

**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER KANSERLERİNDE KRAS VE NRAS  
MUTASYONLARININ GENİŞ SPEKTRUMLU ANALİZİ**

**DR.MÜŞERREF BAŞDEMİRCİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA 2016**



**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER KANSERLERİNDE KRAS VE NRAS  
MUTASYONLARININ GENİŞ SPEKTRUMLU ANALİZİ**

**DR.MÜŞERREF BAŞDEMİRÇİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: DOÇ. DR. AYŞE GÜL ZAMANI**

**KONYA 2016**

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda tamamlamıő olduğum asistanlığım s¼recinde desteğini esirgemeyen anabilim dalı baőkanımız Prof. Dr. M. Selman Yıldırım ve bu s¼reçte bilgi ve tec¼belerinden yararlandığım Doç. Dr. Ayşe G¼l Zamani baőta olmak üzere t¼m hocalarıma teőekk¼rlerimi sunarım.

Ayrıca Prof. Dr. Adil Zamani'ye ve Yard. Doç. Dr. Sıddıka Fındık'a da yardımlarından dolayı teőekk¼r ederim.

Asistanlığım boyunca birlikte çalıőmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve t¼m genetik laboratuarı ekibine teőekk¼r ederim.

Bu günlere gelmemde emeği olan annem baőta olmak üzere t¼m aileme, her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili eőime ve neőe kaynağım oğluma sonsuz sevgilerimi ve teőekk¼rlerimi sunarım...

Haziran 2016

Dr.M¼őerref Başdemirci

## ÖZET

### AKCİĞER KANSERLERİNDE KRAS VE NRAS MUTASYONLARININ GENİŞ SPEKTRUMLU ANALİZİ

DR.MÜŞERREF BAŞDEMİRCİ, UZMANLIK TEZİ, Konya, 2016

**Amaç:** Ras genlerindeki (HRAS, KRAS ve NRAS) mutasyonlar, insan tümörlerinde tesbit edilmiş en yaygın değişikliklerdir ve tüm kanserlerin yaklaşık %30'unda bulunurlar. Bu mutasyonlar genellikle 12,13 ve 61. kodonlarda görülür. Bu projenin amacı akciğer kanserli hastalarda KRAS geninin 12,13 ve 61. kodonlarına ek olarak KRAS ve NRAS genlerinin 59,117 ve 146. kodonlarının da değerlendirilmesidir.

**Yöntem:** Bronkoskopik biyopsi sonrası histopatolojik olarak AC kanseri tanısı konulmuş 64 olgunun formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) doku örneklerinden izole edilen DNA'larından, pyrosekans yöntemi ile KRAS ve NRAS mutasyon analizi yapıldı.

**Bulgular:** Tüm olguların 20'sinde (%31,2) (8/27 epidermoid karsinom, 8/11 adenokarsinom, 3/16 küçük hücreli karsinom ve 1/1 pleomorfik karsinom) KRAS geninde mutasyon saptandı. Mutasyonlar en sık kodon 12'de ve GGT>GTT şeklinde idi. Adenokarsinomlu olgulardaki mutasyon oranı (%72,7) ile epidermoid karsinomlu olgulardaki mutasyon oranı (%22,9) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi (p=0,008). Olguların hiç birisinde KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonlarında mutasyon saptanmadı.

**Sonuç:** Bu çalışmada AC kanserli olgularda KRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonlarına ilaveten KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonları değerlendirildi ve herhangi bir mutasyon tespit edilmedi. Hasta sayısının sınırlı olması ve bu alanda yapılan başka çalışma olmaması nedeniyle, geniş serilerle yapılacak çok merkezli çalışmalarla bu verilerin desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, KRAS, NRAS, Pirosekans

N.E.Ü. BAP Proje No:151518011

## ABSTRACT

### WIDE-SPECTRUM ANALYSIS OF KRAS AND NRAS MUTATIONS IN LUNG CANCERS

DR.MÜŞERREF BAŞDEMİRÇİ, SPECIALITY THESIS, KONYA, 2016

**Objective:** Mutations in the Ras genes, HRAS, KRAS, and NRAS, are the most common modifications in many types of human tumors and are found in approximately 30% of all human cancers. These mutations are usually seen in 12, 13 and 61 codons. The aim of this study is to evaluate mutations in 59, 117 and 146 codons of KRAS and NRAS genes in addition to 12, 13 and 61 codons of KRAS gene of lung cancer patients.

**Method:** KRAS and NRAS mutation analyses with pyrosequencing method were performed on DNAs isolated from paraffin embedded formalin-fixed (FFPE) tissue samples of 64 patients histopathologically diagnosed as lung cancer after bronchoscopic biopsy.

**Results:** In 20 of all patients (31.2%) had mutations in the KRAS gene (8/27 squamous cell carcinoma, 8/11 adenocarcinoma, 3/16 small cell carcinoma and 1/1 pleomorphic carcinoma). The most common mutation in codon 12 was in GGT>GTT. When the mutation rate of adenocarcinoma (72.7%) and squamous carcinoma (22.9%) patients compared with each other, a statistically significant difference was observed ( $p=0.008$ ). Any mutations in codons 59, 117 and 146 of KRAS and NRAS gene were observed in patients.

**Discussion:** In this study, mutations in 59, 117 and 146 codons of KRAS and NRAS genes in addition to 12, 13 and 61 codons of KRAS gene were evaluated in patients with lung cancer and was detected any mutation. Due to the limited number of patients and the lack of other studies in this area, these data will be supported with multicentre studies and larger series.

Key words: Lung cancer, KRAS, NRAS, Pyrosequencing

## TABLolar

### Sayfa

Tablo 2.1 AC kanserinin etyolojisinde rol oynayan faktörler.....	5
Tablo 2.2 AC kanserinin etyolojisinde bilinen ve şüpheli karsinojenler ve ilişkili mesleki maruziyetler.....	7
Tablo 2.3 Akciğer kanserlerinin 2015 Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması.....	11
Tablo 2.4 AC kanserlerinde 7. evreleme sistemi.....	13
Tablo 2.5 AC kanserinde sık görülen moleküler düzeyde değişiklikler.....	15
Tablo 2.6 Akciğer kanserinde sık görülen kromozom kayıpları ve sıklığı.....	20
Tablo 2.7 İnsan Kanserlerinde Ras Mutasyonlarının Dağılımı.....	29
Tablo 3.1 DNA izolasyon kiti'nin içeriği.....	38
Tablo 3.2 KRAS Pyro Kit'in içeriği.....	40
Tablo 3.3 RAS Extension Pyro Kit'in içeriği.....	41
Tablo 3.4 KRAS 12/13, KRAS 61, KRAS 59, KRAS117, KRAS 146, NRAS 59, NRAS 117, NRAS 146 için ayrı ayrı hazırlanan her bir reaksiyon karışımı için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	42
Tablo 3.5 PCR tüplerinin içeriği.....	42
Tablo 3.6 Optimize edilmiş PCR döngüsü protokolü.....	43
Tablo 3.7 DNA immobilizasyonu için hazırlanan karışımın bileşenleri ve miktarları.....	44
Tablo 3.8 Dizileme için sekans primerlerinin dilüe edilerek hazırlandığı karışım.....	47
Tablo 3.9 Spesifik mutasyonlar için belirlenmiş LOD skorları.....	48
Tablo 4.1 Çalışmaya dahil edilen hastalara ilişkin bilgiler.....	49
Tablo 4.2 Epidermoid karsinomlu olguların mutasyon analiz sonuçları.....	51
Tablo 4.3 Adenokarsinomlu olguların mutasyon analiz sonuçları.....	52
Tablo 4.4 Pleomorfik karsinomlu olgunun mutasyon analiz sonuçları.....	52
Tablo 4.5 Büyük hücreli karsinomlu olgunun mutasyon analiz sonuçları.....	52
Tablo 4.6 KHAK'li olguların mutasyon analiz sonuçları.....	53
Tablo 4.7 AC kanserli 64 olgunun klinikopatolojik özellikleri.....	58
Tablo 4.8 AC kanserli 64 olguda tespit edilen mutasyonların dağılımı.....	58
Tablo 4.9 Olguların yaşları ile mutasyon oranlarının karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.10 KHDAK ile KHAK'nde görülen mutasyon oranlarının karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.11 Epidermoid karsinom ile Adenokarsinomda görülen mutasyon oranlarının karşılaştırılması.....	60

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1 Tüm dünya genelinde, gelişmiş ülkelerde ve gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanser tipleri.....	4
Şekil 2.2 Sinyal iletim yolağında ras aktivasyonu.....	16
Şekil 2.3 Rb'nin regülasyonu.....	18
Şekil 2.4 p53'ün biyolojik fonksiyonları.....	19
Şekil 2.5 Küçük GTP-az üyelerinden olan Ras ailesi.....	22
Şekil 2.6 Ras proteininin üç boyutlu yapısı, GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif Ras'ın konformasyonel şekli.....	23
Şekil 2.7 Ras proteininin temel yapısı.....	23
Şekil 2.8 Ras proteinlerinin primer yapısı.....	24
Şekil 2.9 Ras protinlerinin C-terminal bölgelerinin posttranslasyonel modifikasyonu.....	25
Şekil 2.10 Aktif ve inaktif Ras döngüsü.....	26
Şekil 2.11 Ras'ın rol oynadığı sinyal yolakları.....	27
Şekil 2.12 ras-raf-MEK-ERK yolağı.....	27
Şekil 2.13 Ras izoformlarındaki farklı kodonlardaki mutasyon sıklığı.....	30
Şekil 2.14 KRAS geninin 2.ekzonundaki 12 ve 13. kodonlarında görülen nokta mutasyonları.....	31
Şekil 2.15 KHDAK'lerinde KRAS 2.ekzonda kodon 12 ve 13'te farklı değişimlere göre mutasyon sıklığının dağılımı.....	31
Şekil 2.16 Maxam Gilbert Sekanslama Tekniği.....	32
Şekil 2.17 Sanger Zincir Sonlanma Yöntemi.....	33
Şekil 2.18 Pyrosekans tekniği.....	35
Şekil 3.1 DNA izolasyonu yapılacak dokuların elde edilmesi.....	37
Şekil 3.2 DNA ölçümleri için kullanılan Nanodrop 2000 spektrofotometre(Thermo scientific) cihazı.....	39
Şekil 3.3 PCR için kullanılan ısı-döngü cihazı (Sensoquest Labcycler).....	43
Şekil 3.4 Sekanslama için kullanılan PyroMark Q24 cihazı.....	44
Şekil 3.5 Thermo Shaker.....	45
Şekil 3.6 Pyromark Vakum istasyonu ve Vakum Filtresi .....	45
Şekil 4.1 KRAS geni 12. ve 13. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	53
Şekil 4.2 KRAS geni 61. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	54
Şekil 4.3 KRAS geni 12. kodonda G12C mutasyonu ve 13. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	54

Şekil 4.4 KRAS geni 61. kodonda CAA>CTA mutasyonu.....	54
Şekil 4.5 KRAS geni 12. kodonda G12D mutasyonu.....	54
Şekil 4.6 KRAS geni 12. kodonda G12V mutasyonu.....	55
Şekil 4.7 KRAS geni 61. kodonda CAA>CTA ve CAA>CAC mutasyonu.....	55
Şekil 4.8 KRAS geni 59. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	55
Şekil 4.9 KRAS geni 117. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	55
Şekil 4.10 KRAS geni 146. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	56
Şekil 4.11 NRAS geni 59. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	56
Şekil 4.12 NRAS geni 117. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	56
Şekil 4.13 NRAS geni 146. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği.....	56
Şekil 4.14 AC kanserli 64 olguya ait histolojik tümör tipleri ve yüzdeler dağılımları.....	57
Şekil 4.15 AC kanserli 64 olgudaki mutasyon miktarlarının dağılımı.....	60

## KISALTMALAR VE SİMGELER

<b>AHH</b>	: Aril hidrokarbon hidroksilaz
<b>AJCC</b>	: Amerika Birleşik Kanser Komitesi
<b>CDK</b>	: Siklin bağımlı kinaz
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EGF</b>	: Epidermal growth faktör
<b>EGFR</b>	: Epidermal growth faktör reseptör
<b>ERK</b>	: Ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz
<b>FFPE</b>	: Formalin fikse edilmiş parafine gömülü
<b>FHIT</b>	: Frajil histidin triat
<b>GAP</b>	: GTPaz aktive edici protein
<b>GDP</b>	: Guanozin difosfat
<b>GEF</b>	: Guanin nükleotid değişim faktörü
<b>GTP</b>	: Guanozin trifosfat
<b>HRAS</b>	: Harvey rat sarkoma viral onkogen homologu
<b>İPF</b>	: İdiopatik pulmoner fibrozis
<b>KHAK</b>	: Küçük hücreli akciğer kanseri
<b>KHDAK</b>	: Küçük hücreli dışı akciğer kanser
<b>KOAH</b>	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>KRAS</b>	: Kirsten rat sarkoma viral onkogen homologu
<b>LET</b>	: Lineer enerji transfer
<b>MAPK</b>	: MAP kinaz
<b>MAPKK</b>	: Mitojen aktive edici protein kinaz kinaz
<b>miRNA</b>	: mikroRNA
<b>mTOR'un</b>	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
<b>NRAS</b>	: Nöroblastom rat sarkoma viral onkogen homologu
<b>PAH</b>	: Polisiklik aromatik hidrokarbon
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PI3K</b>	: Fosfotidilinositol-3-kinaz
<b>PIP2</b>	: Fosfotidilinositol 4,5 bifosfat
<b>PIP3</b>	: Fosfotidilinositol 3,4,5 trifosfat
<b>PTEN</b>	: Fosfataz ve tensin homologu
<b>PPi</b>	: İnorganik fosfat
<b>Ral</b>	: Ras ilişkili protein
<b>RAS</b>	: Rat sarkoma virüsü
<b>Rb</b>	: Retinoblastom
<b>RTK</b>	: Reseptör tirozin kinaz
<b>SH2</b>	: Src homoloji 2
<b>TSG</b>	: Tümör süpressör gen
<b>UICC</b>	: Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği
<b>VKİ</b>	: Vücut kitle indeksi

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLolar.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akciğer Kanseri.....	3
2.1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi.....	5
2.1.3. Akciğer Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırması.....	10
2.1.4. Akciğer Kanserinin Evrelemesi.....	12
2.1.5. Akciğer Kanserin Moleküler Genetiği.....	15
2.2. RAS Onkogeni.....	21
2.2.1. Ras Gen Ailesi.....	21
2.2.2. Ras Sinyal Yolağının İşleyişi.....	25
2.2.3. Ras ve Kanser.....	28
2.3. Sekanslama Yöntemleri.....	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Hasta Seçimi.....	35
3.2. Formalin Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	36
3.3. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi.....	39
3.4. DNA Örneklerinden Pyrosekanslama Yöntemi İle Mutasyon Analizi.....	40
3.5. İstatistiksel Analiz.....	48
4.BULGULAR.....	49
5.TARTIŞMA.....	61
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
7.KAYNAKLAR.....	70

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü'nün verilerine göre 2012 yılında tüm dünya genelinde tahminen 14,1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon kanser ile ilişkili ölüm bildirilmiştir. Tüm dünya genelinde ve gelişmekte olan ülkelerde akciğer ve meme kanseri en çok tanı konulan kanserler olup, erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir. Gelişmiş ülkelerde ise erkeklerde en sık tanı konulan kanser prostat kanseri iken kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni ise akciğer kanseridir.

Birçok moleküler genetik çalışma, hücre büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunu ya da fonksiyonunu etkileyen hücre genomundaki değişikliklerin kanserin ana nedeni olduğunu ortaya koymuştur. Kanser gelişiminde rol oynayan gen mutasyonlarının keşfi kişiselleştirilmiş hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine imkân sağlamıştır. Örneğin epidermal growth faktör reseptör(EGFR) gen mutasyonu varlığı, küçük hücreli dışı akciğer kanser(KHDAK) hastalarında tedaviyi değiştirmektedir. Akciğer kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğradığı gösterilmiş gen ailelerinden birisi de ras onkogen ailesidir. İnsan tümörlerinde ras genlerindeki mutasyonel aktivasyon ve onkojenik dönüşüm ilk kez 1981'de gösterilmiştir. Bu keşif kanserlerde; hedefe yönelik yeni bir tedavi yaklaşımı olarak anti-ras stratejilerinin geliştirilmesine yönelik merak uyandırmıştır.

Ras proteinleri, hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla oluşan sinyal iletiminde en önde gelen aracı moleküllerden biridir. RAS mutasyonları nedeniyle onkojenik aktivasyon çoğu kanser tipinde oldukça sık görülmektedir. Şimdiye kadar yapılan birçok biyokimyasal ve genetik çalışma ras proteinlerinin birbirleri ile bağlantılı çok çeşitli yollardan oluşan kompleks moleküler bir devreyi kontrol ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla bu proteinler hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatiyeti gibi bir çok fizyolojik olayda hayati önem taşır.

Genel olarak tüm kanserlerin %30'unda RAS genlerinde mutasyon bulunmaktadır. RAS genlerinin spesifik kodonlarında görülen nokta mutasyonları, onkojenik aktivitesi ile ilişkilidir. Akciğer kanserlerinde görülen RAS mutasyon sıklığı ortalama % 33 civarındadır ve en sık mutasyona uğrayan gen KRAS genidir. Nadir de olsa NRAS ve HRAS mutasyonları da görülmektedir. En sık mutasyon görülen bölgeler ise 12, 13 ve 61. kodonlardır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda RAS genlerinin mutasyona uğrayan 12,13 ve 61 inci kodonlarına yönelik çalışmalar ön planda olmuş genin geri kalan bölgelerinde yer alan sıcak mutasyon noktalarına yönelik derin bir değerlendirme yapılmamıştır. Bu çalışmada KRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonlarındaki mutasyon durumuna ilaveten KRAS ve NRAS genlerinin 58, 59, 60, 117, 118, 145, 146 ve 147. kodonlardaki mutasyonlar da değerlendirilecektir. Böylece daha geniş kapsamlı bir değerlendirme yapılarak, en sık mutasyon görülen bölgeleri normal ya da mutant olan hastalarda genin farklı bölgeleri de değerlendirilmiş olacaktır. Aynı zamanda sıklıkla mutasyona uğrayan bölgelerin yanı sıra diğer bölgelerde de mutasyon saptanması halinde kliniğin değişip değişmediği ve prognoza etkisinin olup olmadığı tartışılacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. AC KANSERİ

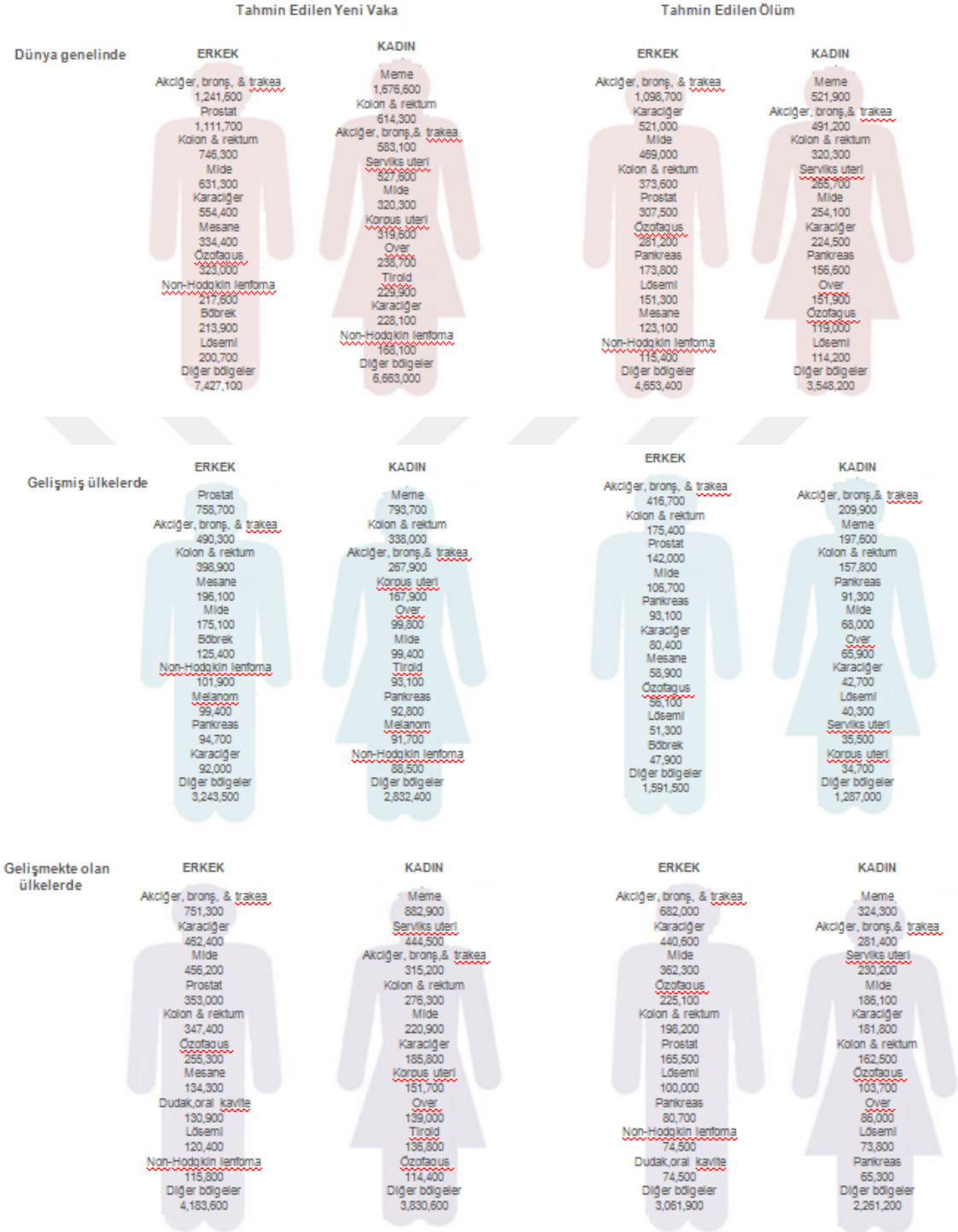
#### 2.1.1. AC KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü'nün 2012 yılı verilerine göre akciğer kanseri erkeklerde gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanser iken gelişmiş ülkelerde prostat kanserinden sonra 2. sırada yer alır ve hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde kanserle ilişkili ölümlerin başında gelir. Kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırada yer alır ve gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni iken, gelişmekte olan ülkelerde meme kanserinden sonra ikinci sıradadır(Şekil 2.1)(Toerre 2012).

Hastalık erkeklerde dünya çapında en yaygın görülen kanser olmaya devam etmekle birlikte, yaşa standardize en yüksek tahmini insidans oranları Orta ve Doğu Avrupa(53.5/100000) ile Doğu Asya'dadır(50.4/100000). Özellikle düşük insidans oranları Orta ve Batı Afrika'da görülmektedir(sırasıyla 2/100000 ve 1.7/100000). Kadınlarda insidans oranları daha düşüktür ve coğrafi dağılım biraz farklıdır. Bu durum aslında sigara maruziyetindeki farklılığı yansıtır. Bu nedenle en yüksek tahmini insidans oranları Kuzey Amerika(33.8), Kuzey Avrupa(23.7) ve nisbeten Doğu Asya'dadır(19.2). Yine Batı ve Orta Afrika'da bu oranlar en düşük düzeydedir(sırasıyla 1.1 ve 0.8)(Web\_1, Ferlay 2013). Tüm dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenini oluşturan AC kanserinin 2012 yılında 1.59 milyon kişinin ölümüne yol açtığı tahmin edilmektedir(Web\_2).

Ülkemizde de AC kanseri tüm dünyada olduğu gibi en sık görülen ve ölüme sebep olan kanserlerin başında gelmektedir. Türkiye'de hastalığın yaygınlığıyla ilgili gerçek bir rakam verilemese de, Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın 2012 verilerine göre ülkemizdeki AC kanserinin yaşa standardize insidans hızının erkeklerde 60.4/100000, kadınlarda ise 9.3/100000 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, erkeklerde tüm kanserler içerisinde en büyük bölümü %21.6'lık oranla akciğer kanseri oluşturmaktadır. Kadınlarda ise akciğer kanseri 5.sıradadır ve %4.9'luk bir orana sahiptir. Türk Toraks Derneğinin 2009 yılında yaptığı 'Türkiye'nin akciğer kanseri haritası' projesinde ülkemizde her yıl 29.314 yeni AC kanser vakası görüldüğü hesaplanmıştır. Coğrafi dağılımına bakıldığında akciğer

kanserinin özellikle batı bölgelerde diğer bölgelere oranla daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (Web\_3).



**Şekil 2.1.** Tüm dünya genelinde, gelişmiş ülkelerde ve gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanser tiplerinin dağılımı(Torre 2012).

## 2.1.2. AC KANSERİNİN ETİYOLOJİSİ

Akciğer kanseri etiolojisinde cinsiyet, ırk, genetik predispozisyon gibi değiştirilemeyen risk faktörleri yanı sıra önlenebilen risk faktörleri de mevcuttur. Bunlar sigara kullanımı, sigara dumanına maruziyet, mesleki karsinojenlere maruziyet, hava kirliliği ve diyetdir(Tablo 2.1)(Özlu 2010).

**Tablo 2.1.** AC kanserinin etiolojisinde rol oynayan faktörler(Özlu 2010)

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

## SİGARA

Akciğer kanserinin en önemli risk faktörüdür ve akciğer kanser gelişiminden %75-90 oranında sorumludur. Akciğer kanser riskinin, yaşamı boyunca sigara içen bireylerde içmeyenlere göre 24 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Sigara ile ilişkili olarak daha fazla izlenen histopatolojik tipler skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinomdur(McErlean 2011).

Sigara içiciliği AC kanser gelişimine iki yolla etki eder. İlki; sigara dumanında bulunan kanserojen bileşenlerden polisiklik aromatik hidrokarbon(PAH)'ların CYP1A1 geni tarafından kodlanan ve sitokrom p450 sisteminde görev alan aril hidrokarbon hidroksilaz(AHH) enzimi ile oluşturulan reaktif metabolitlerinin, hücre döngüsünde kritik rolü olan p53 geninin 157., 248. ve 273. kodonlarında G>T transversiyon mutasyonlarına neden olmasıdır(Vineis 2004, Moorthy 2015). İkincisi ise hayvanlarda güçlü kanserojen etkisi olduğu bilinen ve sigara dumanında bulunan kimyasalların diğer major grubunu oluşturan N-nitrozamin bileşenleridir(Vineis 2004).

Pasif sigara içiminde de etrafa yayılan sigara dumanında çok sayıda karsinojenin bulunması ve sigara filtresinden geçmediği için daha yoğun olması nedeniyle AC kanseri gelişme riski 3,5 kat artmaktadır. Sigaraya başlama yaşı, içme süresi, ortalama tüketim miktarı, türü ve içe çekme şekli AC kanseri gelişiminde etkili olan faktörlerdir(Müsellim 2007).

## **MESLEKİ KARSİNOJENLERE MARUZİYET**

Genellikle işyeri ajanlarına uzun süreli ve aşırı maruz kalan meslek gruplarına yönelik incelemeler, bir takım kimyasalların ve fiziksel ajanların karsinojen olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Mesleki maruziyet ile ilişkili kanserler arasında en yaygın olanı AC kanseridir (Doll 1981, Alberg 2003). Tüm AC kanserli vakaların yaklaşık %9-15'inden mesleki karsinojenlere maruziyet sorumlu tutulmuştur(Alberg 2003).

Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterler, krom, nikel, radon, silika ve vinil klorürü karsinojen olarak belirlemiştir. Bu ajanlar ve bunlara maruziyet ile ilişkili meslekler Tablo 2.2'de gösterilmiştir(Dela Cruz 2011).

**Asbest:** Mesleki maruziyetle ilişkili AC kanserinin en çok bilinen ve en yaygın nedenidir. Asbestin iki ana formu vardır; serpantin ve amfibol. Benzer doz ayarlamasıyla amfibol liflerine maruz kalan işçilerde riskin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tek başına asbest maruziyeti ile AC kanseri için rölatif risk 6 kat artmış iken hem asbest maruziyeti hem de sigara içimi ile birlikte AC kanseri gelişimi için bu riskin 59 kata kadar artabildiği bildirilmiştir(Dela Cruz 2011).

**Tablo 2.2.** AC kanserinin etiyolojisinde bilinen ve şüpheli karsinojenler ve ilişkili mesleki maruziyetler(Dela Cruz 2011)

<b>BİLİNEN KARSİNOJEN</b>	<b>MESLEKİ MARUZİYET</b>	<b>ŞÜPHELİ KARSİNOJEN</b>	<b>MESLEKİ MARUZİYET</b>
Arsenik	Bakır, kurşun, çinko maden eritmesi Böcek ilacı imalatı Madencilik	Akrilonitril	Tekstil imalatı Plastik, petrokimyasal imalatı
Asbest	Asbest madenciliği Asbest tekstil üretimi Fren balatası işçiliği Çimento üretimi İnşaat işi İzolasyon işi Tersane işi	Kadmiyum	Elektrokaplama Boya maddesi üretimi Plastik sanayi
Berilyum	Seramik imalatı Elektronik ve havacılık malzeme üretimi Madencilik	Formaldehit	Formaldehit reçine imalatı Sentetik lifler İzolasyon işi Yalıtım imalatı
Klorometil eterler	Kimyasal madde imalatı	Vinil klorür	Plastik imalatı Polivinil klorid imalatı
Krom	Kromat imalatı Krom elektrokaplama Deri tabaklama Boya maddesi üretimi		
Nikel	Nikel madenciliği, rafinaj, elektrokaplama Paslanmaz ve ısıya dayanıklı çelik üretimi Polisiklik aromatikler Alüminyum üretimi Hidrokarbon bileşikleri Kola imalatı Ferrokrom alaşım imalatı Nikel içerikli maden eritmesi Çatı işçiliği		
Radon	Madencilik		
Silika	Seramik ve cam sanayi Döküm sanayi Granit sanayi Metal madeni eritmesi Madencilik ve taşocaklığı		

**Radyasyon:** İyonize radyasyon maruziyeti AC kanserine yol açar(BEIR VI, 1999). Dokuya enerji transfer hızı ile sınıflandırılan 2 çeşit radyasyon AC kanseri ile ilişkilidir: 1)düşük lineer enerji transfer(LET) radyasyon(örn. x-ray, g-ray) ve 2) yüksek-LET

radasyon(örn. nötronlar, radon). Yüksek-LET radyasyon düşük-LET radyasyona göre dokularda daha yüksek dansitede iyonizasyona yol açtığından, eşit dozlarda daha fazla hücrenel hasar meydana getirir(Hendee 1992).

**Yüksek-LET Radyasyon:** Radon, uranyumun parçalanması sonucu doğal olarak oluşan , inert bir gazdır. Radonun bozulmuş ürünleri, yüksek enerjileri ve kütleleri sebebiyle respiratuar epitelyal hücrelerinin DNA'sına zarar verebilecek “ $\alpha$ ” partikülleri yayar. Yüksek radon konsantrasyonları yer altı madencilerinde artmış AC kanser riski ile ilişkilendirilmiştir(Alberg 2013). Genel popülasyon için kapalı ortamlardaki maruziyet maden işçilerine göre daha az olsa da, vaka-kontrol çalışmaları kapalı ortamlardaki radon maruziyetinin de AC kanseri riskinde artma ile ilişkili olduğunu göstermiştir(Krewski 2005, Darby 2005). Sigara içimi ve radonun bozulmuş ürünleri AC kanser riski için sinerjik etki meydana getirir(Barros-Dios 2002).

**Düşük-LET Radyasyon:** X-ray ve g-ray: Düşük LET radyasyonun AC kanseri ile ilişkisi Japonya'da atom bombası mağdurlarında(Shimizu 1990), birden fazla radyasyon tedavisi alan ankilozan spondilit(Darby 1987) veya tüberküloz hastalarında(Davis 1989, Howe 1995) ve radyasyona maruz kalan meslek gruplarında incelenmiştir(Gilbert 1993). Atom bombası mağdurlarında, tek yüksek doz maruziyet belirgin AC kanser riski ile ilişkilendirilmiştir(Shimizu 1990).

## **ÇEVRE KİRLİLİĞİ**

Yapılan çalışmalar sonucunda, AC kanseri ile çevre kirliliği arasında zayıf bir ilişki bulunmuştur(Metintaş 2010). Doll ve ark.1981 yılında yayımladıkları bir makalede tüm akciğer kanserli vakaların % 1-2'sinin hava kirliliği ile ilişkili olabileceğini tahmin etmişlerdir(Doll 1981).

## **DİYET**

Beslenme ve AC kanseri üzerine yapılan araştırmalar uzun yıllardır devam etmektedir. En çok araştırılan diyetel faktörler AC kanser gelişimini önleyici etkileri olan meyve, sebze ve bunlarda bulunan spesifik antioksidanlardır. Bu araştırmalar antioksidan besinlerden zengin diyetin oksidatif DNA hasarını azalttığını ve böylelikle kansere karşı koruyucu etki yarattığını ortaya koymuştur(Alberg 2007).

Hem diyet alımı hem de kan konsantrasyon ölçümleri ile yapılan araştırmalar karotenoidlerin de AC kanserine karşı koruyucu etkilerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak C vitamini için kanıtlar yetersiz olsa da, yine de koruyuculuğu olduğu dűřünölmektedir. A vitaminine y2nelik bulgular ise yetersizdir(Alberg 2007).

Sigara içimi diyetle ilgili fakt2rlerin dolařımdaki konsantrasyonunu direkt olarak etkileyebilmektedir. Sigara içenlerde antioksidanların dolařımdaki konsantrasyonları daha dűřük olma eđilimindedir(Alberg 2007).

Freudenheim ve ark.(2005)'nın 399.767 g2n2ll2 ve 3137 AC kanserli olguyu kapsayan bir çalışmasında, alkol t2k2tmeyenlere g2re g2nde en az 30 g alkol t2k2tenlerde AC kanser gelişim riskinin daha y2ksek olduğu ortaya konmuştur(Freudenheim 2005).

Daha dűřük v2cut kitle indeksine(VKİ) sahip bireylerin, daha y2ksek VKİ'ne sahip bireylere g2re artmıř AC kanser riskine sahip olduđunu g2steren çalıřmalar da yapılmıřtır(Knekt 1991, Olson 2002). Ancak hem alkol t2k2timinin hem de dűřük VKİ'nin sigara içimiyle birlikte etkilerinin ayırt edilmesi zordur.

Yapılan bir meta-analiz çalışmasında hem orta hem de y2ksek d2zeyde fiziksel aktivitenin AC kanser riskinde %13-30 oranında azalma ile ilişkili olduğu g2r2lm2řt2r(Tardon 2005).

## **GENETİK**

Geçtiğimiz 60 yıllık s2re içinde ailesel AC kanser vakalarının g2r2lmesi, hastalık gelişim s2recinde kalıtsal bir yatkınlığın da etkili olabileceğini desteklemektedir (Molina 2008). AC kanserli vakaların birinci derece akrabalarında hastalığın gelişme riskinin 2.4 kat artmış olduğu g2zlenmiştir(İtil 2000).

Sellers ve ark.'nın yaptığı bi çalışmada ise kanserin erken yaşta başlamasına neden olabilecek otozomal kodominant kalıtımla ilişkili bir gen lokusundan bahsedilmiştir ve bu gen lokusunda delesyonu olan kişilerde 50 yaş 2ncesi AC kanseri gelişimi için %69'a varan riskden s2z edilmiştir(Sellers 1990).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda karsinojen maddeleri de kapsayan toksik ajanların metabolizmasında g2rev alan enzimlerde g2r2len polimorfizm ve mutasyonların da kanser oluşumunda yatkınlığa neden olduğu g2sterilmiştir(Xie 2016). Onkogenlerin aktivasyonu, t2m2r s2pres2r genlerin inaktivasyonu ve b2y2me fakt2rlerini ve resept2rlerini kodlayan genlerdeki değişimlerle birlikte, DNA tamir mekanizmasında g2rev alan genlerde oluşan

değişiklikler akciğer kanseri gelişimdeki diğer önemli etmenlerdir ve ilerleyen bölümlerde bahsedilecektir.

### **2.1.3. AC KANSERİNİN HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMASI**

Akciğer tümörlerinin histolojik sınıflandırılması ışık mikroskobu görüntülerine ve standart histolojik boyama tekniklerine göre yapılmaktadır. Tedavi stratejilerinin farklı olması nedeniyle 2 ana gruba ayrılabilir. Bunlar, küçük hücreli akciğer kanseri(KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri(KHDAK)'dir. Akciğer kanserlerinin ilk detaylı sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1967'de yapılmıştır. Daha sonra bu sınıflama belirli zamanlarda revize edilmiştir. DSÖ'nün en son yaptığı sınıflama ise 2015 yılında yayınlanmıştır(Tablo 2.3)(Travis 2015).

Akciğer kanserlerinin %85'ini, adenokarsinom(~%40), skuamöz hücreli karsinom(~%25-30) ve büyük hücreli karsinomu(~%10-15) da içine alan küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri(KHDAK) oluşturmaktadır(Ginsberg 2007).

#### **I) Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu**

##### ***1. Skuamöz(Epidermoid, Yassı) Hücreli Karsinom:***

Epitel hücrelerinden köken alan, hücreler arası köprüleşme, hücre içi keratinizasyon ve skuamöz inci formasyonu gibi morfolojik özellikler gösteren malign bir tümördür. Sigara ile ilişkisi en fazla olan akciğer kanser türü olması nedeniyle erkeklerde daha sık ortaya çıkmaktadır. Yaklaşık üçte ikisi merkezi yerleşim gösterirken, geri kalanı ise periferik yerleşim göstermektedir(Travis 2011). Büyük bronşların merkezinden çıkma eğilimindedir ve rezeke edilebilme şansı daha yüksektir. Diğer histolojik tipler ile kıyaslandığında toraks dışına metastaz yapma potansiyeli daha düşüktür(Kumar 2000).

##### ***2. Adenokarsinom***

Diğer histolojik alt tiplere göre sigara ile ilişkisi daha az olan AC kanseri türüdür. Özellikle orta yaşlarda ve kadınlarda daha sık görülür. Gelişmiş ülkelerde skuamöz hücreli kanseri geride bırakarak en sık görülen kanser türü haline gelmiştir(Zamani 2010). Skuamöz hücreli kanserin aksine olguların yaklaşık 3/4'ü periferik yerleşimlidir. Bez yapısı oluşturabilmesi ve münin salgılaması en belirgin histolojik özelliğidir. Daha yavaş büyüyüp, daha küçük kitle oluşturmalarına rağmen, diğer tiplere göre daha erken metastaz yapmaya eğilimlidirler(Kumar 2000).

**Tablo 2.3.** Akciğer Kanserlerinin 2015-Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması (Travis 2015)

<p><b>EPİTELYAL TÜMÖRLER</b></p> <p>Adenokarsinom</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Lepidik adenokarsinom</li><li>Asiner adenokarsinom</li><li>Papiller adenokarsinom</li><li>Mikopapiller adenokarsinom</li><li>Solid adenokarsinom</li><li>İnvaziv müsinöz adenokarsinom<ul style="list-style-type: none"><li>Mikst invaziv müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinom</li></ul></li><li>Kolloid adenokarsinom</li><li>Fetal adenokarsinom</li><li>Enterik adenokarsinom</li><li>Minimal invaziv adenokarsinom<ul style="list-style-type: none"><li>Non-müsinöz</li><li>Müsinöz</li></ul></li><li>Preinvaziv lezyonlar<ul style="list-style-type: none"><li>Atipik adenomatöz hiperplazi</li><li>Adenokarsinoma insitu<ul style="list-style-type: none"><li>Non-müsinöz</li><li>Müsinöz</li></ul></li></ul></li><li>Skumöz hücreli karsinom<ul style="list-style-type: none"><li>Keratinize skumöz hücreli karsinom</li><li>Non-keratinize skumöz hücreli karsinom</li><li>Bazaloid skumöz hücreli karsinom</li><li>Preinvaziv lezyon<ul style="list-style-type: none"><li>Skumöz hücreli karsinoma in situ</li></ul></li></ul></li><li>Nöroendokrin tümörler<ul style="list-style-type: none"><li>Küçük hücreli karsinom<ul style="list-style-type: none"><li>Kombine küçük hücreli karsinom</li></ul></li><li>Büyük hücreli nöroendokrin karsinom<ul style="list-style-type: none"><li>Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom</li></ul></li><li>Karsinoid tümörler<ul style="list-style-type: none"><li>Tipik karsinoid tümör</li><li>Atipik karsinoid tümör</li></ul></li><li>Preinvaziv lezyon<ul style="list-style-type: none"><li>Diffüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi</li></ul></li><li>Büyük hücreli karsinom</li><li>Adenoskuamöz karsinom</li><li>Sarkomatoid karsinom<ul style="list-style-type: none"><li>Pleomorfik karsinom</li><li>İgisi hücreli karsinom</li><li>Dev hücreli karsinom</li><li>Karsinosarkom</li><li>Pulmoner blastom</li></ul></li><li>Diğer sınıflandırılmayan karsinomlar<ul style="list-style-type: none"><li>Lenfoepitelyoma benzeri kanser</li><li>NUT karsinoma</li></ul></li><li>Tükrük bezi tipi tümörler<ul style="list-style-type: none"><li>Mukoepidermoid karsinom</li><li>Adenoid kistik karsinom</li><li>Epitelyal-myoepitelyal karsinom</li><li>Pleomorfik adenom</li></ul></li></ul></li></ul>	<p>Papillomalar</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Skumöz hücreli papilloma<ul style="list-style-type: none"><li>Ekzofitik</li><li>İnverted</li></ul></li><li>Glandüler papilloma</li><li>Mikst skumöz ve glandüler papilloma</li></ul> <p>Adenomlar</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Sklerozan pnömositoma</li><li>Alveolar adenom</li><li>Papiller adenom</li><li>Müsinöz kistadenom</li><li>Müköz bezi adenomu</li></ul> <p><b>MEZENKİMAL TÜMÖRLER</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Pulmoner hamartom</li><li>Kondrom</li><li>PEHomatöz tümörler<ul style="list-style-type: none"><li>Lenfanjioleiomyomatozis</li><li>PEHoma, benign<ul style="list-style-type: none"><li>Şeffaf hücreli tümör</li></ul></li><li>PEHoma, malign</li></ul></li><li>Konjenital peribronşial myofibroblatik tümör</li><li>Diffüz pulmoner lenfanjiomatozis</li><li>İnflamatuvar myofibroblastik tümör</li><li>Epiteloid hemanjioendotelyoma</li><li>Plevrapulmoner blastoma</li><li>Sinoviyal sarkoma</li><li>Pulomer arter intimal sarkoma</li><li>EWSR1-CREB1 translokasyonlu pulmoner miksoid sarkoma</li><li>Myoepitelyal tümörler<ul style="list-style-type: none"><li>Myoepitelyoma</li><li>Myoepitelyal karsinom</li></ul></li></ul> <p><b>LENFOHİSTİYOSİTİK TÜMÖRLER</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Mukoza ile ilişkili lenfoid dokunun ekstrasnodal marjinal zon lenfoması (MALT lenfoma)</li><li>Diffüz büyük hücreli lenfoma</li><li>Lenfomatoid granüloatozis</li><li>İntravasküler büyük B hücreli lenfoma</li><li>Pulmoner langerhans hücreli histiositozis</li><li>Erdheim-Chester hastalığı</li></ul> <p><b>EKTOPİK ORJİNLİ TÜMÖRLER</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Germ hücre tümörleri<ul style="list-style-type: none"><li>Teratom,matür</li><li>Teratom,immatür</li></ul></li><li>İntrapulmoner timoma</li><li>Melanom</li><li>Menenjiom, Sınıflandırılmayan</li></ul> <p><b>METASTATİK TÜMÖRLER</b></p>
---	---

(devamı yan sütunda)

### **3.Büyük Hücreli Karsinom**

Skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom özelliklerini göstermeyen az diferansiye tümörlerdir(Kumar 2000). Belirgin nükleoluslu, iri veziküler nükleuslu, bol stoplazmalı genellikle anaplastik özellik gösteren, büyük hücrelerden oluşurlar(Kumar 2000). Erken dönemde uzak metastaz yapabilme özelliği nedeniyle kötü prognoza sahiptirler(Kumar 2000).

### **4.Pleomorfik karsinom**

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin %0.1-0.4'ünü oluşturan, nadir görülen, malign epitelyal tümörlerindendir. Sarkomatoid karsinomlar başlığı altında yer alan pleomorfik karsinom, hücrelerin en az %10'unu iğsi ya da dev hücreli sarkomatoid komponentin oluşturduğu az diferansiye adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ya da büyük hücreli karsinom olarak tanımlanmaktadır. Kliniği evre bağımlı olmasına rağmen diğer KHDAK tiplerine göre daha agresif seyirlidir ve kötü prognoza sahiptir(Tamura 2015).

## **II) Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu**

Suluk gri renkli, akciğer parankimine uzanan, santral yerleşim gösteren kitle şeklinde görülürler. Erken dönemde hiler ve mediastinal lenf nodlarına yayılırlar. Az sitoplazmalı, ince granüler kromatinli yuvarlak, oval veya iğsi hücrelerden oluşan bir tümördür. Hücrelerde bol mitoz ve yaygın nekroz görülür. Küçük hücreli olarak adlandırılmasına rağmen tümör hücreleri lenfositlerin yaklaşık iki katı büyüklüğündedir. Akciğerin nöroendokrin hücrelerinden köken aldıklarından çeşitli nöroendokrin markırlar ekspres ederler(Kumar 2000, Travis 2011 (a)). Tanı anında yaygın metastaz varlığı, paraneoplastik sendroma neden olması sebebiyle kötü prognoza sahiptir(Travis 2011(b)).

### **2.1.4. AC KANSERİNİN EVRELEMESİ**

Evrelendirme kanserli hastalara yaklaşımın önemli bir parçasıdır ve belirli kanser tiplerine sahip hastalar hakkında ortak bir terminoloji sağlamaktadır(Detterbeck 2009a).

Günümüzde halen kullanılmakta olan, TNM evreleme sisteminin prensipleri ilk kez 1940'lı yıllarda Pierro Denoix tarafından ortaya koyulmuştur. AC kanserinde TNM evreleme sisteminin kullanılması ise Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği(UICC) tarafından 1966

yılında kabul görmüştür(Carson 2011). Amerika Birleşik Kanser Komitesi(AJCC) ve UICC'nin tanımlamasına göre, TNM evreleme sisteminde “T: Primer tümörü, N: Bölgesel lenf nodu tutulumunu, M: Uzak metastaz durumunu” ifade etmektedir. Bu evreleme sistemi belirli aralıklarda revize edilmektedir. En son 2009 yılında 7. edisyonun yayınlandığı AC kanseri evreleme kriterleri Ocak 2010 tarihinden itibaren geçerli hale gelmiştir(Tablo2.4)(Detterbeck 2009b, Mirsadraee 2012).

**Tablo 2.4.** AC kanserlerinde 7. evreleme sistemi(Detterbeck 2009b, Mirsadraee 2012)

<b>EVRE</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a, T1b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a,T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Evre IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1-3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0,N1	M0
Evre IIIB	T4	N2	M0
	T1-4	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a,b
Gizli karsinom	Tx	N0	M0

T: Tümör

Tx:Primer tümör değerlendirilemedi veya balgam ya da bronşiyal lavajda malign hücreler tespit edildi ancak görüntüleme yöntemleri veya bronkoskopi ile gösterilemedi.

T0: Primer tümöre ait bir bulgu yok.

Tis: Karsinoma in situ

T1: Tümörün en büyük çapı 3cm, akciğer veya visseral plevrayla çevrilmiş, bronkoskopide

lober bronştan daha proksimale invazyon belirtisi yok (örn. ana bronşta tümör yok)

T1a: Tümörün en büyük çapı 2cm'den daha küçük

T1b: Tümörün en büyük çapı 2cm'den daha büyük fakat 3cm'den daha küçük

T2: Tümörün en büyük çapı 3cm'den büyük fakat 7cm'den daha küçük; veya tümör aşağıdaki durumlardan birine sahip (bu özelliklere sahip T2 tm'ler 5 cm'den küçük ise T2''a olarak sınıflandırılır)

. Karinadan >2 cm uzaklıkta ana bronş invazyonu

. Visseral plevra invazyonu

. Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni

T2a: Tümörün en büyük çapı 3cm'den büyük 5 cm'den daha küçük

T2b: Tümörün en büyük çapı 5cm'den daha büyük 7cm'den daha küçük

T3: Tümörün çapı 7cm'den büyük veya doğrudan aşağıdaki durumlardan birine sahip olması

- Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikard invazyonu
- Tümör ana bronşta karinaya 2cm'den az mesafede ancak karina tutulumu olmaksızın
- . Akciğerin tamamını kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni
- . Aynı lobda ayrı tümöral nodül(ler)

T4: Aşağıdaki durumlardan birine içeren herhangi büyüklükteki tümör

. Mediasten, kalp, büyük damarlar, trake, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra gövdesi, karina invazyonu

. Aynı tarafta farklı lobda tümöral nodül(ler)

N: Lenf nodu

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler ve intrapulmoner lenf nodlarında metastaz, including involvement by direct extension

N2: İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nod(lar)ında metastaz

N3: Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya

supraklaviküler lenf nod(lar)ında metastaz

M: Metastaz

Mx: Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

M1a: Kontralateral lobda ayrı metastatik nodül(ler)

Plevrada tümöral nodüller veya malign plevral/perikardial effüzyonlu tümör

M1b: Uzak organ metastazı

### 2.1.5. AKCİĞER KANSERİNİN MOLEKÜLER GENETİĞİ

Diğer kanserlerde olduğu gibi Akciğer kanser gelişimi de bir çok gende ve çeşitli yollardaki değişiklikleri içeren bir süreçtir. DNA tamir mekanizmasında, hücre büyümesinde, sinyal iletiminde ve hücre döngüsü regülasyonunda rol alan genler akciğer kanser gelişiminin farklı aşamalarında hasara uğrayabilir. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör supressör genlerin inaktivasyonu ve sonrasında artmış genetik instabilite akciğer kanser gelişimindeki major genetik olaylardır(Tablo 2.5)(Devereux 1996).

**Tablo 2.5.** AC kanserinde sık görülen moleküler düzeyde değişiklikler(Devereux 1996)

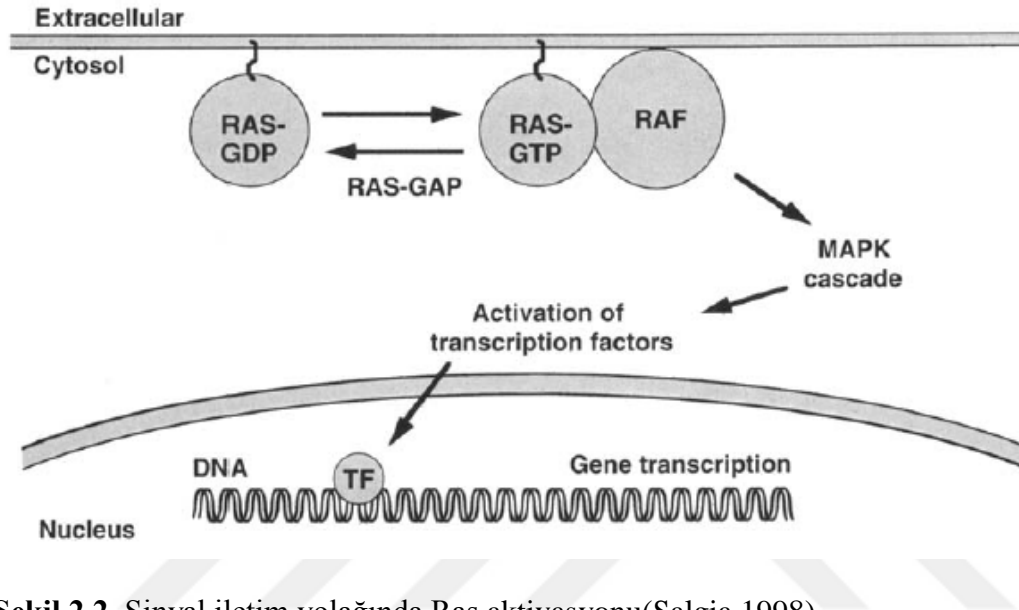
	AC kanseri %	ras Mutasyon Sayı (%)	p53 Mutasyon %	p16 Mut/Del	Rb Mut/Del	Mikrosatellit instabilitesi Sayı(%)
KHAK	25	0/51 (0)	70	az sıklıkta	>%90	15/33(45)
KHDAK	75			daha sık	az sıklıkta	7/108(6)
Alt tipleri						
Adenokarsinom	30	76/237(32)	33			
Skvamöz hücreli	25	6/60 (10)	65			
Büyük hücreli	15	12/38 (32)	60			
Diğer	5					

### I) ONKOGENLERİN AKTİVASYONU

Normal hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonunda görevli olan protoonkogenlerin, aktive edici bir mutasyon sonucu onkogen haline dönüşmesi ve sürekli aktif hale gelmesi kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Nokta mutasyonu, kromozomal translokasyonlar, gen amplifikasyonu ve aşırı gen ekspresyonu bu onkogenetik süreçteki başlıca mekanizmalardır(Cefle 2009).

### 1) RAS;

Tanımlanmış ilk onkogen ailesidir ve HRAS, KRAS ve NRAS olarak 3 protoonkogenen oluşmaktadır. Bu genlerin ürünü olan 21 kd moleküler ağırlıklı ras proteinleri, büyük G proteinleri ile yüksek homoloji gösterirler. Guanozin trifosfat (GTP)'a bağlı iken aktif olan ras proteinleri, GTPaz aktive edici protein(GAP) ile GTP'nin GDP(guanozin difosfat)'ye dönüşümü sonucu inaktif hale geçer(Şekil 2.2)(de Vries 1996).



Şekil 2.2. Sinyal iletim yolağında Ras aktivasyonu(Salgia 1998).

Hücre membranından gelen sinyalleri çekirdeğe iletmede anahtar rol oynayan bu proteinler, kendilerini kodlayan genlerin 12, 13 veya 61. kodonlarında meydana gelen nokta mutasyonları ile malign transformasyona yol açabilirler. Ayrıca bu durum GTP-bağlanma bölgesinde ya da yakınındaki bölgede gerçekleşen bir mutasyon sonucu da ortaya çıkabilir ve GTP inaktivasyonunun engellenmesi ile ras aktivitesinin devamlılığı ile sonuçlanır(Salgia 1998).

Akciğer adenokanserlerinin %30 kadarında KRAS onkogeninin özellikle 12. kodonunda guanin(G)'in timin(T)'e dönüştüğü nokta mutasyonu görülmektedir (Slebos 1992). Bu ras mutasyonları ve artmış ras ekspresyonu özellikle rezeke edilebilir vakalarda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir(Mitsudomi 1991). Nadiren HRAS ve NRAS mutasyonları da görülebilmektedir. KHAK vakalarında ise oldukça nadiren meydana geldikleri gösterilmiştir(Köktürk 2003).

## 2) *Myc*;

Myc onkogen ailesi, transkripsiyonel regülasyonda görev alan nükleer DNA-binding proteinleri kodlayan c-myc, N-myc ve L-myc genlerinden oluşur(Batthey 1983). Akciğer kanserinde myc aktivasyonunun genel mekanizması myc'nin aşırı ekspresyonu ile sonuçlanacak gen amplifikasyonudur(Prins 1993). Hem KHAK'li hem de KHDAK'li olgularda sıklıkla c-myc amplifikasyonu görülür. Diğer myc gen ailesi üyeleri KHAK'li vakalarda daha fazladır(Noguchi 1990). Myc'nin anormal ekspresyon sıklığı KHDAK vakalarında %10 iken, KHAK vakalarında bu oran %10 ila %40 arasında değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda c-myc gen amplifikasyonunun KHAK 'inde sağ kalımı olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir(Brennan 1991).

## 3) *c-erbB-2*;

c-erbB-1 protoonkogeni epidermal growth faktör(EGF) reseptörünü kodlar ve sinyal iletiminde görev alır. İlişkili protoonkogen c-erbB-2(HER-2/neu olarak da bilinir) moleküler ağırlığı 185 kd olan(p185<sup>neu</sup>), tirozin kinaz aktivitesine sahip ve transmembran büyüme faktör reseptörü olarak görev yapan bir protein kodlar. Yapılan çalışmalarda KHDAK'li vakaların %35-58'inde c-erbB-2'nin aşırı eksprese olduğu gözlenmiştir, KHAK'i olan vakalarda ise aşırı ekspresyondan bahsedilmemektedir(Salgia 1998, Shi 1992). Akciğer adenokarsinomlarında c-erbB-2'nin aşırı ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir(Kern 1990). P185<sup>neu</sup> antagonistlerinin KHDAK hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir(Kern 1993).

## 4) *bcl-2*;

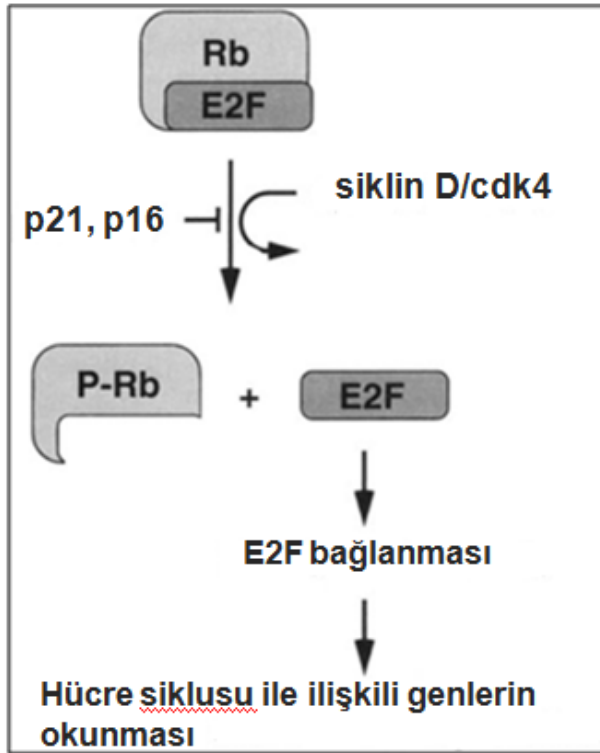
Bir proto-onkogen olan bcl-2 geni programlı hücre ölümünü(apoptozis) inhibe eden bir protein kodlar. Özellikle KHAK'inde bcl-2 proteininin ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlenmiştir. KHDAK'lerinde ise skuamöz hücreli AC kanserlerinde ve adenokanserlerde ekspresyon artışı daha sıktır(Higashiyama 1995, Pezzella 1993). Bcl-2 pozitif bir grup skuamöz hücreli AC kanserli vakada 5 yıllık surveyin daha iyi olduğu gösterilmiştir(Pezzella 1993).

## II)TÜMÖR SUPRESSÖR GENLERİN İNAKTİVASYONU

### 1) Rb (Retinoblastom) geni;

Tanımlanmış ilk tümör supressör gen olan Rb 13q14.11'de yer alır. Bu gen tarafından kodlanan 106 kd büyüklüğündeki Rb proteini transkripsiyon faktör E2F ile etkileşir ve hücre döngüsü regülasyonunda G0/G1 fazında önemli rol oynar. Rb'nin aktivitesi hücre döngüsü sırasında bu proteinin fosforilasyon durumuna bağlıdır. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi G0/G1 fazında Rb bir transkripsiyon faktör olan E2F ile bağlı defosforile haldedir. G1 fazının sonunda siklin/siklin bağımlı kinaz(CDK) kompleksinin(örn. Siklin D/cdk4) fosforillenmesi ile Rb inaktive olur ve E2F'den ayrılır. Rb'den ayrılan E2F S fazını tetikleyecek genlerin okunmasını sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür(Salgia 1998).

KHAK'lerinin %90'dan fazlasında, KHDAK'lerinin ise yalnızca %10-15'inde Rb protein anormallikleri veya inaktivasyonu görülmektedir(Cooper 2013).



Şekil 2.3. Rb'nin regülasyonu(Salgia 1998).

### 3) p16<sup>INK4A</sup>;

Bazı AC kanser türleri de dahil olmak üzere bir takım kanserlerde kromozom 9p21 bölgesinin delesyona uğradığı gösterilmiş ve böylelikle bu bölgede yer alan bir veya daha fazla tümör supressör genin olduğu anlaşılmıştır. Bunlardan birisi olan p16<sup>INK4A</sup> hücre

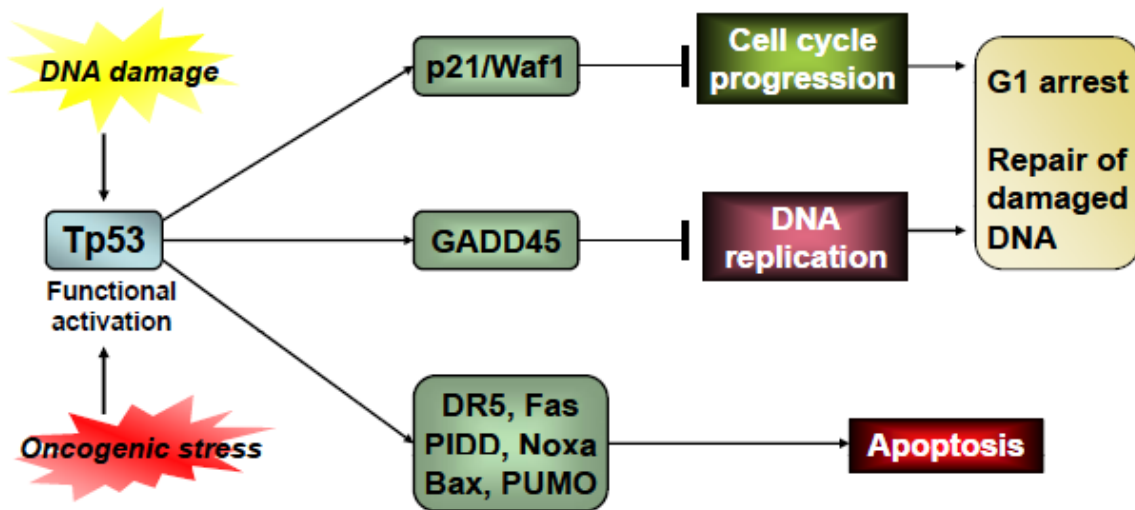
döngüsü kontrolünde CDK4'ü inhibe ederek G1 fazından S fazına geçişi önler(Şekil 2.3)(Salgia 1998).

KHDAK'lerinde p16<sup>INK4a</sup>-siklin D1-CDK4-Rb yolağı çoğunlukla siklin D1, CDK4 ve siklin bağımlı kinaz inhibitör p16'daki(CDKN2A) değişimler nedeniyle bozulur ve mitojenik aktivite ile sonuçlanır. KHDAK'lerinin yaklaşık %80'inde p16<sup>INK4a</sup>'ün homozigot mutasyon, metilasyon ya da delesyon yoluyla inaktive olduğu , %40'nda ise siklin D'nin gen amplifikasyon yoluyla ya da diğer mekanizmalarla overeksprese olduğu gözlenmiştir(Cooper 2013).

### 3) p53 geni;

İnsan kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan p53 geninin, KHAK'lerinin %70'inde yassı hücreli kanserlerin % 65' inde, büyük hücreli kanserlerin % 60'ında ve adeno kanserlerin %33'ünde mutasyona uğradığı gösterilmiştir(Tablo 2.5)(Greenblatt 1994, Devereux 1996).

Kromozom 17p13.1'de lokalize olan p53 geni, hücre hasarının birikimini önleyecek olan 53 kDa büyüklüğünde bir nükleer fosfoprotein kodlar. Bu p53 proteini karsinojenik stres veya DNA hasarına cevap olarak hücre siklusu kontrol noktalarını regüle eden genlerin(CDK inhibitörleri gibi) ekspresyonunu indükleyerek, hücrenin G1 fazında durmasına ve DNA tamirine olanak sağlar. Hasar tamir edilemeyecek düzeyde ise hücreyi apoptozise sokar(Şekil 2.4)(Larsen 2011). p53 geninde heterozigosite kaybı AC kanserinde en yaygın görülen değişikliktir(Tablo 2.5)(Larsen 2011).



Şekil 2.4. p53'ün biyolojik fonksiyonları(Okudela 2010).

### III) KROMOZOMAL BÖLGE KAYIPLARI

Kromozomların tamamının ya da bir bölgesinin kaybı kanserlerde sıkça görülen bir durumdur ve genelde o bölgede yer alan tümör süpressör genin inaktivasyonunu yansıtır. Akciğer kanserlerinde kromozom 3p, 9p ve 17p kaybı oldukça yaygındır(Tablo 2.6). Özellikle 3p ve 9p kaybı erken evre tümörögenezisde görülürken, kromozom 2q, 18q ve 22q kaybı geç dönemde yaygındır(Devereux 1996).

**Tablo 2.6.** Akciğer kanserinde sık görülen kromozom kayıpları ve sıklığı(Devereux 1996)

Kromozom	KHAK(%)	KHDAK(%)	Aday TSG
1q		10/27(37)	
3p	7/7 (100)	92/181(51)	
5q	34/39(87)	43/118(36)	5q21-APC,MCC
8q		22/66(33)	
9p		67/129(52)	9p21-p16,p15
11p		13/27(48)	
13q	10/11(91)	62/202(31)	13q14-Rb
17p	5/5 (100)	96/164(59)	17p13-p53

Skvamöz hücreli karsinomlarda ek heterozigozite kayıpları; 4q(%45),9q(%67),21q(%50)

\*TSG; tümör süpressör gen

Tüm akciğer kanser türlerinin geç evresinde anöploidiler ve kromozomal kayıplar görülse de tiplere göre bir takım farklılıklar vardır. KHAK'lerinde 9p kaybı daha nadirken, 3p, 5q, 13q ve 17p kaybı KHDAK'lerine göre daha fazladır(Yokota 1987). KHDAK'leri içinde skuamöz hücreli kanserler, adenokanserlere göre daha fazla genetik değişikliklere sahiptir. Kromozom 4q, 9q ve 21q'da gözlenen heterozigozite kaybı adenokanserlerde nadirken skuamöz hücreli kanserlerde daha sıktır(Sato 1994).

Kromozom 3p de üç farklı bölge etkilenebilir; 3p25, 3p21.3, 3p14-sent(Hibi 1992). KHAK'lerinin %90'ından fazlasında, KHDAK'lerinin ise yaklaşık %50'sinde 3. kromozomun p kolunda allelik kayıplar görülmektedir(Salgia 1998). Bu bölgede yer alan tümör süpressör genlerin KHAK patogenezeine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca c-RAF-1 protoonkogeni,  $\beta$ -retinoik asit reseptör geni, çinko parmak motifi içeren genler,

protein-tirozin fosfataz- $\gamma$  geni ve Von Hippel Lindau tümör süpressör geni 3p'de yer alan ilişkili diğer genlerdir(Salgia 1998).

KHAK'li vakaların %80'inde, KHDAK'li vakaların ise %40'ında yine 3p14.2'de lokalize olan FHIT(frajil histidin triat) geninin okunmasında bozukluk olduğu gösterilmiştir(Sozzi 1996).

KHDAK'leri ile ilişkili diğer genetik lokuslardan 8p(21.3-22) bölgesinin kaybı, vakaların %50'sinde görülmektedir. Yine p16(multipl tümör süpressör lokus, MTS1/p16<sup>INK4A</sup>) ve p15(MTS2/p15<sup>INK4B</sup>) tümör süpressör genleri içeren 9p(21-22) bölgesinin kaybı ise KHDAK'li vakaların %67'sinde gözlenir. Vakaların %20-46'sında kaybı gözlenen 11p bölgesi ise KHDAK'i ile ilişkili bir başka genetik lokustur(Salgia 1998).

#### **IV) MİKRORNA(miRNA)'LAR**

Temel görevi hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi hücre fonksiyonları sırasında mRNA'ların proteine dönüşümünün düzenlenmesi olan mikroRNA(miRNA)'ların da onkogen ya da tümör süpressör gen gibi davranarak kanser gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir(Lotterman 2008). Tümör süpressör fonksiyona sahip olduğu gösterilmiş Let-7 ailesine ait miRNA'ların akciğer kanserlerinde %40 oranında azaldığı bildirilmiştir(Zamani 2013). Akciğer kanseri ile ilişkili tümör süpressör fonksiyonu olan diğer miRNA'lar; miR-34, miR-192, miR-451 hsa-miR-125a-3p ve hsa-miR-125a-5p ve miR-200'dür. MiR-17-92(miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) ailesi üyeleri ve miR-31 ise AC kanserinde onkojenik fonksiyona sahip olan miRNA'lardır(Zamani 2013).

### **2.2. RAS ONKOGENİ**

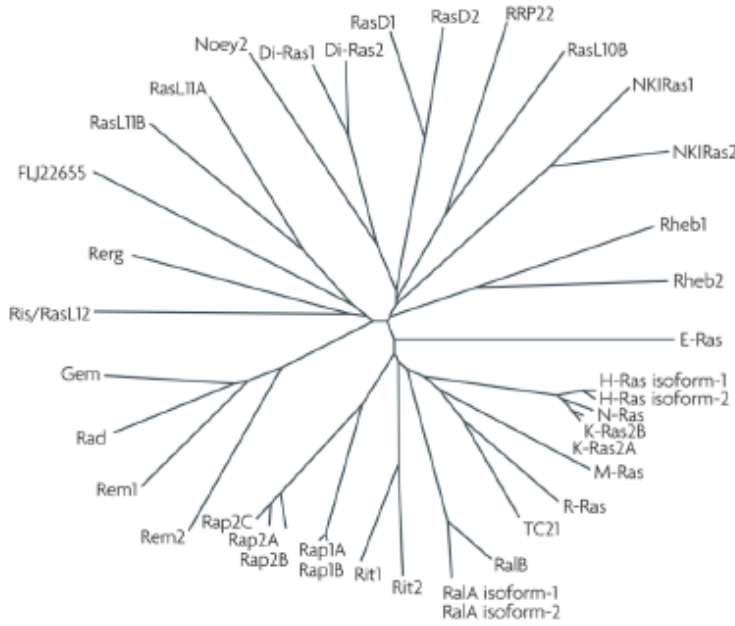
#### **2.2.1. RAS GEN AİLESİ**

RAS ile ilgili çalışmalar ilk olarak 1964 yılında Jennifer Harvey'in lösemik farelerden aldığı bir virüsün yenidoğan sıçanlarda sarkomaya neden olduğunu göstermesi ile başlamıştır. 1967 yılında yine farelerde lösemiye yol açan virüslerin seri pasajı yoluyla Kirsten-MSV(Kirsten-Mürin Sarkoma Virüs) izole edilmiştir. 1970'li yıllarda bu Harvey ve Kirsten sarkoma retrovirüslerinin(Ha-MSV ve Ki-MSV) kanser patogenezinin neden olan ve Ras(rat sarkoma virüsü) olarak isimlendirilen ortak genlere sahip olduğu

gösterilmiştir. Daha sonra bu genlerin fare ve insan hücrelerinde homologlarının bulunduğu anlaşılmış ve bunlar K-ras ve H-ras olarak adlandırılmıştır. Ras gen ailesinin üçüncü üyesi olan N-ras ise 1983 yılında tanımlanmıştır(Malumbres 2003).

Ras genleri ilk bulunan onkogenlerdir ve bu genlere ait ilk mutasyon 1982 yılında insan mesane kanseri hücre serisinde H-ras geninde saptanmıştır(Traczyk 2012).

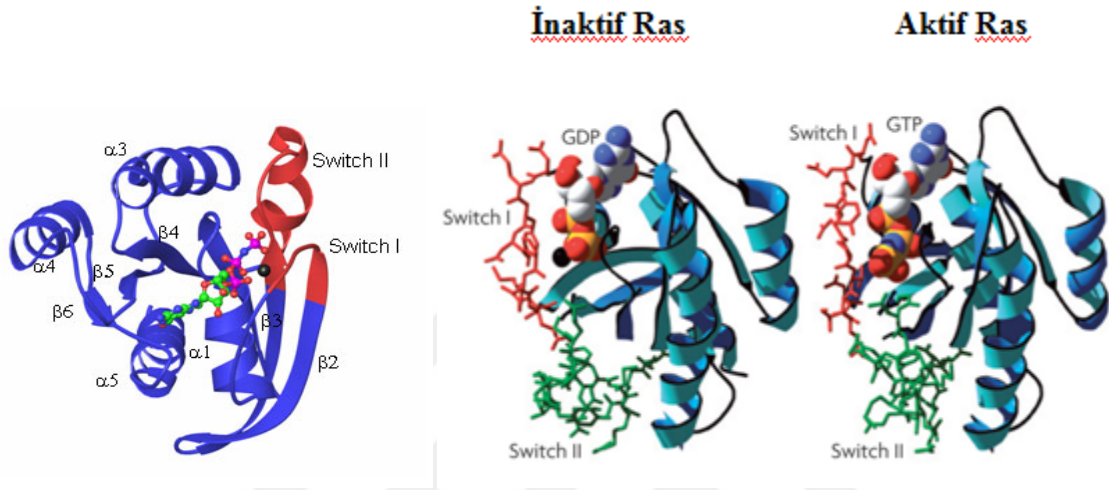
Ras protoonkogenleri hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolünde önemli rol oynayan, GTP-az aktivitesine sahip guanin nükleotidi bağlayıcı düşük molekül ağırlıklı proteinleri kodlar. Memeli genomunda üç ras geni tarafından dört adet ras proteini eksprese edilir; N-Ras, H-Ras, K-Ras4A ve K-Ras4B. K-Ras4A ve K-Ras4B protein izoformları KRAS geninin alternatif kesimi sonucu oluşur(Buday 2008, Plowman 2005). G proteinleri süperailisinin bir üyesi olan Ras ailesi 36 gen tarafından kodlanan 39 farklı ras proteininden oluşmaktadır(Şekil 2.5)(Karnoub 2008).



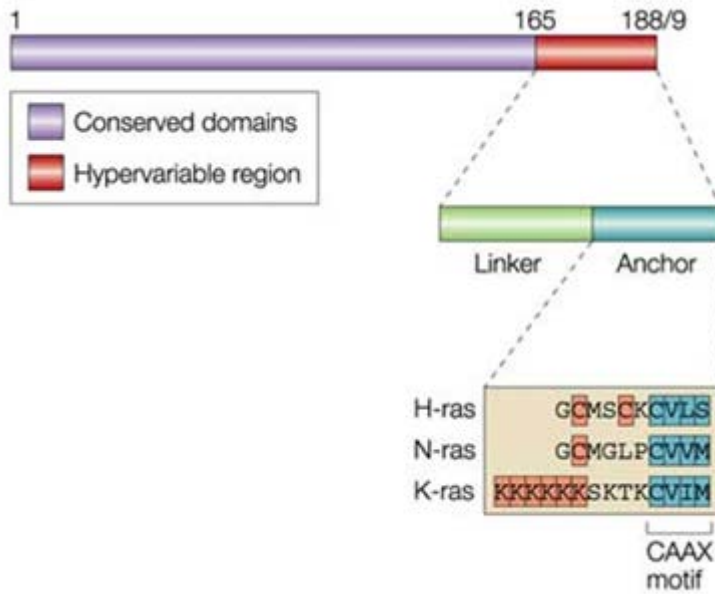
Şekil 2.5. Küçük GTP-az üyelerinden olan Ras ailesi(Karnoub 2008).

Ras proteinlerinin üç boyutlu yapısının 5 adet  $\alpha$ -heliks ve 6 adet  $\beta$  tabakadan oluştuğu gösterilmiştir(Şekil 2.6)(Karnoub 2008). Her bir monomerik ras proteini N-terminal ve C-terminal bölgeleri arasında oldukça korunmuş yaklaşık 190 amino asitlik(aa) rezidülerden oluşmaktadır. Tümünün yapısında benzer olan, N terminalinde yer alan ilk 165 aa'lık dizi özellikle fosfat bağlanma ilmeği olan 'P-loop' ve nükleotid duyarlı 'switch 1' ve 'switch 2' bölgeleridir(Karnoub 2008). Bu proteinler arasındaki farklılıktan ise C

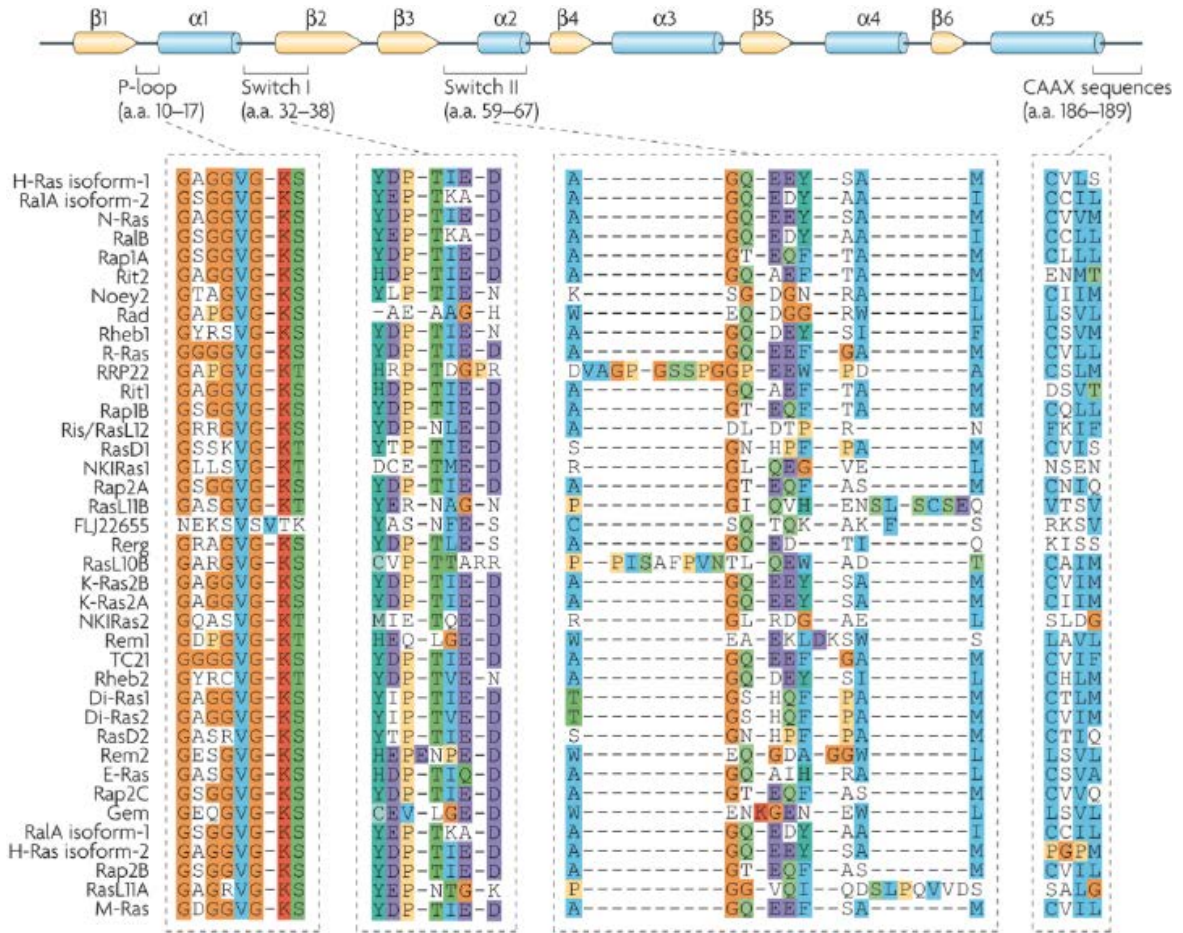
terminalin hemen yakınında yer alan 25 aa'lık oldukça değişken bölge(hypervariable region) sorumludur. Bu değişken bölgenin ras protein izoformlarının sahip olduğu biyolojik fonksiyonlarındaki farklılığa sebep olduğu düşünülmektedir(Adjei 2001). C terminal ucunda bulunan CAAX dizisi(C;sistein, A;alifatik aa(lösin/izolösin/valin gibi), X;herhangi bir aa) posttranslasyonel modifikasyonun meydana geldiği bölgedir ve ras proteinlerinin membrana yönlendirmesinden sorumludur(Şekil 2.7 ve 2.8)(Buday 2008).



Şekil 2.6. Ras proteininin üç boyutlu yapısı, GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif Ras'ın konformasyonel şekli (Web\_4, Karnoub 2008)

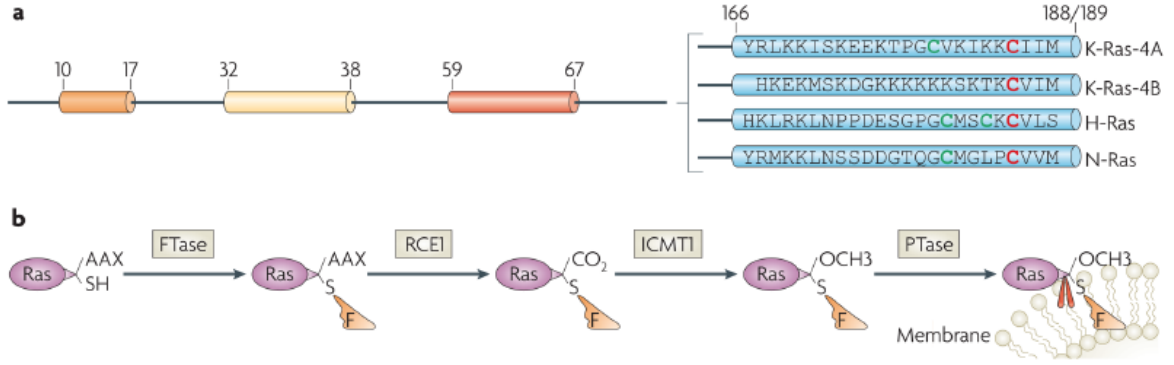


Şekil 2.7. Ras proteininin temel yapısı(Hancock 2003).



**Şekil 2.8.** Ras proteinlerinin primer yapısı (Karnoub 2008).

Ras proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonu 4 aşamalı bir süreçtir ; izoprenilasyon, proteoliz, karboksimetilasyon ve palmitoilasyon(Şekil 2.9)(Karnoub 2008). İlk aşamada bir farnezil pirofosfat yeni sentezlenmiş sitoplazmik ras proteinlerine farnezil transferaz(FTaz) enzimi aracılığıyla kovalent bağ ile ilave edilir. Bu reaksiyonu endoplazmik retikulumda RCE1(Ras-converting enzyme-1) enzim aracılığıyla son 3 aa rezidüsünün(AAX) proteolitik kesimi ve kalan sistein rezidüsünün ICMT1(Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase 1) ile karboksimetilasyonu takip eder. Son aşamada ise H-Ras, N-Ras ve K-Ras4A'nın membrana gitmeden önce C-terminal uca yakın sistein rezidülerine PTase (palmitoyltransferase) aracılığıyla bir palmitoil ilavesi gerçekleşir. K-Ras 4B'nin C-terminalindeki lizin rezidüleri plazma membranı ile elektrostatik ilişki kurması için yeterlidir (Karnoub 2008).



**Şekil 2.9.** Ras proteinlerinin C-terminal bölgelerinin posttranslasyonel modifikasyonu (Karnoub 2008)

a. C-terminal sekanslardaki farnezillenmiş (kırmızı) ve palmitoillenmiş (yeşil) sistein rezidüleri

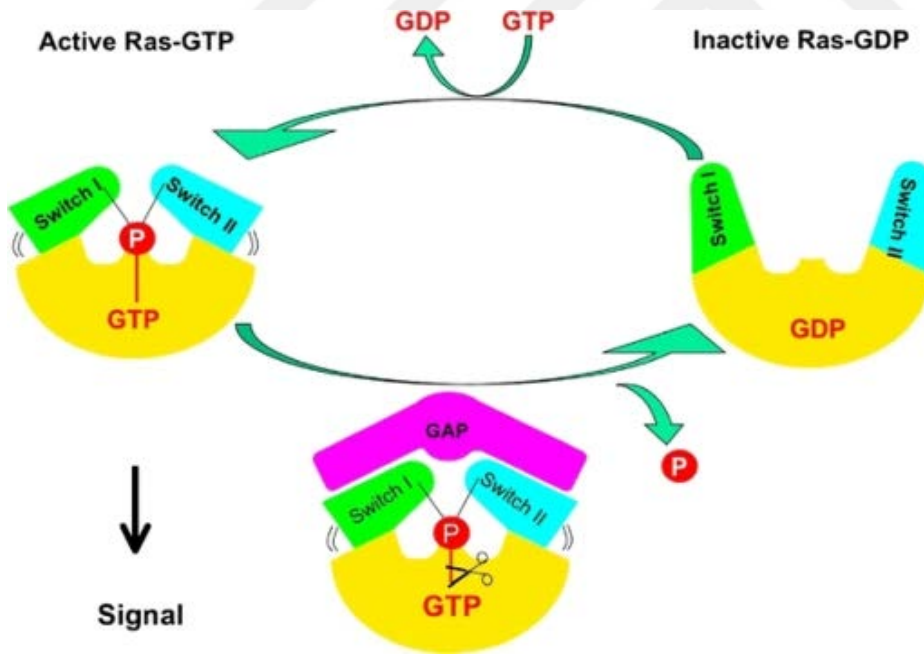
b. C-terminal bölgenin posttranslasyonel modifikasyonu

## 2.2.2 RAS SİNYAL YOLAĞININ İŞLEYİŞİ

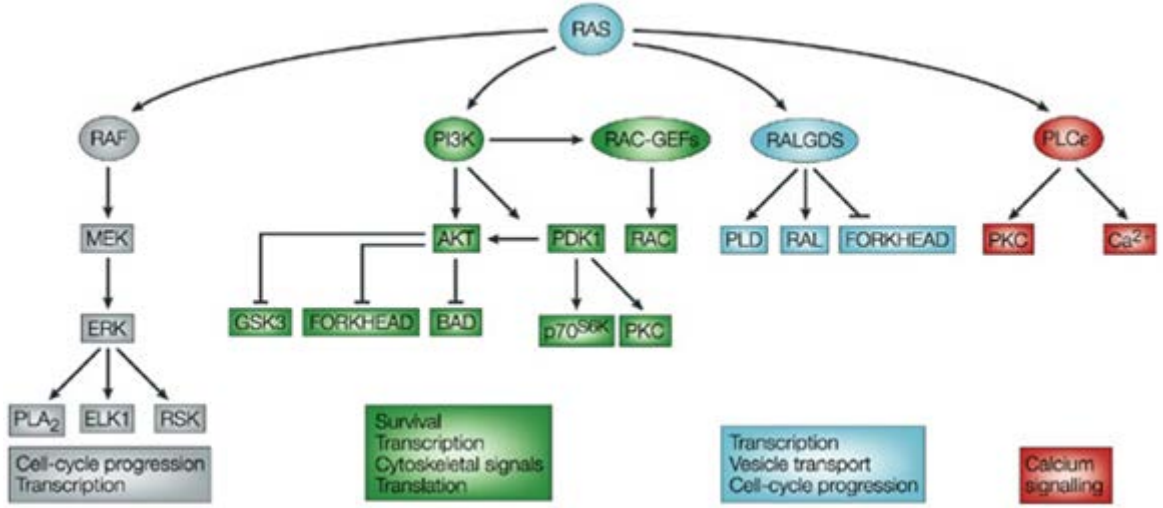
Monomerik bir G proteini olan ras proteini istirahat halinde GDP ile birlikte hücre içi membranda inaktif şekilde bulunur. Ras proteinlerinin aktivasyonu hücre zarında bulunan ve tirozin kinaz aktivitesine sahip olan reseptörlerden gelen sinyallere bağlı olarak gerçekleşir. Fizyolojik koşullar altında, ras proteininin aktif ve inaktif iki formu arasındaki geçiş guanin nükleotid değişim faktörü(guanine nucleotide exchange factor-GEF) ve GTPaz aktive eden proteinler(GAP) tarafından kontrol edilir. GEF proteinleri, ras-GDP ile etkileşip, GDP'nin proteinden uzaklaşmasını sağlayarak ras'ın hücre içi konsantrasyonu fazla olan GTP'ye bağlanmasını ve aktifleşmesini sağlarken, GAP'lar GTPaz'ların aktivitelerini başlatarak ya da artırarak aktif ras-GTP'leri inaktif ras-GDP'lere dönüştürür(Şekil 2.10)(Kratz 2007).

Aktif GTP-bağlı ras ise efektör proteinlerine bağlanmak suretiyle bir takım sinyal iletim yollarında görev alır(Şekil 2.11). Bu yollardan en iyi bilineni rasın aktivasyonu ile başlayan ve sırasıyla Raf(=MAPKKK), MEK(=MAPKK) ve Erk(=MAPK) proteinleri ile devam eden raf-MEK-ERK sinyal iletim yolağıdır(Şekil 2.12)(Adjei 2001). Bu yolakta bir takım ligandlar (büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler gibi) reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanır ve reseptörün intraselüler bölgesinde yer alan spesifik tirozinlerin otofosforilasyonuna yol açar. Reseptörün fosfotirozin rezidüleri, çeşitli sinyal proteinlerinin SH2(Src homoloji 2) domainleri için bağlanma bölgesi olarak görev yapar.

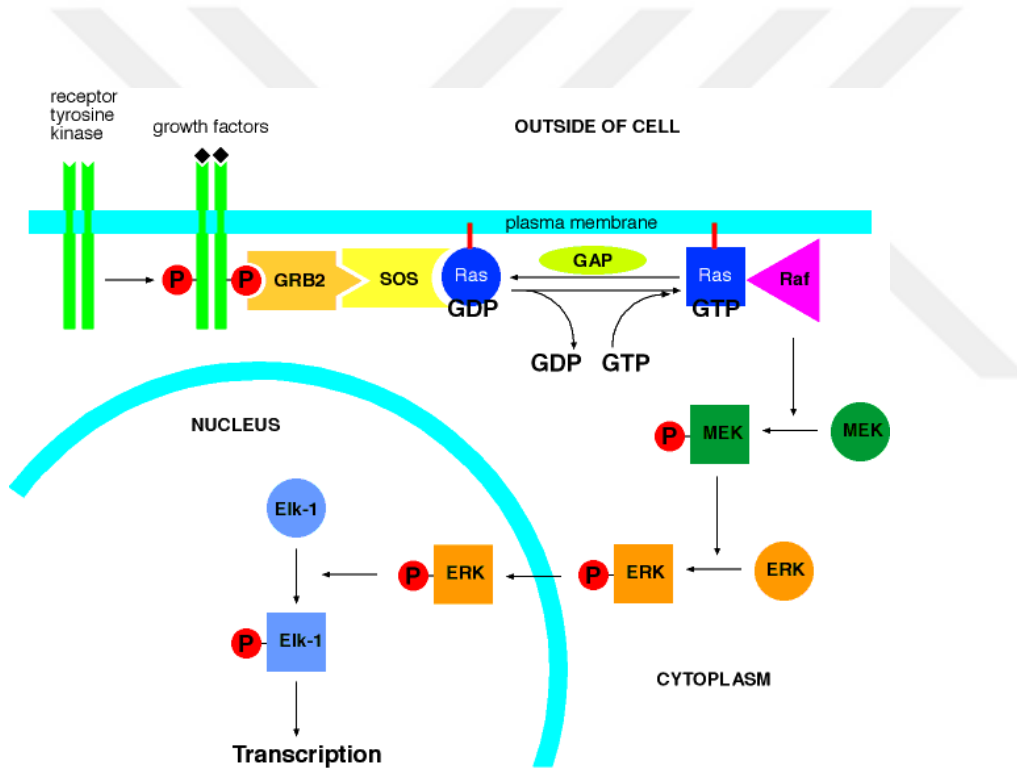
Ras'ın aktivasyonu da SH2/SH3 domainlerini içeren bir adaptör protein olan Grb2'nin, SH2 domaini ile fosforillenmiş olan tirozinlere bağlanması sonucu meydana gelir. Grb2 aynı zamanda SH3 domaini ile ras için bir GEF olan diğer bir adaptör protein SOS'un(son of sevenless) prolinde zengin motiflerine bağlanır. Bu etkileşim sonucu SOS membrana bağlı ras'daki GDP'nin GTP'ye dönüşümünü stimüle etmek için plazma membranına transloke olur(Buday 2008). Aktif hale gelen ras bir serin/treonin kinaz proteini olan raf'ın(ras associated faktör) regülatör bölgesinde konformasyonel değişim meydana getirerek aktivasyonunu sağlar. Aktive olan raf protein kinaz kaskadının aktivasyonunu tetikler. Raf tarafından fosforillenerek direkt aktive edilen MEK(MAP/ERK kinaz, MAPKK(Mitojen aktive edici protein kinaz kinaz)) ise, MAPK(MAP kinaz) olarak da bilinen ERK 1/2'yi(ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz) aktif forma dönüştürür. ERK'nin aktivasyonu sonucu proliferasyon ile ilişkili bir takım genlerin okunmasını sağlayacak olan c-Jun, c-Myc ve c-Fos gibi transkripsiyon faktörleri aktive edilir(Adjei 2001).



Şekil 2.10. Aktif ve inaktif Ras döngüsü(Kratz 2007).



Şekil 2.11. Ras'ın rol oynadığı sinyal yolları(Downward 2003).



Şekil 2.12. ras-raf-MEK-ERK yolağı(Web\_5).

Aktif ras'ın etkilediği bir diğer efektör fosfatidilinositol-3-kinaz'dır(PI3K)(Şekil 2.11). PI3K, fosfatidilinositol 4,5 bifosfatı(PIP2) fosforilleyerek fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfata(PIP3) dönüştürür. PIP3 protein kinaz, ras ile ilişkili proteinlerden Rho/Rac/Cdc42 ailesinin yanı sıra Akt'nin de aktivasyonuna yol açar. Akt aynı zamanda PDK1(fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz 1) tarafından da aktive edilir. Rho/Rac/Cdc42 ailesi aktin hücre iskeletinin polimerizasyonunun kontrolünde, hücre adezyonunda ve gen

transkripsiyonunda görev alır. Akt ise Bad ve kaspas 9 gibi pro-apoptotik proteinlerin baskılanmasında ve p70S6 kinazı(S6K) etkileyerek hücre döngüsünün devamlılığını sağlayan mTOR'un(Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) aktivasyonunda görev alır(Adjei 2001). Dolayısıyla PI3K-Akt sinyalizasyon arayolunun net etkisi hücre çoğalması ve canlılığının devamını sağlamaktır. PTEN(Phosphatase and tensin homologue) proteini ise direkt olarak PI3K-Akt arayolunu engelleyerek kanserli hücrelerin apoptozise girmesini sağlar ve çoğalmayı engeller. PIP<sub>3</sub>'den fosfat rezidülerini ayıran PTEN Akt'ın etkisini ortadan kaldırır. PTEN etkisinin ortadan kalkması Akt üzerindeki kontrolü de kaldırır ve kontrolsüz hücre bölünmesi izlenir(Blanco-Aparicio 2007).

Ras aynı zamanda kendisinin de direk efektörü olan RalGEF'ler(RalGDS, RGL ve Rlf) aracılığıyla bir GTPaz olan Ral'i(ras ilişkili protein) uyararak endositoz, ekzositoz regülasyonu, aktin hücre iskeleti organizasyonu, hücre migrasyonu ve gen ekspresyonu gibi çeşitli hücresel süreçlerin regülasyonuna katkıda bulunmuş olur(Mitin 2005).

Rasın doğrudan efektörü olan fosfolipaz C-epsilon'un (PLC $\epsilon$ ) uyarılması PIP2'nin inositol 1,4,5 trifosfat(IP3) ve diaçilgliserol'e(DAG) hidrolizine ve Ca<sup>2+</sup> salınımına ve PKC'nin(protein kinaz C) aktivasyonuna yol açmaktadır(Mitin 2005).

### **2.2.3 RAS VE KANSER**

Genel olarak tüm insan kanserlerinin yaklaşık %30'unda ras geninde mutasyonların olduğu bildirilmiştir. Bu onkojenik mutasyonlar ağırlıklı olarak K-ras gen lokusunu etkilemektedir. Buna karşılık H-ras ve N-ras aile üyelerinde görülen onkojenik mutasyon oranları daha düşüktür(%8 ve%3, sırasıyla)(Fernández-Medarde 2011).

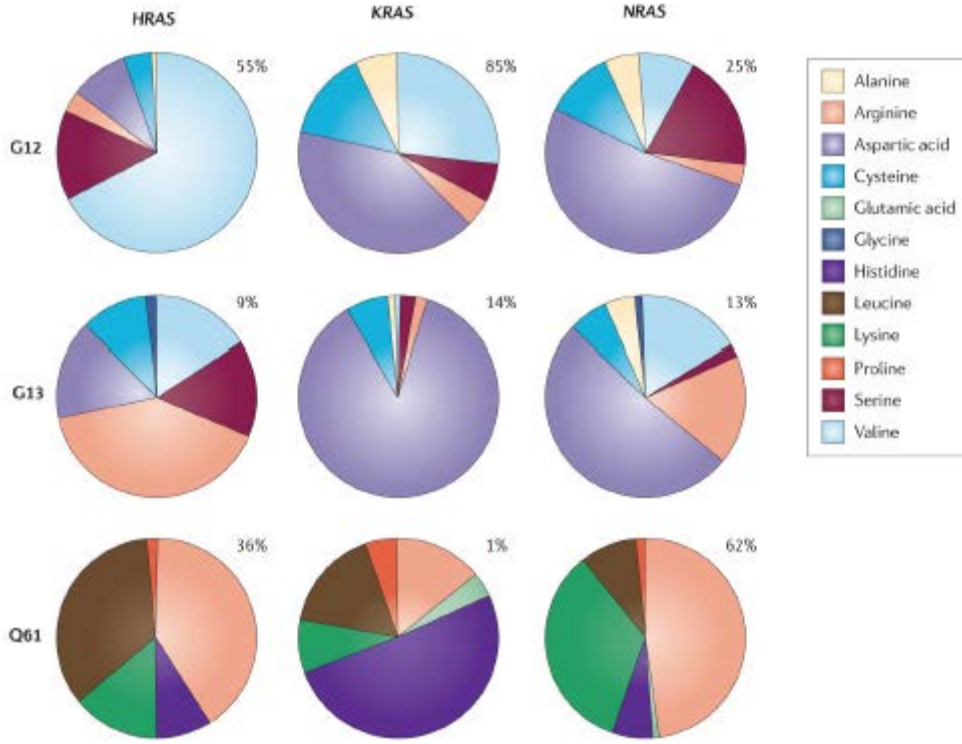
KRAS aktivasyon mutasyonları ağırlıklı olarak pankreas(%95), tiroid(%55), kolorektal(%35) ve akciğer(%35) kanserlerinde görülürken(Kranenburg 2005), mesane karsinomlarında HRAS, lenfoid malignansiler ve melanomlarda ise NRAS mutasyonları daha sıktır(Tablo 2.7)(Karnoub 2008, Playeva-Gupta 2011).

**Tablo 2.7.** İnsan Kanserlerinde Ras Mutasyonlarının Dağılımı(Pylayeva-Gupta 2011)

<b>Doku</b>	<b>HRAS</b>	<b>KRAS</b>	<b>NRAS</b>
Endokrin	%3	%0	%5
Safra yolu	%0	%31	%1
Kemik	%2	%1	%0
Meme	%1	%4	%2
Santral sinir sistemi	%0	%1	%1
Serviks	%9	%7	%2
Endometrium	%1	%14	%0
Göz	%0	%4	%1
Hematopoetik ve lenfoid doku	%0	%5	%10
Böbrek	%0	%1	%0
Kalın bağırsak	%0	%33	%2
Karaciğer	%0	%5	%3
Akciğer	%0	%17	%1
Özefagus	%1	%4	%0
Over	%0	%14	%5
Pankreas	%0	%57	%2
Plevra	%0	%0	%0
Prostat	%6	%8	%2
Tükürük bezi	%15	%3	%0
Deri	%6	%3	%18
İnce bağırsak	%0	%20	%0
Mide	%4	%6	%2
Testis	%4	%4	%3
Timus	%2	%2	%0
Tiroid	%3	%2	%8
Üst sindirim yolu	%9	%3	%3
Üriner kanal	%11	%5	%2

Ras mutasyonları genellikle 2.ekzonun 12,13. kodonlarında ve 3.ekzonun 61. kodonunda kümelenmiştir. Bu mutasyonların dağılımı ise ras ailesinin balıca 3 üyesi arasında değişkenlik göstermektedir. KRAS gen mutasyonları en sık kodon 12'yi takiben sırasıyla kodon 13 ve 61'de görülürken, NRAS geninin en yüksek mutasyon oranı kodon

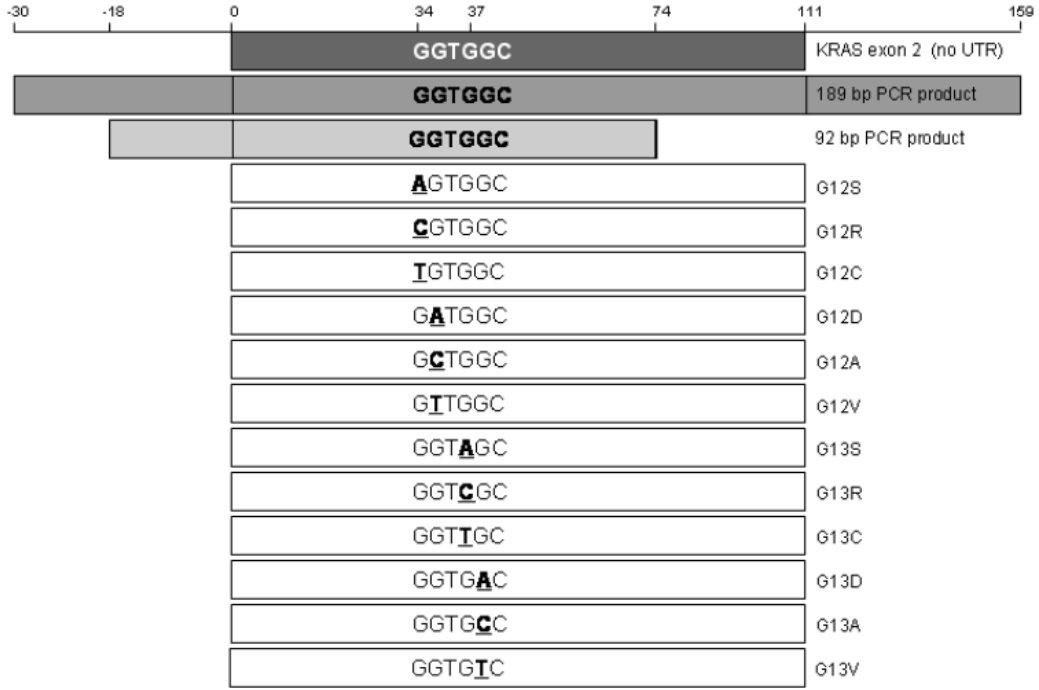
61'de takiben kodon 12'dedir. HRAS geninde ise en fazla oranda mutasyon kodon 12'de, sonrasında ise kodon 61 ve kodon 13'te izlenir(Şekil 2.13)(Playeva-Gupta 2011). Biyolojik açıdan önemi bilinmemekle birlikte KRAS geninin diğer kodonlarında da mutasyonlar görülebilmektedir. Son zamanlarda yapılmış bir çalışmada ekzon 4'te görülen mutasyonların iyi prognoz ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir(Janakiraman 2010).



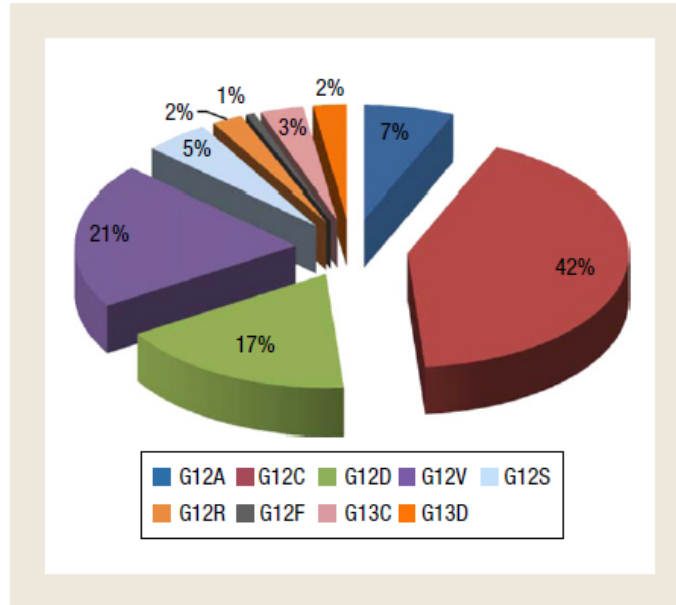
**Şekil 2.13.** Ras izoformlarındaki farklı kodonlardaki mutasyon sıklığı(Playeva-Gupta 2011).

Tüm kanserlerin önemli bir grubunu oluşturan akciğer kanserlerinde KRAS geni en sık mutasyona uğrayan ras gen aile üyesidir. KRAS mutasyonları KHDAK'lerinin yaklaşık %33'ünde bulunmaktadır ve bu mutasyonlar çoğunlukla ekzon 2'deki 12 ve 13. kodonlar ile nadiren ekzon 3'deki 59 ve 61. kodonlarda görülür(Şekil 2.14)(Krypuy 2006, Do 2008). Bu mutasyonlar en yüksek oranda adenokarsinomlarda (%30), daha düşük oranda skuamöz hücreli karsinomlarda(%5) görülürken, küçük hücreli akciğer karsinomlarında bildirilmemiştir(Karachaliou 2013). KRAS genindeki mutasyonların yaklaşık %95'i 12. kodon tarafından kodlanan glisin amino asitinde görülür. Total mutasyonların %42'sinde  $\underline{GGT} > \underline{TGT}$  dönüşümü sonucu glisinin sistein ile yer değişimi(G12C), %21'inde  $\underline{GGT} > \underline{GTT}$  dönüşümü sonucu glisinin valin ile yer değişimi(G12V), %17'sinde  $\underline{GGT} > \underline{GAT}$  dönüşümü sonucu glisinin aspartik asit ile yer değişimi(G12D), %7'sinde ise

GGT>GCT dönüşümü sonucu glisinin alanin ile yer değişimi(G12A) gözlenir(Şekil 2.15)(Karachaliou 2013). 12.kodonda meydana gelen G>T ve G>C transversiyon mutasyonları sigara içenlerde, G>A transisyon mutasyonları ise sigara içmeyenlerde daha sık gözlenmektedir(Riely 2009, Karachaliou 2013).



Şekil 2.14. KRAS geninin 2.ekzonundaki 12 ve 13. kodonlarında görülen nokta mutasyonları(Krypuv 2006).



Şekil 2.15. KHDAK'lerinde KRAS 2.ekzonda kodon 12 ve 13'te farklı değişimlere göre mutasyon sıklığının dağılımı(Karachaliou 2013).

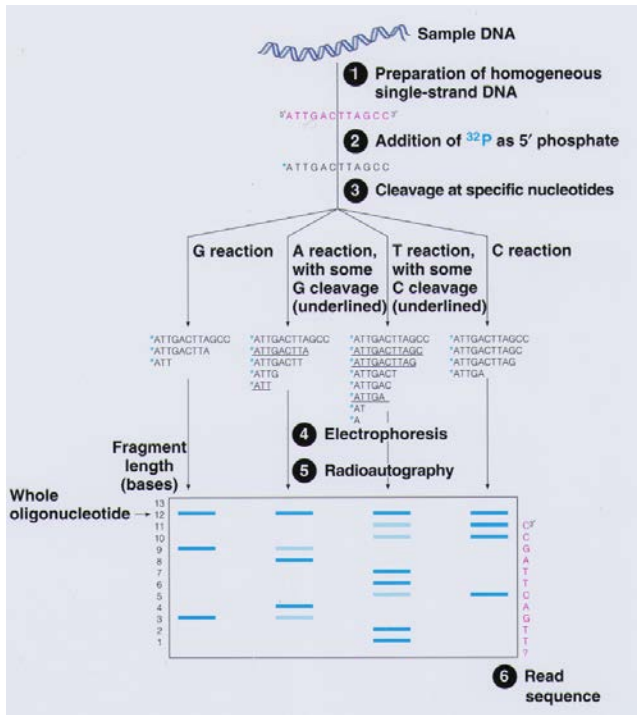
## 2.3 SEKANSLAMA YÖNTEMLERİ

DNA dizi analizi (sekanslama), belirli bir DNA bölgesindeki nükleotid dizisinin belirlenmesidir. 1953 yılında DNA'nın 3 boyutlu yapısının tanımlanmasından sonra, dizi analizinin belirlenmesine yönelik RNA ile yapılan çalışmaları takiben ilk kez Robert Holley tarafından 1965 yılında tRNA molekülünün dizi analizi yapılmıştır. Daha sonra 1977 yılında Allan MAXAM ve Walter GILBERT ile Frederick SANGER tarafından farklı prensiplere dayalı iki farklı DNA dizi analiz yöntemi geliştirilmiştir. 1982 yılında DNA dizi analizinin otomatik cihazlar ile yapılması önerilmiş olup 1985 yılından itibaren otomatik dizi analiz cihazları geliştirilmeye başlanmıştır.

## KLASİK DİZİLEME YÖNTEMLERİ

### 1) Maxam-Gilbert Dizileme Yöntemi

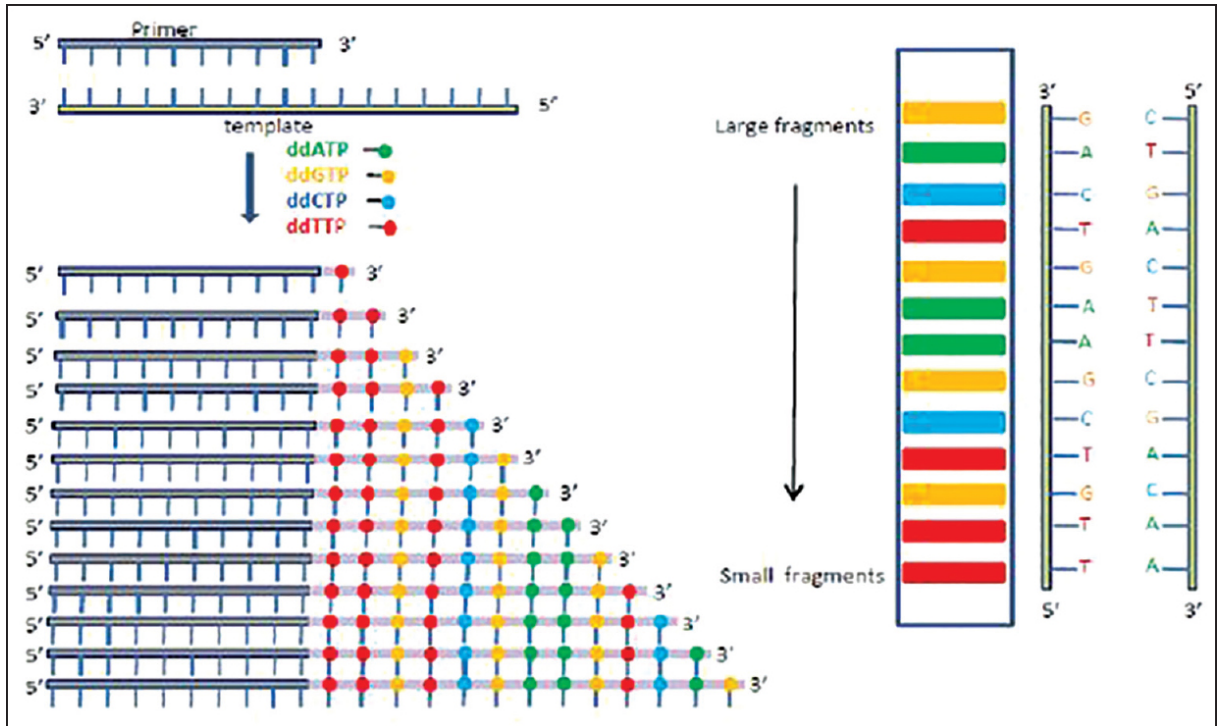
Bu kimyasal yöntem tek zincirli DNA molekülünde bulunan bazların dört ayrı tüpte kendilerine özgü spesifik kimyasal maddeler ile (Dimetil sülfoksit, Hidrazin, Formik asit) değişikliğe uğratılıp, sonrasında piperidin ile zincirin kırılması esasına dayanır. Elde edilen boyları birbirinden farklı işaretli DNA parçacıklarının jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılıp, otoradyografi ile bantları görülerek nükleotid dizileri belirlenir (Şekil 2.16) (Maxam 1977).



Şekil 2.16. Maxam Gilbert Tekniği (Web\_6).

## II) Sanger Dizileme Yöntemi

En yaygın kullanılan ve enzimatik DNA sentezine dayanan bu yöntemde dizisi saptanması istenilen DNA, yeni sentez edilecek DNA zinciri için kalıp görevi görür. Farklı floresanlarla işaretlenmiş modifiye dideoksi nükleotid trifosfatların kullanılması ile sentezlenecek olan bölgenin baz sayısı kadar farklı uzunlukta dizi fragmanlarının elde edilmesi ve bunların jel elektroforezi üzerinde yürütülerek uzunluklarına göre nükleotid dizilerinin belirlenmesi esasına dayanır(Şekil 2.17)(Sanger 1977).



Şekil 2.17. Sanger Zincir Sonlanma Yöntemi(Aliyu 2014).

## 2.NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİLERİ

Günümüze kadar kullanılmış ve kullanılmakta olan dizileme yöntemleri aşağıda gruplanarak verilmiştir. Çalışmamızda kullanılan pyrosekans yöntemi ise irdelenmiştir.

### I)Polonator Sekanslama

### II)454 Genom Sekanslama(pyrosekans)

### III)Illumina (Soleksa) Sekanslama(siklik geriye dönüşümlü sonlandırma ile dizileme)

*IV) SOLİD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) Sekanslama (ligasyon temelli)*

*V) Ion Torrent Sekanslama (Ion semikonduktor)*

### **3. NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİLERİ**

*I) SMR (Single Molecule Real Time Sequencing) Sekanslama (Pacific Biosciences)*

*II) Helicos*

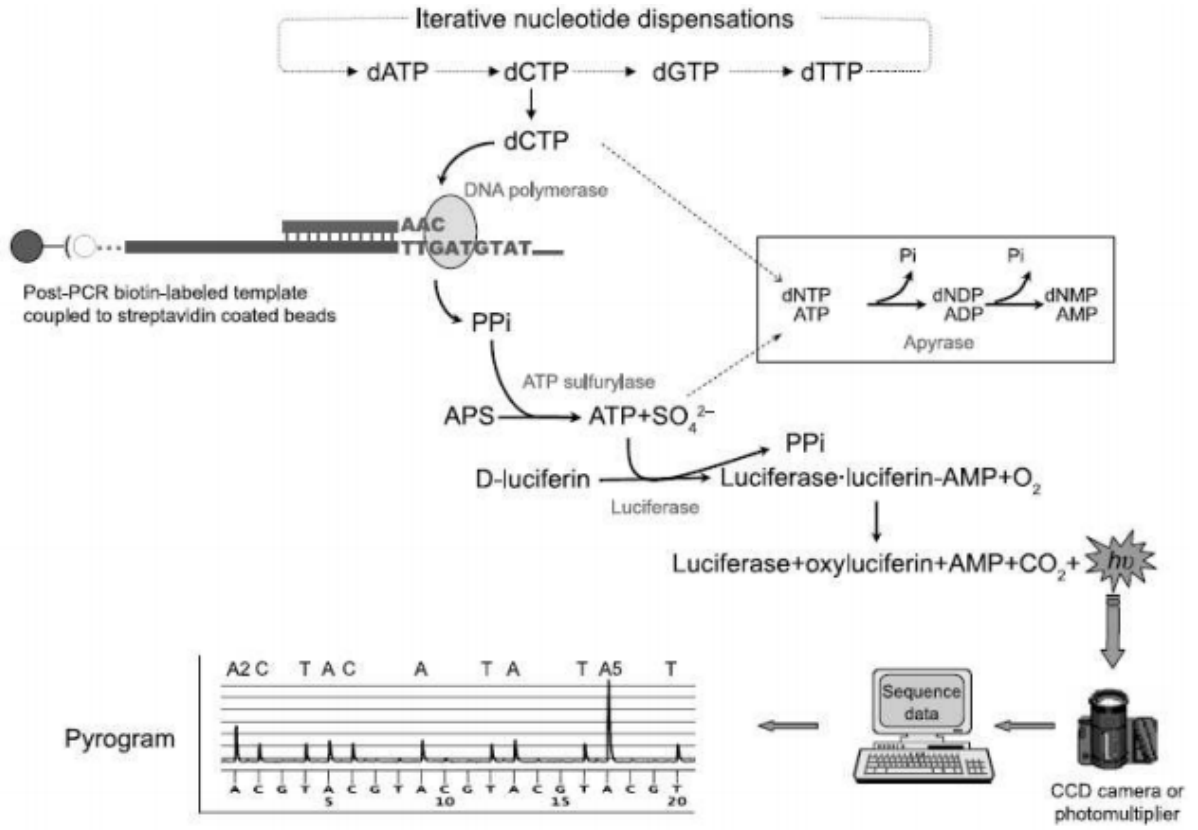
*III) PacBio Real Time Sekanslama*

### **4. NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİLERİ**

*I) Oxford Nanopore*

#### **PYROSEKANS TEKNİĞİ**

Dizilenecek olan DNA'nın tek zincirinin kalıp olarak kullanıldığı tamamlayıcı zincirin sentezine dayalı bir yöntem olan bu teknikte öncelikle dizilenilmesi istenilen DNA bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılır. PCR ile elde edilen biyotin ile işaretli tek sarmallı DNA, sekans primeri ile hibridize edilir ve gerekli enzimler (DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz ve apiraz) ve substratlar (adenozin 5'fosfosülfat (APS) ve lusiferin) ile karıştırılır. Reaksiyon karışımına dört deoksिनükleotid trifosfat (dNTP)'ın ardışık ilavesinden sonra, A, G, C, T nükleotidlerin akışı sırasında kalıp DNA dizisine bağlı sekans primerinin 3' ucuna komplementer nükleotidin gelmesi ve bağlanması sonucu DNA polimeraz ortama inorganik fosfat (PPi) açığa çıkarır. Bu PPi ise ATP sülfürilaz enzim aracılığı ile ortamda bulunan APS ile birleştirilerek kantitatif olarak ATP'ye dönüştürülür. Oluşan ATP ortamdaki lusiferinin lusiferaz enzimi ile oksilusiferine dönüşümünde kullanılır. Bu dönüşüm sırasında ATP miktarı ile orantılı olarak açığa çıkan ışığa CCD kamera ile kaydedilip bilgisayar programları yardımıyla sekans verilerine dönüştürülür. Oluşan ışımalar eklenen nükleotid sayısı ile orantılı olarak seri pikler şeklinde görülür (Şekil 2.18). Bu ışımaların yarattığı sinyalin hangi nükleotidin bağlanması sırasında oluştuğu tespit edilir. Apiraz enzimi ise ortamdaki ATP ve dNTP'leri parçalayarak, ortamı ikinci nükleotidin ilave edilmesine hazırlamış olur (Fakruddin 2012).



Şekil 2.18. Pyrosekans tekniği(Fakruddin 2012).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma tek merkezli olarak Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinde, Göğüs Hastalıkları ve Tıbbi Patoloji bölümlerinin katkılarıyla gerçekleştirildi. Çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 16.01.2015 tarihli 2015/105 karar sayılı Etik Kurul onayı alındı. Çalışmanın yaklaşık 18 ay sürmesi planlandı.

#### 3.1. HASTA SEÇİMİ

Çalışmaya N.E.Ü.M.T.F Göğüs Hastalıkları Kliniğinde 2006-2015 yılları arasında klinik bilgiler ve görüntüleme yöntemleri ile AC CA ön tanısı konulmuş olan, deneyimli bir göğüs hatalıkları uzmanı tarafından bronkoskopi yapılarak, endoskopik olarak görünen lezyonlardan forseps biyopsi örnekleme ile histopatolojik olarak AC kanser tanısı kesinleştirilmiş 81 hasta dahil edildi. Hasta seçiminde yaş ve cinsiyet ayrımı yapılmadı. Çalışma sonuçlanana kadar hastaların histopatolojik tanıları sadece göğüs hastalıkları uzmanı tarafından bilinmekteydi. Genetik bölümü tanılardan haberdar değildi. Hastalarla ilgili bilgiler çalışma tamamlandıktan sonra göğüs hastalıkları uzmanından öğrenildi.

### 3.2.FORMALİN FİKSE EDİLMİŞ PARAFİNE GÖMÜLÜ (FFPE) DOKU ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU

#### ***HEDEF DOKUNUN ELDE EDİLMESİ:***

-Uzman bir patolog tarafından analiz edilerek boyalı preparatlardan kanserli bölge işaretlendi.

-Parafin bloklardan temiz lamlara kesitler alındı.

-Parafine gömülü doku örneklerinin olduğu lamlar parafin dokunun yumuşaması için 75°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı(Şekil 3.1).

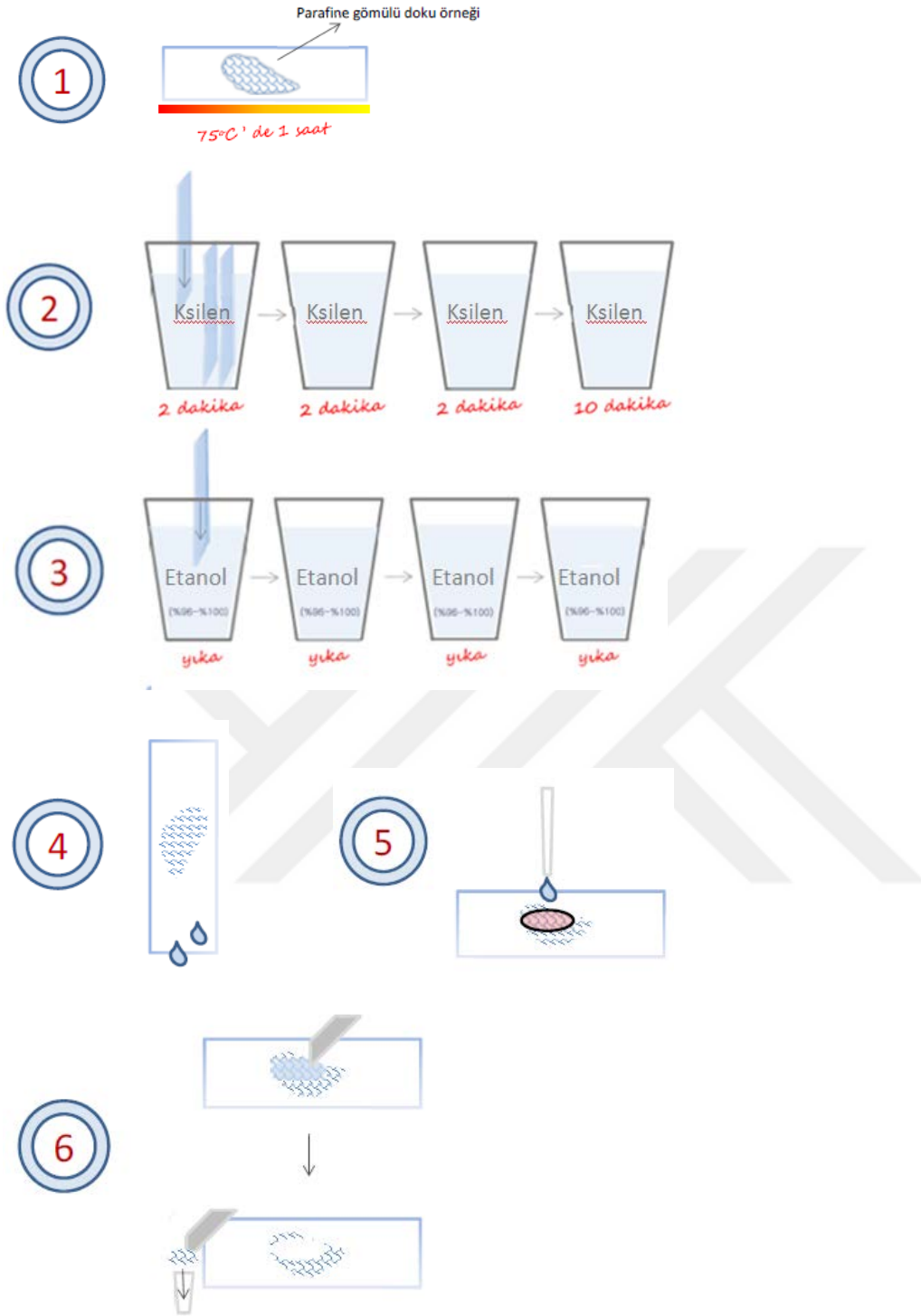
-Süre sonunda, lamlar içlerinde ksilen bulunan dört ayrı şale içerisinde belirli sürelerde bekletildi(2 dk, 2dk, 2 dk, 10 dk)(Şekil 3.1).

-Daha sonra lamlar içlerinde %96-%100 etanol bulunan dört ayrı şalede 10'ar saniye yıkandı(Şekil 3.1).

-Preparatlar kurduktan sonra hedef alan üzerine dokuyu yumuşatmak amacıyla bir damla ultra saf su damlatıldı(Şekil 3.1).

-Daha önceden işaretlenmiş hedef doku bölgeleri steril bistüri ile kazındı ve ependorf tüpler içerisine alındı(Şekil 3.1).

-Her bir hasta dokusunun bulunduğu ependorf tüplere dokuların lizisi için 180 µl ATL tamponu ve 25 µl Proteinaz K eklendikten sonra tüpler iyice vortekslendi ve 56°C'de(O/N) shaker üzerinde 1 gece inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.1. DNA izolasyonu yapılacak dokuların elde edilmesi.

### **DNA İZOLASYONU**

Doku örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp DNA FEPE Tissue Kit (Qiagen,Almanya) kullanılarak manuel olarak yapıldı. Kit içeriği ve miktarları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** DNA izolasyon kiti(QIAamp DNA FEPE Tissue Kit)'nin içeriği

Kitin İçeriği	Miktarlar (50 örnek için)
QIAamp Min Elute Spin Kolonlar	50
Kolleksiyon Tüpler (2 ml'lik)	3x50
ATL Tamponu	14 ml
AL Tamponu	12 ml
AW1 Tamponu (konsantre)	19 ml
AW2 Tamponu (konsantre)	13 ml
ATE tamponu	20 ml
Proteinaz K	1.25 ml

DNA izolasyonuna başlamadan önce AW1 ve AW2 tamponu üretici firmanın belirttiği şekilde sırasıyla 25 ml ve 30 ml %100 etanol ilavesi ile kullanım için hazır hale getirildi. Sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlendi;

-Doku örneklerinin bulunduğu ependorf tüpler 56 °C'de 1 gecelik inkübasyonun ardından 90°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

-Süre sonunda tüp kapaklarının iç tarafındaki damlaları tüpün içine almak için spin yapıldı.

-Tüplere öncelikle 200 µl AL tamponu , ardından 200 µl ethanol(%96-%100) eklendi. 10 saniye vortekslendikten sonra kısaca santrifüj edildi.

-Tüplerin içindeki karışım QIA amp MinElute spin kolonlara aktarıldı. Tüplerin kapağı kapatıldıktan sonra 6000xg(9000 rpm) hızda 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolonun yerleştiği tüpler atıldı. QIA amp MinElute spin kolonlar temiz 2 ml'lik kolleksiyon tüplere yerleştirildi.

-QIA amp MinElute spin kolonlar dikkatlice açıldı ve tüplerin içine 500 µl AW1 tampon eklendi. Tüplerin kapağı kapandıktan sonra 6000xg(9000 rpm) hızda 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolonun yerleştiği tüpler atıldı. QIA amp MinElute spin kolonlar temiz 2 ml'lik kolleksiyon tüplere yerleştirildi.

-QIA amp MinElute spin kolonlar dikkatlice açıldı ve tüplerin içine 500 µl AW2 tampon eklendi. Tüplerin kapağı kapandıktan sonra 6000xg(9000 rpm) hızda 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolonun yerleştiği tüpler atıldı. QIA amp MinElute spin kolonlar temiz 2 ml'lik kolleksiyon tüplere yerleştirildi.

-20,000xg(14,000 rpm) hızda 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolonun yerleştiği tüpler atıldı. QIA amp MinElute spin kolonlar 1.5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirildi.

-QIA amp MinElute spin kolonlar dikkatlice açıldı ve 50 µl ATE tampon kolonların tam ortasına gelecek şekilde ilave edildi. Kolonların kapağı kapatıldı. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 20,000xg(14,000 rpm) hızda 2 dk santrifüj edildi ve DNA izolasyon işlemi tamamlanmış oldu.

-İzolasyon sonrası konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik yöntemle belirlenen DNA örnekleri bir sonraki çalışmaya kadar +4°C'de saklandı.

### 3.3 DNA ÖRNEKLERİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ

İzole edilen DNA'ların mutasyon analizi işlemine geçilmeden önce miktarları spektrofotometre ile ölçüldü. Spektrofotometrik ölçüm için her bir DNA örneğinden 1,5 µl ile Nanodrop 2000 spektrofotometre(Thermo scientific, USA) cihazı kullanıldı(Şekil 3.2). Spektrofotometrik ölçüm DNA'nın 260 nm dalga boyunda sahip olduğu absorpsiyon(OD, optik yoğunluk) değeri, proteinler için dalga boyu olan 280 nm'deki absorpsiyon değerine oranladı( $OD_{260}/OD_{280}$ ). Bu oran saf DNA için 1,8-2,0 arasında olmalıdır. 230 nm'de görülen absorpsiyon ise ortamda bulunan karbonhidratlar, peptidler gibi maddeler ile kontaminasyona işaret eder. Saf örneklerde  $OD_{260}/OD_{230}$  oranı yaklaşık 2,2 olmalıdır. Bu değerlendirme kriterleri esas alınarak DNA miktarları değerlendirildi.



**Şekil 3.2.** DNA ölçümleri için kullanılan Nanodrop 2000 spektrofotometre(Thermo scientific) cihazı.

### 3.4.DNA ÖRNEKLERİNDEN PYROSEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE MUTASYON ANALİZİ

KRAS geninin kodon 12,13 ve 61'ine yönelik mutasyonların belirlenmesi için KRAS Pyro Kit(Qiagen,Almanya), KRAS ve NRAS genlerinin 59,117 ve 146. kodonlarına yönelik mutasyonların belirlenebilmesi için ise RAS Extension Pyro Kit(Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Kitlerin içeriği ve miktarları Tablo 3.2 ve 3.3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.2** KRAS kitinin içeriği.

<b>Kitin içeriği</b>	<b>Miktarlar (24 örnek için)</b>
Sekans Primeri Kras 12/13	24 µl
Sekans Primeri Kras 61	24 µl
PCR Primeri Kras 12/13	24 µl
PCR Primeri Kras 61	24 µl
PyroMark PCR master mix, 2x	850 µl
CoralLoad konsantre, 10x	1,2 ml
Su	3x1,9 ml
Unmetile kontrol DNA, 10 ng/µl	100 µl
<b>Tamponlar ve Reaktifler</b>	
Bağlanma tamponu	10 ml
Anneling tamponu	10 ml
Denatürasyon solüsyonu	250 ml
Yıkama tamponu, 10x	25 ml
Enzim karışımı	1 şişe
Substrat karışımı	1 şişe
dATPαS	1180 µl
dCTP	1180 µl
dGTP	1180 µl
dTTP	1180 µl

**Tablo 3.3.**Ras Extansiyon kitinin içeriği.

<b>Kitin içeriği</b>	<b>Miktarlar (24 örnek için)</b>
Sekans Primeri Kras 59	24 µl
Sekans Primeri Kras 117	24 µl
Sekans Primeri Kras 146	24 µl
Sekans Primeri Nras 59	24 µl
Sekans Primeri Nras 117	24 µl
Sekans Primeri Nras 146	24 µl
PCR Primeri Kras 59	24 µl
PCR primeri Kras 117	24 µl
PCR primeri Kras 146	24 µl
PCR primeri Nras 59	24 µl
PCR primeri Nras 117	24 µl
PCR primeri Nras 146	24 µl
PyroMark PCR master mix, 2x	3x850 µl
CoralLoad konsantre, 10x	1,2 ml
Su (H <sub>2</sub> O)	5x1,9 ml
Unmetile kontrol DNA, 10ng/µl	100 µl
<b>Tamponlar ve Reaktifler</b>	
Bağlanma tamponu	2x10 ml
Anneling tamponu	2x10 ml
Denatürasyon solüsyonu	2x250 ml
Yıkama tamponu, 10x	2x25 ml
Enzim karışımı	2 şişe
Substrat karışımı	2 şişe
dATPαS	2x1180 µl
dCTP	2x1180 µl
dGTP	2x1180 µl
dTTP	2x1180 µl

### ***DNA AMPLİFİKASYONU***

KRAS VE NRAS genlerinin mutasyon analizi için hedef bölgeler PCR ile çoğaltıldı. PCR işlemine başlamadan önce daha önceden izole edilen ve +4°C’de saklanan DNA örnekleri

ile -20°C'de saklanan PCR kiti(PCR Master Mix, PCR primerleri, konsantre CoralLoad) oda sıcaklığına çıkartıldı. Erimeleri sağlanan PCR kiti bileşenleri homojenizasyonun sağlanması amacıyla vortekslendi. Her birinden belirli miktarlarda alınarak PCR ile çoğaltılacak DNA örnek sayısına göre reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı için kullanılan miktarlar Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.4.** KRAS 12/13, KRAS 61, KRAS 59, KRAS117, KRAS 146, NRAS 59, NRAS 117, NRAS 146 için ayrı ayrı hazırlanan her bir reaksiyon karışımı için kullanılan bileşenler ve miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar (Bir örnek için)</b>
PCR Master Mix	12,5 µl
CoralLoad Konsantre, 10x	2,5 µl
PCR primer KRAS 12/13 veya PCR primeri KRAS 61 veya PCR primeri KRAS 59 veya PCR primeri KRAS 117 veya PCR primeri KRAS 146 veya PCR primeri NRAS 59 veya PCR primeri NRAS 117 veya PCR primeri NRAS 146	1 µl
H2O	4 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

Hazırlanan reaksiyon karışımı kısa santrifüje tabi tutularak homojenize edildikten sonra kit içerisinde çıkan kontrol ve her bir örnek için hazırlanmış olan 0,2 ml'lik PCR tüplerine 20 µl reaksiyon karışımı konuldu. Daha sonra bu karışıma pipetajlanmış DNA örneklerinden ve wild tip kontrol DNA örneğinden 5 µl ilave edildi(Tablo 3.5).

**Tablo 3.5.** PCR tüplerinin içeriği.

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Reaksiyon karışımı	20 µl
Örnek DNA	5 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan PCR tüpleri tüketici firmanın talimatlarına göre oluşturulan döngü protokolüne uygun programda ısı-döngü cihazı(Thermocycler)(Sensoquest Labcyclers)'na konuldu(Şekil 3.3)(Tablo 3.6).



Şekil 3.3. PCR için kullanılan ısı-döngü cihazı(Sensoquest Labcyclers).

Tablo 3.6 Optimize edilmiş PCR döngüsü protokolü

<b>Aktivasyon basamağı</b>	15 dakika	95°C
<b>3 Aşamalı Döngü</b>		
Denatürasyon	20 saniye	95°C
Bağlanma	30 saniye	60°C
Uzama	20 saniye	72°C
Döngü sayısı	42	
<b>Son uzama</b>	5 dakika	72°C

### ***PURİFİKASYON VE SEKANSLAMA***

-PCR işlemi bittikten sonra PCR ile elde edilen ampliconların streptavidin ile immobilizasyonu, sonrasında ise sekanslama işlemi gerçekleştirildi.

- Sekanslama için PyroMark Q24(QIAGEN) sekanslama cihazı kullanıldı(Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Sekanslama için kullanılan PyroMark Q24 cihazı.

-Öncelikle gerekli tüm reaktifler ve solüsyonlar oda sıcaklığına çıkarıldı.

\*Bağlayıcı Tampon(+4°C)

\*Enzim ve Substratlar(-20°C)

\*Anneling Tampon(+4°C)

\*Nükleotidler(-20°C)

\*Denatürasyon Solüsyonu(+4°C)

\*Sekans primerleri(-20°C)

\*Yıkama tamponu(+4°C)

\*Streptavidin(+4°C)

-Konsantre halde olan yıkama tamponu dilüe edildi(25 ml taponu 225 ml ultra saf su ).

-Vakum istasyonu için %70 Etanol hazırlandı( 35 ml etanole 15 ml saf su)

-Dolaptan çıkarılan streptavidin nazıkçe alt-üst edilerek homojenize edildi(streptavidin asla vortekslenmez).

-Örnek sayısına göre Costar Plate hazırlandı.

-Bağlanma için göre Tablo 3.7'de belirtilen miktarlarda karışım hazırlandı.

**Tablo 3.7** DNA immobilizasyonu için hazırlanan karışımın bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (her bir örnek için)
Bağlanma tamponu	40 µl
Su	28 µl
Streptavidin	2 µl
Toplam	70 µl

-DNA immobilizasyonu için hazırlanan karışımdan Costar Plate'deki her bir kuyucuğa 70 µl dağıtıldı.

-Daha sonra PCR ile elde edilen ürünlerden 10'ar µl eklendi ve her 4 kuyucukta bir alt üst edildi.

- Plate'in üzeri Costar Seal ile kapatıldı.

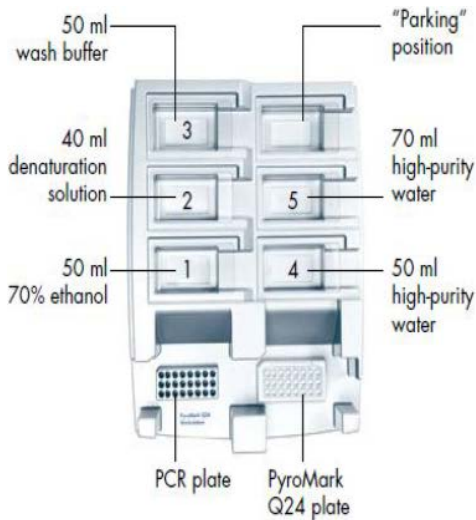
-Costar plate 14000 rpm'de oda sıcaklığında(15-25°C) yaklaşık 10 dakikalığına termo shaker üzerine konuldu(Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Thermo Shaker

- Bu arada vakum istasyonu hazırlandı.

-Vakum istasyonunun 2.bölgesine küvezde bulunan çizgiye kadar denatürasyon solüsyonu(öncesinde çalkalandı), 3. bölgesine daha önceden dilüe edilerek hazırlanan yıkama tamponu, 4 ve 5. bölgelerine ise saf su konuldu(Şekil 3.6)(1. bölgeye konulacak olan etanol uçmaması için sekans primeri karışımının hazırlanmasından sonra konuldu).



Şekil 3.6. Pyromark Vakum istasyonu ve Vakum Filtresi.

- Her bir örnek için Tablo 3.8'te belirtilen miktarlarda sekans primerlerini içeren karışım hazırlandı(Primerler vortekslendi).
- Oda ısısındaki PyroMark Q24 plate holder'ın üstüne PyroMark Q24 plate yerleştirildi ve her bir kuyucuğuna hazırlanan karışımdan 25 µl dağıtıldı.
- Vakum istasyonunun 1. bölgesine daha önceden hazırlanan %70 Etanol konuldu.
- Vakum filtresi park pozisyonundayken vakum açıldı.
- Kuyucuklarında primer karışımı bulunan PyroMark Q24 plate vakum filtresinin sağındaki yerine konuldu.
- Shaker üzerinde bulunan PCR plate vakum filtresinin sol tarafındaki yerine konuldu ve üzerindeki seal açıldı.
- Daha sonra PCR kalıbı içindeki kuyucuklara daldırılan vakum filtresi ile PCR ürünü içeren streptavidinli boncuklar hızlıca filtre uçlarına alınarak tutulmuş oldu.
- İstasyonun etanol bulunan ilk küvezine konulan filtre sıvı akışının görülmesinden 5 sn sonra havaya kaldırıldı.
- Denatürasyon solüsyonunun bulunduğu ikinci küvezde de sıvı akışının görülmesinden sonra 5 sn bekletilen filtre tekrar havaya kaldırıldı ve yıkama tamponunun bulunduğu 3. küveze konuldu ve yine sıvı akışının görülmesinden itibaren 10 sn bekletildi.
- Süre bitiminde havaya kaldırılan ve ters çevrilen filtre 3-4 sn kadar bekletildi, vakum istasyonu kapatıldı.
- İstasyonun sağ tarafına yerleştirilen Pyromark Q24 plate'e konulan filtre ve 15 sn kadar hafif hareketlerle çalkalandı ve böylelikle uçlarında bulunan boncukların sekans primeri içeren kuyucuklara dökülmesi sağlandı.
- Uçlarındaki boncukları dökülen filtre içinde su bulunan 5. küveze konularak biraz sallandı.
- Pyromark Q24 plate 80°C'de ısıtılmış olan plate holder aracılığıyla 2 dk'lığına ısı bloğuna yerleştirildi.
- 5. küvezde bulunan filtre biraz daha sallandıktan sonra yine içinde su bulunan 6.küveze konuldu ve vakum tekrar açıldı. Buradaki tüm su çektirilerek filtrenin temizlenmesi sağlandı. Park ünitesine alındı ve hortumu da temizletildikten sonra vakum istasyonu tekrar kapatıldı.

**Tablo 3.8.** Dizileme için sekans primerlerinin dilüe edilerek hazırlandığı karışım

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar (her bir örnek için)</b>
Anneling tampon	24,2 µl
İlgili sekans primeri (KRAS 12/13 veya KRAS 61 veya KRAS 59 veya KRAS 117 veya KRAS 146 veya NRAS 59 veya KRAS 117 veya KRAS 146 veya)	0,8 µl
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

-Süre sonunda Q24 plate ısı bloğundan alındı ve oda ısısında holder üzerinde 6-10 dk soğumaya bırakıldı.

-Böylelikle tek zincirli hale gelmiş olan biyoinli PCR kalıbı ile sekans primerinin birbirine bağlanması sağlanmış oldu.

- Plate oda sıcaklığında bekletilirken çalışmaya başlamadan önce PyroMark Q24 Software ile hazırlanan bilgisayar programının(Pre-Run Dosyası) olduğu USB PyroMark Q24 cihazına takıldı.

-Kartuş yıkayıp, iyice kurutularak hazır hale getirildi.

-Daha önce oda sıcaklığına çıkarılan nükleotidler çok iyi vortekslendi.

-Analiz edilecek örnek sayısına göre, daha önceden hazırlanmış olan pre-run dosyasının çıktısında belirtilen enzim, substrat ve nükleotidler, filtresiz pipet ucu ve pudrasız eldiven ile kartuştaki ilgili bölmelerine konuldu.

-Kartuş hemen PyroMark Q24 cihazında ilgili bölüme yerleştirildi.

-Soğumaya bırakılmış olan sekans primeri içeren plate de yine cihazda ilgili bölüme yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

-Ortalama dakikada 1 nükleotid okuyan cihaz da sekans işlemi yaklaşık 15-20 dk sürdü.

- Sekans işlemleri tamamlandıktan sonra pyrogram programı ile yapılan sekans analiz edildi.
- Olgulara ait mutasyon analizleri her mutasyon tipi için daha önceden belirlenmiş olan LOD skoru baz alınarak yapıldı(Tablo 3.9)

**Tablo 3.9.** Spesifik mutasyonlar için belirlenmiş LOD skorları(KRAS Pyro® Handbook)

Mutation	LOD (% units)	COSMIC ID* (V42)
<b>Codon 12 (GGT)</b>		
GAT	2.2	521
GTT	1.0 (7 <sup>†</sup> )	520
TGT	2.1	516
AGT	1.9	517
GCT	2.3	522
CGT	1.8	518
<b>Codon 13 (GGC)</b>		
GAC	1.9	532
<b>Codon 61 (CAA), as assayed in reverse orientation (TTG)</b>		
GTG	2.8	554
TAG	3.1	553
TCG	3.5	552
ATG	2.6	555
TTC	3.1	550

### 3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışma sonucu elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi bilgisayar ortamında SPSS 20.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin karşılaştırılmasında T-testi ve  $\chi^2$  testi kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

#### 4.BULGULAR

N.E.Ü. M.T.F. Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalından, histopatolojik olarak AC kanseri tanısı almış, 81 hasta çalışmaya dahil edildi. 16 hastanın parafin bloklarına ulaşamadığı için çalışma 65 hasta ile gerçekleştirildi. DNA izolasyonu yapılan 65 hastadan bir tanesi sekans analizinde verimli sonuç alınamaması nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı. Çalışma 64 hasta ile tamamlandı. Hastaların yaş, cinsiyet, sigara öyküsü ve histopatolojik tanılarına ilişkin bilgiler göğüs hastalıkları uzmanından öğrenildi(Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Çalışmaya dahil edilen hastalara ilişkin bilgiler

No	Ad-Soyad	Cinsiyet	Yaş	Sigara (paket-yıl)	Histopatolojik Tanı
1	Ş.Ü.	E	80	75	Epidermoid karsinom
2	M.Ş.	E	53	80	Epidermoid karsinom
3	İ.K.	E	73	75	Epidermoid karsinom
4	M.E.	E	66	27	Epidermoid karsinom
5	Ş.Y.	E	62	40	Epidermoid karsinom
6	G.Ç.	E	60	40	Epidermoid karsinom
7	K.G.	E	64	110	Epidermoid karsinom
8	A.U.	E	64	90	Epidermoid karsinom
9	A.Y.	E	62	90	Epidermoid karsinom
10	İ.A.	E	53	40	Epidermoid karsinom
11	O.G.	E	58	38	Epidermoid karsinom
12	R.N.	E	67	30	Epidermoid karsinom
13	D.G.	E	62	45	Epidermoid karsinom
14	İ.A.	E	57	80	Epidermoid karsinom
15	A.D.	E	56	40	Epidermoid karsinom
16	A.I.	E	53	35	Epidermoid karsinom
17	H.İ.K.	E	62	90	Epidermoid karsinom
18	H.K.	E	63	90	Epidermoid karsinom
19	Ş.G.	E	69	80	Epidermoid karsinom
20	A.A.	E	63	60	Epidermoid karsinom
21	H.A.	E	61	90	Epidermoid karsinom
22	K.Ö.	E	68	40	Epidermoid karsinom
23	R.E.	E	73	60	Epidermoid karsinom
24	C.Y.	E	68	45	Epidermoid karsinom
25	S.K.	E	42	20	Epidermoid karsinom
26	Y.Z.D.	E	67	130	Epidermoid karsinom
27	Ö.F.B.	E	75	40	Epidermoid karsinom
28	M.Ş.	E	59	43	Epidermoid karsinom
29	Ö.E.	E	65	100	Epidermoid karsinom
30	Ö.L.Y.	E	52	35	Epidermoid karsinom
31	N.D.	E	43	25	Epidermoid karsinom
32	S.B.	E	68	45	Epidermoid karsinom
33	A.K.	E	63	40	Epidermoid karsinom
34	A.Ö.	E	59	35	Epidermoid karsinom
35	K.O.	E	41	40	Epidermoid karsinom
36	D.K.	E	57	0	Adenokarsinom
37	K.G.	E	57	43	Adenokarsinom
38	A.O.B.	E	64	44	Adenokarsinom
39	A.A.	E	65	50	Adenokarsinom
40	İ.D.	E	64	25	Adenokarsinom

41	Y.A.Ö.	E	50	60	Adenokarsinom
42	O.T.	E	74	60	Adenokarsinom
43	S.B.	E	67	40	Adenokarsinom
44	M.E.S.	E	48	35	Adenokarsinom
45	İ.Ç.	E	68	50	Adenokarsinom
46	Y.C.K.	K	67	108	Adenokarsinom
47	K.C.	E	53	5	Pleomorfik karsinom
48	H.T.B.	E	56	48	Büyük hücreli karsinom
49	Y.K.	E	57	80	KHAK
50	N.K.	E	59	70	KHAK
51	C.E.	E	61	30	KHAK
52	E.G.	E	72	50	KHAK
53	M.B.	E	46	20	KHAK
54	M.Y.	E	59	20	KHAK
55	R.A.	E	74	54	KHAK
56	H.G.	K	44	30	KHAK
57	M.P.	E	53	50	KHAK
58	M.S.	E	67	47	KHAK
59	İ.T.	E	84	55	KHAK
60	R.K.	E	72	100	KHAK
61	K.Ö.	E	60	36	KHAK
62	Ö.F.D.	E	65	52	KHAK
63	İ.K.	E	67	50	KHAK
64	İ.K	E	67	50	KHAK

### 3.1. Çalışmaya ilişkin bulgular

Çalışmaya dahil edilen toplam 64 hastanın, AC kanserlerinde mutasyona uğrayan KRAS genindeki en sık mutasyonunun gözlendiği 12,13,61. kodonlarına ilaveten KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonlarındaki mutasyon durumu değerlendirildi. Bütçe yetersizliği nedeniyle hastaların NRAS geni 12, 13 ve 61. kodonlarındaki mutasyon durumu değerlendirilemedi. Hastalar histopatolojik tanılarına göre gruplandırılarak mutasyon durumları karşılaştırıldı(Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6).

Epidermoid karsinomlu olgularda özellikle kodon 12 ağırlıklı olmak üzere KRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonlarında mutasyona sahip olan olgular mevcuttu. 1 olguda hem kodon 12 hem de kodon 61'de mutasyon olduğu gözlendi(Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Epidermoid karsinomlu olguların mutasyon analiz sonuçları

EPİDERMOİD KARSİNOM					
NO	SIK GÖRÜLEN MUTASYONLAR			NADİR GÖRÜLEN MUTASYONLAR	
	KRAS KODON 12	KRAS KODON 13	KRAS KODON 61	KRAS KODON 59,117,146	NRAS KODON 59,117,146
1	<b>GGT&gt;GTT</b>	WT	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT	WT
3	WT	WT	WT	WT	WT
4	WT	WT	WT	WT	WT
5	<b>GGT&gt;GTT</b>	WT	WT	WT	WT
6	WT	WT	WT	WT	WT
7	WT	WT	WT	WT	WT
8	WT	WT	WT	WT	WT
9	WT	WT	WT	WT	WT
10	WT	WT	WT	WT	WT
11	WT	WT	WT	WT	WT
12	WT	WT	WT	WT	WT
13	WT	<b>GGC&gt;GAC</b>	WT	WT	WT
15	WT	WT	WT	WT	WT
15	WT	WT	WT	WT	WT
16	WT	WT	WT	WT	WT
17	WT	WT	WT	WT	WT
18	<b>GGT&gt;GTT</b>	WT	WT	WT	WT
19	WT	WT	WT	WT	WT
20	WT	WT	WT	WT	WT
21	WT	WT	WT	WT	WT
22	WT	WT	WT	WT	WT
23	WT	WT	WT	WT	WT
24	WT	WT	<b>CAA&gt;CTA</b>	WT	WT
25	WT	WT	WT	WT	WT
26	<b>GGT&gt;AGT</b>	WT	WT	WT	WT
27	WT	WT	WT	WT	WT
28	<b>GGT&gt;GTT</b>	WT	<b>CAA&gt;CTA</b>	WT	WT
29	WT	WT	WT	WT	WT
30	WT	WT	WT	WT	WT
31	WT	<b>GGC&gt;GTC</b>	WT	WT	WT
32	WT	WT	WT	WT	WT
33	WT	WT	WT	WT	WT
34	WT	WT	WT	WT	WT
35	WT	WT	WT	WT	WT

\*WT: wild type

Adenokarsinomlu olgularda gözlenen mutasyonların tamamı KRAS geni 12. kodonda idi(Tablo 4.3).

**Tablo 4.3** Adenokarsinomlu olguların mutasyon analiz sonuçları.

ADENOKARSİNOM					
NO	SIK GÖRÜLEN MUTASYONLAR			NADİR GÖRÜLEN MUTASYONLAR	
	KRAS KODON 12	KRAS KODON 13	KRAS KODON 61	KRAS KODON 59,117,146	NRAS KODON 59,117,146
36	GGT>GAT	WT	WT	WT	WT
37	GGT>TGT	WT	WT	WT	WT
38	WT	WT	WT	WT	WT
39	GGT>GTT	WT	WT	WT	WT
40	GGT>GCT	WT	WT	WT	WT
41	GGT>TGT	WT	WT	WT	WT
42	GGT>GAT	WT	WT	WT	WT
43	GGT>GCT	WT	WT	WT	WT
44	WT	WT	WT	WT	WT
45	WT	WT	WT	WT	WT
46	GGT>GTT	WT	WT	WT	WT

Çalışmaya dahil edilen olgulardan bir tanesinin pleomorfik karsinom olduğu ve KRAS geninin 12. kodonunda mutasyona sahip olduğu görüldü(Tablo 4.4, Şekil 4.6).

**Tablo 4.4.** Pleomorfik karsinomlu olgunun mutasyon analiz sonuçları

PLEOMORFİK KARSİNOM					
NO	SIK GÖRÜLEN MUTASYONLAR			NADİR GÖRÜLEN MUTASYONLAR	
	KRAS KODON 12	KRAS KODON 13	KRAS KODON 61	KRAS KODON 59,117,146	NRAS KODON 59,117,146
47	GGT>GTT	WT	WT	WT	WT

Çalışmaya dahil edilen olgulardan bir tanesinin büyük hücreli karsinom olduğu ancak herhangi bir mutasyona sahip olmadığı görüldü(Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Büyük hücreli karsinomlu olgunun mutasyon analiz sonuçları

UNDİFERANSİYE BÜYÜK HÜCRELİ KARSİNOM					
NO	SIK GÖRÜLEN MUTASYONLAR			NADİR GÖRÜLEN MUTASYONLAR	
	KRAS KODON 12	KRAS KODON 13	KRAS KODON 61	KRAS KODON 59,117,146	NRAS KODON 59,117,146
48	WT	WT	WT	WT	WT

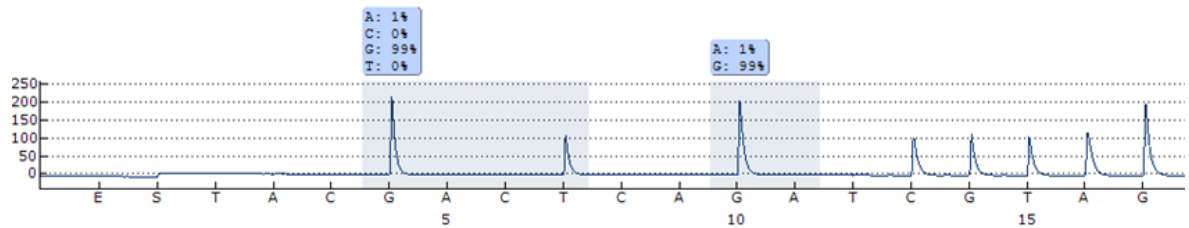
KHAK'li olgulardan 1 tanesinde KRAS geni kodon 12'de, 2 tanesinde kodon 61'de mutasyon gözlemlendi(Tablo 4.6). Kodon 61'de mutasyonu olan olgulardan birinin çift mutasyona sahip olduğu gözlemlendi(Şekil 4.7).

**Tablo 4.6.** KHAK'li olguların mutasyon analiz sonuçları

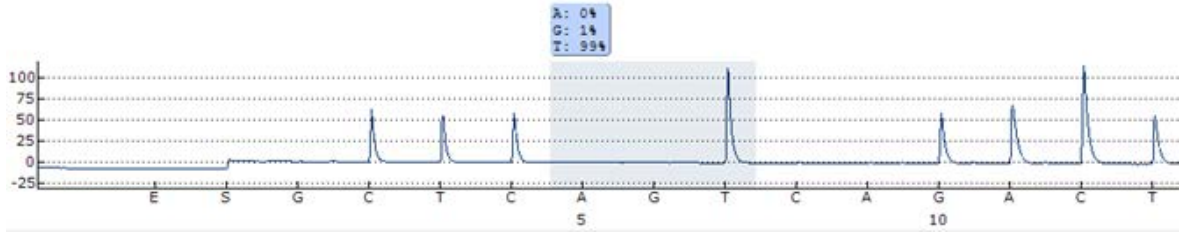
KÜÇÜK HÜCRELİ KARSİNOM					
NO	SIK GÖRÜLEN MUTASYONLAR			NADİR GÖRÜLEN MUTASYONLAR	
	KRAS KODON 12	KRAS KODON 13	KRAS KODON 61	KRAS KODON 59,117,146	NRAS KODON 59,117,146
49	WT	WT	WT	WT	WT
50	WT	WT	WT	WT	WT
51	WT	WT	WT	WT	WT
52	GGT>GTT	WT	WT	WT	WT
53	WT	WT	WT	WT	WT
54	WT	WT	WT	WT	WT
55	WT	WT	WT	WT	WT
56	WT	WT	CAA>CTA+CAC	WT	WT
57	WT	WT	WT	WT	WT
58	WT	WT	WT	WT	WT
59	WT	WT	WT	WT	WT
60	WT	WT	WT	WT	WT
61	WT	WT	CAA>CGA	WT	WT
61	WT	WT	WT	WT	WT
63	WT	WT	WT	WT	WT
64	WT	WT	WT	WT	WT

Çalışmaya dahil edilen olguların hiç birisinde KRAS ve NRAS genlerinin 59,117 ve 146. kodonlarında mutasyon gözlemlenmedi(Şekil 8,9,10,11,12,13).

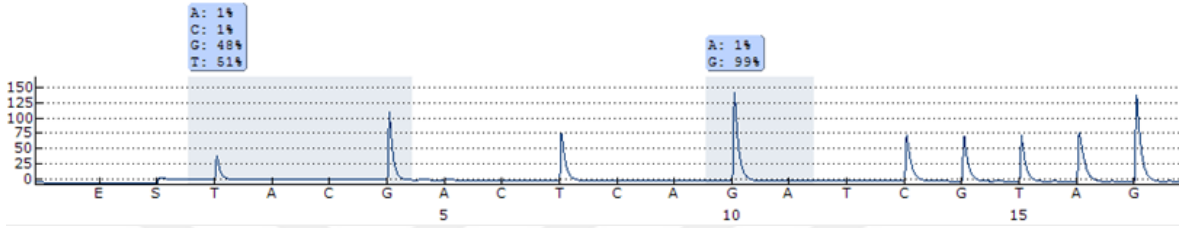
### 3.2 Analiz edilen olgulara ait örnekler



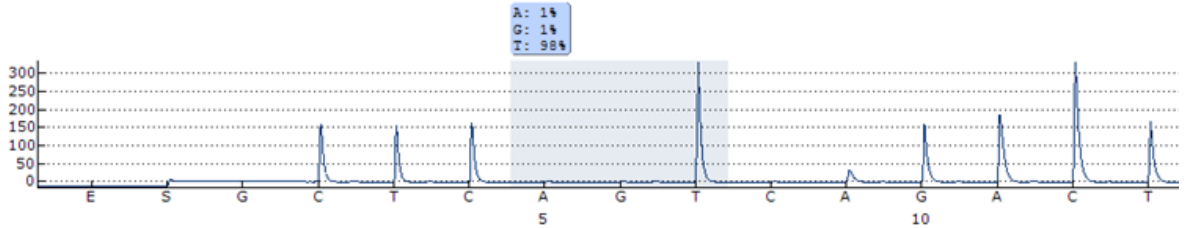
**Şekil 4.1.** KRAS geni 12. ve 13. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(7 nolu olguya aittir).



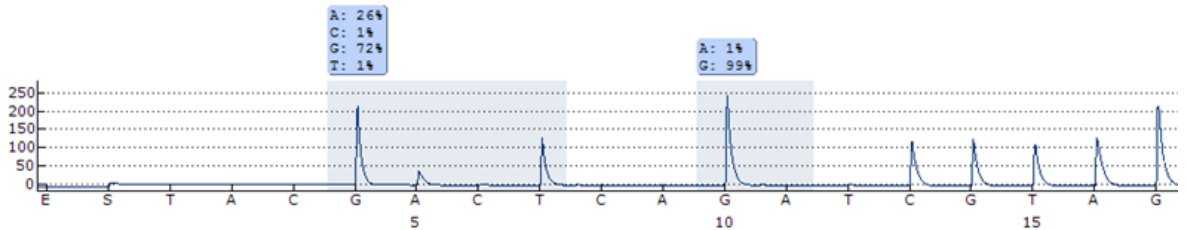
Şekil 4.2. KRAS geni 61. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(15 nolu olguya aittir).



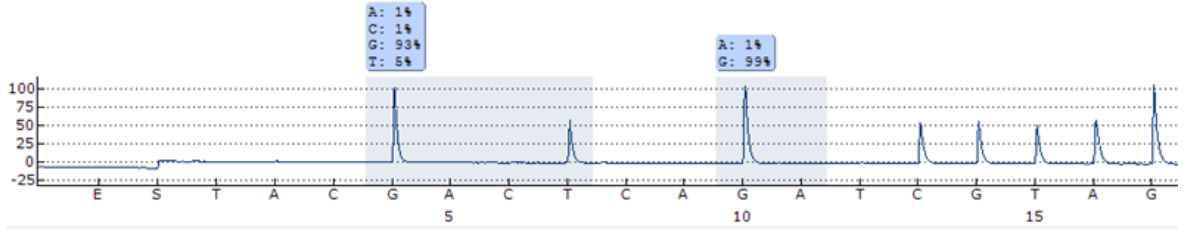
Şekil 4.3. KRAS geni 12. kodonda G12C mutasyonu ve 13. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(41 nolu olguya ait).



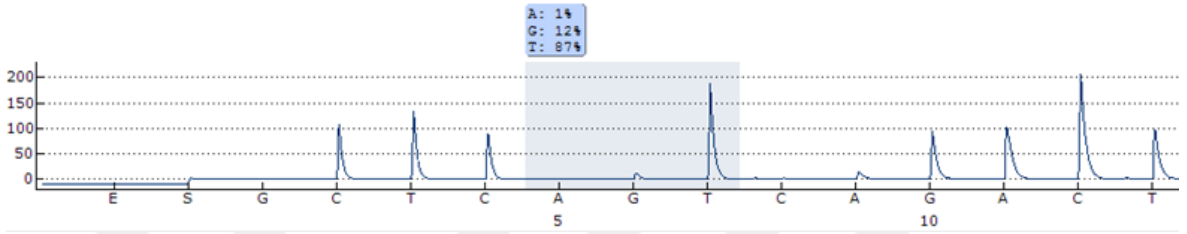
Şekil 4.4. KRAS geni 61. kodonda CAA>CTA mutasyonu(24 nolu olguya aittir).



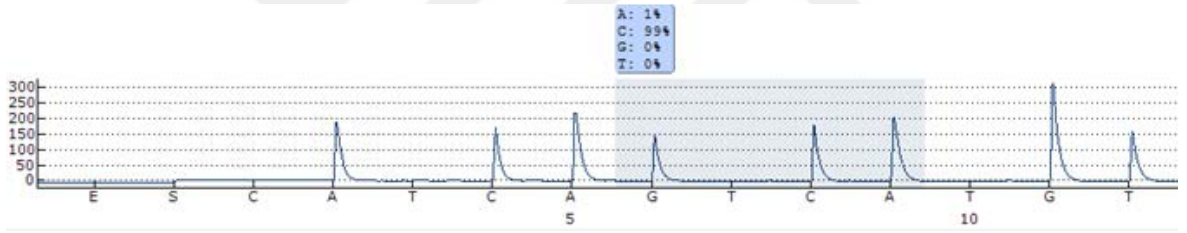
Şekil 4.5. KRAS geni 12. kodonda G12D mutasyonu(36 nolu olguya aittir).



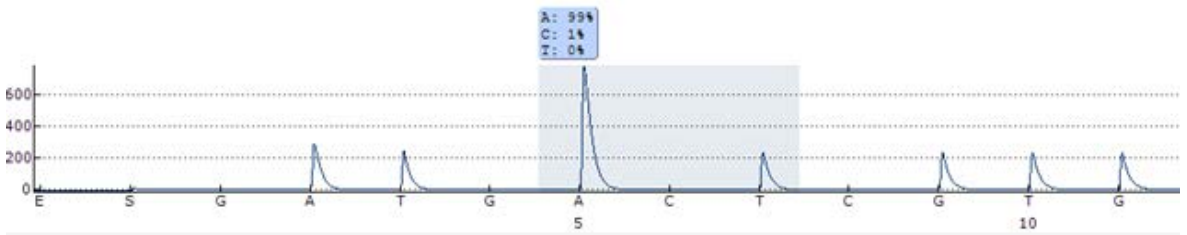
Şekil 4.6. KRAS geni 12. kodonda G12V mutasyonu(47 nolu olguya aittir).



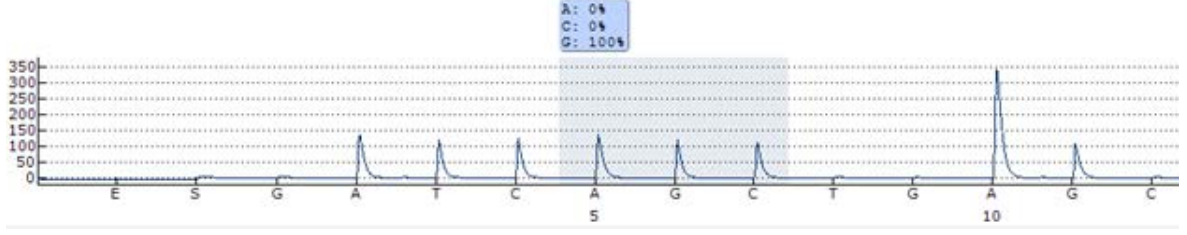
Şekil 4.7. KRAS geni 61. kodonda CAA>CTA ve CAA>CAC mutasyonu(56 nolu olguya aittir).



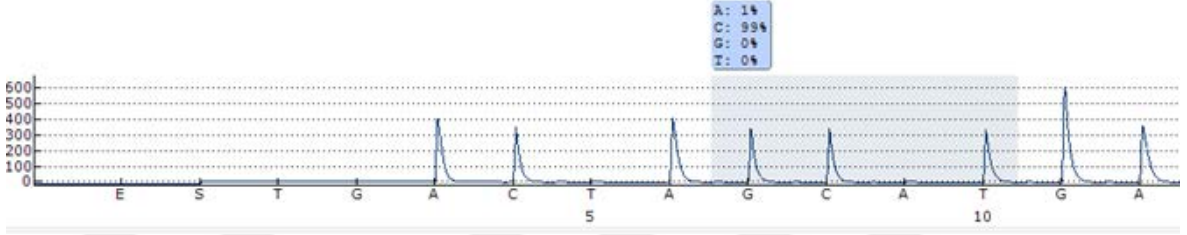
Şekil 4.8. KRAS geni 59. kodonun(GCA) mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(5 nolu olguya aittir).



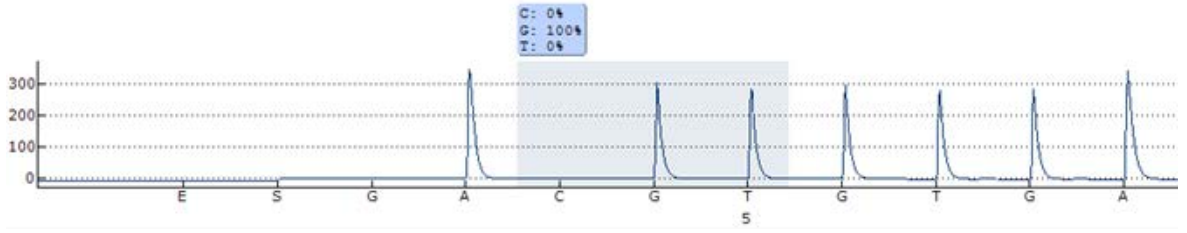
Şekil 4.9. KRAS geni 117. kodonun(AAA) mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(1 nolu olguya aittir).



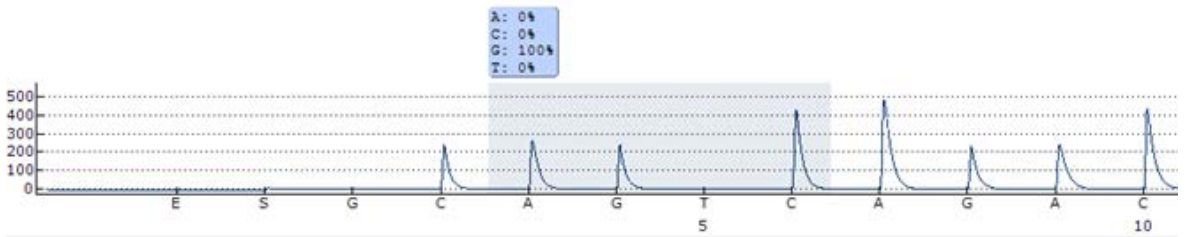
Şekil 4.10. KRAS geni 146. kodonun(GCA) mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(1 nolu olguya aittir).



Şekil 4.11. NRAS geni 59. kodonun(GCT) mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(16 nolu olguya aittir).



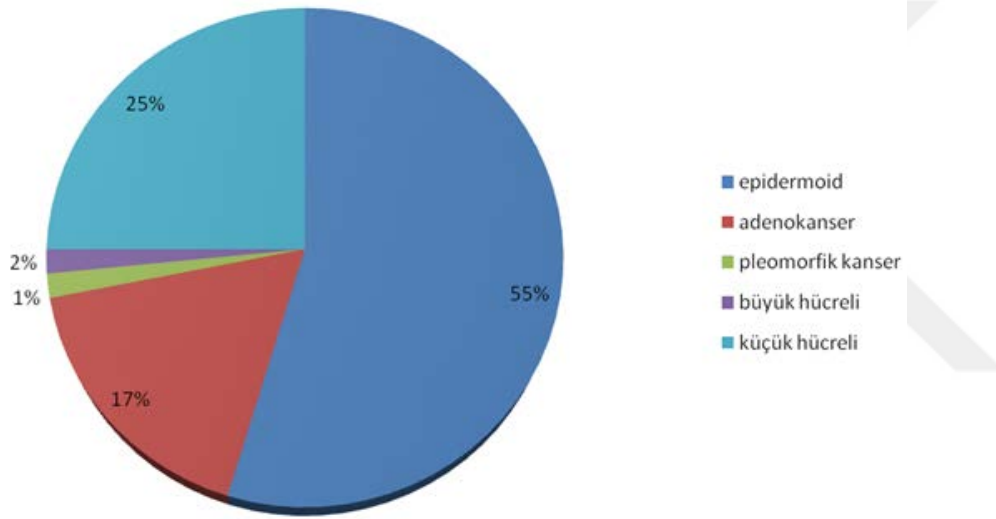
Şekil 4.12. NRAS geni 117. kodonun mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(9 nolu olguya aittir).



Şekil 4.13. NRAS geni 146. kodonun(GCC) mutasyon saptanmayan dizileme grafiği(23 nolu olguya aittir).

### 3.3 İstatistiksel bulgular

Çalışmaya dahil edilen 64 AC kanserli olgunun yaş ortalaması  $61,64 \pm 8,88$ , sigara paket-yıl ortalaması ise  $53,20 \pm 26,41$  idi. Olguların 26'sı(%40,6) 60 yaşından küçük, 38'i(59,4) ise 60 yaşından büyüktü. Olguların 62'si erkek(%96,9), 2'si(%3,1) ise kadındı. Histopatolojik kanser tiplerine bakıldığında 16(%25) olgunun KHAK' i olduğu, 35'i(%54,7) epidermoid karsinom, 11'i(%17,2) adenokarsinom, 1'i(%1,6) büyük hücreli karsinom ve 1'i(%1,6) pleomorfik karsinom olmak üzere toplam 48 (%75) olgunun ise KHDAK' i olduğu gözlemlendi(Şekil 4.14). 64 olgudan 63'ünün(%98,5) sigara içtiği, yalnızca 1(%1,5) tanesinin sigara içmediği belirlendi(Tablo 4.7).



Şekil 4.14. AC kanserli 64 olguya ait histolojik tümör tipleri ve yüzdeleri dağılımları.

**Tablo 4.7.** AC kanserli 64 olgunun klinikopatolojik özellikleri

Parametreler	Hasta Sayısı	%
<b>Yaş</b>		
≤60	26	40,6
>60	38	59,4
<b>Cinsiyet</b>		
Erkek	62	96,9
Kadın	2	3,1
<b>Sigara</b>		
Var	63	98,5
Yok	1	1,5
<b>AC kanser tipi</b>		
Küçük hücreli dışı	48	75,0
Küçük hücreli	16	25,0
<b>KHDAK tipi</b>		
Epidermoid	35	54,7
Adenokanser	11	17,2
Pleomorfik kanser	1	1,6
Büyük hücreli	1	1,6

Analiz edilen 64 hastanın 20'sinde(%31,2) KRAS geninde mutasyon tespit edildi. Tespit edilen mutasyonlar 14 olguda kodon 12'de, 2 olguda kodon 13'te, 3 olguda kodon 61'de ve 1 olguda ise hem kodon 12'de hem de kodon 61'de idi(Tablo 4.8). Kodon 12'de görülen 15 mutasyonun en sık(8/15) G12V mutasyonu olduğu tebit edilirken, 2'sinin G12D, 2'sinin G12C, 2'sinin G12A ve 1'inin ise G12S mutasyonu olduğu belirlendi.

**Tablo 4.8.** AC kanserli 64 olguda tespit edilen mutasyonların dağılımı

MUTASYON DAĞILIMLARI	Hasta Sayısı	%
Mutasyon yok	44	68,8
Kodon 12'de mutasyon	14	21,9
Kodon 13'te mutasyon	2	3,1
Kodon 61'de mutasyon	3	4,7
Kodon 12 ve 61'de mutasyon	1	1,5

60 yaş üstü 12 olgu (%31,6) ve 60 yaş altı 8 olguda (%30,8) mutasyon gözlenirken, 60 yaş üstü 26 olgunun (%68,4) ve 60 yaş altı 18 olgunun (%60,2) mutasyon taşımadığı görüldü. Olguların yaşları ve mutasyonların varlığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi(Tablo 4.9).

**Tablo 4.9.** Olguların yaşları ile mutasyon oranlarının karşılaştırılması

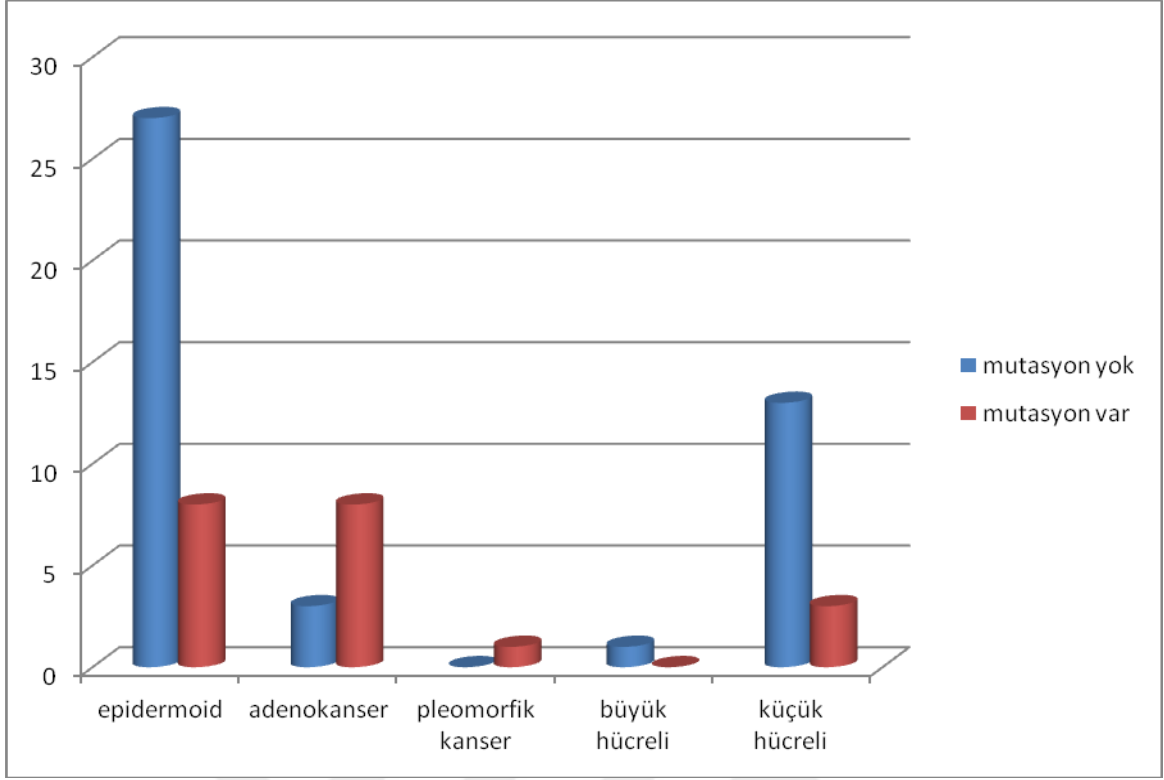
Yaş	Mutasyon Yok Hasta Sayısı (%)	Mutasyon Var Hasta Sayısı (%)	p
≤60	18 (69,2)	8 (30,8)	0,945
>60	26 (68,4)	12 (31,6)	

Mutasyon tespit edilen 20 AC kanserli olgunun 17'sinin(17/48) KHDAK'i, 3'ünün(3/16) ise KHAK'i olduğu tespit edildi. KHDAK'li olgulardaki mutasyon oranının(%35,4) daha fazla olmasına rağmen KHAK'li olgulardaki mutasyon oranı(%18,8) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmedi(Tablo 4.10)

**Tablo 4.10.** KHDAK ile KHAK'inde görülen mutasyon oranlarının karşılaştırılması

Kanser Tipi	Mutasyon Yok Hasta Sayısı (%)	Mutasyon Var Hasta Sayısı (%)	p
KHDAK	31(64,6)	17(35,4)	0,213
KHAK	13(81,2)	3 (18,8)	
<b>Toplam</b>	44 (68,8)	20(31,2)	

KHDAK'li olgulardaki mutasyonlara bakıldığında ise 17 mutasyondan 8'inin adenokarsinomlu olgularda(8/11), 8'inin epidermoid karsinomlu olgularda(8/35), 1 tanesinin ise pleomorfik karsinomlu olguda(1/1) olduğu belirlendi(Şekil 4.15). Adenokarsinomlu olgularda gözlenen mutasyon oranı(%72,7) ile epidermoid karsinomlu olgularda gözlenen mutasyon oranı(%22,9) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi(Tablo 4.11).



Şekil 4.15. AC kanserli 64 olgudaki mutasyon miktarlarının dağılımı

Tablo 4.11. Epidermoid karsinom ile Adenokarsinomda görülen mutasyon oranlarının karşılaştırılması

Kanser Tipi	Mutasyon Yok Hasta sayısı (%)	Mutasyon var Hasta sayısı (%)	p
Epidermoid karsinom	27 (77,1)	8 (22,9)	0,008
Adenokarsinom	3 (27,3)	8 (72,7)	
<b>Toplam</b>	30 (65,2)	16 (34,8)	

## 5.TARTIŞMA

Hücre büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunu ya da fonksiyonunu etkileyen hücre genomundaki değişiklikler kanserin ana nedeni olarak kabul edilmektedir(Bos 1989). İnsan tümörlerinde sıklıkla mutasyonu tespit edilmiş gen ailelerinden ilki ras onkogen ailesidir. Ras onkogenleri malign tümörlerin yaklaşık 30'unda aktive olmaktadır ve NRAS(%8) ve HRAS(%3) ile karşılaştırıldığında en sık KRAS(%22) gen lokusu etkilenmektedir(Prior 2012).

İnsan tümörlerinde tespit edilen KRAS gen mutasyonları %98 oranında kodon 12 ve 13'te görülmekte iken, kodon 61 mutasyonları oldukça nadirdir. NRAS mutasyonlarının ise %60'ı kodon 61'de, %30'u ise kodon 12'de görülmektedir(Prior 2012).

Akciğer kanserlerinde ise KRAS mutasyonlarının varlığı özellikle KHDAK'lerinde ve %20-30 oranında bildirilmiştir (Aviel-Ronen 2006). Histolojik alt tiplere göre mutasyon sıklığı değişmekle birlikte AC adenokarsinomlarında %22-34, skuamöz hücreli karsinomda %0-25, büyük hücreli karsinomda %8-33, adenoskuamöz hücreli karsinomda ise %8-11 oranında mutasyon varlığı bildirilmiştir(Aviel-Ronen 2006).

Literatürde KHDAK'lerinde KRAS mutasyon sıklığını değerlendiren bir çok çalışma mevcuttur. Ancak bu çalışmalarda özellikle KRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonları değerlendirilmiş olup, KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonlarını içeren geniş çaplı bir araştırma yapılmamıştır. Kolorektal kanserlerde yapılan çalışmalarda ise 12.,13. ve 61. kodonların yanı sıra diğer kodonlardaki mutasyon varlığının tirozin kinaz inhibitörleri ile yapılan tedaviye yanıtta heterojeniteyi açıklayabileceği öngörülmüştür(Hecht 2015). Kolorektal kanserlerde olduğu gibi KHDAK olgularında da KRAS geninde mutasyon varlığı tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç ile ilişkilendirilmiştir(Pao 2005, Krypuy 2006). KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonlarının akciğer kanserlerinde ilk kez değerlendirildiği bu çalışmada, bu bölgelerde herhangi bir mutasyon tespit edilmemesi, AC kanserlerinde 12., 13. ve 61. kodonların değerlendirilmesinin klinik izlemde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde yeterli olacağını göstermektedir.

Mao ve ark. yaptıkları bir meta analiz çalışmasında 1470 KHDAK'li olgunun 231'inde(%16) KRAS mutasyon varlığını göstermişlerdir. Mutasyon durumu histolojik alt tiplere göre kıyaslandığında adenokarsinomlu olgularda(%26) diğer histolojik alt tiplere (%16) göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir(Mao 2009).

Sarkar ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise 55 KHDAK'li olgunun 10 tanesinde(%18) KRAS geninin 12. kodonunda mutasyon saptanmıştır. Mutasyonların tamamı adenokarsinomlu olgularda(%33) gözlenmiş olup yalnızca bir mutasyonun kodon 13'te olduğu gözlenmiştir. 25 skuamöz hücreli olgunun ise hiç birisinde mutasyon gözlenmemiştir(Sarkar 1995).

Sarkar ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 16 skuamöz hücreli karsinom, 11 adenokarsinom ve 6 büyük hücreli karsinomdan oluşan toplam 33 KHDAK olgusu değerlendirilmiş ve 5 olguda(%15,1) KRAS geninde 12. kodonda mutasyon saptanmıştır. Mutasyonlardan 4 tanesinin(%36) adenokarsinomlu olgularda, 1 tanesinin ise büyük hücreli karsinomda olduğu gözlenmekle birlikte skuamöz hücreli karsinomların hiç birisinde mutasyon tespit edilmemiştir. Ayrıca adenokarsinomlu olgulardan bir tanesinin çift mutasyona sahip olduğu gözlenmiştir. Mutasyonların 5'inin G>C transversiyon mutasyonu(4'ü G12R, 1'i G12A), bir tanesinin ise G>A transisyon mutasyonu(G12S) olduğu tespit edilmiştir(Sarkar 2001).

Boch ve ark. tarafından 552 olgu (254 adenokanser, 186 skuamöz hücreli kanser, 79 büyük hücreli kanser, 7 sarkomatoid kanser, 5 adenoskuamöz hücreli kanser, 21 diğer tipler) ile yapılan ve KRAS geninin 12 ve 13. kodonlarının değerlendirildiği çalışmada 73 tanesi kodon 12'de ve 12 tanesi kodon 13'te olmak üzere toplam 85 vakada(%15) mutasyon saptanmıştır. Mutasyonların 67 tanesi(%26,4) adenokanser vakalarında, 5 tanesi(%2,7) skuamöz hücreli olgularda, 11 tanesi(%13,9) büyük hücreli vakalarda, 2 tanesi (%9,5) ise diğer KHDAK vakalarında tespit edilmiştir. En sık görülen mutasyon tipinin ise %34 (29/85) oranı ile G12C olduğu bildirilmiştir(Boch 2013).

Brezilyada yapılmış bir çalışmada, 206 KHDAK'li(168 adenokarsinom ve 38 diğer) vakanın 30'unda (%14.6) KRAS mutasyonu tespit edilmiş. Mutasyonların en sık kodon 12'de G12C(GGT>TGT)(15 olgu, %50) ve G12D(GGT>GAT)(6 olgu, %20) olduğu belirlenmiştir. Mutasyonların 27 tanesi(%16,1) adenokarsinom vakalarında, 3 tanesi(%7,9) ise non-adenokarsinom grubunda tespit edilmiş olup adenokarsinom ve non-adenokarsinom histolojik tip karşılaştırmasında KRAS mutasyon varlığı açısından istatistiksel olarak herhangi bir farklılık gözlenmemiş(Bacchi 2012).

Amerika'da yapılan ve 70 KHDAK(47 adenokanser, 11 skuamöz hücreli kanser, 12 KHDAK) vakasının değerlendirildiği bir çalışmada ise 16 vakada(%22.8) KRAS mutasyonu tespit edilmiş. Mutasyonların 13 tanesi adenokarsinomlu(%27,7) olgularda, 3

tanesi ise KHDAK(%33,3) olgularında gözlenirken, 11 skuamöz hücreli karsinomu olan olguların hiç birisinde mutasyon tespit edilmemiş. Mutasyonlardan 14'ünün(%20) 12. kodonda, 2 tanesinin(%2.8) ise 13. kodonda olduğu belirlenmiş olup 12. kodonda tespit edilen mutasyonların 10 tanesinin GGT>TGT(G12C), 2 tanesinin GGT>GAT(G12D), 1 tanesinin GGT>GCT(G12A), 1 tanesinin ise GGT>GTT(G12V) şeklinde olduğu tespit edilmiş. 13. kodonda tespit edilen her iki mutasyonun GGC>TGC(G13C) dönüşümü olduğu bulunmuştur(Massarelli 2007).

Tam ve ark.'nın 215 adenokarsinom ve 15 skuamöz hücreli karsinomu içeren 241 olgu ile yaptığı bir çalışmada 215 adenokarsinomlu olgunun 21'inde(%9.8) KRAS mutasyonu tespit edilmiş olmakla birlikte skuamöz hücreli karsinoma sahip olguların hiç birinde mutasyon gözlenmemiş. Mutasyonlardan 19'unun(%90,5) 12. kodonda, 2 tanesinin(%9.5) ise 61. kodonda olduğu tespit edilmiş. Kodon 12'de tespit edilen mutasyonlardan 9'unun G12C(%4.2), 7'sinin G12V(%3.3), 2'sinin G12D(%0.9) ve 1'nin G12S(GGT>AGT)(%0.5) mutasyonu olduğu, kodon 61'de saptanan mutasyonların ise 1'nin Q61H(CAA>CAC)(%0.5), diğerinin Q61L(CAA>CAT)(%0.5) mutasyonu olduğu belirlenmiş (Tam 2006).

Do ve ark.'ı KHDAK'li 200 olgu(141 adenokarsinom, 24 büyük hücreli karsinom, 10 skuamöz hücreli karsinom, 25 histolojik olarak sınıflandırılmayan) ile yaptığı çalışmada 22 olguda(%11) kodon 12de, 3 olguda(%1,5) ise kodon 13'te olmak üzere toplam 25 olguda(%12,5) KRAS geninde mutasyon varlığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada mutasyonların histolojik alt tiplere göre dağılımı belirtilmemekle birlikte, mutasyon tiplerinin detaylı analizinde 8'inin(%4) G12C, 7'sinin(%3,5) G12D, 5'inin(%2,5) G12V, 1'inin G12A, 1'inin G12F(GGT>TTT), 2'sinin(%1) G13C ve 1'inin(%0,5) G13V mutasyonu olduğu bildirilmiştir(Do 2008).

Grossi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 265 KHDAK'li(%56 skuamöz hücreli kanser, %44 non-skuamöz hücreli kanser) olgunun 47'sinde(%18) KRAS mutasyonu saptanmış olup, mutasyonların %73 oranında kodon 12'de, %6 oranında kodon 13'te ve % 21 oranında ise kodon 61'de olduğu gözlenmiştir. Kodon 12'de tespit edilen mutasyonların en G12V şeklinde olduğu bildirilmiştir. Özellikle kodon 13 ve 61'de de yüksek oranda mutasyon bulunması skuamöz hücreli kanser vakalarında gözlenen mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir(Grossi 2003).

Keohavong ve ark. 127 adenokarsinom, 37 skuamöz hücreli karsinom ve 9 adenoskuamöz karsinom olmak üzere toplam 173 KHDAK'li olgu ile yaptıkları çalışmada 43 vakada(%24,8) KRAS gen mutasyonu saptamışlar. Mutasyonların 41 tanesinin(%32) adenokarsinomlu olgularda, 1 tanesinin(%2,7) skuamöz hücreli, 1 tanesinin(%11) ise adenoskuamöz hücreli olguda olduğunu tespit etmişler. Mutasyonlardan 40 tanesinin kodon 12de, 2 tanesinin kodon 13te ve 1 tanesinin ise kodon 61 de olduğunu göstermişlerdir(Keohavong 1996).

Zhang ve ark.'nın 102 AC kanserli olguda KRAS mutasyon durumunu değerlendirdikleri çalışmada, 25 vakada(%24) KRAS geninin 12. kodonunda mutasyon tespit etmişlerdir. Mutasyon durumunu kanser alt tiplerine göre değerlendirdiklerinde ise KRAS mutasyonunun skuamöz hücreli 40 vakanın 6'sında(%15), adenokarsinomlu 37 vakanın ise 18'inde(%49) olduğunu tespit etmişlerdir. 22 KHAK'li olgununu ise hiç birisinde mutasyon tespit etmemişlerdir(Zhang 1995).

KHDAK'leri ile ilişkili çalışmalar KRAS mutasyonlarının en sık adenokarsinom histolojik alt tipte görüldüğünü ortaya koymaktadır. Bununla ilişkili olarak literatürde AC adenokarsinomlarında KRAS mutasyon durumunu değerlendiren de bir çok çalışma mevcuttur.

Hollanda'da 122 adenokarsinom olgusu ile yapılan bir çalışmada 46 olguda kodon 12'de, 4 olguda kodon 13'te ve 1 olguda ise kodon 61'de olmak üzere toplam 51 olguda(%42) KRAS mutasyonu tespit edilmiş. Mutasyonların 24'ünün(%47) G12C, 8'inin(%16) G12A, 7'sinin(%14) G12V, 6'sının(%12) G12D, 1'inin(%2) G12R, 3'ünün(%6) G13D, 1'inin(%2) G13C ve 1'inin ise Q61H şeklinde olduğu bildirilmiştir (Stigt 2013).

Japonyada 411 adenokarsinomlu olgu ile yapılan bir çalışmada KRAS mutasyon oranı %8,5 olarak bulunmuştur(Serizawa 2014).

Yapılan çalışmalar KHDAK'li olgularda KRAS mutasyon sıklığının %9 ile %25 arasında değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Adenokarsinomlu olgularda ise bu oranın %10 ile %49 arasında değiştiği görülmektedir(Mao 2009, Sarkar 1995, Sarkar 2001, Boch 2013, Bacchi 2012, Massarelli 2007, Tam 2006, Do 2008, Grossi 2003, Keohavong 1996, Zhang 1995, Stigt 2013, Serizawa 2014). Çalışmamızda genel KRAS mutasyon oranı %31,2 olarak tespit edilmişken hem KHDAK'li olgulardaki mutasyon oranı(%35,4) hem de adenokarsinomlu olgulardaki mutasyon oranı(%72,7) literatüre göre yüksek olarak

bulunmuştur. Bu durum çalışmaya dahil edilen toplam hasta sayısının azlığı ve özellikle adenokarsinomlu olguların toplamda küçük bir grubu oluşması(%17,2) ile ya da mutasyon analizi için kullanılan yöntemin hassasiyeti ile ilişkili olabilir. Ayrıca bir çok çalışmada KRAS geninin yalnızca kodon 12 ya da kodon 12 ve 13 mutasyonları değerlendirilmiştir, çalışmamızda ise bazı olgularda diğer çalışmalarda çalışılmayan kodon 61 mutasyonunun varlığının tespit edilmesi de genel mutasyon oranının literatüre göre yüksek çıkmasına neden olmuş olabilir.

Literatürde özellikle skuamöz hücreli AC kanserlerinde KRAS mutasyon durumunu araştıran az sayıda çalışma vardır.

Vachtenheim ve ark.'ı 117 skuamöz hücreli ve 1 adenoskuamöz hücreli kanser olgusunu içeren 141 AC kanserli(19 adenokarsinom, 4 büyük hücreli karsinom) vaka ile yaptıkları çalışmada 17 vakada(%12) KRAS mutasyonu tespit etmişlerdir. Mutasyonların 14'ünü kodon 12'de, 3'ünü kodon 13'te saptamış olup kodon 61'de hiç mutasyon gözlememişlerdir. Adenoskuamöz ve skuamöz hücreli vakalarda tamamı kodon 12'de olan 9(%8) mutasyon, adenokarsinomlu olgularda kodon12 ya da 13'te olan 7(%37) mutasyon , büyük hücreli karsinomda ise kodon 12'de olan 1 mutasyon tespit etmişlerdir (Vachtenheim 1995).

Kenmotsu ve ark.'nın 129 skuamöz(123 olgu) ve adenoskuamöz(6 olgu) hücreli AC kanseri olgusu ile yaptığı çalışmada KRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonları ile NRAS geninin 61. kodonu değerlendirilmiş olup 5 olguda(%4) KRAS, 1 olguda(%1) NRAS(61.kodonda) mutasyon varlığı gösterilmiştir.

KHDAK'leri ile yapılan çalışmalarda skuamöz hücreli AC kanserlerinde KRAS mutasyon sıklığı %0-%2,7 oranında belirtilmiştir(Sarkar 1995, Sarkar 2001, Boch 2013, Massarelli 2007, Tam 2006, Keohavong 1996). Vachtenheim ve ark.'nın çalışmasında bu oranın %8, Kenmotsu ve ark.'nın çalışmasında %4, Zhang ve ark.'nın çalışmasında ise %15 olduğu gösterilmiştir(Vachtenheim 1995, Kenmotsu 2014, Zhang 1995). Çalışmamızda skuamöz hücreli AC kanserli olgularda mutasyon oranı %22,9 olarak bulunmuştur. Adenokarsinomlu olgulardaki mutasyon oranı(%72,7) ile bu oran karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir (p=0,008).

KRAS gen mutasyonlarının özellikle KHDAK'lerinde sık görülmesi nedeniyle literatürde KHAK'lerinde bu gendeki mutasyon durumunu değerlendiren çalışma sayısı sınırlıdır. Wakuda ve ark.'ı 57 KHAK'i ve 3 adenokarsinom ile kombine KHAK'i olmak

üzere toplam 60 olgu ile yaptığı çalışmada 1 adenokarsinom ile kombine KHAK olgusunda G12D mutasyonu saptamışlardır (Wakuda 2014). Çalışmamızda 16 KHAK'li olgunun 3'ünde KRAS gen mutasyonu saptanmış olup mutasyonlardan 1 tanesi kodon 12'de (G12V), diğer iki tanesi ise kodon 61 'dedir.

Ayrıca kodon 61'de mutasyon saptadığımız iki olgudan birisinde çift mutasyon(CAA>CTA ve CAA>CAT) mevcuttur. Sarkar ve ark'nın KHDAK'li 33 vaka ile yaptıkları çalışmada adenokarsinomlu 1 olguda 12. kodonda çift mutasyon (GGT>CGT ve GGT>GAT) gösterilmiştir(Sarkar 2001).

Olgularımızda tespit ettiğimiz mutasyonlar literatür ile uyumluydu. En sık KRAS geninin 12. kodonunda mutasyon tespit edildi. Sarkar ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada kodon 12'de en fazla G12R mutasyonunu tespit edilmiş olmasına rağmen, çalışmaların çoğunda G12C mutasyonu kodon 12'deki en sık mutasyon tipi olarak belirlenmiştir(Bacchi 2012, Masserelli 2007, Do 2008, Stigt 2013). Tam ve ark.(2006) G12C mutasyonundan sonra 2. sıklıkta G12V mutasyonu tespit etmişlerken, Grossi ve ark.(2003) ise en sık G12V mutasyonu varlığını göstermişlerdir. Kodon 12'deki mutasyon türleri değişiklik göstermekle birlikte çalışmamızda Grossi ve ark.'nin çalışması ile uyumlu olarak en sık mutasyon tipi G12V dir

Ülkemizde AC kanserlerinde KRAS mutasyon sıklığını araştıran çalışma sayısı sınırlıdır. Vatan ve ark. 34 KHDAK'li olguda KRAS geninin 12. kodonundaki mutasyon durumunu değerlendirmişler ve yalnızca 2 olguda (%5,88) mutasyon varlığını göstermişlerdir (Vatan 2007). Bircan ve ark.'nın 25 KHDAK (14 adenokarsinom, 11 skuamöz hücreli karsinom)'li olguda KRAS geninin 12 ve 13. kodonlarındaki mutasyon durumunu değerlendirdiği bir çalışmada ise 5 tanesi kodon 12'de, 1 tanesi kodon 13'te olmak üzere toplam 6 olguda (%24) KRAS mutasyonu tespit edilmiştir. Mutasyonların 3 tanesinin adenokarsinomlu olgularda (%21,4), 3 tanesinin ise skuamöz hücreli olgularda (%27,3) olduğu gösterilmiştir (Bircan 2014). Demirağ ve ark.'nın 21 AC kanserli olguda KRAS geninin 12.kodonunun ilk iki baz çiftinin değerlendirdiği çalışmada 15 olguda (%71,4) mutasyon tespit edilmiştir. Histolojik alt tiplere göre incelendiğinde 11 epidermoid karsinomlu olgunun 7'sinde (%77), 3 adenokarsinomlu olgunun hepsinde (%100), 3 bronşial karsinomlu olgunun 2'sinde (%66) mutasyon varlığını göstermişlerdir (Demirağ 2000).Ülkemizde yapılan çalışma sayısı sınırlıdır KRAS mutasyon sıklığının değişim gösterdiği görülmektedir.

NRAS gen mutasyonları özellikle hematolojik malignansilerde görülmektedir ve en sık 61. kodon etkilenmektedir. AC kanserli hastalarda da özellikle kodon 61'de olmak üzere %0,7 oranında NRAS mutasyonları bildirilmiştir ve AC kanserlerinde KRAS mutasyonları ile birlikte NRAS mutasyonlarının da değerlendirildiği bir takım çalışmalar mevcuttur(Ohashi 2013, Sasaki 2007). Ancak alışmamızda bütçe yetersizliği nedeniyle NRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonlarındaki mutasyon durumu değerlendirilememiştir.

AC kanseri tanısı almış 64 olgu ile yaptığımız çalışmada KRAS geninin 12,13,61. kodonlarına ilaveten KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonlarındaki mutasyon durumu da değerlendirildi ancak hiç mutasyon tespit edilmedi. Ayrıca bu bölgeler için kullanılan primerin dizaynı sayesinde 58, 60, 118, 145 ve 147. kodonlarda değerlendirilmiş oldu ve bu bölgelerde de herhangi bir mutasyon görülmedi. Literatürde kolorektal kanserlerde yapılan çalışmalar mevcut olmakla birlikte, araştırmalarımıza göre AC kanserlerinde bu kodonlardaki mutasyon durumunu değerlendiren çalışma mevcut değildir(Edkins 2006, Janakiraman 2011, Richman 2011). Kolon kanserlerinde retrospektif olarak yapılan çalışmalarda KRAS 59,61,117 ve 146. ve NRAS 12,13,59,61,117 ve 146. kodonları değerlendirildiğinde hastalarda ek ras mutasyonlarının mevcudiyeti gösterilmiştir(Van Cutsem 2015). Hatta bu mutasyonların kemoterapiye cevapta rolü olduğuna dair veriler elde edilmiştir(Douillard 2013). Wang ve ark. 24 KHDAK olgusunda KRAS geni 12, 13 ve 61. kodonla birlikte 59. kodonu değerlendirdikleri çalışmada hiç mutasyon tespit etmemişler(Wang 2008). Çalışmamızda 59,117 ve 146. kodonlarda mutasyon tespit edilmemesi akciğer kanserlerinde bu mutasyonların izlenmediğini ve tedavi açısından bir direnç veya yarar oluşturmadığını göstermiştir.

AC kanserli olgularda KRAS mutasyonlarının geniş spektrumlu değerlendirildiği ilk araştırma olan çalışmamızın daha fazla sayıda vaka içeren çok merkezli çalışmalar için bir referans olacağı ve bulgularımızın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Ras proteinleri, hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla oluşan sinyal iletiminde en önde gelen aracı moleküllerden birisidir. Ras genlerinde görülen mutasyonlar nedeniyle onkojenik aktivasyon bir çok kanser tipinde oldukça sık görülmektedir. Ras genlerinin spesifik kodonlarında görülen nokta mutasyonları, intrinsik GTPaz aktivitesi azalmış proteinlerin oluşumuna neden olur ve sürekli aktif halde kalan bu proteinler de sinyal iletim yolağında kontrolsüz hücre çoğalmasını tetikleyerek kanser gelişimine katkıda bulunur.

Ras genlerinin oldukça sık mutasyona uğradığı kanser türlerinden birisi akciğer kanserleridir. Özellikle KHDAK'lerinde görülmekle birlikte sıklığı ortalama %33 civarındadır ve en sık mutasyona uğrayan gen KRAS genidir. En sık mutasyon görülen bölgeler ise 12, 13 ve 61. kodonlardır. Kras mutasyonları görülen KHDAK'li hastalar EGFR inhibitörlerine de nova dirençlidir. Günümüzde Kras üzerinde uygulanan genetik incelemeler tedaviye yanıtın öngörülmesi ve tedavinin izlenmesinde önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle literatürde AC kanserli olgularda KRAS genine ve bu genin 12,13 ve 61. kodonlarına yönelik çalışmaların oldukça fazla olduğu fakat KRAS geninin diğer bölgelerini değerlendiren ve NRAS genine yönelik çok fazla çalışma olmadığı görülmektedir.

Bu çalışma ile akciğer kanserli hastalarda KRAS geninin 12,13 ve 61. kodonlarına ek olarak KRAS ve NRAS genlerinin 59,117, 146. kodonlarının da değerlendirilmesi amaçlanmıştır ve bulunan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

\* Çalışma bronkoskopik biyopsi sonucu AC kanseri tanısı konulan, histopatolojik alt tipleri yalnızca göğüs hastalıkları uzmanı tarafından bilinen, 64 olguya ait FFPE doku örneği ile gerçekleştirildi. Çalışmada mutasyon analizi için Pyrosekans yöntemi kullanıldı.

\* Çalışmaya dahil edilen olguların 48'inin(%75) KHDAK'i, 16'sının(%25) KHAK'i olduğu belirlendi. KHDAK'li olguların ise 35'inin(%54,7) epidermoid karsinom, 11'inin(%17,1) adenokarsinom, 1'inin(%1,6) pleomorfik karsinom, 1'inin(%1,6) büyük hücreli karsinom olduğu tespit edildi.

\* Olguların 20'sinde(%31,2) KRAS gen mutasyonu tespit edilmiş olup, mutasyon oranının literatürdeki benzer çalışmalara göre yüksek olduğu görüldü.

\* Tespit edilen mutasyonların 17'sinin(%35,4) KHDAK'li olgularda, 3'ünün(%18,8) KHAK'li olgularda olduğu belirlendi. Mutasyon oranları karşılaştırıldığında istatistiksel

olarak anlamlı farklılık saptanmadı. KHAK'li olgularda saptanan mutasyonlardan bir tanesinin 61.kodonda çift mutasyon şeklinde olduğu belirlendi.

\* KHDAK'li olgulardaki mutasyon dağılımına bakıldığında 17 mutasyondan 8'inin adenokarsinomlu olgularda(8/11), 8'inin epidermoid karsinomlu olgularda(8/35), 1 tanesinin ise pleomorfik karsinomlu olguda(1/1) olduğu belirlendi. Adenokarsinomlu olgulardaki mutasyon oranı(%72,7) ile epidermoid karsinomlu olgulardaki mutasyon oranı(%22,9) karşılaştırıldığında, adenokarsinomlu olgulardaki mutasyon oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü(p=0,008). Hem adenokarsinomlu hem de skuamöz hücreli karsinomlu olgularda tespit edilen mutasyon oranının literatüre göre yüksek olduğu görüldü.

\* Mutasyonların literatür ile uyumlu olarak en sık kodon 12'de (15 olgu,%23,4) olduğu tespit edildi. Kodon 12'de görülen 15 mutasyonun en sık (8/15) G12V mutasyonu olduğu saptanırken, 2'sinin G12D, 2'sinin G12C, 2'sinin G12A ve 1'inin ise G12S mutasyonu olduğu belirlendi.

\* Kodon 12'de mutasyonu olan olgulardan 1 tanesinin aynı zamanda kodon 61'de de mutasyona sahip olduğu görüldü.

\* Çalışmaya dahil edilen hiç bir olguda KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonlarında mutasyon tespit edilmedi. Ayrıca bu bölgelerin değerlendirilmesi için kullanılan primer dizaynı sayesinde analiz edilen 58, 60, 118, 145 ve 147. kodonlarda da mutasyon gözlenmedi.

\* Olgularda NRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonlarındaki mutasyon durumu bütçe yetersizliği nedeniyle değerlendirilemedi.

Sonuç olarak çalışmamız AC kanserli olgularda KRAS geninin 12, 13 ve 61. kodonlarına ilaveten KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. kodonlarının değerlendirildiği ilk çalışmadır. KRAS ve NRAS genlerinin 59, 117 ve 146. bölgelerinde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. Bu verilerin, hasta sayısının sınırlı olması ve bu alanda yapılan başka çalışma olmaması nedeniyle, geniş serilerle yapılacak çok merkezli çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

## 7.KAYNAKLAR

- Adjei AA. Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets. *Curr Pharm Des.* 2001 Nov;7(16):1581-94.
- Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013 May;143(5 Suppl):e1S-29S.
- Alberg AJ, Ford JG, Samet JM; American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines(2nd edition). *Chest.* 2007 Sep;132(3 Suppl):29S-55S.
- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S.
- Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer.* 2006 Jul;8(1):30-8.
- Bacchi CE, Ciol H, Queiroga EM, Benine LC, Silva LH, Ojopi EB. Epidermal growth factor receptor and KRAS mutations in Brazilian lung cancer patients. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(5):419-24.
- Barros-Dios JM, Barreiro MA, Ruano-Ravina A, Figueiras A. Exposure to residential radon and lung cancer in Spain: a populationbased case-control study. *Am J Epidemiol* 2002;156(6):548-555
- Batley J, Moulding C, Taub R, et al: The human c-myc oncogene: Structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34:779-787, 1983
- Bircan S, Baloglu H, Kucukodaci Z, Bircan A. EGFR and KRAS mutations in Turkish non-small cell lung cancer patients: a pilot study. *Med Oncol.* 2014 Aug;31(8):87.
- Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis.* 2007 Jul;28(7):1379-86.
- Boch C, Kollmeier J, Roth A, Stephan-Falkenau S, Misch D, Grüning W, et al. The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open.* 2013 Apr 3;3(4).
- Bos JL. ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res.* 1989; 49:4682-89
- Brennan J, O'Connor T, Makuch RW, Simmons AM, Russell E, Linnoila RI, et al. myc family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. *Cancer Res.* 1991 Mar 15;51(6):1708-12.
- Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Dec;1786(2):178-87.
- Carson J, Finley DJ. Lung cancer staging: an overview of the new staging system and implications for radiographic clinical staging. *Semin Roentgenol.* 2011 Jul;46(3):187-93.
- Cefle K. Kanser Genetiği. *Klinik Gelişim* 2009;22(3): 50-59
- Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013 Oct;5 Suppl 5:S479-90.

- Darby SC , Doll R , Gill SK , Smith PG . Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis . *Br J Cancer* .1987;55 (2):179-190.
- Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005 Jan 29;330(7485):223.
- Davis FG , Boice JD Jr , Hrubec Z , Monson RR . Cancer mortality in a radiation-exposed cohort of Massachusetts tuberculosis patients . *Cancer Res* . 1989 ; 49 (21): 6130-6136
- de Vries JE, ten Kate J, Bosman FT. p21 ras in carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 1996 Jul;192(7):658-68.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011 Dec;32(4):605-44.
- Demirag, F., Atalay, E., Criss, W. E. Analysis of K-Ras Oncogene Codon 12 Mutations in as Series of Human Lung Cancers. *Turk J. Med. Sci.*,2000;30: 129-134.
- Detterbeck FC, Tanoue LT, Boffa DJ. Anatomy, biology and concepts, pertaining to lung cancer stage classification. *J Thorac Oncol*. 2009 Apr;4(4):437-43.a
- Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest*. 2009 Jul;136(1):260-71.b
- Devereux TR, Taylor JA, Barrett JC. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. Giles F. Filley Lecture. *Chest*. 1996 Mar;109(3 Suppl):14S-19S.
- Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*. 2008 May 21;8:142.
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66:1191–1308
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jan;3(1):11-22
- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013 Sep 12;369(11):1023-34.
- Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, et al. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2006 Aug;5(8):928-32.
- Fakruddin M, Mazumdar RM, Chowdhury A, Hossain MN, Mannan KS. Pyrosequencing-prospects and applications. *Int J Life Sci Pharma Res* 2012;2:65-7
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
- Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer*. 2011; 2(3):344-358

- Freudenheim, J. L., Ritz, J., Smith-Warner, S. A., Albanes, D., Bandera, E. V., van den Brandt, P. A., et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005;82(3): 657-667.
- Gilbert ES , Cragle DL , Wiggs LD . Updated analyses of combined mortality data for workers at the Hanford Site, Oak Ridge National Laboratory, and Rocky Flats Weapons Plant . *Radiat Res.* 1993;136 (3): 408 - 421
- Ginsberg MS, Grewal RK, Heelan RT. Lung cancer. *Radiol Clin North Am* 2007;45(1):21–43
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
- Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, et al. A. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer.* 2003 Jun;39(9):1242-50.
- Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 May;4(5):373-84.
- Hecht JR, Douillard JY, Schwartzberg L, Grothey A, Kopetz S, Rong A, Oliner KS, Sidhu R. Extended RAS analysis for anti-epidermal growth factor therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015 Sep;41(8):653-9.
- Hendee WR . Estimation of radiation risks. BEIR V and its significance for medicine . *JAMA.* 1992 ; 268 (5): 620-624.
- Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene.* 1992 Mar;7(3):445-9
- Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. High prevalence of bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 1995 Mar-Apr;15(2):503-5.
- Howe GR . Lung cancer mortality between 1950 and 1987 after exposure to fractionated moderate-dose-rate ionizing radiation in the Canadian fluoroscopy cohort study and a comparison with lung cancer mortality in the Atomic Bomb survivors study . *Radiat Res .* 1995;142 (3):295-304.
- İtil O. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. In: Haydaroğlu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2000:15-34.
- Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, Pratlas CA, Taylor BS, Chitale D, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):5901-11.
- Karachaliou N, Mayo C, Costa C, Magrí I, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, et al. KRAS mutations in lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2013 May;14(3):205-14.
- Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jul;9(7):517-31.
- Kenmotsu H, Serizawa M, Koh Y, Isaka M, Takahashi T, Taira T, et al. Prospective genetic profiling of squamous cell lung cancer and adenosquamous carcinoma in Japanese patients by multitarget assays. *BMC Cancer.* 2014 Oct 28;14:786.

- Keohavong P, DeMichele MA, Melacrinis AC, Landreneau RJ, Weyant RJ, Siegfried JM. Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis. *Clin Cancer Res.* 1996 Feb;2(2):411-8.
- Kern JA, Filderman AE. Oncogenes and growth factors in human lung cancer. *Clin Chest Med* 14:31-41, 1993
- Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, Robinson RA. p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res.* 1990 Aug 15;50(16):5184-7.
- Knekt P, Heliövaara M, Rissanen A, Aromaa A, Seppänen R, Teppo L, et al. Leanness and lung-cancer risk. *Int J Cancer.* 1991 Sep 9;49(2):208-13.
- Köktürk, N., Kırıçoğlu, C. E., Öztürk, C. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. *Solunum.* 2003;5(3):127-138.
- Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Nov 25;1756(2):81-2.
- Kratz CP, Niemeyer CM, Zenker M. An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. *J Mol Med (Berl).* 2007 Mar;85(3):227-35.
- Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, Field RW, et al. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology.* 2005 Mar;16(2):137-45.
- Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2006 Dec 21;6:295.
- Kumar V., Cotran RS., Robbins SL. *Basic Pathology.* 7th ed. Saunders; 2000.
- Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med.* 2011 Dec;32(4):703-40
- Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle.* 2008 Aug 15;7(16):2493-9.
- Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):459-65. Erratum in: *Nat Rev Cancer.* 2003 Sep;3(9):708
- Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta analysis of 22 studies. *Lung Cancer.* 2010 Sep;69(3):272-8.
- Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 May 15;13(10):2890-6.
- Maxam, A., Gilbert, W. A new method of sequencing DNA. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1977 Feb;74(2):560-4
- McErlean, A., Ginsberg, M.S., 2011. Epidemiology of lung cancer. *Semin. Roentgenol.* 46, 173–177

- Metintaş S. Akciğer kanseri epidemiyolojisi , İç: Özlü T, Metintaş M, Karadağ M, Kaya A. editörler. solunum sistemi ve hastalıkları, İstanbul Tıp Kitabevi, 2010; 1319-1337.
- Mirsadraee S, Oswal D, Alizadeh Y, Caulo A, van Beek E Jr. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol.* 2012 Apr 28;4(4):128-34.
- Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol.* 2005 Jul 26;15(14):R563-74.
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Oie HK, Mulshine JL, Phelps R, Viallet J, et al. ras gene mutations in non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18):4999-5002.
- Molina JR., Yang P, Cassivi, SD, Schild, SE, Adjei AA. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 2008;83(5):584-594.
- Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci.* 2015 May;145(1):5-15
- Müsellim B. Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri sempozyum dizisi, İstanbul, No:58, Kasım 2007; 113-11
- National Research Council (US) Committee on Health Risks of Exposure to Radon (BEIR VI). Health Effects of Exposure to Radon: BEIR VI. Washington (DC):National Academies Press (US); 1999.
- Noguchi M, Hirohashi S, Hara F, Kojima A, Shimosato Y, Shinkai T, et al. Heterogenous amplification of myc family oncogenes in small cell lung carcinoma. *Cancer.* 1990 Nov 15;66(10):2053-8.
- Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Lovly CM, Chen X, Rudin CM, et al. Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clin Cancer Res.* 2013 May 1;19(9):2584-91.
- Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, et al. Morphometric profiling of lung cancers-its association with clinicopathologic, biologic, and molecular genetic features. *Am J Surg Pathol.* 2010 Feb;34(2):243-55.
- Olson JE, Yang P, Schmitz K, Vierkant RA, Cerhan JR, Sellers TA. Differential association of body mass index and fat distribution with three major histologic types of lung cancer: evidence from a cohort of older women. *Am J Epidemiol.* 2002 Oct 1;156(7):606-15.
- Özlü T, Metintaş M, Karadağ M, Kaya A. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi. Solunum Sistemi ve Hastalıkları. İstanbul Tıp Kitabevi, 2010; 1319-37
- Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med.* 2005 Jan;2(1):e17.
- Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med.* 1993 Sep 2;329(10):690-4.
- Plowman SJ, Hancock JF. Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 30;1746(3):274-83.

- Prins J, De Vries EG, Mulder NH. The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res.* 1993 Sep-Oct;13(5A):1373-85.
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012 May 15;72(10):2457-67.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011 Oct 13;11(11):761-74.
- Richman S, Chambers P, Hemmings G, Taylor M, Seymour M, Quirke P. Identification of NRAS and KRAS-146 mutations and double-mutant cases in 817 patients with advanced colorectal cancer (aCRC) 7th NCRI Cancer Conference 2011 Nov 6-9; Liverpool UK.
- Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Apr 15;6(2):201-5.
- Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Mar;16(3):1207-17
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7
- Sarkar FH, Li Y, Vallyathan V. Molecular analysis of p53 and K-ras in lung carcinomas of coal miners. *Int J Mol Med.* 2001 Oct;8(4):453-9.
- Sarkar FH, Valdivieso M, Borders J, Yao KL, Raval MM, Madan SK, et al. A universal method for the mutational analysis of K-ras and p53 gene in non-small-cell lung cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol.* 1995 Dec;4(4):266-73.
- Sasaki H, Okuda K, Kawano O, Endo K, Yukiue H, Yokoyama T, et al. Nras and Kras mutation in Japanese lung cancer patients: Genotyping analysis using LightCycler. *Oncol Rep.* 2007 Sep;18(3):623-8
- Sato S, Nakamura Y, Tsuchiya E. Difference of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res.* 1994 Nov 1;54(21):5652-5.
- Sellers TA, Bailey-Wilson JE, Elston RC, Wilson AF, Elston GZ, Ooi WL, Rothschild H. Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Aug 1;82(15):1272-9.
- Serizawa M, Koh Y, Kenmotsu H, Isaka M, Murakami H, Akamatsu H, et al. Assessment of mutational profile of Japanese lung adenocarcinoma patients by multitarget assays: a prospective, single institute study. *Cancer.* 2014 May 15;120(10):1471-81.
- Shi D, He G, Cao S, Pan W, Zhang HZ, Yu D, et al. Overexpression of the c-erbB-2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinog.* 1992;5(3):213-8
- Shimizu Y, Kato H, Schull WJ. Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). *Radiat Res.* 1990;121(2):120-141
- Slebos RJ, Rodenhuis S. The ras gene family in human non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1992;(13):23-9.

- Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*. 1996 Apr 5;85(1):17-26.
- Stigt JA, 'tHart NA, Knol AJ, Uil SM, Groen HJ. Pyrosequencing analysis of EGFR and KRAS mutations in EUS and EBUS-derived cytologic samples of adenocarcinomas of the lung. *J Thorac Oncol*. 2013 Aug;8(8):1012-8.
- Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1647-53.
- Tamura Y, Fujiwara Y, Yamamoto N, Nokihara H, Horinouchi H, Kanda S, et al. Retrospective analysis of the efficacy of chemotherapy and molecular targeted therapy for advanced pulmonary pleomorphic carcinoma. *BMC Res Notes*. 2015 Dec 18;8(1):800.
- Tardon A, Lee WJ, Delgado-Rodriguez M, Dosemeci M, Albanes D, Hoover R, et al. Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2005 May;16(4):389-97.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87-108.
- Traczyk M, Borkowska E, Roźniecki M, Purpurowicz R, Jędrzejczyk A, Marks P, et al. Polymorphic variants of H-RAS protooncogene and their possible role in bladder cancer etiology. *Cent European J Urol*. 2012;65(2):84-7.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al WHO Panel. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep;10(9):1243-60.
- Travis WD. Classification of lung cancer. *Semin Roentgenol*. 2011 Jul;46(3):178-86. (a)
- Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med*. 2011 Dec;32(4):669-92. (b)
- Vachtenheim J, Horáková I, Novotná H, Opáalka P, Roubková H. Mutations of K-ras oncogene and absence of H-ras mutations in squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res*. 1995 Mar;1(3):359-65.
- Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 1;33(7):692-700.
- Vatan O, Bilaloglu R, Tunca B, Cecener G, Gebitekin C, Egeli U, et al. Low Frequency of *p53* and *k-ras* Codon 12 Mutations in Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) Tumors and Surgical Margins. *Tumori*, 2007 93: 473-477.
- Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jan 21;96(2):99-106.
- Wakuda K, Kenmotsu H, Serizawa M, Koh Y, Isaka M, Takahashi S, et al. Molecular profiling of small cell lung cancer in a Japanese cohort. *Lung Cancer*. 2014 May;84(2):139-44.
- Wang Z, Wu YL, Zhang GC, Zhou Q, Xu CR, Guo AL. EGFR/KRAS mutations and gefitinib therapy in Chinese NSCLC patients. *Onkologie*. 2008 Apr;31(4):174-8.

- Xie YQ, Chen JM, Liu Y. Interaction of the CYP1A1 gene polymorphism and smoking in non-small cell lung cancer susceptibility. *Genet Mol Res.* 2016 Jan 4;14(4):19411-7.
- Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T. Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9252-6.
- Zamani AG, Zamani A. [MicroRNAs and lung cancer]. *Tuberk Toraks.* 2013;61(1):57-62.
- Zamani A. Tanısal bronkoskopi. İç: *Solunum Sistemi ve Hastalıkları.* Editörler; Tefik Özlü, Muzaffer Metintaş, Mehmet Karadağ, Akın Kaya, İstanbul Medikal yayıncılık ve Ltd.Sti., İstanbul ,2010;365-379.
- Zhang G, Sun Y, Wang M. [Detection of K-ras oncogene activation in human lung cancer and its possible clinical application]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 1995 Oct;18(5):282-4, 317.
- Web\_1 <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/lung-new.asp>(12.02.2015)
- Web\_2 World Health Organization. Cancer, fact sheet no. 297 <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>(16.02.2015)
- Web\_3 <http://www.toraks.org.tr/userfiles/file/YOLHARITASI.pdf>(20.06.2016)
- Web\_4 [http://homepages.uconn.edu/~vlr04001/robinson/research\\_interests.html](http://homepages.uconn.edu/~vlr04001/robinson/research_interests.html)(02.03.2016)
- Web\_5 <http://oregonstate.edu/instruct/bb331/lecture14/ras3.html>(14.03.2016)
- Web\_6 <https://www3.nd.edu/~aseriann/maxam.html>(01.04.2016)