

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA LİKİT BİYOPSİ
YÖNTEMİNİN HASTALIK TANISI ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Malike İNCE

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2019

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA LİKİT BİYOPSİ
YÖNTEMİNİN HASTALIK TANISI ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Malike İNCE

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Naci ÇİNE, Dr.Öğr.Üyesi Seda EREN KESKİN

KOCAELİ

2019

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE




Tez Adı: Akciğer Kanseri Hastalarında Likit Biyopsi Yönteminin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması

Tez yazarı: Malike İNCE

Tez savunma tarihi:

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Naci ÇİNE

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	BURÇAN VURAL	
ÜYE(DANIŞMAN)	NACİ ÇİNE	
ÜYE	Jeniz S. Akkoumlu	
ÜYE	Seda Arç Kalkan	

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... /.... /2019

Prof. Dr. Sema AŞKIN KEÇELİ
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Akciğer Kanseri Hastalarında Likit Biyopsi Yönteminin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması

Amaç: Akciğer kanseri ülkemizde ve dünyada sık rastlanan bir kanser türüdür. Akciğer kanserinde biyopsinin yeri önemlidir. Doku biyopsisi yöntemleriyle elde edilen dokunun yeterli tümör hücresi içermeme olasılığı, tekrarının zorluğu yeni tanı yöntemlerine yönelmektedir. Yeni nesil dizileme (NGS) tabanlı Likit biyopsi testi, periferik kanda serbest dolaşan DNA'dan (cfDNA) olası varyasyonları tanımlamayı sağlayan bir genetik tarama yöntemidir. Amacımız; yeni bir yöntem olan likit biyopsi testinin akciğer kanseri hastalarında tarama, tanı ve tedavi için büyük önem taşıyan tümör genetik özelliklerinin belirlenmesi ve bu testin tanı üzerine olan etkinliğinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Çalışmamıza Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2018-2019 yılları arasında başvuran 50 akciğer kanseri hastası alınmıştır ve bu hastalara Likit biyopsi testi çalışılmıştır. Elde edilen veriler analiz programları ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Likit biyopsi testi ve analizi sonucunda hastaların %48,8'inde EGFR ve TP53, %20,9'unda PIK3CA, %18,6'sında MET ve KRAS, %16,2'sinde ALK ve MAP2K1, %9,3'ünde BRAF, %6,9'unda NRAS, %2,3'ünde ROS1 genlerinde varyasyonlar saptanmıştır. EGFR, KRAS, NRAS ve BRAF genlerindeki bazı varyasyonlar ilaç ilişkili olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Yapılan çalışma Likit biyopsi testi ile plazmada düşük oranda görülen mutasyonların saptanabilme kabiliyeti ve tümör genotipindeki değişikliklerin güncel durumunun izlenmesinde hasta bireylere avantaj sağlamaktadır. Ayrıca hedef gen paneli analizlerinin tedavide varyasyona yönelik ilaç önermede oldukça etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: akciğer kanseri, cfDNA, gen, likit biyopsi

ABSTRACT

Investigation of the Efficacy of Liquid Biopsy Method on the Diagnosis of Lung Cancer Patients

Objective: Lung cancer is a common cancer type in our country and in the world. The role of biopsy in lung cancer is important. The likelihood that tissue obtained by tissue biopsy methods does not contain enough tumor cells leads to new diagnostic methods for the difficulty of recurrence. The next generation sequencing (NGS) based Liquid biopsy test is a genetic screening method that allows to identify possible variations of cell free circulating DNA (cfDNA) in peripheral blood. Our aim; the new method of liquid biopsy test is to determine the tumor genetic characteristics which are of great importance for screening, diagnosis and treatment in lung cancer patients and to investigate the effectiveness of this test on diagnosis.

Method: Fifty lung cancer patients who were admitted to Kocaeli University Medical Faculty Medical Genetics Department between 2018-2019 were included in our study and Liquid biopsy tests were performed in these patients. The obtained data were analyzed with analysis programs.

Results: As a result of liquid biopsy test and analysis, 48,8% of the patients had EGFR and TP53, 20,9% had PIK3CA, 18,6% had MET and KRAS, 16,2% had ALK and MAP2K1, in 9,3% BRAF, in 6,9% NRAS and in 2,3% ROS1 genes variations were found. Some variations in EGFR, KRAS, NRAS and BRAF genes were evaluated as drug-related.

Conclusion: The study provides an advantage to the patient individuals in monitoring the current status of the changes in tumor genotype and the ability to detect mutations in the plasma with a liquid biopsy test. In addition, it has been determined that target gene panel analysis is a highly effective method in drug prescription for variations.

Key Words: lung cancer , cfDNA, gene, liquid biopsy

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı başkanı **Prof. Dr. Hakan SAVLI' ya**, Genetik alanında yüksek lisans şansı tanıyan, eğitimim boyunca yardım eden, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterici ve destek olan danışman hocalarım **Doç.Dr.Naci ÇİNE** ve **Dr.Öğr.Üyesi Seda EREN KESKİN'e** teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca her konuda yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tez çalışmamda büyük emeği olan **Dr. Nilüfer SERTDEMİR**, **Uzm. Biyolog Gülhan DEMİR** ve **Uzm. Biyolog Seda REKA'ya** teşekkür ederim.

Sitogenetik alanındaki bilgilerini benimle paylaşan, bu alanda çok şey öğreten **Uzm. Biyolog Buket DOĞRUOĞLU** ve **Uzm.Biyolog Zeynep İLKAY'a** ve tüm Tıbbi Genetik ailesine teşekkür ederim.

Her türlü sıkıntımı ve sevincimi paylaştığım hep yanımda olan dönem arkadaşlarım **Ayşegül ŞAHİN**, **Gülüshan UZUNER** ve **Şebnem ÖZDEMİR'e** teşekkür ederim.

Destegini her zaman yanımda hissettiğim, çok şey paylaştığım dostum **Songül AÇIKGÖZ'e** teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hep hissettiğim, beni hiç yalnız bırakmayan ve her zaman arkamda olan canım **AİLEM'e** teşekkür ederim.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

31/ 05/ 2019

MALİKE İNCE

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLGİSİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÇİZİMLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Kanser Tanımı	1
1.2. Akciğer Kanseri	2
1.2.1. Epidemiyoloji	2
1.2.2. Etiyoloji	2
1.2.3. Akciğer Kanseri Sınıflandırması	3
1.2.3.1. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri	5
1.2.3.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	6
1.2.4. Akciğer Kanserinde Evreleme	6
1.2.5. Akciğer Kanseri Moleküler Genetiği	9
1.2.5.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Genetiği	10
1.2.5.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Genetiği	10
1.2.6. Akciğer Kanserinde Tanı	14
1.2.7. Akciğer Kanserinde Tedavi	16
1.3. Likit Biyopsi	17
2.AMAÇ	21
3.YÖNTEM	22

3.1. cfDNA İzolasyonu	22
3.2. cfDNA Miktar Ölçümü	25
3.3. Likit Biyopsi	25
3.4. Kullanılan Cihazlar	38
3.5. Sarf Malzemeler	39
3.6. Kullanılan Cihazlar	39
3.7. Kullanılan Kimyasallar	40
3.8. Analiz	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR DİZİNİ	55
ÖZGEÇMİŞ	61
EKLER	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C : Santigrat

μ : Mikro

μm : Mikrometre

mL : Mililitre

rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

ADK: Adenokarsinom

ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz

BRAF: V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene

cfDNA : Serbest DNA (Circulating Cell-Free DNA)

CTC : Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (Circulating Tumor Cells)

ctDNA : Serbest Tümör DNA'sı (Circulating Tumor DNA)

DNA: Deoksiribonüleik Asit

EGFR :Epidermal Büyüme Faktörü

ERBB2: Erb-b2 Reseptör Tirozin Kinaz 2

FDG : Fluorodeoksi Glukoz

FISH: Floresans İnsitu Hibridizasyon

IASLC: The International Association For The Study Of Lung Cancer

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

KRAS: Kirsten Sıçan Sarkoma Viral Onkogen Homologu

LB: Likit Biyopsi

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MET: Mesenchymal Epithelial Transition Factor

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

NGS :Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)

NRAS: v-Ras Nöroblastom Viral Onkogen Homoloğu

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PIK3CA: Fosfoinozitol Bifosfat 3 Kinaz, Katalitik Altünite Alfa

p53: Hücrenin Ana Denetleyicilerinden Biri Olan Tümör Süpresör Proteini

ROS-1: c-Ros Oncogene 1

SIFT: Sortsİntolerant FromTolerant

TKİ: Tirozinkinaz İnhibitörü

TNF: Tümör Nekroz Faktörü

TNM: Tümör çapı, Lenf nodu, Metastaz yeri

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

WHO/DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. EGFR geni lokalizasyonu.....	11
Çizim 3.1. Ion One Touch 2 Cihaz bölümleri.....	31
Çizim 3.2. Recovery tüplerin cihaza yerleştirilmesi.....	31
Çizim 3.3. Ion One Touch Es plate.....	35
Çizim 3.4. Chip yükleme.....	38
Çizim 4.1. Hastalarda incelenen genlerde saptanan varyasyon oranı.....	42
Çizim 4.2. Genlerde saptanan varyasyon sayıları.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. DSÖ 2004 Akciğer kanseri histopatolojik sınıflandırması.....	4
Çizelge 1.2. IASLC 2017 TNM sınıflaması.....	7
Çizelge 1.3. TNM'ye göre evre grupları.....	9
Çizelge 3.1. Plazma hacmine göre cfDNA izolasyon bileşenleri.....	22
Çizelge 3.2. Kütüphane oluşturma için gerekli bileşenler.....	25
Çizelge 3.3. Thermal-Cycler döngüsü.....	26
Çizelge 3.4. DNA barkodlama için gerekli bileşenler.....	27
Çizelge 3.5. Barkodlama için Thermal-Cycler döngüsü.....	27
Çizelge 3.6. Light cycler 480 mix bileşenleri.....	30
Çizelge 3.7. Light cycler 480 reaksiyon için gerekli bileşenler.....	30
Çizelge 3.8. Light cycler 480 döngüsü.....	30
Çizelge 3.9. Amplifikasyon solüsyonu hazırlanması.....	32
Çizelge 3.10. Ion S5 reagent mix bileşenleri.....	32
Çizelge 3.11. Melt-off solüsyonu bileşenleri.....	33
Çizelge 3.12. Ion One Touch Es cihaz plate'inde bulunan bileşenler.....	35
Çizelge 3.13. ISPs'in yıkanması.....	36
Çizelge 4.1. Hastalara ait bulgular.....	41
Çizelge 4.2. Hastalarda görülen tüm varyasyonlar.....	42
Çizelge 4.3. TP53 geninde saptanan varyasyonlar.....	43
Çizelge 4.4. EGFR geninde saptanan varyasyonlar.....	44
Çizelge 4.5. MET geninde saptanan varyasyonlar.....	45
Çizelge 4.6. KRAS geninde saptanan varyasyonlar.....	45
Çizelge 4.7. ALK geninde saptanan varyasyonlar.....	45
Çizelge 4.8. MAP2K1 geninde saptanan varyasyonlar.....	46

Çizelge 4.9. BRAF geninde saptanan varyasyonlar.....46



1.GİRİŞ

1.1. Kanser Tanımı

Bir insan vücudunda var olan canlı hücreler normal yaşam döngüleri süresince büyürler ve bölünerek yeni hücreleri oluştururlar. Bu süreç vücudun bütün organlarında farklı mekanizmalar sayesinde kontrol altında gerçekleşir. Kanser, bu kontrol mekanizmasının bozulması ve hücrenin sürekli kontrolsüz bölünerek çoğalması sonucu gerçekleşir. Kanser hücreleri ilk meydana geldikleri yerlerden metastaz ile farklı bölgelere taşınabilir. Taşındıkları bölgelerde de çoğalmaya devam edebilirler. Kanser gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir hastalık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Hatipoğlu 2016).

Kanser klinik tıpta karşımıza çıkan en yaygın ve şiddetli hastalıklardan biridir. Tümör (neoplasm) ya da kitlelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize bir prosestir. Büyümesi artık kontrol altına alınamayan malign tümörler komşu dokuları istila ederek, daha uzak bölgelere metastaz yaparak ya da her ikisine birden yayılarak ilerleyebilmektedir. İstilacı olmayan ve metastaz yapmayan, köken aldıkları doku sınırları içerisinde kalan ve yavaş büyüyen tümörler benign tümör olarak adlandırılmaktadır. Kanserinin 3 temel formu vardır. Sarkomlar kemik, kas, bağ doku ve sinir sistemi gibi mezenkimal dokularda ortaya çıkmaktadır. Karsinomlar bağırsak hücre hattı, bronş ve meme kanalları gibi epitel dokulardan köken alırlar. Hematopoetik ve lenfoid neoplasmlar lenfatik sistem, periferik kan ve kemik iliği boyunca yayılım gösterirler. Bu ana grupların her birinde tümörler doku tipine, histolojik görünümüne ve malignite derecesine göre sınıflandırılırlar (Nussbaum ve diğ. 2007).

Kanser oranı ve mortalitesi dünya çapında giderek artmaktadır. Kanser artık günümüzde her yaş grubunu etkileyen bir hastalıktır. Dünya çapında kanser kaydı tutan 185 ülkede yaşa ve cinsiyete bağlı olarak 36 kanser türünün güncel tahminlerini yapan GLOBOCAN'ın yeni küresel kanser verilerine göre, 2018 yılında küresel kanser yükünün 18.1 milyon vaka ve 9.6 milyon kanser ölümüne yükseldiğini gösteriyor. Cinsiyet ayrımı gözetmeksizin en sık teşhis edilen kanser türü akciğer kanseridir (tüm vakaların %11.6'sı). Akciğer kanserini meme kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser takip etmektedir(Bray ve diğ. 2018).

Türkiye 2015 kanser verileri, Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmiş ülkeler ile kıyaslandığında kanser oranının hem erkeklerde hem de kadınlarda daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir. Türkiye’de 2015 yılında yaşa standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde yüz binde 247,6 kadınlarda ise yüz binde 177,5’tir. Total kanser oranı ise yüz binde 212,6’dır. Türkiye’de toplam 167.463 kişiye yeni kanser tanısı konulmuştur. Son 5 yılın verileri göz önüne alındığında; erkeklerde istatistiksel olarak kanser sıklığında bir azalma olduğu görülürken, kadınlarda herhangi bir değişimin olmadığı görülmektedir.

1.2. Akciğer Kanseri

1.2.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri, dünya çapında meydana gelen kanser ilişkili ölümlerin başlıca nedenidir. 20. yüzyıl başlarında nadir olarak görülürken, 1950 yılından beri sıklığı belirgin bir şekilde artan, günümüzde hem kadınlarda hem de erkeklerde görülen en sık kanser türüdür (Loeb ve diğ. 1984). Akciğer kanseri bütün dünya çapında her geçen yıl tahmini olarak 1.2 milyon yeni vakanın ortaya çıktığı en önemli kanser türlerinden biridir. Her geçen gün insidansı ve mortalitesi artmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde her sene 200.000 yeni akciğer kanseri olgusu tanı almaktadır. Ülkemizde erkeklerde en fazla gözlenen kanser türü akciğer kanseridir Kadınlarda ise tüm yaş grupları ve kanser türleri göz önüne alındığında akciğer kanseri, meme kanserinden sonra gelmektedir (Ulas ve diğ. 2015).

Akciğer ve meme kanserleri yeni oluşan vaka sayısı bakımından dünya çapında lider kanser türleridir. Her iki türün 2018 yılında yaklaşık 2.1 milyon tanıya ve total kanser yükünün yaklaşık %11.6’sına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Akciğer kanseri kötü prognoz nedeniyle 1.8 milyondan sorumlu olan türdür (toplam ölümün %18.4’ü)(<https://www.who.int/cancer/en/>).

1.2.2. Etiyoloji

Akciğer kanseri etiyojisinde birden fazla faktör rol oynar. Bunlar sigara kullanımı, mesleki karsinojen maruziyetleri gibi çevresel faktörlerin yanı sıra genetik, diyet, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, hava kirliliği ve immünolojik faktörlerdir. Sigara kullanımı akciğer kanseri oluşumundan sorumlu en önemli faktördür. Vakaların %90’dan fazlasından sorumludur.

Çeşitli organik ve inorganik maddeler ile maruziyetin artması, akciğer kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu mesleki karsinojenler arasında, arsenik, nikel, kadmiyum, krom, radyasyon, demir-çelik, asbest, berilyum, silika, formaldehid sayılabilir (Alberg ve diğ. 2005).

Epidemiyolojik veriler diyette eksik A vitamini, C vitamini ve beta-karoten alımının akciğer kanseri riskini arttırdığını ortaya koymuştur. Bol miktarda anti-oksidan içerikli besin tüketimi ise akciğer kanserine karşı koruyucu bir rol oynamaktadır. Bu etkinliğin tam olarak hangi mekanizmayla olduğu bilinmemekle birlikte anti-oksidan içerikli besinlerin DNA hasarını azaltmakta olduğuna dair bilgiler vardır. Diğer kanser türlerine yönelik radyoterapi alan hastalarda ikincil olarak akciğer kanseri görülme riski artmıştır. Bu risk artışı meme kanseri ve Hodgkin lenfomada gösterilmiştir (Alberg ve diğ. 2007).

Sigaraya maruz kalan her hastada akciğer kanseri gelişmemesi karsinojenlere karşı savunma mekanizmalarında bireysel farklılıklar olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda ailede akciğer kanseri öyküsünün varlığı güçlü bir risk faktörü olduğunu göstermiş ve genetik bir yatkınlık olabileceğini öne sürmüştür. Bu genetik farklılıklar karsinojen metabolizması ve aktivasyonunda, ayrıca DNA onarım mekanizmasında meydana gelebilir. Ailede akciğer kanseri öyküsü bulunması ve bununla birlikte sigara kullanımının akciğer kanseri riskini 30 kat arttırdığına dair bulgular saptanmıştır (Dündar 2015).

1.2.3. Akciğer Kanseri Sınıflandırması

Akciğer kanserinin histolojik verilere göre sınıflandırılmasını, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2011 yılında güncellemiştir. Tümörün büyüme hızı, yayılımı, metastazın zamanlanması, kemoterapi ve radyoterapiye yanıt gibi parametrelere bakarak gruplandırmıştır (Ergelen ve Çimşit 2013).

Akciğer karsinomları 2 ana başlık altında toplanabilir. Küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDK) ve küçük hücre akciğer kanseri (KHAK)'dir. Olguların %83,2'sini KHDK, %16,8'ini KHAK oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre birincil akciğer kanseri dört ana histolojik tipten oluşmaktadır. Akciğer kanseri olgularının % 95'inden fazlasını oluşturan bu dört ana tip görülme sıklıkları ile birlikte şu şekildedir: adenokarsinom (%38), skuamoz (yassı) hücreli karsinom (%20), büyük hücreli karsinom

(%5), küçük hücreli karsinom (%13) ve diğer küçük hücre dışı akciğer karsinomları (%18) şeklinde gruplandırılabilir. (Çizelge 1.1.)

Çizelge 1.1. DSÖ 2004 Akciğer Kanseri Histopatolojik Sınıflandırması

Küçük Hücreli Karsinom
Kombine küçük hücreli karsinom
Skuamöz Hücreli Karsinom
Berrak hücreli Küçük hücreli Papiller Baseloid
Adenokarsinom
Adenokarsinom, mikst subtip Asiner adenokarsinom Papiller adenokarsinom Bronkoalveolar karsinom Musinöz Nonmusinoz Mikst Musin salgılatan solid adenokarsinom Fetal Kolloid Musinöz kistadenokarsinom Taşlı yüzük hücreli adenokarsinom Berrak hücreli adenokarsinom
Büyük Hücreli Karsinom
Büyük hücreli nöroendokrin karsinom Büyük hücreli kombine nöroendokrin karsinom Bazaloid karsinom Lenfoepidelyoma benzeri karsinom Berrak hücreli karsinom Rabdoid fenotipinde büyük hücreli karsinom
Adenoskuamöz Karsinom
Sarkomatoid Karsinom
Plemorfik karsinom İğ hücreli karsinom Dev hücreli karsinom Karsinosarkom Pulmoner blastom
Karsinoid Tümör
Tipik karsinoid

Atipik karsinoid
Tükrük Bezi Tipindeki Karsinomlar
Mukoepidermoid karsinom Adeoid kistik karsinom Epitelyal-miyoepitelyal karsinom
Preinvaziv Lezyonlar
Skumöz hücreli insitu karsinom Atipik adenomatöz hiperplazi Diffuz idiyopatik pulmoner noroendokrin hücre hiperplazi

Adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinom ise küçük hücre dışı karsinom (KHDK) olarak bilinmektedirler. Bu karsinom tiplerinin tek bir başlıkta toplanmasının amacı seyirleri ve tedavi yaklaşımlarının benzer olmasıdır. Bu şekilde küçük hücreli akciğer kanserinden (KHAK) bariz bir şekilde ayrılmaktadırlar (Devesa ve diğ. 2005).

1.2.3.1. Küçük hücre dışı akciğer kanserleri (KHDK)

Adenokarsinom (ADK): Adenokarsinom, çoğu ülkede akciğer kanserinin baskın bir histolojik alt tipidir. Erkeklerde en sık görülen akciğer kanseri tipidir (Brombilla ve diğ. 2001). Genellikle sigara öyküsü bulunmayan kişilerde, kimi zaman skar doku zemininde gelişen bu tümör, terminal bronşiyol epitelinde köken alır. Tümör histopatolojik olarak genellikle karmaşık heterojen bir yapıya sahiptir. İnvaziv özellik göstermektedir (Yener ve Apa 2014). Cinsiyet ayrımı olmaksızın her iki cinsten de görülür. Sıklığı her geçen yıl artmaktadır. Periferik olduklarından metastatik adenokanser ayrımı yapmak oldukça zordur. Bronkoalveoler tipte %40-50 oranında mütin sekresyonu mevcuttur.

Skumöz (yassı) Hücreli Karsinom: Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülen sigara kullanımıyla ilgili olan tümör türüdür. Sıklıkla büyük bronşların merkezinden köken almakta ve bölgesel hiler lenf nodlarına kolaylıkla yayılım göstermektedir. Periferik yerleşimli lezyonlar çoğunlukla skar ile birliktelik gösterir. Toraks dışına diğer hücre tiplerine oranla daha geç yayılır. Histolojik olarak bu tümörler iyi diferansiye tipten, minimal skuamöz özellik gösteren indiferansiye tipe kadar değişiklik gösterebilmektedir. Prognozu diğer kanser türlerine göre daha iyidir.

Büyük Hücreli Karsinom: Bu tipte olan akciğer kanseri, sitolojik farklılaşma göstermeyen, yassı veya grandüler kanserlerin herhangi bir grubuna dahil olamayacak

kadar farklılaşmamış bir formudur. Çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Bu kanser tipi bazen köken aldığı ata hücrelerine benzemeyen kötü, büyük bir hücre kitlesinden oluşur. Erken evrede uzak bölgelere metastaz yapma özellikleri vardır (Robbins 1995).

1.2.3.2. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK):

Erkelerde kadınlara oranla daha çok görülen, sigara kullanımıyla ilişkili bir kanser türüdür. Kanama ve nekroz sıklıkla görülür. KHAK hızlı ilerler. Çoğunlukla merkezi bir bronştan kaynaklanır. Akciğer karsinomları içinde köken aldığı yer hakkında sıklıkla tartışılan kanser tipidir. Nöron Spesifik Enolaz (NSE), hücrelerde nörofilamentlerin varlığının gösterilmesi, serotonin, bombesin gibi nöroendokrinlerin peptid hormonlarının var olması bu tümör tipinin nöroendokrin hücrelerinden köken aldığını işaret etmektedir (Warren ve diğ. 1989).

1.2.4. Akciğer Kanseri Evreleme

Akciğer kanseri tanısı konulduktan sonraki adım uygun bir şekilde evreleme yapılmasıdır. Evreleme yapılırken kullan standardize sistem T-N-M (tümör-nodül-metastaz) sistemidir. Vakanın tanı aldıktan sonraki klinik, radyolojik, brongoskopik olarak yapılan evrelemesi klinik (kTNM) evreleme, cerrahi koşullar altındaki evrelemesi cerrahi (cTNM) evreleme, cerrahi işlem sonucuna bakılarak dokuların histopatolojik değerlendirmelerinin ardından yapılan evreleme, patolojik evreleme (pTNM) olarak bilinmektedir. Evreleme toraks içi ve toraks dışı olmak üzere iki şekilde yapılır. Toraks dışı evreleme uzak metastaz araştırılması yapılmasıdır. Akciğer kanserinin klinik evrelemesi yapılırken mümkün olduğunca az invaziv yol ile hastalığın yayılımının belirlenmesi hedeflenir (Canbaz 2011).

Akciğer kanseri ile mücadele edilirken, diğer organların malignitelerinde olduğu gibi, akciğer kanserinin evrelemesinde anatomik yapıya ve hastalığın ilerleyişine paralel olarak bir tümör boyutu, lenf nodu yayılımı ve metastaz (TNM) durumunu içeren uluslararası standart kabul edilecek bir evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda çalışan Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırma Birliği (IASLC), Uluslararası Kanser Karşıtları Birliği (IUAC) ve Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) düzenli bir şekilde her yıl hasta popülasyonlarını içeren verileri toplayarak, doğru bir evreleme için önerilerini sunmaktadır. Türkiye’de de IASLC’nin sunduğu evreleme sistemi

kullanılmaktadır. 2009 yılından bu yana yedinci evreleme sistemi kullanılıyorken, 2017 Ocak ayında IASLC tarafından sekizinci evreleme sistemi yayınlanmıştır (IASLC 2018).

IASLC tarafından yapılan sekizinci TNM evrelemesi Çizelge 1.2. ve Çizelge 1.3.'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. IASLC 2017 TNM Sınıflaması

PRİMER TÜMÖR (T)	BÖLGESEL LENF NODLARI (N)	METASTAZ PARAMETRESİ (M)
TX: Primer tümör değerlendirilemiyor veya balgam sitolojisi ile bronşiyal lavajlarında malign hücre pozitif olmasına rağmen görüntüleme yöntemleri ve bronkoskopide görülüyor.	NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.	M: Uzak metastaz
T0: Primer tümöre rastlanmadı.	N0: Bölgesel lenf nodu metastazı değerlendirilemiyor.	M0: Uzak metastaz yok
Tis: Karsinoma in situ	N1: Tümörle aynı taraf peribronşiyal ve hiler lenf nodları ve intrapulmoner lenf nodlarına metastaz/direk invazyon	M1: Uzak metastaz mevcut M1a: Tümörün karşı tarafındaki akciğerde ek nodül, taraftan bağımsız plevral nodül, malign plevral ve/veya perikardiyal efüzyon M1b: Ekstratorasik tek metastaz M1c: Ekstratorasik bir veya daha fazla organda çoklu metastaz
T1: Tümörün en geniş çapı 3 cm veya daha küçük, akciğer dokusu veya viseral plevra ile tamamen sarılı, bronkoskopik incelemesinde lobar bronş proksimaline invazyonu yoktur. T1a mi Minimal invaziv adenokarsinom T1a Tümör geniş çapı ≤ 1 T1b Tümör geniş çapı $1 < \text{çap} < 2$ T1c Tümör geniş çapı $2 < \text{çap} < 3$	N2: Tümörle aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarına metastaz	
T2: Tümörün en geniş çapı 3 santimden büyük fakat 5	N3: Tümörün karşı tarafında	

<p>santimden büyük değildir. -Karinaya olan uzaklığına bakılmaksızın ana bronş invazyonu mevcut, karina tutulumu yoktur. -Viseral plevra invazyonu -Akciğerin bir kısmı veya bütün akciğerde, hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni T2a Tümörün geniş çapı 3<çap<4 T2b Tümör geniş çapı 4<çap<5</p>	<p>mediastinal, hiler lenf nodları, veya herhangi bir skalen veya supraklavikuler lenf nodlarına metastaz</p>	
<p>T3: Tümörün en geniş çapı 5 cm'den büyük, fakat 7 cm'den büyük değildir veya aşağıdaki yapılardan birine direk invazyonu mevcut; -Göğüs duvarı -Frenik sinir -Parietal plevradan herhangi birine direk invazyon -Tümörle aynı lobda ek nodül</p>		
<p>T4: Tümörün en geniş çapı 7 cm'den büyüktür veya aşağıdakilerden birine direk invazyon mevcuttur; -Mediasten -Kalp -Büyük Damarlar -Trekea -Özefagus -Vertebra -Diyafragma -Karina -Rekürren laringeal sinir -Tümörle aynı taraf, ayrı lobda ek nodül</p>		

Çizelge 1.3. TNM'ye Göre Evre Grupları (Çok. G 2018)

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

1.2.5. Akciğer Kanseri Moleküler Genetiği

Onkogenlerde mutasyon sonucu meydana gelen aktivasyon, tümör baskılayıcı genlerde mutasyona bağlı inaktivasyon, hücre döngüsü düzenlenmesi ve DNA hasar-onarımında rol oynayan genlerde meydana gelen değişiklikler, akciğer kanserinde görülen temel moleküler değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kanselerde meydana gelen genetik değişimler kromozomal seviyede ya da tek bir nükleotid dizisindeki değişimlerden kaynaklanabilmektedir. Kanser hücresinde büyüme ve çoğalma sürecinde oluşan onkogenler, tümör süpressör genlerde oluşan genetik değişimler enzim polimorfizmi gibi etkenler ve anjiyogenez, invazyon, metastaz gibi tümör ile yerleştiği doku arasındaki etkileşim sonucunda tümöral kitle oluşmaktadır (Savaş 1995).

1.2.5.1. Küçük hücreli akciğer kanseri genetiği

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) bütün akciğer kanserlerinin %15'ini oluşturmaktadır. Erken evrede metastaz görülmesi ve başlangıçta kemoterapiye yanıt göstermesi sonrasında nüks etmesi bu tipin klinik özelliğidir. KHAK her yıl akciğer kanseri ölümlerinin %25'inden sorumludur (Sher ve diğ. 2008). KHAK'de 3p,4p,5q,16q,13q ve 17p delesyonları ile 3q, 5p, 8q, 19q ve Xq kazançları tümör yapısında en çok karşılaşılan kromozomal anomalilerdir. %90'ından fazlasında 3p delesyonları sıklıkla bulunmaktadır. Tümör süpressör genlerindeki değişikliklerinden dolayı 4 gen dikkat çekmektedir. İlki FHIT (fragile histidin triad geni) diadenozin trifosfat hidrolaz enzimini kodlar ve apoptoz, hücre döngüsü kontrolünde sekonder rol oynadığı düşünülmektedir.

İkincisi RASSF1 genidir. Mikrotübül bağlayıcı proteini kodlamaktadır. RASSF1 geni işlev kaybı tümör hücrelerinin hızla büyümesine neden olur. Üçüncüsü RARB (retinoic acid reseptör beta) tümör süpressör genidir. İşlevi aktivatör 1 protein aktivasyonunu engellemek ve apoptozu başlatmaktır. Tümörögenезisin baskılanmasında ve epitel hücrelerin büyümesinin düzenlenmesinde rol oynar. KHAK'de bu gende ekspresyon kaybı mevcuttur. Dördüncüsü yine bir tümör süpressör gen olan FUS1 (fused in sarcoma) genidir. Overekspresyonu hücre döngüsü G1 fazında durmaya neden olur.

TP53 geni ve RB1 geni mutasyonları KHAK'de %90 civarında görülen diğer genetik değişimlerdir. TP53 geni mutasyonları delesyon ya da nokta mutasyonlarıdır. Mutant P53 proteinleri onkojenik özellik göstererek hücre büyümesi düzenlenmesinin bozulmasına, invazyona ve metastaza yol açar. RB1 geni inaktivasyonu küçük hücreli akciğer kanserinde oldukça yaygındır.

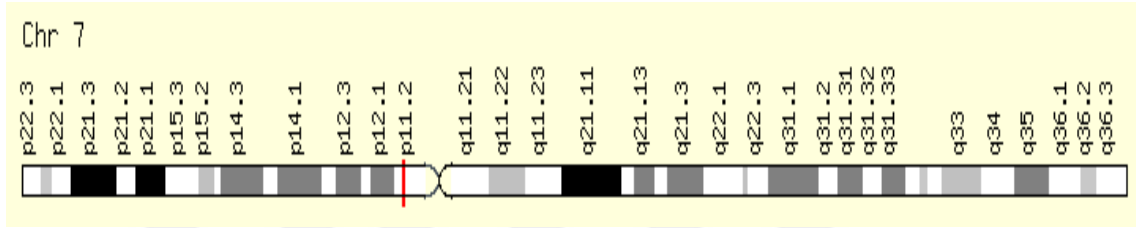
Daha az sıklıkta PTEN, PIK3CA, EGFR ve K-RAS mutasyonları ve olguların %20'sinde de MYC amplifikasyonu olduğu bilinmektedir (Ekinci 2014).

1.2.5.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri genetiği

Hücrenin çoğalması ve sağ kalımında önemli rol oynayan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar driver mutasyon olarak adlandırılır. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin %50'sinde EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PIK3A, ALK, MEK1, ROS1 genlerinde somatik mutasyonlar mevcuttur (Sequist ve diğ. 2011).

- **EGFR Mutasyonu**

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), hücrenin proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen sinyal iletim yollarının kontrolünün sağlanmasında hücre yüzey reseptörü olarak görev yapan tirozin kinazların ErbB ailesinin bir üyesidir. Bu transmembran reseptörler hücre yüzeyinde monomer halinde bulunurlar. Bu reseptörler hücre yüzeyine bir ligand bağlandığında aktive olurlar. EGFR ligandları olarak bilinenler; epidermal büyüme faktörü (EGF), epiregulin ve transforma edici büyüme faktörü alfa'dır. Hücre dinlenme durumundayken EGFR bloke haldedir (Pauwels 2012).



Çizim 1.1. EGFR Geni Lokalizasyonu (genecards.com)

EGFR, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi temel biyolojik olayları kontrol etmekte ve birçok sinyal iletim yollarını düzenlemektedir. EGFR sinyal yollarındaki düzensizlikler kanserle ilişkilendirilmektedir (Çalışkan 2015). EGFR hem normal hücre proliferasyonu hem de malign forma dönüşme ile ilişkili tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir transmembran glikoproteinidir. KHKDAK'lerin %13-80'inde EGFR genlerinde mutasyonlar oluşmaktadır (Zhang ve diğ. 2008).

EGFR geni 7.kromozomda lokalizedir. EGFR geninde meydana gelen somatik mutasyonlar ekzon 18, 19, 20 ve 21'de olmaktadır. Ekzon 19 ve 21'de oluşan somatik mutasyonlar EGFR mutasyonlarının %80'inden fazlasından sorumludur. Ekzon 19'da meydana gelen delesyon ile lösin-arjinin-glutamat-alanin yapısı ortadan kalkar. Ekzon 21 mutasyonu L858R nokta mutasyonu sonucunda timin-guanin transversiyonu arjinin yerine lösin geçmesi ile oluşur. Ekzon 20 mutasyonu ise 790. pozisyonunda bulunan treonin yerine metionin geçmesi sonucu T790M mutasyonudur. Ekzon 19 ve 21 mutasyonları iyi prognoz ile ilişkilendirilirken ekzon 20 mutasyonu direnç ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Ünal 2012).

Aktivasyon başlatıcı mutasyonlar reseptörün katalitik bölgesinin yapısını değiştirerek sürekli kinaz aktivitesine neden olur. Bu yapısal değişiklik EGFR tirozin kinaz inhiitörleri (TKİ) için bağlanma bölgesi oluşturur. Bunun sonucu olarak bu mutasyonlar TKİ'ne hassas

ve onlarla korele özellik göstermektedir. KHDAK hastalarının %40-80'inde EGFR overekspresyonu mevcuttur. EGFR'yi hedef alan küçük moleküllü terapötik ajanlar gefitinib, erlotinib ve afatinibdir. Bu TKI'ler, tirozin kinazların otofosforilasyonunu ve ATP bağlanmasını geri dönüşümlü olarak bloke ederler. Bu şekilde sinyal iletimi engellenmiş olur.

Gefitinib, icotinib ve erlotinib EGFR'yi hedef alan birinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleridir. Afatinib, dacomitinib ve neratinib ise hem EGFR hem de HER2 inaktivasyonunu hedef alan tirozin kinaz inhibitörüdür (Ekinci 2014).

- **TP53 Mutasyonu**

İnsan kanser türlerinde en fazla bulunan genidir. 17. kromozomun 17p13 bölgesinde lokalizedir (Tchia ve diğ.1991). Birçok kanser türünde p53 geninin kaybı söz konusudur. Hücre radyasyona veya karsinojen etkenlere maruz kaldığında p53 geni p53 proteinini sentezler. p53 proteini hücre çekirdeğinde birikmeye başlar. Bunun sonucu olarak bir siklin bağımlı kinaz kodlanır ve hücrenin S fazına geçmesi engellenir. Hücre G1 fazında beklerken DNA'daki hasarlar onarılmaya çalışılır. P53 tümör baskılayıcı geni birçok kanser türünde mutasyona uğramış haldedir. (Maeda ve diğ. 2008).

- **KRAS Mutasyonu**

KRAS geni Ras gen ailesinin bir üyesi olup, 12.kromozomun 12p12.1 bölgesinde lokalize durumdadır ve 6 ekzondan oluşmaktadır. KRAS geninin alternatif splicingi sonucu KRAS4A ve KRAS4B olmak üzere iki izoformu oluşur. Bir GTPaz olan K-ras proteini, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi bir çok biyolojik olayda görev alır.

KHDAK vakalarının %20-30'unda KRAS gen mutasyonu meydana gelmektedir. Nokta mutasyonlar bu gene ait spesifik bölgelerde oluşur. Çoğunlukla ekzon 1'deki 12. ve 13. kodonda, nadir olarak da ekzon 2'deki 59. ve 61. kodonda oluşur. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde KRAS mutasyonlarının %95'ten fazlası kodon 12 ve 13'te, %80-90'ının ise sadece kodon 12'de meydana geldiği bilinmektedir. Kodon 12 için en sık rastlanan değişim G-T transversiyonudur. KRAS geninde meydana gelen nokta mutasyon neticesinde eksprese olan K-ras proteininin şekli değişir ve protein normal olmayan şekilde GTPaz aktivitesi gösterir. Bunun sonucu olarak sürekli aktif olan protein durmaksızın hücre çoğalmasını uyarır. KRAS mutasyonuna sahip hastaların EGFR mutasyonuna sahip

hastalara göre hayatta kalım sürelerinin daha kısa olduğu belirtilmektedir. KRAS gen mutasyonuna sahip hastaların erlotinib ve gefitinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç gösterdikleri bilinmektedir. Bu mutasyonun varlığının saptanması hedeflenen tedavi açısından yol gösterici olarak (Krypuy ve diğ.2008 , Pao ve diğ. 2007).

- **HER2 Mutasyonu**

EGFR ailesinin üyesi olan bir onkogendir. Bir çeşit tirozin kinaz reseptörü kodlar ve hücre çoğalmasını düzenlemektedir. HER2 mutasyonları küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin %1-4'ünde bulunur. HER2'de meydana gelen mutasyonlar ekzon 20'de oluşan insersiyonlardır ve tirozin kinaz bölgesine karşılık gelmektedir. HER2 mutasyonu tirozin kinazın sürekli aktivasyonuna yol açar ve sürekli olarak hücre çoğalmasını indükler. KHDAK hatalarında HER2 ekspresyonu artmış durumdadır. KRAS ve EGFR mutasyonları ile birlikte bulunmadığı bilinmektedir (Ekinci 2014).

- **PIK3CA Mutasyonu**

21 ekzon içeren fosfatidil inozitol kinaz (PI3K)'ın katalitik alt ünitesini kodlayan bir genidir. Büyüme faktörleri tarafından uyarılan reseptör, tirozin kinazların aktive ettiği hücre işlevlerini düzenleyen hücre sinyal yollarında görev alan sekonder mesajcı PIP3'ü üretir. Akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde bu gene ait gen amplifikasyonları, delesyonları ve daha sıklıkla yanlış anlamlı mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlar aktif AKT sinyal iletimi ve artmış onkojenik aktiviteye sebep olmaktadır. Sürekli aktif PI3K/Akt sinyal yolağına neden olan PIK3CA mutasyonları EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine karşı gelişen ilaç direnci ile ilişkisinin olduğu düşünülmektedir (Çalışkan 2015).

- **BRAF Mutasyonu**

BRAF geni 7.kromozomun q34 bölgesinde bulunur. Bu gen 18 kodon ile 766 aminoasit uzunluğunda BRAF proteinini kodlar. BRAF sitoplazmik bir serin treonin protein kinazdır. KRAS sinyal yolağının alt ünitelerini aktive eder. Hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında ve transkripsiyonel faaliyetlerinde görev alır (Leicht ve diğ. 2007).

KHDAK olgularının yaklaşık %3'ünde BRAF aktive edici mutasyonları bulunur (Thomas ve diğ. 2013). BRAF mutasyonları kinaz aktivasyonunda artışa sebep olur ve çoğunlukla adenokanser histopatolojisinde ve sigara içmeyenlerde görülür. EGFR ve KRAS driver mutasyonları ile birlikte görülmez. En fazla görülen V600E ekzon 15 tarafından kodlanan aktive edici mutasyondur ve olguların %50'sinde görülür. Olguların %39'unda ekzon 11 tarafından kodlanan G-loop bölgesinde oluşan G469A ve %11'inde ekzon 15 tarafından kodlanan D594G mutasyonu bulunur (Zhang ve diğ. 2010).

- **ALK Mutasyonu**

ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) geni 2.kromozomun 23p bölgesinde bulunur. 29 ekzon ile 1620 aminoasit uzunluğunda transmembran ALK reseptör tirozin kinaz proteinini kodlar. ALK insulin reseptör tirozin kinaz alt ailesinin bir üyesidir. Hücrenin apoptoz inhibisyonunda ve hücre çoğalmasında görev alır (Amin ve Lai 2007). Olguların yaklaşık %3-7'sinde ALK yeniden düzenlenmesi görülür. Füzyonlar ALK kinaz bölgesinin tamamını bulundururken füzyon eşi ALK'nın dimer oluşumuna katkı sağlar ve kinaz aktivitesinin otonomi kazanmasına yol açar. ALK'nın en sık görülen füzyon eşi EML4'tür. EML4 ile ALK'nın en az 15 farklı füzyon varyantı bulunmuştur ancak klinik önemi henüz bilinmediğinden daha fazla inceleme gerektirir. ALK füzyonu olan kanserlerin, ALK kinaz aktivitesine bağımlı olması sebebi ile ALK tirozin kinaz inhibisyonuna karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir (Choi ve diğ. 2008).

- **ROS1 Mutasyonu**

ROS1 geni, 6.kromozomun q22.1 bölgesinde bulunur. 43 ekzon ile ROS1 integral membran proteinini kodlar. MAPK ve PI3K-Akt yollarını aktive eder. Hücre büyümesinde ve çoğalmasında görev alır (Zhang ve diğ. 2010). ROS1 yeniden düzenlenmesi olguların %2'sinde bulunur.ROS1 füzyonu EGFR, ALK ve KRAS gibi driver mutasyonlarla birlikte bulunmaz. ROS1'in birden fazla füzyon eşi bulunmuştur. Bu füzyon eşleri ROS1 füzyonunun dimerleşmesinde rol oynar ve ROS1'in otonomi kazanmasına neden oldukları bilinmektedir. ALK/MET/ROS1 tirozin kinaz inhibitörü crizotinib'in ROS1 pozitif hücre hatlarında etkili olduğu gösterilmiş ve ileri evre ROS1 pozitif KHDAK hastalarında yanıt verdiği görülmüştür(Thomas ve diğ. 2013) .

1.2.6. Akciğer Kanseri Tanı

Akciğer kanseri tanısının noninvaziv olarak değerlendirilmesinde toraks BT, MRG, endoskopik ultrasonografi(EUS) ve PET-BT kullanılmaktadır.

Bilgisayarlı Toraks Tomografisi: Toraks BT akciğer kanserlerinin evrelemesinde ve tanı konulmasında kullanılan standart yöntemdir. Toraks içerisindeki tümörün bölgesini, büyüklüğünü ve anatomik yapı ile bağlantısını gösterebilmektedir (Vesselle ve diğ. 2002).

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG): MRG iyonize radyasyon içermeyen ve her düzlemde görüntüleme yapma özelliğine sahip bir tekniktir. İkincil görüntüleme yöntemi

olarak akciğer kanserlerinin değerlendirilmesinde kullanılır (Heelan ve diğ. 1989). BT'ye göre damarsal yapı ile lenf nodları ayrımı daha iyidir. BT ve MRG gibi tümörün anatomik yapısını gösteren teknikler ile kitlelerin malign veya benign olduğunun anlaşılması zordur.

Endoskopik Ultrasonografi (EUS): Bu teknik ile genellikle sol alt paratrakeal, aortikopulmoner pencere, subkarinal, paraözefagiyal, pulmoner ligament lenf nodları ve sol adrenal gland metastazları değerlendirilir. BT'ye göre malign lenf nodlarını saptama oranı daha iyidir ve yanlış pozitiflik oranı daha azdır (Kramer ve diğ. 2003).

Pozitron Emisyon Tomografisi Bilgisayarlı Tomografi (PET-BT): Son yıllarda akciğer kanseri tanısında kullanımı gittikçe yaygınlaşan bir yöntemdir. Glikoz tüketiminin çok olduğu alanların belirlenmesine dayanır. Beyin, kalp kasları, böbrek ve nispeten mesane dışındaki bölgelerde glikoz birikimi o bölgede güçlü bir inflamatuvar reaksiyonunun varlığını gösterir. Böylece radyoaktif işaretli glikoz vücuda verilerek birikimin fazla olduğu bölgeler belirlenir. Radyoaktif işaretleyici olarak da çoğunlukla flor-18 ile işaretli 2-deoksi 2-floro-de-glikoz (FDG) kullanılır. Vücudun herhangi bir bölgesindeki FDG tutulum değeri standart uptake value (SUV) olarak ifade edilir. Tümör hücreleri de doğası gereği yüksek glikoz tüketimine sahiptir. SUV değeri ne kadar yüksek olursa tümörün malignitesi o kadar artar (Lardinois ve diğ. 2003).

PET'in değerlendirilmesinin BT ile birlikte yapılması önerilir. Tek başına PET metabolik görüntülemeyi sağlar. Bu görüntülemenin olduğu bölgenin morfolojik olarak da aynı anda analizi gereklidir. Bu yüzden PET-BT'nin birlikte kullanımı daha doğru bilgi vermektedir (Goldsmith ve diğ. 2004).

Akciğer kanseri tanısında kullanılan invaziv yöntemler:

Bronkoskopi: Akciğer kanseri şüphesi bulunan hastalarda tanı, evreleme, tedavi ve tedaviyi izleme amaçlı kullanılan bir yöntemdir. Bronkoskopi ile saptanan kitle türüne göre bronş biyopsisi, transbronşiyal biyopsi, bronşiyal fırçalama, bronş lavajı, transbronşiyal iğne aspirasyonu, bronkoalveolar lavaj yapılabilmektedir (Kayacan ve Bedir 2009).

Plevral Sıvı Aspirasyonu/Plevral Biyopsi: Adenokanserlerde sitolojik olarak tanı konulması diğer kanser türlerine göre daha yüksektir. Plevra biyopsisinin sitolojik tanı değeri %60-75'tir (Özlu 2009).

Mediastinoskopi/ Anterior Mediastinotomi: Anterior mediasten tümörleri ve genellikle aortikopulmoner pencerede var olan lenf bezlerinin incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir.

Lenf Bezi Biyopsisi: Supraklavikular bölge ve servikal bölge gibi alanlarda ele gelen lenf bezi varlığında uygulanan bir yöntemdir. Lenf nodunun malign olarak tespit edilmesi ameliyat edilemez bir durumdur.

Torakotomi: Erken evre vakalarda, diğer tanı yöntemleri ile tanı konulamadığı durumlarda hastanın rezeksiyon durumu da varsa torakotomi yapılır.

Transtorasik İnce İğne Aspirasyonu: BT ya da USG ile birlikte deri geçişli olarak uygulanmaktadır. Akciğerlerde malignite şüpheli kitle, nodül ve sertleşmenin olduğu dokuların tanısında ve mediastinal kitlelerin tanısında kullanılır (Ak 2010).

1.2.7.Akciğer Kanserinde Tedavi

Küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) tedavisi evrelere göre aşağıdaki gibidir.

TXN0M0 ve yüzeysel tümörlerde tedavi, yayılım derinliği 3 mm'yi ve uzunluğu 1 cm'yi geçmeyen tümör saptanan vakalarda öngörülen tedavi şekli cerrahidir. Cerrahi işlem mümkün olmayan vakalarda ise ek tedavi seçenekleri şu şekildedir; brakiterapi, argon plazma koagülasyon, fotodinamik tedavi, elektrokoter ve kriyoterapi.

Evre IA ve IB tümörlerin tedavisindeki standart yaklaşım, tümörün bulunduğu akciğer dokusu ile birlikte cerrahi olarak çıkarılması ve hiler, mediastinal lenf bezi diseksiyonu ile total rezeksiyonudur. Hiler ve mediastinal lenf bezi diseksiyonu rutin bir şekilde olmalıdır. (Keller ve diğ. 2000).

Evre IIA (N1) ve IIB (N1) tedavisinde, cerrahi operasyon ile tümörün total olarak çıkarılmasıdır. Hiler ve mediastinal lenf bezi çıkarılması rutin olarak yapılmalıdır (Scagliotti ve diğ. 2003).

Evre IIIA'da tedavi, göğüs duvarı, mediastinal plevra, pariyetal perikard, mediastinal yağ dokusu ve ana bronş etkilenmesi nedeniyle T3 (N1) vakalarda tümörün cerrahi olarak total çıkarılmasıdır. Neoadjuvant kemoterapiye cevap alınmış ve cerrahi olarak çıkarılmış olgularda aynı protokolle adjuvant olarak tedaviye 2-3 kür daha devam edilmelidir (Depierre ve diğ. 2002).

Evre IIIB tedavisi, cerrahi olarak çıkarılma potansiyeli olan T4 N0-1 M0 vakalarda 2-3 kür sisplatin bazlı sistemik indüksiyon kemoterapi uygulandıktan sonra, primer tümör boyutunda küçülme varsa cerrahi operasyon durumu tekrar gözden geçirilir. Bir değişme yoksa ya da tümör boyutunda ilerleme varsa radikal torasik radyoterapi ya da kemoradyoterapi uygulanmaya başlanır.

Evre IV tedavisi, temel tedavi şekli sisplatin bazlı kombine kemoterapidir. Fakat kemoterapi uygulanmasındaki amaç bulgunun kontrolü ile ilerlemeyen sağkalım ve genel olarak sağkalımda uzama elde etmeyi sağlamaktır (Soria ve diğ. 2001). Tam veya kısmi cevap alınan, yaşam kalitesi sabit stabil hastalıkta 2 kür daha kemoterapi verilir. Her kemoterapi sonrası tümör boyutunda küçülme olan hastalarda kemoterapi 6 küre tamamlanır (Patchel ve diğ. 1990).

1.3. Likit Biyopsi

Kanda dolaşan tümörler (CTC) ile ilgili ilk rapor 1869 yılında Avustralyalı bir hekim tarafından, hastasının ölümünden sonra hastanın kanında tümör hücrelerine benzer hücrelere rastlamasıyla oluşturulmuştur (Ashworth 1869). 1945-1955 yılları arasında bu konu çok fazla ilgi gördü ve bu konuyla ilgili pek çok makale yayınlandı (Engel 1955)(Christopherson 1965). Son yıllarda kanda serbest dolaşan DNA (cfDNA)'lar ve dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC) analizleri, tespiti ve moleküler karakterizasyonları yeni biyobelirteçler olarak ilgi görmüştür. Şu anda hem temel bilimlerin hem de klinik bilimlerin araştırma konusu olmuştur (Ranuncolo 2016).

Likit biyopsi terimi, periferik kandan elde edilen serbest dolaşan DNA'lar ile tümör hücresi DNA'larını kapsamaktadır. Somatik hücreler çevresel etkiler veya genetik faktörlerin etkisi ile tamir edilemeyecek şekilde hasarlandığında apoptoz veya kanserleşme yoluna girerler. Apoptoz yoluna giren hücrelerin büzüşerek nükleusları parçalanır. Hücre içeriği fagosite edilir. Kromozom kondenzasyonu gerçekleşerek DNA fragmentlere ayrılır ve dolaşıma katılır.

Kanserleşme yoluna giren hücreler ise sınırsız bölünme ve proliferasyon yeteneği kazanarak tümör hücrelerini oluştururlar. İmmün sistem tarafından tanınabilen tümör hücreleri nekroz ile ortadan kaldırılır. Nekroz sırasında ozmotik basınç etkisi ile hücreler patlar ve enflamasyon oluşturur. Nekroz sırasında da DNA fragmentasyonu gözlenir.

Hücrenin patlaması sonucu fragmente olmuş tümör DNA'ları dolaşıma katılır (Elmore 2007 ve Zhivotosky 2001).

Kanser hücrelerinin en belirgin özelliğinden bir tanesi de metastaz yapabilme yetenekleridir. Lenfatik ve venöz dolaşım yolları ile uzak organlara taşınmaktadırlar. Uygun bölge bulduklarında da yerleşmektedirler (Sethi 2011). Normal şartlarda 1gr tümör için dolaşıma her gün 10^6 tümör hücresinin döküldüğü gözlenmiştir. Ancak bu sayı kanserin türüne ve evresine göre değişmektedir (Chang 2000).

Akciğer kanserinin erken tanısında ve tedavisinde biyolojik belirteçler ilgi çekmektedir. Bahsedilen biyolojik belirteçler arasında EGFR translokasyonu, ALK translokasyonu, ROS1 translokasyonu, BRAF mutasyonu ve MET amplifikasyonu yer alır. Tanıda tümör dokusunun moleküler profilinin çıkarılması, hedeflenebilir mutasyonların belirlenmesi önem taşımaktadır (Chadhuri 2017). Hedeflenebilir mutasyonlar son zamanlarda kanser tedavisinde köklü değişimlere neden olmuştur ancak bunun yanı sıra bir takım sorunlar da mevcuttur. Bu sorunlar arasında tümör heterojenitesi başta olmak üzere, klonal değişim, biyopsi yöntemlerinin potansiyel ilaçlara erişim sorunları ve ilacın olmaması yer alır (Heitzer 2015).

Tedavi edilmekte olan tümörler, tümör heterojenitesi ve klonal değişimler sonucunda direnç geliştirebilirler. Bu durumda uygulanacak olan yeni tedaviye tümörün genetik değişimine bakılmaksızın karar verilmektedir. Bazen de tümör dokusuna ulaşmak zor olmaktadır. Bu sorunların çözümüne yönelik olarak yapılan çalışmalar sonucunda, akciğer kanserinin erken tanısında, tümörün tedaviye yanıtını belirlemek ve gelişen direnci tespit etmek üzere, hastalığın tedavisinde kan, serum ve plazma örneklerinde tümör ve tümör hücrelerinin tespiti amacıyla noninvaziv likit biyopsi (LB) yöntemi karşımıza çıkmaktadır (Molina 2016).

Likit biyopsi yöntemi ile apoptoz veya nekroz sonucu ölen hücrelerden salınan hücre dışı DNA'lar (cfDNA) yakalanmaya çalışılır. Bu hücre dışı DNA'lar;

- tümör kaynaklı bir ürün olan dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs),
- dolaşımdaki tümör DNA (ctDNA),
- egzozomların içeriğindeki DNA, RNA, proteinler ve
- tümör eğitilmiş trombositler (TEPs)'i içerir.

Basit bir kan alımı sonucunda bu test çalışlabilmektedir. Son yıllarda cfDNA'nın kullanımına olan ilgilinin artmasıyla, cfDNA kanser ve otoimmün hastalıklar gibi klinik durumların tanı ve prognozunda yol gösterici olmaktadır (Ramirez ve diğ. 2016).

cfDNA kanda ya da serumda bulunan tek veya çift zincirli moleküldür. Yapılan çalışmalar tek nükleotid mutasyonları, metilasyon değişiklikleri ve kanserden türetilmiş viral diziler gibi kanserle ilişkili birçok moleküler özelliğin cfDNA'da bulunduğunu göstermiştir. Bu bulgular cfDNA teknolojisinin keşfi için önemlidir. Vücut hücreleri cfDNA'yı kan dolaşımına salarlar. Ancak bazen cfDNA kanser hücresi kökenli olmayabilir ve tümör kaynaklı değişiklikleri tespit etmeyi zorlaştırır. Belirli mutasyonlar hakkında bilgi sahibi olmak yararlı olabilir ancak bu bilginin elde edilmesi zor olabilir. Bununla beraber son teknolojik gelişmeler, kanser hastalarının cfDNA'sındaki genetik ve epigenetik değişiklikleri tanımlamayı mümkün hale getirerek bu sınırlamaların üstesinden gelmiştir (Callejo ve diğ. 2016).

Egzozomlar; kanser hücreleri ve diğer hücreler tarafından hücre dışı ortama salınan 40-100 nm boyutunda olan veziküllerdir. DNA, RNA ve miRNA'ları içerir ve hücre-hücre arası iletişimi sağlarlar. Bu veziküller tümör büyümesi, ilerlemesi, ilaç direnci ve metastatik durum gibi tümör biyolojisi ile ilgili birçok konuda önemli role sahiptir.

Trombositler, tümör hücreleri ile etkileşerek tümör büyümesi, invazyonu ve metastaz gelişiminde önemli rol oynarlar. Dolaşımdaki serbest nükleik asitler, tümör hücreleri ve tümör DNA'ları en sık analiz edilen ve yüksek spesifiteye sahip bileşenlerdir. Dolaşımdaki tümör DNA'ları tümörün tüm genetik özelliklerini barındırır ve tümör spesifik genetik ve epigenetik değişikliklerin analizine imkan verir (Santarpia ve diğ. 2011). Kanserli bireylerde sağlıklı bireylere göre, metastatik hastalarda metastatik olmayan hastalara göre serbest dolaşan DNA miktarı daha fazla bulunmaktadır. Serbest dolaşan DNA miktarı tümörün evresi ve yükü ile doğru orantılıdır (Sozzi ve diğ. 2003).

Günümüzde cfDNA'daki genetik değişimleri belirlemek için çeşitli metodlar bulunmaktadır. Bu metodlar real-time PCR, digital PCR, amplifikasyon ve magnetikler (BEAMing), yeni nesil dizileme (NGS) ve kütle spektrometresi genotipleme (MS genotyping)'dir (Ramiez ve diğ. 2016). Bu tez çalışmasında NGS temelli analiz yöntemi kullanılmıştır.

NGS, bugüne kadar klinik moleküler onkolojide en yüksek tespit duyarlılığını ve özgüllüğünü göstermiştir. Yapılan çalışmalar NGS'nin cfDNA'daki tümör kaynaklı mutasyonları tanımlamak için uygun, doğru ve hassas bir teknik olduğunu göstermiştir. Günümüzde özel ve değiştirilmiş ancak aynı prensibe sahip birden fazla NGS tekniği vardır. Tek DNA moleküllerinden kısa dizilerin üretilmesine ve genomun önemli bir bölümünün dizilimi ile sonuçlanan bir referans diziyle karşılaştırılmasına dayanırlar. NGS'nin temel avantajı, diğer teknikler ile tespit edilemeyen genetik ve kopya numara değişikliklerinin olduğu bölgeleri tanımlayabilmesidir (Ramirez ve diğ. 2016).

NGS, Sanger dizileme ile kıyaslandığında daha güçlü avantajlara sahiptir. Binlerce genin ve neredeyse tüm genomun test edilmesini sağlayacak verime sahiptir. NGS az miktardaki DNA girdisi ile de iyi bir test performansı göstermektedir (Luthra ve diğ. 2015). NGS bazlı likit biyopsi, doku biyopsisinden kaynaklı bölgesel heterojenliği ve aday gen karakterizasyonundan genomik bilgidaki sınırlamalarını aşan KHDAK'nın minimal olarak invaziv ve kapsamlı bir genomik profilini oluşturmayı kolaylaştırır (Zill ve diğ. 2016). Bununla birlikte bu teknik pahalıdır, sonuçları kapsamlı bir şekilde analiz edip yorumlamak için uzman personele ihtiyaç duyar ve verilerin depolanması için kapsamlı bir altyapıya sahip olunması gerekir (Ramirez ve diğ. 2016).

Likit biyopsi analizi kanser araştırmalarında hızla ilerleyen bir alandır. Kanser hastalarında erken tanı ve tedavi süreçlerinin izlenmesinde, metastatik relaps veya metastatik progresyon, gerçek zamanlı risk tahmini, tedavi hedeflerinin belirlenmesi ve dirençliliği gibi konularda yol göstericidir (Callejo ve diğ. 2016).

2.AMAÇ

Bu tezin amacı, yeni bir yöntem olan likit biyopsinin, akciğer kanseri hastalarında tarama, tanı ve tedavi için büyük önem taşıyan tümör genetik özelliklerinin belirlenmesi ve bu testin tanı üzerine olan etkinliğinin araştırılmasıdır.

Belirlenen genetik mutasyona ve özelliklere bağlı olarak klasik kemoterapinin yanı sıra kişiye özgü akıllı ilaçlar ile tedavi olanaklarının belirlenmesine de yardımcı olunması amaçlanmaktadır.



3.YÖNTEM

Araştırmamız, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından KÜ GOKAEK 2019/89 karar numarasıyla kabul edilmiştir.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı'na başvuran akciğer kanseri tanısı almış, cinsiyet farkı gözetmeksizin 50 hasta çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan hastaların 30 ml periferik kan örneklerinden cfDNA izolasyonu ve Likit Biyopsi Testi, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında yapılmıştır.

Aynı gün içerisinde hastadan alınan 30 ml taze kan örneğinden kullanılmak üzere 10 ml plazma elde edilmiştir. Plazmadan vücut sıvısında serbest dolaşan nükleik asitlerin (cfDNA) izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen cfDNA'lar PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan ürünler yeni nesil dizileme tekniği ile (NGS) dizilenmiştir. Elde edilen veriler tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir.

3.1. cfDNA İzolasyonu

- Hastadan alınan 30 ml kan 2000g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Plazma yeni santrifüj tüplerine aktarıldı.
- Plazma 16000g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.

Çizelge 3.1. Plazma hacmine göre cfDNA izolasyon bileşenleri

Bileşenler	Plazma Hacmi				
	1 ml	2 ml	4 ml	5 ml	10 ml
MagMax Cell Free DNA Lysis/Binding Solution	1,25 ml	2,5 ml	5 ml	6,25 ml	12,5 ml
MagMax Cell Free DNA Manyetik Boncuk	15 µl	30 µl	60 µl	75 µl	150 µl
Son Hacim	1,265 ml	2,53 ml	5,06 ml	12,65 ml	12,65 ml

- 10 ml plazma pellete dokunulmadan yeni tüpe alındı.
- Plazma üzerine 12,5 ml MagMAX Cell Free DNA Parçlama Bağlama Solüsyonu ve 150 µl MagMAX Cell Free DNA manyetik boncuk eklendi.

- Hızı 7 veya daha yüksek olacak şekilde 10 dk vortekslendi.
- Tüp 5 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Tüp magnet üzerinde tutulmaya devam edilerek süpernatant pipet yardımıyla tamamen uzaklaştırıldı.
- Tüp magnetten alındı.
- Beadler 1 ml MagMAX Cell Free DNA yıkama solüsyonu ile yeniden süspanse edildi.
- Boncuk solüsyonu yeni 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Boncuk solüsyonu içeren tüp DynaMag-2 Magnet üzerinde 20 saniye bekletildi.
- Süpernatant tekrar bir önceki tüpe aktarılıp karıştırılarak tüpte kalan boncuklar tamamen toplanmaya çalışıldı. Tüpten alınan boncuk solüsyonu tekrar magnet üzerindeki 1,5'lük tüpe aktarıldı.
- Tüp 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- %80'lik alkol ve 0,1X TAE hazırlandı.
- Süpernatant boncuklara dokunulmadan 1ml'lik pipetle uzaklaştırıldı.
- Magnet 5 kez masaya vuruldu ve kalan süpernatant 200µl'lik pipet ile tekrardan uzaklaştırıldı.
- 1,5'lük santrifüj tüpü magnetten alındı, 1ml %80'lik alkol eklendi ve 30 saniye vortekslendi.
- Tüp 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant boncuklara dokunulmadan 1ml'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- Tüp DynaMag-2 Magnet üzerinde 5 dk kurumaya bırakıldı.
- Magnet 5 kez masaya vuruldu kalan süpernatant 200µ'lik pipet ile uzaklaştırıldı. Tüp magnetten alındı.
- 400µl 0,1X TAE eklendi ve 5 dk vortekslendi.
- 1,5'lük tüp 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant yeni 1,5ml'lik tüpe aktarıldı.

- 10µl MagMAX Cell Free DNA Manyetik boncuklar ve 500µl MagMAX Cell Free DNA parçalama/bağlama solüsyonu eklendi.
- 5 dk vorteks yapıldı.
- 1,5 ml'lik tüp 5 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant boncuklara dokunulmadan 1ml'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- Tüp magnetten alındı, 1ml MagMAX Cell Free DNA yıkama solüsyonu eklendi ve 30 saniye vorteks yapıldı.
- 1,5 ml'liktüp 5 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant boncuklara dokunulmadan 1ml'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- Magnet 5 kez masaya vuruldu kalan süpernatant 200µ'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- Tüp magnetten uzaklaştırılarak 1ml %80'lik alkol eklendi ve 30 saniye vorteks yapıldı.
- 1,5ml'lik tüp 5 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant boncuklara dokunulmadan 1ml'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- Magnet 5 kez masaya vuruldu kalan süpernatant 200µ'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- Tüp magnetten uzaklaştırılarak 1ml %80'lik alkol eklendi ve 30 saniye vorteks yapıldı.
- 1,5ml'lik tüp 5 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant oncuklara dokunulmadan 1ml'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- 1,5ml'lik tüp DynaMag-2 Magnet üzerinde tutularak 5 dk kurumaya bırakıldı.
- Magnet 5 kez masaya vuruldu kalan süpernatant 200µ'lik pipet ile uzaklaştırıldı.
- 17µl MagMAX Cell Free DNA Elution solüsyon eklendi.
- 5 dk vorteks yapıldı.
- 1,5ml'lik tüp 5 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar magnete yapışana kadar DynaMag-2 Magnet üzerinde bekletildi.
- Süpernatant cfDNA'yı içermektedir.
- İzole edilen cfDNA sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı..

3.2. cfDNA Miktar Ölçümü

- 3 adet Qubit ölçüm tüpü alındı, içerisine 199'ar µl Qubit™ dsDNA HS Buffer solüsyonu konuldu.
- Qubit™ dsDNA HS Reagent^x 200X ölçüm boyası vortekslendi.
- 1'er µl tüplerin içine konuldu.
- Tüpler vorteks yapıldı.
- Hazırlanan karışımlardan standart ölçülecek tüplerin içerisinden 10'ar µl çekilerek atıldı. Total hacim 190 µl oldu.
- cfDNA ölçümü yapılacak olan tüpten 2 µl atıldı.
- Bir tüpe izole edilen cfDNA'dan 2 µl konuldu ve vorteks yapıldı.
- Diğer 2 tüpe 10'ar µl Qubit dsDNA HS Standart1 ve Standart2 konuldu.
- Qubit 3 cihazında önce hazırlanan standartlar ng/µl olacak şekilde okutuldu.
- Sonrasında hasta cfDNA'sını içeren tüp okutuldu ve miktarı belirlendi.
- Bu tez çalışmasının devam edebilmesi için cfDNA miktarının 2-50ng/µl arasında olması gerekmektedir.

3.3. Likit Biyopsi

Akciğer kanser paneli için çalışmadan daha yüksek kalitede verim alabilmek için çalışmaya maksimum 8 hasta ile girilmektedir. Hesaplamalar bu durum göz önünde bulundurularak yapılmalıdır.

Kütüphane Oluşturma

- Plate'e sırasıyla tabloda verilen miktarlarda DNA, su, kanser türüne göre panel ve PCR master mix eklendi. Solüsyonlar mix haline getirilmeden direk plate'e dağıtıldı.

Çizelge 3.2. Kütüphane oluşturmak için gerekli bileşenler

Bileşenler	Hacim
cfDNA 1-50 ng	X ul
Su	13-X ul
cfDNA panel	2 ul
cfDNA Kütüphane PCR Master Mix	15 ul
Son Hacim	30 ul

Not: Çalışmaya en az 20 ng DNA ile girilmelidir.

- Birden fazla örnek ile yapılan çalışmalarda DNA konsantrasyonu eşit hacme çekilerek çalışmaya başlandı.
- Şeffaf kaplama filmi ile kapatıldı.
- Plate kısa bir vorteks yapıldıktan sonra 300g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Thermal-Cycler önceden 90C'ye ısıtıldı.

Çizelge 3.3. Thermal-Cycler döngüsü

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Süre	98	2 dk
2 döngü	98	30 sn
	64	2 dk
	62	2 dk
	60	4 dk
	58	2 dk
	72	30 sn
Süre	72	2 dk
Süre	4	sonsuz

- Plate Thermal-Cycler'a yerleştirilerek program çalıştırıldı.
- Thermal-Cycler'dan alınan plate 300g 'de 1 dk santrifüj edildi.
- Şeffaf kaplama filmi plateten uzaklaştırıldı.
- Plate kuyularında 30 µl örnek olup olmadığı kontrol edildi, eksik bulunan kuyular su ile 30 µl'ye tamamlandı.
- 45 µl (örnek hacmi*1.5) Agencourt AMPure XP Reagent her kuyuya eklenerek plate şeffaf kaplama filmi ile kapatıldı.
- 15 saniye vorteks yapıp, 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Homojenizasyon vorteks ile sağlandı.
- Ardından 300g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Şeffaf kaplama filmi dikkatlice plateten uzaklaştırıldı.
- Plate magnetik standı alındı ve 5 dk ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar magnet üzerinde bekletildi. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol pipetaj yapmadan eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye bekletildi. Pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol pipetaj yapmadan eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye bekletildi. Pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.

- Kalan süpernatant 10 µl 'lik pipet ile tamamen uzaklaştırıldı. Ardından 5 dk oda sıcaklığında hava kurumasına bırakıldı.
- Plate magnetten alındı.
- Her bir kuyuya pipetaj yapılmadan 24 µl TE Buffer eklendi.
- Plate şeffaf kaplama filmi ile kapatılarak kısaca vortekslendi ardından 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Şeffaf kaplama filmi plateten uzaklaştırıldı ve plate magnetik stand üzerine alındı.
- Plate magnet üzerinde 2 dk bekletildi. Ardından 23 µl süpernatant çekilerek aynı plate üzerinde farklı kuyulara aktarıldı. (Bu işlem esnasında boncuk taşınmamasına dikkat edildi.) Plate hala magnet üzerinde tutulmaya devam edildi.

Çizelge 3.4. DNA barkodlama için hazırlanan master mix bileşenleri

Bileşenler	Hacim
DNA	23 µl
Barkod BC (#1-48)	1 µl
cfDNA Kütüphane Primer P1	1 µl
cfDNA Kütüphane PCR Master Mix	25 µl
Son Hacim	50 µl

- Plate'e sırasıyla DNA, barkod BC, cfDNA kütüphane primer P1, cfDNA kütüphane PCR master mix dağıtıldı.
- Plate Şeffaf kaplama film ile kapatılarak 15 sn vortekslendi ardından 1 dk 300g'de santrifüj edildi.
- Plate Thermal-Cycler'a yerleştirilerek program çalıştırıldı.

Çizelge 3.5. Barkodlama için Thermal-Cycler döngüsü

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Süre	98	2dk
18 Döngü	98	15 sn
	64	15sn
	72	15sn
Süre	72	5dk
Süre	4	Sonsuz

- Agencourt AMPure XP Reagent kullanılmadan 30dk önce oda sıcaklığına çıkarıldı.
- %80 alkol hazırlandı.
- Thermal-Cyclerdan alınan plate 300g'de 1 dk santrifüj edildi.

- Şeffaf kaplama filmi dikkatlice kaldırılarak her kuyuya 57.5 µl Agencourt AMPure XP Reagent eklendi. Plate film ile kapatıldı.
- Plate 15 sn vortekslendi ardından oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300g'de 1 dk santrifüj edildi. Ardından film çıkarıldı.
- Plate magnetik standda alındı ve 5 dk ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar magnet üzerinde bekletildi. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklendi. Plate 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında magnetik standda tutuldu. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Alkol yıkaması tekrar edildi. Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklendi. Plate 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında magnetik standda tutuldu. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Plate magnetik standda tutulmaya devam edilerek 10µl-20µl'lik pipetlerle kalan alkol tamamen uzaklaştırıldı. Ardından plate oda sıcaklığında 5 dk kurumaya bırakıldı.
- Plate magnetten alınarak her bir kuyuya 50 µl TE Buffer eklendi ve plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı.
- Plate kısaca vortekslendi ardından 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300g'de 1 dk santrifüj edildi. Ardından film çıkarıldı.
- Plate magnetik standda alınarak 2 dk inkübe edildi ardından 50 µl süpernatant aynı plate üzerinde yeni kuyulara aktarıldı.
- Plate magnetik standdan alınarak her bir kuyuya 50 µl Agencourt AMPure XP Reagent eklendi.
- Plate şeffaf kaplama filmi ile kapatılarak kısaca vortekslendi ardından oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300g'de 1 dk santrifüj edildi. Ardından film çıkarıldı.
- Plate magnetik standda alındı ve 5 dk ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar magnet üzerinde bekletildi. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklendi. Plate 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında magnetik standda tutuldu. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.

- Alkol yıkaması tekrar edildi. Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklendi. Plate 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında magnetik standda tutuldu. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Plate magnetik standda tutulmaya devam edilerek 10µl-20µl'lik pipetlerle kalan alkol tamamen uzaklaştırıldı. Ardından plate oda sıcaklığında 5 dk kurumaya bırakıldı.
- Plate magnetten alınarak her bir kuyuya 30 µl TE Buffer eklendi.
- Plate şeffaf kaplama filmi ile kapatılarak kısaca vortekslendi ardından oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300g'de 1 dk santrifüj edildi. Ardından film çıkarıldı.
- Plate magnetik standda alınarak 2 dk inkübe edildi ardından 28 ul süpernatant aynı plate üzerinde yeni kuyulara aktarıldı.
- Final kütüphane(plate) bir sonraki işleme kadar buz aküsü üzerinde tutuldu.
- 68 pm E.coli DH10B Ion kontrol kütüphaneden 10 kat seri dilüsyon halinde 5 standart hazırlandı.

(4µl 68 pm E.coli+36 µl su=6.8 pm standart)

(4µl 6.8 pm E.coli +36 µl su=0.68 pm standart)

(4µl 0.68 pm E.coli+36 µl su=0.068 pm standart)

(4µl 0.068 pm E.col+36µl su=0.0068pm standart)

(4µl 0.0068 pm E.col+36µl su=0.00068pm standart)

- Örnek için; 1/100 kütüphane dilüsyonu hazırlandı. Dilüsyon kısaca vortekslendi ardından kısaca santrifüj edildi.
(2µl library+198 µl su ile hazırlandı.)
- Örnek için; 1/1000 dilüsyon hazırlandı. Dilüsyon kısaca vortekslendi ardından kısaca santrifüj edildi.
(4µl 1/100 dilüsyon kütüphane+36 µl su ile hazırlandı.)
- 26 µl DNA kalan plate mix hazırlanma aşamasında -20'ye kaldırıldı.

Çizelge 3.6. Light Cyler 480 Mix bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon Başına Düşen Hacim	
	96-well plate	384 well plate
2X Taqman master mix	10 µl	5 µl
20X Ion Taqman assay	1 µl	0,5 µl
Son Hacim	11 µl	5,5 µl

- Hasta sayısı, standartlar ve NTC(negatif kontrol) sayısı ve pipetaj hatası(+1) hesaba katılarak mix hesaplaması yapıldı.

Çizelge 3.7. Light Cyler 480 reaksiyonu için gerekli bileşenler

Bileşenler	Reaksiyon Başına Düşen Hacim	
	96-well plate	384 well plate
PCR Master mix	11 µl	5.5 µl
1:1000 Örnek dilüsyonu	9 µl	4,5 µl

- Light Cyler 480 plate'ine standart ve hasta her biri 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 11 µl mix dağıtıldı.
- 1/1000 DNA dilüsyonu 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 9 µl pipetaj yapılarak dağıtıldı.
- Standartlar her biri 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 9 µl pipetaj yapılarak dağıtıldı.

Çizelge 3.8. Light Cyler 480 döngüsü

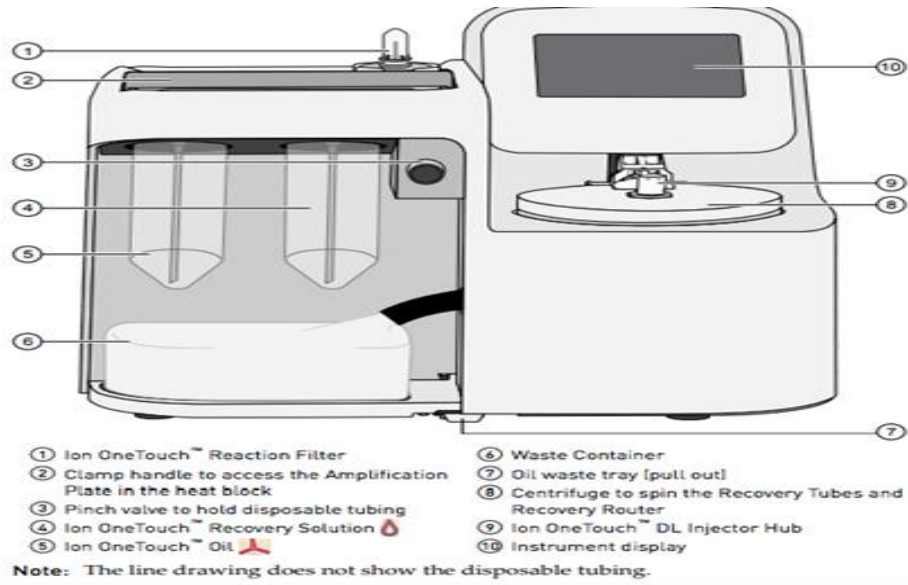
Aşama	Sıcaklık	Zaman
Süre	50 °C	2dk
Süre	95 °C	20 sn
40 döngü	95 °C	1dk
	60°C	20sn

- Light Cyler 480'de qPCR (kantitatif PCR) reaksiyonu gerçekleşti.
- Her hasta için qPCR sonucunda elde edilen verilerin ortalaması alındı. Her hasta için 3 kopya konulduğundan sonuçlar toplanıp 3'e bölündü. 1/1000 oranında dilüe edildiğinden bölüm sonucu 1000 ile çarpıldı.
- Sonraki aşama olan emPCR için total hacmin 50 µl olması gerekmektedir. Bunun için her hasta için 1000 ile çarpılan sonuç kullanılarak $M1.V1=M2.V2$ hesaplaması yapılarak final kütüphaneden ne kadar alınacağı hesaplandı.
- Final kütüphaneden alınan miktarın üzerine total hacim 50 µl olacak şekilde nükleaz free su ile tamamlandı.

- Her hasta için ayrı 1,5ml'lik tüplerde hazırlanan 50 µl'lik örneklerden 20'şer µl alınarak tek bir tüpte 100 pmol olacak şekilde akciğer havuzu oluşturuldu.
- Çalışmaya devam etmek için 100 pmol olan havuzun 8 pmol'e çekilmesi gerekmektedir.
- emPCR için cihaz hazırlandı.

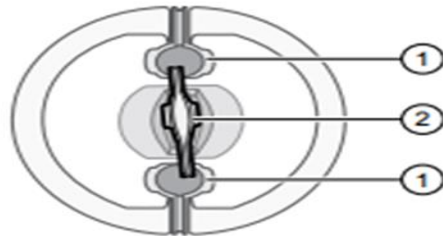
Ion One Touch2 Kurulumu

- Run> kullanılacak kit protokolü> next> assisted (önerilen)> şeklinde cihazın yönlendirmesi takip edildi.



Çizim 3.1. Ion One Touch2 cihaz bölümleri (Ion PGM™Hi-Q™ View OT2 Kit)

- Assisted seçilerek yönlendirmeler takip edildi.
- Oil yarısına kadar dolduruldu, recovery solüsyon 1/3 oranında dolduruldu.
- 150µl Ion OneTouch Breaking solüsyon iki ayrı recovery tüpe konur.
- Tüpler aşağıdaki şekilde verildiği gibi cihaza yerleştirildi.



Çizim 3.2. Recovery Tüplerin Cihaza Yerleştirilmesi (Ion PGM™Hi-Q™ View OT2 Kit)

Çizim 3.2. Recovery Tüplerin Cihaza Yerleştirilmesi (Ion PGM™Hi-Q™ View OT2 Kit)

- Ortaya recovery router konuldu.
- Ion yazısı önde kalacak şekilde amplifikasyon plate yerleştirildi.
- Cihaz üzerinde gösterilen şekilde iğne yerleştirildi, hortum takıldı, plate kolu kapatıldı.
- Bir kit ile 8 run çalışılabilir.
- Amplifikasyon solüsyonu hazırlandı.

Çizelge 3.9. Amplifikasyon solüsyonu hazırlanması

Bileşenler	Hazırlık
Ion S5 Reagent Mix	Oda ısısına getirildi. Reagent Mix 30 sn vortekslendi. 2 dakika santrifüj edildi. Reagent Mix in dibinde çökelti olmamasına dikkat edildi. Reagent mix kullanılana kadar oda ısısında bekletildi. Çözülmüş Reagent Mix 4C de saklandı.
Ion S5 Enzyme Mix	Tüp elle karıştırıldı. 2sn santrifüj edildi. Buzda bekletildi.
Ion Sphere Particles	Oda ısısında bekletildi.

ISPs (İon Sphere Particles) hazırlandı.

- ISPs maximum hızda 1 dakika vortekslendi.
- 2sn santrifüj edildi.
- ISPs pipetaj yapıldı.
- Hızlıca diğer basamağa geçildi.
- Oda ısısında bekleyen 2mL Ion S5 Reagent Mix içerisine tabloda verilen solüsyonlar sırası ile eklendi.

Çizelge 3.10. Ion S5 Reagent mix bileşenleri

Sıra	Reagent	Kapak rengi	Volume
1	Su	-	80µl
2	Ion S5 Enzyme Mix	Kahverengi	120µl
3	Ion Sphere Particles	Siyah	100µl
4	Dilue kütüphane-8pM	-	100µl
	Son volüm		2400µl

- Amplifikasyon solüsyonları hazırlandıktan sonra 15 dakikadan önce Ion One Touch2 Cihazına konulmalıdır.

Reaksiyon Filtresinin Doldurulması

- 1000'lik pipet 800'e ayarlandı.
- Amplifikasyon solüsyonu maximum hızda 5 sn vortekslendi, 2sn santrifüj edildi. Bu işlemler hızlı bir şekilde yapıldı.
- Amplifikasyon solüsyonu pipetaj yapıldı, 800µl pipete çekildi.
- Şekilde gösterilen porttan 2400µl library karışımı 800, 800 yüklendi. Her seferinde yeni pipet ucu takıldı.
- 1000'lik pipet ile 200µl Ion OneTouch Reaction Oil örnek portundan yüklendi.
- Ion One Touch Reaksiyon filtresi örnek portu solda kalacak şekilde döndürülür.
- Filtre üstündeki 3 port 3 deliğe denk gelecek şekilde yerleştirildi.
- Tüpte baloncuk görülürse patlatılmalıdır.
- Cihazda 16 saat kalabilmektedir.
- Cihazın çalışması bittikten sonra final spin yapıldı. Sonra gerekli solüsyonlar hazırlandı.

Melt-Off Solüsyonu Hazırlığı

- 1M NaOH ve solüsyon taze olarak hazırlandı.
- Melt-off solüsyonu 300 µl olarak 7 numaralı kuyucuğa yüklendi.

Çizelge 3.11. Melt-Off Solüsyonu Bileşenleri

Order	Bileşenler	Hacim
1	Tween Solüsyon	280µl
2	1 M NaOH	40µl
-	Total	320µl

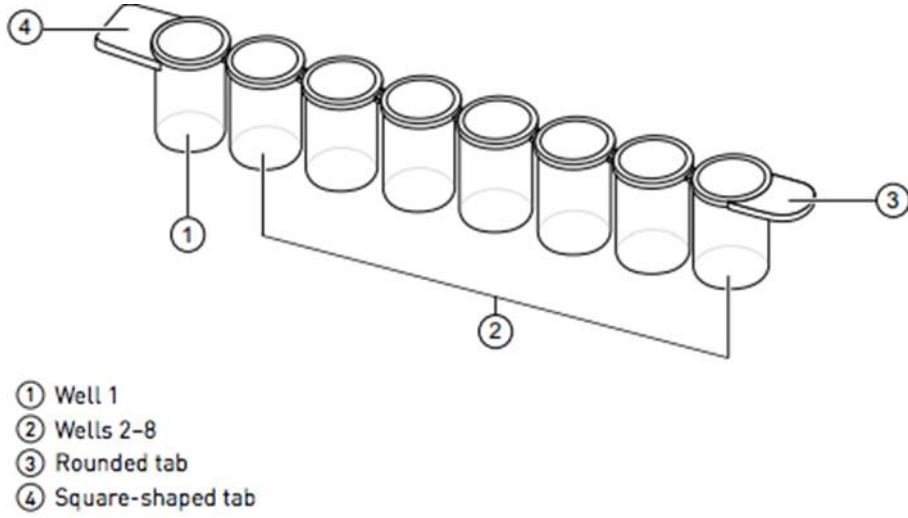
Dynabead'lerin Yıkınması

- Dynabead'ler 30sn vortekslendi.
- 100 µl Dynabead 1,5'luk tüpe alındı.
- Tüp Manyetik boncuk standına (MBS) alındı. 2 dakika beklendi. Süpernatant atıldı.
- 1000 µl Ion OneTouch yıkama solüsyonueklendi.
- Tüp magnetten alındı, 30sn vortekslendi, 2sn santrifüjlendi.

- Tüp MBS'ye tekrar yerleştirildi. 2dk veya şeffaflaşana kadar beklendi. Supernatant atıldı.
- 130 µl My One Beads yakalama solüsyonu dynabeadlerin üstüne eklendi.
- Tüp magnetten çıkarıldı. 30sn vortekslendi, 2sn santrifüj edildi.
- 2 numaralı kuyucuğa yüklendi.

Template Pozitif ISPs'lerin Yıkınması

- Çeltiğin olduğu tarafta pellet birikir. Ters yönden süpernatant çekildi.
- Recovery tüplerde son hacim 100µl olarak kalacak şekilde çekildi.
- Her iki tüp pipetaj yapıldı.
- Her iki tüptede olan 100µl' lik kütüphane tek 1.5' luk tüpte toplandı.
- Çeltikli tüpte kalanları temizlemek için her iki tüpe de 100µl su konuldu ve yıkanarak çekildi, 1,5'luk tüpte olan kütüphanenin üstüne eklendi. Total hacim yaklaşık 400µl oldu.
- 1,5 luk tüpün üstüne 600µl su eklendi. Total hacim 1000µl olacak şekilde.
- Bu noktada template pozitif ISPs 4C'de 3 gün saklanabilir. OneTouch Recovery Solüsyon içinde saklanmaz.
- 30 sn vortekslendi, 2 sn santrifüj edildi.
- 15500g'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatanttan 20µl kalacak şekilde üst süpernatant atıldı.
- Üzerine 80µl ISP Resuspension Solüsyon konuldu. Total hacim 100µl ldu.
- 30sn vortekslendi, 2sn santrifüj edildi.
- ISPs 10 kere pipetaj yapıldı.
- Tüm hacim 100µl olacak şekilde 1.kuyucuğa yüklendi.



Çizim 3.3. Ion One Touch ES Plate(Ion PGMTMHi-QTM View OT2 Kit)

- 3-4-5. kuyucuklara 300'er µl Ion One Touch ES yıkama solüsyonu yüklendi.
- 6. ve 8. kuyucuklar boş kalacak.

Çizelge 3.12. Ion One Touch Es Cihaz Plate'inde bulunan bileşenler

Kuyucuk Numarası	Kuyucuklarda Bulunan Bileşenler
1. Kuyu	Template pozitif ISPs Örneği (100µl)
2. Kuyu	130µl Dynabeads
3. Kuyu	300µl Ion One Touch Es Yıkama Solüsyonu
4. Kuyu	300µl Ion One Touch Es Yıkama Solüsyonu
5. Kuyu	300µl Ion One Touch Es Yıkama Solüsyonu
6. Kuyu	Boş
7. Kuyu	300µl Melt-Off Solüsyonu
8. Kuyu	Boş

One Touch Es Cihazının Hazırlanması

- Cihaza 0,2 lik PCR tüp ve pipet takıldı.
- Plate'i yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.
- Bu işlem 40 dakika sürmektedir.

Dizileme Cihazını Başlatma

- Yeni yıkama solüsyonu takıldı.
- İçinde eski çip olup olmadığı kontrol edildi var ise atıldı.

- Atık kutusu kontrol edildi. Dolu ise boşaltıldı.
- Yeni kartuj takıldı. Kullanımından 40 dakika önce kartuj -20C ‘den çıkarıldı.

Zenginleştirilmiş ISPs’in Çıkarılması ve Yıkınması

- Ion One Touch Es cihazından çıkan 0,2’ lik tüpte bulunan zenginleştirilmiş olan ISPs 15500g’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Pellete dokunmadan son hacim 10µl kalacak şekilde supernatant atıldı.
- Üzerine 200µl nuclease free su eklendi. 10 kere pipetaj yapıldı.
- Bu arada yükleme buffer oda ısısına çıkarıldı.
- 15500g’de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Dipte kahverengi pellet var mı yok mu kontrol edildi ona göre aşağıdaki tablo izlendi.

Çizelge 3.13. ISPs’in Yıkınması

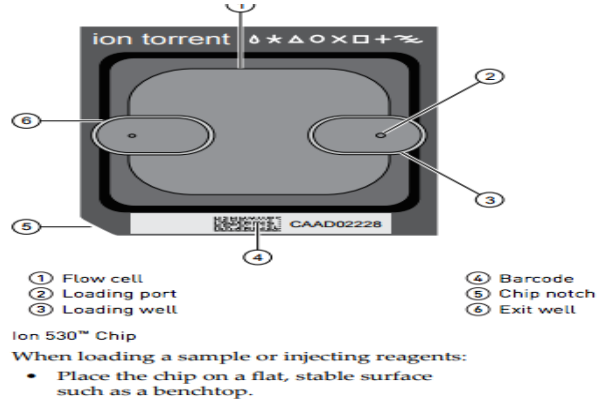
Kahverengi DynaBead var mı yok mu?	
Yok	<ol style="list-style-type: none"> 1. 10 µl kalacak şekilde supernatant uzaklaştırıldı. 2. Son hacim 100 µl olacak şekilde 90 µl su eklendi. 3. 10 kere pipetaj yapılarak pellet resuspend edildi. 4. Sekans cihazına geçildi veya 4C de 3 gün saklanabilir.
Var	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pelleti resuspend etmek için 10 kere pipetaj yapıldı. 2. 0.2’lik PCR tüpü DynaMag gibi bir magnet üzerinde 4 dakika bekletildi. 3. Supernatant, yeni bir 0.2lik PCR tüpüne transfer edildi. 4. Supernatant 15,000g de 5 dakika santrifüj edildi. 5. 10µl kalacak şekilde supernatant uzaklaştırıldı. 6. Total hacim 100 µl olacak şekilde su eklendi. 7. Pelleti resuspend etmek için 10 kere pipetaj yapıldı. 8. Sekans cihazına geçildi veya 4C de 3 gün saklanabilir.

Chip Yükleme

- Kullanılacak solüsyonlar taze hazırlandı.

Başlamadan Önce;

- Dizileme başlatma yapıldıktan sonra 4 saat içinde cihaza yükleme yapılmalıdır.
- Sekans primerleri buza konuldu.
- İlk kullanımdan önce yükleme buffer, foaming solüsyon ve annealing buffer oda ısısına getirildi.
- Bu solüsyonlar bir kere eridikten sonra oda ısısında saklanmalıdır.
- %50 lik annealing buffer hazırlandı. 1000 μ l annealing buffer, 1000 μ l su karışımı hazırlandı.
- Her run için 1300 μ l annealing buffer gerekir.
- Chip için uygun kontrol Ion Sphere seçildi.
- Kontrol Ion Sphere Particles 5 sn vorteklendi, 2 sn santrifüjlendi.
- 0.2'lik zenginleştirilmiş olan template-pozitif ISPs içine 5 μ l Control Ion Sphere Particul eklendi. Pipeteaj yapıldı.
- Partiküllerin görülmesi zor olduğu için her seferinde aynı pozisyonda santrifüj edildi. Pelletin nerede olduğunu bilmek için.
- 15500g 'de 5 dakika template-pozitif ISPs santrifüj edildi.
- 10 μ l kalacak şekilde supernatant atıldı.
- 15 μ l dilüe edilmemiş Annealing Buffer eklendi. Total volüm 25 μ l oldu.
- 20 μ l dizileme primer eklendi. Son hacim 45 μ l den az olursa dilüe edilmemiş annealing buffer ile tamamlanır.
- Vortekslendi ve santrifüj edildi.
- Thermal Cycler'da 95C'de 2 dakika, 37C'de 2 dakika tutuldu.
- Chip yükleme veya sekanslamaya geçmeye daha vakit varsa oda ısısında bekletilebilir.
- ThermalCycler'dan sonra 6 μ l Ion S5 dizileme polimeraz ve 10 μ l Ion S5 yükleme buffer eklendi. Vorteks ve santrifüj edildi. Total hacim yaklaşık 60 μ l'dir.
- 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.



Çizim 3.4. Chip Yükleme(Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3)

- Chip sabit bir yüzeye konuldu.
- Pipete 40µl örnek çekildi. yükleme portuna pipet yerleştirildi. Basılmadan döndürülerek örnek yüklendi.
- Kalan 20µl yüklenecek örnek chipe pipetle bırakıldı.
- Chip, chip santrifüjüne konuldu.
- 5dakika santrifüj edildi.
- 1,5µl' lik tüp içine 900µl %50 annealing buffer ve 100µl foaming solüsyon eklendi.
- Elle çalkalandı.
- Santrifüj sonrası chip sabit bir yüzeye konuldu.
- 100µl oluşan köpük loading porttan yüklenir. Basılmadan döndürülerek yüklendi.
- Çıkış kısmından çıkanlar pipetle çekildi ve atıldı.
- Totalde yaklaşık 400µl köpük bu şekilde yüklendi.
- 100µl %50 annealing buffer yükleme porttan yüklendi. Çıkıştan çıkanlar çekilip atıldı.
- Totalde yaklaşık 400µl %50 annealing buffer bu şekilde köpük olmamasına dikkat edilerek yüklendi.
- Chip cihaza takılarak sequencing başlatıldı.

3.4. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (Türkiye, Arçelik)
- Çip Santrifüjü (Life Technologies)
- Mikro Santrifüj (ABD, Sigma)
- Vorteks (Biosan)

- Light Cyclers 480 (Almanya, Roche)
- Simply Amp Thermal Cycler Cihazı
- Allegra X-12 Santrifüj (Fransa, Beckman Coulter)
- Ion One Touch ES
- Ion One Touch 2
- Ion S5 Semiconductor Sequencer (Singapur, iontorrent)
- DynaMag-2 Magnet (İnvitrogen)
- DynaMag-50 Magnet (İnvitrogen)
- Mikropipetler 10µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf ,Almanya)
- Qubit-3 DNA Ölçüm Cihazı (İnvitrogen)
- -80°C Derin Dondurucu

3.5. Sarf Malzemeler

- PCR Tüpü
- 15ml'lik ve 50ml'lik Tüp
- Pasteur Pipeti (Çin, Nest)
- Pipet Ucu
- Ion 530 Chip
- Ion One Touch Recovery Tüp
- Light Cyclers 480 Şeffaf Kaplama Filmi
- Light Cyclers 480 Multiwell Plate 96 (Roche)
- Şeffaf Kaplama Filmi

3.6. Kullanılan Kitler

- Qubit dsDNA HS Assay Kit (İnvitrogen)
- MagMax Cell Free DNA İzolasyon Kiti
- Ion S5TM OT 2 Solutions Kit (Life Technologies)
- Ion S5TM OT 2 Supplies Kit (Life Technologies)
- Ion 530TM Chip Kit-4 Pack (Life Technologies)
- Ion Library TaqmanTM Quantitaion Kit (Life Technologies)
- Ion 520TM& Ion 530TM Loading Reagents OT2 (Life Technologies)
- Ion 520TM& Ion 530TM OT2 Reagents (Life Technologies)

3.7. Kullanılan Kimyasallar

- Qubit dsDNA HS Buffer
- %80 Alkol
- 68 pm E.coli DH10B Ion Control Library
- 1X TAE (Tris Asetat Edta)
- 1M NaOH

3.8. Analiz

Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing) cihazından elde edilen dizi verileri Human Genome 19 ile karşılaştırıldı. Akciğer kanser panelinde ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, NRAS, MAP2K1, TP53, ROS1, PIK3CA gen sıcak bölge varyasyonları (hotspot) incelendi. Varyant analizleri Toret Suite Software, Ion Reporter, Oncomine Knowledgebase Reporter programları kullanılarak yapıldı. Kit için standart olan değerlendirme frekans limiti (LOD, limit of detection) değeri %0.05 olarak kabul edildi. Bu değerin üstünde frekansa sahip olan varyantlar pozitif olarak değerlendirildi. Bu tezde varyasyon değerlendirmesi ve biyoinformatik analizler ACMG ve Clinvar veri bankaları kullanılarak yapılmıştır. İn siliko analiz aracı olarak kullanılan DANN, mutation taster ve SIFT ile tespit edilen klinik olarak anlamlı olan varyantlar, belirtilen olan tüm parametreler göz önünde bulundurularak incelendi.

4.BULGULAR

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülen bu tezde, akciğer kanseri tanısı almış 50 hastaya likit biyopsi testi yapılmıştır. Çıkan sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

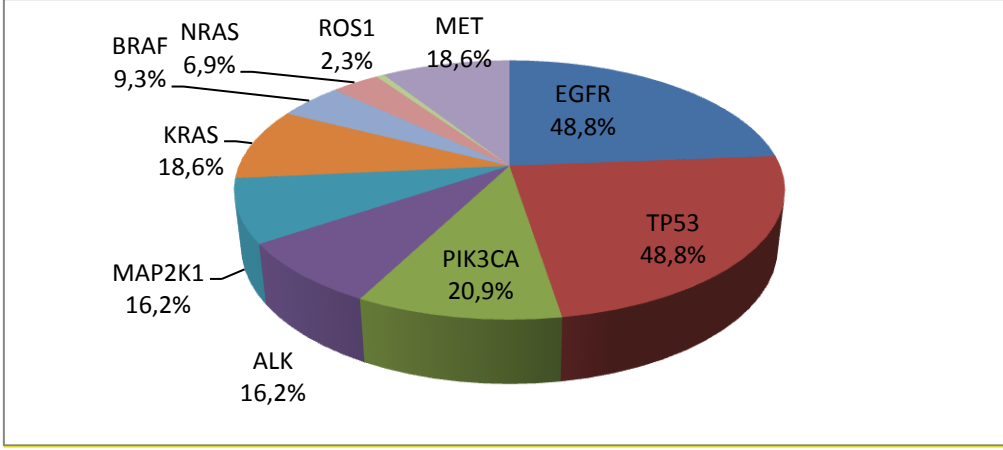
50 hastanın 35 'ü erkek (%70), 15'si (%30) kadın hastadır. Hastaların yaş ortalaması 63,2'dir. Hastaların 24'ünün (%48) kanser evresi bilinmektedir. Evresi bilinen hastaların 18'i 4.evre(%36), 5'i 3.evre(%10), 1'i 1.evre(%2)'dir. Hastaların 26'sının (%52) çeşitli dokularda metastazları olduğu bilinmektedir. Sigara kullandığı bilinen hasta sayısı 28 (%56)'dir. Hastaların %14'ünde (7 hastada) bu taranan 11 gen bölgesinden hiçbirinde varyasyon saptanmamıştır. Hastaların %14'ünde (7 hastada) cfDNA elde edilemediğinden bu gen bölgelerine bakılamamıştır. 10 hastanın (%20) çalışması tamamlanmış ancak hastalar ex olmuştur.

Çizelge 4.1. Hastalara Ait Bulgular

Bulgu	Hasta Sayısı (n)
Kadın/Erkek Oranı	15/35
Yaş Ortalaması	63,2
Evresi Bilinen Hasta	24
Metastazı Olan	26
cfDNA Elde Edilemeyen	7
Varyasyon Saptanmayan	7
Ex Olan	10
Sigara Kullanan	28

Akciğer kanseri tanılı hastaların likit biyopsi testinde PIK3CA, EGFR, MET, ALK, BRAF, KRAS, NRAS, ERBB2, ROS1, MAP2K1, TP53 gen bölgeleri taranmaktadır. Belirtilen gen bölgeleri taranan 43 hastanın (%86) hiçbirinde ERBB2 geninde varyasyona rastlanmamıştır.

Likit biyopsi testi çalışılan akciğer kanseri hastalarının %86'sinde (43 hastada) farklı varyasyonlar saptanmıştır. Hastaların %48,8'inde EGFR, %48,8'inde TP53, %20,9'unda PIK3CA, %18,6'sında MET ve KRAS, %16,2'sinde ALK ve MAP2K1, %9,3'ünde BRAF, %6,9'unda NRAS, %2,3'ünde ROS1 genlerinde varyasyonlar saptanmıştır. Hastalarda en çok gözlenen varyasyonların oranı Çizim 4.1.'de gösterilmiştir.



Çizim4.1. Hastalarda incelenen genlerde saptanan varyasyon oranı

Çizelge 4.2. Hastalarda görülen tüm varyasyonlar

Hastalar	TP53				EGFR			ALK	MAP2K1	
1	p.Arg273Cys									
2									p.Lys57Glu	
3	p.His179Arg	p.Gly245Cys								
4	p.Arg337His	p.Arg248Trp			p.Thr790Met	p.Glu746_Ala750del		p.Phe1245ser		p.Phe53Ser
5	p.Arg283His	p.Arg248Trp	p.Tyr220Cys		p.Leu858Arg	p.Glu709Gly				
6	p.Arg158His									
7	p.Arg248Gln	p.Arg158 Leu								
8	p.Arg249Ser				p.Leu858Arg	p.Lys745Arg				
9	p.Arg273His				p.Lys745Arg					
10	p.Arg158His									
11					p.Lys745Arg	p.Leu858Pro				
12	p.Tyr205Cys	p.His214Arg	p.Arg248Gln	p.Tyr220Cys	p.Thr790Met	p.Glu746_Ala750del				
13	p.Arg282Trp				p.Glu709Gly	p.Cys797Tyr	p.Met766Val	p.Ile1171Thr		p.Lys57Arg p.Glu203Gly
14	p.Arg283Pro				p.Leu858Arg	p.Glu709Gly	p.Ile1171Thr	p.Ile1171Thr		p.Lys57Arg
15	p.Arg273Leu				p.Leu858Arg	p.Glu709Gly	p.Asp1203Asn	p.Asp1203Asn		
16							p.Arg1272Gln	p.Arg1275Gln		
17	p.Arg283Pro	p.Arg273His			p.Leu858Arg					p.Lys57Arg
18	p.Arg248Gln				p.Leu858Arg	p.Leu861Gln	p.Leu1152Pro	p.Leu1152pro		p.Phe53Leu
19										
20	p.Arg337His	p.Cys277Tyr	p.Arg273Cys		p.Leu858Arg					
21										
22										
23										
24						p.Glu746_Ala750del				
25	p.Arg248Gln	p.Tyr220Cys			p.Leu858Arg					
26						p.Glu746_Ala750del				
27					p.Glu709Gly		p.Leu1152Pro	p.Leu1152pro		p.Lys57Asn
28					p.Thr790Met					
29										
30	p.Arg175Gly									
31	p.Arg282Trp	p.Arg248Trp	p.Tyr163Cys		p.Thr790Met	p.Leu858Arg	p.Phe1174Leu	p.Phe1174Leu		
32	p.His214Arg	p.His179Pro								
33										
34						p.Glu746_Ala750del				
35					p.Thr790Met	p.Glu746_Ala750del				
36	p.Val157Ile				p.Thr790Met	p.Glu746_Ala750del				

Çizelge 4.2. Hastalarda görülen tüm varyasyonlar (devamı)

Hastalar	MAP2K1	MET	KRAS	BRAF	NRAS	PIK3CA	ROS1
1		p.Thr1010Ile				p.Glu545Lys	
2	p.Lys57Glu						
3						p.Glu542Lys	
4	p.Phe53Ser	p.Thr1010Ile			p.Gln61Arg	p.Glu542Lys	p.Glu545Lys
5		p.Try1021Cys		p.Ala600Ala			
6							
7							
8							
9							p.Leu1951Me
10							
11							
12			p.Gly12Cys	p.Tyr472Cys		p.Glu542Lys	
13	p.Lys57Arg	p.Glu203Gly					
14	p.Lys57Arg	p.Tyr1248His	p.Gly12Asp		p.Gln61lys	p.Glu542Lys	
15							
16							
17	p.Lys57Arg	p.Tyr1021His	p.Tyr1248His				
18	p.Phe53Leu	p.Met1268Thr	p.Met1268Ile	p.Val600Ala	p.Gly469Val		
19			p.Gly12Cys				
20		p.Met1268Thr					
21			p.Gly12Cys				
22			p.Gly12Asp				
23						p.Glu542Lys	
24						p.Glu542Lys	
25							
26							
27	p.Lys57Asn		p.Gly12Cys		p.Gln61lys	p.Glu542Lys	
28							
29			p.Gly12Ser				
30							
31		p.Tyr1248His		p.Tyr472Cys			
32						p.Glu545Lys	
33			p.Gly12Asp				
34							
35							
36							

Likit biyopsi testi ile incelenen genlerde farklı sayılarda varyasyon saptanmıştır. İncelenen genlerden en çok varyasyon TP53 geninde saptanmıştır. Bu gende saptanan 22 varyasyonun 1 tanesi patojenik, 17 tanesi olası patojenik ve 4 tanesi kesin olmayan patojenite olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.3. TP53 Geninde Saptanan Varyasyonlar

Hasta Sayısı (n)	Varyasyon
2	p.Arg273Cys
2	p.Arg273His
1	p.Gly245Cys
1	p.Tyr205Cys
2	p.His214Arg
2	p.Arg337His
1	p.Cys277Tyr

4	p.Arg248Gln
3	p.Tyr220Cys
2	p.Arg158His
1	p.Arg283His
1	p.Val157Ile
2	p.Arg283Pro
2	p.Arg282Trp
3	p.Arg248Trp
1	p.Tyr163Cys
1	p.His179Arg
1	p.Arg249Ser
1	p.Arg158Leu
1	p.Arg273Leu
1	p.Arg175Gly
1	p.His179Pro

EGFR geninde 9 farklı varyasyon saptanmıştır. Saptanan varyasyonlardan 1'i olası patojenik, 3'ü kesin olmayan patojenik ve 5'i ilaç ilişkili olarak değerlendirilmiştir. EGFR geninde en sık saptanan varyasyonlar p.Leu858Arg ve p.Thr790Met'tir ve hastaların %20,3'ünde bulunmuştur. İkinci en çok saptanan varyasyon ise p.Glu746_Ala750del varyasyonu (ekzon 19 delesyonu) ve hastaların %16,2'ünde değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.4. EGFR Geninde Saptanan Varyasyonlar

Hasta Sayısı (n)	Varyasyon
1	p.Leu858Pro
9	p.Leu858Arg(exon21)
1	p.Met766Val
5	p.Glu709Gly(exon18)
9	p.Thr790Met(exon20)
1	p.Cys797Tyr
1	p.Lys745Arg
7	p.Glu746_Ala750del(exon19)
1	p.Leu861Gln

PIK3CA geninde 2 farklı varyasyon toplam 10 hastada saptanmıştır. Saptanan varyasyonlardan p.Glu545Lys 3 hastada, p.Glu542Lys varyasyonu ise 7 hastada saptanmış olup iki varyasyon da olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

MET geninde 6 farklı varyasyon saptanmıştır. Saptanan varyasyonlar Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. MET Geninde Saptanan Varyasyonlar

Hasta Sayısı (n)	Varyasyon
2	p.Thr1010Ile
1	p.Met1268Thr
1	p.Tyr1021Cys
4	p.Tyr1248His
1	p.Tyr1021His
1	p.Met1268Ile

KRAS geninde 3 farklı varyasyon saptanmıştır. Saptanan varyasyonların 8'i patojenik olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6. KRAS Geninde Saptanan Varyasyonlar

Hasta Sayısı (n)	Varyasyon
4	p.Gly12Cys
3	p.Gly12Asp
1	p.Gly12Ser

ALK geninde 6 farklı varyasyon saptanmıştır. Toplam 8 hastada saptanan bu varyasyonlardan 5'i kesin olmayan patojenite ve 2'si olası patojenik'tir.

Çizelge 4.7. ALK Geninde Saptanan Varyasyonlar

Hasta Sayısı (n)	Varyasyon
2	p.Ile1171Thr
1	p.Phe1245Ser
1	p.Phe1174Leu
2	p.Leu1152Pro
1	p.Arg1275Gln
1	p.Asp1203Asn

MAP2K1 geninde 5 farklı varyasyon saptanmıştır. Bu varyasyonlardan 1'i kesin olmayan patojenik, 4'ü olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.8. MAP2K1 Geninde Saptanan Varyasyonlar

Hasta Sayısı (n)	Varyasyon
1	p.Lys57Glu
4	p.Lys57Arg
1	p.Glu203Gly
1	p.Phe53Leu
1	p.Phe53Ser

BRAF geninde 3 farklı varyasyon saptanmıştır. Hastalarda saptanan varyasyonların 3'ü de patojenik olarak değerlendirilmiştir.

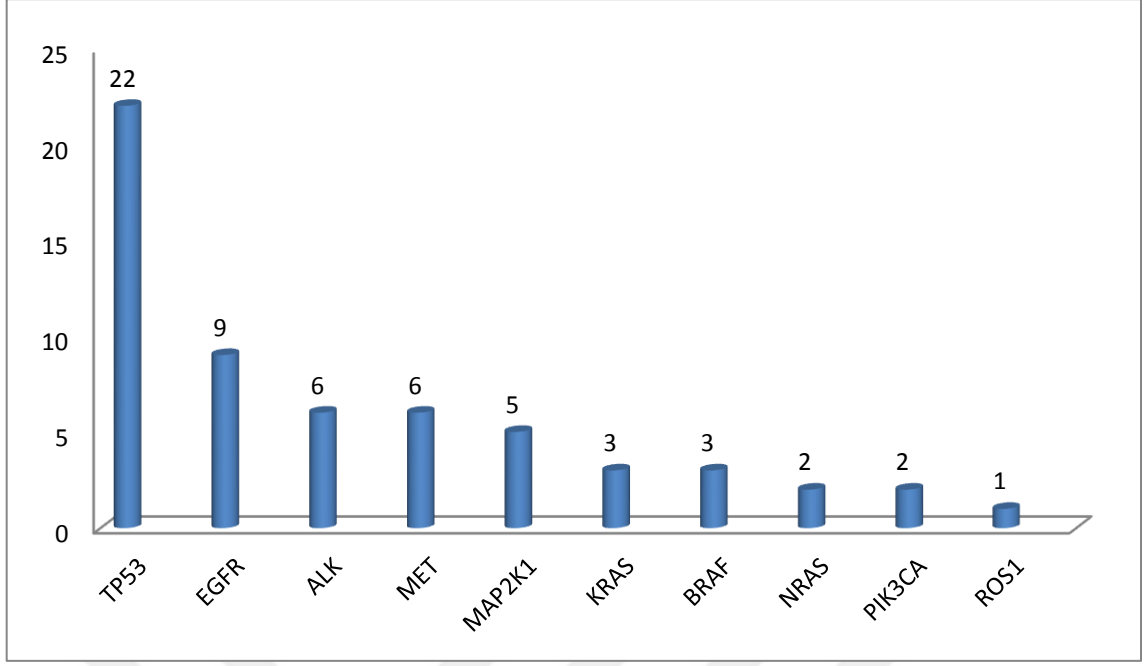
Çizelge 4.9. BRAF Geninde Saptanan Varyasyonlar

Hasta Sayısı (n)	Varyasyon
2	p.Val600Ala
1	p.Gly469Val
2	p.Tyr472Cys

NRAS geninde 2 farklı varyasyon saptanmıştır. Saptanan varyasyonlardan p.Gln61Lys varyasyonu 2 hastada patojenik, p.Gln61Arg varyasyonu 1 hastada olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

ROS1 geninde 1 hastada saptanan p.Leu1951Met varyasyonu sınıflandırılmamıştır.

ERBB2 geninde ise hastalarda varyasyon saptanmamıştır.



Çizim 4.2. Genlerde Saptanan Farklı Varyasyon Sayıları

5.TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, likit biyopsi testi ile cfDNA izolasyonundan yeni nesil dizileme tekniği ile sonuçların raporlanmasına kadar olan süreç bir bütün olarak ele alınmıştır. Tez çalışması boyunca akciğer kanseri tanısı almış 50 hastanın cfDNA'sı izole edilmiş, bu hastaların likit biyopsi testi çalışılmış ve sonuçları analiz edilmiştir. Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular sıraya uygun olarak tartışılmıştır.

Tez çalışmamıza dahil edilen 50 hastanın 35'i erkek (%70), 15'i kadın (%30) hastadır. Hastaların %56'sının sigara kullandığı bilinmektedir. Akciğer kanserinin görülme sıklığı yaş ile birlikte doğru orantılı olarak artmaktadır. Akciğer kanseri hastalarının çoğu 50-70 yaş grubu arasındadır. Arınç S. ve arkadaşları 2005 yılında hastanelerinde akciğer kanseri hastaları ile yaptıkları çalışmada hastaların %60'ının 46-65 yaş aralığında olduğunu görmüşlerdir (Arınç ve diğ. 2005). Çalışmamıza aldığımız akciğer kanseri hastalarının yaş ortalaması 63,2 olarak bulunmuştur. Bu sonuç literatür ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Üretici firmanın uygun gördüğü protokol dahilinde likit biyopsi testi için hastalardan elde edilen cfDNA miktarı 2-50 ng aralığında olmalıdır. Çalışmamıza dahil edilen 50 hastanın 7'sinin cfDNA'sı elde edilemediğinden çalışmaya devam edilememiştir. Hastaların çalışma için kan verdikleri güne yakın kemoterapi ve radyoterapi almış veya operasyon geçirmiş olmaları, elde edilen cfDNA seviyelerinde azalmaya neden olabileceği düşünülmektedir. Yapılan farklı çalışmalar sonucunda Huang ve ark. meme kanseri, Frattini ve ark. kolon kanseri ve Sozzietal ve ark. akciğer kanseri hastalarında cfDNA seviyelerini izlemişlerdir. Cerrahi operasyon geçiren hastaların işlem sonrası cfDNA seviyelerini ölçtüklerinde bir düşüş gözlemlemişlerdir. cfDNA konsantrasyon düşüklüğü hastanın periferik tümör yüküyle de yakından ilişkilidir. Hastalığın evresine ve seyrine bağlı olarak periferik tümör yükünün düşük olması cfDNA elde edilmesini zorlaştırmaktadır.

Likit biyopsi testi çalışması tamamlanan 43 hastanın 7'sinin genlerinde hiç bir varyasyon saptanmamıştır. Kandan çalışma için yeterli miktarda saptanamayan cfDNA'nın düşük tümör yükünden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Literatürde bildirilen bazı çalışmalarda tümör yükü düşüklüğünden cfDNA elde edilemediği belirtilmiştir (Almodovar ve diğ. 2018)(Schrock ve diğ. 2018). Tümör yükü dışında kan numunesi miktarı, kanın alınma zamanı, hastanın yakın zamanda almış olduğu tedavi gibi faktörlerin de cfDNA elde edilememesinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda en çok varyasyon TP53 ve EGFR (%48,8) genlerinde saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada TP53 geninde 22 farklı varyasyon bulunmuş ve taranan genler arasında en fazla bu gende farklı varyasyon saptanmıştır. Tümör süpresör gen olan p53'ün, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptozis, kromozom kondenzasyonu gibi önemli fonksiyonlara sahip olmasından ötürü bu gende meydana gelen varyasyonlar kanserle doğrudan ilişkilidir (Lane ve diğ. 1992). Jiayi Z ve ark. 2019 yılı Şubat ayında Çin'de yaptıkları çalışmada akciğer kanseri hastalarında TP53 geninde %44,9 oranında varyasyon saptamışlardır. Victor D. ve ark. 2018 yılında akciğer kanseri hastalarıyla yaptıkları çalışmada TP53 geninde varyasyon oranını %46.5 olarak saptamışlardır. Yudong W. ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada TP53 gen varyasyon oranını %67 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda TP53 geninde saptadığımız %48,8' lik varyasyon oranı literatürde belirtilen oranlar ile yakın olduğu görülmüştür. TP53'de gözlenen 22 farklı varyasyon arasından en sık saptanan p.Arg248Gln varyasyonudur.

EGFR hem normal hücre proliferasyonu hem de malign forma dönüşme ile ilişkili tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir transmembran glikoproteinidir. KHDAK'lerin %13-80'inde EGFR genlerinde mutasyonlar oluşmaktadır (Zhang ve diğ. 2008). Bu varyasyonlardan ekzon 20'de görülen Thr790Met varyasyonu akciğer kanserinde direnç ve kötü prognozla ilişkilendirilir. Çalışmamızda EGFR varyasyonu hastalarda %48,8 oranında saptanmıştır. Bu gende en sık varyasyon görülen bölgeler sırasıyla %20,3 oranında exon21(p.Leu858Arg) ve exon20(p.Thr790Met), %16,2 oranında exon19(p.Glu746_Ala750del)'dur. Şebnem Ö. ve arkadaşlarının 2016 yılında Türkiye'de akciğer kanseri hastalarında yaptıkları çalışmada EGFR varyasyon oranını %47,7 olarak saptamışlardır. Ünal O.U.ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışma da EGFR varyasyonunu %42,6 olarak saptamışlardır. Akciğer kanseri ile yapılan bir başka çalışmada ise EGFR gen varyasyon oranını %36,8 olarak saptamışlardır (Tengteng ve diğ. 2015). Yaptığımız bu çalışmada ise EGFR gen varyasyon oranını literatür ile yakın (%58,3) olarak belirledik. Çalışmamızda EGFR geninde en sık gözlemlenen varyasyon p.Thr790Met (%20,3) olarak saptanmıştır. EGFR geninde meydana gelen p.Thr790Met varyasyonu hastaların %60'ında EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine karşı birincil dirençten sorumludur ve üçüncü basamak tirozin kinaz inhibitörleri ile ilişkilidir. EGFR geninde bu varyasyonun meydana gelmesi ile threonin aminoasitinin yerini metionin aminoasiti alır ve ATP bağlanması için reseptörün ilgisini azaltır. Böylece birinci ve ikinci kuşak tki'lerin etkisini sınırlandırır. Hastalığın tedavisi planlanırken p.Thr790Met varyasyonunun olup

olmadığına bakılması tedavinin planlanması için önemlidir (O’Kane ve diğ. 2018). Egfr geninde saptadığımız bir diğer varyasyon ise p.Leu858Arg (%20,3) değişimidir ve en sık saptadığımız delesyon ise %16,2 bir orana sahip olan p.Glu746_Ala750del değişimidir. Klinik olarak anlamlı EGFR varyasyonlarından biri p.Glu746_Ala750del delesyonudur ve tüm varyasyonların %45’ini oluşturur. Bir diğeri de ekzon 21’deki lōsinin arjinine dönüşmesine neden olan p.Leu858Arg nokta mutasyonudur. Bu varyasyonlardan birine sahip olan kanser hücresi sürekli çoğalma eğilimindedir (Brückle ve diğ. 2016).

Akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde PIK3CA genine ait gen amplifikasyonları, delesyonları ve daha sıklıkla yanlış anlamlı varyasyonlar saptanmıştır (Çalışkan 2015). Çalışmamızda PIK3CA genine ait varyasyon oranı %20,9 olarak saptanmıştır. Lina Z. ve ark. 2013 yılında Çin’de küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarıyla yaptıkları çalışmada PIK3CA gen varyasyon oranını %20,5 olarak saptamışlardır. Metin Ç. ve ark. 2018 yılında küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarıyla Türkiye’de yaptıkları çalışmada PIK3CA gen varyasyon oranını %7,5 olarak saptamıştır. Metin Ç. ve ark. parafin bloğa gömülü doku kullanarak varyasyon analizi yapmışlardır. Buldukları oranın bizim oranımızdan düşük olduğu görülmektedir. Bu farklılığın sebebinin kullanılan tekniklerin farklı olması ve doku parçasının yeterli tümör hücresi içermemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

MET geninde meydana gelen düzensizlikler yüksek ekspresyon, amplifikasyon, varyasyon ve epigenetik değişiklikler gibi farklı mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır (Robinson ve diğ. 2013). Çalışmamız kapsamında MET geninde meydana gelen varyasyon oranı %18,6 olarak saptanmıştır. Maria S. ve arkadaşları 2016 yılında akciğer kanseri hastalarında likit biyopsi tabanlı yaptıkları gen varyasyon analizi sonucunda MET geninde varyasyon oranını %17,5 olarak saptamışlardır. Michele B. ve arkadaşları 2008 yılında küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarından alınmış parafin bloğa gömülü doku parçasını kullanarak yaptıkları çalışmada MET amplifikasyon oranını %21 olarak saptamışlardır. Xavier M. ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada MET geni varyasyon oranını %18,5 olarak saptamışlardır. Yapılan literatür araştırmalarının çalışmamızda saptadığımız MET geni varyasyon oranı ile uyumlu olduğu görüldü.

Bir GTPaz olan K-ras proteini, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi bir çok biyolojik olayda görev alır. KRAS geninde nokta mutasyon olması sonucunda Kras proteininin şekli değişir ve anormal şekilde GTPaz aktivitesi gösterir. Buna bağlı olarak

sürekli aktif olan protein hücre çoğalmasını tetikler (Krypuy ve diğ.2008, Pao ve diğ. 2007). Çalışmamızda KRAS geninde varyasyon oranı %18,6 olarak saptanmıştır. Metin Ç. ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada KRAS geninin varyasyon oranını %28,7 olarak saptamışlardır. Tengeng ve ark. 2014 yılında küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarında yaptıkları çalışmada KRAS geni varyasyon oranını %8,5 olarak saptamıştır. Çalışmalarında parafin bloğa gömülü doku parçasını kullanmışlardır. Saptadıkları oran bizim oranımızdan oldukça düşük bulunmuştur. Bu farklılığın kullanılan iki tekniğin farklı olmasından ve doku parçasının yeterli tümör hücresine sahip olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Marks ve ark. yaptıkları çalışmada KRAS geni varyasyon oranını kadınlarda %15,3, erkeklerde %19,2 olarak saptamışlardır. Billah S. ve arkadaşları 2011 yılında ABD’de küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarıyla yaptıkları çalışmada KRAS varyasyon oranını %23,6 olarak saptamışlardır. Çalışmamızın literatür verileriyle uygun olduğu görülmektedir.

ALK insulin reseptör tirozin kinaz alt ailesinin bir üyesidir. Hücrenin apoptoz baskılanmasında ve hücre çoğalmasında görev alır. ALK geninde bir varyasyon oluşması sonucunda tirozin kinaz aktivitesi göstererek hücrenin sürekli olarak çoğalmasını sağlar. (Amin ve Lai 2007). Tez çalışmamızda ALK varyasyonu hastalarda %16,2 oranında saptanmıştır. Zhuang X. ve ark. 2014-2017 yılları arasında küçük hücre dışı akciğer kanseri tanısı almış Çinli hastalardan aldıkları parafin bloğa gömülü doku örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada ALK gen varyasyon oranını %5,5 olarak saptamışlardır. Lee T. ve ark. küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarından çeşitli yöntemlerle aldıkları parafine gömülü doku parçasından yaptıkları çalışmada ALK gen varyasyon oranını %5,8 oranında saptamışlardır. Literatür taraması sonucu bulunan oranların bizim çalışmamızın sonucunda saptadığımız orandan düşük olduğu görülmektedir. Bu farklılığın sebebi olarak; kullanılan tekniklerin farklı oluşu, çeşitli biyopsi yöntemleri sonucu alınan doku parçasının tümör yükünün az olabileceği, tümör heterojenitesinin doku parçasında tespitinin zor olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

MAP2K1 (mitojen aktive edici protein kinaz) geninde meydana gelen herhangi bir delesyon ya da varyasyon hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını artırır (Cowley 1994). Tez çalışmamızda MAP2K1 geni varyasyon oranını %16,2 olarak saptadık. Nicos M. ve arkadaşları 2016 yılında küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarından aldıkları parafin bloğa gömülü doku örneklerini PCR tekniğiyle çoğaltarak varyasyon analizi yapmışlar ve MAP2K1 geninde varyasyon oranını %1 olarak saptamışlardır. Bu oran bizim

çalışmamızda saptadığımız orandan düşüktür. Bizim çalışmamız çok daha hassas olan yeni nesil dizileme tekniği ile yapılmıştır. Varyasyon oranlarının farklı olması iki tekniğin birbirinden farklı olmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmüştür. Parafin bloğa gömülü doku parçasının tümör yükünün az olabileceğini düşündürmektedir. Solid ve likit biyopsi örneklerinden elde edilen tümör yükünün farklılığından kaynaklanabilecek bir durumda göz önünde bulundurulmalıdır.

BRAF geni hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında ve transkripsiyonel faaliyetlerinde görev alır. Bu gende meydana gelen varyasyon sonucu sürekli olarak hücre çoğalması ve farklılaşması görülür. (Leicht ve diğ. 2007). Tez çalışmamız kapsamında BRAF geni varyasyon oranını %9,3 olarak saptadık. Mutlu D. ve ark. 2014 yılında parafin bloğa gömülü doku parçasından Türkiye’de akciğer kanseri varyasyon oranlarını değerlendirdikleri çalışmada BRAF geni varyasyon oranını %4,7 olarak saptamışlardır. Cardarella S. ve ark. 2013 yılında akciğer kanseri hastalarının parafin bloğa gömülü dokusundan yaptıkları çalışmada BRAF varyasyon oranını %4 olarak saptamışlardır. Çalışmamız literatür ile yakındır. Ancak bizim çalışmamız sonucunda oran daha yüksek bulunmuştur. Kullanılan materyallerin ve tekniklerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

NRAS, RAS gen ailesinin bir üyesidir. RAS genlerinin ürünleri olan Ras proteinleri GTP bağlanmasıyla aktif hale geçerler. RAS genlerinde varyasyon meydana gelirse proteinler sürekli aktif hale gelerek hücre çoğalmasını tetikler (Nanda ve diğ. 2010). Tez çalışmamızda NRAS geninde varyasyon oranı %6,9 olarak saptanmıştır. Irfan Shaukat ve ark. 2018 yılında akciğer kanseri hastalarının parafin bloğa gömülü dokularını kullanarak yaptıkları çalışmada NRAS geni varyasyon oranını %3,18 olarak saptamışlar. 2013 yılında Kadoaki O. ve farklı ülkelerden bilim insanlarının ortaklaşa 4562 akciğer kanseri hastası ile yaptıkları çalışmada NRAS geni varyasyon oranını %0,7 olarak saptamışlardır. Yapılan literatür araştırması çalışmamız ile yakındır. Bizim çalışmamızın hasta sayısının daha az olması ve test tekniklerinin farklı olmasından dolayı oranımızın yüksek saptandığı düşünülmektedir.

ROS1 geni hücre büyümesinde ve çoğalmasında görev alır. Gende varyasyon meydana geldiğinde sürekli hücre çoğalması görülür (Zhang ve diğ. 2010). Tez çalışmamızda ROS1 geni varyasyon oranı %2,3 olarak saptanmıştır. You-Cai Z. ve arkadaşları 2019 yılında 67 hasta ile yaptıkları çalışmada ROS1 gen varyasyon oranını %2,56 olarak saptamışlardır.

Jongmin L. ve arkadaşları 2019 yılında Güney Kore’de yaptıkları çalışmada ROS1 geni varyasyon oranını %3,4 olarak saptamışlardır. Çalışmamızın literatür ile uyumlu olduğu görüldü.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız tez çalışması sonucunda; likit biyopsi yöntemi doku elde edilemeyen ya da doku biyopsisi için uygun olmayan hastalarda hedeflenebilir varyasyonların incelenmesi açısından hızlı sonuçlanan ve invaziv olmayan alternatif bir metod olarak bazı kanser türlerinin tanısında yol gösterici olmaktadır. Likit biyopsi testi ile plazmada düşük oranda gözlenebilen varyasyonların kabiliyeti ve tümör genotipindeki değişikliklerin durumunun belirlenmesi hasta bireylere avantaj sağlamaktadır. Hedef gen paneli analizlerinin tedavide klasik kemoterapinin yanı sıra gene yönelik akıllı ilaç önermede oldukça etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Likit biyopsi testi hastalığın ilerleyişinin takibi ve hastaların tedaviye yanıtlarının izlenmesi için gerektiğinde tekrar edilebilir bir yöntem olarak klinik açıdan önemlidir. NGS tabanlı likit biyopsi testi ile genomik değişikliklerin tanımlanması, hedeflenen terapötiklere dinamik olarak yanıtın ve direncin izlenmesi ve erken evre akciğer kanseri tanısı mümkün olabilmektedir. Bu testin klinik açıdan daha iyi fayda sağlaması için kullanımının yaygınlaşması ve ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ak G: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri :Tanı ve Evreleme. İç:Özlü T, Metintaş M, Karadağ M, Kaya A , Solunum Sistemi ve Hastalıkları Temel Başvuru Kitabı. İstanbul, *İstanbul Tıp Kitabevi*;2010. s.1397-1421
- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest Journal* .2003;123(1):21S-49S.
- Almodovar K, Iams W, Meador C ve diğ., Longitudinal Cell-Free DNA Analysis in Patients with Small Cell Lung Cancer Reveals Dynamic Insights into Treatment efficacy and Disease Relaps,*J Thorac Oncol*. 2018Jan; 13(1):112-123 (doi:10.1016/j.jtho.2017.09.1951)
- Amin HM, Lai R, Pathobiology of ALK+ Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2259-67.
- Arınç S, Özvaran MK, Güngör N, Hastanemizde Tanı Alan Akciğer Kanseri Olguların Epidemiyolojik ve Histolojik Özellikleri. *Klinikleri Akciğer*, 2005;6:149-52
- Ashworth, TR A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *The Medical Journal of Australia*, 14, 146-147, 1869
- Billah, Shahreen, ve diğ. "EGFR and KRAS Mutations in Lung Carcinoma." *Cancer Cytopathology* 119.2 2011: 111-117.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I ve diğ. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancer in 185 Countries, *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424, 2018, Erişim Tarihi: 26.12.2018
- Brombilla E, Travis WD, Colby TV ve diğ. The New World Health Organization Classification of Lung Tumors, Series "Highlights in Lung Cancer", Number 3 in This Series, *Eur Respir J* 2001;18:1059-1068, UK,(doi:10.1183/09031936.01.00275301)
- Brückle W, Tufman A, Huber RM, Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) with Activating EGFR Mutations: First Line Treatment with Afatinib and Other EGFR TKIs, Expert Review of Anti Cancer Therapy, 2016 doi:10.1080/14737140.2017.1266265
- Callejo-Perez David, Romero Atocha, Provencio Mariano, Torrente Maria, Liquid Biopsy Based Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer for Diagnosis and Treatment Monitoring, *Trans Lung Cancer Res* 2016;5(5):455-465
- Canbaz P., Akciğer Kanseri Tumorün Yaygınlığı ile Klinik Tablonun İlişkisi ve Akciğer Kanseri Evrelemesinde Klasik Tarama Yöntemi ile PET/BT'nin Karşılaştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2011
- Cardarella S, Ogino A ,Nishino M, Clinical, Pathologic, and Biologic Features Associated with BRAF Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer, *Clin Cancer Res*; 19(16) August 15, 2013
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM ve diğ. Mosaic Blood Vessels in Tumors: Frequency of Cancer Cells in Contact with Flowing Blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14608-14613.
- Chadhuri AA, Chabun JJ, Lovejoy AF, ve diğ. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discovery* 2017; 7: 1394-403.
- Choi YL, Takeuchi K, Soda M, ve diğ. Identification of Novel Isoforms of the EML4-ALK Transforming Gene in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*. 2008;68(13):4971-6.
- Christopherson W, Cancer Cells in the Peripheral Blood: A Second Look. *Acta Cytologica*, 1965, 9, 169-174
- Cowley S, Peterson H, Kemp P, Marshall CJ, Activation of MAP Kinase is Necessary and Sufficient for PC12 Differentiation and for Transformation of NIH 3T3 Cells. *Cell*. 1994;77:841-5
- Çalışkan M, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tanılı Hastalara Ait Parafin Blok Kesitlerinde EGFR, KRAS, BRAF, PIK3A, HER2 ve NRAS Gen Mutasyonlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015

Çok G, Akciğer Kanserinde TNM Evrelemesi, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Derleme,2018, doi:10.4274/nts.2018.001

Depierre A, Milleron M, Moro-Sibilot D ve diğ. Preoperative Chemotherapy Followed by Surgery Compared with Primary Surgery in Resectable Stage I (Except T1N0), II, and IIIa Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO*; 2002; 247-253.

Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP ve diğ. International Lung Cancer Trends by Histologic Type: Male:Female Differences Diminishing and Adenocarcinoma Rates Rising. *Int J Cancer*. 2005;117:294-9.

Dogan Mutlu ve diğ. "The Relationship Between Common EGFR, BRAF, KRAS Mutations and Prognosis in Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer with Response to the Treatment in Turkey." *International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi* 24.1 2014.

Ekinçi S, Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinde PIK3CA Mutasyonlarının Araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2014

Elmore, S; 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 4, 35, 495-516.

Engell, HC (1955) Cancer Cells in the Circulating Blood: A Clinical Study on the Occurrence of Cancer Cells in the Peripheral Blood and in Venous Blood Draining the Tumor Area at Operation. *Acta chirurgica Scandinavica Supplementum*, 201, 1- 70.

Ergelen R, Çimşit NC, Akciğer Tümörleri, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, 2013,(doi: 10.5152/tcb.2013.30)

Frattini M, Gallino G, Signoroni S ve diğ. Quantitative and Qualitative Characterization of Plasma DNA Identifies Primary and Recurrent Colorectal Cancer. *Cancer Lett*. 2008;263:170–81.(doi 10.1016/j.canlet.2008.03.021)

GeneCards Erişim Tarihi:20.01.2019.<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=egfr>

Goldsmith SJ, Kostakoglu LA, Somrov S, Palestro CJ. Radionuclide Imaging of Thoracic Malignancies. *Thorac Surg Clin* .2004; 14:95-112.

Hatipoğlu T , Akciğer Kanserinde Moleküler Tedavi Hedeflerinin Saptanması Amaçlı ve Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Tanı Kiti, syf 2,Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 2016

Heelan RT, Demas BE, Carevelli JF et al. Superior Sulcus Tumors: CT and MR Imaging *Radiology* 1989; 170: 637-41.

Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry* 2015; 61; 112-23.

Huang ZH, Li LH, Hua D. Quantitative Analysis of Plasma Circulating DNA at Diagnosis and During Follow-up of Breast Cancer Patients. *Cancer Lett*. 2006;243:64–70

Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit, User Guide, Katalog No:A29900, Ion Torrent Thermo Fisher Scientific

Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3, User Guide, Katalog No:4488315, Ion Torrent by Life Technologies

Irfan Shaukat, Jason J. Kern, Naseruddin Höti ve diğ. Detection of RAS and RAS-Associated Alterations in Primary Lung Adenocarcinomas. A Correlation Between Molecular Findings and Tumor Characteristics. 2018, (doi: 10.1016/j.humpath.2018.09.004)

Jiayi Zhao, Yiping Han, Jiamei Li, Rong Chail, Chong Bai, Prognostic Value of KRAS/TP53/PIK3CA in Non-Small Cell Lung Cancer, *Oncology Letters* 17: 3233-3240, 2019(doi: 10.3892/ol.2019.10012)

Jongmin Lee , Chan Kwon Park , Hyoung-Kyu Yoon, ve diğ., PD-L1 expression in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer: A study using simultaneous genotypic screening of EGFR, ALK, and ROS1, *Thoracic Cancer* 10 (2019) 103–110

Kayacan O, Beder S, Tanısal Bronkoskopi. İç: Özönal C, Üstün U, editör. Göğüs Hastalıkları. Ankara, Poyraz Yayıncılık; 2009. s.167-169

Keller SM, Adak S, Wagner H ve diğ. Mediastinal Lymph Node Dissection Improves Survival in Patients with Stage II and IIIA Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 358-66.

Kramer H, Harry JM Groen, Current Concepts in the Mediastinal Lymph Node Staging of Nonsmall Cell Lung Cancer. *Ann Surg* 2003 ; 238: 180-88.

Krypuy M, Newnhawn GM, Thomas DM, ve diğ. High Resolution Melting Analysis for the Rapid and Sensitive Detection of Mutations in Clinical Samples: KRAS Codon 12 and 13 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer, 2006, *BMC Cancer*, 6:295

Lane D. p53, Guardian of the Genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.

Lardinois D, Weder W, Hany TF ve diğ. Staging of Nonsmall Cell Lung Cancer with Integrated Positron-Emission Tomography and Computed Tomography. *N Engl J Med*. 2003; 348:2500-7.

Lee T, Lee B, Choi Y ve diğ., Non-Small Cell Lung Cancer with Concomitant EGFR, KRAS, ALK Mutation: Clinicopathologic Features of 12 Cases, *J Pathol Transl Med*. 2016;50(3):197-203 (doi:10.4132/jptm.2016.03.09)

Leicht DT, Balan V, Kaplun A ve diğ. Raf Kinases: Function, Regulation and Role in Human Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1196-212.

Lina Zhang¹, Lei Shi, Xiaoting Zhao, Yue Wang, Wentao Yue. *OncoTargets and Therapy* 2013;6 497–502
Loeb LA , Emster VJ , Warner KE ve diğ. Smoking and Lung Cancer: An Overview, *Cancer Research* 1984;44:5940-58

Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR. Next-generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers (Basel)* 2015;7:2023–2036. (doi: 10.3390/cancers7040874)

Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. Oncogenesis by Retroviruses: Old and New Paradigms. *Reviews in Medical Virology*, 2008, 18: 387-405.

Maria Schwaederle, Hatim Husain, Paul T. Fanta ve diğ., Detection Rate of Actionable Mutations in Diverse Cancers Using a Biopsy-Free (blood) Circulating Tumor Cell DNA Assay, *Oncotarget*, Vol. 7, No. 9

Marks JL, Broderick S, Zhou Q ve diğ. Prognostic and Therapeutic Implications of EGFR and KRAS Mutations in Resected Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 3: 111-116, 2008.

Metin Çalışkan, Gökay Bozkurt, Nezi Meydan, İbrahim Meteöglu, Nur Selvi Günel, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Onkogen Mutasyonlarının Araştırılması, *SDÜ Tıp Fak Derg*, 2018;25(3)322-328

Miche`le Beau-Faller, Anne-Marie Ruppert, Anne-Claire Voegeli ve diğ., MET Gene Copy Number in Non-small Cell Lung Cancer: Molecular Analysis in a Targeted Tyrosine Kinase Inhibitor Naıve Cohort, *Journal of Thoracic Oncology* Volume 3, Number 4, April 2008

Molina-Vila. Liquid Biopsy in Lung Cancer: Present and Future. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5: 452-4. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review. 1975-2010. 2011;28:5-30.

Nanda MS, Sameer AS, Syeed N, Shah ZA, Murtaza I, Siddiqi MA, Ali A. Genetic Aberrations of the K-ras Proto-Oncogene in Bladder Cancer in Kashmiri Population. *Urol J*. (2010);7:168-73

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson & Thompson Genetics In Medicine, 7. edition, Chapter 16, Canada, 2007

Ohashi Kadoaki ve diğ. "Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations." *Clinical Cancer Research* 19.9 (2013): 2584-2591.

O’Kane GM, Barnes TA, Leighl NB, Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors,T790M and Clinical Trials, *Current Oncol.* 2018 Jun;25(S1):S28:S37

Özlü T, Torasentez ve Plevra Biyopsisi. İç: Zamani A, Ardiç S,editör. Göğüs Hastalıklarında Ayrıcı Tanı, *Toraks Kitapları.* Sayı 7, Ankara, 2009; s.421-435

Pao W ve Ladany M,Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Testing in Lung Cancer: Searching For the İdeal Method, 2007, *Clin. Cancer Res.*, 13(17):4954-4955

Pauwels P, Mutations in Lung Cancer With Clinical Significance,2012, (doi:10.5152/tcb.2012.27)
Progress in Lung Cancer: Celebrating 40 Years of the IASLC and Research Advancements (1974-2013). IASLC Press, 2013.

Ramirez-Perez Cristina, Garre-Canadas Marisa, Robles Ana I. ve diğ. Liquid Biopsy in Early Stage Lung Cancer,2016, *Transl Lung Cancer Res* 2016;5(5):517-524

Ranuncolo SM Towards the Dreamed Biomarkers? 2016; *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, S2, e002

Robbins K (Çeviri: U Çevikbaş). Solunum Sistemi. 21th. İstanbul: *Nobel & Yüce*; 1995: S.385-437.

Robinson KW, Sandler AB. The role of MET Receptor Tyrosine Kinase in Non-Small Cell Lung Cancer and Clinical Development of Targeted anti-MET Agents. *Oncologist.* 2013; 18(2): 115-122.

Santarpia M, Altavilla G, Salazar MF, et al. Tyrosine Kinase İnhibitors for Non-small-Cell Lung Cancer: Finding Patients Who will be Responsive. *Expert Rev Respir Med* 2011; 5: 413-24.

Savaş İ, Onkogenler, *Temel Klinik Tıp Bilimleri*, 1995, 15:374-377

Sebnem Ozemri Sag, Ozlem Gorukmez, Mehmet Ture ve diğ. Spectrum of EGFR Gene Mutations and ALK Rearrangements in Lung Cancer Patients in Turkey,2016, (doi:10.1186/s40064-016-2150-4)

Sethi N, Kang Y. Unravelling the Complexity of Metastasis - Molecular Understanding and Targeted Therapies. *Nat Rev Cancer* 2011;11:735-748.

Sequist, LV, Heist, RS, Shaw AT ve diğ. Implementing Multiplexed Genotyping of Non-Small-Cell Lung Cancers into Routine Clinical Practice,2011; *Annals of Oncology*, 22(12), 2616-24.

Scagliotti GV, Fossati R, Torri V. ve diğ. Randomized Study of Adjuvant Chemotherapy for Completely Resected Stage I, II or IIIA Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1453-61.

Schrock A, Pavlick D, Klemptner S, Hybrid Capture–Based Genomic Profiling of Circulating Tumor DNA from Patients with Advanced Non–Small Cell Lung Cancer,*Clin Can Res.* 2018 Apr 15;24(8):1881-1890 (doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3103)

Sher T, Grace K, Alex A, Small Cell Lung Cancer, Symposium on Solid Tumors, *Mayo Clin Proc.*2008;83(3):355-367,2008

Soria JC, Brisgand D, Le Chevalier T. Do All Patients with Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer Benefit from Cisplatin Based Combination Therapy. *Ann Oncol* 2001; 12: 1667-70.

Sozzi G, Conte D, Mariani L ve diğ. Analysis of Circulating Tumor DNA in Plasma at Ddiagnosis and During Follow-up of Lung Cancer Patients. *Cancer Res.* 2001;61:4675–8.

Sozzi G, Conte D, Leon M ve diğ. Quantification of Free Circulating DNA as a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3902-8.

Tengteng Wang, Tao Zhang, Xiaoxue Han ve diğ. Impact of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of stage IA

adenocarcinoma of the lung: Correlation between computed tomography images and EGFR and KRAS gene mutations, *Experimental and Therapeutic Medicine* 9: 2095-2103, 2015, (doi: 10.3892/etm.2015.2422)

Tchia MM, Holmes MD, McLennan G. The Molecular Biology of Lung Cancer. *Med J Australia* 1991;154:501-503.

Thomas A, Rajan A, Lopez-Chavez A, Wang Y, Giaccone G. From Targets to Targeted Therapies and Molecular Profiling in Non-small Cell Lung Carcinoma. *Ann Oncol.* 2013 Mar;24(3):577-85.

Türkiye Kanser İstatistikleri 2015 Erişim Tarihi:25/12/2018 <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/1026-2015-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html>

Ulas A, Tokluoglu S, Kos M. ve diğ. Lung Cancer in Women, a Different Disease: Survival Differences by Sex in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(2):815-22.

Ünal OÜ, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri EGFR Mutasyon Durumu ile Klinikopatolojik Özelliklerin Korelasyonu, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı, 2012

Unal OU, Oztop I, Calibas G. ve diğ. Relationship between epidermal growth factor receptor gene mutations and clinicopathological features in patients with non-small cell lung cancer in western Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev* ,2013,14:3705–3709

Vesselle H, Pugsley JM, Vallieres E. ve diğ. The Impact of Fluorodeoxyglucose F-18 Positron-Emission Tomography on the Surgical Staging of Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 511-19

Victor D. Li , Karen H. Li, John T. Li, TP53 Mutations as Potential Prognostic Markers for Specific Cancers: Analysis of Data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*,2018

Yardımcı EH, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Uzun Dönem Sonuçlarla 7. ve 8. TNM Evrelemesinin Karşılaştırmalı Değerlendirmesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıpta Uzmanlık Tezi,2018

Yener NA, Apa DD, Akciğer Kanseri Morfolojik Tanı ve Sınıflama, *Türk Radyoloji Derneği*, Trd Sem;2014: 2: 281-289, Erişim Tarihi:27.12.2018

You-Cai Zhui, Xin-Gen Zhang , Xue-Ping Lin ve diğ., Clinicopathological Features and Clinical Efficacy of Crizotinib in Chinese Patients with ROS1-positive Non-Small Cell Lung Cancer, *Oncology Letters* 17: 3466-3474, 2019 (doi: 10.3892/ol.2019.9949)

Yudong Wang, Zhijie Wang, Sarina Piha-Paul ve diğ. Outcome Analysis of Phase I Trial Patients with Metastatic KRAS and/or TP53 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer, *Oncotarget*,2018

Zhang X ve Chang A, Molecular Predictors of EGFR-TKI Sensitivity in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer, 2008,*Int.J.Met.Sci.*, 5(4):209-217

Zhang X, Zhang S, Yang X. ve diğ. Fusion of EML4 and ALK is Associated with Development of Lung Adenocarcinomas Lacking EGFR and KRAS Mutations and is Correlated with ALK Expression. *Mol Cancer.* 2010;9:188.

Zhivotosky, B. ve S. Orrenius; 2001. Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 18, Unit 18.13.

Zhuang X, Zhao C, Li J ve diğ., Clinical Features and Therapeutic Options in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Concomitant Mutations of EGFR,ALK,ROS1,KRAS or BRAF, *Cancer Medicine* 2019 (doi:10.1002/kam4.2183)

Zill OA, Mortimer S, Banks KC, Nagy RJ, Chudova D, Jackson C, et al. Somatic genomic landscape of over 15,000 patients with advanced-stage cancer from clinical next-generation sequencing analysis of circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2016;34(suppl 15):abstr 587s.

Warren W, Faber P, Gould V . Neuroendocrine Neoplasms Of The Lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98:321-332.

WHO Erişim Tarihi: 25/12/2018 <https://www.who.int/cancer/en/>

Xavier M, Anne-Marie R, Martine A ve diğ., c-MET Overexpression as a Poor Predictor of MET Amplifications or Exon 14 Mutations in Lung Sarcomatoid Carcinomas, *J Thorac Oncol* ,2018 Aralık;13(12):1962-1967 (doi: 10.1016 / j.jtho.2018.08.008.)



ÖZGEÇMİŞ

1.BİREYSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Malike İNCE

Doğum Yeri ve Tarihi: 31.12.1994-Sakarya

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi: Kirazlı Mah. Karadere Sok. No:119 Kocaali/Sakarya

Telefon No: (0262) 303 88 40

2.EĞİTİM DURUMU

2012-2016: Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

2009-2012: Karasu Şehit Üsteğmen İbrahim Abanoz Anadolu Lisesi

STAJLAR

2015: Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvar Stajı

2013: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı Stajı

YABANCI DİL

İngilizce

3.ÜNVANLARI

2016- Moleküler Biyolog

4.MESLEKİ DENEYİMİ

-Periferik lenfosit kültürü

-Kemik iliği kültürü

-Amniyon sıvısı kültürü

-Postnatal-prenatal kromozom analizi

-FISH(Floresan in situ hibridizasyon)(doku/periferik kan)

- FISH(Floresan in situ hibridizasyon) analizi
- cfDNA (cell free DNA) İzolasyonu
- Likit Biyopsi
- Agaroz Jel Elektroforezi
- Real Time PCR
- DNA ve RNA İzolasyonu
- NGS (Next Generation Sequencing)

5.BİLİMSEL ETKİNLİK

Naci Çine, **Malike İnce**, Şebnem Özdemir, Ayşegül Şahin, Nilüfer Sertdemir, Gülhan Demir, Seda Reka, Pelin Balçık Erçin, Hakan Savlı. *Akciğer Kanserinde NGS Tabanlı Likit Biyopsi Yönteminin Etkinliği ve Kişiyeye Yönelik Tedavi Yaklaşımlarındaki Önemi*. Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, 2019- Kocaeli

EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr

Başvuru Bilgileri	Araştırmacının Adı	Akciğer Kanseri Hastalarında Likit Biyopsi Yönteminin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2019/89			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Doç. Dr. Naci ÇİNE			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji AD			
	Destekleyici				
	Araştırmacının Türü	Yüksek Lisans Tezi			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
	Başvuru Dilekçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başvuru Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmacının Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosya ve görüntü kayıtları gibi retrospektif arşiv taraması
	Araştırma Protokolü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay Formu	18.10.2017/KOGGOK01.2	1/2

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2019/48 / Proje No: 2019/89 / Tarih: 01/04/2019
	Doç. Dr. Naci ÇİNE sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyoistatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Semil Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Dr. Öğretim Üyesi Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	
Dr. Öğretim Üyesi Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	K	E	H	E	H	

* Gerekeç ve öneriler:

KÜ Girişimci Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.lu	Sayfa
	Onay İsmi	18.10.2017/ROG0EK01.2	2/2