

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA SOLİD BİYOPSİ VE LİKİT
BİYOPSİ YÖNTEMLERİNİN HASTALIK TANISI ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül ŞAHİN

Kocaeli Üniversitesi
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 SOLİD BİYOPSİ VE LİKİT
BİYOPSİ YÖNTEMLERİNİN HASTALIK TANISI ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül ŞAHİN

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

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

KOCAELİ
2019

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Akciğer Kanseri Hastalarında Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi Yöntemlerinin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması

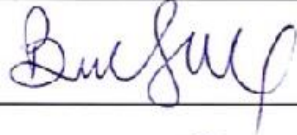



Tez yazarı: Ayşegül ŞAHİN

Tez savunma tarihi: 25.06.2019

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Naci ÇİNE

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji

Anabilim Dalı'nda BİLİM UZMANLIĞI / Yüksek Lisans TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	BURCU VURAL	
ÜYE(DANIŞMAN)	Naci ÇİNE	
ÜYE	Deniz H. Akdoğan	
ÜYE	Sema Aşkin Keçeli	

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 Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi Yöntemlerinin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması

Amaç: Akciğer kanseri tüm dünyada insidans ve mortalite oranları bakımından bütün kanserler arasında ilk sırada yer alır ve sağkalım süresi, tedaviye yanıtın düşüklüğü gibi sebeplerle bireye özgü takip gerektirmektedir. Hastanın genetik bilgileri ışığında tedaviye olası yanıtın değerlendirilmesi hastalar için oldukça önemlidir. Bu çalışma ile akciğer kanseri hastalarında tanı ve tedavide büyük önem taşıyan moleküler hedeflerin ve buna bağlı olarak hedefleyici tedavilerin solid biyopsi ve likit biyopsi yöntemleri ile araştırılması ve her iki yöntemin etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda akciğer kanseri tanılı 30 hastada Likit Biyopsi (LB) testi kapsamında Yeni Nesil Dizi Analizi (NGS) yöntemiyle 11 gen taranmış ve analiz edilmiştir. Aynı hasta grubundan çeşitli girişimsel işlemler ile elde edilmiş biyopsi materyallerinde saptanan mutasyon verileri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Belirlenen mutasyonların sıklığı ve varlığı üzerinden her iki yöntem araştırılmıştır.

Bulgular: NGS tabanlı Likit Biyopsi testi kapsamında hastaların EGFR, TP53, PIK3CA, MET, MAP2K1, ALK, KRAS, BRAF ve NRAS genlerinde çeşitli varyasyonlar saptanmıştır. Saptanan bazı varyasyonlar ilaçlarla ilişkilendirilmiştir. Solid biyopsi materyali ile yapılan çalışmalara ait veriler değerlendirilmiş, hastaların EGFR ve ROS1 genlerinde mutasyona rastlandığı kaydedilirken, solid biyopsi materyaliyle çalışma yapılan hiçbir hastada ALK geninde mutasyon gözlenmemiştir.

Sonuç: Likit biyopsi çalışmaları günümüzde altın standart olarak kabul edilen solid biyopsiye alternatif oluşturmakta ve tümör genotipindeki değişikliklerin güncel durumunun izlenmesinde hasta bireylere avantaj sağlamaktadır. Yapılan çalışmanın sonucunda solid biyopsi ve likit biyopsi yöntemleri ile araştırılan mutasyonlar arasında bir uyum olduğu gözlenmiş olup hedef gen paneli analizlerinin tedavide hedefe yönelik ilaç önermede oldukça etkili bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

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

Abstract

Investigation of the Effect of Solid Biopsy and Liquid Biopsy Methods on Disease Diagnosis in Lung Cancer Patients

Objective: Lung cancer is the first stage among all cancers in terms of incidence and mortality rates all over the world. It is a disease that requires routine and individual follow-up due to reasons such as survival time, low response to treatment. Evaluation of the possible response to treatment in the light of the patient's genetic information is very important for patients. The aim of this study is to investigate the molecular targets that are of great importance in the diagnosis and treatment of lung cancer patients and accordingly the targeted therapies with solid biopsy and liquid biopsy methods and to reveal the effectiveness of both methods.

Method: In our study, 11 genes were screened and analyzed with the new generation sequence analysis method in 30 patients with lung cancer. The mutation data obtained from the biopsy materials obtained by various interventional procedures of the same patient group were obtained from the patient files. The frequency and presence of the identified mutations were investigated in both methods.

Results: Various variations of EGFR, TP53, PIK3CA, MET, MAP2K1, ALK, KRAS, BRAF and NRAS genes have been determined in the scope of NGS based Liquid Biopsy test. Some variations have been associated with drugs. Data on solid biopsy materials were evaluated and mutations were observed in EGFR and ROS1 genes. No mutation was observed in ALK gene in any patient with solid biopsy material.

Conclusion: Liquid biopsy studies are an alternative to solid biopsy which is accepted as the gold standard and it provides an advantage to patient individuals in monitoring the current status of changes in tumor genotype. As a result of the study, it was observed that there was a correlation between Solid Biopsy and Liquid Biopsy methods and the target gene panel analyzes were found to be a highly effective method in the treatment of targeted drugs.

Keywords: lung cancer, solid biopsy, liquid biopsy, gene

Teşekkür

Tıbbi Genetik alanında bana çalışma fırsatı tanımış olan Prof. Dr. Hakan SAVLI' ya; yüksek lisans öğrenimim süresince tecrübe ve bilgilerinden büyük ölçüde istifade ettiğim, değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye; Dr. Öğr. Üyesi Seda Eren KESKİN'e; tezde yer alan deneylerin gerçekleştirilmesinde emekleri olan ve tüm yardımseverliğiyle sorularımı cevaplayarak, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Nilüfer SERTDEMİR, Uzm. Biyolog Gülhan DEMİR ve Uzm. Biyolog Seda REKA'ya; sitogenetik alanında büyük bilgi birikimlerini sabırla ve tüm içtenlikleriyle paylaşarak bu alanda çok şey öğrenmeme vesile olan Uzm. Biyolog Buket DOĞRUOĞLU ve Uzm. Biyolog Zeynep İLKAY'a; yardımlarını esirgemeyen ve her an yanımda olan, çok şey paylaştığım sevgili arkadaşlarım Şebnem ÖZDEMİR, Malike İNCE ve Gülüşan UZUNER'e; hayatımın her anında varlığıyla bana güç veren, fedakarlıklarıyla tüm sıkıntılı süreçlerimin üstesinden gelmem için bana bıkmadan yol gösteren biricik ablam Hilal ÖZKAN'a; tez çalışmam ve tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, karşılaştığım tüm zorlukları benimle birlikte göğüsleyen, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan ve vereceğim kararlarda daima yanımda olacaklarını bildiğim sevgili AİLEM'e tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum...

Ayşegül ŞAHİN

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRGESİ

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.

27 / 05 / 2019
Ayşegül ŞAHİN



İÇİNDEKİLER

Özet	iv
Abstract	v
Teşekkür	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRGESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZİMLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1 Kanserin Tanımı	1
1.2. Akciğer Kanseri	2
1.2.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi	2
1.2.2. Akciğer kanseri etiyolojisi	3
1.2.3. Akciğer Kanserinde Patolojik Sınıflama	4
1.2.3.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)	6
1.2.3.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)	6
1.2.4. Akciğer Kanserinde Moleküler Patogenez	7
1.2.4.1.Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)	7
1.2.4.2.Kirsten rat sarkoma viral onkogen homologu (KRAS)	8
1.2.4.3.Hepatosit büyüme faktörü reseptörü (MET)	8
1.2.4.4.Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa (PIK3CA)	9
1.2.4.5.V-raf mürin sarkoma viral onkogen homologu (BRAF)	9
1.2.4.6.Anaplastik Lenfoma Reseptör Tirozin Kinaz (ALK)	9
1.2.4.7. ROS proto-onkogeni	10
1.2.4.8. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2/ErbB2)	10
1.2.5. Akciğer Kanserinde Tanı Yöntemleri	10
1.2.6. Akciğer Kanserinde Evreleme	13
1.2.7. Akciğer Kanseri'nde Tedavi	16
1.3. Likit Biyopsi	19
1.3.1. Likit Biyopside Değerlendirilen Tümör Kaynaklı Ürünler	20
1.3.1.1. Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs)	20
1.3.1.2. Dolaşımdaki DNA molekülleri (cfDNA)	20

1.3.1.3. Egzozomlar	20
1.3.1.4. Tümör eğitilmiş trombositler (Tumor educated platelets: TEPs)	20
1.3.2. Tümör DNA'sı Kan Dolaşımına Nasıl Geçer?	21
1.3.3. Akciğer Kanserinde Likit Biyopsi ve Solid Biyopsi	21
1.3.4.1. Yeni nesil dizileme (NGS=Next generation sequencing)	22
2. AMAÇ	23
3. YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	24
3.1.2. Sarf Malzemeler	24
3.1.3. Kullanılan Kitler	25
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar	25
3.2. cf DNA (Serbest DNA =Circulating Cell-Free DNA) İzolasyonu	25
3.3. Likit Biyopsi	28
3.3.1. Kütüphane Oluşturma	28
3.3.2. Reaksiyon Filtresinin Doldurulması	34
3.3.3. Melt-Off Solüsyonu Hazırlığı	34
3.3.4. Dynabead'lerin Yıkanması	35
3.3.5. Template Pozitif ISPs'lerin Yıkanması	35
3.3.6. Dizileme Cihazını Başlatma	36
3.3.7. Zenginleştirilmiş ISPs'in Çıkarılması ve Yıkanması	36
3.3.8. Chip Yükleme	37
3.3.9. Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Doku Materyali ile Yapılan Testlere Ait Bulgular	39
4.2. Likit Biyopsi Materyali ile Gerçekleştirilen Analizlere Ait Bulgular	40
4.3. Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi Materyallerinde Saptanan Mutasyonlar	46
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	65
EKLER	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
BRAF	: V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene
cfDNA	: Serbest DNA (Cell Free-DNA)
CTC	: Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (Circulating Tumor Cells)
ctDNA	: Serbest Tümör DNA'sı (Circulating Tumor DNA)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
FDG	: Fluorodeoksi Glikoz
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
HER2	: Erb-b2 Reseptör Tirozin Kinaz 2
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IASC	: Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Grubu
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	: Kirsten Sıçan Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu
LB	: Likit Biyopsi
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
MET	: Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
NCCN	: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
NGS	: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDL-1	: Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı-1
PIK3CA	: Fosfoinozitol Bifosfat 3 Kinaz, Katalitik Ünite Alfa
RT	: Radyoterapi
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
ROS1	: c-Ros Oncogene 1
SIFT	: Sorts Intolerant From Tolerant

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Türkiye’de erkeklerde sık görülen bazı kanserlerin yüzde dağılımları.....	3
Çizim 1.2. Türkiye’de kadınlarda sık görülen bazı kanserlerin yüzde dağılımları.....	3
Çizim 1.3. Akciğer kanserinde tanı algoritması.....	11
Çizim 4.1. Likit biyopsi testi kapsamında akciğer kanseri hastalarında taranan gen bölgelerine göre saptanan varyasyon oranı.....	40
Çizim 4.2. 25 akciğer kanseri hastasında cfDNA varyasyonlarının sıklığı.....	41
Çizim 4.3. 19 akciğer kanseri hastasında gözlenen EGFR varyasyon bölgeleri ve sayıları.....	41
Çizim 4.4. 12 akciğer kanseri hastasında gözlenen TP53 varyasyon bölgeleri ve sayıları.....	42
Çizim 4.5. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen MAP2K1 varyasyon bölgeleri ve sayıları.....	43
Çizim 4.6. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen ALK varyasyon bölgeleri ve sayıları.....	43
Çizim 4.7. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen MET varyasyon bölgeleri ve sayıları.....	44
Çizim 4.8. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen KRAS varyasyon bölgeleri ve sayıları.....	44
Çizim 4.9. Çalışmayı oluşturan hasta grubunda likit biyopsi ve solid biyopside EGFR, ALK ve ROS1 genlerinde mutasyon saptanan hastaların sayısı.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. DSÖ 2015 akciğer tümörleri sınıflandırması.....	5
Çizelge 1.2. TNM Sınıflaması (8. Baskı).....	14
Çizelge 1.2. TNM Sınıflaması (devam).....	15
Çizelge 1.3. TNM' ye göre evre grupları.....	15
Çizelge 1.3. TNM' ye göre evre grupları (devam).....	16
Çizelge 3.1. Kütüphane oluşturmak için gerekli bileşenler.....	28
Çizelge 3.2. Termal döngü cihazı protokolü.....	28
Çizelge 3.3. DNA barkodlama için hazırlanan master miks bileşenleri.....	30
Çizelge 3.4. Barkodlama için termal döngü protokolü.....	30
Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı pcr miks bileşenleri.....	32
Çizelge 3.6. Gerçek zamanlı pcr bileşenleri.....	32
Çizelge 3.7. Gerçek zamanlı pcr programı.....	33
Çizelge 3.8. Ion S5 reagent miks bileşenleri.....	34
Çizelge 3.9. Melt-off solüsyonu bileşenleri.....	34
Çizelge 3.10. Ion one touch Es cihaz plakasında bulunan bileşenler.....	36
Çizelge 4.1. Solid biyopsi materyaliyle çalışma yapılan hasta sayısı.....	39
Çizelge 4.2. 30 akciğer kanseri hastasında gözlenen varyasyon bölgeleri ve diğer* bazı bilgiler.....	45
Çizelge 4.3. 30 akciğer kanseri hastasında gözlenen varyasyon bölgeleri ve diğer* bazı bilgiler-2.....	46
Çizelge 4.4. 30 akciğer kanseri hastasının EGFR, ALK ve ROS1 genlerine ait mutasyonların solid biyopsi ve likit biyopsi yöntemleri açısından araştırılması.....	49

1.GİRİŞ

1.1 Kanserin Tanımı

Kanser terimi ilk kez M.Ö. 460-377 yılları arasında Hipokrat tarafından organizmada meydana gelen ve tedavi edilemeyen yeni oluşumları ifade etmek için kullanılmıştır. Hipokrat, vücut yüzeyinde gelişen ve diğerlerinden farklı bir karakter taşıyan kırmızı renkli ve yavaş büyüyen şişlikleri ise "Carcinoma" olarak adlandırmıştır (Ünal 2006).

Kanser kısaca hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalmaları anlamına gelmektedir. Bu çoğalma esnasında kanser hücrelerinde, normal hücrelere göre bazı yapısal farklılıklar olduğu gibi, işlevleri açısından da çeşitli farklılıklar ortaya çıkar; hücre normalde yapması gereken işlevlerini yapmazken, öte yandan da yeni işlevler kazanmaya başlar. Anormal biçimde çoğalmaya başlayan bu hücreler buldukları yerdeki doku ve organları işgal ederler. Hatta daha uzaktaki organları da işgal ederek bu bölümlerin görevlerini yerine getirmesini engellerler. Kanseler köken aldıkları doku ve organlara göre adlandırılmaktadırlar. Belirti, bulgu ve tedavileri de kanserin cinsine göre farklılık göstermektedir. En sık rastlanan kanser türleri akciğer, deri, meme, sindirim ve üreme sistemlerinden kaynaklanan kanserlerdir (Kutluk ve Kars 1992).

Kanser dünya çapında ölüm nedenleri arasında önde gelen hastalıklardan biridir. Kanser insidansı ülkemizde ve dünyada giderek artmaktadır (Gültekin ve diğ. 2011). Dünya çapında kanserle ilişkili ölümlerin başlıca nedenini ise akciğer kanseri oluşturmaktadır (Perez-Ramirez ve diğ. 2016).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) raporuna göre, dünyada yaklaşık olarak altı kişiden biri kanser nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Bu kayıpların %70'ini düşük gelirli ve orta gelirli ülkeler oluşturmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Mayıs 2017 verilerine göre ise, Türkiye'de her 5 ölümden 1'i kanserden kaynaklanmaktadır. Türkiye'de 2014 yılında 65 yaş ve üstü için kanser ölüm oranları %17 olarak rapor edilirken, 2016 yılında bu oran %16 olarak kaydedilmiştir. 2008 yılında ise yaklaşık olarak 12,7 milyon kanser vakası teşhis edilmiş ve 2010 yılında yaklaşık 7,98 milyon kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir.

Her yıl meydana gelen ölümlerin yaklaşık %13'ü kanser nedeniyle olmaktadır. İlk sırada akciğer kanseri (1,4 milyon ölüm) sayılırken, onu mide kanseri (740.000 ölüm), karaciğer kanseri (700.000 ölüm), kolorektal kanser (610.000 ölüm) ve meme kanseri (460.000 ölüm) takip etmektedir (Xia ve diğ. 2014).

Günümüzde görülme sıklığı bakımından en önde yer alan akciğer kanseri tüm yeni kanser vakalarının %12,8'ini oluşturur ve sıklığı her yıl %3 oranında artmaktadır. Akciğer kanseri her iki cins içinde en sık kansere bağlı ölüm nedenidir. Kanser ölümlerinin %17,8'inden akciğer kanserinin sorumlu olduğu belirtilmektedir (Bakar 2017).

1.2. Akciğer Kanseri

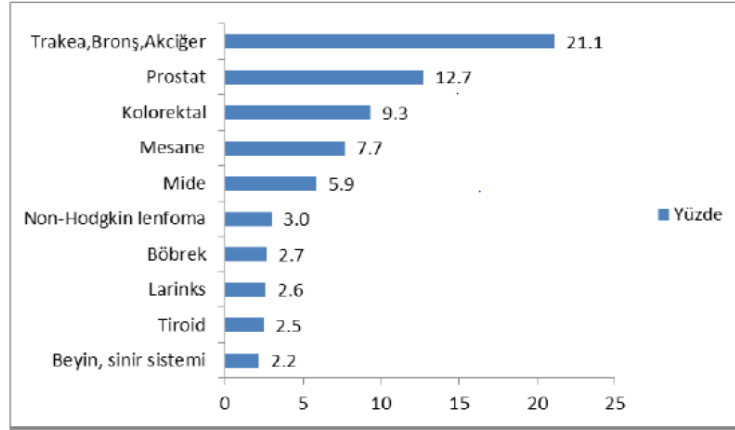
Akciğer kanseri tüm dünyada insidans ve mortalite oranları bakımından bütün kanserler arasında ilk sırada yer alan kanser türüdür. Dünyada her yıl 1,8 milyon yeni akciğer kanseri tanısı konmakta ve tüm kanserlerin yaklaşık olarak %13'ünü akciğer kanseri oluşturmaktadır (Yüce ve Kılıçkapı 2016).

1.2.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi

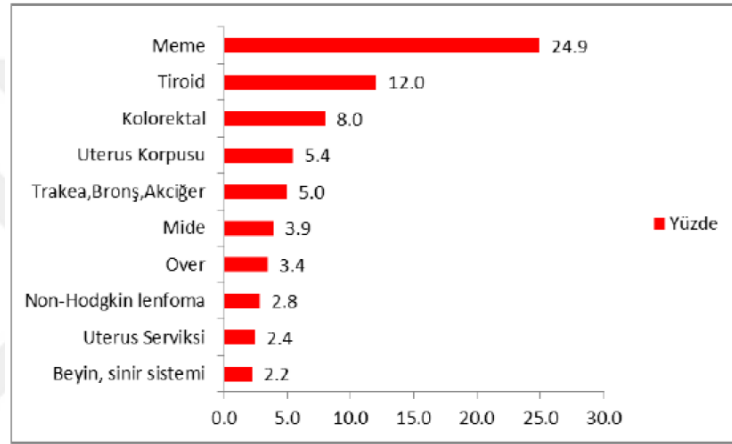
Akciğer kanseri tüm dünyada kanser nedenli ölümler arasında birinci sırada yer alır (Siegel ve diğ. 2016). Dünyadaki tüm yeni kanser olgularının %12.8'ini akciğer kanseri oluşturmaktadır. Kanser ölümlerinin ise %17.8'inden sorumludur (Parkin ve diğ. 2005). Sıklığının her yıl %3 oranında arttığı belirlenmiştir (Bingöl 2014). Sigara kullanımı ile akciğer kanseri arasındaki ilişki, ekolojik ve klinik olarak kanıtlanmış olup küresel açıdan, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, artan tütün tüketimi ile birlikte akciğer kanseri mortalitesinde de yükselme eğilimi gözlenmektedir (Didkowska ve diğ. 2016, Dela Cruz ve diğ. 2011).

DSÖ'nün verilerine göre her yıl yaklaşık 1.2 milyon yeni akciğer kanseri vakası teşhis edilmekte ve 2030 yılında bu rakamın 26 milyonu bulacağı düşünülmektedir (Siegel ve diğ. 2016). DSÖ'nün 2018 yılı verilerine göre ise 1 milyon 76 bin kişinin akciğer kanseri sebebiyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29313949).

Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın 2012 raporuna göre akciğer kanseri Türkiye'de tüm nüfus ve erkeklerde en sık rastlanan kanser tipidir. Kadınlarda ise sıklığı beşinci sırada yer alır. Erkeklerde tüm kanserlerin %21.8'ini oluştururken, kadınlarda %4.9'unu oluşturmaktadır. Akciğer kanserinin Türkiye'de yaşa standardize insidans hızı erkekler için 100.000'de 60.4, kadınlar için ise 100.000'de 9.3 olarak bildirilmiştir (Şencan ve Keskinç 2015). Akciğer kanserinin 2014 yılında Türkiye'de kadın ve erkeklerde sıklığı sırasıyla Çizim 1.1 ve Çizim 1.2'de gösterilmiştir.



Çizim 1.1. Türkiye’de erkeklerde sık görülen bazı kanserlerin yüzde dağılımları (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2014).



Çizim 1.2. Türkiye’de kadınlarda sık görülen bazı kanserlerin yüzde dağılımları (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2014).

Türk Toraks Derneği tarafından 2009 yılında gerçekleştirilen ‘Türkiye’nin akciğer kanseri haritası’ projesinde Türkiye’de her yıl 29.314 yeni akciğer olgusu ortaya çıktığı hesaplanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre Türkiye’de akciğer kanseri hastalarının yaş ortalaması 60 olup, %90.4’ünü erkekler oluşturmaktadır (Turkish Thoracic Society 2013).

1.2.2. Akciğer kanseri etiyolojisi

Akciğer kanseri, tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin başlıca sebebidir. Sigara ve diğer tütün ürünlerinin yanısıra, genetik faktörlerin, çevresel faktörlerin ve çeşitli etkenlerin, akciğer kanseri etiyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir. Akciğer kanserinden korunmada etiyolojik faktörler en önemli basamaklardan birini oluşturur (Siegel ve diğ. 2011).

- **Tütün ve tütün ürünleri**

Akciğer kanserinin en önemli nedenlerinden biri sigara ve diğer tütün ürünleridir. Akciğer kanseri hastalarının %10’undan daha az bir kısmı hiç sigara içmeyen bireylerden

oluşmaktadır (Uluç ve diğ. 2016). Kronik sigara tüketimi, akciğer kanserlerinin yaklaşık %85-90'ından sorumludur. Sigara kullananlarda akciğer kanseri riski, kullanmayanlara oranla 30 kat artmıştır. Pasif içicilerde de risk yaklaşık iki kat artış göstermektedir. Bireyler arasında, kullanılan sigara sayısı ve kullanım süresine bağlı olarak risk oranı değişir (Aydiner ve Topuz 2006).

- **Çevresel ve mesleki risk faktörleri**

Mesleki maruziyet, akciğer kanseri etiyojisinde önemli rol oynar. Madencilik, matbaacılık, gemi inşaa gibi çeşitli sektörlerin çalışanlarında akciğer kanseri riski artmaktadır ve bu meslek gruplarında sıklıkla akciğer kanserine rastlanır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından berilyum, asbest, kadmiyum, arsenik, Bis (chloromethyl) ether, nikel, silika, kromiyum,vinil klorid ve radon gibi çok sayıda mesleki karsinojen tanımlanmıştır. 2000 yılında kanserle ilişkili ölümlerin erkeklerde %10'undan (88000 ölüm) kadınlarda %5'inden (14300 ölüm) arsenik, kadmiyum, asbest, berilyum, kromiyum, dizel, nikel ve silika dumanından oluşan 8 mesleki karsinojene maruziyetin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Driscoll ve diğ. 2005, Fingerhut ve diğ. 2006).

- **Genetik faktörler**

Sigara kullanımının her bireyde akciğer kanserine yol açmıyor olması karsinojenlere karşı savunma mekanizmalarında bireysel farklılıklar olduğunu akla getirmiştir. Buna göre sigara dumanının içerdiği başlıca karsinojenlerden olan, polisiklik hidrokarbonları metabolize eden p450 sitokrom sistemindeki ve glutasyon S transferaz sistemindeki polimorfizm varlığı bireysel farklılıklara sebep olabilmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ailede akciğer kanseri öyküsünün güçlü bir risk faktörü olduğunu göstererek genetik bir yatkınlığın olabileceğini ileri sürmüştür (Gorlova ve diğ. 2007). Ailesinde akciğer kanseri bulunan ya da genç yaşta akciğer kanseri gelişme öyküsü olan bireylerde akciğer kanseri gelişme riski 2 kat artmıştır. (Matakidou ve diğ. 2005).

1.2.3. Akciğer Kanserinde Patolojik Sınıflama

Akciğer kanserinde hücre tipleri genellikle ışık mikroskobu altındaki görünümüne göre adlandırılmıştır ve büyüklüklerine bağlı olarak küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olmak üzere iki tipe ayrılmıştır (Bakar 2017).

Akciğer tümörlerinin DSÖ tarafından 2015 yılında düzenlenen histolojik sınıflaması Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir (Yıldız 2017).

Çizelge 1.1. DSÖ 2015 akciğer tümörleri sınıflandırması

Histolojik Tip ve Alt Tip	Histolojik Tip ve Alt Tip
<p><u>Adenokarsinom</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Lepidik adenokarsinom ❖ Asiner adenokarsinom ❖ Papiller adenokarsinom ❖ Mikropapiller adenokarsinom ❖ Solid adenokarsinom ❖ İnvaziv müsinoz adenokarsinom ❖ Kolloid adenokarsinom ❖ Fetal adenokarsinom ❖ Enterik adenokarsinom ❖ Minimal invaziv adenokarsinom <ul style="list-style-type: none"> Müsinoz Nonmüsinoz ❖ Preinvaziv lezyonlar <ul style="list-style-type: none"> Atipik adenomatöz hiperplazi Adenokarsinoma in situ Müsinoz Nonmüsinoz ❖ Yassı epitel hücreli karsinom <ul style="list-style-type: none"> Keratinize yassı epitel hücreli Nonkeratinize yassı epitel hücreli Bazaloid yassı epitel hücreli İn situ yassı epitel hücreli <p><u>Nöroendokrin tümörler</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Küçük hücreli karsinom <ul style="list-style-type: none"> Kombine küçük hücreli karsinom ❖ Büyük hücreli nöroendokrin karsinom <ul style="list-style-type: none"> Kombine büyük hücreli karsinom ❖ Karsinoid tümörler <ul style="list-style-type: none"> Tipik karsinoid tümör Atipik karsinoid tümör Diffüz idiyopatik hücre hiperplazisi ❖ Büyük hücreli karsinom ❖ Adenoskuamöz karsinom ❖ Sarkomatoid karsinomlar <ul style="list-style-type: none"> Pleomorfik karsinom İğsi hücreli karsinom Dev hücreli karsinom Karsinosarkom Pulmoner blastom ❖ Diğer ve sınıflandırılmayan karsinomlar <ul style="list-style-type: none"> Lenfoepitelyoma benzeri karsinom NUT karsinom <p><u>Ektopik kökenli tümörler</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Germ hücreli tümörler <ul style="list-style-type: none"> Teratom, matür Teratom, immatür ❖ İntrapulmoner timoma ❖ Melanom ❖ Meningiom, NOS 	<p><u>Tükruk bezi tipi tümörler</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Mukoepidermoid karsinom Adenoid kistik karsinom Epitelyal-miyoepitelyal karsinom Pleomorfik adenom ❖ Papillom <ul style="list-style-type: none"> Yassı epitel hücreli papillom Glandüler papillom Mikst skuamöz ve glandüler papillom ❖ Adenomlar <ul style="list-style-type: none"> Sklerozan pnömositom Alveoler adenom Papiller adenom Müsinoz kistadenom Müköz gland adenomu <p><u>Mezenkimal tümörler</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Pulmoner hamartoma ❖ Kondroma ❖ PEComatöz tümörler <ul style="list-style-type: none"> Lenfangiomiyomatozis PEComa, benign Berrak hücreli tümör PEComa, malign ❖ Konjenital peribronşial miyofibroblastik tümör ❖ Diffüz pulmoner lenfanjiomatozis ❖ İnflamatuvar miyofibroblastik tümör ❖ Epiteloid hemanjiyotelyoma ❖ Plevropulmoner blastom ❖ Sinovyal sarkom ❖ Pulmoner arter intimal sarkom ❖ Pulmoner miksoid sarkom, EWSR1-VREB1 translokasyonu ❖ Miyoepitelyal tümörler ❖ Miyoepitelyoma ❖ Miyoepitelyal karsinoma <p><u>Metastatik Tümörler</u></p> <p><u>Lenfohistiositik tümörler</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ MALT lenfoma-Düşük gradeli marjinal zon B hücreli ❖ Diffüz büyük hücreli lenfoma ❖ Lenfomatoid granüloatozis ❖ İntravasküler büyük B hücreli lenfoma ❖ Pulmoner Langerhans hücreli histiositoz ❖ Erdheim-Chester hastalığı

1.2.3.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), genellikle hiperkromatik çekirdekli, çekirdek/sitoplazma oranı yüksek, küçük boyutlu hücrelerden oluşur. Tüm akciğer kanserlerinin %14 kadarından KHAK sorumludur. Submukozal yerleşimli nöroendokrin hücrelerden geliştiği sanılmaktadır (Churg 1988, Warren ve diğ. 1989).

Erkeklerde görülme oranı kadınlara göre daha sıktır ve neredeyse tüm olgular sigarayla ilişkilidir. Hastalığın klinik seyri çok hızlıdır. Tanı anında çoğu olgu ileri evrededir. Aynı zamanda tanı esnasında metastaz da yapabilirler. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerine (KHDAK) göre daha agresif seyrederekler.

Küçük hücreli akciğer karsinomlarını, küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarından ayıran asıl özellik morfolojilerinden ziyade, kromatin yapısıdır. Tümör hücreleri, kolay zedelenebilmeleri nedeniyle oluşan ezilme, çekilme, yığılma artefaktı oluşturan ve yüksek mitotik aktivite gösteren ince granüler bir kromatine sahiptir. Damar duvarındaki tümör hücreleri kaynaklı DNA'nın oluşturduğu bazofilik görünüm küçük hücreli akciğer karsinomları için tipik bir bulgudur (Taban 2017, Yener ve Apa 2017, Yüksek 2015).

1.2.3.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom şeklinde sınıflandırılır. Bu karsinom tiplerinin tek grup altında toplanmalarının sebebi tedavi yaklaşımları ve prognozlarının benzer olması ayrıca bu özellikleriyle küçük hücreli akciğer kanserlerinden belirgin bir şekilde ayrılmalarıdır (Dündar 2015).

- **Skuamöz hücreli karsinom**

Bronş epitelinde skuamöz metaplazi ya da displazinin ilerlemesi sonucunda gelişen genellikle santral yerleşimli tümörlerdir (Yener ve Apa 2017).

Erkeklerde daha sık görülür ve sigarayla yakından ilişkilidir. Diğer tiplere göre daha az hematojen metastaz yapma eğilimi gösterir. Bu nedenle prognozu daha iyidir. Histopatolojik olarak incelendiğinde, skuamoid hücrelerin oluşturduğu, ortası keratinize solid hücre adaları, tek hücre keratinizasyonu ve hücrelerarası köprüleşmeler gözlenir. Şeffaf hücreli, bazaloid, küçük hücreli ve papiller olmak üzere dört morfolojik varyantı vardır (Ferlay ve diğ. 2010).

- **Adenokarsinom**

Kadınlarda ve sigara öyküsü olmayan kişilerde en sık rastlanan tümör tipidir. Bazen skar dokusu zemininde gelişen bu tümör, terminal bronşiyal epitelinden köken alır (Yener ve Apa 2017). Periferik havayolları ile alveollerden gelişen periferik tümörler olmakla birlikte, epitel ve submukozal glandların proksimalinden de gelişebilmektedir (Robbins 1995, Sulu ve Damadoğlu 2007). Bu tümör tipi, histopatolojik açıdan çoğu zaman kompleks heterojen bir yapı içerir. (Yener ve Apa 2017). Görülme sıklığı açısından ülkemizde ikinci sırada yer alırken, Avrupa ülkelerinde birinci sıradadır.

- **Büyük hücreli karsinom**

Büyük hücreli akciğer kanseri, sitolojik diferansiyasyon göstermeyen, skuamöz ya da grandüler kanserlerin indiferansiye şeklidir. İri, poligonal nükleuslu ve belirgin nükleoluslu hücrelerden oluşur. Genellikle periferik yerleşimli olmakla beraber santral yerleşimli de olabilirler. Erken dönemde uzak metastaz yapabilme yeteneğine sahiptirler (Robbins 1995). KHDAK olgularının %3-5'inden büyük hücreli karsinomlar sorumludur. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom, şeffaf hücreli karsinom, lenfoepitelyoma-benzeri karsinom, bazaloid karsinom, rabdoid fenotipli büyük hücreli karsinom, hiç ayrılaşmamış büyük hücreli karsinom gibi alt tipleri tanımlanmıştır (Travis ve diğ. 2004, Sholl 2014).

1.2.4. Akciğer Kanserinde Moleküler Patogenez

Dünya geneline bakıldığında kanser nedenli ölümlerin en sık sebebinin akciğer kanseri olduğu görülmektedir. Bu sebeple üzerinde en fazla çalışılan kanser çeşitlerinden biri olan akciğer kanserinde son zamanlarda hem patogenezini anlama hem de tedavi yaklaşımlarını belirlemede büyük gelişmeler yaşanmıştır. Pek çok moleküler değişiklik tanımlanmış, bu değişikliklerin kanserin başlangıcından ve gelişiminden sorumlu olduğu bildirilmiştir.

Akciğer kanseri gelişiminde diğer kanser tiplerinde olduğu gibi onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu başlıca rol oynamaktadır (Fong ve diğ. 2003). Bunun yanı sıra akciğer kanser hücreleri translokasyon, amplifikasyon, delesyon ve insersiyon gibi çok sayıda kromozomal anomali barındırmaktadır (Horn ve diğ. 2011).

1.2.4.1. Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)

Hücre membran reseptörleri tirozin kinaz ailesine mensup olan EGFR geni kromozom 7p12-13'e lokalizedir. EGFR geni üzerinde aktive edici bir etkiye sahip olan EGFR mutasyonu gefitinib-erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin hedef alanıdır (Rosell ve diğ. 2012). akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %20'sinde EGFR mutasyonu gözlenmektedir (Rosell ve diğ. 2012). Mutasyonlar genellikle *EGFR* geni üzerinde 18-21.

ekzonları arasında saptanmakta olup en sık gözlenen mutasyonlar ekzon 19 ve ekzon 21 üzerinde yer almaktadır (Lynch ve diğ. 2004). Ekzon 20 üzerinde izlenen mutasyonlar çoğunlukla tedaviye dirençli değişikliklerdir (Uramoto ve diğ. 2007). Ancak ekzon 20 üzerinde pozisyon 768 ve öncesindeki insersiyonlar bu durumun istisnası olarak karşımıza çıkmaktadır (Improta ve diğ. 2016). EGFR tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavi edilen hastaların büyük kısmında tedavinin bir noktasında ilaca karşı gelişen direnç nedeniyle hastalığın nüks ettiği görülür. Gelişen bu direncin en önemli nedeni diğer *EGFR* mutasyonlarına ikincil olarak tedavi sürecinde gelişen bir mutasyon olan T790M'den kaynaklanmaktadır ve geliştiği noktadan itibaren tedaviye dirençten sorumludur (Pao ve diğ. 2005). Nüks anında yeni biyopsilerin alınmasıyla T790M mutasyonu saptanabilmektedir. Daha önce tedavi almamış hastalarda T790M mutasyonunun saptanması durumunda bu mutasyonun germline mutasyon olarak bulunma ihtimali üzerinde durulmakta ve kalıtsal kanser sendromuna işaret edebilmektedir (Yu ve diğ. 2014).

1.2.4.2. Kirsten rat sarkoma viral onkogen homologu (KRAS)

Ras proteinleri hücre döngüsü, apoptoz regülasyonu ve hücre adezyonu gibi farklı biyolojik süreçlerde görev alırlar. Ras gen ailesi (HRAS, KRAS, ve NRAS) GTP'ye bağlanan birtakım proteini kodlar ve bu proteinler sinyal iletiminin aktivasyonunda rol oynarlar. Bunlar arasında onkogenik aktivasyonunun en sık olduğu bilinen KRAS (12p12.1) genine ait mutasyonlar tümörlerin %17-25'inde gözlenmektedir. Proteinin GTP'ye sürekli bağlı kalmasına yol açan bu mutasyonlar sinyal iletimindeki kontrolün bozulmasına neden olurlar (Plessec ve Hunt 2009). MAPK (mitogen-activated protein kinase) yolağının sürekli uyarılarak hücre çoğalması tetiklenir. KHDAK olgularının %40'ında KRAS geninin aktivasyon artışına sebep olan mutasyonlar saptanır. KRAS mutasyonları, EGFR uyarısından bağımsız olarak aynı yolak efektörlerini aktive etmeleri sebebiyle KRAS saptanan tümörler TKI'lerine dirençlidir (Shigematsu ve diğ. 2005).

1.2.4.3. Hepatosit büyüme faktörü reseptörü (MET)

MET, onkogenik mutasyonlar, amplifikasyon/aşırı ekspresyon ve alternatif kesip eklemede görev alan bir proteindir. MET proto-onkogeni, EGFR ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) genlerini de içeren insan kromozomu 7 üzerinde yer almaktadır. Doğal ligandına (HGF) bağlanan bir reseptör tirozin kinazı kodlar (Ma ve diğ. 2003). Malignite bağlamında, MET-HGF yolu, tümör büyümesi, hayatta kalma, dallanan morfogenez, motilite ve migrasyon, invazyon, tümör anjiyogenez ve metastazda güçlü bir aracı rolü üstlenmektedir. (Ma ve diğ. 2003, Wojta ve diğ. 1994, Besser ve diğ. 1997).

Akciğer kanserlerinde mezenkimal epitelyal geçiş geninde (MET) meydana gelen çeşitli mutasyonlar ve amplifikasyonlar gözlenir. Mutasyonlar çoğunlukla ekzon 14 çevresinde yerleşirler. Ekzon 14 bölgesinde mutasyon taşıyan hastalarda MET inhibitörlerine yanıt alındığını gösteren çeşitli çalışmalar ortaya konmuştur (Paik ve diğ. 2015, Frampton ve diğ. 2015).

1.2.4.4.Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa (PIK3CA)

PIK3CA geni, fosfatidilinositol 3-kinazların (PI3K) katalitik alt birimlerinden birini oluşturan p110a'yı kodlar. PI3K, hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, sağkalımı gibi birçok hücrel süreçte görev alan bir lipit kinaz ailesi üyesidir.

PIK3CA'daki somatik mutasyonlar küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin %1-3'ünde saptanmıştır (Samuels ve diğ. 2004, Kawano ve diğ. 2006). Bunun yanısıra skuamöz hücreli karsinomda daha sık görülmektedir. Kanser hedefli ilaç tedavisinde PIK3CA bir aday olarak iyi bir potansiyele sahiptir (El-Telbany ve Ma 2012).

1.2.4.5.V-raf mürin sarkoma viral onkogen homologu (BRAF)

BRAF kinaz, ARAF, BRAF ve CRAF (RAF1) içeren serin-treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Çeşitli kanserlerin patogeneğinde rol oynamaktadır. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %5'inde BRAF mutasyonu saptanır. Bu mutasyonların %50'sini ise V600E mutasyonu oluşturmaktadır. BRAF mutasyonlu hastalarda hedefe yönelik bir ajan olan dabrafenibin, MEK inhibitörleriyle beraber kullanılır (Bozkurtlar ve Kaya 2018).

1.2.4.6.Anaplastik Lenfoma Reseptör Tirozin Kinaz (ALK)

Anaplastik lenfoma kinaz (ALK), farklı malignitelerde anormal halde bulunan bir tirozin kinaz reseptörüdür (El Telbany ve Ma 2012). Büyük hücreli lenfomalarda t(2;5)(p23;q35) translokasyonu ile saptanmıştır. KHDAK'nda ise yaklaşık %2-%7 oranında bir sıklıkla 2p inversiyonu neticesinde EML4 (echinoderm microtubule - associated protein-like) ile füzyon yapar. EML4-ALK füzyonu ise artmış tirozin kinaz aktivitesiyle sonuçlanır (Gerber ve Minna 2010). EML4-ALK translokasyonu oldukça nadir gözlenmesine rağmen dünya genelindeki akciğer kanseri sayısındaki artış göz önünde bulundurulduğunda yıllık ortalama 40.000 ALK pozitif vaka tespit edilmesi öngörülmektedir (Palmer ve diğ. 2009).

1.2.4.7. ROS proto-onkogeni

Tirozin kinaz reseptörü olan ROS1, insülin reseptör ailesinin bir üyesidir. ROS1 geni kromozom 6'nın q22.1 bölgesinde lokalizedir. MAPK ve PI3K-Akt yollarının aktive olmasını sağlayarak hücre büyümesi ve çoğalmasında rol oynamaktadır. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %1-2'sinden ROS1 geninde meydana gelen kromozomal değişiklikler sorumludur ve ROS1 yeniden düzenlenmesi gözlenen hastalar tirozin kinaz inhibitörü olan krizotinibe yanıt verir (Bozkurtlar ve Kaya 2018).

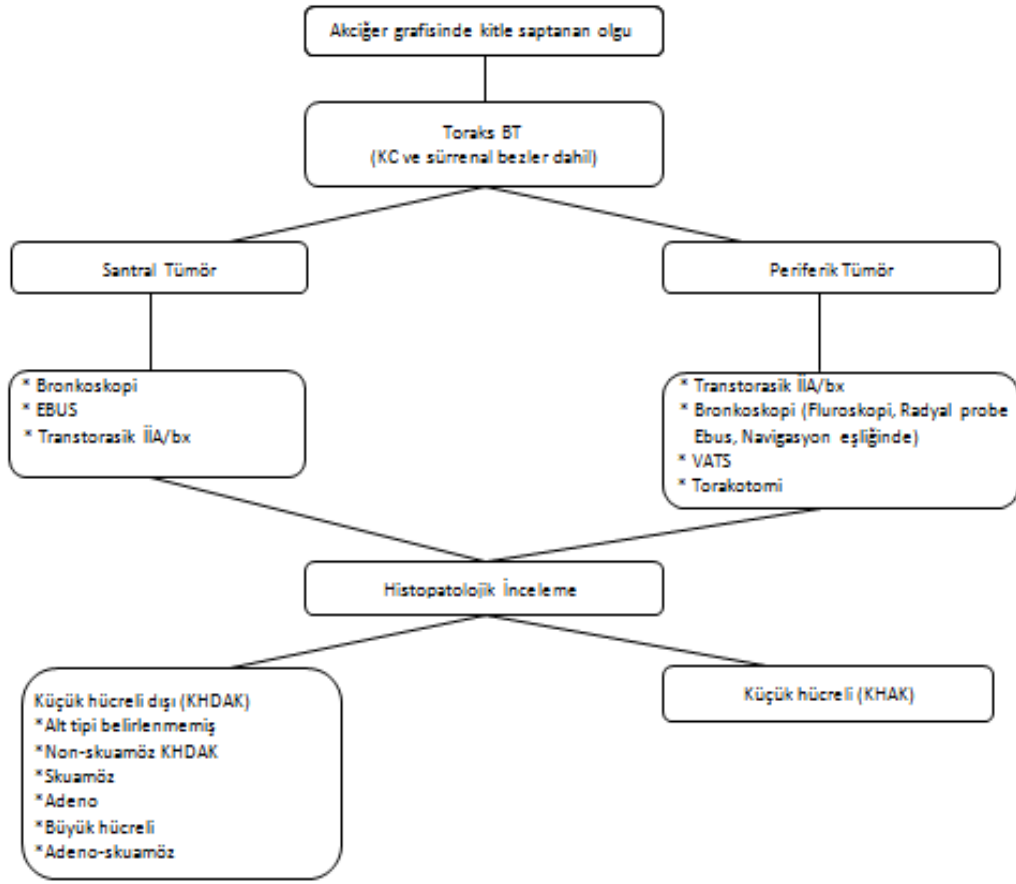
1.2.4.8. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2/ErbB2)

Epidermal büyüme faktörü olan HER/erbB büyüme faktörü reseptör ailesine mensup olup EGFR (HER1 veya erbB1), HER2/neu (erbB2), HER3(erbB3) ve HER4 (erbB4) çeşitlerini içerir. HER2 geni 17. kromozomun uzun kolunda yerleşmiştir ve intrinsik tirozin kinaz aktivitesi aracılığıyla hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, apoptoz, adhezyon ve migrasyon benzeri fonksiyonlarda görev alan transmembran reseptör proteinini kodlamaktadır. HER2'nin aşırı ekspresyonu hastalığın kötü seyri ile ilişki içerisinde. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, HER2 protein aşırı ekspresyonu %6-35 ve gen amplifikasyonu %10-20 oranında gözlenmiş olup (Rouquette ve diğ. 2012, Pellegrini ve diğ. 2003) HER2 mutasyonları ise yaklaşık %2-4 oranındadır (Arcila ve diğ. 2012, Tomizawa ve diğ. 2011).

1.2.5. Akciğer Kanserinde Tanı Yöntemleri

Akciğer kanseri ölümleri çoğunlukla uzak metastazlar sebebiyle gerçekleşir. Bu nedenle akciğer kanserinde metastaz oluşmadan asemptomatik dönemde tanı oldukça önemlidir.

NCCN (National Comprehensive Cancer Network, Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı) ve ACCP (American College of Chest Physicians, Amerikan Göğüs Hekimleri Koleji) 'nin öncülüğünde özetlenmiş olan akciğer kanserinde tanı algoritması Çizim 1.3. 'de gösterilmiştir (ACCP 2013, www.nccn.org).



Çizim 1.3. Akciğer kanserinde tanı algoritması

- **Akciğer grafisi**

Seçilecek olan ilk radyolojik yöntem akciğer grafisidir. Nodül-kitle, mediastinal genişleme, atelektazi, plevral efüzyon, diyafragma yüksekliği gibi bulgular gözlenir. Böylece kitlenin lokal etkisine ve varsa altta yatan akciğer hastalıklarına dair ipucu verir (Dündar 2015).

- **Bilgisayarlı tomografi (BT)**

Tümör çapı ve mediastinal tutulumun belirlenmesi için bilgisayarlı tomografi iyi bir görüntüleme yöntemidir. Tanı, evreleme ve aynı zamanda tedaviye yanıtın değerlendirilmesi açısından önem taşır (Demirhan 2017). Tümörün mediasten, kalp, büyük damarlar, özofagus, trakea, göğüs duvarı ve karina ile ilişkisini ayrıntılı şekilde ortaya koyabilir (Venuta ve diğ. 1992).

- **Pozitron emisyon tomografisi bilgisayarlı tomografi (PET-BT)**

Akciğer kanseri tanı ve evrelemede oldukça sık kullanılan ve flor-18 ile işaretli 2-deoksi 2-floro-de-glikoz (FDG)'un kullanıldığı bir tarama yöntemidir (Dündar 2015).

Yöntemin esası glukoz tüketiminin fazla olduğu bölgelerin belirlenmesi temeline dayanır. Glukoz tüketiminin beyin, kalp kasları, mesane ve böbrekler haricinde bir lokalizasyonda yüksek oranda olması o bölge için güçlü bir inflamatuvar reaksiyona işaret eder. Radyoaktif bir madde ile işaretlenmiş olan glukoz vücuda verilerek tutulumun yüksek olduğu bölgelerin belirlenmesi sağlanır. Tümör hücreleri yüksek metabolik hıza sahip olduklarından glukoz tüketimleri de yüksek seviyededir (Lardinois ve diğ. 2003).

PET değerlendirmesinin BT ile beraber yapılması gerekmektedir. PET metabolik bir tarama yöntemidir. Bu yöntemle elde edilen dokunun metabolik ve biyolojik işlevlerine ait veriler BT'den elde edilen anatomik verilerle birleştirilir ve kanserli dokunun doğru lokalizasyonuna, boyut ve karakterinin belirlenmesine imkan tanır (Dündar 2015).

- **Manyetik rezonans görüntüleme**

Yumuşak dokularda iyi görüntüye sahip, birçok planda kesit alabilen, mediasteninin, superior sulkusun, göğüs duvarının, kalp ve büyük damarların diyafragma ve spinal kanalın ayrıntılı değerlendirilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir.

- **Balgam sitolojisi**

Akciğer kanseri malign hücreleri bronş sekresyonları ile birlikte dışarı atılırlar. Akciğer kanseri şüphesi taşıyan hastalar için sabah çıkarılan ilk balgam büyük oranda tanısal değere sahiptir ve ucuz, risksiz bir tetkiktir. Bu yöntemle %50-85 oranında kesin tanı konulması mümkündür. Balgam sitolojisi ile santral bronş kanserlerinde pozitiflik oranı yaklaşık %80, periferik bronş kanserlerinde ise %50 oranındadır (Demirhan 2017).

- **Girişimsel tanı yöntemleri**

Bronkoskopi; Bronşiyal ağacın endokamerayla görüntülenmesidir. Akciğer kanserinde tanı, evreleme, tedavi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılır. Bronkoskopi uygulaması sonucunda saptanan lezyonun tipine bağlı olarak transbronşiyal biyopsi (TBB), bronş lavajı, bronş biyopsisi, bronşiyal fırçalama, bronkoalveolar lavaj (BAL), transbronşiyal iğne aspirasyonu (TBİA) yapılabilmektedir (Kayacan ve Beder 2009).

Transtorasik ince iğne aspirasyonu; Tümör çapına bağlı olarak periferik akciğer lezyonlarında yaklaşık %90 oranında tanı sağlayan yöntemdir. Bilgisayarlı tomografi eşliğinde yapılması tanı oranını artırmaktadır.

Plevral biyopsi; Plevral efüzyonların tanısında kullanılan bir yöntemdir. Plevra sıvısı sitolojik incelemesinin tanı değeri %60-75 oranındadır. Sitolojik tanı adenokanserlerde diğer tümör tiplerine göre daha yüksek seviyededir (Özlü ve diğ. 2009).

Torakoskopi; Lokal anestezi eşliğinde ve sedoanaljezi ile hastanın toraks kavitesi içerisine girilerek lezyonlardan biyopsi almak, plevral sıvıyı boşaltmak gibi hedefler için kullanılan cerrahi bir işlemdir (Alar ve Şahin 2012).

Torakotomi; Erken olgularda, minimal invaziv yöntemlerle tanı konamayan hastalarda son çare olarak torakotomi ile kitleden direkt biyopsi yapılır. Evresine göre gerekli cerrahi rezeksiyon uygulanır (Papiashvilli ve diğ. 2012).

Mediastinoskopi; Mediastinoskopi mediastendeki lenf bezleri ve kitlelerden genel anestezi altında, mediastinoskop veya video-mediastinoskop denilen bir alet yardımıyla biyopsi almak amacıyla yapılır (Hurtgen ve diğ. 2002).

1.2.6. Akciğer Kanseri Evreleme

Hastalara, akciğer kanseri tanısı konduktan sonra prognozları hakkında sağlıklı bir yaklaşımda bulunmak, en etkili tedavi yöntemini belirleyebilmek ve alınan tedavi sonuçlarının bilimsel kıyaslamasını yapabilmek için, hastalığın anatomik yaygınlığının saptanması yani evrelendirilmesi gerekir (<http://file.toraks.org.tr>)

Akciğer kanserinde evreleme için standart olarak tümörün özelliklerinin (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) durumlarının değerlendirildiği TNM evreleme sistemi kullanılır. 2017 yılında kullanılmaya başlanmış olan 8. TNM sistemi için 1999-2010 yılları arasında prospektif olarak 94.708 hastadan oluşan yeni bir veri tabanı kullanılmış ve bu veri tabanındaki 77.156 hastanın verileri değerlendirilmek için uygun görülmüştür. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Grubu (IASLC) evreleme ve prognostik faktörler komitesi bu 77.156 olguyu 16 ülkeden ve 35 merkezden toplamıştır. Veri girişleri ile istatistiksel analizler 'Cancer Research and Biostatistics (CRAB)' tarafından yapılmıştır (Kıyık 2018, Çok 2018). Günümüzde 8. baskısı kullanılmakta olan TNM sınıflaması Çizelge 1.2'de, TNM sınıflaması baz alınarak oluşturulan evreleme ise Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. TNM Sınıflaması (8. Baskı)

Primer Tümör(T)	
Tx	Balgam ya da bronkoalveoler lavaj sitolojisinde malign hücrelerin tespit edilmesi fakat görüntüleme yöntemleri ya da bronkoskopik olarak tümörün gösterilememesi
T0	Primer tümöre ait kanıt yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör en büyük çapı ≤ 3 cm, akciğer ya da visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lobar bronşun daha proksimaline invazyon bulgusu yok <ul style="list-style-type: none">❖ T1a(mi): minimal invaziv adenokarsinom❖ T1a: tümör en büyük çapı ≤ 1 cm❖ T1b: tümör en büyük çapı > 1 cm fakat ≤ 2 cm❖ T1c: tümör en büyük çapı > 2 cm fakat ≤ 3 cm
T2	Tümör en büyük çapı > 3 cm fakat ≤ 5 cm, veya aşağıdaki özelliklerden birine sahip; <ul style="list-style-type: none">✓ Karinaya uzaklığından bağımsız olarak ana bronş tutulumun karina tutulumu olmadan olması✓ Visseral plevra invazyonu✓ Hilusa uzanan, akciğerin bir kısmını ya da tamamını kapsayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni ile beraber olması <ul style="list-style-type: none">❖ T2a: tümör en büyük çapı > 3 cm fakat ≤ 4 cm❖ T2b: tümör en büyük çapı > 4 cm fakat ≤ 5 cm
T3	Tümör en büyük çapı > 5 cm fakat ≤ 7 cm veya primer tümör ile aynı loba başka tümör nodülü veya nodüllerinin varlığı veya direk olarak aşağıdaki yapılardan birini invaze etmiş olması: <ul style="list-style-type: none">• Göğüs duvarı (pariyetal plevra ve süperior sulkus tümörleri dahil)• Frenik sinir• Pariyetal perikard
T4	Tümör en büyük çapı > 7 cm veya primer tümörün olduğu lobdan başa ipsilateral loblarda tümör nodül veya nodüllerinin olması veya aşağıdaki yapılardan birini invaze etmiş olması: <ul style="list-style-type: none">✓ Diafragma✓ Mediastinum✓ Kalp✓ Büyük damarlar✓ Trakea✓ Rekürren laringeal sinir✓ Özefagus✓ Vertebra korpusu✓ Karina

Çizelge 1.2. TNM Sınıflaması (devam)

Bölgesel Lenf Nodu Tutulumu(N)	
Nx	Bölgesel lenf nodu tutulumu değerlendirilememekte
N0	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
N1	İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf nodu tutulumu ve intrapulmoner lenf nodu tutulumu mevcut
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodu tutulumu mevcut
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral ya da kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf nodu tutulumu mevcut
Uzak Metastaz(M)	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz mevcut M1a: Kontralateral lobda başka tümör nodülü veya nodüllerin olması; plevral veya perikardiyal nodül/nodüllerin olması veya malign plevral veya perikardiyal effüzyonun olması M1b: Tek ekstratorasik metastaz mevcut M1c: Bir veya daha çok organda multipl ekstratorasik metastaz mevcut

Çizelge 1.3. TNM' ye göre evre grupları

Evre	T	N	M	
Gizli Karsinom	Tx	N0	M0	
Evre0	Tis	N0	M0	
EvreI	IA1	T1mi	N0	M0
		T1a	N0	M0
	IA2	T1b	N0	M0
	IA3	T1c	N0	M0
	IB	T2a	N0	M0
Evre II	IIA	T2b	N0	M0
	IIB	T1a	N1	M0
		T1b	N1	M0
		T1c	N1	M0
		T2a	N1	M0
		T2b	N1	M0
		T3	N0	M0

Çizelge 1.3. TNM' ye göre evre grupları (devam)

Evre III	IIIA	T1a	N2	M0
		T1b	N2	M0
		T1c	N2	M0
		T2a	N2	M0
		T2b	N2	M0
		T3	N1	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
	IIIB	T1a	N3	M0
		T1b	N3	M0
		T1c	N3	M0
		T2a	N3	M0
		T2b	N3	M0
		T3	N2	M0
T4		N2	M0	
IIIC		T3	N3	M0
	T4	N3	M0	
Evre IV	IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
		Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b
	IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

1.2.7. Akciğer Kanseri'nde Tedavi

Akciğer kanseri tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin başlıca sebebidir. Akciğer kanserinde tedavi kararı tümör histolojisi ve hastalık evresi ile yaş, pulmoner fonksiyonlar, ko-morbiditeler gibi hastaya özel çeşitli faktörler doğrultusunda şekillenir. Tedavi seçeneklerini belirlemek ve hastalığın seyrini öngörebilmek için ise en önemli basamak evrelemedir (Yılmaz 2018).

KHDAK alt tipleri için benzer tedavi yaklaşımları gerekmekte iken KHAK'inde sınırlı evre ve yaygın evre durumuna göre farklı tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır (Dündar 2015).

- **Erken evre (Evre I ve II) KHDAK tedavisi**

KHDAK vakalarının yaklaşık %30'unu Evre I ve II grubu hastalar oluşturmaktadır. Bu grubu ise tümörü bir akciğere sınırlı olan, mediastinal ve uzak organ yayılımı olmayan hastalar oluşturur. Yani lenf nodu ve metastazı olmayan ve tümör boyutu 5 cm ya da daha küçük olan, en fazla N1 lenf nodu metastazı barındıran hastalar Evre I ve II grubu içerisinde tanımlanır (Goldstraw ve diğ. 2016).

Bu hastalar için cerrahi rezeksiyon öncelikli olarak uygulanan ve kür ile sonuçlanabilen altın standart tedavi yöntemidir. Pulmoner fonksiyonun korunması nedeniyle erken evre KHDAK'nde tek bir lobun rezeksiyonu şeklinde gerçekleştirilen lobektomi, optimal

cerrahi prosedür olarak kabul edilmektedir (Ginsberg ve Rubinstein 1995, Yan ve diğ. 2009).

Cerrahi sonrası evre 2 ve evre 1B hastalarda adjuvan kemoterapi endikasyonu vardır (Heineman ve diğ. 2017). Adjuvan kemoterapi planlanacağı zaman eşlik eden komorbiditeler ve operasyon sonrası iyileşme süreci göz ardı edilmemelidir. (Pignon ve diğ. 2008). İmmünoterapilerin veya hedefe yönelik tedavilerin ise adjuvan tedavi uygulamasında yeri olmamaktadır (Yılmaz 2018).

- **Evre III KHDAK'nde tedavi**

Hastalığın yayılımı ve yerleşimindeki değişikliklere bağlı olarak Evre III KHDAK oldukça heterojen bir hastalık profili gösterir. Bu hasta grubunun yönetiminde cerrahi eksizyon, kemoterapi ve radyoterapinin birarada bulunduğu ikili ve üçlü tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır (Horn ve Johnson 2015).

Evre III hastalık öngörülen hastalarda lenf nodlarının görüntülenme yöntemleri vasıtasıyla değerlendirilmesi önemli bir kriterdir (Horn ve Johnson 2015). Toraks BT ya da PET BET değerlendirmesi sonucunda mediastinal tutulum düşünülüyorsa bu durum tedavi yaklaşımını değiştireceğinden dolayı çeşitli invaziv yöntemler (bronkoskopik teknikler, mediastinoskopi vs.) kullanılarak patolojik doğrulamanın yapılması gerekmektedir. Mediastinal tutulumun olmaması halinde hasta erken evre olarak değerlendirilir ve cerrahi rezeksiyon gerçekleştirilir. Eğer mediastinal tutulum varsa hasta definitif kemoradyoterapi bakımından değerlendirmeye alınır (NCCN 2017).

Sekizinci TNM evreleme sistemine göre Evre IIIA grubu hastalarda (N1 tutulumu olan T3 tümörleri) mediastinal tutulumun olmadığı gösterildikten sonra cerrahi eksizyon mümkünse cerrahi yapıldıktan sonra adjuvan kemoterapi verilmesi en doğru yaklaşımdır. Cerrahi tam rezeksiyonun mümkün olmadığı durumlarda ise eş zamanlı kemoradyoterapi önerilir (NCCN 2017, Wong ve diğ. 2015).

Yapılan çalışmalarda tam rezeksiyon uygulanan Evre III hastalarında platin bazlı ikili kemoterapinin sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (Pignon ve diğ. 2008).

Günümüzde tam rezeksiyon yapılmış olan Evre II ve Evre III hastaları için adjuvan sisplatin tabanlı tedaviler standart yaklaşım olarak uygulanmaktadır (Taban 2017).

- **İleri evre (Evre IV / Metastatik Hastalık) KHDAK tedavisi**

Metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında kemoterapi sağkalımı artırır ve tedavi almayan hastalarda 1 yıllık sağkalım oranı % 10 iken, tedavi gören hastalarda %35-40 civarına yükselmesini sağlar (Dündar 2015).

Evre IV KHDAK'nde tedavinin amacı tedaviye bağılı olarak meydana gelen yan etkileri en düşük seviyede tutarak yaşam süresini arttırmaktır. Evre IV hastalarda tedaviyi şekillendiren bazı özellikler vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir:

- Hastalığın yayılımı, mevcut metastaz sayısı ve bölgesi, metastaz ile ilişkili semptom varlığı,
- Tümör histolojisi (skuamöz ya da non-skuamöz) ,
- Adenokarsinomlu olgularda sürücü mutasyon varlığı; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ve ROS1 varlığı,
- Tümörde programlanmış hücre ölüm reseptörü-1 (PD-L 1) ifadesinin yüksek seviyede olması (Yılmaz 2018).

Evre IV hastalıkta birinci basamak tedavi tümör histolojisi, PDL-1 ifadesi ve sürücü mutasyonun mevcut olma durumuna bakılarak planlanır. Hasta ilk süreçte bu tedavilere yanıt verse de ilerleyen dönemde 2. ve 3. basamak tedavilere geçme ihtiyacı doğacaktır (Taban 2017).

Sürücü mutasyonun olmadığı durumlarda; düşük ya da orta seviyede PDL-1 ifadesi mevcut olan skuamöz tümörlerde platin bazlı kemoterapi rejimleri tercih edilir (Taban 2017). Yapılan çalışmalar sisplatin tabanlı rejimlerin karboplatine kıyasla sağkalım üstünlüğü taşıdığını göstermiştir. (Dündar 2015).

Sürücü mutasyon varlığında, EGFR aktive edici mutasyon taşıyan KHDAK hastası için birinci basamakta EGFR tirozin kinaz inhibitörleri olan afatinib, gefitinib veya erlotinib'den birinin kullanımı önerilmektedir. Hedefe odaklı bu ajanlar birinci basamak tedavide platin bazlı kemoterapiye kıyasla sağkalımı artırır (Rosell ve diğ. 2012). Ancak sağkalımı arttırmadığından dolayı kemoterapiyle beraber kullanımı önerilmemektedir. Tümör hücreleri yeni mutasyonlar kazanarak EGFR tirozin kinaz inhibitörüne bir süre sonra direnç geliştirir ve meydana gelen sekonder mutasyonların neredeyse %50'si T790M mutasyonlarından oluşmaktadır. T790M mutasyonu taşıyan tümörlerde osimertinib kullanımı önerilmektedir (NCCN 2017).

EML4-ALK füzyon geni barındıran KHDAK hastalarında birinci basamak tedavide krizotinib önerilmektedir. Tümör hücrelerinde krizotinibe direnç gelimesi halinde 2. jenerasyon ALK inhibitörleri olarak bilinen alektinib ve seritinibin kullanımı uygun görülmektedir (NCCN 2017).

ROS1 yeniden düzenlenmesi varlığında tedavinin birinci basamağında krizotinib önerilmektedir. HER2, MEK, BRAF, RET ve MET gibi sürücü mutasyonlara yönelik geliştirilen ilaçlar ise araştırma aşamasındadır (NCCN 2017).

- **Küçük hücreli akciğer kanserinde tedavi**

Küçük hücreli akciğer kanseri nöroendokrin karsinomların %14'ünü oluşturmaktadır. Hızlı yayılım gösterme, yüksek büyüme fraksiyonu ve erken dönemde metastaz özelliği kazanma kapasitesine sahip olan küçük hücreli akciğer kanseri olgularının 2/3'sinde tanı esnasında hematogen metastaz görülmektedir (Yılmaz 2018).

Küçük hücreli akciğer kanserlerinde sınırlı ve yaygın evre olma durumuna göre tedavi planı yapılır. Sınırlı evrede küçük hücreli akciğer kanseri bir hemitoraksa sınırlıdır ve lenf nodlarında saptanır. Bir hemitoraksın dışına taşıdığı, malign plevral ve perikardiyal efüzyonu da içeren evre ise yaygın evre olarak sınıflandırılır.

KHAK'nde tedavinin temelini platin tabanlı kemoterapi oluşturmaktadır. Sınırlı evre KHAK hastalarında kemoterapinin yanısıra göğüs bölgesine uygulanan radyoterapi sağkalım avantajı sağlamaktadır (Warde ve Payne 1992). Platin bazlı kemoterapi (sisplatin + etopozid) ile eş zamanlı olarak verilen radyoterapi ise ardışık radyoterapiye kıyasla sağkalım üstünlüğü gösterir. Bu sebeple iyi performans durumu gösteren sınırlı evre KHAK hastalarında eş zamanlı kemoradyoterapi önerilmektedir (Jeremic ve diğ. 1999). Ayrıca sağkalımı 5 aydan 7 aya kadar uzatan profilaktik kraniyal RT'de sınırlı evre KHAK hastaları için avantaj sağlar (Dündar 2015).

Yaygın evrede KHAK tanısı alan hastaların yalnızca %5'i iki yıldan daha uzun bir süre yaşam sürdürmektedir. Yaygın evre hastalıkta tedavi kemoterapi ile gerçekleştirilir. Kemoterapi ile tam yanıt alınırsa sınırlı evre hastalıkta olduğu gibi yaygın evrede de torakal RT ile profilaktik kraniyal RT önerilmektedir (Von Pawel ve diğ. 1999, Sause ve Machtay 1998).

1.3. Likit Biyopsi

Kanserde tanı ve moleküler testler için uygulanan girişimsel yöntemler, meydana gelebilecek komplikasyonlar sebebiyle risk taşıyan uygulamalardır ve bu işlemlerle her zaman neticeye ulaşmak mümkün olmadığı gibi tekrar da gerektirebilmektedir. Bu sorunların aşılması yalnızca hızlı, düşük maliyetli ve tekrarlanabilir yöntemlerle sağlanabilmektedir (Solomon ve diğ. 2014). Günümüzde likit biyopsi bu yöntemlerden biri olarak hem araştırma hem de rutin klinik çalışmalarda laboratuvar uygulamalarına önemli oranda katkı sağlayan ilgi çekici bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır (Chu 2017).

Likit biyopsi kavramı tümöre ait olan ve dolaşımda serbest olarak bulunan hücre ve/veya diğer genetik materyal kullanılarak, tümöre ait moleküler özellikleri tanımlamak için kan veya vücuttaki diğer sıvı örneklerinden yapılan tüm işlemler şeklinde açıklanabilmektedir (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>).

Günümüze kadar kanser hücrelerinin sahip olduğu mutasyonlara tümör dokusuna uygulanan invaziv yöntemlerle ulaşılmakta iken, günümüzde noninvaziv bir yöntem olan likit biyopsi testiyle bu mutasyonları tespit etmek mümkün hale gelmiştir. Kanserle ilişkili bu mutasyonların tespit edilmesi tedavi planının belirlenebilmesi için büyük önem taşır. Hedefe yönelik akıllı ilaçlar dediğimiz yeni nesil kanser ilaçları bu mutasyonları hedef almaktadır.

1.3.1. Likit Biyopside Değerlendirilen Tümör Kaynaklı Ürünler

Günümüzde kullanımı gittikçe yaygınlaşan likit biyopside hedef, tümör kaynaklı ürünlerdir. Bu ürünler dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs), egzozomlar, dolaşımdaki tümör DNA (ctDNA) ya da RNA'lar (ctRNA) ve tümör eğitilmiş trombositler (TEPs)'den oluşmaktadır.

1.3.1.1. Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs)

Likit biyopside en sık analiz edilen materyal dolaşımdaki tümör hücreleri ve ctDNA'lardır. 1989'da ilk kez tanımlanan CTCs, dolaşımda tek başına hücreler halinde olabildikleri gibi mikroemboli (CTM) olarak da karşımıza çıkabilir. Akciğer kanserinde bu embolilerin varlığı kötü prognozla ilişkilendirilir (Hou ve diğ. 2012).

1.3.1.2. Dolaşımdaki DNA molekülleri (cfDNA)

Çeşitli sebeplerle dolaşıma dökülen DNA moleküllerinin bir kısmını sağlıklı hücrelere ait DNA'lar oluştururken bir kısmı tümör hücrelerinin DNA'larıdır. Likit biyopsinin hedeflerinden birini de işte bu DNA'lar oluşturur. Dolaşımdaki tümör DNA'ları tümöre ait genetik özellikleri taşıırken, aynı zamanda tümör spesifik genetik ve epigenetik değişikliklerin analizine de olanak tanımaktadır.

1.3.1.3. Egzozomlar

Kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tarafından ekstrasellüler alana salınan 40-100 nm boyutundaki ekstrasellüler veziküllerdir. Hücre-hücre iletişiminin sağlanmasında anahtar role sahip olan egzozomlar içeriğinde DNA, mRNA ve miRNA özelliğinde nükleik asitleri barındırırlar (Weidle ve diğ. 2015).

1.3.1.4. Tümör eğitilmiş trombositler (Tumor educated platelets: TEPs)

Tümör hücreleri ile etkileşime girerek, tümör büyümesi, yayılması ve uzak metastaz gelişiminde rol oynayan trombositler dolaşımda bulunan mRNA'yı içlerine alabilmektedirler. Sonraki aşamada farklı yüzey reseptörleri geliştiren ve kendi pre-RNA larını üreten trombositler kanser tanısında kullanılabilirler (Joosse ve Pantel 2015).

1.3.2. Tümör DNA'sı Kan Dolaşımına Nasıl Geçer?

Tümöre ait DNA'ların kana nasıl geçtiği tam olarak ortaya konmamış olmakla birlikte başlıca apoptotik ve nekrotik hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücreleri apoptoz ya da nekroza yönlendiren belli başlı olaylar meydana gelir.

Çevresel ya da bazı genetik faktörlerin etkisi sonucunda somatik hücreler onarılamayacak biçimde normal yapılarını kaybettiklerinde bu hücrelerin akıbeti iki şekilde olabilmektedir: Apoptoz ya da kanserleşme.

Apoptoz giden hücrelerin nükleusları parçalanarak hücre içeriği fagosite edilir. Kromatin kondensasyonu meydana gelir ve sonrasında DNA fragmente bir halde dolaşıma katılır.

Kanserleşme sürecinde ise durum biraz daha farklıdır. Sınırsız büyüme ve çoğalma özelliği kazanan bu hücreler tümör oluşumuna sebep olur. İmmün sistem tarafından tanınan kanser hücreleri nekroz ile ortadan kaldırılır. Bu süreçte osmotik basıncın etkisiyle hücreler patlar ve enflamasyon ortaya çıkar. Apoptoz sürecinde olduğu gibi nekrozda da DNA fragmentasyonu meydana gelir. Fakat nekroz sonucunda oluşan DNA fragmanları apoptozla kıyasla daha küçüktür (Elmore 2007, Zhivotosky 2001).

1.3.3. Akciğer Kanseri Likit Biyopsi ve Solid Biyopsi

Akciğer kanseri, sağkalım süresi, tedavi yanıtının düşük olması gibi birtakım sebeplerle rutin ve bireye özgü takip gerektiren ciddi bir hastalıktır. Bu özellikleri dolayısıyla hastanın genetik bilgileri ışığında tedaviye olası yanıtın değerlendirilmesi hastalar için önemlidir.

Likit biyopsiler geleneksel tümör doku biyopsi işlemlerine uygun olmayan ya da doku biyopsisi sonrası yetersiz sonuç alınan hastalarda iyi bir alternatif oluşturur. Ayrıca hızlı, düşük maliyetli ve tekrarlanabilen bir yöntem oluşu onu hastalar için cazip bir işlem haline getirmiştir. Bir tümördeki tüm genetik değişiklikler hakkında bilgi sunabilen likit biyopsi tümör heterojenitesinin değerlendirilmesinde de önemli bir adım oluşturur. Kanserde tanıdan ziyade tedavi odaklı çalışmalarda büyük önem taşır ve kanserle ilişkili mutasyonların tespit edilmesini sağlayarak tedavi planının belirlenmesinde önemli rol oynar.

Solid biyopsiler her hasta için ve hastalığın her evresinde uygulanma imkanı olmayan yöntemlerdir. Ayrıca bu uygulamalar gelişebilecek komplikasyonlar sebebiyle risk taşımaktadır. Tümör doku biyopsilerinde tümörün yalnızca belli bir bölümü alındığından kısıtlı bir bilgiye sahip olunur ve hastalığın ileri evrelerinde gelişen yeni mutasyonlardan

haberdar olmak tek bir biyopsiyle mümkün olmayacaktır. Ancak yöntemin zorluğu sebebiyle sürekli tekrar edilmesi de sakıncalı ve genellikle mümkün olmamaktadır.

Her iki yönteminde prognoz, metastaz ve progresyon açısından anlamlılığını gösteren yayınlar bulunsa da klinik pratiğimiz için likit biyopsilerin kullanımındaki en önemli nokta hedeflenebilir mutasyon varlığının ve hedefe yönelik tedavide direnç gelişiminin güvenilir ve kolay bir şekilde saptanabilmesidir. Ancak düşük sensitivite ve yüksek spesifite değerleriyle geleneksel tümör doku biyopsisinin yerini alması düşünülemeyebilir. Günümüzde hala altın standart olarak geleneksel doku biyopsileri kabul görmektedir (Dirican ve diğ. 2016).

1.3.4. cfDNA Tespit ve Analizi için Kullanılan Teknolojiler

Vücutta hızla çoğalan tümör hücreleri sağlıklı hücreler gibi ölmeye ve bu süreçte kendilerine ait DNA moleküllerini kan dolaşımına vermeye başlarlar. Kan dolaşımındaki bu serbest DNA moleküllerinde meydana gelen genetik değişimleri belirlemek için kullanılan çeşitli metodlar bulunmaktadır. Bunlar, Yeni Nesil Dizileme (NGS), ddPCR ve BEAMing gibi platformları içeren Digital PCR, Real-Time PCR(Gerçek Zamanlı PCR) ve Kütle Spektrometresi Teknolojisidir (Elazezy ve Joosse 2018).

1.3.4.1. Yeni nesil dizileme (NGS=Next generation sequencing)

Yeni nesil dizileme son on yılda DNA dizileme ve DNA'dan genetik bilgi edinme amacına yönelik etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Moleküler tanıda altın standart olarak kabul görmeye başlayan NGS oldukça hassas ve güvenilir bir yöntemdir (Elazezy ve Joosse 2018). Kanser tanısında ve tedaviye hedef yolların belirlenmesinde etkili bir araç olarak kullanılan NGS, düşük miktarda genetik materyalden yüksek miktarda bilgi elde edilmesi sebebiyle moleküler genetik tanıda vazgeçilmez bir yöntem haline gelmiştir (Sönmezler 2018).

Günümüzde aynı prensibi paylaşan değiştirilmiş birden fazla NGS tekniği mevcuttur. Bunlar, tek DNA moleküllerinden kısa sekansların üretilmesine ve bir referans diziyile karşılaştırılarak genomun önemli bir kısmının dizilenmesi temeline dayanır. Ayrıca NGS, diğer tekniklerle tespit edilemeyen genetik değişimleri, kopya sayı değişiklik bölgelerini ve yeniden düzenlenmelerini tespit edebilmektedir (Perez-Ramirez ve diğ. 2016).

Likit Biyopside kullanılarak cfDNA'daki değişiklikleri analiz eden NGS platformu akciğer kanseri teşhisini daha az invaziv ve daha ucuza gerçekleştirebilmektedir. Ayrıca tümördeki değişimlerin izlenmesini sağlayarak tedavide bireyin spesifik ihtiyaçlarının karşılanması konusunda yardımcı olmaktadır (Bennett ve diğ. 2016).

2. AMAÇ

Akciğer kanseri, sağkalım süresi, tedaviye yanıtın düşüklüğü gibi sebeplerle rutin ve bireye özgü takip gerektiren bir hastalıktır. Bu özelliklerinden ötürü hastanın genetik bilgileri ışığında tedaviye olası yanıtın değerlendirilmesi hastalar için önemlidir.

Bu tez çalışmasının amacı, akciğer kanseri hastalarında solid biyopsi ve likit biyopsi yöntemlerinin hastalık tanısı üzerine etkinliğinin araştırılmasıyla moleküler hedeflerin ve buna bağlı olarak hedefleyici tedavilerin belirlenmesindeki avantajın gösterilmesidir.

Çalışmada, akciğer kanseri tanısı almış hastalardan elde edilen periferik kandan likit biyopsi materyalleri ve çeşitli girişimsel işlemler aracılığıyla elde edilmiş biyopsi materyallerinden gerçekleştirilen analizler dikkate alınarak mutasyon yükleri belirlenecektir. Belirlenen mutasyonların sıklığı ve varlığı üzerinden her iki yöntemin tanıya sağladığı katkıdan bahsedilecek ve akciğer kanseri tanısı almış kişilerde tedavinin bireysel planlanması ve izlenmesi amacıyla kullanılan likit biyopsi testi ayrıntılı olarak araştırılmış olacaktır.

3. YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasına, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'na başvuran akciğer kanseri tanısı almış farklı evrelerdeki 30 hasta dahil edilmiş olup hastaların klinik ve laboratuvar sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Dahil edilen 30 hastanın likit biyopsi örneklerinden yeni nesil dizileme ile çalışılmış ve aynı hasta grubundan patoloji laboratuvarında, çeşitli girişimsel işlemler aracılığıyla elde edilen biyopsi materyallerinden FISH tekniği ile gerçekleştirilen test sonuçları hasta dosyalarından temin edilerek incelenmiştir. Elde edilen tüm verilerin tez çalışması kapsamında değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Derin dondurucu -80°C (Sanyo, Japonya)
- LightCycler 480 Real Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- SimpliAmp Thermal Cycler cihazı
- DynaMag-2 Magnet (İnvitrogen)
- DynaMag-50 Magnet (İnvitrogen)
- Qubit 3 DNA ölçüm cihazı (İnvitrogen)
- Allegra X-12 Santrifüj (Beckmann Coulter, Fransa)
- Ion S5 Semiconductor Sequencer
- Ion One Touch 2
- Ion One Touch ES
- Çip Santrifüjü (Life Technologies)
- Mikro Santrifüj (Sigma, ABD)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Mikropipetler, 10µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Almanya)
- Vorteks (Biosan)

3.1.2. Sarf Malzemeler

- Ion 530 Chip
- Ion One Touch Recovery Tube
- Pastör pipeti (Nest, Çin)
- Falkon tüp (15 ml, 50 ml)
- Mikrosantrifüj tüpler

- PCR tüpü
- Pipet ucu
- LightCycler 480 Sealing Foil
- LightCycler 480 multiwell plate 96 (Roche, Almanya)
- MikroAmp Clear Adhesive Film

3.1.3. 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)

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar

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

3.2. cf DNA (Serbest DNA =Circulating Cell-Free DNA) İzolasyonu

Akciğer kanseri tanısı almış 30 hastadan likit biyopsi örnekleri, 30 ml periferik kandan olacak şekilde örnek toplama tüplerine alınmıştır. Cf DNA izolasyonu *MagMAX Cell Free DNA* İzolasyon Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda likit biyopsilerden cf DNA izole edilmiş ve konsantrasyon tayinleri florometrik DNA ölçüm cihazı (Qubit 3, İnvitrogen) yardımı ile yapılmıştır. Yeterli miktarda DNA konsantrasyonuna sahip örnekler bir sonraki aşamaya aktarılmıştır.

- Kanlar 2000 g'de 4C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Plazma yeni santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Plazma 16000 g'de 4C'de 10 dk veya 6000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir.
- Plazma yeni tüpe aktarılmıştır.

- Bağlayıcı solüsyon/Boncuk karışımı hazırlanarak plazma üzerine eklenmiştir.
- Tüp 10 kere el ile karıştırılmıştır.
- Hızı 7 veya daha yüksek olacak şekilde 10 dakika vortekslenmiştir.
- Tüp 5 dakika ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
- Tüp manyetik spor üzerinde tutulmaya devam edilerek süpernatant pipet yardımı ile tamamen uzaklaştırılmıştır. Tüp manyetik spordan alınmıştır.
- Boncuklar 1 ml *MagMAX Cell Free DNA Wash* solüsyonu ile yeniden süspanse edilmiştir.
- Manyetik boncuk solüsyonu yeni 1.5 ml'lik santrifüj tüpe aktarılmıştır.
- Manyetik boncuk solüsyonu santrifüj tüp *DynaMag-2 Magnet*'te 20 saniye bekletilmiştir.
- Süpernatant tekrar bir önceki tüpe aktarılarak tüpte kalan boncuklar tamamen toplanmaya çalışılmıştır. Tüpten alınan boncuk solüsyonu tekrar manyetik spor üzerindeki santrifüj tüpe aktarılmıştır.
- Santrifüj tüp 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- %80 alkol ve 0.1X *TAE* hazırlanmıştır.
- Süpernatant boncuklara değmeden 1 ml'lik pipet ile uzaklaştırılmıştır.
- Manyetik spor 5 kez masaya vurulmuş ve kalan süpernatant 200 µl'lik pipet ile tekrardan uzaklaştırılmıştır.
- Santrifüj tüpü manyetik spordan alınıp 1 ml %80 alkol eklenmiş ve 30 saniye vorteks yapılmıştır.
- Santrifüj tüpü 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Süpernatant boncuklara değmeden 1 ml'lik pipet ile uzaklaştırılmıştır.
- Santrifüj tüpü *DynaMag-2 Magnet* üzerinde tutularak 3-5 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Manyetik spor 5 kez masaya vurulmuş ve kalan süpernatant 200µl'lik pipet ile tekrardan uzaklaştırılmıştır. Tüp manyetik spordan alınmıştır.
- 400µl 0.1X *TAE* eklenmiş ve 5 dk vorteks yapılmıştır.

- Santrifüj tüpü 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Süpernatant yeni 1.5 ml'lik santrifüj tüpe aktarılmıştır.
- 5-10 µl *MagMAX Cell Free DNA Lysis/Binding* Solüsyonu eklenmiştir.
10 ml örnek için 10 µl *MagMAX Cell Free DNA* Manyetik Boncuklar kullanılmıştır.
- 5 dk vorteks yapılmıştır.
- Santrifüj tüpü 5 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Süpernatant boncuklara değmeden 1 ml'lik pipet ile uzaklaştırılmıştır.
- Tüp manyetik spordan alınıp 1 ml *MagMAX Cell Free DNA Wash* solüsyonu eklenmiş ve 30 saniye vorteks yapılmıştır.
- Santrifüj tüpü 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Süpernatant boncuklara değmeden 1 ml'lik pipet ile uzaklaştırılmıştır.
- Manyetik spor 5 kez masaya vurulmuş ve kalan süpernatant 200 µl'lik pipet ile tekrardan uzaklaştırılmıştır.
- Tüp manyetik spordan uzaklaştırılarak 1 ml %80 alkol eklenmiş ve 30 saniye vorteks yapılmıştır.
- Santrifüj tüpü 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Süpernatant boncuklara değmeden 1 ml'lik pipet ile uzaklaştırılmıştır.
- Manyetik spor 5 kez masaya vurulmuş ve kalan süpernatant 200 µl'lik pipet ile tekrardan uzaklaştırılmıştır.
- Tüp manyetik spordan uzaklaştırılarak 1 ml %80 alkol eklenmiş ve 30 saniye vorteks yapılmıştır.
- Santrifüj tüpü 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Süpernatant boncuklara değmeden 1 ml'lik pipet ile uzaklaştırılmıştır.
- Santrifüj tüpü *DynaMag-2 Magnet* üzerinde tutularak 3-5 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Manyetik spor 5 kez masaya vurulmuş ve kalan süpernatant 200 µl'lik pipet ile tekrardan uzaklaştırılmıştır.

- 15 µl *MagMAX Cell Free DNA Elution* solüsyon eklenmiştir. 5 dk vorteks yapılmıştır.
- Santrifüj tüpü 2 dk ya da solüsyon tamamen berrak hale gelip boncuklar manyetik spora yapışana kadar *DynaMag-2 Magnet* üzerinde bekletilmiştir.
- Elde edilen süpernatant cfDNA'yı içermektedir.
- cfDNA (+)4C'de 24 saat, (-)20C'de uzun süre saklanabilmektedir.

3.3. Likit Biyopsi

Yeni nesil dizilemede 60 birimlik hacme sahip chipler kullanılmaktadır. Chipte 7 birimlik alan kaplayan akciğer kanser paneli için çalışmaya en fazla 8 hasta ile girilebilmektedir. Hesaplamalar bu doğrultuda yapılmalıdır.

3.3.1. Kütüphane Oluşturma

- 96 kuyulu plakaya sırasıyla DNA, su, kanser türüne göre panel ve PCR master miks eklenmiştir. (Solüsyonlar miks haline getirilmeden direk plakaya dağıtılmıştır.)

Çizelge 3.1. Kütüphane oluşturmak için gerekli bileşenler

Karışım Bileşeni	Hacim
cfDNA 1-50 ng	X
Su	13-X µl
cfDNA panel	2 µl
cfDNA Kütüphane PCR Master Miks	15 µl
Toplam Hacim	30 µl

- Kuyucuklar şeffaf kaplama filmi ile kapatılmıştır.
- 96 kuyulu plaka kısa bir vorteks yapıldıktan sonra 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Termal döngü cihazı 90°C'ye ısıtılmıştır.

Çizelge 3.2. Termal döngü cihazı protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü
98 °C	2 dakika	Bekleme
98 °C	30 saniye	2
64 °C	2 dakika	2
62 °C	2 dakika	2
60 °C	4 dakika	2
58 °C	2 dakika	2
72 °C	30 saniye	2
72 °C	2 dakika	Bekleme
4 °C	∞	Bekleme

- Plaka termal döngü cihazına yerleştirilerek program çalıştırılmıştır.
- Termal döngü cihazından alınan plaka 300g 'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Şeffaf kaplama filmi plakadan uzaklaştırılmıştır.
- Plaka kuyularında 30 µl örnek olup olmadığı kontrol edilmiş, eksik bulunan kuyular su ile 30 µl'ye tamamlanmıştır.
- 45 µl (örnek hacmi*1.5) *Agencourt AMPure XP Reagent* her kuyuya eklenerek plaka *MicroAmp Clear Adhesive Film* (Şeffaf Kaplama Filmi) ile kapatılmıştır.
- 15 saniye vorteks yapılmış 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Ardından 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Şeffaf film dikkatlice plakadan uzaklaştırılmıştır.
- Plaka manyetik spora alınmış ve 5 dk ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar spor üzerinde bekletilmiştir. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol pipetaj yapmadan eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 saniye bekletilmiştir. Pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol pipetaj yapmadan eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 saniye bekletilmiştir. Pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Kalan süpernatant 10µl 'lik pipet ile tamamen uzaklaştırılmıştır. Ardından 5 dk oda sıcaklığında hava kurumasına bırakılmıştır.
- Plaka manyetik spordan alınmıştır.
- Her bir kuyuya pipetaj yapılmadan 24 ul *TE Buffer* eklenmiştir.
- Plaka şeffaf film ile kapatılarak kısaca vortekslenmiş ve ardından 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Plaka 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Şeffaf film plakadan uzaklaştırılmış ve plaka manyetik spor üzerine alınmıştır.
- Plaka manyetik spor üzerinde 2 dk bekletilmiştir. Ardından 23 µl süpernatant çekilerek aynı plaka üzerinde farklı kuyulara aktarılmıştır. Plaka hala magnet üzerinde tutulmaya devam edilmelidir.
- Plakaya sırasıyla DNA, Barkod BC, cfDNA Kütüphane Primer P1, cfDNA Kütüphane PCR Master Miks dağıtılmıştır.

Çizelge 3.3. DNA barkodlama için hazırlanan master miks bileşenleri

Karışım Bileşeni	Hacim
DNA	23 µl
Barkod BC (#1-48)	1 µl
cfDNA Kütüphane Primer P1	1 µl
cfDNA Kütüphane PCR Master Miks	25 µl
Toplam Hacim	50 µl

- Plaka şeffaf film ile kapatılarak 15 sn vortekslenmiş ardından 1 dk 300g'de santrifüj edilmiştir.
- Plaka termal döngü cihazına yerleştirilerek program çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.4. Barkodlama için termal döngü protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü
98 °C	2 dakika	Bekleme
98 °C	15 saniye	18
64 °C	15 saniye	18
72 °C	15 saniye	18
72 °C	5 dakika	Bekleme
4 °C	∞	Bekleme

- *Agencourt AMPure XP Reagent* kullanımından 30dk önce oda sıcaklığına çıkarılmıştır.
- %80 alkol hazırlanmıştır.
- Termal döngü cihazından alınan plaka 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Şeffaf film dikkatlice kaldırılarak her kuyuya 57.5 µl *Agencourt AMPure XP Reagent* eklenmiştir. Plaka film ile kapatılmıştır.
- Plaka 15 sn vortekslenip ardından oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Plaka 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Ardından film çıkarılmıştır.
- Plaka manyetik standı alınmış ve 5 dk ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar manyetik stand üzerinde bekletilmiştir. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklenmiştir. Plaka 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında manyetik standda tutulmuştur. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Alkol yıkaması tekrar edilmiştir. Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklenmiştir. Plaka 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında manyetik

standda tutulmuştur. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.

- Plaka manyetik standda tutulmaya devam edilerek 10µl-20µl'lik pipetlerle kalan alkol tamamen uzaklaştırılmıştır. Ardından plaka oda sıcaklığında 5 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Plaka manyetik standdan alınarak her bir kuyuya 50 µl *TE Buffer* eklenmiş ve plaka şeffaf kaplama filmi ile kapatılmıştır.
- Plaka kısaca vortekslenmiş ardından 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Plaka 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Ardından film çıkarılmıştır.
- Plaka manyetik standda alınarak 2 dk inkübe edilmiş ardından 50 µl süpernatant aynı plaka üzerinde yeni kuyulara aktarılmıştır.
- Plaka manyetik standdan alınarak her bir kuyuya 50 µl *Agencourt AMPure XP Reagent* eklenmiştir.
- Plaka şeffaf kaplama filmi ile kapatılarak kısaca vortekslenmiş ardından oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Plaka 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Ardından film çıkarılmıştır.
- Plaka manyetik standda alınmış ve 5 dk ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar stand üzerinde bekletilmiştir. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklenmiştir. Plaka 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında manyetik standda tutulmuştur. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Alkol yıkaması tekrar edilmiştir.. Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklenmiştir. Plaka 30 sn ya da solüsyon berrak bir hal alana kadar oda sıcaklığında manyetik standda tutulmuştur. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- Plaka manyetik standda tutulmaya devam edilerek 10µl-20µl'lik pipetlerle kalan alkol tamamen uzaklaştırılmıştır. Ardından plaka oda sıcaklığında 5 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Plaka standdan alınarak her bir kuyuya 30 µl *TE Buffer* eklenmiştir.
- Plaka şeffaf kaplama filmi ile kapatılarak kısaca vortekslenmiş ardından oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.

- Plaka 300g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Ardından film çıkarılmıştır.
- Plaka manyetik standda alınarak 2 dk inkübe edilmiş ardından 28 µl süpernatant aynı plaka üzerinde yeni kuyulara aktarılmıştır.
- Final kütüphane (kuyucuklu plaka) bir sonraki işleme kadar buz aküsü üzerinde tutulmuştur.
- 68 pM *E.coli DH10B Ion* Kontrol Kütüphane'den 10 kat seri dilüsyon halinde 5 standart hazırlanmıştır.
 (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.coli*+36µl su=0.0068pM standart)
 (4µl 0.0068 pM *E.coli*+36µl su=0.00068pM standart)
- Örnek için; 1/100 kütüphane dilüsyonu hazırlanmıştır. Dilüsyon kısaca vortekslenmiş ardından kısaca santrifüj edilmiştir.
- Örnek için; 1/1000 dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyon kısaca vortekslenmiş ardından kısaca santrifüj edilmiştir.
- 26 µl DNA kalan plaka miks hazırlanma aşamasında -20'ye kaldırılmıştır.

Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı pcr miks bileşenleri

Karışım Bileşeni	96 kuyucuklu plaka	384 kuyucuklu plaka
2X Taqman master mix	10 µL	5 µl
20X Ion Taqman assay	1 µl	0,5 µl
Toplam Hacim	11 µl	5,5 µl

- Hasta sayısı, standartlar ve NTC sayısı ve pipetaj hatası (+1) hesaba katılarak miks hesaplaması yapılmıştır.

Çizelge 3.6. Gerçek zamanlı pcr bileşenleri

Karışım Bileşeni	96 kuyucuklu plaka	384 kuyucuklu plaka
PCR master miks	11 µL	5,5 µl
1:1000 Dilüe edilmiş örnek	9 µl	4,5 µl

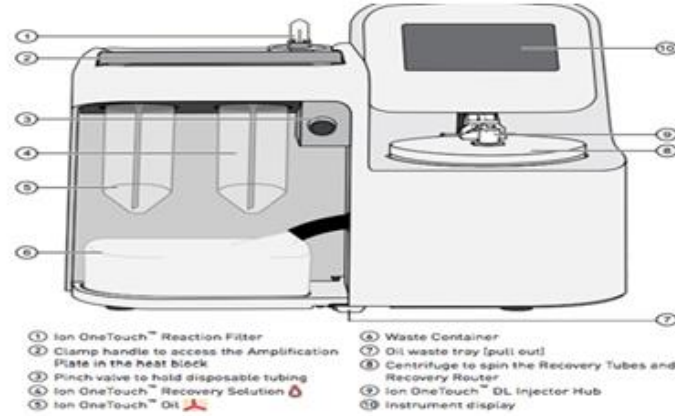
- Gerçek Zamanlı PCR cihazı (Light Cyler 480) kuyucuklu plakasına standart ve hasta her biri 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 11 µl miks dağıtılmıştır.

- 1/1000 DNA dilüsyonu 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 9 µl pipetaj yapılarak dağıtılmıştır.
- Standartlar her biri 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 9 µl pipetaj yapılarak dağıtılmıştır.

Çizelge 3.7. Gerçek zamanlı pcr programı

Sıcaklık	Zaman	Döngü
50 °C	2 dakika	Bekleme
95 °C	20 saniye	Bekleme
95 °C	1 dakika	40
60 °C	20 saniye	40

- Light Cycler 480’de PCR reaksiyonu gerçekleşmiştir.
- Her hasta için PCR sonucunda elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır. Her hasta için 3 kopya konulduğundan sonuçlar toplanıp 3’e bölünmüştür. 1/1000 oranında dilüe edildiğinden bölüm sonucu 1000 ile çarpılmıştır.
(Sonraki aşama olan emPCR için total hacmin 50 µl olması gerekmektedir.)
- Final Kütüphane’den alınan miktarın üzerine total hacim 50 µl olacak şekilde su ile tamamlanmıştır.
- Her hasta için ayrı santrifüj tüpünde hazırlanan 50 µl’lik örneklerden 20’şer µl alınarak tek bir tüpde 100 pM olacak şekilde akciğer havuzu oluşturulmuştur.
- Çalışmaya devam etmek için 100 pM olan havuz 8 pM’e çekilmiştir.
- emPCR için cihaz hazırlanmıştır.



Çizim 3.1. Ion one touch2 cihaz bölümleri (Ion PGM™Hi-Q™ View OT2 Kit)

- Amplifikasyon solüsyonu hazırlanmıştır (Amplifikasyon solüsyonu bileşenleri: *Ion S5 Reagent Mix, Ion S5 Enzyme Mix, Ion Sphere Particles*)
- *ISPs (İon Sphere Particles=İyon Küre Parçacıklar)* hazırlanmıştır. (kısa vorteks, santrifüj, pipetaj yapılarak)
- Diğer basamağa geçilerek oda ısısında bekleyen 2ml *Ion S5 Reagent Mix* içerisine Çizelge 3.8.'de verilen solüsyonlar sırası ile eklenmiştir.

Çizelge 3.8. Ion S5 reagent miks bileşenleri

Sıra	Reaktif	Hacim
1	Su	80 µl
2	İyon S5 Enzim Karışımı	120 µl
3	İyon Küre Partikülleri	100 µl
4	Dilüe Kütüphane-8pM	100 µl
Toplam Hacim		2400 µl

3.3.2. Reaksiyon Filtresinin Doldurulması

- Amplifikasyon solüsyonu maximum hızda 5 sn vortekslenip, 2sn santrifüj edilmiştir.
- Amplifikasyon solüsyonu pipetaj yapılarak 800µl pipete çekilmiştir.
- Reaksiyon filtresine 2400µl kütüphane karışımı 800, 800 yüklenmiştir.
- 1000'lik pipet ile 200µl *Ion OneTouch Reaction Oil* örnek portundan yüklenmiştir.
- Ion One Touch Reaksiyon filtresi örnek portu solda kalacak şekilde döndürülmüştür.
- Filtre üstündeki 3 port 3 deliğe denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir.
- Cihazın çalışması bittikten sonra final spin yapılmıştır. Sonra gerekli solüsyonlar hazırlanmıştır.

3.3.3. Melt-Off Solüsyonu Hazırlığı

- 1M NaOH hazırlanmıştır.
- *Melt-off* solüsyonu 300 µl olarak 7 numaralı kuyucuğa yüklenmiştir.

Çizelge 3.9. Melt-off solüsyonu bileşenleri

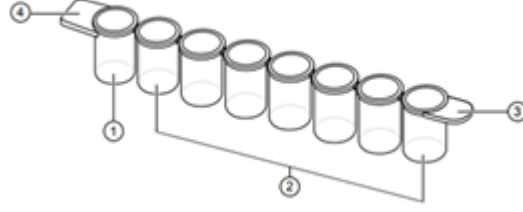
Sıra	Bileşenler	Hacim
1	Tween Solüsyonu	280 µl
2	1M NaOH	40 µl
Toplam Hacim		320 µl

3.3.4. Dynabead'lerin Yıkanması

- *Dynabead*'ler 30sn vortekslenmiştir.
- 100 µl *Dynabead* 1,5'luk tüpe alınmıştır.
- Tüp *Manyetik Bead Standına* (MBS) alınmıştır. 2 dakika beklendikten sonra süpernatant atılmıştır.
- 1000 µl *Ion OneTouch* yıkama solüsyonu eklenmiştir.
- Tüp manyetik spordan alınıp 30sn vortekslenildikten sonra 2sn santrifüj edilmiştir.
- Tüp MBS'ye tekrar yerleştirilmiştir. 2dk veya şeffaflaşana kadar beklendikten sonra süpernatant atılmıştır.
- 130 µl *My One Beads Capture* Solüsyonu dynabeadlerin üzerine eklenmiştir.
- Tüp manyetik spordan çıkarılıp 30sn vortekslenmiş ve 2sn santrifüj edilmiştir.
- 2 numaralı kuyucuğa yüklenmiştir.

3.3.5. Template Pozitif ISPs'lerin Yıkanması

- Pellet çeltiğin olduğu tarafta birikmektedir. Bu nedenle ters yönden süpernatant çekilmiştir.
- Recovery tüplerde son hacim 100µl olarak kalacak şekilde süpernatant alınmıştır.
- Her iki tüp pipetaj yapılmıştır.
- Her iki tüptede olan 100µl' lik kütüphane tek 1.5' luk tüpte toplanmıştır.
- Çeltikli tüpte kalanları temizlemek için her iki tüpe de 100µl su konulmuş ve yıkanarak çekilmiştir. 1,5'luk tüpte olan kütüphanenin üzerine eklenmiştir. Bu aşamada total hacim yaklaşık 400µl'dir.
- 1,5 luk tüpün üzerine 600µl su eklenmiştir.
- 30 sn vortekslenmiş ve 2 sn santrifüj edilmiştir.
- Ardından 15500g'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatanttan 20µl kalacak şekilde üst süpernatant atılmıştır.
- Üzerine 80µl *ISP Resuspension* solüsyonu konulmuştur. Total hacim 100µl 'dir.
- 30sn vortekslenip, 2sn santrifüj edilmiştir.
- *ISPs* 10 kere pipetaj yapılmıştır.
- Tüm hacim 100µl olacak şekilde 1.kuyucuğa yüklenmiştir.



Çizim 3.2. Ion One touch ES plaka (Ion PGMTMHi-QTM View OT2 Kit)

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

Çizelge 3.10. Ion one touch Es cihaz plakasında 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 Wash Solüsyonu
4. Kuyu	300µl Ion One Touch Es Wash Solüsyonu
5. Kuyu	300µl Ion One Touch Es Wash Solüsyonu
6. Kuyu	Boş
7. Kuyu	300µl Melt-Off Solüsyonu
8. Kuyu	Boş

- *One Touch Es* Cihazına 0,2 lik PCR tüpü ve pipet takılıp plaka yerleştirilmiş ve cihaz çalıştırılmıştır. (Bu işlem 40 dakika sürmektedir.)

3.3.6. Dizileme Cihazını Başlatma

- Yeni yıkama solüsyonu takılmıştır.
- Atık kutusu kontrol edilmiştir. Dolu ise boşaltılmıştır.
- Yeni kartuj takılmıştır. Kullanımından 40 dakika önce kartuj -20C 'den çıkarılmıştır.

3.3.7. 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 edilmiştir.
- Pellete dokunmadan son hacim 10µl kalacak şekilde supernatant atılmıştır.
- Üzerine 200µl su eklenmiş ve 10 kere pipetaj yapılmıştır.
- Bu arada *Loading buffer* oda ısısına çıkarılmış ve 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Dipte kahverengi pellet olup olmadığı kontrol edilmiştir.

- Kahverengi pellet olmaması durumunda 10 µl kalacak şekilde supernatant uzaklaştırılmıştır.
- Son hacim 100 µl olacak şekilde 90 µl su eklenmiş ve 10 kez pipetaj yapılmıştır.
- Sekans cihazına geçilmiştir. (Veya 4C de 3 gün saklanabilir.)

3.3.8. Chip Yükleme

- Kullanılacak solüsyonlar taze hazırlanmıştır.
- Dizileme cihazına başlatma yapıldıktan sonra 4 saat içinde cihaza yükleme yapılmalıdır.
- Sekans primerleri buza konulmuştur.
- İlk kullanımdan önce yükleme buffer, *foaming* solüsyonu ve *annealing buffer* oda ısısına getirilmiştir ve %50 lik *annealing buffer* hazırlanmıştır.
- Chip için uygun *Control Ion Sphere* seçilmiştir.
- *Control Ion Sphere Particles* 5 sn vorteklenmiş, 2 sn santrifüjlenmiştir.
- 0.2'lik zenginleştirilmiş olan template-positif *ISPs* içine 5µl *Control Ion Sphere Particul* eklenip pipetaj yapılmıştır.
- 15500g 'de 5 dakika template-pozitif *ISPs* santrifüj edilmiştir.
- 10µl kalacak şekilde supernatant atılmıştır.
- 15µl saf *Annealing Buffer* eklenmiştir. Toplam hacim 25µl olmuştur.
- 20µl sekans primeri eklenip vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir.
- Termal döngü cihazında 95°C'de 2 dakika, 37°C'de 2 dakika tutulmuştur.
- Ardından 6µl Ion S5 dizileme polimeraz ve 10µl Ion S5 yükleme buffer eklenmiştir. Vorteks ve santrifüj edilmiştir.
- 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.



Çizim 3.3. Ion 530TM Chip (Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3)

- Chip sabit bir yüzeye konulmuştur.
- Pipete 40µl örnek çekilip yükleme noktasına pipet yerleştirilmiştir. Basılmadan döndürülerek örnek yüklenmiştir.
- Kalan 20µl loading chipe pipetle bırakılmıştır.
- Chip, chip santrifüjüne konulmuş ve 5dakika santrifüj edilmiştir.
- 1,5µl' lik tüp içine 900µl %50 *annealing buffer* ve 100µl *foaming* solüsyonu eklenip elle çalkalanmıştır.
- Santrifüj sonrası chip sabit bir yüzeye konulmuştur.
- 100µl oluşan köpük yükleme noktasından yüklenmiştir.
- Çıkış kısmından çıkanlar pipetle çekilip atılmıştır.
- Toplamda yaklaşık 400µl köpük bu şekilde yüklenmiştir.
- 100µl %50 *annealing buffer* yükleme portundan yüklenmiştir. Çıkış noktasından çıkanlar çekilip atılmıştır.
- Yaklaşık 400µl %50 *annealing buffer* bu şekilde köpük olmamasına dikkat edilerek yüklenmiştir.
- Chip cihaza takılarak dizileme başlatılmıştır.

3.3.9. Analiz

Yeni nesil dizileme (NGS) ile elde edilen sekans datası Human Genome Build 19 ile eşleştirilmiştir. ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PIK3CA, ROS1 ve TP53 gen hotspot bölgeleri akciğer kanser paneli için incelenerek varyant analizleri Torent Suite Software, Ion Reporter ve Oncomine Knowledgebase Reporter programları kullanılarak yapılmıştır. Kitin standardize edilmiş LOD (limit of detection) değeri 0.05 olarak alınmıştır. Bu değer üzerinde frekans değeri taşıyan varyantlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada varyant tespiti ve biyoinformatik analizler ACMG ve Clinvar veri bankaları kullanılarak yapılmıştır. Biyoinformatik analizin önemli bir parçası olan DANN, Mutation Taster ve SIFT in siliko analiz araçları kullanılarak tespit edilen klinik olarak anlamlı varyantlar belirtilen parametreler göz önünde bulundurularak incelenmiştir.

4. BULGULAR

Bu tez kapsamında, çalışmaya dahil edilen akciğer kanseri tanısı almış 30 hastadan likit biyopsi ile elde edilen cfDNA'nın, izolasyon aşamasından klinik raporlamaya kadar geçen süreci araştırılmıştır. Aynı hasta grubunun çeşitli girişimsel işlemler aracılığıyla elde edilen biyopsi materyallerinden Patoloji Anabilim Dalı'nda FISH tekniği kullanılarak gerçekleştirilen testler retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan bu çalışmada hastaların yaş ortalaması 60,9 (yaş aralığı 39-86) olarak bulunmuştur. Hastaların %46,7'si (n=14) kadın ve %53,3'ü (n=16) erkeklerden oluşmaktadır. 30 hastanın 26'sı sağ iken 4'ü hayatını kaybetmiştir.

4.1. Doku Materyali ile Yapılan Testlere Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 30 akciğer kanseri hastasının patoloji raporları incelendiğinde hastalardan 2'sinin (%6,6) doku biyopsisine uygun olmadığı, 2 hastadan (%6,6) alınan solid biyopsi materyalinin tümör hücresi içermediği ve 1 hastada (%3,3) alınan doku materyalinin yetersizliğinden dolayı moleküler testlerin çalışılmadığı dolayısıyla EGFR, ALK ve ROS1 gen mutasyonlarının yükünün belirlenemediği gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak 1 hastada ALK geni için çalışma yapılmış iken aynı hastada alınan doku materyalinin yetersiz kalmasından ötürü ROS1 geni için çalışma yapılamamıştır. Hastalardan çeşitli girişimsel yöntemlerle elde edilen doku materyali ile yapılan moleküler testlere ait bazı veriler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Solid biyopsi materyaliyle çalışma yapılan hasta sayısı

Çalışılan Genler	Hasta Sayısı (n=30)
EGFR, ALK ve ROS1	7
ALK ve ROS1	5
Yalnız EGFR	12
Yalnız ALK	1
Diğer*	5
Toplam:30	

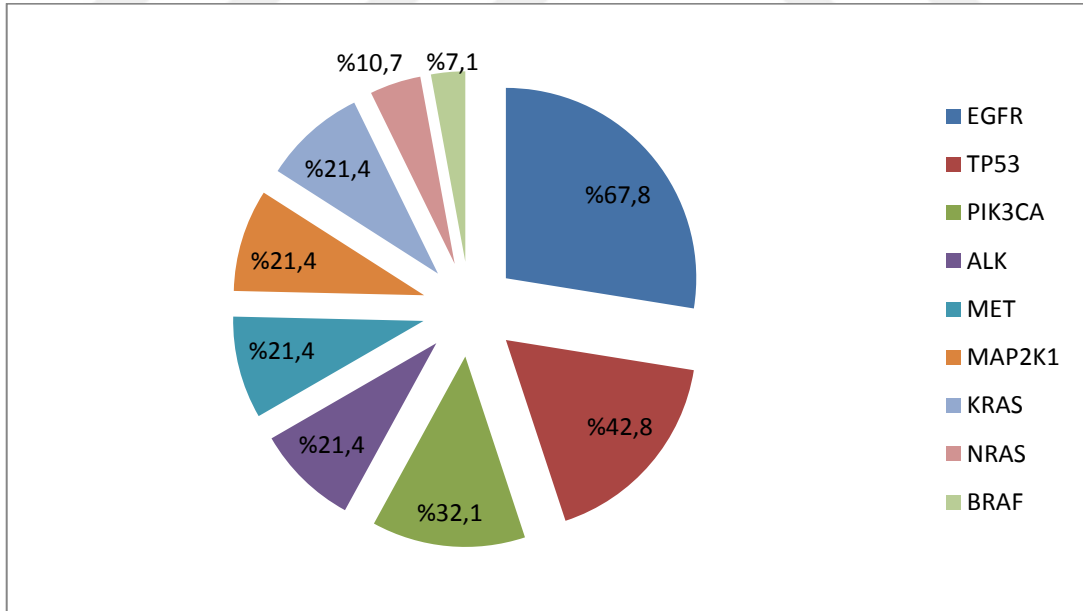
Diğer: Doku biyopsisine uygun olmayan, alınan solid biyopsi materyalinde tümör hücresi içermeyen ve alınan materyalin yetersizliğinden dolayı çalışma yapılamayan hasta sayısı'

Patoloji raporları incelenen 30 hastanın 25'inde (%83,3) solid biyopsi materyaliyle testler yapılmış ve hastaların 9'unda (%47,3) EGFR, 2'sinde (%16,6) ROS1 genine ait mutasyonlar saptanmış olup hiçbir hastada ALK geninde mutasyona rastlanmamıştır.

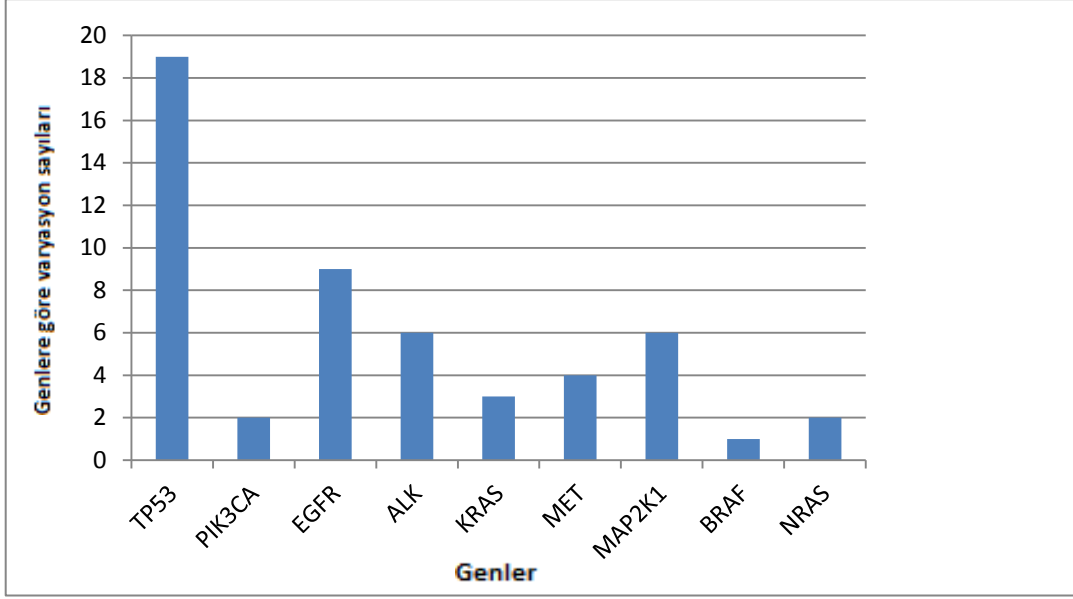
4.2. Likit Biyopsi Materyali ile Gerçekleştirilen Analizlere Ait Bulgular

Likit biyopsi testi kapsamında 30 akciğer kanseri hastasından alınan periferik kan örneklerinden cfDNA izole edilerek EGFR, TP53, PIK3CA, ALK, MAP2K1, ROS1, MET, KRAS, NRAS, BRAF ve ERBB2 gen bölgeleri taranmıştır. Ancak 2 hastada (%6,6) yeterli miktarda cfDNA elde edilemediğinden çalışmanın sonraki aşamalarına geçilememiştir. 3 hastada (%10) ise taranan gen bölgelerinde varyasyon saptanmamıştır.

Belirtilen gen bölgeleri taranan 28 (%93,3) akciğer kanseri hastasının %67,8'inde EGFR, %42,8'inde TP53, %32,1'inde PIK3CA, %21,4'ünde ALK, %21,4'ünde MET, %21,4'ünde MAP2K1, %21,4'ünde KRAS, %10,7'sinde NRAS ve %7,1'inde BRAF genlerinde çeşitli varyasyonlar saptanmış olup ERBB2 ve ROS1 genlerinde herhangi bir varyasyon gözlenmemiştir. Hastalarda gen bölgelerine göre saptanan varyasyonların oranı Çizim 4.1.'de bu varyasyonların gen bölgelerine göre sayıları ise Çizim 4.2.'de gösterilmiştir.



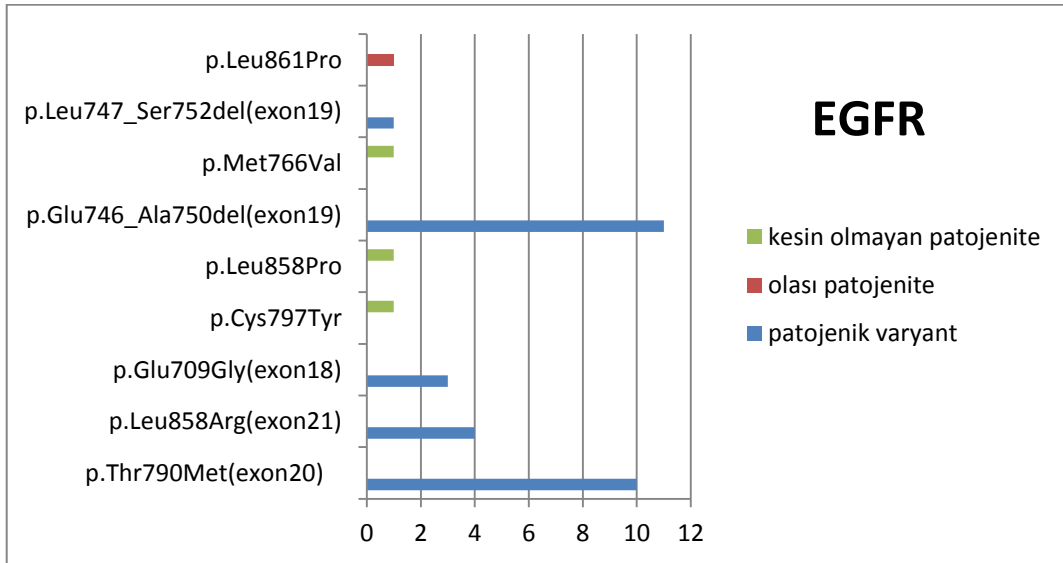
Çizim 4.1. Likit biyopsi testi kapsamında akciğer kanseri hastalarında taranan gen bölgelerine göre saptanan varyasyon oranı



Çizim 4.2. 25 akciğer kanseri hastasında cfDNA varyasyonlarının sıklığı. 9 farklı gende toplam 52 varyasyon tespit edilmiştir.

- **EGFR Geninde Saptanan Varyasyon Bölgeleri ve Sayıları**

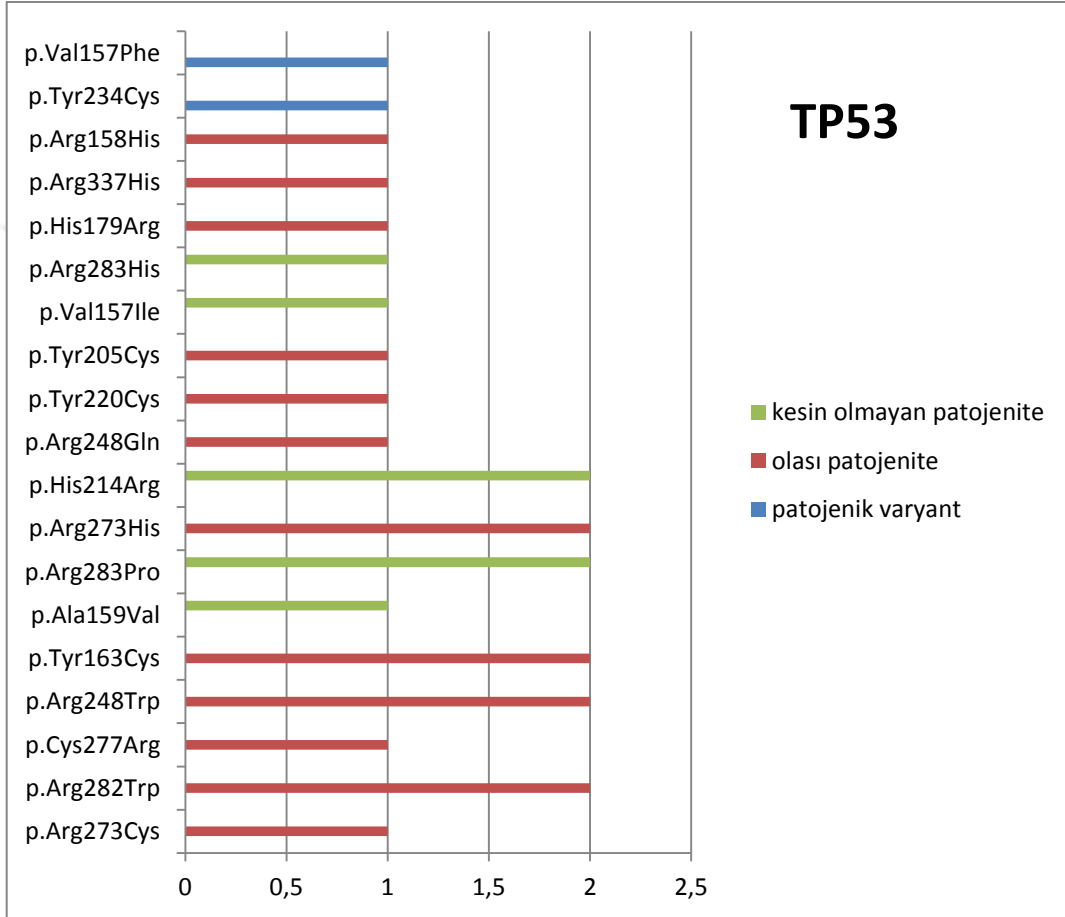
Likit biyopsi yöntemi ile 28 akciğer kanseri hastasında EGFR gen bölgesi taranmış ve Çizim 4.3.'de gösterilen çeşitli varyasyonlar 19 hastada saptanmış olup bu varyasyonlardan 5'i patojenik, 3'ü kesin olmayan patojenite ve 1'i olası patojenite olarak değerlendirilmiştir. Patojenik olarak değerlendirilen p.Leu747_Ser752del, p.Glu746_Ala750del, p.Glu709Gly, p.Leu858Arg ve p.Thr790Met varyasyon bölgeleri çeşitli ilaçlarla ilişkilendirilmiştir.



Çizim 4.3. 19 akciğer kanseri hastasında gözlenen EGFR varyasyon bölgeleri ve sayıları

- **TP53 Geninde Saptanan Varyasyon Bölgeleri ve Sayıları**

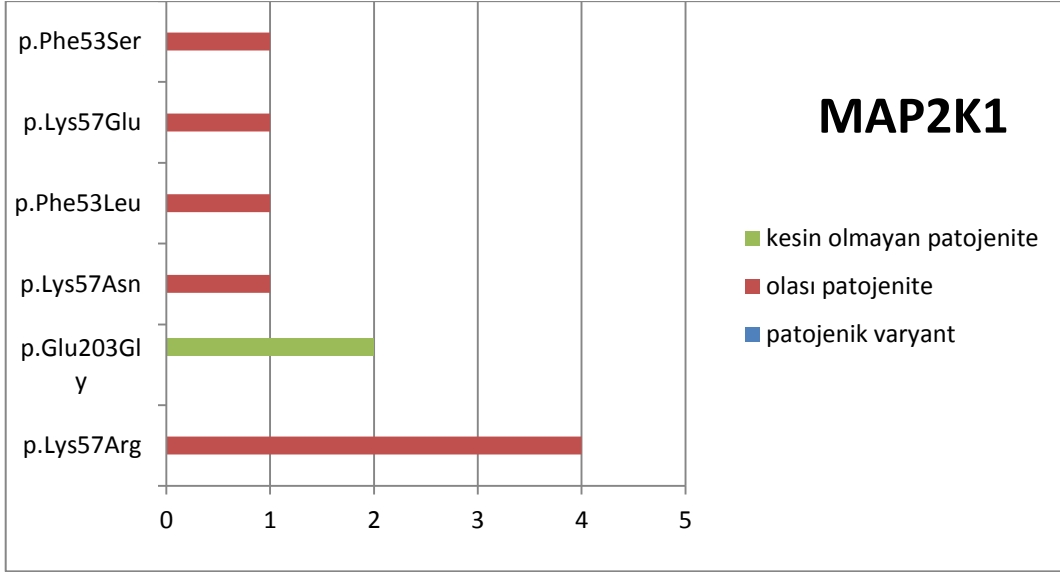
TP53 gen bölgesi taranan 28 akciğer kanseri hastasının 12'sinde toplam 19 farklı varyasyon saptanmış olup bu varyasyonlardan 11'i olası patojenite, 5'i kesin olmayan patojenite ve 2'si patojenik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan likit biyopsi çalışmasında taranan genler arasında en fazla varyasyon bölgesinin saptandığı gen TP53 geni olmuştur. TP53 varyasyon bölgelerine ait veriler Çizim 4.4. 'de gösterilmiştir.



Çizim 4.4. 12 akciğer kanseri hastasında gözlenen TP53 varyasyon bölgeleri ve sayıları

- **MAP2K1 Geninde Saptanan Varyasyon Bölgeleri ve Sayıları**

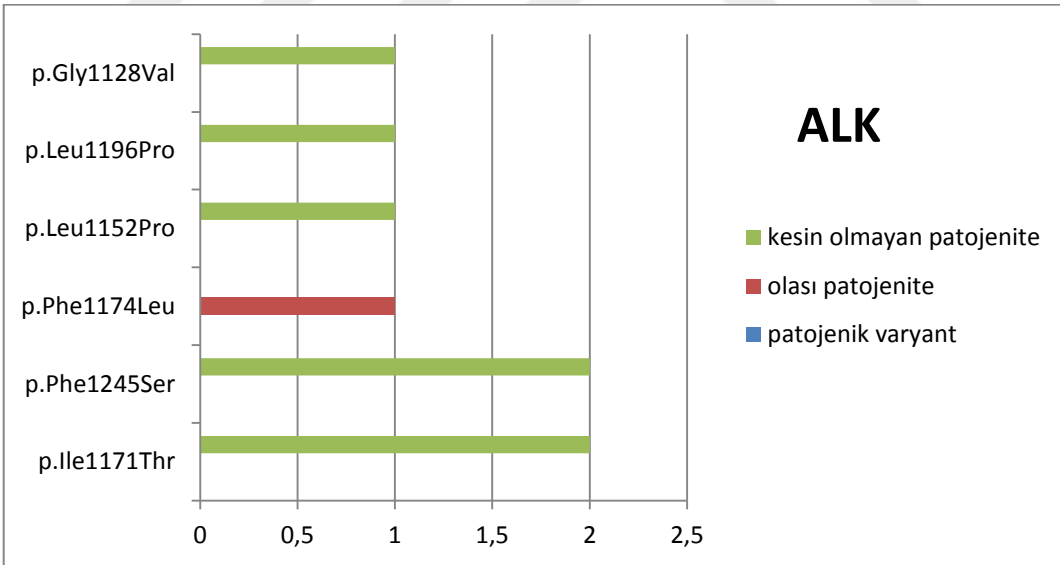
MAP2K1 gen bölgesi taranan 28 hastadan 6'sında 6 farklı varyasyon saptanmıştır. Saptanan varyasyonlardan 5'i olası patojenite, 1'i kesin olmayan patojenite olarak değerlendirilmiş olup patojenik varyant saptanmamıştır. (Çizim 4.5.)



Çizim 4.5. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen MAP2K1 varyasyon bölgeleri ve sayıları

- **ALK Geninde Saptanan Varyasyon Bölgeleri ve Sayıları**

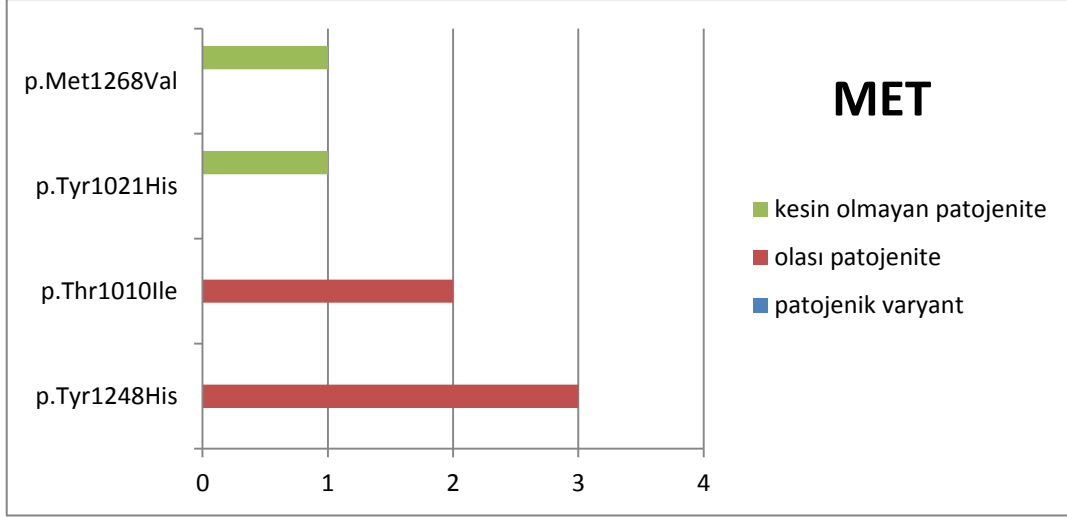
ALK geninde 6 farklı varyasyon saptanmıştır. 28 hastanın 6'sında saptanmış olan bu varyasyonlardan 5'i kesin olmayan patojenite olarak değerlendirilirken 1'i olası patojenite olarak değerlendirilmiştir. ALK geninde saptanan varyasyon bölgeleri ve sayıları Çizim 4.6.'de gösterilmiştir.



Çizim 4.6. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen ALK varyasyon bölgeleri ve sayıları

- **MET Geninde Saptanan Varyasyon Bölgeleri ve Sayıları**

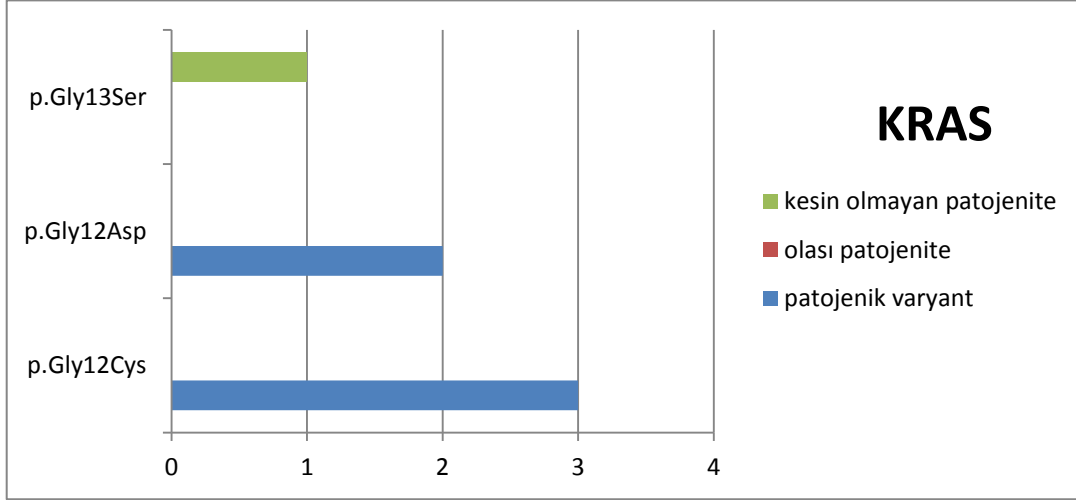
MET geninde toplam 6 hastada 4 farklı varyasyon gözlenmiştir. Bu varyasyonların 2'si olası patojenite, diğer ikisi ise kesin olmayan patojenite olarak değerlendirilmiştir. MET geninde saptanan varyasyon bölgelerine ait veriler Çizim 4.7.'de gösterilmiştir.



Çizim 4.7. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen MET varyasyon bölgeleri ve sayıları

- **KRAS Geninde Saptanan Varyasyon Bölgeleri ve Sayıları**

KRAS geninde 3 farklı varyasyon saptanmıştır. 28 hastanın 6'sında saptanan bu varyasyonlardan 1'i olası patojenite, 2'si patojenik olarak değerlendirilmiş olup patojenik varyantlar ilaç ilişkilidir. KRAS varyasyon bölgeleri Çizim 4.8. 'de gösterilmiştir.



Çizim 4.8. 6 akciğer kanseri hastasında gözlenen KRAS varyasyon bölgeleri ve sayıları

- **PIK3CA, BRAF, NRAS Genlerinde Saptanan Varyasyon Bölgeleri ve Sayıları**

Yeni nesil dizileme yöntemiyle likit biyopsi materyalinden yapılan analiz sonucunda 9 hastada PIK3CA geninde 2 farklı varyasyon saptanmıştır. p.Glu542Lys varyasyonu 7 hastada gözlenirken, p.Glu545Lys varyasyonu 4 hastada gözlenmiş ve iki varyasyon da olası patojenite olarak değerlendirilmiştir.

BRAF geninde 2 hastada saptanan p.Tyr472Cys varyasyonu patojenik olarak değerlendirilmiştir.

NRAS geninde toplam 3 hastada 2 farklı varyasyon saptanmıştır. 2 hastada saptanan p.Gln61Lys varyasyonu patojenik, 1 hastada saptanan p.Gln61Arg varyasyonu ise olası patojenite olarak değerlendirilmiştir.

- **Sonuç Olarak;**

Likit biyopsi çalışmaları ile akciğer kanseri panelinde 28 hasta için 11 gen taranmış ve analiz edilmiştir. 25 hastada gen varyasyonları bulunmuştur. 3 hastadan elde edilen cfDNA’da ise varyasyon saptanmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 30 akciğer kanseri hastasının varyasyon bölgeleri ve sayılarına ait veriler, varyasyon saptanmayan ve cfDNA elde edilemeyen hastalar Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. 30 akciğer kanseri hastasında gözlenen varyasyon bölgeleri ve diğer* bazı bilgiler

Hasta No	EGFR	MET	ALK	KRAS	NRAS
1	Varyasyon Saptanmadı				
2		p.Thr1010Ile			
3	p.Thr790Met p.Leu858Arg	p.Tyr1248His	p.Phe1174Leu		
4				p.Gly12Asp	
5	p.Glu709Gly p.Cys797Tyr		p.Ile1171Thr		
6	Varyasyon Saptanmadı				
7	p.Thr790Met p.Leu858Pro				
8	p.Leu858Arg	p.Tyr102His p.Tyr1248His			
9	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met p.Met766Val			p.Gly12Cys	
10					
11	p.Glu746_Ala750del				
12	p.Leu858Arg p.Glu709Gly	p.Tyr1248His	p.Ile1171Thr	p.Gly12Asp	p.Gln61Lys
13	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met				
14	p.Glu746_Ala750del				
15	p.Leu747_Ser752del				
16	Varyasyon Saptanmadı				
17	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met				
18	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met				
19	p.Glu709Gly			p.Leu1152Pro	p.Gly12Cys p.Gln61Lys
20	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met p.Leu861Pro	p.Met1268Val		p.Phe1245Ser p.Ile1171Thr p.Gly1128Val	p.Gly13Ser
21	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met	p.Thr1010Ile		p.Phe1245Ser	p.Gln61Arg
22					
23				p.Gly12Cys	
24	cfDNA Elde Edilemedi				
25	cfDNA Elde Edilemedi				
26	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met				
27	p.Leu858Arg				
28	p.Glu746_Ala750del				
29	p.Glu746_Ala750del p.Thr790Met				
30					

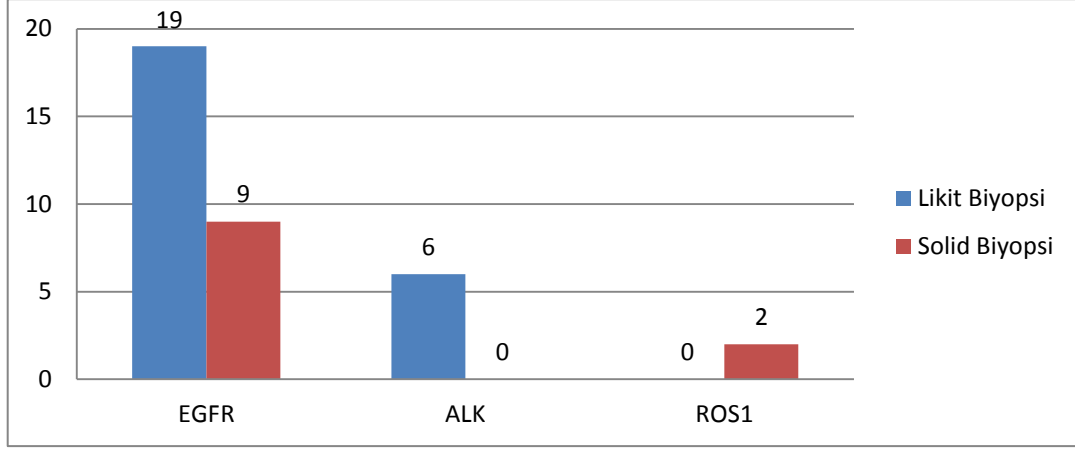
Diğer: 2 akciğer kanseri hastasından cfDNA elde edilememiş ve cfDNA elde edilen 3 hastanın cfDNA’sında varyasyon gözlenmemiştir.’

Çizelge 4.3. 30 akciğer kanseri hastasında gözlenen varyasyon bölgeleri ve diğer* bazı bilgiler-2

Hasta No	TP53	PIK3CA	BRAF	MAP2K1
1	Varyasyon Saptanmadı			
2	p.Arg273Cys	p.Glu545Lys		
3	p.Arg282Trp p.Cys277Arg p.Arg248Trp p.Tyr163Cys p.Ala159Val		p.Tyr472Cys	
4				
5	p.Arg282Trp			p.Lys57Arg p.Glu203Gly
6	Varyasyon Saptanmadı			
7				
8	p.Arg283Pro p.Arg273His			p.Lys57Arg
9	p.His214Arg p.Arg248Gln p.Tyr220Cys p.Tyr205Cys	p.Glu542Lys	p.Tyr472Cys	
10		p.Glu542Lys		
11		p.Glu542Lys		
12	p.Arg283Pro	p.Glu542Lys		p.Lys57Arg
13	p.Val157Ile			
14				
15	p.His214Arg			
16	Varyasyon Saptanmadı			
17				
18				
19		p.Glu542Lys		p.Lys57Asn
20	p.Arg283His p.Arg273His p.His179Arg p.Tyr163Cys	p.Glu542Lys p.Glu545Lys		p.Phe53Leu p.Lys57Glu p.Lys57Arg p.Glu203Gly
21	p.Arg337His p.Arg248Trp	p.Glu542Lys p.Glu545Lys		p.Phe53Ser
22	p.Arg158His			
23				
24	cDNA Elde Edilemedi			
25	cDNA Elde Edilemedi			
26				
27				
28				
29		p.Glu545Lys		
30	p.Tyr234Cys p.Val157Phe			

4.3. Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi Materyallerinde Saptanan Mutasyonlar

Likit biyopsi testi kapsamında akciğer kanseri hastalarında yeni nesil dizi analizi yöntemiyle ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PIK3CA, ROS1 ve TP53 genleri taranmıştır. Aynı hastaların solid biyopsi materyallerinden gerçekleştirilen testlerle elde edilen EGFR, ALK ve ROS1 genlerindeki mutasyon verileri hasta dosyalarından incelenmiştir. Likit biyopsi ve solid biyopside EGFR, ALK ve ROS1 genlerinde mutasyon saptanan hasta sayıları Çizim 4.9. 'de gösterilmiştir.



Çizim 4.9. Çalışmayı oluşturan hasta grubunda likit biyopsi ve solid biyopside EGFR, ALK ve ROS1 genlerinde mutasyon saptanan hastaların sayısı

- **EGFR Gen Mutasyonlarının Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi Yöntemleri Açısından Değerlendirilmesi**

Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre likit biyopsi materyali ve solid biyopsi materyalinden yapılan analizler sonucunda;

- Hastaların 9'unda EGFR gen mutasyonu hem likit biyopsi hem de solid biyopsi materyalinde pozitif olarak değerlendirilmiştir.
- Çalışmaya dahil edilen 7 hastada likit biyopsi çalışmasında EGFR varyasyon bölgelerine rastlanmış ancak solid biyopsi materyali ile yapılan çalışmalar bu gen açısından negatif olarak değerlendirilmiştir.
- Hastaların 3'ünde her iki yöntem açısından EGFR mutasyonu negatif olarak değerlendirilmiştir.
- Solid biyopsi çalışmasında EGFR pozitif sonuç verilip, likit biyopsisinde bu gen açısından varyasyon saptanmayan hiçbir hastaya rastlanmamıştır.
- Hastaların 11'inde ise çeşitli sebeplerle EGFR geni için solid biyopsi materyaliyle çalışma yapılamamış ve bu hastalardan 3'ünde yapılan likit biyopsi çalışması sonucunda çeşitli EGFR varyasyonlarına rastlanmıştır. Bu 11 hastanın 2'sinde cfDNA elde edilemediğinden likit biyopsi testinin sonraki aşamalarına geçilememiş varyasyon analizi yapılamamıştır.

- **ALK Gen Mutasyonlarının Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi Yöntemleri Açısından Değerlendirilmesi**

Yapılan çalışma ile;

- Hastaların 1'inde likit biyopsi materyalinden yapılan analizlerde ALK varyasyon bölgelerine rastlanmış ancak solid biyopsi materyali ile yapılan çalışmalar bu gen açısından negatif olarak değerlendirilmiştir.

- Hastaların 17'sinde çeşitli sebeplerle ALK geninde solid biyopsi materyaliyle çalışma yapılamamıştır. Bu hastalardan 5'inin likit biyopsi çalışmasında ALK varyasyon bölgeleri saptanmıştır.
- Solid biyopsi materyaliyle çalışma yapılamayan 17 hastadan 1'inde ise cfDNA elde edilememiş ve likit biyopsi yöntemi açısından değerlendirme yapılamamıştır.
- cfDNA elde edilemediği için likit biyopsi testi kapsamında yeni nesil dizileme ile değerlendirilemeyen 1 hasta ise solid biyopsi materyali ile değerlendirilebilmiş ve ALK negatif olarak sonuçlandırılmıştır.
- Çalışmaya dahil edilen 11 hastada her iki yöntem açısından ALK mutasyonu negatif olarak değerlendirilmiştir.
- ALK mutasyonu açısından hem likit biyopsi hem de solid biyopsi materyalinden yapılan çalışmaların ikisinde de pozitif olarak değerlendirilen hasta yoktur.
- Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda solid biyopside ALK pozitif olarak değerlendirilip, likit biyopsisinde varyasyon saptanmayan herhangi bir hastaya rastlanmamıştır.
- **ROS1 Gen Mutasyonlarının Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi Yöntemleri Açısından Değerlendirilmesi**

Çalışmaya dahil edilen 30 akciğer kanseri hastası likit biyopsi ve solid biyopsi yöntemleri açısından ROS1 geni için değerlendirildiğinde;

- Çalışmaya alınan hastaların 2'sinde, yapılan solid biyopsi testlerinde ROS1 geni pozitif olarak değerlendirilirken, bu hastalara ait likit biyopsi çalışmasında ROS1 varyasyon bölgelerine rastlanmamıştır.
- Hastaların 9'unda her iki yöntemle yapılan çalışmalar negatif sonuç vermiş ve varyasyon gözlenmemiştir. Her iki materyal açısından pozitif olarak değerlendirilen hasta ise bulunmamaktadır.
- Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda solid biyopside ROS1 negatif olarak değerlendirilip, likit biyopsisinde varyasyon saptanmış olan herhangi bir hastaya rastlanmamıştır.
- Hastaların 18'inde ise çeşitli sebeplerle solid biyopsi materyalinden çalışma yapılamamış ve bu hastaların 17'sinde yapılan likit biyopsi çalışmasında ROS1 varyasyon bölgesi saptanmamıştır. 1 hastada cfDNA elde edilemediğinden likit biyopsi testinin sonraki aşamalarına geçilememiştir.

Çalışmaya dahil edilen 30 akciğer kanseri hastasında solid biyopsi ve likit biyopsi yöntemlerinin etkinliği araştırılarak, bu hastalarda saptanan EGFR, ALK ve ROS1 genlerine ait mutasyonlar iki yöntem açısından Çizelge 4.4.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. 30 akciğer kanseri hastasının EGFR, ALK ve ROS1 genlerine ait mutasyonların solid biyopsi ve likit biyopsi yöntemleri açısından araştırılması

Hasta No	Solid Biyopsi			Likit Biyopsi		
	EGFR	ALK	ROS1	EGFR	ALK	ROS1
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)			POZİTİF	POZİTİF	(-)
4		(-)		(-)	(-)	(-)
5	(-)			POZİTİF	POZİTİF	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(-)			POZİTİF	(-)	(-)
8	(-)			POZİTİF	(-)	(-)
9	POZİTİF			POZİTİF	(-)	(-)
10	(-)			(-)	(-)	(-)
11	POZİTİF	(-)	(-)	POZİTİF	(-)	(-)
12	(-)	(-)	(-)	POZİTİF	POZİTİF	(-)
13	POZİTİF			POZİTİF	(-)	(-)
14	POZİTİF	(-)	(-)	POZİTİF	(-)	(-)
15	POZİTİF			POZİTİF	(-)	(-)
16		(-)	POZİTİF	(-)	(-)	(-)
17	POZİTİF	(-)	(-)	POZİTİF	(-)	(-)
18	POZİTİF			POZİTİF	(-)	(-)
19				POZİTİF	POZİTİF	(-)
20				POZİTİF	POZİTİF	(-)
21	(-)			POZİTİF	POZİTİF	(-)
22				(-)	(-)	(-)
23		(-)	POZİTİF	(-)	(-)	(-)
24		(-)	(-)			
25						
26	POZİTİF			POZİTİF	(-)	(-)
27				POZİTİF	(-)	(-)
28	POZİTİF	(-)	(-)	POZİTİF	(-)	(-)
29	(-)			POZİTİF	(-)	(-)
30		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri tüm dünyada insidans ve mortalite oranları açısından bütün kanserler arasında ilk sırada yer almakta olup akciğer kanserine neden olan genetik faktörler, karsinogenezin temelinde yatan onkogenler ve tümör süpresör genler olarak bilinmektedir. Dünyada her yıl 1,8 milyon yeni akciğer kanseri tanısı konmakta ve bütün kanserlerin yaklaşık olarak %13'ünü akciğer kanseri oluşturmaktadır (Yüce ve Kılıçkapı 2016). Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın 2012 raporuna göre akciğer kanseri Türkiye'de tüm nüfus ve erkeklerde en sık karşımıza çıkan kanser tipi olarak kaydedilmektedir. Kadınlarda ise sıklığı bakımından beşinci sırada yer alır. Erkeklerde tüm kanserlerin %21.8'ini akciğer kanseri oluştururken, kadınlarda %4.9'unu oluşturmaktadır. (Şencan ve Keskinılıç 2015).

Akciğer kanseri sağkalım süresi, tedaviye yanıtın düşüklüğü gibi sebeplerle rutin ve bireye özgü takip gerektirmektedir. Bu özellikleri sebebiyle hastanın genetik bilgileri ışığında tedaviye olası yanıtın değerlendirilmesi hastalar için önem taşımaktadır. Akciğer kanseri hastalarında solid biyopsi ve likit biyopsi yöntemlerinin hastalık tanısı üzerine etkinliğinin araştırılmasını amaçladığımız bu çalışmada her iki yöntemle elde edilen materyal üzerinden EGFR, ALK ve ROS1 genlerinin mutasyon yükleri belirlenmiş, ayrıca likit biyopsi testi kapsamında yeni nesil dizi analizi ile akciğer kanseri panelinde 11 gen analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar tartışılmıştır.

Akciğer kanseri dünya genelinde kadınlara kıyasla erkeklerde daha sık gözlenen bir kanser tipi olmakla birlikte ülkemizde erkek/kadın oranının 9/1 civarında olduğu belirtilmiştir (Köktürk ve diğ. 2004, Turkish Thoracic Society 2002). Kırkıl ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada bu oranı (E/K) 6,3/1 olarak bulmuşlardır. Radzikowska ve arkadaşları tarafından 1995-1998 yılları arasında yapılan ve 20561 akciğer kanseri vakasının incelendiği başka bir çalışmada ise erkek/kadın oranı 6/1 olarak bulunmuştur. Trawis ve arkadaşlarının ABD'de yaptığı bir çalışmada ise bu oran 1,5/1 olarak tespit edilmiştir. Erkek/Kadın oranını 1,1/1 olarak bulduğumuz çalışmamızda bu oranın literatürde belirtilen oranlarla olan farkının hasta sayımızın diğer çalışmalara kıyasla çok daha düşük olmasından kaynaklandığını ve aradığımız kriterlere uygun hasta seçiminin bu oranı büyük oranda etkilediğini düşünmekteyiz.

Tüm yaş gruplarında izlenebilen akciğer kanseri için en sık rastlanan yaş aralığının 50-70 yaş aralığı olduğu bildirilmiştir (Ertaş 2015). Villaflor ve arkadaşları 2016 yılında akciğer kanseri hastaları ile yaptıkları çalışmada yaş ortalamasını 64 olarak bildirmişler, 2012 yılında Günbatar ve arkadaşları tarafından yapılan akciğer kanserli olguların

değerlendirildiği bir çalışmada ise hastaların yaş aralığı 56-61 olarak rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada hastaların yaş ortalaması 60,9 olup literatürde belirtilen yaş aralığının içerisinde yer almaktadır.

Likit biyopsi testi kapsamında hastaların plazma cfDNA'ları ile çalışılabilmesi için 30 ml periferik kan örneklerinden 2-50 ng cfDNA elde edilmelidir. Likit biyopsi çalışmasına dahil ettiğimiz 30 akciğer kanseri hastasının 2'sinde plazmadan yeterli miktarda cfDNA elde edilemediğinden testin sonraki aşamalarına geçilememiş ve genlerdeki varyasyon durumu değerlendirilememiştir. Dolaşımdaki tümör DNA'sının miktarı (ctDNA) tümör tipi ve lokasyonu ile sınırlı olmamak üzere klinik evre, tümör yükü, apoptozis ve nekroz oranı gibi birkaç klinik faktöre bağlıdır ve genelde evre ile korelasyon göstermektedir (Newman ve diğ. 2014). Bu klinik faktörlere ek olarak kan alımının zamanlaması likit biyopsi testi için oldukça önemlidir. Bu durum kan dolaşımında mevcut olan ctDNA seviyelerini etkileyebilmektedir. Mevcut bazı çalışmalar cerrahi rezeksiyon sonrası ve öncesi ctDNA seviyelerini değerlendirmiş ve ctDNA seviyelerinin ameliyattan hemen sonra sıklıkla yükseldiğini, ameliyat sonrası 2-4 haftalık süreçte ise düşüşte olduğunu bildirmiştir (Kim ve diğ. 2015, Diehl ve diğ. 2008). Benzer şekilde ctDNA seviyeleri, hastalarda kemoterapi veya hedefe yönelik tedavilere klinik yanıt ile korelasyon gösterir. Tedaviye cevap veren hastalarda ctDNA seviyesi düşer hatta tespit edilemeyen seviyelere inebilir ancak daha sonra progresyon ve nüks sürecinde tekrar dolaşımdaki tümör DNA seviyeleri yükselmektedir (Newman ve diğ. 2014).

Çalışmaya dahil ettiğimiz 30 akciğer kanseri hastasının 5'inde 'doku yetersizliği, materyalin tümör hücresi içermemesi, hastanın doku biyopsisine uygun olmaması' gibi çeşitli nedenlerle solid biyopsi materyalinden çalışma yapılamadığı tespit edilmiş olup likit biyopsi testi kapsamında bu hastaların 4'ünden elde edilen cfDNA materyali analiz edilmiş ve 3'ünde EGFR, 2'sinde ALK geninde çeşitli varyasyonlara rastlanmıştır. Doku materyali ile çalışma yapılamayan bu 5 hastanın 1'inde ise cfDNA elde edilemediğinden likit biyopsi testinin sonraki aşamalarına geçilememiş, dolayısıyla EGFR, ALK ve ROS1 genlerindeki mutasyon durumu incelenememiştir. Moleküler değişiklikleri değerlendirmek için altın standart olarak kabul edilen doku biyopsisi bazen akciğer kanseri hastalarının tedavisini olumsuz yönde etkileyebilecek çeşitli sınırlamalar sunmakta ve tümör dokusuna erişim her zaman mümkün olmamaktadır. Tekrarlanması da risk oluşturabilen bu yöntem özellikle ileri evre akciğer kanseri hastaları için tehlikeli bir seçenek halini almaktadır (Mandel ve Metais 1948). Böyle hastalarda hastalık progresyonunu izlemek, tedaviye yanıtı ve direnç kazanımını tespit etmek için likit biyopsi iyi bir alternatif oluşturmaktadır.

Hem solid biyopsi hem de likit biyopsi materyali ile çalışma yapılan 7 hastada likit biyopsi çalışmasında EGFR geninde ekzon 18,19,20 ve 21'de yer alan ilaçlarla ilişkilendirilmiş çeşitli varyasyonlara rastlanırken, bu hastaların solid biyopsi materyali ile yapılan çalışmalar EGFR geni açısından negatif olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde her iki materyal ile çalışma yapılmış olan 1 hastada likit biyopsi testi kapsamında ALK geninde varyasyon bölgeleri saptanmış ancak bu hastanın solid biyopsi materyali ile yapılan çalışmalarda ALK geninde değişiklik gözlenmemiştir. Akciğer kanser tümörleri heterojenite göstermektedirler. Bu nedenle bireysel tümör biyopsisi tümörün tamamını temsil etmemektedir. Özellikle alınan küçük biyopsi örnekleri moleküler incelemeler için yetersiz kalmakta ve mutasyonların tespitinde problem oluşturmaktadır. Ayrıca solid biyopsilerde uygun yer ve yöntemi belirlemek oldukça önemlidir (Fisher ve diğ. 2013, Yap ve diğ. 2012). Solid biyopsi örnekleri tümör içerisinde bulunan tüm mutasyonları içermediğinden, kan dolaşımına salınan tümör DNA'ları (ctDNA) daha fazla prognostik bilgi sunabilmektedir. Bunlara ek olarak solid biyopsi örneğinde mutasyon gözlemlenmediği halde likit biyopsi materyali ile yapılan çalışmalarda çeşitli varyasyonlara rastladığımız hastalardaki bu durum yüksek derecede metastatik hastalığın belirtisi olabilmektedir. Metastatik tümör hücreleri primer tümörden köken alarak subklonal populasyonlar oluşturmaktadırlar (Xu ve diğ. 2015).

Çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların 2'sinde solid biyopsi materyali ile yapılan çalışmalarda ROS1 genindeki mutasyon durumu pozitif olarak değerlendirilmiş, ancak likit biyopsi materyali ile yapılan çalışmalarda bu hastaların ROS1 geninde varyasyon bölgelerine rastlanmamıştır. Beyaz kan hücreleri nekrozla tümörlerden kana salınan DNA'yı (ctDNA) seyreltip tespitini engelleyebilmektedirler. Bu durum solid biyopsi materyalinde tespit edilen mutasyonların ctDNA'da saptanmamasına neden olabilmektedir (Xu ve diğ. 2015). Solid biyopsi materyalinde ROS1 mutasyonu gözlemlendiği halde likit biyopsi materyalinde bu gende herhangi bir varyasyon saptamadığımız hastalardaki durumun bu sebepten kaynaklandığını düşünmekteyiz.

İnsanda 7. Kromozomun 7p11.2 bölgesinde lokalize olan EGFR geni, 28 ekzona sahip bir gen olup glikoprotein kodlamaktadır. Tirozin kinaz aktivitesine sahip olan EGFR bir transmembran proteindir. Hücre dışı sinyallerin hücre içine iletilmesinde görev almaktadır. Kanserler ve EGFR aktivasyonlarının veya aşırı ekspresyonlarının bir ilişki içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Uludağ 2008).

Ünal ve arkadaşları akciğer kanseri hastalarının solid biyopsi materyallerini kullanarak 2013 yılında yaptıkları çalışmada EGFR mutasyon sıklığını Türkiye'de %42 olarak

bulmuş, Akça ve arkadaşları ise aynı yıl yaptıkları bir çalışmada bu oranı %48 olarak tespit etmişlerdir. Aydın Demiray 2015 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak yaptığı çalışmada 300 hastanın verilerini kullanarak bu oranı %36 olarak hesaplamıştır. Bizim çalışmamızda solid biyopsi materyali kullanılarak EGFR mutasyon sıklığına bakılan hastaların %47,3'ünde mutasyona rastlanmış ve literatürde belirtilen oranlara yakın bir sonuç elde edilmiştir. Sundaresan ve arkadaşları 2015 yılında akciğer kanseri tanısı almış 40 hastanın doku ve plazma ctDNA materyalleri ile yaptıkları bir çalışmada EGFR T790M mutasyonlarını iki materyalde karşılaştırmış ve doku örnekleri ile yaptıkları çalışmada hastaların %71'inde ctDNA örnekleri ile yaptıkları çalışmada ise hastaların %80'inde T790M genotipini başarılı bir şekilde elde etmişlerdir. İki örnek arasındaki uyumu %74 olarak bildirmişlerdir. Xu ve arkadaşları 2015 yılında 42 akciğer kanseri hastası ile yaptıkları çalışmada 11 hastanın (%26,2) likit biyopsi materyalinde EGFR mutasyonları tespit etmişlerdir. Isobe ve arkadaşları ise 2012 yılında 24 akciğer kanseri hastasını dahil ettikleri çalışmada 6 hastada (%25) EGFR mutasyonu saptamışlardır. Çalışmamızda likit biyopsi materyaliyle yapılan diğer çalışmalardan biraz farklı olarak 28 akciğer kanseri hastasından 19'unda (%67,8) EGFR mutasyonu saptadık. Bulunan oranlar arasındaki farkın daha az hasta sayısı ile çalışmış olmamızdan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Anaplastik lenfoma kinaz (ALK), farklı malignitelere anormal halde bulunan bir tirozin kinaz reseptörüdür (El Telbany ve Ma 2012). Büyük hücreli lenfomalarda t(2;5)(p23;q35) translokasyonu ile saptanmıştır. KHDAK'nda ise yaklaşık %2-%7 oranında bir sıklıkla 2p inversiyonu neticesinde EML4 ile füzyon yapmaktadır. EML4-ALK füzyonu ise artmış tirozin kinaz aktivitesiyle sonuçlanır. Paik ve arkadaşları 2003 ve 2008 yılları arasında akciğer kanseri tanısı almış 465 hastayı dahil ettikleri çalışmada hastaların 19'unda (% 4,2) ALK yeniden düzenlenmesi tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Dacic ve arkadaşları 2016 yılında 2116 akciğer adenokarsinom hastasının doku materyaline FISH tekniğini uygulamışlar ve bu hastaların 72'sinde (%4) ALK pozitif sonuç almışlardır. Bizim çalışmamızda Patoloji Anabilim Dalı'nda ALK yeniden düzenlenmelerinin tespiti için FISH tekniği uygulanan hastaların hiçbirinde ALK pozitif sonuç alınmamıştır. Mutasyon sıklığı, yapılan birçok çalışmada düşük olarak bildirilen ALK yeniden düzenlenmesinin çalışmamızda hiçbir hastada saptanmamasının nedeninin çalışmaya dahil edilen hasta sayısının çok düşük olması, doku yetersizliği gibi sebeplerle bazı hastalarda çalışma yapılamamış olması ve alınan doku biyopsi materyalinde tümör hücrelerine ulaşamamış olması vb. sebeplerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Villaflor

ve arkadaşları 2016 yılında likit biyopsi materyali ile 68 hasta için çalışma yapmışlar ve hastaların %3'ünde ALK varyasyonları saptamışlardır. Yaptıkları çalışmada rapor edilen diğer çalışmalara oranla daha düşük bir oran bulmuşlar ve bunu belirtmişlerdir. Likit biyopsi çalışması yaptığımız 28 hastanın 6'sında(%21,4) ALK geninde varyasyon saptanmış olup bu 6 hastadan 1'inin solid biyopsi materyaliyle de ALK geni çalışılmış ancak negatif sonuç alınmıştır. Dolayısıyla bu hasta için iki materyal ile yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında uyum gözlenememiş ve likit biyopsi testi hedeflenebilir varyasyonların gösterilmesi açısından üstünlük sağlamıştır.

ROS-1 6. kromozomun 6q22 bölgesinde lokalize, insan reseptör tirozin kinaz ailesine mensup bir gendir ve ilk olarak 2003 yılında bulunmuştur (Bergethon ve diğ. 2012). MAPK ve PI3K-Akt yolaklarının aktive olmasını sağlayarak hücre büyümesi ve çoğalmasında rol oynamaktadır. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %1-2'sinden ROS1 geninde meydana gelen kromozomal değişiklikler sorumludur (Bozkurtlar ve Kaya 2018). Zhang ve arkadaşları FISH tekniğini kullanarak 120 hastada yaptıkları çalışmada ROS1 geni yeniden düzenlenmelerini %1,7 (n=2) oranında, Bergethon ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları benzer bir çalışmada 1073 hastanın %1,7'sinde(n=18) , Jin ve arkadaşları ise 375 hasta ile yaptıkları çalışmada %0,8 (n=3) oranında bulduklarını belirtmişlerdir. Ginestet ve arkadaşları 2018 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada, 26 hastanın formalin fikse parafine gömülü tümör doku örneklerini kullanarak FISH tekniğini uygulamış ve hastaların 3'ünde (%11,5) ROS1 genine ait yeniden düzenlemelere rastlamışlardır. Bizim çalışmamızda ROS1 geni yeniden düzenlemeleri için oran %16,6 olarak bulunmuş olup bu oran Ginestet ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki oranla benzerlik göstermektedir. Diğer çalışmalarda bulunan oranla arasındaki farkın çalışmamızda nispeten daha az hasta sayısı ile çalışılmış olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Likit Biyopsi testi kapsamında ROS1 geni için yaptığımız çalışmalarda ise bu gende varyasyon gözlenen herhangi bir hasta olmamıştır.

TP53 geni, 17. kromozomun p kolunda yer alan tümör baskılayıcı bir gendir. Bu gen hücre döngüsünü düzenleyen, apoptoz, yaşlılık, DNA onarımı ve metabolizmasında görev alan ve önemli bir tümör supresör proteini olan p53 proteinini kodlamaktadır (Takahashi ve diğ. 2008). Çalışmamız sonucunda likit biyopsi materyali kullanılarak elde edilen veriler doğrultusunda hastaların %42,8'inde TP53 geninde çeşitli varyasyonlar saptanmış olup taranan 11 gende saptanan toplam 52 varyasyonun %36,5'ini bu gene ait varyasyonlar oluşturmaktadır. Villaflor ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada hastalarının

%40'ında TP53 genine ait varyasyonlar saptamışlardır. Bu oran bizim çalışmamızda bulduğumuz oranla benzerdir.

BRAF geni, 7. kromozomun uzun kolunda 7q34 bölgesinde lokalizedir ve 18 ekzondan oluşur. BRAF mutasyonları sıklıkla ekzon 15 içerisinde bulunan kodon 600 bölgesinde (V600A, V600D, V600E ve V600KRM) ve 11. ekzonda gözlenmektedir (Ertaş 2015). Çalışmamızda BRAF gen varyasyonları hastaların %7,1'inde saptanmış olup Villaflor ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmaya kıyasla yüksek bir oran yakalanmıştır. Villaflor ve arkadaşları çalışmalarında bu oranı %3 olarak tespit etmiş ve oranlarının literatüre kıyasla düşük olduğunu belirtmişlerdir.

PIK3CA geni, fosfatidilinositol 3-kinazların (PI3K) katalitik alt birimlerinden biri olan p110a'yı kodlamaktadır. PI3K, hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, sağkalımı gibi birçok hücrel süreçte görev alan bir lipid kinaz ailesi üyesidir. PIK3CA'daki somatik mutasyonlar küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin %1-3'ünde saptanmıştır (Samuels ve diğ. 2004, Kawano ve diğ. 2006). Yaptığımız çalışmada hastaların %32,1'inde PIK3CA geninde çeşitli varyasyonlar saptanmıştır. Bu oran literatürde bildirilen ortalama oranların çok üzerindedir. Ortaya çıkan bu büyük oran farkının ırk içi genetik farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca çalışma grubunu oluşturan hasta sayısının düşük olması hasta sayısı bakımından daha kapsamlı çalışmalara nispeten daha farklı sonuçlar verebilmektedir.

KRAS geni, 12. kromozomun p kolunda yer alan bir Ras gen ailesi üyesidir. Ras proteinleri hücre döngüsü, apoptoz regülasyonu ve hücre adezyonu gibi farklı biyolojik süreçlerde görev alırlar. Ras gen ailesi (HRAS, KRAS, ve NRAS) üyeleri arasında onkojenik aktivasyonunun en sık olduğu bilinen KRAS genine ait mutasyonlar tümörlerin %17-25'inde gözlenmektedir (Plesec ve Hunt 2009). Doğan ve arkadaşları 2014 yılında Türkiye'de ileri evre KHDAK'de EGFR, KRAS ve BRAF mutasyonlarının değerlendirildiği ilk çalışma olarak belirttikleri araştırmada 42 hastayı mutasyonlar bakımından incelemiş ve KRAS mutasyon oranını %4,7 olarak saptamışlardır. Metin Çalışkan 2015 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak yaptığı çalışmada bu oranı %29 olarak tespit etmiş ve literatürle benzer olduğunu bildirmiştir. Likit Biyopsi testi kapsamında akciğer kanseri hastalarında taradığımız KRAS genine ait mutasyon oranını çalışmamızda %21,4 olarak saptamış olup bulduğumuz oranın literatür verileriyle kıyaslandığında uyumlu olduğunu görmekteyiz.

MET, onkogenik mutasyonlar, amplifikasyon/aşırı ekspresyon ve alternatif kesip eklemede görev alan bir proteindir. MET proto-onkogeni, EGFR ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) genlerini de içeren insan kromozomu 7 üzerinde yer almaktadır. (Ma ve diğ. 2003). Akciğer kanserlerinde mezenkimal epitelyal geçiş geninde (MET) meydana gelen çeşitli mutasyonlar ve amplifikasyonlar gözlenir. Mutasyonlar çoğunlukla ekzon 14 çevresinde yerleşmişlerdir (Paik ve diğ. 2015, Frampton ve diğ. 2015). Villaflor ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları likit biyopsi çalışmasında hastaların %1'inde, Schewaederle ve arkadaşları ise aynı yıl yaptıkları başka bir NGS tabanlı likit biyopsi çalışmasında bu oranı % 10,5 olarak bulduklarını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda bulunan oran %21,4 olup benzer çalışmalarla kıyaslandığında yüksek bir oranın elde edildiği dikkat çekmektedir.

MAP2K1 (mitojenle aktifleştirilen protein kinazı 1) geni, hücre dışından hücre çekirdeğine kimyasal sinyaller ileten, RAS/MAPK sinyal yolunun bir parçası olan MEK1 protein kinazı üretmektedir. Bu protein hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptozu düzenler. Akciğer kanserlerinde bu gende mutasyon ortaya çıktığı bildirilmiştir (<https://www.oncompass.com.tr>). Yaptığımız likit biyopsi testinde çalışmaya dahil edilen akciğer kanseri hastalarının %21,4'ünde MAP2K1 genine ait çeşitli varyasyonlar saptanmıştır. Marks ve arkadaşları 2008 yılında 207 KHDAK hastasının tümör dokusu ile yaptıkları çalışmada 2 hastada (%1) mutasyon saptamışlardır. Literatürü incelediğimizde doku materyali ile yapılan çalışmalarda bu gene ait varyasyon oranı çok düşük olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz yüksek oranın, çok hassas bir teknik olan yeni nesil dizileme yönteminin kullanılmış olması ve tümör dokusu ile yapılan çalışmalarda dokunun içerdiği tümör yükünün az olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Epidermal büyüme faktörü olan HER/erbB büyüme faktörü reseptör ailesine mensup olup EGFR (HER1 veya erbB1), HER2/neu (erbB2), HER3(erbB3) ve HER4 (erbB4) çeşitlerini içerir. HER2 geni 17. kromozomun q kolunda lokalizedir ve intrinsik tirozin kinaz aktivitesi aracılığıyla hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, apoptoz, adhezyon ve migrasyon benzeri fonksiyonlarda görev alan transmembran reseptör proteinini kodlamaktadır. Akciğer kanserinde HER2 mutasyonları hastalığın kötü seyri ile ilişki içerisinde (Rouquette ve diğ. 2012, Pellegrini ve diğ. 2003). ERBB2 mutasyonları KHDAK vakalarının %2'sinde saptanmaktadır (Pao ve Girard 2011). Stephens ve arkadaşları 2004 yılında 120 akciğer kanseri hastası ile yaptıkları çalışmada bu hastaların %4'ünde, Buttitta ve arkadaşları ise 2006 yılında 403 akciğer kanseri hastasının

%2,2'sinde (n=9) ERBB2 mutasyonları saptamışlardır. Villaflor ve arkadaşları ise 2016 yılında likit biyopsi materyali ile yaptıkları çalışmada mutasyon oranını %3 olarak bildirmişler ve literatür verileriyle benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmamızda Likit Biyopsi testi kapsamında hastalarımızın cfDNA örneklerinde ERBB2 gen bölgesi taranmış ancak hiçbir hastada bu gene ait varyasyon saptanmamıştır. Hasta sayımızın benzer çalışmalardakine kıyasla çok daha az olduğu göz önünde bulundurulursa elde ettiğimiz sonucun literatürle uyum sağladığı söylenebilmektedir.

Kanserde mutasyon analizi için, cfDNA'nın güvenilir bir kaynak olup olmadığını belirlemek amacıyla;

Lebofsky ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada metastatik kanserli 34 hastadan solid biyopsi ve plazma cfDNA'sının mutasyon durumunu karşılaştırmışlardır. Bu hastaların 27'sinde hem solid biyopsi materyali hem de plazma cfDNA'sında toplam 29 mutasyon üzerinden 28 mutasyon tespit etmişlerdir.

Benzer şekilde Janku ve arkadaşları 2015 yılında plazma cfDNA örnekleri ve doku biyopsi örneklerinde BRAF, EGFR, KRAS, PIK3CA mutasyon durumunu karşılaştırmış ve plazma cfDNA örneklerinde tespit edilen çoğu mutasyonu tümör biyopsi örneklerinde de tespit etmişlerdir. Vakalar arasındaki uyum BRAF mutasyonları için %91, EGFR mutasyonları için %99, KRAS mutasyonları için %83 ve PIK3CA mutasyonları için %91 olarak belirtilmiştir.

Xu ve arkadaşları tarafından 2015 yılında 42 ileri evre KHDAK hastasında doku materyali ve likit biyopsi materyali arasındaki mutasyon uyumu EGFR, KRAS, PIK3CA ve TP53 genleri vasıtasıyla ölçülmüş ve doku ile plazma arasındaki uyum %76 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda solid biyopsi materyali ile likit biyopsi materyali arasındaki mutasyon uyumu EGFR, ALK ve ROS1 genleri aracılığı ile ölçülmüş olup uyum, EGFR mutasyonları için %68.4, ALK mutasyonları için %91.6 ve ROS1 için %81.8 olarak tespit edilmiştir. Solid biyopsi materyali ve likit biyopsi materyali arasındaki mutasyon uyumu hakkında literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, tespit ettiğimiz sonuçlar rapor edilen çalışmalarla kısmen benzerlik göstermektedir. Tümör biyopsisi ve kan bazlı analizler arasındaki uyumsuz genotiplerin ise teknolojik farklılıklar, farklı tümör hücre popülasyonlarının örneklenmesi gibi nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Likit biyopsi çalışmaları günümüzde altın standart olarak kabul edilen solid biyopsiye alternatif oluşturmakta ve tümör genotipindeki değişikliklerin güncel durumunun izlenmesinde hasta bireylere avantaj sağlamaktadır. Geleneksel tümör biyopsi işlemlerine göre daha minimal invaziv bir işlem olan likit biyopsi hastayı işleme bağlı birçok komplikasyondan kurtarabilmektedir. Ayrıca doku biyopsisine uygunluk göstermeyen hastalarda kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem oluşuyla tümör genotipindeki değişiklikleri tespit etmek için iyi bir seçenek halini almaktadır.

Yapılan çalışmanın sonucunda akciğer kanseri hastalarında Solid Biyopsi ve Likit Biyopsi yöntemleri ile araştırılan mutasyonlar arasında bir uyum olduğu gözlenmiş olup hedef gen paneli analizlerinin tedavide hedefe yönelik ilaç önermede oldukça etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Şuan için likit biyopsi yönteminin, solid biyopsinin yerini alması düşünülemese de rutin klinik uygulamada NGS ve cfDNA kullanımının hızlandırılması için çeşitli teknik gelişmeler ve standardizasyon adımlarının atılması gerektiği düşünülmektedir. Böylece yakın gelecekte Likit Biyopsi, etkin kanser tarama programlarında, primer kanser tanısında, ilaç seçiminde, tedaviye yanıtın değerlendirilmesi ve takibinde etkin olarak kullanılmaya başlanacaktır.

KAYNAKLAR

- Ak G. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri :Tanı ve Evreleme. İç: Özlü T, Metintaş M, Karadağ M ve diğ. Solunum sistemi ve hastalıkları temel başvuru kitabı. *İstanbul,İstanbul Tıp Kitabevi*;2010. s.1397-1421
- Alar T, Şahin EM. Akciğer kanseri birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma. Lung cancer: Diagnosis, treatment and prevention in primary care. *Smyrna Tıp Dergisi*. 68, 2012
- Arcila ME, Chaft JE, Nafa K ve diğ. “Prevalence, clinicopathologic associations and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. “, *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(18),10.1158/1078-0432.CCR-12-0912, 2012.
- Aydiner A, Topuz E. Akciğer Kanseri Tanı- Tedavi-Takip. *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 2006.
- Bakar C. Dünyada ve Türkiye'de Kanser Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Med Genet-Special Topics* 2(2):49-59 (2017).
- Bennett CW, Berchem G, Kim YJ, El-Khoury V. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, L-1526 Luxembourg, Luxembourg, Centre Hospitalier de Luxembourg, L-1210 Luxembourg, Luxembourg.
- Bergethon K, Shaw AT, OU SH. ROS-1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:863-70.
- Besser D, Bardelli A, Didichenko S ve diğ. “Regulation of the urokinasetype plasminogen activator gene by the oncogene Tpr-Met involves GRB2.”, *Oncogene*. 14:705-11 (1997).
- Bingöl Z. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics*, 7(1):1-5 (2014).
- Bozkurtlar E, Kaya H. Akciğer Kanserinde Moleküler Patoloji. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. *Nucl Med Semin* 2018;4:26-31. Doi: 10.4274/nts. 2018.004
- Cancer fact sheet No. 297. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Chu D, Park BH. 2017. Liquid biopsy: unlocking the potentials of cell-free DNA. *Virchows Arch*.
- Churg A. Pathology Of The Lung. In: Thurlbeck W M (Ed). Tumors Of Lung. *Theime Medical Publishers*. New York, 1. Ed. 1988; Pp 311-423.
- Çok G. Akciğer Kanserinde TNM Evrelemesi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye. *Nucl Med Semin* 2018; 4:1-5 DOI:10.4274/nts.2018.001
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. 32(4):605-44 (2011).
- Demirhan M. Akciğer kanseri tanısı almış olmak sigara bırakmada etkili midir? Uzmanlık tezi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul, 2017
- Didkowska J, Wojciechowska U, Mańcu M ve diğ. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med*, 4(8):150 (2016).
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA ve diğ. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008; 14:985-990.
- Dirican A, Dirican N, Ölmezöglü A. İleri Evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Hedef Driver Mutasyonların Tespitinde Likit Biyopsi Doku Biyopsisinin Yerini Alabilir mi? *CBU SBED*. Derleme, 2016, 3(2):165-168.

Driscoll T, Nelson DI, Steenland K ve diğ. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am J Ind Med* 2005; 48:419-431

Dündar E. Akciğer kanseri olgularının klinik, patolojik, moleküler özellikleri ve sağkalımla ilişkisi. Uzmanlık tezi. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2015.

Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany.

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

El-Telbany A, Ma PC. Cancer Genes in Lung Cancer: Racial Disparities: Are There Any? *Genes & Cancer*, 3:(7-8) 467-480 (2012).

Ertaş F. Lokal İleri ve Metastaik Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde BRAF, DDR2, PIK3CA Mutasyon Profilinin Klinikopatolojik Parametrelerle Korelasyonu Tıpta Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2015.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127: 2893-917

Fingerhut M, Nelson DI, Driscoll T ve diğ. The contribution of occupational risks to the global burden of disease: sum-mary and next steps. *Med Lav* 2006; 97:313-321

Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics, *Br J Cancer*, 108 (2013) 479-485.

Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF ve diğ. Lung Cancer: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*. 2003;58:892-900.

Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M ve diğ. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 2015;5:850-859.

Gerber DE, Minna JD. ALK Inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell*. 2010;18:548-551.

Goldstraw P, Chansky K, Crowley J ve diğ. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11:39-51.

Gorlova OY, Weng SF, Zhang Y ve diğ. Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *Int J Cancer*. 2007;121:11-118.

Gültekin M, Özgül N ve diğ. Kanser ve kanser risk faktörleri hakkında Türk halkının bilgi düzeyinin ölçülmesi ve araştırılması. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 2011; Cilt 8 Sayı:1 Sayfa:57-61.

Heineman DJ, Daniels JM, Schreurs WH. Clinical staging of NSCLC: current evidence and implications for adjuvant chemotherapy. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9:599-609.

Horn L, Pao W, Johnson D. Neoplasms of the lung. Longo D, Kasper D, Fauci A, ed. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18. basım. New York: Mc Graw Hill. 2011:737-753.

Hou JM, Krebs MG, Lancashire L ve diğ. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 525-32.

Hurtgen M, Friedel G, Toomes H ve diğ. Radical video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy (VAMLA)-technique and first results. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21:348-351.

Improta G, Pettinato A, Gieri S ve diğ. Epidermal growth factor receptor exon 20 p.S768I mutation in non-small cell lung carcinoma: A case report combined with a review of the literature and investigation of clinical significance. *Oncol Lett* 2016;11:393-398.

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

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

Jeremic B, Shibamoto Y, Nikolic N ve diğ. Role of radiation therapy in the combined-modality treatment of patients with extensive disease small-cell lung cancer: A randomized study. *J Clin Oncol* 1999;17:2092-2099.

Joesse SA, Pantel K. Tumor-educated platelets as liquid biopsy in cancer patients. *Cancer Cell* 2015; 28: 552-4.

Kawano O, Sasaki H, Endo K ve diğ. "PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients.", *Lung Cancer*, 54:209-15(2006).

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

Kıyık M. Akciğer Kanseri 8. TNM Evreleme Sistemi. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 2018; 6(3):39-44 DOI: 10.5152/gghs.2018.039

Kim ST, Lee WS, Lanman RB ve diğ. Prospective blinded study of somatic mutation detection in cell-free DNA utilizing a targeted 54-gene next generation sequencing panel in metastatic solid tumor patients. *Oncotarget*. 2015; 6:40360– 40369. doi: 10.18632/oncotarget.5465.

Köktürk N, Yeğın D, Çiftçi UT, Mullaoglu BS, Öztürk C. Akciğer kanserlerinde epidemiyolojik özellikler yıllar içinde değişim gösteriyor mu? *Toraks Dergisi* 2004;5:137-142.

Kutluk T, Kars A. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Ankara, 1992.

Lardinois D, Weder W, Hany TF ve diğ. Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computed tomography. *N Engl J Med*. 2003; 348:2500-7.

Horn CML, Johnson D. Neoplasm of the Lung. Harrison's Principles of Internal Medicine 19th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. p. 506-22.

Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey 1994-1998. Turkish Thoracic Society. *Respiration* 2002;69:207-210.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R ve diğ. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139.

Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. 1948, 142, 241–243. [PubMed]

Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005;93(7):825-33.

Ma PC, Maulik, G, Christensen J, Salgia, R.. "c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition.", *Cancer Metastasis Rev.*, 22:309-25 (2003).

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. NSCLC guideline. 2017.

NCCN Guidelines 2015. www.nccn.org (Erişim: 25 Aralık 2018)

Newman AM, Bratman SV, To J ve diğ. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014; 20:548–554.

- 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
- Paik PK, Drilon A, Fan PD ve diğ. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov* 2015;5:842-849.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C ve diğ. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J*. 2009;420:345-361.
- Pao W, Girard N. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yeni sürücü mutasyonları. *Lancet Oncol*. 2011 Feb; 12 (2): 175-80. doi: 10.1016 / S1470-2045 (10) 70087-5.
- Pao W, Miller VA, Politi KA ve diğ. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73.
- Papiashvili M, Stav D, Cyjon A ve diğ. Lobectomy for non-small cell lung cancer: differences in morbidity and mortality between thoracotomy and thoracoscopy. *Innovations (Phila)* 2012;7(1):15-22.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J ve diğ. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A ve diğ. HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.*, 9:3645-52.
- Perez-Ramirez C, Canadas-Garre M, Robles AI ve diğ. Liquid biopsy in early stage lung cancer. *Translational lung cancer research*. 2016; 5(5):517-524, (doi: 10.21037/tlcr.2016.10.15).
- Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV ve diğ. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3552-9.
- Plessec TP ve Hunt J L . KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol* 2009;16 (4):196-203.
- Robbins K (Çeviri: U Çevikbaş). Solunum Sistemi. 21th. İstanbul: *Nobel & Yüce*; 1995: S.385-437.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R ve diğ. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(3):239-46.
- Rouquette I, Lauwers-Cances V, Allera C ve diğ. Characteristics of lung cancer in women: importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer*, 76:280-5 (2012).
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A ve diğ. "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.", *Science.*, 304:554 (2004).
- Sause W, Machtay M. Treatment Of Non Small Cell Lung Cancer: Radiation Therapy. In: Fishman Ap Fishman"s Pulmonary Diseases And Disorders. 3th Ed. New York: Mcgraw Hill:1998. P.1805-18.
- Scott KF, Sajinovic M, Hein J ve diğ. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. *Biochimie* 2010; 92: 601-610.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T ve diğ. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97 (5):339- 46.
- Sholl LM. Large-cell carcinoma of the lung: a diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics. *Curr Opin Pulm Med* 2014; 20: 324- 31.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. 13. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.
- Siegel R, Ward E, Brawley O ve diğ. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:212-236.

Solomon BJ, Mok T, Kim D-W ve diğ. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014; 371: 2167-77.

Sönmezler Ö. Kanserde Likit Biyopsi ve Yeni Nesil Dizileme Metodunun Klinik Laboratuvar Uygulamalarına Entegrasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, 2018.

Sulu E, Damadoğlu E. Primer Akciğer Kanserinde Tümör Tipi Ve cinsiyet Dağılımı Değişiyor Mu? 2004 Yılı Sonuçlarının Daha Önceki Yıllar İle Karşılaştırılması. *Tüberküloz Ve Toraks Dergisi* 2007; 55(1): 59-63

Şencan İ, Keskinçilic B. Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2015.

Taban H. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinin Tanı, Tedavi Yanıtı Ve Prognoz Tayininde Sulf2 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, 2017.

Takahashi S, Moriya T, Ishida T ve diğ. Prediction of breast cancer prognosis by gene expression profile of TP53 status. *Cancer Sci* 2008; 99 (2):324–32.

The NCI Dictionary of Cancer Terms features 8,128 terms related to cancer and medicine: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=779095>. (Erişim: 5 Ocak 2019)

Tomizawa K, Suda K, Onozato R ve diğ. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer*, 74:139–44 (2011).

Travis W, Brambilla E, Muller-Hermelink H ve diğ. Pathology and genetics: tumors of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization classification of tumors. Lyon, France: IARC, 2004. P.1-344.

Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Prognostic factors affecting survival in cases with lung cancer [A Lung Cancer Mapping Project in Turkey (LCMPT)]. Abstract Number 852840. ERS 2013.

Uludağ P. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser Dokularında Her2/Neu ve EGFR Genlerinin Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 2008.

Uluç BO, Demir G, Çelik İ ve diğ. Akciğer kanseri yol haritası (Birinci Basım). *Türk Akciğer Kanseri Derneği, Türk Tıbbi Onkoloji Derneği, Türk Toraks Derneği, İmmuno-Onkoloji Derneği ortak yayınları*, 2016.

Uramoto H, Uchiumi T, Izumi H, ve diğ. A new mechanism for primary resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma: the role of a novel G796A mutation in exon 20 of EGFR. *Anticancer Res* 2007;27:2297-2303.

Ünal H. Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Meme Kanseri Sempozyumu Dizisi* No:54; 9-13 (2006).

Venuta F, Rendina EA, Ciriaco P ve diğ. Computed tomography for preoperative assessment of T3 and T4 bronchogenic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1992;6:238-241.

Von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA ve diğ. Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:658-667.

Wang EH, Corso CD, Rutter CE ve diğ. Postoperative Radiation Therapy Is Associated With Improved Overall Survival in Incompletely Resected Stage II and III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(25):2727-34.

Warde P, Payne D. Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell carcinoma of the lung? A meta-analysis. *J Clin Oncol*. 1992;10:890-895.

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

Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G ve diğ. The multiple roles of exosomes in metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 2017; 14: 1-15.

Xia J, Chen J, Zhang Z ve diğ. A map describing the association between effective components of traditional Chinese medicine and signaling pathways in cancer cells in vitro and in vivo. *Drug Discov Ther*. 2014; 8(4):139-53.

Xu ve diğ. Circulating tumor DNA identified by targeted sequencing in advanced-stage non-small cell lung cancer patients. Department of Lung Cancer Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, China, 2015.

Yan TD, Black D, Bannon PG ve diğ. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(15):2553-62.

Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA ve diğ. Intratumor Heterogeneity: Seeing the Wood for the Trees, *Science translational medicine*, 4 (2012) 127ps110-127ps110.

Yener NA, Düşmez Apa D. Akciğer kanserinde morfolojik tanı ve sınıflama. *Trd Sem* 2014; 2:281-289. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Yıldız K. Akciğer Kanserlerinin Sınıflamasında Patolojide Yenilikler. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye. DOI: 10.5578/tbc.2017.012. *Toraks Cerrahisi Bülteni* 2017; 10: 31-39.

Yılmaz Ü. Akciğer Kanserlerinde Tedavi Yaklaşımları. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye. *Nucl Med Semin* 2018;4:32-38. DOI:10.4274/nts.2018.005

Yu HA, Arcila ME, Harlan Fleischut M ve diğ. Germline EGFR T790M mutation found in multiple members of a familial cohort. *Cancer* 2014;9:554-558.

Yüce D, Kılıçkapı S. Prevatif Onkoloji AD, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Ankara. *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics* 2016;9(4):1-5

Yüksek GE. Akciğer Adenokarsinomlarının, 2011 Uluslararası Akciğer Karsinomları Çalışma Grubu (Iaslc/Ats/Ers)'Nun Sınıflandırmasına Göre Yeniden Sınıflandırılması Ve Olguların Gözden Geçirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mersin, 2015.

Zhivotosky B ve Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 18, Unit 18.13, 2001

http://file.toraks.org.tr/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/mesleki-kurslar-2-ppt_pdf/Atilla_Akkoclu.pdf (Erişim: 25 Aralık 2018)

<https://www.oncompass.com.tr> (Erişim: 18 Mayıs 2019)

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms> (Erişim: 6 Ocak 2019)

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29313949 (Erişim: 27 Aralık 2018)

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı : Ayşegül ŞAHİN
- Doğum yeri ve tarihi : Körfez-1993
- Uyuşu : TC
- Medeni Durumu : Bekar
- İletişim Adresi ve telefonu : Yeniköy Merkez Mahallesi Medeniyet Caddesi
No:22/2 Başiskele-KOCAELİ
Tel: (262) 303 88 40

2. Eğitimi

- 2012-2016 :Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Staj

- 2015 : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
- 2018 : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yabancı dil

- İngilizce

3. Unvanları

- 2016- : Moleküler Biyolog

4. Mesleki Deneyimi




- Periferik lenfosit hücre kültürü
- Kemik iliği kültürü
- Amniyon sıvısı kültürü
- Kordon kanı kültürü
- Postnatal ve prenatal kromozom analizi

- FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)
- FISH Analizi
- cfDNA İzolasyonu
- Doku ve Kan Materyalinden DNA İzolasyonu
- Real Time PCR yöntemi
- Likit Biyopsi
- Yeni Nesil Dizileme (NGS)

5. Bilimsel Etkinlikler

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. (17-18 Haziran 2019 Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Poster Sunum Bildirisi)

EK 1. Etik Kurul Onayı

	T.C. KOCAELI 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	gokuetikkurul@kocaeli.edu.tr			
Başvuru Bilgileri	Araştırmacının Adı	Akciğer Kanseri Hastalarında Solid Biyopsi ve Uçuk Biyopsi Yöntemlerinin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması			
	Araştırma Proje Numarası	KU GOKAER 2019/90			
	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				
	Araştırmanın 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"/>		
	Araştırmanın 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"/>		
	Ünvan 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"/>			
KU Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu		Form No: 18.10.2017/MSK0E401.2	Revizyon: 2	Sayfa: 1/2	

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2019/2607	Proje No: 2019/90	Tarih: 23.04/2019
	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 [05.09.2014/29111]; Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu; 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 ilgili		Toplantıda Bulunma		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Canan Boydemir Üye	Biyoistatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Semih Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Aslıhan Akınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Ceylan Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* Gerekece ve öneriler: