz izlenmedi.

Olguların 36'sında (%29,8) plevral invazyon saptanmış olup, 85 olguda (%70,2) invazyon görülmedi.

Olguların 83'ünde (%68,6) lenfovasküler invazyon mevcuttu. 38 olguda (%31,4) lenfovasküler invazyon görülmedi.

Olguların 35'inde (%28,4) lenf nodu metastazı saptandı. Olguların 86'sında (%71,6) lenf nodları salimdi. Metastatik lenf nodu olan 33 olgunun 25'inde (%75,7) metastatik lenf nodu lokalizasyonu peribronşial bölgeydi. Yedi olguda (%21,2) 10 nolu lenf nodu, dört olguda (%12,1) 4 nolu lenf nodu, iki olguda (%6) 7 nolu lenf nodu ve iki olguda (%6) 5 nolu lenf nodu metastatik özellikteydi.

T evre durumu 15 olguda (%12,4) pT1a, 32 olguda (%26,4) pT1b, 44 olguda (%36,4) pT2a, 12 olguda (%9,9) pT2b, 11 olguda (%9,1) pT3, yedi olguda (%5,8) pT4 olarak değerlendirildi. N evre durumu ise 87 olguda (%72,5) N0, 28 olguda (%22,5) N1, altı olguda (%5) N2 idi.

Tüm olgulara İHK'sal yöntemle uygulanan BRAF ile 62 olguda (%51,2) boyanma olmazken, 59 olguda (%48,8) farklı derecelerde boyanma izlendi. Boyanma derecesi olguların 37'sinde (%30,5) +1, 15'inde (%12,3) +2, 7'sinde (%6) +3 olarak saptandı.

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olgularda yaş ort. 59,5; +2 olgularda 67; +1 olgularda 65,4; 0(sıfır) olgularda 65,9'du. İHK'sal BRAF ile yaş değişkeni arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,381).

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olgularda ort. tümör boyutu 2,5 cm; +2 olgularda 4 cm; +1 olgularda 3,8 cm; 0(sıfır) olgularda 4,2 cm'di. İHK'sal BRAF ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,892).

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olgularda tümörün histolojik tipi tüm olgularda ADK olup bunlardan 4'ü asiner tip, 2'si lepidik tip, 1'i solid tip ADK idi. İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +2 olguların 5'inde histolojik tip SHK; 10'unda ADK idi. ADK tanılı olguların 1'inde histolojik subtip asiner tip, 2'sinde solid tip, 7'sinde lepidik tipti. ADK tanılı olgularda tümör alt tipi ile İHK'sal BRAF arasındaki ilişki incelendiğinde; asiner tip (p=0,837), solid tip (p=0,353), mikropapiller tip (p=0,867), papiller tip (p=0,636), müsinöz tip (p=0,579) ile İHK'sal BRAF arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Lepidik tip ADK ile İHK'sal BRAF arasında anlamlı bir ilişki saptandı (p=0,01). İHK'sal BRAF ile SHK tanılı olgularda histolojik alt tipler arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,817).

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olan olgularda tümör lokalizasyonu 4'ünde sağ üst lob, 2'sinde sol üst lob, 1'inde sağ alt lobdu. Boyanma derecesi +2 olan olgularda ise 5'inde sağ üst, 5'inde sağ alt, 3'ünde sol üst, 2'sinde sol alt lob idi. İHK'sal BRAF ile tümör lokalizasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,797).

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 ve +2 olan olgularda tümöral odak sayısı tek iken, boyanma derecesi +1 olan üç olgu ve boyanma derecesi 0 (sıfır) olan üç olguda multipl tümöral odak saptandı. İHK'sal BRAF ile tümöral odak sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,758).

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olan olgularda tümörün ana bronşa uzaklığı ort. 3,1 cm; +2 olgularda 1,7 cm; +1 olgularda 2,08 cm; 0(sıfır) olgularda 1,2 cm idi.

İHK'sal BRAF ile tümörün ana bronşa uzaklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,385).

İHK'sal BRAF ile herhangi bir derecede boyanma saptanan olguların tümünde bronş cerrahi sınırı salimdi. İHK'sal BRAF ile boyanma 0 (sıfır) olarak sonuçlanan iki olguda bronş cerrahi sınır pozitif. İHK'sal BRAF ile bronş cerrahi sınır durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,838).

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olgularda tümörün plevraya uzaklığı ort. 0,35 cm; +2 olgularda 0,06 cm; +1 olgularda 0,22 cm; 0 (sıfır) olgularda 0,2 cm idi. İHK'sal BRAF ile tümörün plevraya uzaklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,408).

İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olan olgularda tümöre komşu alanlardaki inflamatuvar yanıt üç olguda orta derecede, üç olguda hafif derecede var olup, bir olguda yoktu. Boyanma derecesi +2 olan olgularda ise üç olguda şiddetli, beş olguda orta derecede, iki olguda hafif derecede var olup beş olguda yoktu. İHK'sal BRAF ile inflamatuvar yanıt arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,914).

İHK'sal BRAF ile tümöral alanlardaki nekroz durumu, boyanma derecesi +3 olan olguların üçünde "var", dördünde "yok" olarak değerlendirildi. Boyanma derecesi +2 olan olguların dokuzunda "var", altısında "yok" olarak değerlendirildi. İHK'sal BRAF ile nekroz varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,435).

İHK'sal BRAF ile plevral invazyon durumu, boyanma derecesi +3 olan olguların birinde "var", altısında "yok" olarak değerlendirildi. Boyanma derecesi +2 olan olguların dokuzunda "var", altısında "yok" olarak değerlendirildi. İHK'sal BRAF ile plevral invazyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,755).

İHK'sal BRAF ile lenfovasküler invazyon durumu, boyanma derecesi +3 olan olguların altısında "var", birinde "yok" olarak değerlendirildi. Boyanma derecesi +2 olan olguların 12'sinde "var", üçünde "yok" olarak değerlendirildi. İHK'sal BRAF ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,472).

İHK'sal BRAF ile +3 boyanma gösteren olguların birinde metastatik lenf nodu var olup, altısında yoktu. BRAF ile +2 boyanma gösteren olguların beşinde metastatik lenf nodu

mevcut olup, 10'unda yoktu. Metastatik lenf nodu olan olguların beşinde lokalizasyon peribronşial bölge iken birinde 7 ve 10 nolu lenf nodları idi. İHK'sal BRAF ile metastatik lenf nodu varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,66$).

Moleküler yöntemle BRAF uygulanan 50 olgunun ikisi (%4) pozitif olarak sonuçlandı. Bu iki olgunun birinde İHK'sal BRAF ile +3, diğerinde +1 boyanma saptandı. BRAF mutasyonu yönünden incelenen 50 olgunun İHK'sal ve moleküler yöntemle analizinin karşılaştırılmasında sonuçlar arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,21$).

BRAF mutasyonu bakılan 50 olgunun demografik ve histopatolojik özelliklerine göre analiz tablosu Tablo VIII; BRAF mutasyonu saptanan iki olgunun demografik ve histopatolojik özellikleri Tablo X'da; İHK'sal BRAF boyanmasına ait görüntü Resim 7'de verilmiştir.

Tüm olgulara İHK'sal yöntemle uygulanan HER2 boyamasında; 100 olgu (%82,6) 0 (sıfır), 15 olgu (%12,4) +1, beş olgu (%4,1) +2, bir olgu (%0,9) +3 olarak değerlendirildi.

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda yaş 54; +2 olan olgularda ort. 66,4; +1 olan olgularda ort. 68,8; 0(sıfır) olgularda ort. 65,1 idi. İHK'sal HER2 ile yaş değişkeni arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,467$).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda tümör boyutu 3,5 cm; +2 olan olgularda ort. 3,5 cm; +1 olan olgularda ort. 3,2 cm; 0 (sıfır) olan olgularda ort. 3,4 cm idi. İHK'sal HER2 ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,657$).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda tümörün histolojik tipi asiner tip ADK idi. İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +2 olan olguların dördünde histolojik tip SHK; birinde lepidik tipte ADK idi. SHK tanılı olguların ikisi bazaloid tip, biri keratinize tip, biri non keratinize tip idi. İHK'sal HER2 ile tümörün histolojik tipi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,10$).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda tümör lokalizasyonu sol lobdu. +2 olan olguların ikisinde sağ üst, ikisinde sağ alt, birinde sol üst lobdu. İHK'sal HER2 ile tümör lokalizasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,15$).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 ve +2 olan olgularda tümöral odak sayısı tek iken, boyanma derecesi +1 olan bir olgu ve boyanma derecesi 0 (sıfır) olan beş olguda multipl tümöral odak saptandı. İHK'sal HER2 ile tümöral odak sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,918).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda tümörün ana bronşa uzaklığı 0,1 cm; +2 olan olgularda ort. 1,3 cm; +1 olan olgularda ort. 1,9 cm; 0 (sıfır) olgularda ort. 1,6 cm idi. İHK'sal HER2 ile tümörün ana bronşa uzaklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,938).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda bronş cerrahi sınırı pozitif. Ayrıca İHK'sal HER2 ile boyanma 0 (sıfır) olarak sonuçlanan bir olguda bronş cerrahi sınır pozitif. Diğer olgularda bronş cerrahi sınır salimdi. İHK'sal HER2 ile bronş cerrahi sınır durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,327).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda tümörün plevraya uzaklığı 0,2 cm; +2 olan olgularda ort. 0,37 cm; +1 olan olgularda ort. 0,16 cm; 0 (sıfır) olan olgularda ort. 0,19 cm idi. İHK'sal HER2 ile tümörün plevraya uzaklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,658).

İHK'sal HER2 ile boyanma derecesi +3 olan olguda tümöre komşu alanlardaki inflamatuvar yanıt orta derecede idi. Boyanma derecesi +2 olan olguların birinde şiddetli, birinde orta derecede, birinde ise hafif derecede var olup iki olguda inflamatuvar yanıt izlenmedi. İHK'sal HER2 ile inflamatuvar yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,109).

İHK'sal HER2 ile tümöral alanlardaki nekroz durumu, boyanma derecesi +3 olan olguda “yok” olarak değerlendirildi. Boyanma derecesi +2 olan olguların birinde “var”, dördünde “yok” olarak değerlendirildi. İHK'sal HER2 ile nekroz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,362).

İHK'sal HER2 ile plevral invazyon durumu, boyanma derecesi +3 olan olguda “yok” olarak değerlendirildi. Boyanma derecesi +2 olan olguların birinde “var”, dördünde

“yok” olarak değerlendirildi. İHK’sal HER2 ile plevral invazyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,756$).

İHK’sal HER2 ile lenfovasküler invazyon durumu, boyanma derecesi +3 olan olguda “var” olarak değerlendirildi. Boyanma derecesi +2 olan olguların üçünde “var”, ikisinde “yok” olarak değerlendirildi. İHK’sal HER2 ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,798$).

İHK’sal HER2 ile +3 boyanma gösteren olguda metastatik lenf nodu mevcut olup, 4 nolu bölgede idi. HER2 ile +2 boyanma gösteren olguların hiçbirinde metastatik lenf nodu mevcut değildi. İHK’sal HER2 ile metastatik lenf nodu varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,445$).

FISH yöntemiyle HER2 çalışılan 50 olgunun beşi (%10) pozitif, 45’i (%90) negatif olarak değerlendirildi. İHK’sal HER2 ile +3 boyanma gösteren olguda FISH yöntemiyle HER2 saptanmadı. Pozitif sonuçlanan beş olgunun birinde İHK’sal HER2 +2; birinde +1, üçünde 0 (sıfır) olarak bulundu. HER2 mutasyonunun İHK’sal ve FISH yöntemle analizinin karşılaştırılmasında sonuçlar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,109$). HER2 mutasyonu bakılan 50 olgunun demografik ve histopatolojik özelliklerine göre analiz tablosu Tablo IX’da; HER2 mutasyonu saptanan beş olgunun demografik ve histopatolojik özellikleri Tablo XI’de verilmiştir. HER2 FISH pozitifliği saptanan olgulara ait görüntüler Resim 3,4 ve 5’te; HER2 FISH negatif olguya ait görüntü Resim 6’da verilmiştir.

BRAF ve HER2 mutasyonu pozitif olgular karşılaştırıldığında her iki mutasyonun da bulunduğu olgu saptanmadı. Olgular arasında moleküler yöntemle uygulanan BRAF ve HER2 sonuçları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,63$).

Tablo VIII: BRAF mutasyonu bakılan 50 olgunun demografik ve histopatolojik özelliklerine göre analiz tablosu

		Mol. BRAF pozitif (2)	Mol. BRAF negatif (48)	P değeri
ortalama yaş		53,5 (ort)	64,8 (ort)	0,147
cinsiyet	kadın	0	8	0,529
	erkek	2	40	
tümör evresi	1	0	16	0,824
	2	2	23	
	3	0	5	
	4	0	4	
tümör tipi	SHK	0	8	0,985
	ADK	2	37	
	Mikst	0	3	
SHK subtip	keratinize	0	4	0,936
	non-keratinize	0	3	
	bazaloid	0	1	
ADK subtip	solid	1	10	0,659
	asiner	1	22	
	papiller	0	1	
	müsinöz	0	2	
	lepidik	0	12	
	mikropapiller	0	1	
Tümör	sağ	1	32	0,793
lokalisasyonu	sol	1	16	
Odak sayısı	tek	2	47	0,837
	multipl	0	1	
Bronş es	pozitif	0	1	0,837
	negatif	2	47	
İnflamatuar yanıt	var	2	31	0,450
	yok	0	17	

nekroz	var	1	25	0,520
	yok	1	23	
Plevral invazyon	var	2	16	0,157
	yok	0	32	
LVI	var	1	34	0,557
	yok	1	14	
Metastatik LN	var	0	14	0,557
	yok	2	30	
	lenf nodu yok	0	4	
İHK BRAF durumu	pozitif	1	4	0,210
	negatif	1	44	

Tablo IX: HER2 mutasyonu bakılan 50 olgunun demografik ve histopatolojik özelliklerine göre analiz tablosu

		Mol. HER2 pozitif (5)	Mol. HER2 negatif (45)	P değeri
yaş		62,4 (ort)	61,2 (ort)	0,629
cinsiyet	kadın	1	7	0,797
	erkek	4	38	
evre	1	3	13	0,717
	2	2	23	
	3	0	5	
	4	0	4	
tümör tipi	SHK	0	8	0,882
	ADK	5	34	
	Mikst	0	3	
SHK subtip	keratinize	0	4	0,838
	non-keratinize	0	3	
	bazaloid	0	1	

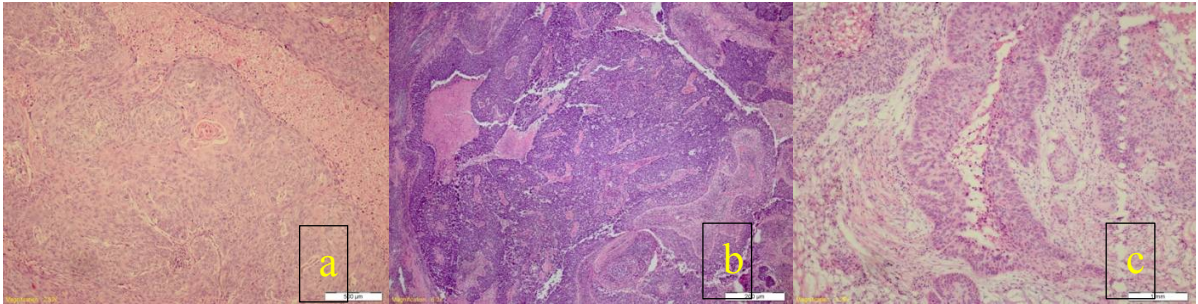
ADK subtip	solid	1	12	0,587
	asiner	1	22	
	papiller	0	0	
	müsinöz	0	2	
	lepidik	3	9	
	mikropapiller	0	0	
Tümör lokalizasyonu	sağ	5	28	0,733
	sol	0	17	
Odak sayısı	tek	5	44	0,736
	multipl	0	1	
Bronş cs	pozitif	0	1	0,736
	negatif	5	44	
İnflamatuvar yanıt	var	4	37	0,776
	yok	1	8	
nekroz	var	2	26	0,664
	yok	3	19	
Plevral invazyon	var	1	17	0,671
	yok	4	28	
LVİ	var	3	33	0,689
	yok	2	12	
Metastatik LN	var	1	13	0,565
	yok	3	29	
	lenf nodu yok	1	3	
İHK HER2 durumu	pozitif	1	2	0,109
	negatif	4	43	

	yaş	Cinsiyet	Histolojik subtip	evre	mutasyon	İHK
Olgu 1	64	E	ADK, Solid tip	2	G469A, Ekzon 11	+3
Olgu 2	50	E	ADK, Asiner tip	2	V600E, Ekzon 15	+1

Tablo X: BRAF mutasyonu saptanan 2 olgunun demografik ve histopatolojik özellikleri

Tablo XI: HER2 mutasyonu saptanan 5 olgunun demografik ve histopatolojik özellikleri

	yaş	cinsiyet	Histolojik subtip	evre	ihk
Olgu 1	69	E	ADK, solid tip	2	0
Olgu 2	55	E	ADK, asiner tip	1	0
Olgu 3	68	K	ADK, lepidik tip	2	+1
Olgu 4	62	E	ADK, lepidik tip	1	+2
Olgu 5	58	E	ADK, lepidik tip	1	0

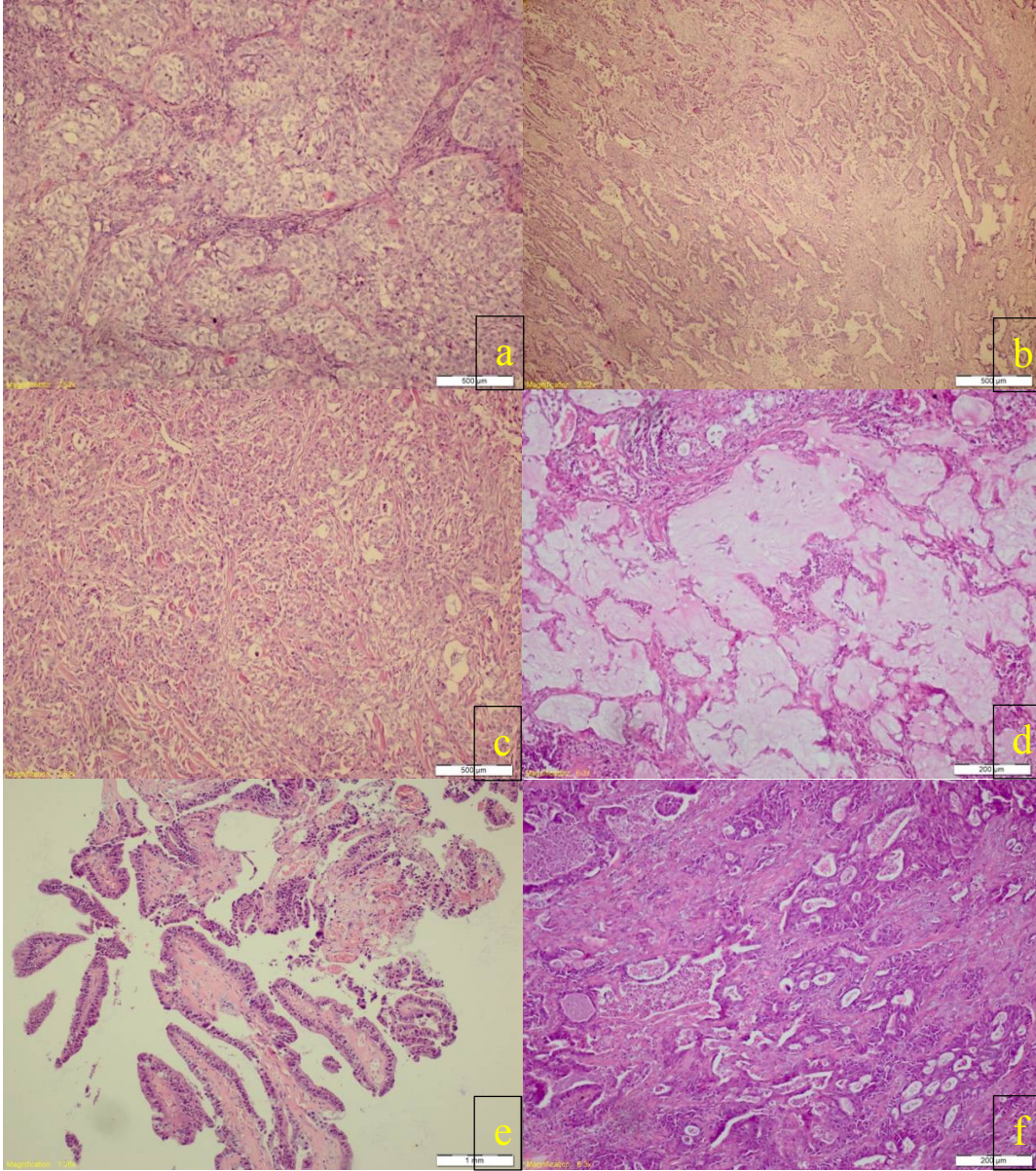


Resim 1: SHK histolojik alt tipleri

a: keratinize tip (h&e, 100x)

b: non-keratinize tip (h&e, 40x)

c: bazaloid tip (h&e, 100x)

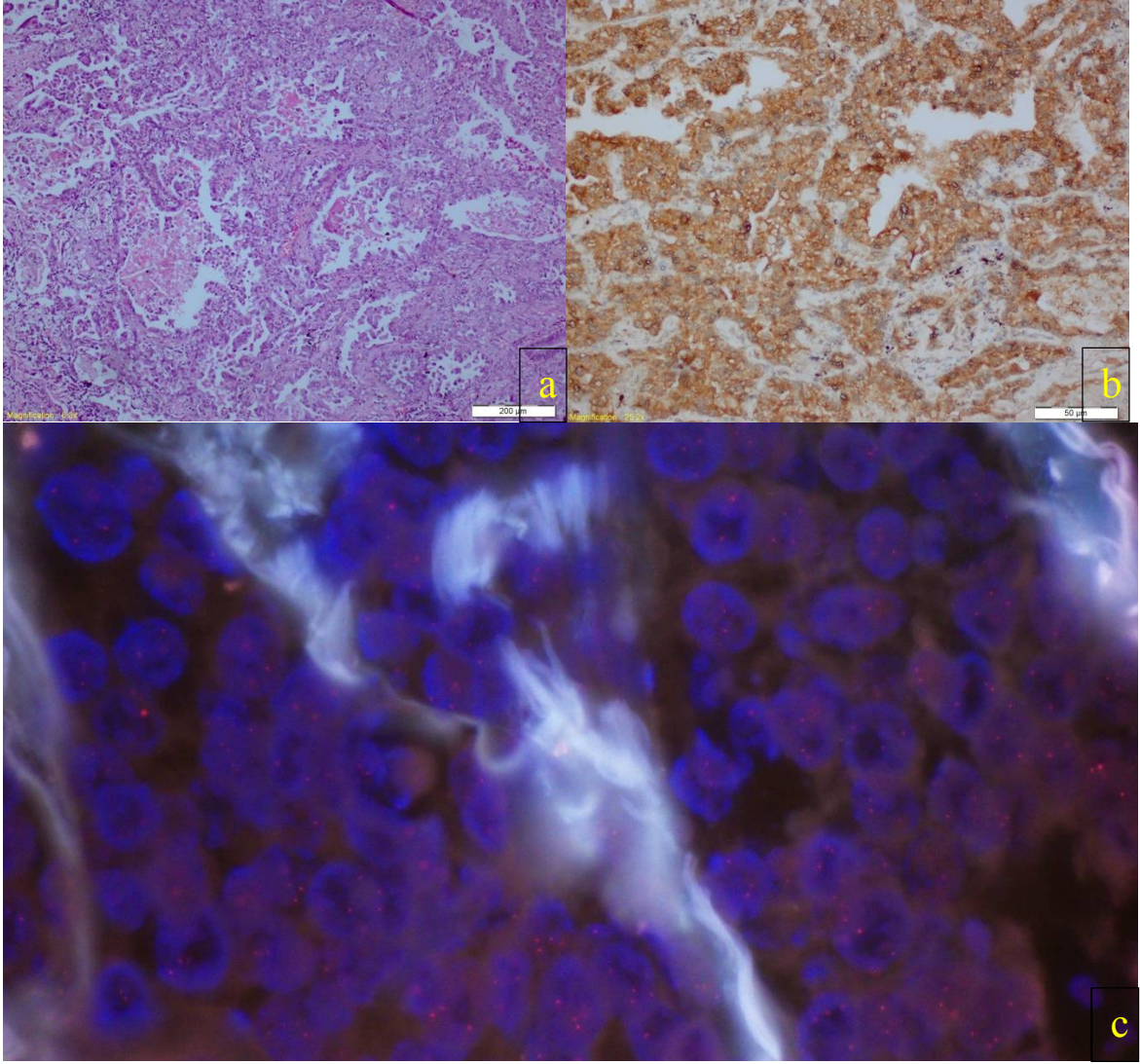


Resim 2: Adenokarsinom histolojik alt tipleri

a: solid tip (h&e, 200x) b: lepidik tip (h&e, 100x)

c: asiner tip (h&e, 100x) d: müsinöz tip (h&e, 100x)

e: papiller tip (h&e, 100x) f: adenoskuamöz tip (h&e, 100x)

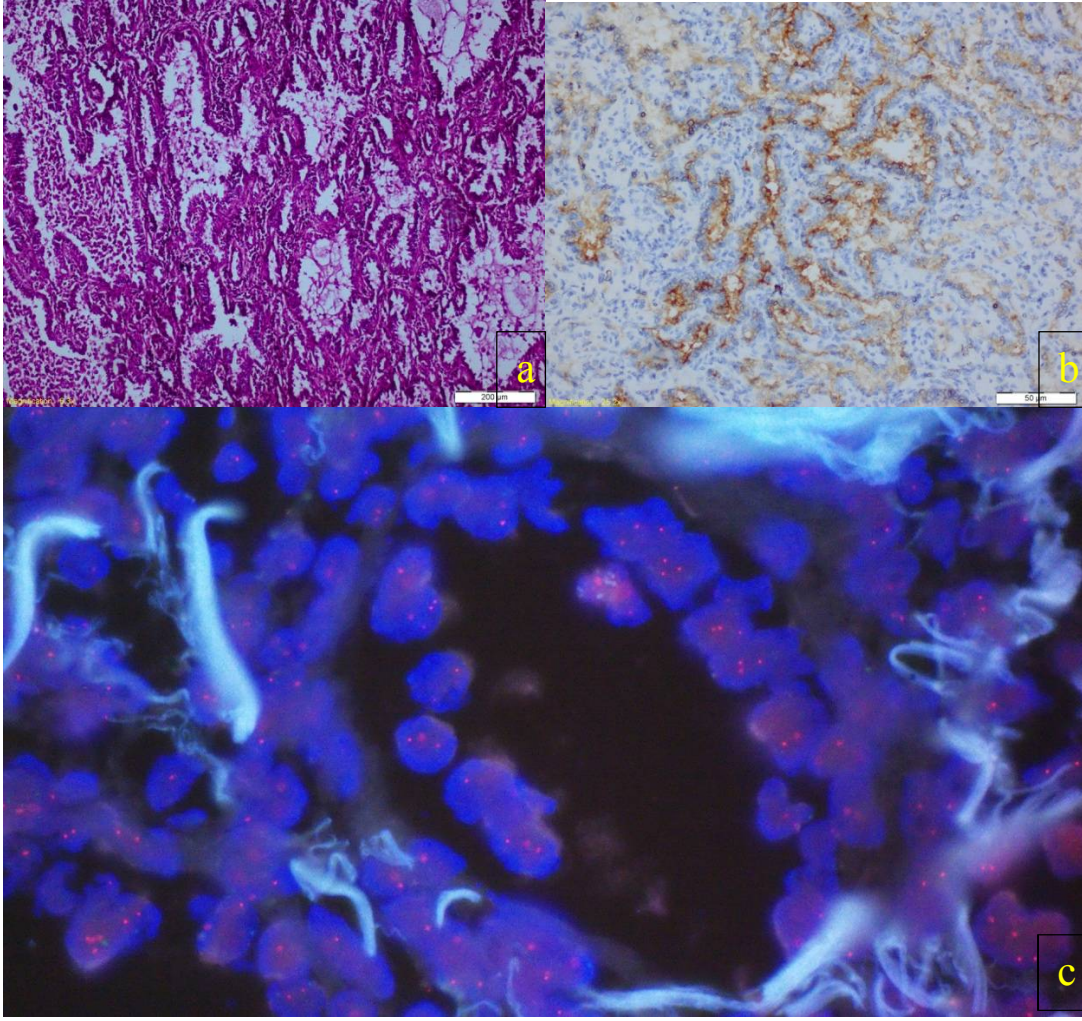


Resim 3: HER2 FISH pozitif olgunun h&e ve İHK kesitleri

a: ADK (h&e, 100x)

b: İHK HER2 boyanması (+2), (400x)

c: FISH pozitifliği

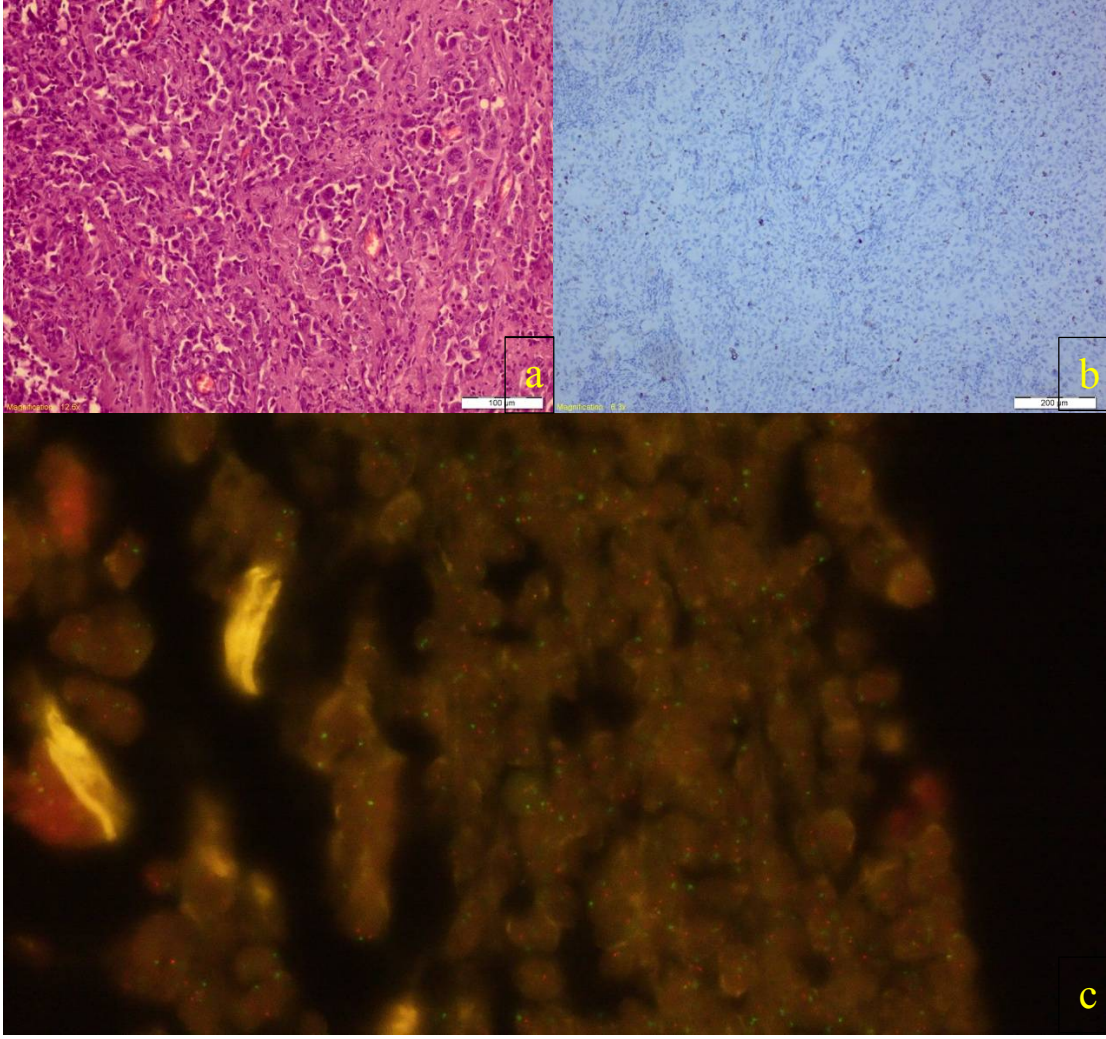


Resim 4: HER2 FISH pozitif olgunun h&e ve İHK kesitleri

a: ADK (h&e, 100x)

b: İHK HER2 boyanması (+1), (400x)

c: FISH pozitifliği

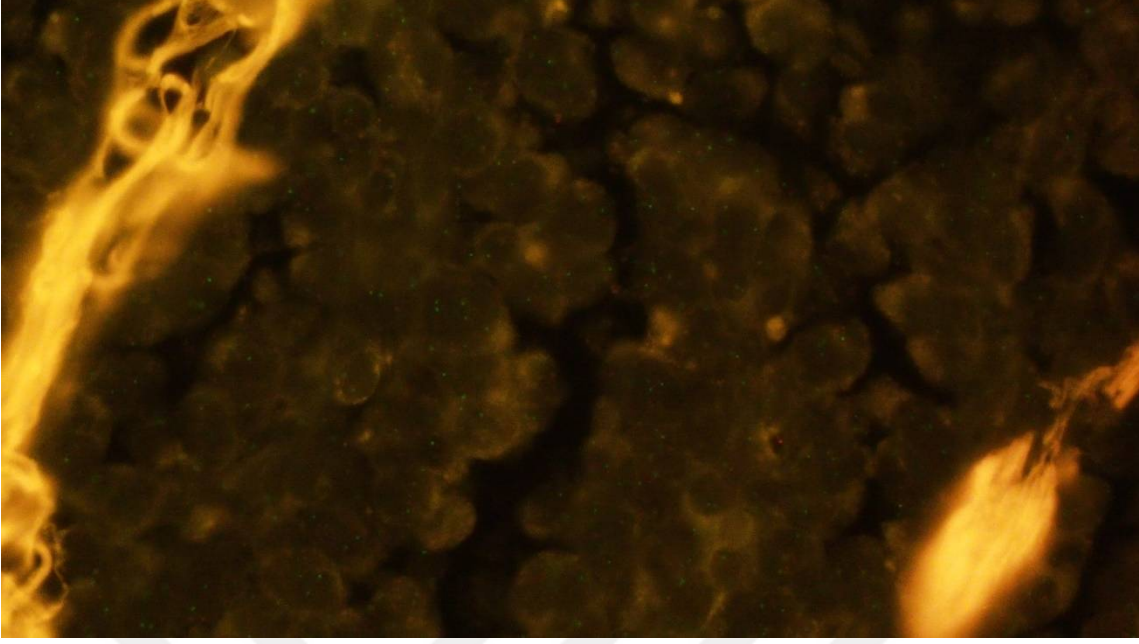


Resim 5: HER2 FISH pozitif olgunun h&e ve İHK kesitleri

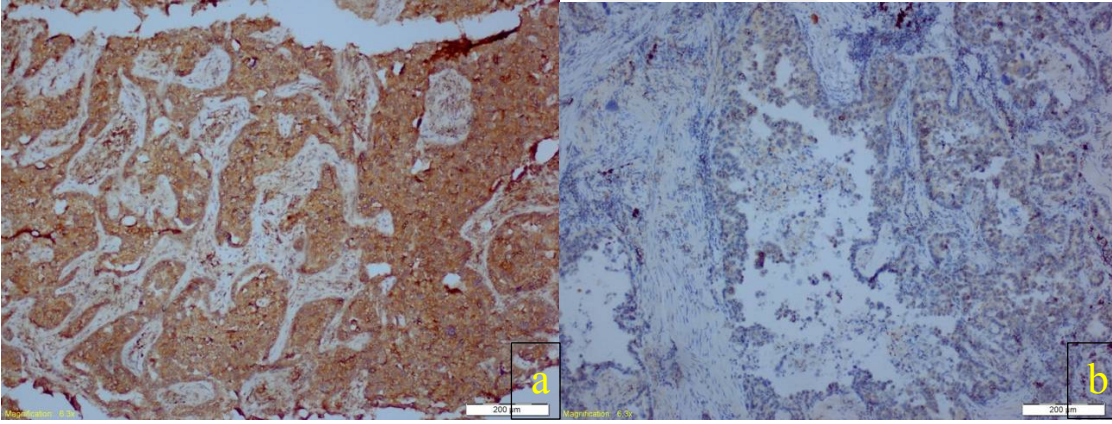
a: ADK (h&e, 400x)

b: İHK HER2 boyanması (0), (400x)

c: FISH pozitifliği



Resim 6: FISH negatifliği



Resim 7: İHK'sal BRAF boyanması

a: İHK BRAF pozitif olgu (100x)

b: İHK BRAF negatif olgu (100x)

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri genel olarak dünyada kanserle ilişkili ölümlerin en önde gelen nedenidir. Küresel olarak, erkeklerde kanserden ölümlerin en sık nedeni olup, kadınlarda ikinci en sık nedenidir. Bununla birlikte, gelişmiş ülkelerde kadınlarda da akciğer kanseri mortalitesi meme kanserini aşmış durumdadır. Dünya genelinde, 2012'de yaklaşık 1,6 milyon ölüm akciğer kanserine bağlı bulunmuştur (erkeklerde 1,1 milyon ve kadınlarda yaklaşık 500,000) (137, 138). Akciğer kanseri, kemoterapi ve cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen, 5 yıllık sağkalım oranları %10-20 arasında değişen en ölümcül kanser türlerinden biri olmaya devam etmektedir (139). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın tüm sağlık kuruluşlarında tanı alan kanser olgularının kaydedildiği kanser kayıt sistemi verilerine göre (2002) akciğer kanseri insidansı 11,5/100.000'dir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre akciğer kanseri sıklığı batı bölgelerimizde daha yüksek (Akdeniz 41,0/100.000, Ege ve İç Anadolu 39,5/100.000) Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde daha düşük (sırayla 17,7/100.000, 11,7/100.000) değerlerdedir (140).

Sigara kullanımı, akciğer kanseri gelişiminde en önemli nedenlerden biri olup, sigara içicileri arasında akciğer kanseri gelişimi içmeyenlere oranla 10 - 25 kat artış gösterir ve akciğer kanserinin tüm histopatolojik tiplerinin gelişme riskini değişik oranlarda arttırır. Akciğer kanseri gelişme riski, sigaranın bırakılması ile birlikte progresif olarak azalır ve 15-30 yıllık sigarasız dönemden sonra hiç sigara içmemiş popülasyonla yaklaşık eşit düzeye gelir (141). Akciğer kanserinin en önemli sebebi sigara olsa da, akciğer kanseri hiç sigara içmeyenlerde de görülmektedir. Hiç sigara içmeyenlerde görülen akciğer kanserinin %70'i ADK'dır (142). Hastanede yatış oranları ve iş gücü kayıplarının yüksek olması, akciğer kanserini önemli bir halk sağlığı problemi haline getirmektedir. Sigara kullanımı ile yüksek oranda ilişkili olması, akciğer kanserinin önlenmesinde en önemli adımın sigaranın bırakılması olduğunu göstermektedir. Akciğer kanserine bağlı ölümlerin azaltılmasında diğer önemli faktör erken tanıdır. Türk Toraks Derneği-Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu'nun çalışmasında olguların %86,7'si ileri evrede yer almaktadır (143).

KHDAK; ADK, SHK ve BHK dahil olmak üzere çeşitli kategorilere ayrılır. ADK şu anda birçok ülkede en yaygın histolojik alt tiptir ve bu hastalığın DSÖ/Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışması Derneği tarafından alt sınıflandırılması histolojik heterojenite

nedeniyle zor olabilmektedir. Bu alt tiplere ek olarak, nöroendokrin karsinom, iğsi hücreli karsinom ve dev hücreli karsinom dahil olmak üzere düşük insidanslı birkaç alt tip daha vardır (144). Literatürde KHDAK olgularını içeren birçok çalışmada, sonuçlar değişkenlik göstermekle birlikte en sık görülen alt tip ADK'dır. Cinsiyete göre dağılım ise yıllar içinde değişim göstermekte olup, genel olarak erkek cinsiyet baskınlığı mevcuttur (138). Kawaguchi ve ark.'nın yaptıkları 1499 KHDAK tanılı ve sigara kullanıcısı olmayan olguları içeren çalışmada en sık görülen alt tip ADK (%87,4) olup, ortalama yaş 65 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada olguların çoğunluğu kadın (%74,9) olup, kadın cinsiyette ADK oranı daha yüksek saptanmıştır (145). Grossel ve ark.'nın 138 ADK tanılı olguyu içeren çalışmasında hastaların büyük çoğunluğu kadın (%58,7) olup, ortalama yaş 64,5 olarak saptanmıştır (115). Bhaumik ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise 204 KHDAK tanılı olguların büyük çoğunluğunun ADK (181 olgu, %88,7) morfolojisinde olduğu ve erkeklerde (%63,7) daha sık görüldüğü bulunmuştur (146). Villalva ve ark.'nın yaptıkları 77 KHDAK olgulu çalışmada en sık histolojik tip 71 olgu ile ADK olup, %69,2'lik oranla erkek cinsiyet baskınlığı bulunmuştur. Ortalama yaş 59,2 olarak tespit edilmiştir (125). Oberly ve ark. yaptıkları 16798 olguluk geniş vaka serili çalışmasında da en sık görülen tip ADK (%31,9) olup, bunu SHK (%29,1) ve KHAK (%15,4)'nın takip ettiği bulunmuştur (147). Literatürde Asya kökenli ırklarda ADK, Batı kökenli ırklarda SHK oranı daha yüksek bulunmuştur (148). Bizim çalışmamızdaki sonuçlar Asya kökenli toplumlara benzerlik göstermekte olup, en sık tümöral alt tip SHK olarak saptanmıştır. Ortalama yaş 65,5 olup, erkek cinsiyet çoğunluktadır.

Yapılan çalışmalarda akciğer kanseri sıklığının yaşla birlikte arttığı ve yıllar içerisinde kadın cinsiyette de geçmişe göre artış gösterdiği görülmüştür. Bhaumik ve ark.'nın yaptıkları çalışmada yaşın artışı ile birlikte akciğer kanseri sıklığında da tutarlı bir artış olduğu saptanmıştır (30 yaş altı: %1.96, 30-60 yaş: %44.6 ve 60 yaş üstü: %53.43) (146). Ülkemiz popülasyonuna ait bir çalışma olan Sulu ve ark.'nın yaptıkları primer akciğer kanseri tanılı 1403 vakalık çalışmada en sık görülen alt tip SHK (%45,9) olup, kadın/erkek oranı 1/7,5 olarak bulunmuştur. 1998 yılında saptanan 1/10,9 oranı ile kıyaslandığında kadın hasta oranının geçmişe göre arttığı sonucuna varılmıştır (149). Bizim çalışmamızda KHDAK tanısı alan en genç hasta yaşı 36 idi. Olguların yaşa göre dağılımlarına bakıldığında 3. dekatta iki olgu (1 ADK, 1 SHK), 4. dekatta altı olgu (5 ADK, 1 SHK), 5. dekatta 18 olgu (12 ADK, 6 SHK), 6. dekatta 55 olgu (33 SHK, 22 ADK), 7. dekatta 35 olgu (21 SHK, 14 ADK), 8. dekatta beş olgu (üç SHK, iki ADK) olduğu görüldü. Yaşla birlikte olguların sıklığının

arttığı, özellikle altıncı dekatta pik yaptığı görüldü. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamızda da en sık görülen tip SHK idi (149). Bu durum Batılı kaynaklara göre ülkemizde en sık görülen KHDAK alt tipinin SHK olduğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Son yıllarda moleküler metodlarla yapılan çalışmaların sonucu olarak kanser patogeneğinde genetik değişimlerin bulunduğu ve kanser hücrelerinin mutasyon, amplifikasyon, delesyon, intrakromozomal ve interkromozomal translokasyonlar gibi birçok mekanizma kullanarak anahtar genleri aktiflediği bilinmektedir (144). Belirli bir kanser tipini veya hastanın bireysel kanserojenik gen varlığını karakterize edebilen çoklu genomik değişiklikler de göz önüne alındığında, kanser genomlarının kapsamlı karakterizasyonuna olan ihtiyaç artmaktadır. Bu, geleneksel ve ilk nesil Sanger sekans analizi yanısıra yeni nesil dizileme (NGS) gibi teknolojilerdeki gelişmeler ve kanser örneklerinin biyoinformatik analizlerinde yapılan iyileştirmelerle sağlanmıştır (144). Akciğer kanserinin moleküler biyolojisini anlamamızı sağlayan bu son gelişmeler, özellikle mutasyonla onkogen aktivasyonu (EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2), translokasyon (ALK,ROS1, RET) ve amplifikasyon (MET, FGFR1) yeni hedef tedavi imkanları ve tedaviye cevabı öngörebilen moleküler profile sahip tümör alt tiplerini tanıma imkanı sağlamaktadır (2). Yakın zamanda tümör biyolojisi alanında yapılan çalışmalarda bir protoonkogen olan BRAF geninde meydana gelen mutasyonun çeşitli kanser türlerindeki varlığı tespit edilmiştir. BRAF mutasyonu en sık melanomlarda görüldüğünden (%50-70) literatürde BRAF mutasyonu ile ilgili çalışmalar en çok melanom olguları üzerinde yapılmıştır. BRAF mutasyonunun kutanöz malign melanom dışında, papiller tiroid karsinomu, kolorektal karsinom, KHDAK, pleomorfik ksantoastrositoma dahil olmak üzere çeşitli neoplazmlarda da görüldüğü yapılan son çalışmalarla ortaya konmuştur (120, 122). Günümüzde BRAF mutasyonlarının tespiti sadece malign melanom için değil, melanom dışı birkaç malignite için de klinik gidişat ve tedavi protokolü açısından rehberlik etmektedir. Papiller tiroid karsinomunda BRAF V600E mutasyonlarının tespiti, tanının doğruluğunu sunmakla birlikte, daha agresif bir hastalık seyrini öngörmektedir. Bunun dışında BRAF V600E mutasyonu içeren metastatik kolorektal karsinomlarda daha kötü bir prognoz ile ilişki saptanmış ve bu vakalarda anti-EGFR tedavisine direnç görülmüştür. Preklinik çalışmalar, BRAF V600E mutasyonu içeren tümörlerin BRAF inhibitör tedavisi için potansiyel olduğunu göstermiştir. Son çalışmalarda BRAF mutasyonlu akciğer ADK hastalarında da BRAF inhibitör tedavisine yanıtlar

bildirilmiştir (118, 120). Özellikle akciğer ADK vakalarında BRAF'in sürücü bir mutasyon olduğunu ortaya koyan çalışmalar, KHDAK'da BRAF hedefli tedavilere yönelik ileri çalışmalara ivme kazandırmıştır (98).

Literatürde oranlar oldukça değişken olmakla birlikte, genel bilgi KHDAK'larının yaklaşık %2-5 kadarında BRAF mutasyonunun görüldüğü yönündedir. Bhaumik ve ark.'ın (146) yaptığı 204 vakalık çalışmada BRAF mutasyon oranı %1,5 iken, Chen ve ark.'ın yaptığı 89 vakalık ADK olgularını içeren çalışmada bu oran %3,4 olarak belirtilmiştir (150). Yine 138 ADK vakasını içeren bir çalışmada %2,2, 112 KHDAK vakasını içeren başka bir çalışmada ise %1,79 oranında saptanmıştır (119, 121). Kinno ve ark.'ın 2001 KHDAK vakasını içeren çalışmasında Sanger sekanslama yöntemiyle elde ettikleri BRAF mutasyon analizi çalışmasında olguların 26'sında (%1.3) BRAF mutasyonu tespit edilmiştir (120). Ülkemiz popülasyonuna ait bir çalışma olan Dogan ve ark.'ın 513 KHDAK vakasını içeren çalışmada BRAF mutasyon oranı %2,38 olarak saptanmıştır (126). Bizim çalışmamızda 50 olguda moleküler yöntemle analiz edilen BRAF mutasyon oranı %4 olarak bulunmuş olup, literatür verilerine göre çok hafif yüksek olmakla birlikte, literatürle uyumlu aralık içerisinde yer almaktadır.

KHDAK'larda BRAF mutasyonunun alt tiplere göre dağılımına bakıldığında ADK'larda daha sık olup, SHK ve BHK dahil olmak üzere diğer histolojik alt tiplerde nadir de olsa görülebilmektedir (117). ADK alt tiplerine göre ise mutasyon saptanan olguların %80'inde mikropapiller özellikler ile karakterize agresif histolojik tipleri içerebildikleri görülmüştür. Bir çalışmada 1046 KHDAK olgusu değerlendirilmiş, ADK'ların % 4.9'u ve SHK'ların % 0.3'ünde BRAF mutasyonu tesbit edilmiştir (95). Ross ve ark.'ın yaptığı çalışmada BRAF mutasyonlu tüm KHDAK olgularında alt tip ADK olup, SHK veya KHAK'de tesbit edilmemiştir (122). Villalva ve ark.'ın yaptığı çalışmada ise BRAF mutasyonu saptanan 71 olgu ADK, beş olgu SHK ve bir olgu BHK morfolojisinde saptanmıştır (125). Kinno ve ark.'ın yaptıkları çalışmada 2001 KHDAK vakasının 26'sında BRAF mutasyonu saptanmış olup, bu vakaların 25'inin ADK, bir tanesinin SHK morfolojisinde olduğu görülmüştür (120). Bizim çalışmamızda İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +3 olgularda tümörün histolojik tipi tüm olgularda ADK olup bunlardan 4'ü asiner tip, 2'si lepidik tip, 1'i solid tip ADK idi. İHK'sal BRAF ile boyanma derecesi +2 olguların 5'inde histolojik tip SHK; 10'unda ADK idi. ADK tanılı olguların 1'inde histolojik subtip asiner tip,

2'sinde solid tip, 7'sinde lepidik tipti. ADK alt tip dağılımına bakıldığında İHK'sal BRAF ile lepidik baskın tip ADK arasındaki ilişki analizinde sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,01$). Ayrıca moleküler BRAF pozitifliği saptanan olguların her ikisi de histolojik olarak literatürle benzer şekilde ADK morfolojisindeydi. Literatürde özellikle akciğer kanserleri ile BRAF mutasyon varlığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çok az çalışma bulunmakta olup, ADK subtipleri ile BRAF mutasyonu varlığı arasındaki ilişkiyi inceleyen daha geniş vaka serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

KHDAK'da BRAF mutasyon profilini değerlendiren çalışmalarda, en sık ekzon 15'de V600E (%50) kinaz bölgesinde, daha sonra ekzon 11'deki G469A (%39) ve ekzon 15'deki D594G(%11) bölgelerinde mutasyon bulunmuştur. Kinaz bölgesindeki mutasyonların yanı sıra az sayıda G-loop aktivasyonu sağlayan gen mutasyonu (G465V ve G468A) da bildirilmiştir (115). Brose ve ark.'ın 292 KHDAK ve 35 melanom olgusu üzerinde yaptıkları çalışmada her iki tümör grubunda BRAF mutasyonunun farklı bölgelerde olduğu ortaya konmuştur. Bu durum KHDAK'de BRAF mutasyonlarının melanomdakilerden niteliksel olarak farklı olduğunu düşündürmekte, ayrıca akciğer kanseri ve melanom arasında RAF inhibitörlerine terapötik yanıtta farklılıklar olabileceğini vurgulamaktadır (92). Paik ve ark. BRAF mutasyonu içeren ADK tanı 697 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada 18 hastada (%3) BRAF mutasyonları saptanmıştır. Tespit edilen BRAF mutasyonları V600E (%50), g469a (%39) ve D594G (%11) şeklinde bildirilmiştir (90). Kinno ve ark.'ın yaptıkları çalışmada ise 26 olguda V600E (%30.8), G469A (%23.1), k601e (%15.4) ve diğer rezidüel mutasyonlar (%0.04) olmak üzere 13 mutasyon genotipi tespit edilmiştir. 13 genotipten dört genotip (g464e, G596R, a598t ve g606r) daha önce akciğer kanserinde rapor edilmemiş tiplerdir (120). Bizim çalışmamızda da BRAF mutasyonu tesbit edilen 2 olguda V600E ve G469A bölgelerinde mutasyon saptandı.

Akciğer kanserlerinde BRAF mutasyonunu ve klinikopatolojik veriler ile ilişkisini değerlendiren sınırlı çalışma bulunmaktadır. Yaş, cinsiyet, ırk, sigara içme öyküsü ve hastalığın evresi gibi klinikopatolojik özellikler açısından, BRAF mutasyonlu KHDAK hastalarında, bilinen bir onkogenik sürücü taşımayan hastalara benzer şekilde sonuçlar bulunmuştur. Bununla birlikte, sigara içmeyenlerde BRAF V600E mutasyonunun daha yaygın olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur. Yaşam beklentisi için yapılan bazı çalışmalar BRAF mutasyonlu KHDAK'lı hastaların sonuçlarının, bilinen bir sürücü

mutasyonu olmayan ya da vahşi tip tümörleri olan hastalara benzer olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda özellikle V600E mutasyonları olan hastalar için daha az yaşam beklentisinin olduğunu bildirilen çalışmalar da vardır (98). Baik ve ark.'ın yaptıkları çalışmada BRAF mutasyon durumu ile hasta yaşı veya cinsiyeti arasındaki ilişki incelendiğinde, EGFR veya KRAS mutasyonu içeren veya mutasyon bulandırmayan hastalar ile benzer olduğu bulunmuştur. Ancak kadın cinsiyet ile BRAF mutasyon sıklığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Ayrıca BRAF V600E mutasyonlu hastalarda sigara içme öyküsünün daha düşük sıklıkta olduğu bildirilmiştir (117). Bhaumik ve ark.'ın yaptığı çalışmada BRAF mutasyonunun erkeklerde ve 60 yaş üzerinde daha sık olduğu saptanmıştır (112). Myall ve ark.'ın BRAF mutasyonlu KHDAK'lı hastaların klinik seyri ve sonuçlarını araştırdıkları çalışmada, bilinen bir sürücü mutasyonu veya herhangi diğer mutasyonları barındırmayan tümörlere kıyasla benzer sonuçlar bildirilmiştir (98). Dogan ve ark.'ın Türkiye'de KHDAK'lerin sık görülen onkojenik mutasyonlarının prognoz ve tedaviye yanıtla ilişkisini araştırdıkları çalışmada BRAF mutasyonu olanlarda beklenen ortalama sağ kalım süresi daha uzun bulunmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (126). Bizim çalışmamızda moleküler olarak BRAF mutasyonu saptanan iki olgu da erkekti. Olguların biri 50 diğer 64 yaşında idi. Çalışmamızda tümör yerleşimi, odak sayısı, tümör boyutu, bronş cerrahi sınır durumu, tümörün ana bronşa uzaklığı, tümöre karşı oluşan inflamatuvar yanıt, nekroz varlığı, plevranın durumu, tümörün plevraya uzaklığı, lenfovasküler invazyon varlığı, disseke edilen lenf nodu sayısı, lenf nodlarının durumu ve tümörün evresi ile İHK'sal BRAF ve moleküler yöntemle saptanan BRAF mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Mutasyonların doğru ve hızlı taranması, akciğer kanserlerinde, özellikle moleküler hedef terapisine uygunluklarının belirlenmesinde önemlidir. Mutasyon profilinin belirlenmesinde kullanılan yöntem de spesifite ve sensitivite açısından oldukça önem arz etmektedir. BRAF'ı tanımlamak için mevcut standart teknik PCR testidir. BRAF mutasyonunda moleküler alt tip tayini için PCR testi daha iyi bir yöntem olmakla birlikte daha zahmetli ve pahalı mikrodiseksiyona ihtiyaç duyduğundan maliyetlidir ayrıca her patoloji laboratuvarında rutin olarak uygulanamamaktadır. En sık görülen BRAF V600E için İHK, daha hızlı analiz, daha az masraf, daha yüksek doku koruması ve daha geniş laboratuvar kullanılabilirliği açısından pratik avantajlar sunar. İHK'sal BRAF boyanması, BRAF mutasyonu taramasında önemli ek bilgiler verebilir (97). Ayrıca İHK, BRAF V600E'nin küçük tümör odaklarında teşhisine ve BRAF genotiplerinin intratümöral heterojenitesinin

değerlendirilmesine olanak sağlar. Her ne kadar İHK, teknik olarak daha az zor ve mutasyonel analizden daha hızlı bir yöntem olsa da, boyama yoğunluğunun subjektif ölçümü gerçeği ve antikolar arasındaki yanıt değişkenliği, mutasyon analizini hala daha güvenilir bir test yapmaktadır. Bununla birlikte, moleküler analizler bile yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir (88). Akciğer kanserinde BRAF mutasyonunun saptanmasında kullanılan çeşitli yöntemleri karşılaştıran çalışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalarda İHK'nın, BRAF V600E mutasyonu tespiti için moleküler biyolojiye alternatif olabileceği ve moleküler hedef tedavi kullanımı açısından tarama amaçlı kullanılabilirliği belirtilmiştir (97). Routhier BS ve ark.'ın çoğunluğu malign melanom olan ve akciğer kanserini de içeren 152 vakalık çalışmada BRAF V600E mutasyonunun moleküler ve İHK'sal yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırılmış, bu iki yöntem arasında yüksek oranda uyum saptanmıştır (88). Sasaki ve ark.'ının akciğer ADK olgularında BRAF V600E mutasyonunun saptanmasında İHK'nın kullanılabilirliğini araştırdıkları çalışmada olguların yedisinde BRAF mutasyonu (beş V600E, bir n581i ve bir V599 insertion t mutasyonu) tesbit edilmiştir. Bu olgulardan BRAF V600E mutasyonuna uğramış tümörlerin beşinde de İHK'al olarak BRAF pozitif bulunmuştur (97). Bizim çalışmamızda moleküler BRAF pozitifliği saptanan olgulara uyguladığımız İHK'sal boyama sonucunda bir olguda +3, diğer olguda +1 boyanma tesbit edilmiştir. Çalışmamızın kısıtlayıcı yönlerinden olan durumlardan biri, maliyet nedeniyle tüm İHK uygulanan olgulara moleküler BRAF analizi yapılamamış olmasıdır. Bizim çalışmamızda moleküler analiz sonuçları ile İHK sonuçları arasında anlamlı bir farklılık tesbit edilmemiş olup, anlamlı sonuç için daha geniş vaka serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

HER2, tirozin kinaz aktivitesi olan bir transmembran reseptör glikoproteinidir ve tümör hücrelerinin adezyonu, göçü ve farklılaşmasında rol oynar (151, 152). Aynı ailenin üyesi EGFR'ye benzer şekilde HER2 mutasyonunun sıklığı, hiç sigara içmeyenlerde, kadın cinsiyette ve Asyalılarda daha yüksektir. HER2'de mutasyona sahip hücreler, hem EGFR hem de HER2'nin aktivitesini hedef alan tirozin kinaz inhibitörleriyle tedaviye duyarlıdır. (153). HER2, KHDAK'ların yaklaşık % 20 'sinde aşırı eksprese edilmesine rağmen, vakaların yaklaşık %2- 4'ünde mutasyona uğrar. Bu mutasyonun varlığı EGFR ve RAS mutasyonları varlığını hemen her zaman dışlar (132). KHDAK'da, en yaygın HER2 mutasyonları, ekzon 20 insersiyonu ve hücre dışı bölge mutasyonlarıdır. In-Jae Oh ve ark.'ın 360 ADK tanılı olgu ile yaptıkları çalışmada sekans analizi yapılan 129 olgunun 29'unda (%8,1) HER2 mutasyonu bulunmuş olup, olguların büyük çoğunluğunun kadın

olduğu saptanmıştır (134). Bhaumik ve ark.'ın yaptığı çalışmada ise KHDAK'lı vakalarda HER2 mutasyonu %1,5 oranında erkeklerde kadınlara göre daha yüksek oranda bulunmuştur (112). Bizim çalışmamızda FISH ile tesbit edilen HER2 mutasyonu %10 oranında saptanmış olup, literatür verilerine göre yüksek oranda tesbit edildi. Ayrıca literatürün çoğunluğundan farklı olarak HER2 mutasyonu tesbit edilen olguların %80'i erkek cinsiyete sahipti.

HER2 aşırı ekspresyonu / amplifikasyonu ADK'da diğer akciğer kanseri histolojik tiplerinden daha sık görülmektedir (132). KHDAK vakaları üzerinde yapılan çalışmalarda HER2 mutasyonu büyük çoğunlukla ADK'larda tesbit edilmiş, nadiren BHK ve SHK vakalarında da görülebildiği belirtilmiştir (128). 204 KHDAK'lu vaka üzerinde yapılan bir çalışmada HER2 mutasyonu üç hastada saptanmış olup, tamamının ADK morfolojisinde olduğu saptanmıştır (112). ADK alt tiplerinde HER2 mutasyonu hakkında sınırlı bilgi mevcut olup, lepidik paterni baskın düşük dereceli ADK'larda daha sık görüldüğü bilinmektedir (154). Akciğer kanseri alt tipleri için hedef tedavilerin gerçek yanıt oranını ve en iyi hedeflenmiş terapileri belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (155). Bizim çalışmamızda HER2 mutasyonu saptanan olguların tamamı ADK morfolojisinde idi.

KHDAK'da HER2 mutasyonunun prognostik rolü tartışmalıdır ve kullanılan tespit yöntemine, İHK'ya veya hibridizasyona bağlı olarak farklılık gösterebilir. HER2 için İHK ve FISH şu anda tanısal testler olarak kullanılmaktadır (132). Çeşitli çalışmalar, İHK'sal teknikleri kullanarak akciğer kanserlerinde HER2 onkogen ve protein ekspresyonunu değerlendirmiştir. Bu çalışmalar, KHDAK hastalarının %27 - 57'sinde HER-2'nin aşırı ekspresyonunu, ve bunlar içinde de ADK'ların en yüksek aşırı ekspresyon oranlarına sahip olduğunu bildirmiştir. Frekanstaki bu geniş dağılımın, test edilen metodolojilerdeki ve çalışılan hasta popülasyonlarındaki farklılıklar ile ilişkili olması muhtemeldir. Yapılan çalışmalarda KHDAK'da HER2 / neu'nun aşırı ekspresyonu, daha kötü bir sağkalımla ve kısa nüks zamanıyla ilişkilendirilmiştir (134). Hirsch ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada 238 KHDAK olgusunda İHK ile HER2 protein overekspresyonu araştırılmış, 39 hastada (%16) 2+ veya 3+ ekspresyon bulunmuş; bunların 33'ü (%35'i) ADK ve 20'si (%20'si) BHK'larda tesbit edilmiştir. 113 SHK olgusundan sadece birinde İHK'sal olarak HER2 pozitif bulunmuştur (128). Bizim çalışmamızda İHK'sal olarak altı olguda +2, bir olguda +3 boyanma saptandı ve vakaların tamamının ADK morfolojisinde olduğu görüldü.

KHDAK'da HER2 İHK ve FISH arasındaki uyum hakkında literatürde çok az bilgi yer almaktadır. Yapılan az sayıda çalışmada HER2 mutasyonu ile artmış ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır (154). İHK'sal olarak HER2'nin aşırı ekspresyonunun, FISH ile HER2 amplifikasyonu olmaksızın, daha kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (151). Birkaç çalışmada KHDAK'da HER2 aşırı ekspresyon ve amplifikasyonu sırasıyla %13 - 20 ve %2 - 22.8 oranlarında bildirilmiş, HER2 İHK skoru +3 olan KHDAK vakalarının sadece %2-6'sında HER2 mutasyonu bulunmuştur (134, 156-158). Hirsch ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada 51 KHDAK olgusunda HER2 hem İHK, hem de FISH teknikleriyle değerlendirilmiştir. Olguların %6'sında güçlü pozitif boyama (3+), %19'unda pozitif (2+) sonuç, %75'inde negatif (0 – 1+) sonuç alınmıştır. ADK (%42) ve BHK'lar (%40) arasında en yüksek pozitif boyama oranları bulunurken, SHK olgularının sadece %5'i pozitif bulunmuştur (134). Heinmöller ve ark.'ın yaptığı çalışmada HER2 durumunun üç farklı teknoloji (İHK, FISH ve ELISA) açısından karşılaştırılması için 563 KHDAK olgusu değerlendirilmiştir. Örneklerin %20'sinde (410 olgunun 83'ü) İHK kullanılarak HER2 aşırı ekspresyonu gösterilirken, %2'si (378 olgunun 7'si) FISH ile pozitif, %6'sı (511 olgunun 31'i) ELISA ile HER2 düzeyleri yüksek (>15 ng/ml) olarak bulunmuştur. Altmış altı örnek sadece İHK ve 13 örnek sadece ELISA ile pozitif iken, örneklerin hiçbirisi yalnızca FISH ile pozitif bulunmamıştır. Tüm tekniklerle uyumlu sonuç sadece üç örnekte görülmüştür. Üç teknikten en az biri ile HER2 pozitif saptanabilen ADK'lı olgu oranı %29 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada İHK ve FISH yöntemi arasında HER2 mutasyon tesbiti için ELISA'ya göre daha anlamlı bir uyum bulunmuştur (158). Ko ve ark. 1217 KHDAK olgusu üzerinde yaptıkları çalışmada HER2'nin İHK ve FISH'in tanısal doğruluğu arasındaki uyum değerlendirilmiş; HER2 İHK ve FISH arasındaki uyum oranı 0.795 (%95 güven aralığı 0.534-0.929) olarak saptanmıştır. HER2 İHK negatif (skor 0/1+) alt grubunda uyum oranı 0.975 (%95 güven aralığı 0.854-0.996), HER2 İHK skoru 2+ ve 3+ alt gruplarının uyum oranları sırasıyla 0.091 (%95 güven aralığı 0.039-0.197) ve 0.665 (%95 güven aralığı 0.446-0.830) belirtilmiştir. HER2 İHK skoru 0/1 + vakalarında büyük ölçüde FISH ile uyumlu sonuç bulunmuştur. HER2 İHK skoru 2/3 + olgularının uyum oranları, skoru 0/1 + olgulara göre daha düşük olduğundan, skoru 2+ veya 3+ için ileri çalışmaların gerekliliği vurgulanmıştır. Bu çalışmanın KHDAK'li olgularda HER2'nin İHK ve FISH arasındaki uyumunu gösteren ve tanısal uygunluğunu değerlendiren ilk çalışma olduğu belirtilmiştir (132). Bizim çalışmamız da bu açıdan literatürdeki az sayıda çalışmadan biridir. Bizim çalışmamızda da HER2 İHK ve FISH

yöntemleri değerlendirilmiş olup, FİSH yöntemiyle HER2 mutasyonu bulunan beş olgudan birinde İHK'sal olarak HER2 pozitif (3+), dördünde negatif (+1 ve 0) sonuç bulunmuştur. Moleküler analiz sonuçları ile İHK sonuçları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Literatürde HER2 mutasyon durumu ile klinikopatolojik verileri karşılaştıran sınırlı çalışma bulunmaktadır. In-Jae Oh ve ark.'ın 360 adenokarsinom tanılı olgu ile yaptıkları çalışmada HER2 mutasyonu saptanan olguların ortalama yaşı 57 olarak saptanmış olup, bunların 17'sinin kadın, 12'sinin erkek cinsiyette olduğu belirtilmiştir. Olguların %55,2'si evre 4 olarak tesbit edilmiştir (155). Hirsch ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada HER2 pozitifliği tesbit edilen 51 KHDAK olgusunun 39'u erkek, 12'si kadın olup, ortalama yaş 65 olarak belirtilmiştir. Olguların 32'si Evre 1, 8'i Evre 2, 11'i Evre 3 olarak bulunmuştur (134). Çalışmamızda KHDAK olgularında HER2 mutasyonu saptanan olgular arasında ortalama yaş 62,4'dü. Olguların tümünde tümör ADK morfolojisinde olup 4'ü erkek, 1'i kadındı. Tümör evresi iki olguda Evre 2 iken, üç olguda Evre 1'di. Çalışmamızda tümör yerleşimi, odak sayısı, tümör boyutu, bronş cerrahi sınır durumu, tümörün ana bronşa uzaklığı, tümöre karşı oluşan inflamatuvar yanıt, nekroz varlığı, plevranın durumu, tümörün plevraya uzaklığı, lenfovasküler invazyon varlığı, disseke edilen lenf nodu sayısı, lenf nodlarının durumu ve tümörün evresi ile İHK'sal HER2 ve moleküler yöntemle çalışılan HER2 mutasyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

KHDAK'de HER2 durumunun prognostik rolü hala tartışmalıdır. Meme ve mide kanserlerinden farklı olarak, Trastuzumab'ın terapötik etkisi, HER2 aşırı ekspresyonu gösteren KHDAK'de tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, birkaç kinaz inhibitörü arasında Neratinib ve Dacomitinib'in HER2-mutant akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonu üzerinde bir etkisi olduğu gösterilmiştir (159-161). Son bilgiler yakın gelecekte HER2'yi hedefleyen potansiyel ilaçların etkisiyle, ADK'da rutin klinik genotiplemede HER2'nin de yer alacağını desteklemektedir. Ancak yapılan çalışmalarda HER2 mutasyonu ile artmış ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır. Bu mutasyonu taşıyan hastaların HER2 tedavi stratejilerinden fayda görüp görmeyeceği henüz net değildir. HER2 amplifikasyonunun EGFR tedavisine kazanılmış direnç mekanizması olarak saptanmış olması oldukça önemlidir (154).

Literatürde BRAF ve HER2 mutasyonunu birlikte değerlendiren çok az çalışma mevcuttur. KHDAK'larında bir grup mutasyonu değerlendiren az sayıda çalışmada BRAF ve HER2 mutasyonları da değerlendirilmiş ancak hiçbirinde BRAF ve HER2 mutasyon birlikteliği saptanmamıştır (112, 118, 120, 121). Çalışmamızda BRAF ve HER2 mutasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış olup, hiçbir hastada bu iki mutasyonun beraberliği tesbit edilmemiştir. Bu durum bu iki mutasyon varlığının bir diğerini dışlayıcı nitelikte olabileceğini de akla getirmektedir. Literatürde bu alanda oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışma KHDAK tanılı Türk hastalarda BRAF mutasyonu ve HER2 gen amplifikasyonunun değerlendirildiği ilk çalışmalardan olma özelliği taşımaktadır. Yapılacak daha çok çalışma ile toplumumuza özgü genetik değişikliklerin ortaya konması, hem klinisyene tedavide yol gösterici olacak, hem de tanı önceliklerinin belirlenmesine önemli katkı sağlayacaktır.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri dünyada en sık görülen ve en sık mortaliteye neden olan kanser türüdür. Akciğer kanseri gelişimi çok basamaklı bir süreç olup, birçok genetik değişiklik tanımlanmıştır. Genetik değişikliklere, sürücü mutasyonlara sahip tümörler, oluşan gen ürünlerini hedefleyen tedavilere karşı oldukça hassastır.

Biz bu çalışmada KHDAK tanılı olgularda tedavide hedef olabilecek BRAF mutasyonu ve HER2 gen amplifikasyonunun prevalansı ve prognostik önemini, BRAF ve HER2 için İHK'sal boyanmalarının moleküler analiz ile korelasyonunu değerlendirerek amplifikasyonu ne oranda yansıttığını ve bu mutasyonlar ile KHDAK'lı olguların demografik ve histopatolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi saptamaya çalıştık. Bu amaçla bölümümüzde KHDAK olarak tanı almış 121 akciğer rezeksiyon materyali histopatolojik olarak incelenmiş, 65'i (%53,7) SHK, 52'si (%43) ADK, dördü (%3,3) Adenoskuamöz Karsinom olarak sınıflandırılmıştır. Bu olgulardan 50'sine yapılan moleküler çalışma sonucunda olguların ikisinde (%4) BRAF, beşinde (%10) HER2 mutasyonu bulunmuştur.

İHK'sal BRAF pozitifliği saptanan olguların çoğunluğu erkek cinsiyette ve ADK morfolojisindedir.

Çalışmamızda İHK'sal BRAF pozitifliği ile olgulara ait yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, tümörün ana bronşa uzaklığı, tümöre karşı oluşan inflamatuvar yanıt, nekroz, plevral invazyon, lenfovasküler invazyon, metastatik lenf nodu parametreleri arasında her biri için ayrı ayrı analiz yapılmış, anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. ADK alt tip dağılımına bakıldığında ise BRAF mutasyonu en sık lepidik baskın tipte saptanmıştır. Ayrıca İHK'sal BRAF ile lepidik baskın tip ADK arasındaki ilişki analizinde de sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,01).

Moleküler BRAF pozitifliği saptanan olguların her ikisi de histolojik olarak literatürle uyumlu şekilde ADK morfolojisindedir.

Moleküler BRAF pozitifliği saptanan olgulara uygulanan İHK'sal boyama sonucunda bir olguda +3, diğer olguda +1 şiddetinde boyanma tesbit edilmiştir. Moleküler analiz sonuçları ile İHK boyanma sonuçları arasında anlamlı bir farklılık tesbit edilmemiştir.

İHK'sal HER2 pozitifliği saptanan olguların tümü erkek cinsiyette olup, olguların 4'ü SHK, 2'si ADK morfolojisindedir.

Çalışmamızda İHK'sal HER2 pozitifliği ile olgulara ait yaş, cinsiyet, tümör tipi, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, tümörün ana bronşa uzaklığı, tümöre karşı oluşan inflamatuvar yanıt, nekroz, plevral invazyon, lenfovasküler invazyon, metastatik lenf nodu parametreleri arasında her biri için ayrı ayrı analiz yapılmış, anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Moleküler HER2 pozitifliği saptanan olguların tümü histolojik olarak literatürle uyumlu şekilde ADK morfolojisindedir.

Moleküler HER2 pozitifliği saptanan olgulara uygulanan İHK'sal boyama sonucunda bir olguda +2, diğer olguda +1 şiddetinde membranöz boyanma tesbit edilmiştir. Moleküler analiz sonuçları ile İHK sonuçları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Çalışmamızdaki BRAF mutasyonu saptanan olguların oranı literatürde bildirilen oranlarla uyumlu referans aralığı içerisinde olup, HER2 gen amplifikasyonu literatürde bildirilen oranların oldukça üzerindedir. Bu sonuç HER2 gen amplifikasyonunun tanı ve tedavide daha fazla dikkate alınmasının tedavi başarısına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bu alanda oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışma KHDAK tanılı Türk hastalarda BRAF mutasyonu ve HER2 gen amplifikasyonunun değerlendirildiği az sayıdaki çalışmalardan biri olma özelliği taşımaktadır.

Akciğer kanserindeki en önemli prognostik faktör olan sigara kullanım sürelerinin ve hastaların klinik takip sürelerininin çalışmamıza dahil edilememiş olması ve vaka sayısının az olması çalışmamızın sınırlılıklarıdır. Daha büyük ve çok merkezli çalışmalar, standardize edilmiş değerlendirme kriterleri, takip süreleri ve daha fazla prognostik parametre içeren kapsamlı çalışmalar daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

7. ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KARSİNOMLARINDA BRAF VE HER2 MUTASYONLARININ İMMUNHİSTOKİMYASAL ANALİZİ VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

Akciğer kanseri tüm dünyada erişkinlerde en sık görülen kanser türü olup, gelişmiş ülkelerde tüm kanserlerin %24'ünü, kansere bağlı ölümlerin de %20'sini oluşturmaktadır. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturur. KHDAK'ları arasında en sık görülen histolojik alt tipler Skuamöz Hücreli Karsinom (SHK) ve Adenokarsinom (ADK)'dur. Bu farklı histolojik grup tümörlerin tedavisinde kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılık açısından biyolojik olarak farklı davranışlar gözlenir. Artan moleküler yöntemlerin ışığında, HER2 ve BRAF da dahil olmak üzere akciğer kanserlerinin patogeneze katkıda bulunan birçok onkojenik sürücü mutasyonunun saptanmasında ilerleme kaydedilmiştir. Bu çalışmada, KHDAK'larda HER2 ve BRAF mutasyon profilinin belirlenmesi, aynı zamanda BRAF ve HER2 immunhistokimya (İHK)'sal boyanma sonuçlarının demografik ve histopatolojik veriler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda KHDAK tanısı alan 121 olguya ait akciğer rezeksiyon materyali çalışmaya alınmış; olguların demografik ve histopatolojik verileri arşiv raporlarından elde edilmiştir. Olguların tamamına İHK'sal olarak HER2 ve BRAF boyaları uygulanmış, bunların 50'sinde eş zamanlı olarak moleküler yöntemle BRAF ve HER2 mutasyonu çalışılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Olguların 108'i (%89,3) erkek, 13'ü (%10,7) kadındı. Ortalama yaş 65,5 (\pm 9,48) idi. Olguların 65'i (%53,7) SHK, 52'si (%43) ADK, 4'ü (%3,3) Adenoskuamöz Karsinom tanılıydı. Moleküler yöntemle BRAF çalışılan 50 olgunun 2'sinde (%4) mutasyon tesbit edildi. Bu 2 olgunun 1'i İHK'al olarak +3, diğeri +1 pozitif boyandı. FISH yöntemiyle HER2 çalışılan 50 olgunun 5'i (%10) pozitif, 45'i (%90) negatifti. 5 olgunun İHK'sal HER2

boyanmasında 1'inde +2; 1'inde +1, 3'ünde 0 (sıfır) boyanma bulundu. BRAF ve HER2 mutasyonlarının İHK'sal yöntemle analizlerinin karşılaştırılmasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,21$), ($p=0,109$). Moleküler BRAF ve HER2 pozitifliği saptanan olguların tümü histolojik olarak ADK morfolojisindeydi. BRAF ve HER2 mutasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış olup, hiçbir hastada bu iki mutasyonun beraberliği tesbit edilmedi ($p=0,63$). Ayrıca İHK'sal BRAF ve HER2 pozitifliği ile olgulara ait yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, tümörün ana bronşa uzaklığı, tümöre karşı oluşan inflamatuvar yanıt, nekroz, plevral invazyon, lenfovasküler invazyon, metastatik lenf nodu parametreleri arasında her biri için ayrı ayrı analiz yapıldı, anlamlı bir ilişki bulunmadı. ADK alt tip dağılımına bakıldığında ise BRAF mutasyonu en sık lepidik baskın tipte saptandı. Ayrıca İHK'sal BRAF ile lepidik baskın tip ADK arasındaki ilişki analizinde de sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,01$).

Akciğer kanseri gelişimi çok basamaklı bir süreç olup, birçok genetik değişiklik tanımlanmıştır. Günümüzde KHDAK'ların insidansı ve moleküler yapısı bakımından toplumlar arasında farklılıklar görülmektedir. Çalışmamızda en sık tümöral alt tip SHK olup, erkek cinsiyette baskınlık saptanmıştır. Ülkemizde KHDAK'ların mutasyon profiline dair yeterli veri bulunmamakta olup, tedavi protokolleri Avrupa ve ABD verilerine göre düzenlenmektedir. Bu yüzden KHDAK'ların moleküler verilerinin oluşturulması, tanı ve tedavi stratejilerinin belirlenmesi ayrıca tedavi başarısının artırılması bakımından önemlidir. Çalışmamızda BRAF mutasyonu oranı literatür ile uyumlu aralık içerisinde olup, HER2 mutasyonu ise literatürde belirtilen oranların biraz üzerinde saptanmıştır. Bu çalışma KHDAK tanılı Türk hastalarda BRAF mutasyonu ve HER2 gen amplifikasyonunun değerlendirildiği az sayıdaki çalışmalardan biri olma özelliği taşımaktadır. Akciğer kanseri alt tipleri için hedef tedavilerin gerçek yanıt oranını ve en iyi hedeflenmiş terapileri belirlemek için daha geniş vaka serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Akciğer, BRAF, HER2, küçük hücreli dışı karsinom

İletişim adresi: esinyigitbasi@gmail.com

8. SUMMARY

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF BRAF AND HER 2 MUTATIONS IN SMALL CELL LUNG CARCINOMAS AND THEIR RELATIONSHIP WITH CLINICAL-PATHOLOGICAL PARAMETERS

Lung cancer is the most common type of cancer in adults worldwide, accounting for 24% of all cancers in developed countries and 20% of cancer-related deaths. Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) accounts for about 80% of all lung cancers. The most common histological subtypes among NSCLCs are squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (ADC). In the treatment of these different histological group tumors, biologically different behaviors are observed in terms of susceptibility to chemotherapy and radiotherapy. In light of increased molecular methods, progress has been made in detecting many oncogenic driver mutations that contribute to the pathogenesis of lung cancers, including HER2 and BRAF. In this study, it was aimed to determine the HER2 and BRAF mutation profile in NSCLCs and also to compare the results of BRAF and HER2 immunohistochemical (IHC) staining with demographic and histopathological data.

In the Medical Pathology Department of Aydin Adnan Menderes University, lung resection material of 121 patients diagnosed as NSCLC was taken into the study; demographic and histopathological data of the patients were obtained from archival reports. In all cases, HER2 and BRAF dyes were applied, and in 50 of them, BRAF and HER2 mutations were studied simultaneously by molecular method and the results were compared.

Of the cases, 108 (89.3%) were male and 13 (10.7%) were female. The median age was 65.5 (9.48%). Of the cases, 65 (53.7%) were diagnosed with SCC, 52 (43%) were diagnosed with ADC, and 4 (3.3%) were diagnosed with Adenosquamous Carcinoma. Mutations were detected in 2 (4%) of the 50 patients studied BRAF by molecular method. Of these 2 cases, 1 was +3 positive and the other was +1 positive. Of the 50 cases studied with FISH method HER2, 5 (10%) were positive and 45 (90%) were negative. In the IHC HER2 staining of 5 cases, 1 had +2, 1 had +1, and 3 had 0 (zero) staining. No significant differences were found in the comparison of IHC analysis of BRAF and HER2 mutations ($p=0.21$), ($p=0.109$). All of the patients with molecular BRAF and HER2 positivity were histologically in ADC morphology. There was no significant association between BRAF and HER2 mutations and no correlation between these two mutations was found in any patient ($p=0.63$).

The age, sex, tumor localization, tumor size, tumor distance, inflammatory response to tumor, necrosis, pleural invasion, lymphovascular invasion and metastatic lymph node parameters of the patients were analyzed separately and there was no significant relationship between the positivity of IHC BRAF and IHC HER2. The BRAF mutation was most commonly found in the lepidic dominant type when looking at the ADC subtype distribution. In addition, the results were statistically significant in the analysis of the relationship between IHC BRAF and lepidic dominant type ADC ($p=0,01$).

The development of lung cancer is a multi-step process and many genetic changes have been identified. Today, there are differences between societies in terms of the incidence and molecular structure of NSCLCs. In our study, the most common tumoral subtype was SCC and male sex dominance was determined. There is not enough data on the mutation profile of NSCLCs in our country and treatment protocols are regulated according to European and US data. Therefore, the creation of molecular data of NSCLCs, identification and treatment strategies are also important in terms of increasing treatment success. In our study, the rate of BRAF mutation was in the range consistent with the literature, while the HER2 mutation was found to be slightly above the rates indicated in the literature. This study is one of the few studies evaluating BRAF mutation and HER2 gene amplification in Turkish patients with NSCLC. More extensive case series studies are needed to determine the true response rate of target treatments for lung cancer subtypes and the best targeted therapies.

Key words: Lung, BRAF, HER2, non-small cell carcinoma

Contact address: esinyigitbasi@gmail.com

9. KAYNAKLAR

1. Cruz CSD, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin in Chest Med.* 2011;32(4):605-44.
2. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1240-2.
3. Spierings DC, de Vries EG, Timens W, Groen HJ, Boezen HM, de Jong S. Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3397-405.
4. Fujimoto J, Wistuba, II. Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2014;31(4):306-13.
5. Luo J, Xiong J, Wu J, Ye X. Genetic polymorphisms and haplotypes of TRAIL gene correlate with NSCLC susceptibility in a group of Chinese patients. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):16223-30.
6. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
7. Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol.* 2008;3(8):819-31.
8. Walker MS, Larsen RJ, Zona DM, Govindan R, Fisher EB. Smoking urges and relapse among lung cancer patients: findings from a preliminary retrospective study. *Prev Med.* 2004;39(3):449-57.
9. Kwiatkowski DJ, Harpole Jr DH, Godleski J, Herndon 2nd J, Shieh D-B, Richards W, et al. Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: clinical implications. *Int J Clin Oncol.* 1998;16(7):2468-77.
10. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39-51.
11. Cheng L, Zhang S, Alexander R, Yao Y, MacLennan GT, Pan C-x, et al. The landscape of EGFR pathways and personalized management of non-small-cell lung cancer. *Future Oncol.* 2011;7(4):519-41.

12. La Fleur L, Falk-Sorqvist E, Smeds P, Berglund A, Sundstrom M, Mattsson JS, et al. Mutation patterns in a population-based non-small cell lung cancer cohort and prognostic impact of concomitant mutations in KRAS and TP53 or STK11. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2019;130:50-8.
13. Yousem SA, Nikiforova M, Nikiforov Y. The histopathology of BRAF-V600E-mutated lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(9):1317-21.
14. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet PJ, Quoix E, Baik CS, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *The Lancet Oncol*. 2016;17(7):984-93.
15. Yan B, Choo SN, Mulyadi P, Srivastava S, Ong CW, Yong KJ, et al. Dual-colour HER2/chromosome 17 chromogenic in situ hybridisation enables accurate assessment of HER2 genomic status in ovarian tumours. *J Clin Pathol*. 2011;64(12):1097-101.
16. Day JD, Digiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, et al. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum pathol*. 1996;27(2):119-24.
17. Oh IJ, Hur JY, Park CK, Kim YC, Kim SJ, Lee MK, et al. Clinical Activity of Pan-HER Inhibitors Against HER2-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Clin lung cancer*. 2018;19(5):e775-e81.
18. Ma BB, Hui EP, Mok TS. Population-based differences in treatment outcome following anticancer drug therapies. *The lancet oncol*. 2010;11(1):75-84.
19. Pabst R, Putz R, Taylor AN. *Sobotta atlas of human anatomy: Williams & Wilkins; 1997.*
20. Lekeux P, Art T. The respiratory system: anatomy, physiology, and adaptations to exercise and training. *The Athletic Horse: principles and practice of equine sports medicine: WB Saunders, Philadelphia; 1994. p. 79-127.*
21. Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):S72-S7.
22. BAILE EM. The anatomy and physiology of the bronchial circulation. *J Aerosol Med*. 1996;9(1):1-6.
23. Martini F. *Anatomy and Physiology, 2007 Ed: Rex Bookstore, Inc.; 2006.*

24. Kaçar D, Barut Ç. Kalbin venleri: Terminolojik inceleme. Turk Gogus Kalp Damar Cer. 2011;19:529-32.
25. Arıncı K. Anatomi 2. cilt: Dolaşım sistemi, periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi, duyu organları: Güneş kitapevi; 2006.
26. Sternberg SS, Sternberg, Stenberg, Stenberg. Histology for pathologists: Lippincott-Raven Philadelphia; 1997.
27. Berrocal T, Madrid C, Novo S, Gutiérrez J, Arjonilla A, Gómez-León N. Congenital anomalies of the tracheobronchial tree, lung, and mediastinum: embryology, radiology, and pathology. Radiographics. 2004;24(1):e17-e.
28. Jeffery PK. The development of large and small airways. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157(5):S174-S80.
29. Kravitz RM. Congenital malformations of the lung. Pediatr Clin North Am. 1994;41(3):453-72.
30. Merkus P, Have-Opbroek At, Quanjer P. Human lung growth: a review. Pediatr Pulmonol. 1996;21(6):383-97.
31. Cotran RS, Kumar V, Fausto NR, Nelso Fausto R, Stanley L, Abbas AKR. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. St Louis, Mo: Elsevier Saunders. 2005:542.
32. Thurlbeck WM. Postnatal human lung growth. Thorax. 1982;37(8):564-71.
33. Brand-Saberi BE, Schäfer T. Trachea: anatomy and physiology. Thorac Surg Clin. 2014;24(1):1-5.
34. Tomashefski JF, Farver CF. Anatomy and histology of the lung. Dail and Hammar's pulmonary pathology: Springer; 2008. p. 20-48.
35. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. Int J Biochem Cell Biol. 2010;42(1):1-4.
36. West JB. Respiratory physiology: the essentials: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
37. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.
38. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for hispanics/latinos, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62(5):283-98.

39. Zhou W, Christiani DC. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer*. 2011;30(5):287.
40. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-85.
41. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):992-1001.
42. Goksel T, Akkoclu A. Pattern of lung cancer in Turkey, 1994-1998. Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. *Respiration*. 2002;69:207-10.
43. Çelik İ, Engin K, Özyardımcı N. Akciğer kanserinde epidemiyoloji. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel ilkeler ve Uygulamalar Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd Şti Yayınları, İstanbul. 2001:50-6.
44. KB. Değerlendirilmesi 1993-1994. TC Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yayınları. 1997.
45. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. *BMC cancer*. 2012;12(1):385.
46. Garfinkel L, Silverberg E. Lung cancer and smoking trends in the United States over the past 25 years. *CA Cancer J Clin*. 1991;41(3):137-45.
47. Bach PB, Kattan MW, Thornquist MD, Kris MG, Tate RC, Barnett MJ, et al. Variations in lung cancer risk among smokers. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(6):470-8.
48. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(14):1194-210.
49. Li D, Zhang L, Zhou J, Chen H. Cigarette smoke extract exposure induces EGFR-TKI resistance in EGFR-mutated NSCLC via mediating Src activation and EMT. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2016;93:35-42.
50. Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tomioka Y, Itoh H, Kasai H. Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer res*. 1996;56(11):2546-9.

51. Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, Greenwald P, Chorost S, Tucci C, et al. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N Engl J Med.* 1990;323(10):632-6.
52. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2007;132(3):29S-55S.
53. Baris Yİ. Asbestos and erionite related chest diseases: Department of Chest Diseases, Hacettepe Univ., School of Medicine; 1987.
54. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin.* 2000;50(1):7-33.
55. Osann K, Ernster V, Mustacchi P. Chapter 45. Epidemiology of lung cancer. *Textbook of Respir Med*, 3rd ed Philadelphia: WB Sanuders, company. 2001:1395-407.
56. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA, editors. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*; 2008: Elsevier.
57. Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera EV, Van Den Brandt PA, et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(3):657-67.
58. Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2006;608(2):157-62.
59. Kreyberg L. Histological Typing of Lung Tumours: By Leiv Kreyberg in Collaboration with AA Liebow, EA Uehlinger, and Seventeen Pathology Departments in Fifteen Countries: World Health.; 1967.
60. Organization WH. Histological typing of lung tumours. *International histological classification of tumours.* 1981;1.
61. Müller-Hermelink HK, Engel P, Kuo T, Ströbel P, Marx A, Harris N, et al. Pathology & genetics, tumours of the lung, pleura, thymus and heart. *World Health Organization Classification of Tumors* Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, Eds IARC Press, Lyon. 2004:146-7.
62. Travis W. The 2015 WHO classification of lung tumors. *Der Pathologe.* 2014;35(2):188-.
63. Fletcher C. *Diagnostic Histopathology of Tumors*, 4. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.

64. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Geisinger K, Beer D, Powell CA, et al. The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol.* 2009;4(9):S86-S9.
65. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2013;15(4):415-53.
66. Wong DWS, Leung ELH, So KKT, Tam IYS, Sihoe ADL, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer.* 2009;115(8):1723-33.
67. Group RoaT. Air pollution and cancer: risk assessment methodology and epidemiological evidence. *Environ Health Perspect.* 1978:1-12.
68. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol.* 2011;6(9):1496-504.
69. Cagle PT, Allen TC, Dacic S, Beasley MB, Borczuk AC, Chirieac LR, et al. Revolution in lung cancer: new challenges for the surgical pathologist. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):110-6.
70. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod pathol.* 2011;24(5):653.
71. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest.* 1997;111(6):1710-7.
72. Koike T, Terashima M, Takizawa T, Aoki T, Watanabe T, Akamatsu H. Results of surgery for primary lung cancer based on the new international staging system. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;47(7):313-7.

73. Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8(th) lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg.* 2018;8(7):709-18.
74. Fletcher CDM. *Diagnostic Histopathology of Tumors: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.*; 2013. 207-39 p.
75. Barletta JA, Yeap BY, Chirieac LR. Prognostic significance of grading in lung adenocarcinoma. *Cancer: Interdisciplinary Int J Am Cancer Soc.* 2010;116(3):659-69.
76. Chilosi M, Murer B. Mixed adenocarcinomas of the lung: place in new proposals in classification, mandatory for target therapy. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(1):55-65.
77. Yeh Y-C, Kadota K, Nitadori J-i, Sima CS, Rizk NP, Jones DR, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification predicts occult lymph node metastasis in clinically mediastinal node-negative lung adenocarcinoma. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2015;49(1):e9-e15.
78. Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, et al. Proposal of an improved histological sub-typing system for lung adenocarcinoma—significant prognostic values for stage I disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010;3(4):348.
79. Silver SA, Askin FB. True papillary carcinoma of the lung: a distinct clinicopathologic entity. *Am J Surg Pathol.* 1997;21(1):43-51.
80. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;27(26):4247.
81. Churg A, Johnston WH, Stulbarg M. Small cell squamous and mixed small cell squamous--small cell anaplastic carcinomas of the lung. *Am J Surg Pathol.* 1980;4(3):255-63.
82. Mills SE. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology.* 6 ed. Philadelphia 2015. 1160-207.
83. Kradin RL. *Understanding Pulmonary Pathology: Applying Pathological Findings in Therapeutic Decision Making: Academic Press;* 2016.
84. Zhang J, Kalyankrishna S, Wislez M, Thilaganathan N, Saigal B, Wei W, et al. SRC-family kinases are activated in non-small cell lung cancer and promote the survival of epidermal growth factor receptor-dependent cell lines. *Am. J. Pathol.* 2007;170(1):366-76.

85. López-Malpartida AV, Ludeña MD, Varela G, Pichel JG. Differential ErbB receptor expression and intracellular signaling activity in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2009;65(1):25-33.
86. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-39.
87. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-500.
88. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839)(Iressa®) tablets. *The oncologist*. 2003;8(4):303-6.
89. Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Miller L, Metheny-Barlow L, Lo H-W. EGFR and HER2 signaling in breast cancer brain metastasis. *Front Biosci (Elite edition)*. 2016;8:245.
90. Morris SW, Xue L, Ma Z, Kinney MC. Alk+ CD30+ lymphomas: a distinct molecular genetic subtype of non-hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol*. 2001;113(2):275-95.
91. Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, Dafni U, Kerr KM, Hager H, et al. Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2780-7.
92. Kim MH, Shim HS, Kang DR, Jung JY, Lee CY, Kim DJ, et al. Clinical and prognostic implications of ALK and ROS1 rearrangements in never-smokers with surgically resected lung adenocarcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2014;83(3):389-95.
93. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(10):1773-80.
94. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Modern Pathology*. 2009;22(4):508.
95. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561.

96. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer res.* 2008;68(13):4971-6.
97. Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *Am Soc Clin Oncol*, 2009.
98. Cagle PT. Precision Molecular Pathology of Lung Cancer. Cagle PT, editor. Houston, TX, USA: Springer 2018.
99. Kakegawa S, Shimizu K, Sugano M, Miyamae Y, Kaira K, Araki T, et al. Clinicopathological features of lung adenocarcinoma with KRAS mutations. *Cancer.* 2011;117(18):4257-66.
100. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(2):201-5.
101. Forbes S, Clements J, Dawson E, Bamford S, Webb T, Dogan A, et al. COSMIC 2005. *Br J Cancer.* 2006;94(2):318-22.
102. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(18):5731-4.
103. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990;323(9):561-5.
104. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, Jänne PA, Pignon J-P, Graziano S, et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2013;31(17):2173.
105. Bos M, Gardizi M, Schildhaus H-U, Buettner R, Wolf J. Activated RET and ROS: two new driver mutations in lung adenocarcinoma. *Transl Lung Cancer Res.* 2013;2(2):112.
106. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(15):4040-5.
107. Ou S-hI, Camidge D, Engelman J, Clark J, Tye L, Wilner K, et al. Clinical activity of crizotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harboring ROS1 gene rearrangement. *ESMO 2012.* 2012.

108. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012;30(8):863.
109. Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, et al. Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2008;68(14):5524-8.
110. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Disease.* 2013;5(Suppl 5):S479.
111. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006;7(8):606.
112. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer res.* 2001;61(10):3986-97.
113. Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(8):1315-26.
114. Wells SA, Jr., Santoro M. Targeting the RET pathway in thyroid cancer. *Clinical cancer research : an official J Am Assn Cancer Res.* 2009;15(23):7119-23.
115. Ju YS, Lee W-C, Shin J-Y, Lee S, Bleazard T, Won J-K, et al. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome res.* 2012;22(3):436-45.
116. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat. Med.* 2012;18(3):382.
117. Kinno T, Tsuta K, Shiraishi K, Mizukami T, Suzuki M, Yoshida A, et al. Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations. *Ann. Oncol.* 2013;25(1):138-42.
118. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366(21):2038-40.
119. Gautschi O, Pauli C, Strobel K, Hirschmann A, Printzen G, Aebi S, et al. A patient with BRAF V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib. *J Thorac Oncol.* 2012;7(10):e23-e4.

120. Routhier CA, Mochel MC, Lynch K, Dias-Santagata D, Louis DN, Hoang MP. Comparison of 2 monoclonal antibodies for immunohistochemical detection of BRAF V600E mutation in malignant melanoma, pulmonary carcinoma, gastrointestinal carcinoma, thyroid carcinoma, and gliomas. *Hum Pathol.* 2013;44(11):2563-70.
121. Davies H, Bignell G, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949-54.
122. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2046.
123. Sasaki H, Shimizu S, Endo K, Takada M, Kawahara M, Tanaka H, et al. EGFR and erbB2 mutation status in Japanese lung cancer patients. *Int J Oncol.* 2006;118(1):180-4.
124. Ji H, Wang Z, Perera SA, Li D, Liang M-C, Zaghlul S, et al. Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models. *Cancer Res.* 2007;67(10):4933-9.
125. Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes & Dev.* 2007;21(4):379-84.
126. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011;29(26):3574-9.
127. Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, Rueschoff J, Meldrum C, Schilling R, et al. Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(11):1385-91.
128. Novais R, Thorstenson Y. The evolution of Pyrosequencing® for microbiology: from genes to genomes. *J Microbiol Methods.* 2011;86(1):1-7.
129. Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Shitara M, Okuda K, Hikosaka Y, et al. Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2013;82(1):51-4.
130. Myall NJ, Henry S, Wood D, Neal JW, Han SS, Padda SK, et al. Natural Disease History, Outcomes, and Co-mutations in a Series of Patients With BRAF-Mutated Non-small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2019;20(2):e208-e17.

131. Halon A, Donizy P, Biecek P, Rudno-Rudzinska J, Kielan W, Matkowski R. HER-2 expression in immunohistochemistry has no prognostic significance in gastric cancer patients. *Sci World J.* 2012;2012.
132. Ko YS, Kim NY, Pyo J-S. Concordance analysis between HER2 immunohistochemistry and in situ hybridization in non-small cell lung cancer. *Int J Biol Marker.* 2018;33(1):49-54.
133. Buttitta F, Barassi F, Fresu G, Felicioni L, Chella A, Paolizzi D, et al. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2586-91.
134. Hirsch F, Varella-Garcia M, Franklin W, Veve R, Chen L, Helfrich B, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer.* 2002;86(9):1449.
135. Travis WD, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart: IARC; 2015.
136. Geiersbach K, Meyer RG, Kloft-Nelson SM, Knutson DL, Knudson RA, Sukov WR, et al. Reassignment of HER2 status for subgroups of breast cancer according to the 2018 updated American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists guidelines: The impact of combined immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) reflex testing in a large national reference laboratory. *Am Soc Clin Oncol;* 2019.
137. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 2013;132(5):1133-45.
138. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
139. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet.* 2015;385(9972):977-1010.
140. Politikası KS, Verileri K. TC Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. Ankara, Bakanlık Yayın. 2002(618).

141. Samet JM, Wiggins CL, Humble CG, Pathak DR. Cigarette Smoking and Lung Cancer in New Mexico1-3. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:1110-3.
142. Li C, Fang R, Sun Y, Han X, Li F, Gao B, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers. *PloS one*. 2011;6(11):e28204.
143. Grubu TDAMÇ. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. *Toraks Dergisi*. 2006;7:1-37.
144. MacConaill LE. Advancing personalized cancer medicine in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(10):1210-6.
145. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Gender, histology, and time of diagnosis are important factors for prognosis: analysis of 1499 never-smokers with advanced non-small cell lung cancer in Japan. *J Thorac Oncol*. 2010;5(7):1011-7.
146. Bhaumik S, Ahmad F, Das BR. Somatic mutation analysis of KRAS, BRAF, HER2 and PTEN in EGFR mutation-negative non-small cell lung carcinoma: determination of frequency, distribution pattern and identification of novel deletion in HER2 gene from Indian patients. *Med Oncol*. 2016;33(10):117.
147. Oberli LS, Valeri F, Korol D, Rohrmann S, Dehler S. 31 years of lung cancer in the canton of Zurich, Switzerland: incidence trends by sex, histology and laterality. *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14327.
148. Tannenbaum SL, Koru-Sengul T, Zhao W, Miao F, Byrne MM. Survival disparities in non-small cell lung cancer by race, ethnicity, and socioeconomic status. *Cancer J*. 2014;20(4):237-45.
149. Ebru S, DAMADOĞLU E, NERGİZ S, ERTUĞRUL M, SALTÜRK C, KARABAY EÖ, et al. Primer akciğer kanserinde tümör tipi ve cinsiyet dağılımı değişiyor mu? 2004 yılı sonuçlarının daha önceki yıllar ile karşılaştırılması. *Respir J*. 2007.
150. Chen D, Zhang L-Q, Huang J-F, Liu K, Chuai Z-R, Yang Z, et al. BRAF mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(6):e101354.
151. Liu L, Shao X, Gao W, Bai J, Wang R, Huang P, et al. The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data. *J Thorac Oncol*. 2010;5(12):1922-32.

152. Pyo J-S, Kang G, Park K. Clinicopathological significance and diagnostic accuracy of HER2 immunohistochemistry in colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Marker*. 2016;31(4):389-94.
153. Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer cell*. 2006;10(1):25-38.
154. Mazieres J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, et al. Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol*. 2013;31(16):1997-2003.
155. Oh I-J, Hur JY, Park C-K, Kim Y-C, Kim SJ, Lee MK, et al. Clinical activity of Pan-HER inhibitors against HER2-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(5):e775-e81.
156. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(18):4910-8.
157. Zinner RG, Glisson BS, Fossella FV, Pisters KM, Kies MS, Lee PM, et al. Trastuzumab in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with Her2-overexpressing, untreated, advanced non-small cell lung cancer: report of a phase II trial and findings regarding optimal identification of patients with Her2-overexpressing disease. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2004;44(1):99-110.
158. Heinmöller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrocchi M, et al. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clinical Cancer Res*. 2003;9(14):5238-43.
159. Shimamura T, Ji H, Minami Y, Thomas RK, Lowell AM, Shah K, et al. Non-small-cell lung cancer and Ba/F3 transformed cells harboring the ERBB2 G776insV_G/C mutation are sensitive to the dual-specific epidermal growth factor receptor and ERBB2 inhibitor HKI-272. *Cancer Res*. 2006;66(13):6487-91.
160. Kwak E. The role of irreversible HER family inhibition in the treatment of patients with non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2011;16(11):1498-507.
161. Oxnard GR, Binder A, Jänne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):1097.