T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

EGFR MUTASYONU BULUNDURAN VE BULUNDURMAYAN AKCİĞER KARSİNOMASI OLGULARINDA MORFOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLER

Dr. Melahat MUSAYEVA

TIBBI PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serpil DİZBAY SAK

Ankara
2016

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr.Melahat MUSAYEVA	**Sınav tarihi:** 18/ 07 / 2016
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Prof.Dr.Serpil DİZBAY SAK	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: EGFR Mutasyonu Bulunduran ve Bulundurmayan Akciğer Karsinoması Olgularında Morfolojik ve İmmünhistokimyasal Özellikler			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Işınsu KUZU
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof.Dr.Serpil DİZBAY SAK
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Doç.Dr.Sevgen ÖNDER
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Ankara Universitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile yetişmemde büyük katkıları bulunan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Işınsu KUZU olmak üzere tüm hocalarıma ve uzman ablalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamım her aşamasında ve uzmanlık eğitimim boyunca, ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, çalışmamın her aşamasına bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, bana yol gösteren ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı tez danışmanım, değerli hocam, Prof. Dr. Serpil DİZBAY SAK'a müteşekkirim.

Arşiv materyallerinin elime ulaşmasında bana yardımcı olan Alahattin ALPTEKİN ve Yusuf ASLAN'a, kesitlerin hazırlanmasında yardımını esirgemeyen Zeki KARABULUT'a ve Cem KAYA'ya immünhistokimyasal boyamalar sırasında yardımcı olan tüm immünpatoloji laboratuarı çalışanlarına, moleküler çalışmalarından ötürü biyolog Şenay BOYACIGİL ve Öznur ÇOŞKUN'a, ayrıca istatistiksel değerlendirme aşamasında yardımcı olan Zeynep GENÇTÜRK'e teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığım, iyi ve kötü günlerimde hoşgörü ve destekleriyle yanımda olan, çok değerli uzman olan dostlarım; Banu İNCE ALKAN, Seher YÜKSEL, Hilal ÖZAKINCI, Hale KIVRAK, Ayşegül ŞAŞMAZ'a ve diğer asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Asistanlık sürecim boyunca benden her ne kadar uzakta olsalar da desteklerini hep yanımda hissettiğim, benim bu günlere gelmemi sağlayan sevgili anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Melahat MUSAYEVA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY i
ÖNSÖZ..... ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
TABLOLAR DİZİNİ x
RESİMLER DİZİNİ xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER.....3
2.1 Akciğer kanserinin epidemiyolojik özellikleri 3
2.2 Akciğer kanserinin etyolojisi.....3
2.3 Akciğer karsinomlarının histopatolojik sınıflaması 4
2.3.1 Akciğer adenokarsinomalarının sınıflandırılması 6
2.3.1.1 Preinvaziv lezyonlar 8
2.3.1.1.1 Atipik adenomatöz hiperplazi 8
2.3.1.1.2 Adenokarsinoma in situ (AİS) 8
2.3.1.2 Minimal invaziv adenokarsinoma.....9
2.3.1.3 İnvaziv adenokarsinoma 9
2.3.1.3.1 Lepidik adenokarsinoma 9
2.3.1.3.2 Asiner adenokarsinoma.....10
2.3.1.3.3 Papiller adenokarsinoma 10
2.3.1.3.4 Mikropapiller adenokarsinoma 13
2.3.1.3.5 Solid adenokarsinoma 13
2.3.1.4 Adenokarsinoma varyantları.....15
2.3.1.4.1 İnvaziv müsinöz adenokarsinoma 15

2.3.1.4.2 Kolloid adenokarsinoma 15
2.3.1.4.3 Fetal adenokarsinoma 17
2.3.1.4.4 Enterik adenokarsinoma.....17
2.3.2 Akciğer karsinomlarında izlenen immünhistokimyasal bulgular.....17
2.3.2.1 TTF-1 19
2.3.2.2 Napsin A 20
2.4 Akciğer adenokarsinomalarda ve diğer küçük hücreli dışı karsinomalarda tedavi seçenekleri 20
2.4.1 Hedefe yönelik tedavi için olgu seçimi 22
2.5 KHDAK'da tedavi hedefi olarak EGFR 23
2.5.1 EGFR mutasyonu 26
2.5.1.1 EGFR mutasyonu tetkik yöntemleri 27
2.5.1.2 EGFR proteinin aşırı ifadesi 28
2.5.1.3 EGFR gen kopya sayısı tayini 29
2.5.2 EGFR hedefli tedaviye direnç mekanizmaları 30
2.5.2.1 Primer direnç mekanizmaları.....30
2.5.2.2 Sekonder direnç mekanizmaları.....31
2.5.3 EGFR geninde tek nükleotit polimorfizmi.....32
2.6 KHDAK'da diğer tedavi hedefleri 32
2.6.1 RAS mutasyonu.....32
2.6.2 ALK yeniden düzenlenmeleri 33
2.6.3 ROS1 yeniden düzenlenmeleri.....33
2.6.4 RET yeniden düzenlenmeleri 33
2.6.5 BRAF mutasyonu.....34
2.6.6 MET amplifikasyonu.....34
2.6.7 HER2 mutasyonu/amplifikasyonu 35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....36
3.1 Kayıtlar üzerinde yapılan değerlendirme 36

3.2 Morfolojik değerlendirme 36
3.3 İmmünhistokimyasal değerlendirme 37
3.4 Mutasyon analizi 38
3.5 İstatiksel analiz 40
4. BULGULAR 41
4.1 Genel bulgular 41
4.2 Histopatolojik, immünhistokimyasal bulgular 43
4.2.1 Baskın patern 43
4.2.2 Müsin varlığı 43
4.2.3 TTF-1 44
4.2.4 Napsin A 44
4.3 ALK 45
4.4 EGFR 46
4.4.1 EGFR Mutasyon Analizinin Teknik Başarısı 46
4.4.1.1 Materyal tipine göre 46
4.4.1.2 Materyal kaynağına göre 48
4.4.1.3 Asit takibi işlemine göre 48
4.4.2 EGFR mutasyon oranı, dağılımı, klinikopatolojik özellikler ile karşılaştırılması 49
4.4.2.1 EGFR mutasyonu ile materyal özelliklerinin karşılaştırması 49
4.4.2.2 EGFR mutasyonu ile yaş ve cinsiyet özelliklerinin karşılaştırılması 51
4.4.2.3 EGFR mutasyonu ile histopatolojik özelliklerin karşılaştırılması 51
5. TARTIŞMA 56
5.1 EGFR mutasyon analizinde kullanılan materyaller 57
5.2 EGFR mutasyon analizinde kullanılan yöntemler 59
5.3 KHDAK'da EGFR mutasyon sıklığı ve dağılımı 59

5.3.1 Ekzon 18.....61
5.3.2 Ekzon 19.....61
5.3.3 Ekzon 20.....63
5.3.4 Ekzon 21.....64
5.4 SNP (Q787Q).....66
5.5 Histopatolojik özellikler ve EGFR.....66
5.6 TTF-1, Napsin A ve EGFR mutasyonu.....68
5.7 ALK.....70
6. SONUÇLAR.....81
ÖZET.....83
SUMMARY.....86
KAYNAKLAR.....88
EK.....117

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAH	**:**	Atipik Adenomatöz Hiperplazi
AİS	**:**	Adenokarsinoma İn Situ
ALK	**:**	Anaplastik Lenfoma Kinaz
ARMS	**:**	Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi
BAK	**:**	Bronkioloalveoler Karsinom
BTC	**:**	Betacellulin
CK	**:**	Sitokeratin
CİSH	**:**	Kromojenik İn Situ Hibridizasyon
DSÖ	**:**	Dünya Sağlık Örgütü
dHPLC	**:**	Denatüre Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
DNA	**:**	Deoksiribonükleik Asit
EML4	**:**	Ekinoderm Mikrotübül İlişkili Protein Benzeri 4
EGFR	**:**	Epidermal Büyüme (Growth) Faktörü Reseptörü
EGF	**:**	Epidermal Büyüme (Growth) Faktörü
EPR	**:**	Epiregulin
EMT	**:**	Epitelyal Mezenşimal Transformasyon
FİSH	**:**	Floresan İn Situ Hibridizasyon
HRMA	**:**	Yüksek Rezolüsyonlu Erime Analizi
HER	**:**	**“**Human Epidermal Growth Factor Receptor”
H-E	**:**	Hematoksilen-Eozin
HRG	**:**	Herregülin
HB-EGF	**:**	Heparin Binding EGF-like Growth Factor

IASLC	**:**	"International Association for the Study of Lung Cancer" (Uluslararası Akciğer Çalışma Grubu)
kDA	**:**	Kilodalton
KRAS	**:**	Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkojen Homoloğu
KHDAK	**:**	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinoması
KHAK	**:**	Küçük Hücreli Akciğer Karsinoması
ME PCR	**:**	Metiltransferaz PCR
MİA	**:**	Minimal İnvaziv Adenokarsinoma
MAPK	**:**	"Mitogen-activated protein kinase"
MET	**:**	"Mesenchymal-Epithelial Transition Factor"
NOS	**:**	"Not otherwise specified" (Daha ileri sınıflandırılamayan)
NGS	**:**	"Next Generation Sequencing" (Yeni nesil dizileme)
PCR	**:**	"Polimerase Chain Reaction" (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIK3CA	**:**	Fosfotidilinositol 3- kinaz, Katalitik Subunit Alfa
PDL-1	**:**	"Programmed Death Ligand-1"
RET	**:**	"Rearranged During Transfection"
RT-PCR	**:**	"Real Time" PCR
ROS-1	**:**	"Repressor of Silencing 1"
STAT	**:**	"Signal Transducer and Activator of Transcription"
SNP	**:**	"Single Nucleotid Polymorphism"
TTF-1	**:**	Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1
TNM	**:**	Tümör, (Lenf) Nod (u), Metastaz
TKİ	**:**	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TGF-α	**:**	"Transforming Growth Factor Alpha"
YHK	**:**	Yassı Hücreli Karsinom

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1. 2016 itibarı ile akciğer adenokarsinomalarında izlenen mutasyonların dağılımı 21

Şekil 2.2. Akciğer kanserlerinde EGFR, ALK durumu ve histolojik tipe göre tedavi şeması. 22

Şekil 2.3. Akciğer kanserlerinde moleküler analiz için olguların seçimi 23

Şekil 2.4. HER ailesi ve ligandları 25

Şekil 2.5. Tirozin kinaz proteini ve ilaç hedefleri 25

Şekil 3.1. Moleküler analizde izlenen yol. 39

Şekil 4.1. Baskın paterni değerlendirilebilen tümörlerde izlenen baskın patern dağılımı (n=179). 43

Şekil 4.2. Materyal tiplerine göre analiz başarısı. 47

Şekil 4.3. Materyal kaynağına göre analiz başarısı. 48

Şekil 4.4. EGFR mutasyonlarının (n:75) ekzonlara dağılımı. 50

Şekil 4.5. Saptanan mutasyonların ekzonlara göre dağılımı ve EGFR TKİ tedavisine muhtemel yanıtları 50

Şekil 4.6. EGFR mutasyonu bulunduran ve bulundurmayan olguların cinsiyet açısından dağılımı 52

Şekil 4.7. EGFR mutasyon durumunun baskın patern ile ilişkisi 52

Şekil 4.8. Baskın patern ile mutasyonun izlendiği ekzonların ilişkisi 53

Şekil 4.9. EGFR mutasyonu ve müsin varlığı ilişkisi 53

Şekil 4.10. EGFR mutasyonu ve TTF-1 54

Şekil 4.11. EGFR mutasyonu ve Napsin A 54

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. 2015 DSÖ Sınıflaması'na Göre Akciğer Tümörleri (Özet).....6

Tablo 2.2. 2015 DSÖ Sınıflamasına Göre Akciğer Adenokarsinomaları.....7

Tablo 2.3. Sitokeratin pozitif bulunan, morfolojik olarak KHDAK tiplendirilmesi yapılamayan; müsin boyası ile solid patern içeren adenokarsinomanın ekarte edildiği[a] olgularda immünhistokimyasal boyalar yardımı ile tiplendirme (DSÖ 2015 sınıflamasından alınmıştır). 19

Tablo 2.4. Mutasyon tetkik yöntemleri 28

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlar.....38

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan 600 olguya ait genel veriler.....42

Tablo 4.2. EGFR mutasyon analizi açısından başarılı olan 499 olguya ait genel veriler 42

Tablo 4.3. Akciğer adenokarsinomalarında TTF-1 ve Napsin A açısından olguların dağılımı.....45

Tablo 4.4. DNA fragman uzunluğu ve materyal tipi ilişkisi.....47

Tablo 5.1. Dünya genelinde akciğer karsinomunda EGFR mutasyonu açısından yapılan çalışmaların özeti 72

Tablo 5.2. Akciğer karsinomunda EGFR mutasyonunu araştıran Türkiye kökenli çalışmaların özeti 75

Tablo 5.3. Çalışmamızda izlenen EGFR mutasyonlarının dökümü ve bu mutasyonların TKİ tedavisine yanıtlarına ilişkin literatür verileri 76

Tablo 5.4. EGFR geninde SNP (Q787Q) ile ilişkili çalışmaların özeti 77

Tablo 5.5. Akciğer adenokarsinomunda EGFR mutasyonu ile baskın patern ilişkisine yönelik çalışmaların özeti.....78

Tablo 5.6. Baskın patern ile EGFR mutant ekzon arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların özeti 79

Tablo 5.7. TTF-1 ve Napsin A'nın sensitivite ve spesifitesine yönelik çalışmaların özeti.....79

Tablo 5.8. EGFR mutasyonu ve TTF-1 ilişkisine yönelik çalışmaların özeti.....80

Tablo 5.9. EGFR mutasyonu ve Napsin A ilişkisine yönelik çalışmaların özeti.....80

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 2.1. Minimal invazyon gösteren adenokarsinoma (HE). Küçük resimlerde üstte lepidik, altta ise (5 mm'den küçük olan) asiner komponent izlenmektedir. 11

Resim 2.2. Lepidik baskın adenokarsinoma (HE). Bu alan sadece lepidik paterni göstermektedir, diğer alanlarda tümörün başka gelişim paternleri de içerdiği saptanmıştır..... 11

Resim 2.3. Asiner baskın adenokarsinoma (HE). 12

Resim 2.4. Papiller baskın adenokarsinoma (HE). 12

Resim 2.5. Mikropapiller baskın adenokasinoma (HE). 14

Resim 2.6. Solid baskın adenokarsinoma (HE ve alttaki küçük resim TTF-1). 14

Resim 2.7. İnvaziv müsinöz adenokarsinoma (HE). 16

Resim 2.8. Kolloid adenokarsinoma (HE). 16

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri tüm dünyada erkeklerde kansere bağlı ölüm sebepleri arasında ilk sırada, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. 5 yıllık sağkalım süresinin her iki cinste %10-20 arasında değiştiği bildirilmektedir (1). Türkiye'de de akciğer kanseri önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Kanser sıklığı sıralamasında erkeklerde ilk sırada; kadınlarda ise meme, tiroid, kolon/rektum ve uterus kanserinden sonra 5. sırada yer almaktadır (2). Olguların büyük bir kısmında, akciğer kanserleri ileri evrede saptanmaktadır. Sık görülmeleri, ileri evrede tanı almaları ve sık ölüme yol açmaları nedeni ile akciğer kanserlerinin tedavisinde alternatif arayışları sürmektedir.

Son yıllarda akciğer kanserlerinin patogenezinde rol alan bir dizi gen değişiklikleri tanımlanmıştır. Kanser hücrelerinde mutasyon, amplifikasyon, intrakromozomal ya da interkromozomal translokasyonlar yolu ile bazı anahtar genlerin aktive olduğu bilinmektedir. Günümüzde bu gen değişikliklerini bulunduran hastalarda, bu değişikliklere yönelik tedavi ajanlarının kullanımı söz konusudur. Kişiye özel tedavi seçenekleri her geçen gün artmaktadır (3, 4). Akciğer kanserleri içerisinde sıklığı giderek artış gösteren adenokarsinomlarda bugün itibarı ile klinik açıdan en önemli genler: epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), anaplastik lenfoma kinaz (ALK), ROS1 (Repressor of Silencing 1) ve RET (Rearranged During Transfection)'dir (5).

Yukarıdaki bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1.) Türkiye popülasyonunda akciğer adenokarsinomalarında, adenokarsinoma komponenti bulunduran küçük hücreli dışı akciğer karsinoma (KHDAK) ve daha ileri sınıflandırılamayan (NOS) KHDAK olgularında, EGFR mutasyon oranının ve dağılımının tespit edilmesi;

2.) Mutasyon durumu ile akciğer adenokarsinomasının morfolojik özellikleri, TTF-1 ve Napsin A boyanması arasındaki muhtemel ilişkilerin araştırılması;

3.) Mutasyonu tespit etmede kullanılan materyal tipi ile mutasyon analizinin teknik başarısı arasındaki ilişkinin irdelenmesi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Akciğer kanserinin epidemiyolojik özellikleri

Dünya genelinde akciğer kanseri, en sık görülen ve en sık ölüme neden olan kanserdir. 2012 yılı verilerine göre 1.8 milyon yeni tanı almış olgu (tüm yeni kanser olgularının %13 kadarı) ve 1.6 milyon akciğer kanseri nedenli ölüm (tüm kanser ölümlerinin %19.4 kadarı) bildirilmiştir (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2015 verilerine göre 221.200 yeni akciğer kanseri tanısı (tüm yeni kanser olgularının %13'ü) olduğu ve bunların 115.610 erkek ve 105,590 kadın olduğu bildirilmiştir. Yıllık akciğer kanserine bağlı erkeklerde 86,380 (kansere bağlı ölümlerin %28'i) ve kadınlarda 71,660 (kansere bağlı ölümlerin %26'sı) ölüm olgusu bildirilmiştir (6).

Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) 2013 verilerine göre, akciğer kanserinde tanı yaşının 71 yıl olduğu bildirilmiştir. Akciğer kanserinin yaş gruplarına göre dağılımı şöyledir: 20- 34 yaş arasında %0.2; 35-44 yaş arasında %1.5; 45-54 yaş arasında %8.8; 55-64 yaş arasında %20.9; 65 -74 yaş arasında %31.1; 75-84 yaş arasında %29 ve 85 yaş ve üzerinde %8.3 (7).

2.2 Akciğer kanserinin etyolojisi

Akciğer kanser gelişiminde sigara içimi, hava kirliliği, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, farklı mesleki maruziyetler, genetik yatkınlık gibi bir çok faktör rol oynamaktadır. Sigara, akciğer kanseri olgularının %90 kadarından sorumlu olan en önemli risk faktörüdür. Ancak sigara içenlerin yalnızca %20 kadarında akciğer kanser gelişimi izlenmektedir. Sigara içmeyenlere oranla, içenlerde risk 20-25 kat artmıştır. Bu risk artışı, kullanılan günlük sigara miktarı, sigara içme süresi ve başlama yaşı ile ilişkilidir. Cinsiyet ve kullanılan tütün tipinden bağımsız olarak, sigaranın bırakılması akciğer kanseri gelişme riskini azaltmaktadır. Tütün dumanında 4000'den fazla farklı kimyasal madde olup, bunların 50'den fazlası kanserojendir. Sigarada bulunan kanserojen maddelerin en önemlileri: polisiklik

aromatik hidrokarbonlar, N-nitrozaminler, aromatik aminler, diğer organik (benzen, akrilonitril) ve inorganik (arsenik, asetaldehit) bileşiklerdir. Tütün dumanında bulunan benzopirenin p53 tümör baskılayıcı genini mutasyona uğratarak akciğer kanseri gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur. N-nitrozoamin metabolitleri de DNA'da mutasyon oluşturmakta ve K-RAS onkogeninde aktivasyon meydana getirmektedir. Sigara içen akciğer adenokanser olgularının % 20-30' unda K-RAS mutasyonu belirlenmiştir. Sigara kullananlarda küçük hücreli akciğer kanseri ve yassı hücreli kanser sıklığı daha yüksektir. Sigara içmeyenlerde ise adenokanser ve EGFR mutasyonu daha yüksek oranda görülmektedir (7-9). Pasif sigara dumanına maruz kalan bireylerde de akciğer kanser gelişme riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Etrafa yayılan sigara dumanında da aynı karsinojenler bulunmaktadır. Sigara içmeyen bireylerde akciğer kanser gelişme riski ile ilgili yapılan çalışmalarda; sigara içen biri ile aynı evde yaşayan sigara içmeyen bireylerde, akciğer kanseri gelişme riskinin %24 olduğu gösterilmiştir (10, 11).

Akciğer kanser gelişiminde önemli role sahip arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterler, krom, nikel, radon, silika ve vinil klorid gibi mesleki ve çevresel maruziyet ile ilişkili karsinojenler tanımlanmıştır. Akciğer kanser ölümlerinin erkeklerde yaklaşık %10 ve kadınlarda %5 kadarının sigara dışındaki bu grup karsinojenlere maruziyet ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7).

Ayrıca bir sıra enfeksiyon hastalıkları (HPV, HIV, EBV, klamidial pnömoni), diyet (vitamin A, C ve E'den fakir gıda tüketimi) ve genetik yatkınlık akciğer kanser gelişiminde rol almaktadır (7, 12).

2.3 Akciğer karsinomlarının histopatolojik sınıflaması

Geleneksel olarak küçük hücreli karsinomanın klinik özellikleri ve tedavisinin diğer akciğer kanseri tiplerinden farklılık göstermesi nedeni ile; küçük hücreli karsinomayı diğerlerinden ayıran 'küçük hücreli akciğer karsinomu' (KHAK) ve diğer tüm tipleri içine alan 'küçük hücreli dışı akciğer karsinoması' (KHDAK) şeklinde ikili bir sınıflama akciğer kanserli hastaların klinik idaresinde uzun yıllar

kullanılmıştır. KHDAK, tüm akciğer kanserlerinin %85-90'ını, KHAK ise %10-15'ini oluşturmaktadır. KHDAK içerisinde adenokarsinomalar %40, yassı hücreli karsinoma (YHK) %25-30 ve büyük hücreli karsinomlar ise %10-15 oranında görülmektedir. Geriye kalan kısmını ise, diğer akciğer karsinomları oluşturmaktadır (13). Sigara kullanımı tüm kanser tipleri, özellikle YHK ile yakın ilişkilidir. 20 yıl öncesine kadar YHK daha sık olarak izlenirken, günümüzde adenokarsinomalar bir çok seride bunların önüne geçmiştir. Bu durum, kullanılan sigaraların daha az nikotin içermesi, filtreli sigara kullanımı, yumuşak içimli sigaraların kullanımına bağlı olarak daha derinden inhalasyon ve akciğer adenokarsinomalarının daha yaygın görüldüğü akciğerin periferik kısmının karsinojenlere daha fazla maruz kalması ile açıklanmaktadır (14). Adenokarsinomlar pek çok farklı patern ve morfolojik özellik gösterebilmektedir ve bununla bağlantılı farklı klinik, radyolojik, moleküler özellikler sergileyebilmektedir (15).

1967, 1981 ve 1999 yıllarına ait Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamaları temel olarak patologlara yönelik olarak ve yine patologlar tarafından yapılmıştır. DSÖ sınıflamasının 2004 yılındaki revizyonunda ise o dönemdeki güncel gelişmeler ışığında genetik ve klinik özellikler dahil edilmiştir (16). Moleküler biyoloji ve onkolojideki gelişmeler yanı sıra, radyoloji ve cerrahi prosedürlerdeki ilerlemeler nedeniyle sadece histomorfolojiye dayanmayan yeni bir sınıflama ihtiyacı doğmuştur. Son dekat içinde akciğer adenokarsinomu daha iyi anlaşılmış, medikal onkoloji, moleküler biyoloji ve radyoloji alanındaki gelişmeler sonucu bu alanlardaki yenilikleri ve uygulamaları da kapsayan multidisipliner bir sınıflama ihtiyacı doğmuştur. KHDAK'nın moleküler özelliklerinin daha iyi anlaşılması; EGFR başta olmak üzere hedefe yönelik tedavi alanındaki ve görüntülemedeki gelişmeler sonucu küçük ve non-invaziv akciğer kanserlerinin daha sık olarak gözlenmesi akciğer adenokarsinomasının 2015 sınıflamasında olduğu gibi yeniden düzenlenmesini zorunlu hale getirmiştir (16). Yeni DSÖ sınıflaması Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. 2015 DSÖ Sınıflaması'na Göre Akciğer Tümörleri (Özet) (14)

- Adenokarsinoma	- Tükrük bezi tipi tümörler
- Yassı hücreli karsinoma	Mukoepidermoid karsinoma
- Nöroendokrin tümörler	Adenoid kistik karsinoma
Küçük hücreli karsinoma	Epitelyal-miyoepitelyal karsinoma
Büyük hücreli nöroendokrin karsinoma	Pleomorfik adenoma
	- Papilloma
Karsinoid tümör (tipik/atipik)	- Adenoma
Diffüz pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi (DIPNECH)	Sklerozan pnömositoma
	Alveolar adenoma
- Büyük hücreli karsinoma	Papiller adenoma
- Adenoskuamöz karsinoma	Müsinöz kistadenoma
- Sarkomatoid karsinoma	Müsinöz gland adenomu
Pleomorfik, iğsi hücreli, dev hücreli	- Mezenşimal tümörler
	- Lenfohistiositik tümörler
Karsinosarkoma	- Ektopik orijinli tümörler
Pulmoner blastoma	

2.3.1 Akciğer adenokarsinomalarının sınıflandırılması

Eski sınıflamaya göre, tek bir gelişim paterni gösteren adenokarsinomlar bu paterne göre isimlendirilmekte; birden fazla patern içeren adenokarsinomlar ise, "mikst" tipte adenokarsinoma olarak isimlendirilmekteydi. Paternlerin pür halde olması oldukça nadir rastlanan bir durum olduğundan, adenokarsinomların büyük kısmının (ortalama %80-94 kadarının) mikst tipte adenokarsinom olarak sınıflandırılması gerekiyordu. Tümörlerin bu kadar büyük bir bölümünün mikst grupta sınıflanması ise, farklı klinik ve moleküler özellikler sergileyen tümörlerin prognozunu öngörmede ve tedaviyi yönlendirmede yetersiz kalan bir yaklaşımdı (16). Bu nedenle, 2011 yılında Uluslararası Akciğer Çalışma Grubu/Amerikan Toraks Derneği ve Avrupa Solunum Derneği (IASLC/ATS/ERS) akciğer adenokarsinomları için uluslararası multidisipliner yeni bir sınıflama önermiş ve bu

sınıflama DSÖ 2015 sınıflamasının temelini oluşturmuştur. 2015 DSÖ adenokarsinoma sınıflaması tümörleri baskın histolojik paterne göre sınıflamayı öngörmektedir. Bu sınıflama Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. 2015 DSÖ Sınıflamasına Göre Akciğer Adenokarsinomaları (14)

Preinvaziv lezyonlar Atipik adenomatöz hiperplazi Adenokarsinoma in situ - Non-müsinöz - Müsinöz - Mikst müsinöz ve non-müsinöz	**Minimal invaziv adenokarsinoma** - Non-müsinöz - Müsinöz - Mikst müsinöz ve non-müsinöz
İnvaziv adenokarsinoma Lepidik adenokarsinoma Asiner adenokarsinoma Papiller adenokarsinoma Mikropapiller adenokarsinoma Solid adenokarsinoma	**İnvaziv adenokarsinoma varyantları** İnvaziv müsinöz adenokarsinoma Kolloid adenokarsinoma Fetal adenokarsinoma Enterik adenokarsinoma

Yeni sınıflamada gündeme gelen bir başka değişiklik de "bronkioloalveoler karsinoma" (BAK) teriminin kullanımının ortadan kalkmasıdır. 1999 ve 2004 DSÖ sınıflamalarından sonra, BAK terimi farklı morfolojik ve klinik özellikler (5 yıllık sağkalımı %100 olan, tek, periferik, non invaziv tümörler; minimal invazyon gösteren ve yine 5 yıllık sağkalımı %100'e yakın olan tümörler; prognozu daha kötü olan mikst tipte invaziv adenokarsinomlar) sergileyen tümörler için ortak kullanılan bir terim halini almıştır. Bu durum prognozu öngörmede ve tedaviyi belirlemede klinisyeni yeterli derecede yönlendirememektedir. Bu nedenle 2015 sınıflamasında, bu terimin artık kullanılmaması gerektiği belirtilmekte ve eskiden bronkioloalveoler

karsinom adı verilen tümörler için aşağıda sayılan farklı terminolojilerin kullanılması önerilmektedir (16):

a) Adenokarsinoma in-situ,

b) Minimal invaziv adenokarsinom,

c) Lepidik baskın adenokarsinom,

d) Fokal lepidik alanlar içeren invaziv adenokarsinom,

e) İnvaziv müsinöz adenokarsinom.

2.3.1.1 Preinvaziv lezyonlar

2.3.1.1.1 Atipik adenomatöz hiperplazi

Atipik adenomatöz hiperplazi (AAH), hafif-orta derecede atipi gösteren tip II pnömosit ve/veya Clara hücrelerinin alveol duvarını ve bazen respiratuar bronşiolleri döşediği 0,5 cm veya daha küçük boyutlu lokalize lezyonları tanımlamaktadır (14). Rezeksiyon materyallerinde %7 oranında AAH görülmektedir. Küçük biyopsi ve sitoloji materyallerinde bu tanı verilmemelidir (16).

2.3.1.1.2 Adenokarsinoma in situ (AİS)

Adenokarsinoma in situ (AİS), eskiden BAK olarak sınıflanan lezyonlardan biri olup, 3 cm veya daha küçük boyutlu; tümör hücrelerinin alveoller boyunca ilerlediği (lepidik patern), stromal, vasküler ya da plevral invazyon göstermeyen preinvaziv bir lezyondur. Bu lezyonda asiner, papiller veya mikropapiller paternde ya da intraalveoler tümör hücreleri izlenmemelidir. AİS müsinöz ve non-müsinöz olmak üzere ikiye ayrılır. Olguların büyük kısmı non-müsinöz özelliktedir. Nadir olarak izlenen müsinöz AİS'de tümör hücreleri yüksek kolumnar biçimli olup, bazalde yerleşmiş nükleusa ve yoğun müsin içeriğine sahiptir. Bazen goblet hücreleri de izlenebilir. Tümörün tüm alanlarının izlenemediği küçük biyopsi ve sitoloji materyallerinde AİS tanısı verilmemelidir (14, 16).

2.3.1.2 Minimal invaziv adenokarsinoma

Minimal invaziv adenokarsinom (MİA) tek, düzgün sınırlı, 3 cm veya bundan daha küçük boyutlu; baskın olarak lepidik patern gösteren ve invaziv sahası en büyük alanda 5 mm'yi geçmeyen adenokarsinom olarak tanımlanmıştır. MİA non-müsinöz ve müsinöz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Non-müsinöz tip MİA, müsinöz tipe göre daha sık olarak izlenmektedir. İnvaziv odakta tümör hücrelerinin miyofibroblastik stromaya invazyonu izlenir ve lepidik patern dışı histolojik paternler (asiner, papiller, mikropapiller ve/veya solid) gözlenir (Resim 2.1). Lenfovasküler invazyon, plevral invazyon, tümör nekrozu ve hava yolu ile yayılım dışlanmalıdır. MİA tanılı olgularda tümörün tam olarak rezeke edildiği durumda, 5 yıllık hastalıksız sağ kalımın %100'e yakın olduğu tespit edilmiştir (14, 16).

2.3.1.3 İnvaziv adenokarsinoma

Akciğer adenokarsinomları heterojen yapıya sahip olup, çoğu kez birden fazla paterni bir arada içerebilmektedir. 2015 DSÖ sınıflamasında pulmoner adenokarsinomlar baskın histolojik alt tipe göre sınıflandırılmaktadır ve mevcut histolojik subtiplerin miktarı %5'lik oranlar ile gösterilmektedir. Paternleri yüzdeleyerek belirtmenin özellikle multipl primer akciğer adenokarsinoması olgularında, senkron veya metakron primer akciğer adenokanserlerini; tek bir primer akciğer adenokarsinomasının metastazlarından ayırt etmede yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Histolojik tiplerin klinik ve prognoz açısından farklılık göstermesi yanı sıra, tiplerin belirtilmesinin moleküler korelasyon açısından da fayda sağlayacağı öne sürülmektedir (14, 16).

2.3.1.3.1 Lepidik adenokarsinoma

Lepidik adenokarsinoma, MİA ve AİS ile benzer morfolojik özelliklere sahip, tip 2 pnömosit ve/veya Clara hücrelerinin alveol duvarını döşer şekilde yayılması ile karakterli ve 0.5 cm'den daha geniş alanda invazyon gösteren adenokarsinoma olarak tanımlanmıştır. İnvaziv odak lepidik patern dışı histolojik alt tiplerin (asiner, papiller, mikropapiller ve/veya solid) varlığı ya da miyofibroblastik stromada tümör

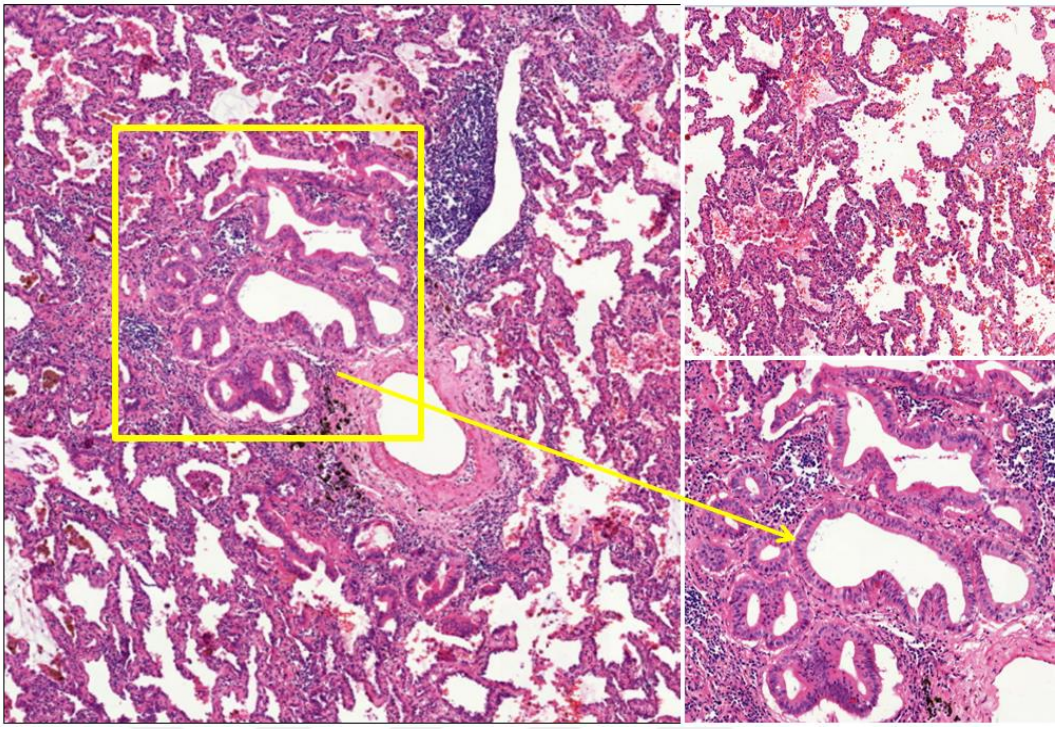
hücrelerinin invazyonunun gözlenmesidir. Lepidik baskın tümörlerde MİA'dan farklı olarak lenfovasküler, plevral invazyon, tümör nekrozu ve hava yolu ile yayılım görülebilir (Resim 2.2). Yeni sınıflamada lepidik baskın adenokarsinoma sadece lepidik paterni baskın non-müsinöz tümörleri tanımlamaktadır, lepidik patterni baskın müsinöz tümörler 'invaziv müsinöz adenokarsinoma' adı ile ayrı bir varyant olarak tarif edilmektedir (14, 16).

2.3.1.3.2 Asiner adenokarsinoma

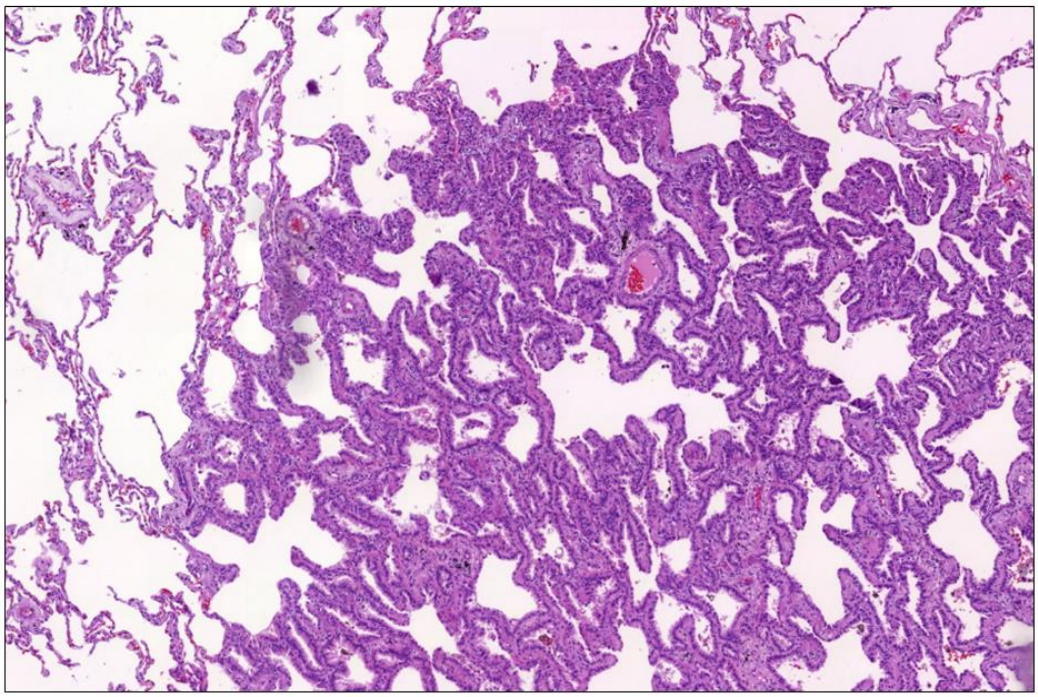
Asiner adenokarsinoma başlıca komponentini tümör hücreleri ile çevrili santral lümen bulunduran bez yapılarının oluşturduğu tümörleri tanımlamaktadır. Gland lümeninde veya intrasellüler alanda müsin varlığı izlenebilir (Resim 2.3). Kribriform patern kötü prognoz ile ilişkili olup, asiner patern içerisinde tanımlanmaktadır (14).

2.3.1.3.3 Papiller adenokarsinoma

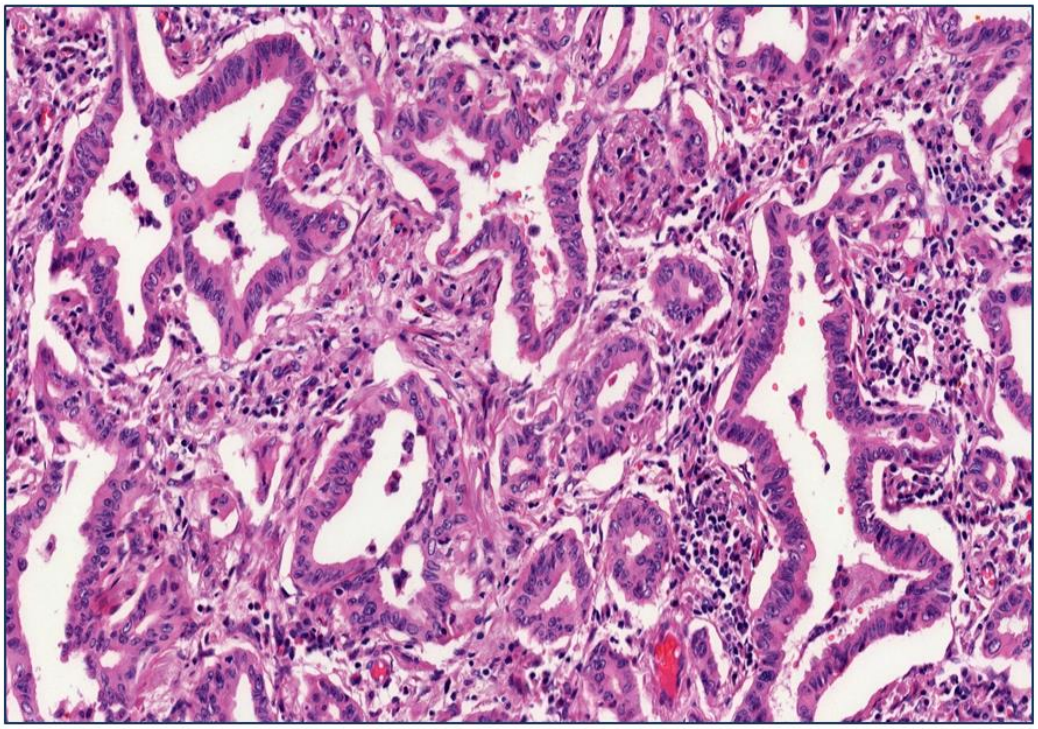
Papiller adenokarsinoma, ortasında fibrovasküler kor bulunduran glandüler hücreler ile döşeli papiller yapılar oluşturan tümörleri tanımlamaktadır (Resim 2.4). Bu görünümün tanjansiyel kesitlerde lepidik adenokarsinoma alanlarından ayırt edilmesi önemlidir. Tümörde alveoler boşluklar veya asiner yapılar içerisinde papiller yapılanmalar izleniyorsa, papiller adenokarsinom olarak sınıflanmalıdır (14, 16).



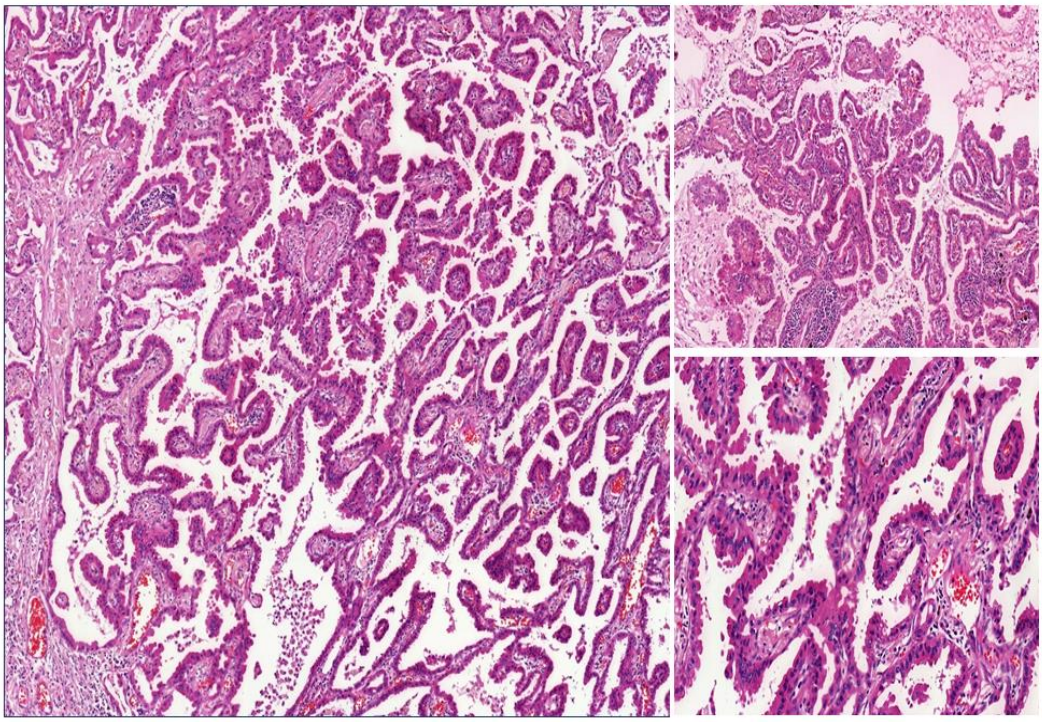
Resim 2.1. Minimal invazyon gösteren adenokarsinoma (HE). Küçük resimlerde üstte lepidik, altta ise (5 mm'den küçük olan) asiner komponent izlenmektedir.



Resim 2.2. Lepidik baskın adenokarsinoma (HE). Bu alan sadece lepidik paterni göstermektedir, diğer alanlarda tümörün başka gelişim paternleri de içerdiği saptanmıştır.



Resim 2.3. Asiner baskın adenokarsinoma (HE).



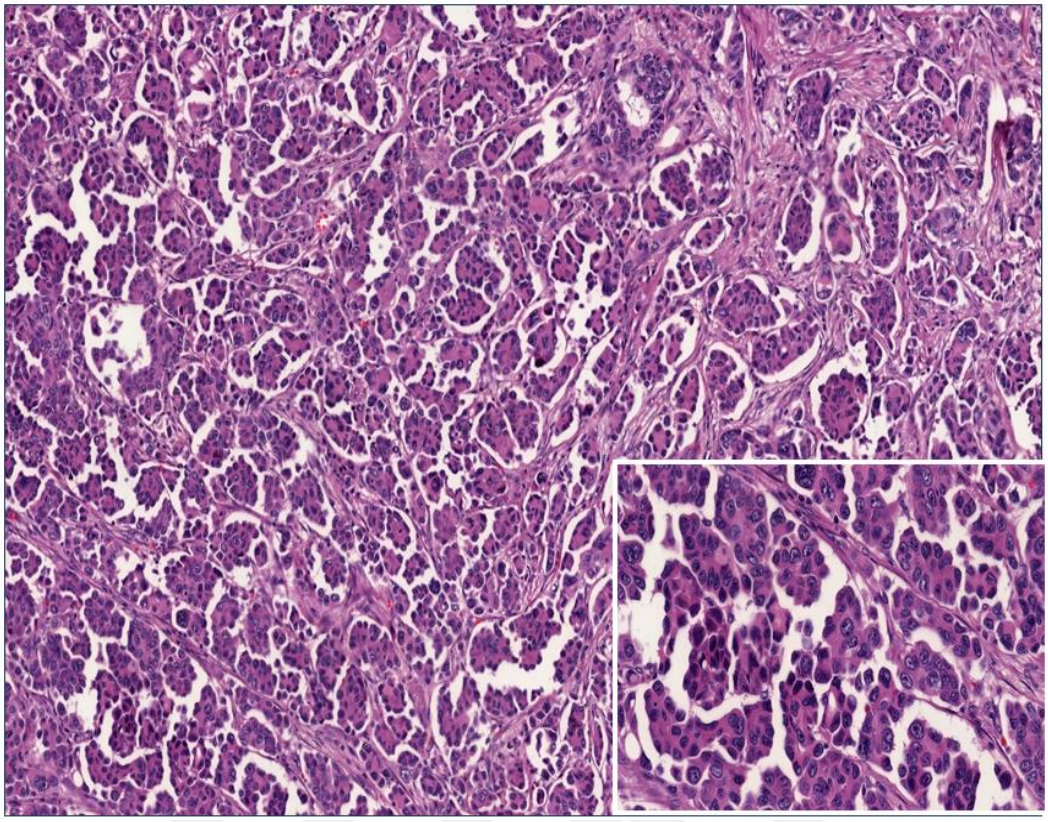
Resim 2.4. Papiller baskın adenokarsinoma (HE).

2.3.1.3.4 Mikropapiller adenokarsinoma

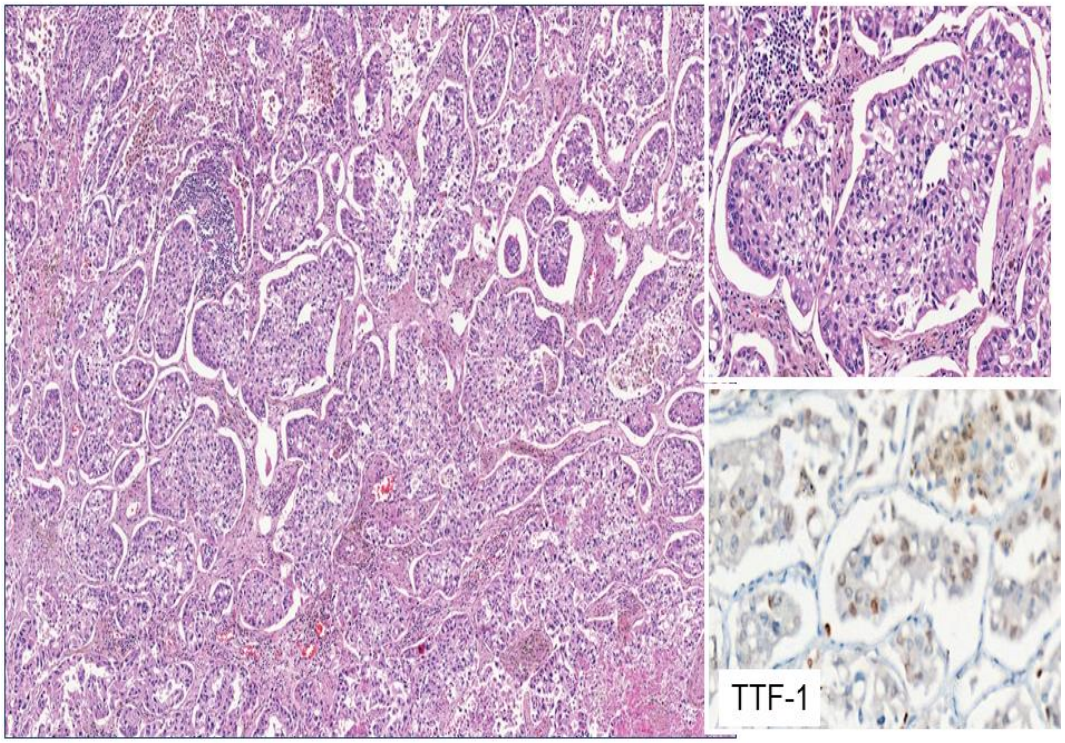
Mikropapiller patern, fibrovasküler kor içermeyen, papiller yumaklar oluşturan hücre gruplarından oluşur (Resim 2.5). Papiller yapılar, alveoler boşluklar içinde ya da alveoler septumlara tutunmuş halde izlenirler. Tümör hücreleri genellikle minimal nükleer atipi gösteren, dar eozinofilik sitoplazmalı, küçük kübik epitelyal hücrelerdir. Alveoler boşluklar içinde halka benzeri glandüler yapılar izlenebilir. Sıklıkla vasküler ve stromal invazyon mevcuttur. Psammoma cisimcikleri görülebilir. Bu patern kötü prognoz ile ilişkili olup; primer tümörün küçük bir komponentini oluşturmasına rağmen, metastatik odaklarda daha büyük oranda izlenebilmesi, bu histolojik paternin agresif davranış gösterdiğinin bir kanıtı olarak değerlendirilir (14, 16).

2.3.1.3.5 Solid adenokarsinoma

Solid adenokarsinoma belirgin bir organizasyon (asiner, papiller, mikropapiller veya lepidik) içermeyen, tabakalar oluşturan, bir bölümü müsin üretebilen poligonal hücrelerden oluşmaktadır (Resim 2.6). Eğer tümörün tamamı solid ise, iki büyük büyütme alanının her birinde, en az 5 hücrede müsin boyaları ile kanıtlanan müsin varlığı gösterilmelidir. YHK ve büyük hücreli karsinomlarda da çok az sayıda hücrede intrasellüler müsin izlenebileceğinden, bu tümörlerden ayırım yapılması önemlidir. DSÖ sınıflamasında müsin içermeyen, ancak pnömositlere özgü belirteçleri (TTF-1 ve/veya Napsin A) eksprese eden tümörler de, solid adenokarsinoma olarak sınıflandırılmaktadır. Solid adenokarsinomların da mikropapiller adenokarsinomlar gibi kötü prognozlu olduğu gösterilmiştir (14, 16).



Resim 2.5. Mikropapiller baskın adenokasinoma (HE).



Resim 2.6. Solid baskın adenokarsinoma (HE ve alttaki küçük resim TTF-1).

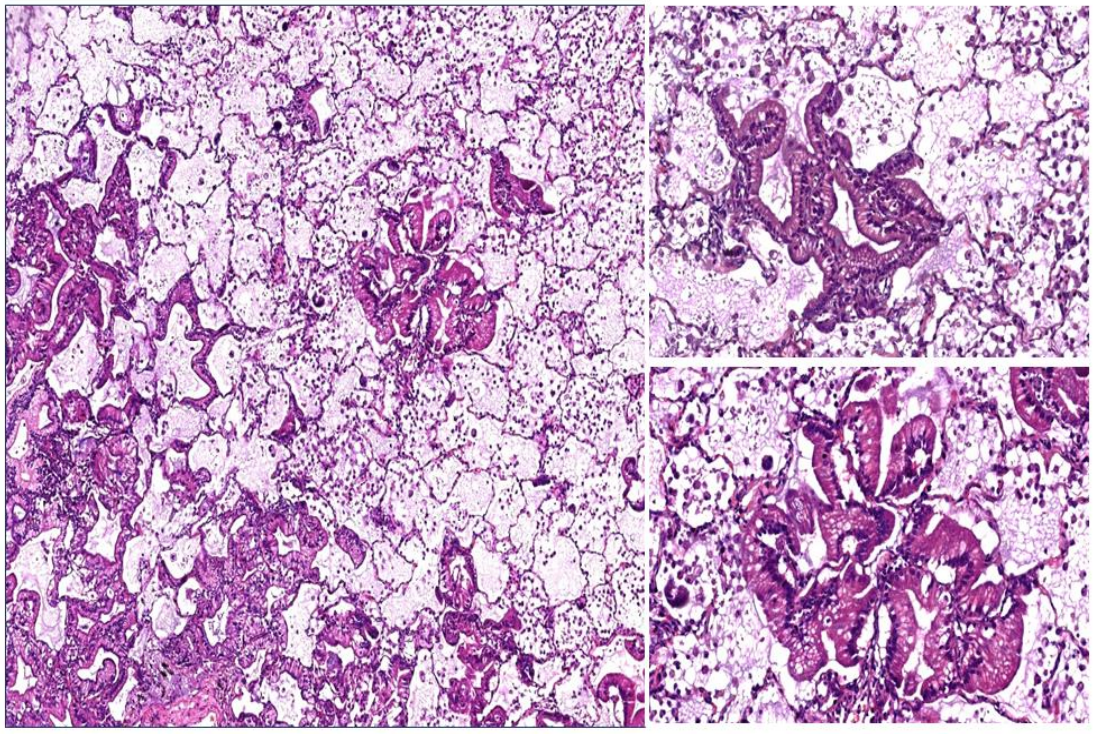
2.3.1.4 Adenokarsinoma varyantları

2.3.1.4.1 İnvaziv müsinöz adenokarsinoma

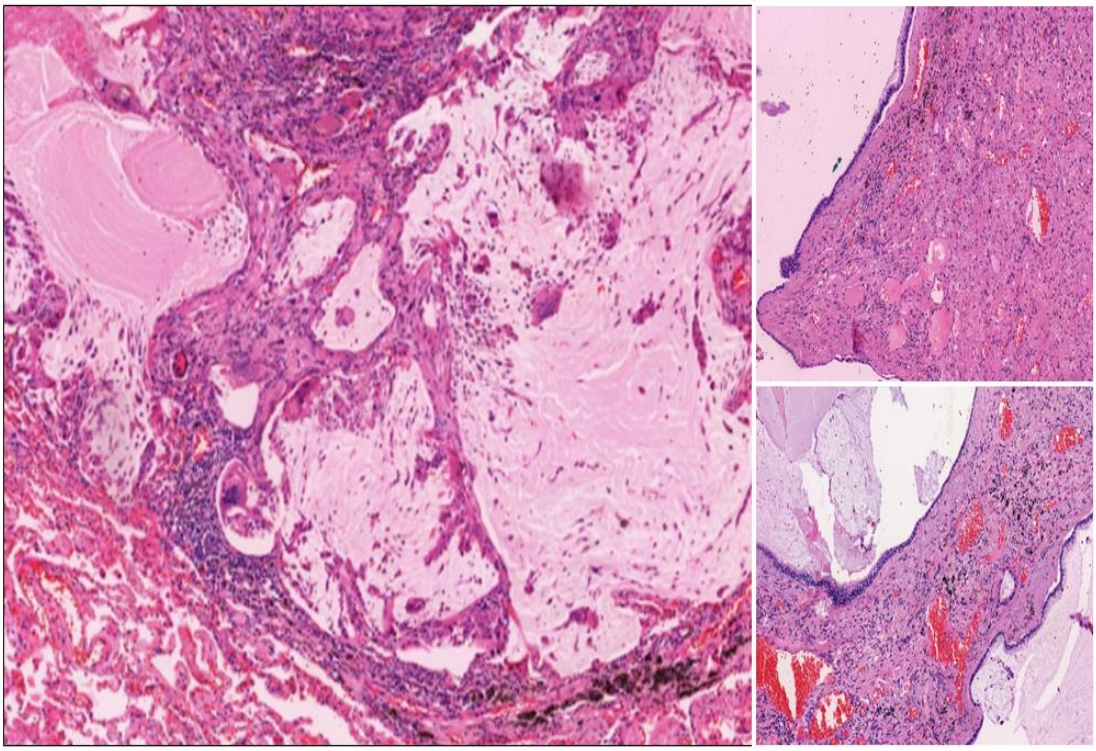
İnvaziv müsinöz adenokarsinoma, eski adıyla müsinöz BAK'ı da içeren, intrasitoplazmik müsin bulunduran, goblet ya da kolumnar hücrelerden oluşan bir tümördür. Bu tümör non-müsinöz tümörlere benzer şekilde, solid patern dışındaki tüm paternleri gösterebilir, ancak lepidik patern en sık izlenen paterndir (Resim 2.7). Bu paternlerin yüzde olarak oranları ve baskın patern belirtilmelidir. Alveolar boşluklar müsin içerebilir. Sitolojik atipi belirgin değildir. Müsinöz MİA ve AİS'den ayırımda boyut (3cm'den büyük boyut ya da invaziv alanın 0.5 cm'den büyük olması) çok sayıda odak bulunması veya düzensiz sınırların (komşu akciğer parankimine miliyer yayılım) varlığı başlıca kriterlerdir. İnvaziv müsinöz karsinoma kriterlerine uymayan ancak ışık mikroskopi ve müsin boyası ile müsin varlığı tespit edilen adenokarsinoma olgularında, tümör baskın paterne göre sınıflandırıldıktan sonra, 'müsinöz değişiklikler' veya 'müsin sekrete eden' gibi tanımlayıcı terimlerin kullanılması önerilmektedir. İnvaziv musinöz adenokarsinomlar multisentrik, multilober olabilir ve her iki akciğeri tutabilir. Non-müsinöz ve müsinöz tümörler ender olarak bir arada görülebilmektedir. Her bir komponent tümörün en az %10'unu oluşturduğunda "mikst müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinom" olarak sınıflandırılmaktadır (14).

2.3.1.4.2 Kolloid adenokarsinoma

Kolloid adenokarsinoma (eski müsinöz kistadenokarsinoma) alveoler boşlukları genişleterek, duvarlarını destrükte eden, ekstraselüler müsin gölcükleri ile karakterli bir tümördür (Resim 2.8). Müsin gölcükleri içerisinde, tümörün sadece küçük bir bölümünü oluşturan, müsin sekrete eden hücre kümeleri bulunur. Tümör hücreleri lepidik patern gösteren, goblet hücrelerine benzer yüksek kolumnar hücreler veya diğer müsin sekrete eden hücrelerden meydana gelir. Müsinöz tümör hücrelerinin tipik olarak alveolleri inkomplet olarak döşedikleri dikkat çeken bir bulgudur. Tümör hücreleri oldukça iyi diferansiye olabilirler ve bu durum küçük biyopsi ve frozen kesitlerde tanı açısından güçlük yaratır. Bu tümörde nükleer psödostratifikasyon gösteren epitel hücreleri ve bazı olgularda belirgin sitolojik atipi bulguları izlense de mitotik aktivite düşüktür ve nekroz gözlenmez (14, 16).



Resim 2.7. İnvaziv müsinöz adenokarsinoma (HE).



Resim 2.8. Kolloid adenokarsinoma (HE).

2.3.1.4.3 Fetal adenokarsinoma

Fetal adenokarsinoma, fetal akciğer tübüllerine benzer şekilde glikojenden zengin, silyasız epitel hücreleri ile döşeli kompleks glandüler yapılardan oluşmaktadır. Subnükleer vakuol oldukça sık ve karakteristik bir bulgudur. Lümen içerisinde skuamoid morüller izlenebilir. Düşük ve yüksek dereceli olmak üzere iki grupta incelenir. Düşük dereceli tümörler genç ve sigara öyküsü bulunan bireylerde daha sık olarak izlenmektedir (14, 16).

2.3.1.4.4 Enterik adenokarsinoma

Enterik adenokarsinomalar, %50 ya da üzerinde enterik komponent içeren primer akciğer adenokarsinomalarıdır. Enterik farklılaşma, nükleer psödostratifikasyon gösteren, yüksek kolumnar epitel hücreleri ile döşeli, kribriform paternin de eşlik ettiği glandüler ve/veya papiller yapılar, lüminal nekroz ve belirgin nükleer kırıntılardan oluşan morfolojik görünüm içerir. Ancak bu tümörler, metastatik kolorektal adenokanserlerden farklı olarak, lepidik patern gibi primer akciğer adenokanserlerinde izlenen diğer histolojik paternleri de bulunduran heterojen bir morfoloji gösterirler. Enterik farklılaşma gösteren akciğer adenokanserleri morfolojik olarak kolon adenokarsinomasına benzerlikleri yanı sıra, immünohistokimyasal olarak kolorektal adenokarsinomaya özgü belirteçleri de eksprese ederler (Bakınız: 2.3.2). Bu tanıyı vermeden önce olguda kolorektal adenokarsinom varlığı ekarte edilmelidir (14, 16).

2.3.2 Akciğer karsinomlarında izlenen immünhistokimyasal bulgular

Akciğer karsinomalarının tiplendirilmesinde, morfolojik olarak adenokarsinoma lehinde yorumlanabilecek olan glandüler organizasyon ve/ veya histokimyasal olarak müsin varlığı; ya da YHK yönünde yorumlanabilecek skuamöz diferansiasyonun saptanamadığı durumlarda, tanının spesifiye edilebilmesi için

immühistokimyasal belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Akciğer karsinomalarında kullanılan immünhistokimyasal belirteçler ve bunların yorumları Tablo 2.3'te gösterilmiştir. Adenokarsinoma ve YHK ayırıcı tanısında TTF-1 ve Napsin A adenokarsinoma yönünde; p40, p63 ve CK5/6 YHK yönünde delil oluşturmaktadır. TTF-1 ve Napsin A'dan birinin pozitiflik gösterdiği; p40, CK5/6 ve p63 belirteçlerinin negatif olduğu durumda olgular "KHDAK, adenokarsinoma ile uyumlu" olarak rapor edilmelidir. p40, CK5/6 ve p63 belirteçlerinden birinin pozitiflik gösterdiği ve TTF-1 /Napsin A negatif olan durumlarda ise, "KHDAK, YHK ile uyumlu" olarak rapor edilmelidir. Bu immün belirteçler ile negatif olan ve morfolojik olarak da adenokarsinoma, YHK ve nöroendokrin karsinoma morfolojisi sergilemeyen tümörlerde, rezeksiyon materyalinde "büyük hücreli karsinoma" tanısı konulabilir. Adenokarsinoma ile nöroendokrin tümör ayırıcı tanısı gerektiren durumlarda immünhistokimya paneline nöroendokrin tümör açısından kromogranin A, CD56, sinaptofizin belirteçleri eklenebilir (14, 17).

Yeni sınıflamada yer alan bazı adenokarsinoma varyantlarının, klasik adenokarsinomalardan farklı immünprofil sergiledikleri akılda tutulmalıdır. Örneğin invaziv müsinöz adenokarsinoma CK7 ve CK20 pozitif; TTF-1 ve Napsin A negatif immünprofil sergilemektedir. Bu tümörlerin HNF4α ile pozitiflik gösterdikleri de bildirilmiştir. Bu tümörlerde moleküler özellikler de farklıdır: %75 oranında KRAS, %5'den az oranda EGFR mutasyonu görülmektedir. Kolloid adenokarsinomada intestinal belirteçler olan CDX2, MUC2 ve CK20 ile ekspresyon izlenirken; CK7 ve TTF-1 ile zayıf boyanma saptanır. Enterik adenokarsinomada enterik farklılaşma yönünde en az bir tane immünohistokimyasal belirteç (CDX2, CK20, MUC2) pozitiftir. Olguların yarısında TTF-1 ve CK7 pozitifliği izlenmekte olup, bu özellik metastatik karsinomlardan ayırımda yardımcı olabilmektedir (16).

Tablo 2.3. Sitokeratin pozitif bulunan, morfolojik olarak KHDAK tiplendirilmesi yapılamayan; müsin boyası ile solid patern içeren adenokarsinomanın ekarte edildiği[a] olgularda immünhistokimyasal boyalar yardımı ile tiplendirme (DSÖ 2015 sınıflamasından alınmıştır (14)).

Tanı (biyopsi/sitoloji)	Tanı (rezeksiyon)	TTF-1[b]	P63	P40	CK5/6
KHDAK, adenokarsinoma ile uyumlu	Adenokarsinoma	+ (fokal / diffüz)	-	-	-
KHDAK, adenokarsinoma ile uyumlu	Adenokarsinoma	+ (fokal /diffüz)	+ (fokal/diffüz)	-	-
KHDAK, adenokarsinoma ile uyumlu	Adenokarsinoma	+ (fokal /diffüz)	+ (fokal/diffüz)	+ (fokal)	-
KHDAK, adenokarsinoma ile uyumlu	Adenokarsinoma	+ (fokal /diffüz)	-	-	+ (fokal)
KHDAK, YHK ile uyumlu	YHK	-	Herhangi biri diffüz (+)		
KHDAK, NOS	Büyük hücreli karsinoma-belirsiz[c]	-	Herhangi biri fokal (+)		
KHDAK, NOS	Büyük hücreli karsinoma - null[d]	-	-	-	-
KHDAK, NOS, immünhistokimyasal boyama yapılmayan	Büyük hücreli karsinoma, immünhistokimyasal boyama yapılmayan	?	?	?	?

- Fokal: %1-10 hücre pozitif, diffüz: %10'dan fazla hücre pozitif

[a]- Rezeksiyon materyalinde 2 BBA'da 5 ve daha fazla, biyopsi materyalinde ise 2 ve daha fazla müsin damlacığı saptanması müsin pozitif olarak, daha az hücre ise negatif olarak kabul edilmektedir.

[b]- Napsin A, TTF-1'e alternatif olarak kullanılabilir, CK7 düşük spesifiteye sahip olduğundan adenokarsinoma diferansiasyonu için önerilmemektedir.

[c]- Nöroendokrin tümör ekarte edildikten sonra TTF-1 negatif ve p63/p40/CK5/6 fokal boyanma adenokarsinoma kökenine işaret etmektedir.

[d]- Sarkomatoid karsinoma (iğsi/ dev hücre içermeyen andiferansiye morfoloji) ve nöroendokrin tümör ekarte edilmelidir.

2.3.2.1 TTF-1

TTF-1 (Tiroid transkripsiyon faktörü 1), 371 aminoasitten oluşan, 38 kD ağırlığında bir polipeptit özelliğindedir. Normal tiroid folikül ve parafoliküler C hücreleri; akciğerde Clara hücreleri, tip 2 pnömositler ve silyasız bronş epitel hücreleri ile beyin dokusunun bir kısmı tarafından eksprese edilen, NKX-2 gen ailesine mensup nükleer transkripsiyon faktörüdür. Tiroglobulin, tiroid peroksidaz, sekretuar proteinler ve surfaktan proteinlerinin regülasyonundan sorumludur (18, 19). İmmünhistokimyasal olarak akciğer adenokarsinomlarında gösterdiği nükleer boyanma, bu tümörlerin tanısında çok yararlanılan bir özelliktir. TTF-1 SPT24

klonunun, 8G7G1/1 klonuna göre daha yüksek sensitiviteye (sırasıyla %84 ve %65) sahip olduğu bildirilmektedir (20).

2.3.2.2 Napsin A

Napsin A, 38kD ağırlığında akciğer ve böbreklerde eksprese edilen TA02 polipeptid homoloğu, peptidaz A1 ailesine ait bir aspartik proteinazdır. Akciğerde tip 2 pnömositler ve alveoler makrofajlarda, ayrıca pankreasın asinüs ve duktuslarında eksprese olur. Napsin A akciğer adenokarsinomları yanı sıra, böbreğin berrak tip renal hücreli karsinomlarında %43, papiller tip renal hücreli karsinomlarında ise %80'lere varan pozitivite göstermektedir (20). Sürfaktan B proteininin yapımında rolü vardır. Napsin A immünhistokimyasal olarak sitoplazmik granüler boyanma gösterir, nükleer boyanma izlenmez (21, 22).

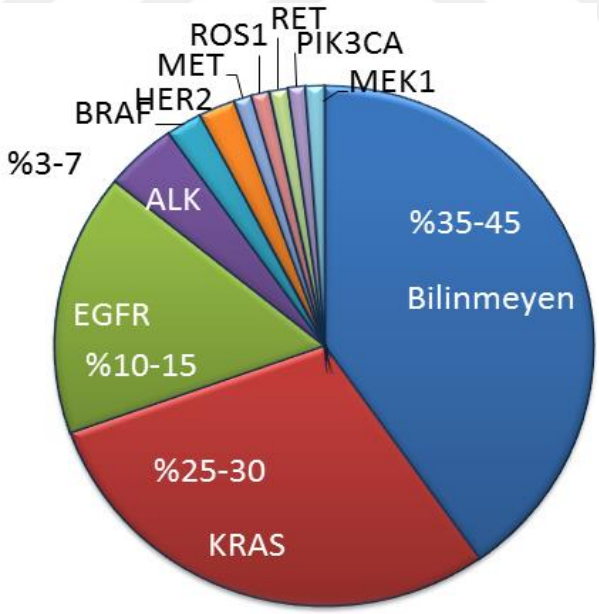
2.4 Akciğer adenokarsinomalarda ve diğer küçük hücreli dışı karsinomalarda tedavi seçenekleri

KHDAK'da önerilen ilk tedavi seçeneği cerrahidir. Ancak olguların %70-80'i lokal ileri evre veya uzak metastazlı dönemde saptanmaktadır. Operasyon seçeneği olmayan hastaların standart kemoterapi ile yaşam süresi ortalama 12 ay kadardır. Bu nedenle bu olgularda yaşam süresini uzatacak yeni tedavi alternatiflerine ihtiyaç duyulmaktadır. Birkaç dekad öncesine dek birbirine benzer şekilde tedavi edilen KHDAK histolojik alt tipleri, günümüzde tedavi seçenekleri açısından birbirinden belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar, bu tümörlerin farklı moleküler özelliklere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (3, 13, 23). Örneğin rekombinant monoklonal antikor olan bevacizumab YHK dışındaki, KHDAK tedavisinde kullanılırken; YHK'da yaşam için tehlike oluşturan kanamaya neden olabilmektedir. Pemetrexed tedavisine adenokarsinomların YHK'ya oranla daha iyi yanıt verdiği gösterilmiştir (14).

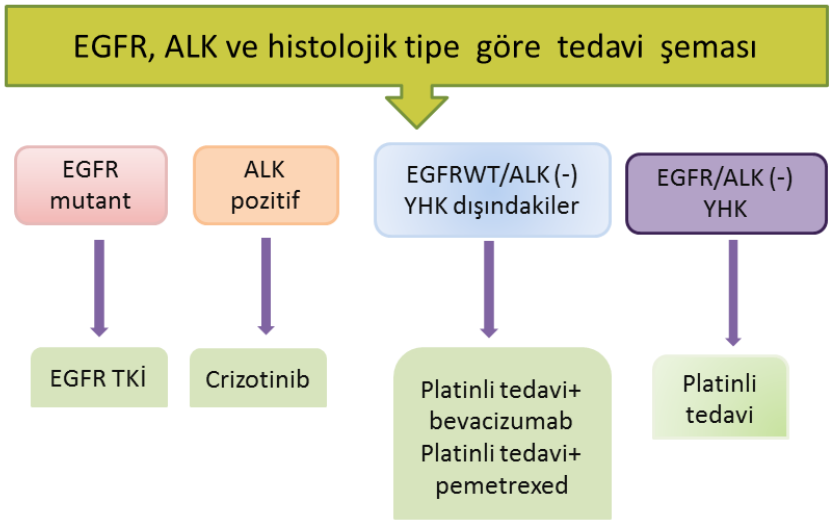
Son bir iki dekad içerisinde KHDAK'da hedefe yönelik tedaviler gündeme gelmiştir. Başka tümörlerde olduğu gibi, akciğer kanserlerinin patogenezinde de, zamanla biriken moleküler değişiklikler rol almaktadır. Gen değişiklikleri

mutasyonlar, gen susturulması, gen amplifikasyonu veya delesyonu, kromozom sayısında artma veya azalma şeklinde gözlenmektedir (24-26). Akciğer adenokarsinomlarında hedefe yönelik tedavide önem taşıyan değişiklikler EGFR, HER2, KRAS, BRAF mutasyonu; ALK, RET, ROS-1 rearanjmanı ve MET amplifikasyonu şeklinde izlenmektedir (4, 5). Akciğer adenokanserlerinde izlenen gen değişiklikleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Adenokanserlerde hedefe yönelik tedavide EGFR mutant olgularda ağırlıkla tirozin kinaz inhibitörleri, ALK gen rearanjmanı içeren olgularda ise crizotinib kullanılmaktadır. EGFR, ALK durumu ve histolojik tip göz önünde bulundurularak kullanılan tedavi şeması Şekil 2.2'de gösterilmiştir. En sık olarak kullanılan hedefe yönelik ajanlar EGFR ve ALK mutasyonlarını hedef almakla birlikte, pek çok başka hedefe yönelik tedavi alternatifleri için çalışmalar da sürdürülmektedir (5). Bu nedenle KHDAK tanısından mümkün olduğu kadar kaçınılmalı, spesifik tiplendirme yapılmalıdır (14).



Şekil 2.1. 2016 itibarı ile akciğer adenokarsinomalarında izlenen mutasyonların dağılımı



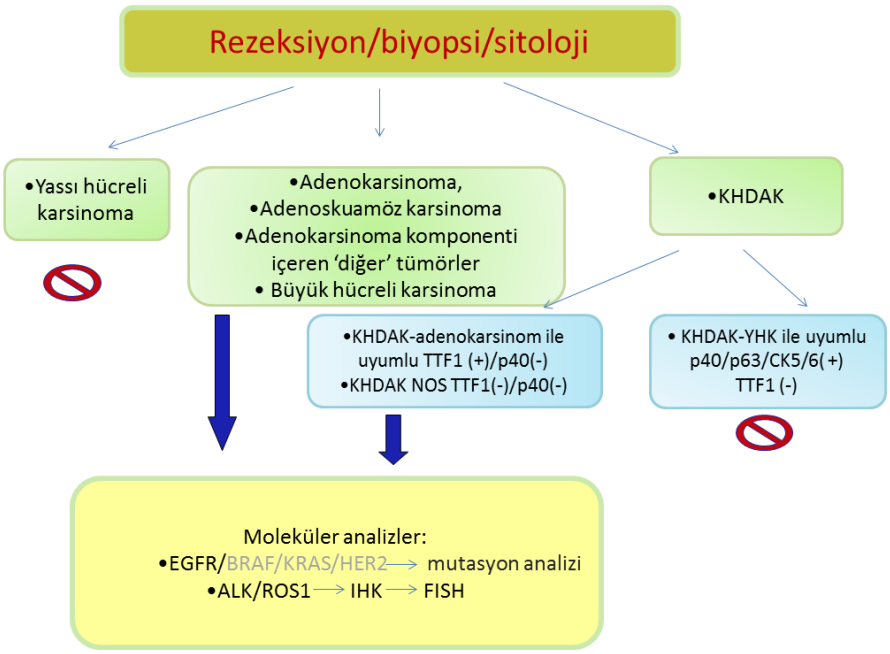
Şekil 2.2. Akciğer kanserlerinde EGFR, ALK durumu ve histolojik tipe göre tedavi şeması.

Ayrıca günümüzde immünoterapinin KHDAK'da kullanımı ile ilgili geniş çaplı çalışmalar yürütülmektedir. Tümör hücreleri kendilerini korumak için immün yanıttan kaçmaktadır. Tümör hücreleri üzerinde bulunan PDL-1 (programmed death ligand-1) sitotoksik T hücreler üzerinde bulunan PD-1 reseptörüne bağlanarak T hücrelerinin oluşturduğu sitotoksik reaksiyonu inhibe etmektedir. Bu molekülleri hedefleyen monoklonal antikorlar (nivolimab, lambrolizumab, MPLD-3280A) tedavi seçeneği olarak umut vermektedir (27, 28).

2.4.1 Hedefe yönelik tedavi için olgu seçimi

Son veriler adenokarsinoma tedavisinde hedefe yönelik tedavilerin önemini göstermektedir. Rezeksiyon materyallerinde tanı alan adenokarsinoma olguları ve adenokarsinoma komponenti içeren tümörler mutasyon açısından araştırılmaktadır. Diğer yandan, akciğer kanserlerinin yaklaşık %70'i ileri evrede ortaya çıktığı için, çoğu kez sitolojik materyaller ve küçük biyopsiler ile tanı konulmaktadır. Bu materyallerde de mümkün olduğunca, spesifik tiplendirme yapmaya çalışılmalı, KHDAK tanısından kaçınılmalıdır. Materyal sınırlı olduğunda, immünhistokimyasal ve moleküler çalışmalar için dokunun doğru kullanılması önem kazanmaktadır. Küçük biyopsilerde, morfolojik olarak glandüler diferansiasyon gösteren veya müsin

içeren tümörler, adenokarsinoma tanısı alarak, hedefe yönelik tedaviler açısından araştırılmalıdır (29). Ancak küçük materyallerde, HE boyası ile, tanı %25-30 kadar olguda, KHDAK-NOS düzeyinde kalmaktadır. Bu durumda, sınırlı bir immünhistokimyasal panel ile inceleme yapılarak spesifik tanıya gidilmesi önerilmektedir. İmmünhistokimyanın eklenmesi ile, daha ileri tiplendirilemeyen KHDAK olgularının oranı %10'a kadar indirilebilmektedir (17, 29). Adenokarsinoma açısından TTF-1 Napsin A ve YHK için p40, CK5/6, p63 testleri yapılarak adenokarsinoma ve YHK şeklinde ayırım yapılmalı; bu belirteçler ile de tiplendirilemeyen ve KHDAK-NOS olarak değerlendirilen olgular da hedefe yönelik tedaviler açısından incelemeye yönlendirilmelidir (30). Buna yönelik algoritma Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



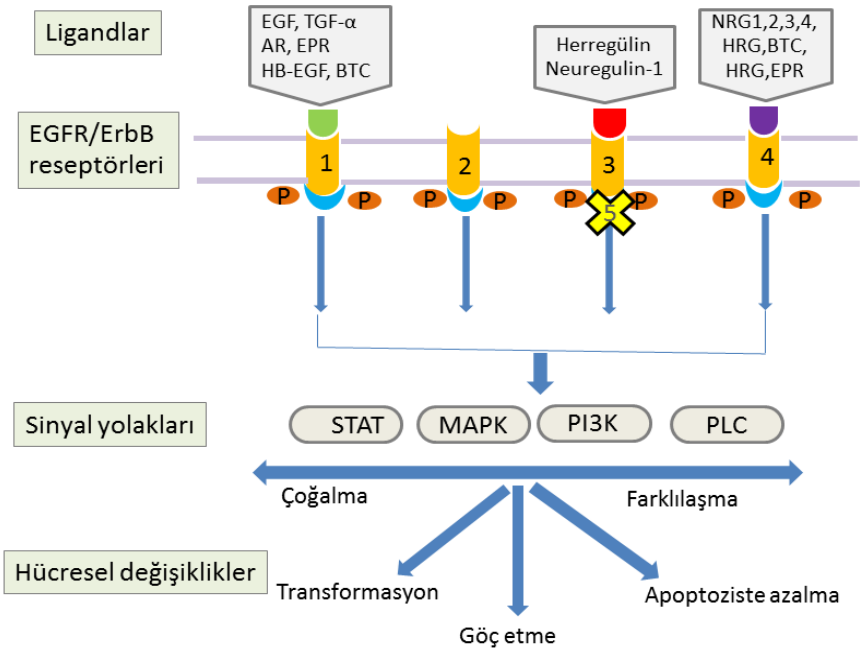
Şekil 2.3. Akciğer kanserlerinde moleküler analiz için olguların seçimi

2.5 KHDAK'da tedavi hedefi olarak EGFR

30 yıl önce Nobel tıp ödülünü kazanan Stanley Cohen epidermal büyüme faktörünün (EGF) hücre büyümesindeki rolünü ortaya koymuştur. EGF ve bunun reseptörü EGFR büyüme, farklılaşma, yapışma, göç etme ve hücrelerin hayatta kalması gibi kanser biyolojisinde çok önemli olaylara katkıda bulunmaktadır (31).

Kanserin ilerlemesinde çok boyutlu rolünden dolayı EGFR ve bu ailenin üyeleri tedavi hedefi olarak uygun görünmektedir. EGFR geni 7. kromozomun kısa kolunda (7p11.2) lokalize olup, 170-kDa ağırlığında tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran reseptörü kodlamaktadır. EGFR (ErbB1/HER1), Erb ailesine mensuptur (31, 32). ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4 aynı ailenin diğer üyeleridir. Reseptör hücre dışı, transmembran ve hücre içi olmak üzere 3 ayrı kısımdan oluşmaktadır (33, 34). Dış kısım, farklı ligandları bağlama kapasitesine sahiptir. Ligandın EGFR'ye bağlanması ile dimerizasyon oluşmakta ve intrasitoplazmik tirozin kinaz aktivitesi sayesinde, farklı sinyal yollarını aktive etmektedir. RAS-RAF-MEK-ERK; RAS-PI3K-anti-apoptotik AKT yolağı ve STAT yolaklarından biri aktive olmakta ve sonuçta hücrenin proliferasyonu, anjiogenez, göç etme, adhezyon ve hayatta kalma fonksiyonları gerçekleşmektedir (32, 35). Erb ailesine mensup reseptörlerin ligandları ve fonksiyonları Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde EGFR geninde oluşan değişiklikler, genin aşırı protein ifadesi (overekspresyon), gen kopya sayısında artış (amplifikasyon) veya gende mutasyon şeklinde tespit edilebilmektedir.

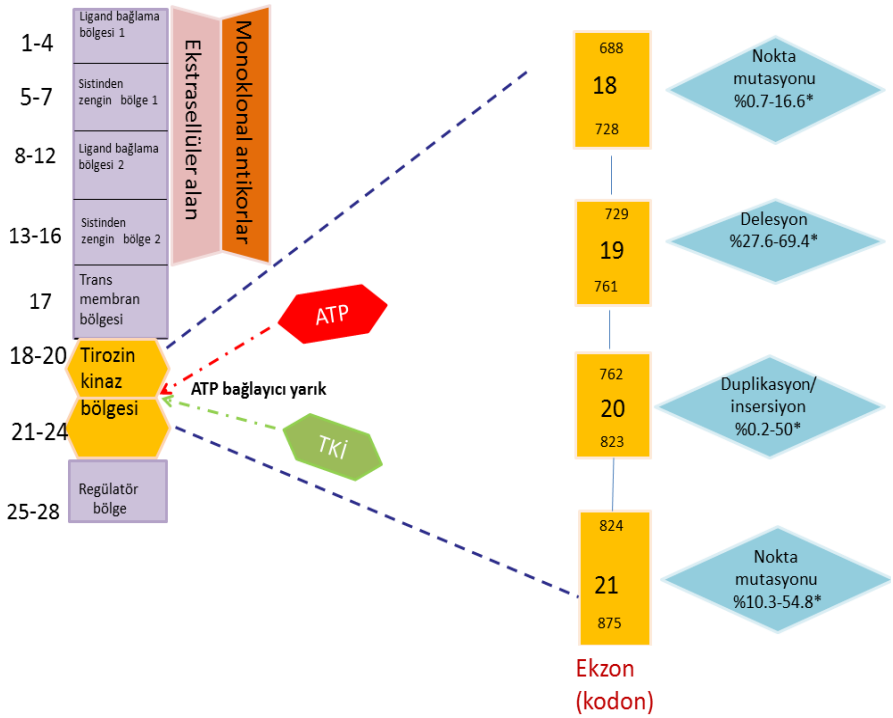
Bu çalışmanın konusu olan EGFR mutasyonu saptanan KHDAK olgularında tedavide temel olarak iki yol kullanılmaktadır: monoklonal antikorlar ve küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) (Şekil 2.5). Monoklonal antikorlar EGFR'nin hücre dışındaki kısmına bağlanarak ligandın bağlanmasını engellemekte ve reseptör dimerizasyonu, otofosforilasyon ve sinyal iletimi önlenmektedir. Bu ailenin üyeleri cetuximab, panitumumab, necitumumab ve matuzumabdır (36). TKİ ise ATP analoğu gibi davranmakta, hücre içinde tirozin kinazın ATP bağlayan kısmına bağlanarak otofosforilasyonu ve sonraki aşamadaki sinyal iletimini inhibe etmektedir. Bu moleküller tirozin kinaza geri dönüşlü (erlotinib, gefitinib) ya da geri dönüşsüz (afatinib) olarak bağlanabilen küçük moleküllerdir (37-39).



Şekil 2.4. HER ailesi ve ligandları

1-ErbB1/HER1, 2- ErbB2/HER2, 3- ErbB3/HER3, 4- ErbB4/HER4, 5- HER3 tirozin kinaz aktivitesine sahip değildir, aktivasyonu diğer erbB reseptörleri ile heterodimerler yoluyla sağlanır.

Ligandlar: Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha β (TGF-α), amphiregulin (AR), betacellulin (BTC), heparinbinding EGF-like growth factor (HB-EGF), epiregulin (EPR), epigen (EPG), Herregülin (HRG)



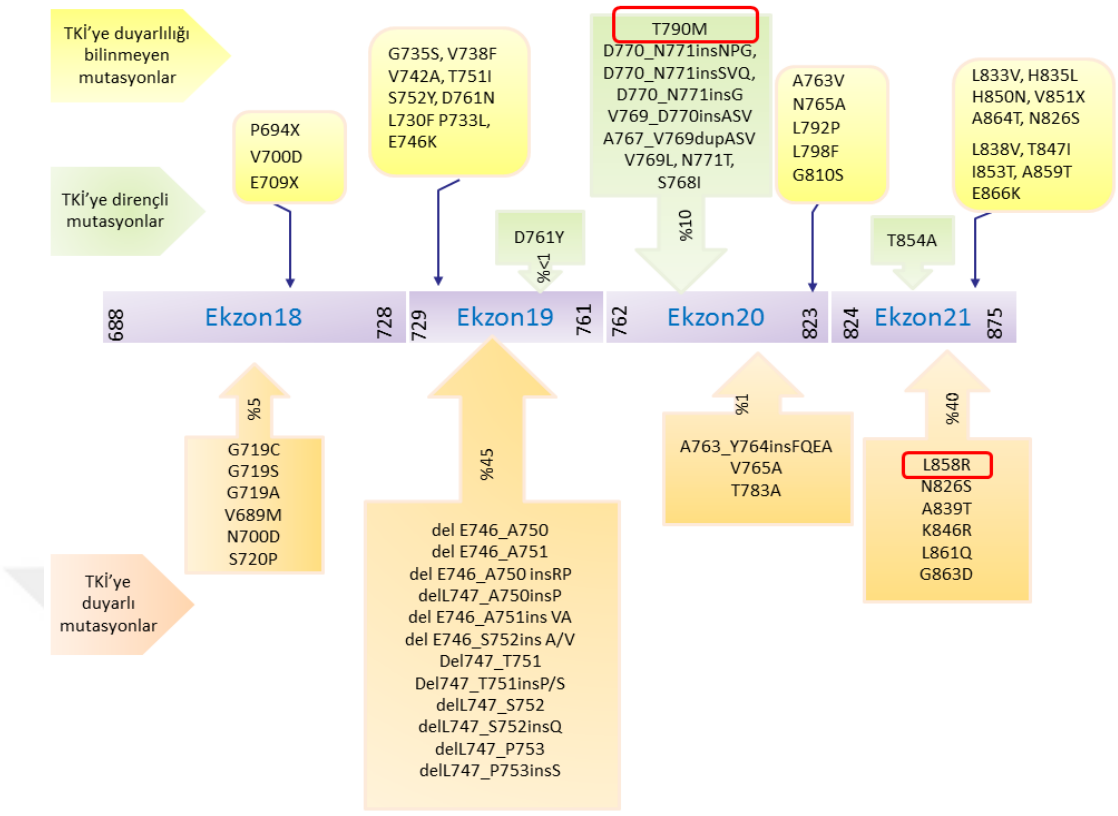
Şekil 2.5. Tirozin kinaz proteini ve ilaç hedefleri

*Farklı kaynaklarda ekzonlarda izlenen mutasyon oranları (40-82)

2.5.1 EGFR mutasyonu

Akciğer kanserlerinde EGFR mutasyonu, genin tirozin kinaz bölgesini ilgilendiren 18-21. kodonlarda izlenmektedir (83, 84) (Şekil 2.5). EGFR mutasyon oranları etnisite ve sigara ile ilişkili değişkenlik göstermektedir. Asyalı, sigara içmeyen kadın hastalarda EGFR mutasyonunun diğer gruplara göre yüksek olduğu izlenmektedir (85). Epidemiyolojik çalışmalar sigara ile ilişkisi olmayan akciğer kanserlerinde, EGFR mutasyon sıklığının Asyalılarda beyaz ırka oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir (31). Bir çalışmada etnik gruplar arasında izlenen bu farklılığın EGFR geninde izlenen polimorfizm ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (86). En sık izlenen mutasyonlar şunlardır: ekzon 19'da kısa "in frame" delesyonlar, ekzon 18 ve 21'de tek nükleotid değişikliği şeklinde mutasyonlar ve ekzon 20'de 'in frame' duplikasyon veya insersiyon şeklindeki mutasyonlar (31). Genel olarak KHDAK'da EGFR geninde en sık görülen mutasyonlar ekzon 19'da izlenen 'in frame'delesyon (%50 kadar) ve ekzon 21'de izlenen L858R nokta mutasyonudur (%40 kadar); bu mutasyonların TKİ tedavisine iyi yanıt ile ilişkili olduğu bilinmektedir (46, 87, 88). Ekzon 18 nokta mutasyonları yaklaşık %4-5 ve ekzon 20 insersiyon mutasyonları ise yaklaşık %5-10 oranında görülmektedir (31, 87, 89-91).

EGFR geninde izlenen mutasyonların büyük bir kısmı TKİ'ye iyi yanıt ile ilişkili iken, bir kısmı ise tedaviye direnç ile ilişkilidir. Bazı mutasyonların klinik etkileri ise net değildir. Bu mutasyonların dağılımı ve klinik etkileri Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı ve TKİ tedavisine yanıt ile ilişkileri

2.5.1.1 EGFR mutasyonu tetkik yöntemleri

Mutasyon analizi için kullanılan yöntemler hedefe yönelik ("targeting") ve tarama ("screening") yöntemleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Hedefe yönelik yöntemler bilinen spesifik mutasyonları tespit etmek için tasarlanmış, duyarlı ve hızlı yöntemlerdir, ancak bunlar maliyet açısından daha pahalıdır. Tarama yöntemleri ise EGFR'de izlenebilecek tüm mutasyonları saptamaya yöneliktir. Sanger sekanslama (direkt sekanslama), bir tarama yöntemi olarak yaygın şekilde kullanılan düşük maliyetli bir yöntemdir. Ancak bu metodun az miktarda tümör hücresi bulunduran olgularda düşük sensitiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Eğer tümör dokunun %50'den azını oluşturuyor ise, yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Sanger sekanslamaya alternatif olarak, kendine özgü artı ve eksileri olan başka metotlar ile de mutasyon analizi yapılmaktadır (38, 92). Moleküler biyolojideki en büyük

keşiflerden biri de yeni nesil dizileme /“next generation sequencing” (NGS) yöntemidir. Bu yöntem daha az miktarda tümör içeren küçük biyopsi ve sitoloji materyallerinde mutasyon analizini yapmaya imkan vermektedir (92). Querings ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada daha az sıklıkla rastlanan mutasyonları saptamada NGS ile %100, direkt sekanslama ile %67, pirosekanslama ile %89 oranında başarı elde edilmiştir (93). Tablo 2.4’te bazı mutasyon tetkik yöntemleri ve sensitiviteleri gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Mutasyon tetkik yöntemleri (94).

Metod	Tarama yöntemi	Hedefe yönelik yöntem	Sensitivite (% mutant DNA)
PCR- direkt sekans	X		20
Pirosekanslama	X		5-10
PCR/dHPLC/HRMA (Melt analiz)	X		5
Fragman analizi	X		5
TaQMAn-PCR		X	5-10
SNAPSHOT		X	5-10
ARMS		X	1
PNA/LNA klamp		X	0.1-1
ME PCR/sekans		X	0.1-1
RT-PCR		X	-

2.5.1.2 EGFR proteinin aşırı ifadesi

KHDAK’ların %85’inde immünhistokimyasal olarak EGFR proteinin aşırı ifadesi görülmektedir. Yapılan çalışmalarda protein aşırı ifadesi ile EGFR TKİ tedavisine cevap arasında ilişki bulunmamıştır (49) Ancak mutasyon spesifik antikorların kullanımı bu durumu değiştirebilir. Mutasyon spesifik antikorlar EGFR TKİ’ ye duyarlılıkla ilişkili olan en sık iki mutasyonu saptamaya yöneliktir: ekzon 19 E746-A750 delesyonu ve ekzon 21 de izlenen L858R nokta mutasyonu (95, 96). Ekzon 19’da izlenen mutasyonu saptayan SP111 ve ekzon 21 L858R mutasyonuna yönelik olan SP125 klonu kullanılarak yapılan immünhistokimyasal çalışmada bu mutasyonları saptamak açısından sırası ile %83 ve %76’ya ulaşan sensitivite tespit edilmiştir (95). EGFR mutasyonu akciğer adenokarsinomlarda erken aşamada oluşan

bir değişiklik olduğundan, normal akciğer dokusunda SP125 antikoru ile pozitif boyanan (yani L858R mutasyonu bulunduran) bir olgu da gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada mutasyon içeren bazı olgularda boyanma gözlenmemiştir (95). Ayrıca bu antikorlarla ilgili bir diğer sorun da EGFR mutasyonu içermeyen bazı olguların da boyanma göstermesidir (97). Mutasyonların immünhistokimya ile saptanmasının önündeki bir diğer engel de, her bir antikorun tek bir mutasyonu tespit edebilmesi; buna karşılık EGFR mutasyonlarının çok heterojen yapıda olmasıdır. Bu nedenle, immünhistokimyasal yöntem, EGFR TKİ tedavisine aday hastaları saptama açısından yetersiz kalmaktadır (95).

2.5.1.3 EGFR gen kopya sayısı tayini

EGFR geninin kopya sayısında artış ile EGFR mutasyonu arasında ilişki olduğu saptanmıştır (20). EGFR gen kopya sayısında artış KHDAK olgularında dizomi, düşük trizomi, yüksek trizomi, düşük polizomi, yüksek polizomi ve gen amplifikasyonu şeklinde görülmektedir (98). EGFR gen kopya sayısı floresan in situ hibridizasyon (FİSH) veya kromojenik in situ hibridizasyon (CİSH) yöntemi ile belirlenebilmektedir; yüksek polizomi ve gen amplifikasyonu FİSH pozitif olarak kabul edilmektedir (99). Bazı çalışmalarda EGFR kopya sayısındaki artış ile TKİ'ye iyi yanıt arasında ilişki olduğu bildirilmektedir (100-102). EGFR mutant akciğer adenokanseri olgularının %50'sinde EGFR kopya sayısında artış bulunduğu; kopya sayısının artmış olduğu olguların ise, %75'inde mutasyon olduğu gösterilmiştir. EGFR mutasyonunun akciğer kanserinin erken döneminde oluştuğu, ancak EGFR amplifikasyonunun ise kanserin daha ileri döneminde meydana geldiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada EGFR açısından amplifiye olguların hepsinin ekzon 19 delesyonu bulundurduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada amplifiye tümörlerin solid patern baskın özellikte olduğu ve TKİ'ye kötü cevap verdiği gösterilmiştir (98, 103). Bir başka çalışmada ise, FİSH pozitif olguların TKİ'ye tedaviye yanıtının değerlendirilmesinde, bu hastaların sağkalım süresinin FİSH negatif olgulara göre daha uzun olduğu saptanmıştır (104, 105). Özet olarak, EGFR amplifikasyonu araştırılması EGFR TKİ tedavisine aday hastaları saptamak için optimal bir yöntem olarak kabul edilmemektedir (98).

2.5.2 EGFR hedefli tedaviye direnç mekanizmaları

EGFR TKİ ile tedavi sonrası ortaya çıkan başlıca problemlerden biri bunlara karşı oluşan dirençtir. Primer ve kazanılmış direnç mekanizmaları tanımlanmıştır. Olguların bir kısmında oluşan direncin sebebi bilinmemektedir.

2.5.2.1 Primer direnç mekanizmaları

Hasta ilişkili primer direnç nedeni olarak sigara kullanımı ve BIM polimorfizmi başlıca mekanizmaları oluşturmaktadır. Sigara dumanı TKİ metabolizması ile ilişkisi olan sitokrom CYP1A1'i aktive etmektedir. Ayrıca sigara dumanı reaktif oksidatif stres faktörlerini aktive ederek, ortamda TKİ olmasına rağmen, "wild" tip ve mutant EGFR reseptörlerinin otofosforilasyonuna yol açmaktadır. Sigara içen EGFR mutant KHDAK olgularının TKİ'ye daha düşük yanıt verdiği gösterilmiştir (106). BCL2L11 tarafından kodlanan BIM ise, BCL2 ailesine mensup proapoptotik bir proteindir. TKİ'nin yol açtığı apoptoziste rol oynamaktadır. Bazı çalışmalarda BCL2L11'de oluşan germline mutasyonlar sonucu, BIM3 domainin azaldığı ve buna bağlı olarak EGFR TKI'ye intrensek direnç oluştuğu gösterilmiştir. BIM3 domaini bulundurmayan izoformların EGFR TKİ'ye daha az duyarlı olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, intrensek apoptotik yolağı aktive eden BIM3 mimetik ilaçlar, EGFR TKİ ile kombine şekilde kullanılabilmektedir (106-108).

Tümör ilişkili primer direnç ise direnç mutasyonları ile ilişkilidir. EGFR mutant olgularda TKİ ile %75-90 oranında tedaviye yanıt gözlenmektedir. Ancak tedaviye direnç ile ilişkili primer EGFR mutasyonları da tanımlanmıştır. Ekzon 20'de izlenen bazı insersiyon mutasyonları [(D770_N771 (ins NPG), D770_ N771 (ins SVQ) ve D770_ N771 (ins G)]; ekzon 20, V769L, N771T ve T790M nokta mutasyonları; ekzon 19 D761Y mutasyonu tedaviye direnç ile ilişkili mutasyonlardır. T790M mutasyonu, TKİ tedavisi sonrasında gelişen mutasyonların %60 kadarını meydana getirmekte, ayrıca nadiren primer olarak da görülebilmektedir (109). Ayrıca KRAS mutasyonu, MET amplifikasyonu, düşük PTEN ifadesi, primer direnç ile ilişkili mutasyonlardır (108-110). Sinyal iletim yolunda EGFR'den daha aşağı kısımda meydana gelen mutasyonların da EGFR TKİ' ye direnç oluşturabildiği

gösterilmiştir. PI3/Akt yolağında oluşan mutasyonlarda da EGFR TKİ'ye direnç meydana gelebilmektedir (107).

2.5.2.2 Sekonder direnç mekanizmaları

EGFR TKİ ile tedavi sırasında oluşan kazanılmış (sekonder) direnç mekanizmaları 3 başlık altında sınıflandırılmaktadır: T790M mutasyonu, diğer yolaklarda oluşan aktivasyon ve fenotipik transformasyon.

Oluşan mutasyonlardan %60-65'den fazlasını T790M nokta mutasyonu oluşturmaktadır. Daha az oranda ise dirençten yeni gelişen D761Y, L747S ve T854A mutasyonları sorumludur (106). T790M mutasyonu sonucu katalitik yarıkta, treoninin yerini metionin alır. Bu değişim TKİ'nin bağlanmasını engeller. ATP ve TKİ arasındaki rekabetin galibi ATP olur (109, 111). Bu mutasyonun ortaya çıktığı olgular için de alternatif ilaçlar geliştirilmektedir (AZD9291, CO-1686) (112).

EGFR TKİ tedavisi sırasında diğer yolaklarda oluşan aktivasyon, direnç mekanizması oluşturmaktadır. Bu grupta en sık izlenen c-MET amplifikasyonudur. C-MET transmembran kinaz reseptörü olup, hepatosit büyüme faktörünün (HGF) bağlanması ile aktive olmakta ve PI3K/Akt ve MAPK yolaklarını aktifleştirmektedir. C-MET amplifikasyonu TKİ tedavisi sonrası direnç oluşan hastalarda %4-22 oranında tespit edilmiştir (29, 108, 113). Ayrıca HGF de EGFR TKI tedavisi alan hastalarda direnç gelişiminde rol almaktadır (113). HER2 amplifikasyonu direnç nedenleri arasında yaklaşık %2 oranında görülmektedir. Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, HER2 amplifikasyonu bulunan olgularda ayrıca T790M mutasyonun da bulunduğunu ortaya koymuştur (107, 113, 114).

Fenotipik transformasyon yolu ile EGFR TKİ'ye karşı direnç küçük hücreli kansere dönüşüm ve epitelyal-mezenşimal dönüşüm (EMT) yolu ile olmaktadır. Direnç oluşan olgularda %2-14 oranında adenokarsinomadan KHAK'ya transformasyon tespit edilmiştir. Bu olayın mekanizması tam olarak bilinmemekte; ancak bu olguların önceki biyopside saptanamamış, KHK komponenti içeren kombine tümörleri temsil edebileceği öne sürülmektedir (113, 115). Epitelyal-mezenşimal dönüşüm de tanımlanan direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır. EMT sonucu hücreler arası ilişki zayıflayarak tümör daha invaziv hal almaktadır.

İmmünhistokimyasal olarak β-katenin ve E-kaderin kaybı ile vimentin ifadesinde artış gözlenmektedir. Bu dönüşüm mekanizması tam olarak bilinmemektedir. NOTCH-1 aşırı regülasyonu, TGF-β ifadesinde artış veya MET aktivasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (106, 107, 113, 116).

2.5.3 EGFR geninde tek nükleotit polimorfizmi

Genetik materyaldeki çeşitlilik polimorfizm ve mutasyon sonucu oluşmaktadır. Mutasyonlar hastalık nedeni olabilir, ancak polimorfizmler genel olarak; hastalık nedeni olarak değil, hastalığa yatkınlık nedeni olarak görülmektedirler. En sık görülen polimorfizm, tek nükleotid polimorfizmidir (single nucleotide polymorphism/SNP). SNP'ler genlerde protein kodlayan ekzon ya da protein kodlamayan intron bölgelerinde bulunabilirler (117). SNP'ler hastalık yatkınlığı ve ilaç cevabı konusunda majör etkiye sahiptir. EGFR geni kodon 20'de G-A değişimi ile ortaya çıkan ve Glisin kodlayan SNP (Q787Q; G2607A) sık olarak izlenmektedir (86, 118-120).

2.6 KHDAK'da diğer tedavi hedefleri

2.6.1 RAS mutasyonu

KRAS, GTP bağlayan proteinler ailesine mensup olup, hücre dışı sinyale cevap olarak hücre davranışını düzenlemektedir. RAS, MAPK ve PI3K yolağı üzerinden proliferasyon, farklılaşma, apoptozis ve adhezyonu kontrol etmektedir. KRAS mutasyonu müsinöz olanlarda daha sık olmak üzere, akciğer adenokanser olgularının %30 kadarında; YHK olgularının ise %5'inde izlenmektedir. Mutasyon sigara içenlerde, içmeyenlere göre, daha yüksek oranda izlenmektedir. KRAS onkogeninde kodon 12, 13 ve 61'de oluşan nokta mutasyonu sonucu KRAS proteini aktive olmaktadır. KRAS mutasyonu insan tümörlerinde yaygın olarak izlense de, günümüzde bu mutasyona yönelik olarak geliştirilmiş, kullanılabilir durumda bir tedavi ajanı bulunmamaktadır (37, 121, 122).

2.6.2 ALK yeniden düzenlenmeleri

EML4-ALK, ekinoderm mikrotübül ilişkili protein benzeri-4 geni (EML4) ile anaplastik lenfoma kinaz geni arasında oluşan füzyon sonucu ortaya çıkan bir onkogendir. Bu füzyon sonucu 'kimerik' bir protein oluşmaktadır. Bu protein liganddan bağımsız olarak tümörogeneziste rol alan PI3K-AKT, MAPK ve JAK-STAT yolaklarını aktive etmektedir (4, 123, 124). Bu olay, KHDAK'da %2-7 oranında görülmektedir; daha sık olarak genç ve sigara kullanmayan hastalarda izlenmektedir. EML4-ALK histolojik olarak solid paternli, taşlı yüzük hücre değişikliği gösteren adenokarsinomlarda daha sık izlenmektedir (29). EML4-ALK rearanjmanı immünhistokimya veya FİSH yöntemi ile saptanmaktadır. Tedavide bu hedefe yönelik olarak crizotinib, ceritinib ve alectinib kullanılmaktadır (4, 125).

2.6.3 ROS1 yeniden düzenlenmeleri

ROS1, 6q22' de lokalize, insülin reseptör ailesine mensup bir tirozin kinazdır. ROS1 kinaz hayatta kalma, hücre proliferasyonu ve hücre çoğalmasını kontrol eden sinyal yolaklarını (STAT3, PI3K/AKT/mTOR, RAS-MAPK/ERK) aktive etmektedir. ROS1 ile ilgili farklı onkojenik füzyon partnerleri (EZR, CD74, SLC34A2, LRIG3, SDC4, TPM3, FIG, GOPC, CCDC6, KDELR2 LIMA1 ve MSN) tespit edilmiştir. ROS1 füzyonu sigara öyküsü bulunmayan, genç hastalarda daha sık görülmektedir. EML4-ALK1 translokasyonunda kullanılan crizotinib'in ROS1 yeniden düzenlenmesi bulunan kanserlerde de etkili olduğu gösterilmiştir (5, 26, 126).

2.6.4 RET yeniden düzenlenmeleri

RET bir tirozin kinaz inhibitörü olup, 10q11.2' de lokalizedir. RET mutasyonlarının ve yeniden düzenlenmelerinin medüller ve papiller tiroid kanserlerindeki rolü iyi bilinmektedir. RET yeniden düzenlenmesinin akciğer kanserlerinde rolü 2011 yılında keşfedilmiştir. KHDAK olgularının %1-2 kadarında görülmektedir. 10. kromozomda perisentrik bölgede intrakromozomal yeniden düzenlenme/somatik inversiyon oluşmakta sonuç olarak liganddan bağımsız RET

tirozin kinaz aktivasyonu meydana gelmektedir. Füzyon sıklıkla RET-KIF5B şeklinde izlenmektedir. Yedi farklı RET-KIF5B füzyonu tanımlanmıştır. Onkojenik mekanizma ALK'ya benzer özelliktedir. Olgular sıklıkla, genç ve sigara öyküsü bulunmayan hastalardır(126). Morfolojik açıdan, taşlı yüzük hücresi içeren solid paternli ve ekstrasellüler müsin içeren, kribriform paterne sahip akciğer kanseri ön plandadır. KIF5B-RET ve CCDC6-RET füzyonu gösteren olgularda tedavide, multikinaz inhibitörü vandetanib kullanılmaktadır (5, 26, 108).

2.6.5 BRAF mutasyonu

Akciğer kanseri olgularının %2-10 kadarında BRAF mutasyonu izlenmektedir (14). BRAF bir serin-treonin kinaz olup MAPK yolağında rol almaktadır. KHDAK'da BRAF mutasyonlarının yarısı ekzon 15'de V600E mutasyonu şeklindedir (34). Seyrek olarak kinaz domaininde D594G ve L596R mutasyonları ve G-loop bölgesinde, G465V ve G468A mutasyonları izlenmektedir. Adenokanser olgularında %4, YHK'da %6 oranında BRAF mutasyonu görülmektedir. V600E BRAF mutasyonu daha sık olarak genç kadın hastalarda izlenmektedir (126). Melanoma tedavisinde kullanılan vemurafenib, KHDAK'da V600E BRAF mutasyonlarında kullanılmaktadır. BRAF mutasyonlarında da MEK ve RET inhibitörleri de kullanılmaktadır (5, 37).

2.6.6 MET amplifikasyonu

MET geni, 7q21 bölgesinde lokalize olup, hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR) kodlamaktadır. HGFR, EGFR'ye benzer şekilde, tirozin kinaz aktivitesine sahip olup hücre büyümesi, invazyon ve metastaz yapma gibi özellikleri düzenlemektedir (108). KHDAK'da primer MET amplifikasyonu sadece %2 oranında görülmekte, ancak EGFR TKİ ile tedavi sonrası, %20 oranında direnç gelişimi ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır (83). MET amplifikasyonu, EGFR TKİ ile tedavide ortaya çıkan direnci araştırmak amacı ile FİSH yöntemi ile test edilmekte; amplifiye olgularda tedavide crizotinib kullanılmaktadır (29, 108).

2.6.7 HER2 mutasyonu/amplifikasyonu

HER2 (ERBB2), EGFR gibi ERB ailesine mensup bir tirozin kinazdır. KHDAK'da HER2 mutasyonu %1-2, HER2 amplifikasyonu ise, %6-35 oranında görülmektedir (4). Sigara içmeyen kadın hastalarda ve adenokarsinomlarda daha sık olarak izlenmektedir. HER2 mutasyonu bulunduran olgularda trastuzumab ve afatinib tedavisinin faydalı olduğu gösterilmiştir (126, 127).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 2012-2015 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD, Moleküler Patoloji Laboratuarı'nda EGFR mutasyon analizi yapılmış olan toplam 600 olgu retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

3.1 Kayıtlar üzerinde yapılan değerlendirme

EGFR mutasyon analizi yapılmış olan 600 olgunun verilerine bilgisayar kayıtlarından ve arşiv sisteminden ulaşılmıştır. Veri tabanından hastanın yaşı, cinsiyeti, patolojik örneğin tipi (sitoloji, biyopsi, rezeksiyon), lokalizasyon (metastatik veya primer olması), materyalin kaynağı (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri ya da konsültasyon), tanı verilirken yapılan immünhistokimyasal incelemeler, DNA analizinde elde edilen fragman uzunluğu, EGFR mutasyon durumu (var ya da yok), mutasyonun yerleşimi ve tipi, EGFR geninde SNP varlığı (var ya da yok), ALK immünhistokimyasal pozitifliği/gen rearanjmanı (var ya da yok) kaydedilmiştir.

3.2 Morfolojik değerlendirme

AÜTF Patoloji ABD arşivinden 408 olguya ait HE, özel ve immünhistokimyasal boyalı kesitler ve Sitoloji BD arşivinden 192 olguya ait HE, May Grünwald Giemsa, özel ve immünhistokimyasal boyalı kesitler çıkarılarak yeniden değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede 1.) tanılar gözden geçirilmiş; 2.) yeterli miktarda doku içeren tüm adenokarsinoma olguları patern açısından yeniden değerlendirilmiş, izlenen adenokarsinoma paternleri %5'lik dilimler halinde kaydedilmiş; 3.) olgular müsin varlığı açısından (daha önce yapılmış özel boyaları ve HE kesitleri kullanılarak) değerlendirilmiştir. Müsin açısından yapılan değerlendirmede tümörde ekstraselüler ya da intraselüler müsin varlığı pozitif (+) ya da negatif (-) şeklinde kayda alınmıştır. Ayrıca bu değerlendirmede arşivimizde yeterli parafin bloğu olan tüm olguların lamları üzerinde tümörü temsil eden alanlar, daha sonraki incelemeler için çizilerek ayrılmıştır.

3.3 İmmünhistokimyasal değerlendirme

İmmünhistokimyasal değerlendirme, çalışmanın geriye dönük dizaynı nedeniyle üç ayrı grupta yapılmıştır:

a.) Bölümümüzde daha önce TTF-1 ve/veya Napsin A açısından değerlendirilen olgulara ait immünhistokimyasal kesitler yeniden değerlendirilmiştir. Bu kesitler üzerinde yapılan incelemede, Napsin A için sitoplazmik özellikte boyanmalar, TTF-1 için ise nükleer boyanmalar dikkate alınarak olgular her antikor için, (+) ya da (-) olarak kaydedilmiştir.

b.) Daha önce TTF-1 ve Napsin A açısından değerlendirilmemiş olan ve yeterli parafin dokusu bulunan 57 rezeksiyon materyali için ise, bu çalışma kapsamında immünhistokimyasal boyama yapılmıştır. Bunlara ait bloklardan, her olgudan daha önce lam üzerinde seçilmiş alandan bir adet olmak üzere; "McKesson" punch biyopsi iğnesi ile, 4 mm çaplı doku silindirleri çıkarılmıştır. Bu 57 olgu toplam 4 adet alıcı blok üzerinde haritalanarak bir araya getirilmiştir. Hazırlanan 'array' bloğundan elde edilen 4 mikrometre kalınlıktaki kesitler "pozitif yüklü" lamlara alınmıştır. Hazırlanan kesitler, Ventana (Benchmark XT) otomatik boyama cihazında, deparafinizasyon işlemi sonrasında, streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile "ultraView Universal DAB Detection Kit" kullanılarak, uygun pozitif ve negatif kontroller eşliğinde, TTF-1 ve Napsin A ile boyanmıştır. Kullanılan antikorların klonları, dilüsyon oranları ve ticari isimleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Tümör hücrelerinin TTF-1 ile nükleer ve Napsin A ile sitoplazmik granüler boyanması pozitif olarak değerlendirilmiştir. Her iki antikor ile de boyanma şiddetinden bağımsız olarak, boyanan olgular "pozitif" ve boyanmayan olgular "negatif" olarak gruplandırılmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlar

Antikor	Klon	Dilüsyon	Ticari isim
TTF-1	8G7G3/1	1/200	Thermo
NapsinA	TMU-AD2	1/100	Biocare

c.) Bölümümüze konsültasyon olarak gelen, dokunun azlığı ya da tanı anında ihtiyaç duyulmaması nedeniyle bölümümüzde TTF-1 ve Napsin A açısından değerlendirilmemiş olan olguların ilk patoloji raporları incelenmiş; bunlarda kaydı bulunduğu taktirde, ilk merkezde yapılmış olan TTF-1 ve/veya Napsin A boyama sonuçları (+) ya da (-) olarak kayıt altına alınmıştır.

3.4 Mutasyon analizi

Bu çalışmada, yeni bir mutasyon analizi yapılmamış, daha önce rutin hasta tedavisi için yapılmış bulunan analiz sonuçları kullanılmıştır. Bu analiz için kurumumuzda uygulanmış olan genel yöntem DNA izolasyonu gerçekleştirip, DNA'nın kalite ve miktar açısından değerlendirilmesidir. Daha sonra EGFR mutasyonunu saptamak için direkt sekanslama kullanılarak moleküler analiz gerçekleştirilmektedir. Bunun için izlenen yol aşağıdaki gibidir (Resim 3.1):

a.) HE kesitler üzerinde, tümörlü alanın ya da fragmanın işaretlenmesi;

b.) Parafin bloktan lamlar üzerine alınan yeni kesitlerden tümör alanının diseksiyonu, Qiagen QiaAMP FFPE Tissue kit kullanılarak DNA ekstraksiyonu;

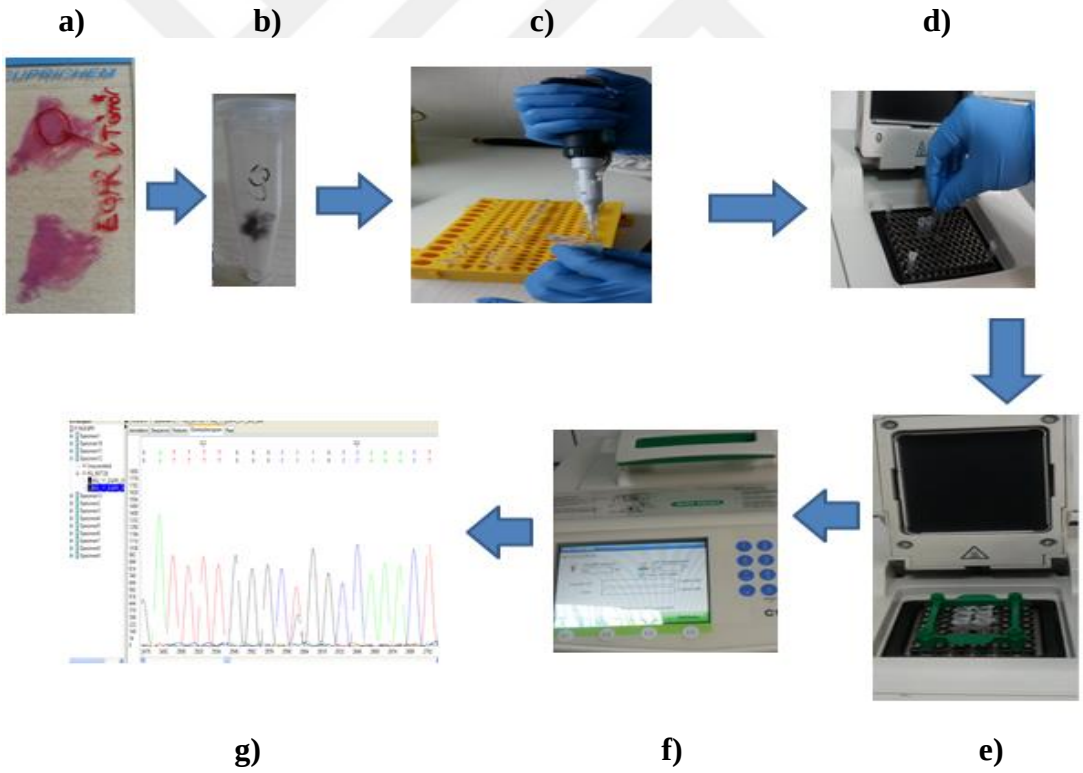
c.) Elde edilen DNA'nın saflığı ve miktarının A260/280 oranı dikkate alınarak değerlendirilmesi ve DNA bütünlüğünü kontrol etmek için Agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi;

ç.) Elde edilen DNA örneklerinde EGFR mutasyonunu tespit etmek için "forward" ve "reverse" primerler [(5′-gctgaggtgacccttgtctc-3′ (Ekzon 18 forward); 5′acagcttgcaaggactctgg-3′ (Ekzon 18 reverse); 5′

gctggtaacatccacccaga-3′ (Ekzon 19 forward), 5′-gagaaaaggtgggcctgag-3′ (Ekzon 19 reverse); 5′- catgtgccccttccttctg-3′ (Ekzon 20 forward); 5′-gatcctggctccttatctcc-3′ (Ekzon 20 reverse); 5′-cctcacagcagggtcttctc-3′ (Ekzon 21 forward), 5′ cctggtgtcaggaaaatgct-3′ (Ekzon 21 reverse)] kullanılarak EGFR geni 18,19, 20 ve 21. ekzonlarının PCR ile çoğaltılması;

d.) PCR ürünlerinin Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 ile çift yönlü (forward ve reverse) olarak DNA Sequencer (Applied Biosystem Foster City, CA) cihazında sekanslanması;

e.) Elde edilen dizilerin NCBI Blast DNA bilgi bankasındaki genlerin orijinal dizileri ile karşılaştırılarak mutasyon ve SNP'nin tespiti.



Şekil 3.1. Moleküler analizde izlenen yol.

a-tümör alanın seçilmesi
b- tümörün makrodiseksiyonu
c-f DNA ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonun gerçekleştirilmesi
g- elektroferogram görüntüsü

3.5 İstatiksel analiz

Elde edilen verilerin (yaş, cins, materyal tipi, kaynağı, tanı, adenokarsinoma olgularında baskın patern, müsin durumu, TTF-1 ve Napsin A boyanma sonuçları, EGFR mutasyon durumu, ALK yeniden düzenlenmesi durumu) analizi 'SPSS for Windows 15' paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; dağılımı normal olan değişkenler için ortalama ± standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için ortanca (min – maks), nominal değişkenler ise (%) olarak gösterilmiştir.

Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği ANOVA varyans analizi testi ile, ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testi ile araştırılmıştır. Nominal değişkenler Pearson Ki-Kare veya Fisher exact testi ile değerlendirilmiştir. $p<0,05$ sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Genel bulgular

Çalışmaya dahil edilen EGFR mutasyon analizi yapılmış olan 600 olguya ait genel veriler Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre olguların %72.8'i erkeklerden oluşmaktadır. 600 olgunun genel yaş ortalaması 60.87 (30-84) olup, erkek ve kadınlarda ortalama yaş sırası ile 60.50 (30-84) ve 61.84 (31-83) olarak saptanmıştır. Olguların %76.2'sini adenokarsinoma olguları oluşturmaktadır. Çalışma materyali birbirine yakın oranlarda biyopsi, rezeksiyon ve sitoloji materyali içermektedir. Olguların büyük kısmı (%66.1) primer tümörlerden çalışılmıştır ve yine büyük bölümü (%68.2), AÜTF kliniklerinde değerlendirilmiş olgulara aittir. Çalışmaya alınan olguların EGFR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 600 olgudan 495 tanesinde sekans analizinin çalışılan 4 ekzon (EGFR ekzon 18, 19, 20 ve 21) için de başarılı olduğu izlenmektedir. EGFR mutasyonu ile bu aşamadan sonraki ilgili değerlendirmelere 4 ekzonu da analiz edilebilen olgular (495 olgu) ile; bir ya da daha fazla ekzonda teknik başarısızlık gözlense bile, başarılı olan herhangi bir ekzonda EGFR mutasyonu saptanan olgular (4 olgu) olmak üzere toplam 499 olgu dahil edilmiştir. Diğer bir deyişle, herhangi bir ekzonun analizi başarısız olan ve başarılı ekzonlarda da mutasyon izlenmeyen 101 olgu EGFR ile ilgili analizlere dahil edilmemiştir. EGFR analizi açısından başarılı olarak değerlendirilen 499 olguya ait genel veriler Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan 600 olguya ait genel veriler

Olguların dökümü	Olgu n (%)
Yaş	60.86 (30-84)
Cinsiyet: Erkek Kadın	 437 (72.8) 163 (27.2)
Tanı: Adenokarsinoma KHDAK-NOS Diğerleri (YHK, pleomorfik, KHK)	 457 (76.2) 101(16.8) 42 (7)
Materyal tipi: Biyopsi Rezeksiyon Sitoloji	 196 (32.7) 212 (35.3) 192 (32)
Primer/metastatik: Primer Metastatik	 397(66.1) 203 (33.9)
Materyalin kaynağı AÜTF Konsültasyon (hazır blok/kesit)	 409 (68.2) 191 (31.8)

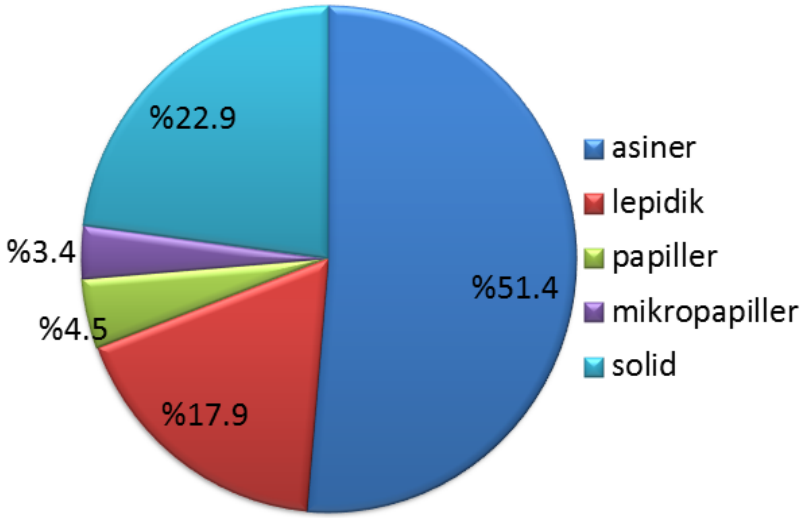
Tablo 4.2. EGFR mutasyon analizi açısından başarılı olan 499 olguya ait genel veriler

Olguların dökümü	Olgu n (%)	EGFR mutant (%)	EGFR "wild" (%)
EGFR analiz sonucu	499 (100)	70 (14)	429 (76)
Yaş:	60.84 (30-84)	62.15 (31-82)	60.63 (30-84)
Kadın Erkek	141 (28.3) 358 (72.6)	43 (30.5) 27 (7.5)	98 (69.5) 331 (92.5)
Adenokarsinoma KHDAK-NOS Diğerleri	386 (77.4) 82 (16.4) 31 (6.2)	66 (17.1) 4 (4.9) 0	320 (82.9) 78 (95.1) 31 (100)
Biyopsi Rezeksiyon Sitoloji	148 (29.7) 169 (33.9) 182 (36.5)	20 (13.5) 26 (15.4) 24 (13.2)	128 (86.5) 143 (84.6) 158 (86.8)
Primer Metastatik	327(65.7) 171 (34.3)	51 (15.6) 19 (11.1)	276 (84.4) 152 (88.9)
AÜTF Konsultasyon (hazır blok/kesit)	355 (71.1) 144 (28.9)	49 (13.8) 21 (14.6)	306 (86.2) 123 (85.4)

4.2 Histopatolojik, immünhistokimyasal bulgular

4.2.1 Baskın patern

Patern değerlendirilmesine imkan verecek kadar doku içeren toplam 179 adenokarsinomaya ait baskın patern dağılımı Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre olgularımızın büyük kısmında (%51.4) asiner patern hakimdir; en az görülen baskın patern ise mikropapiller paterndir (%3.4). Paternlerin cinsiyet ile ilişkisi değerlendirildiğinde, solid paternin erkeklerde (35 olgu, %85.4), kadınlara göre (6 olgu %14.6) daha fazla gözlendiği saptanmıştır. Ayrıca mikropapiller paternin baskın olarak görüldüğü olguların tümünün erkek hastalar olması dikkat çekicidir. Ancak, baskın patern ile cinsiyet arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.



Şekil 4.1. Baskın paterni değerlendirilebilen tümörlerde izlenen baskın patern dağılımı (n=179).

4.2.2 Müsin varlığı

Müsin varlığı açısından değerlendirilen 600 olgunun 114 (%19) tanesinde ekstraselüler ya da intraselüler müsin varlığı saptanmıştır. Hem müsin varlığı hem de baskın patern açısından değerlendirilebilen 179 olgunun 59'unda müsin varlığı dikkati çekmiştir. Solid patern baskın tümörlerde daha yüksek oranda (%39) müsin varlığı izlenirken; mikropapiller ve papiller paternli tümörlerde ise daha düşük oranda (sırasıyla %16.7 ve %12.5) müsin varlığı gözlenmiştir. Ancak müsin varlığı ile baskın patern arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

4.2.3 TTF-1

TTF-1 açısından değerlendirilen toplam 477 olgunun 361'i (%75.7) TTF-1 pozitif, 116'sı (%24.3) ise TTF-1 negatif özelliktedir. TTF-1 pozitif olgularda ortalama yaşın 60.99 (30-84), TTF-1 negatif olgularda ise 60.35 (32-82) olduğu saptanmıştır. TTF-1 ile yaş arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

TTF-1 ile cinsiyet arasında ilişkiye bakıldığında; kadın hastaların 117'sinde (%85.4), erkek hastaların 244'ünde (%71.8) TTF-1 pozitif olarak saptanmıştır. TTF-1 ile cinsiyet arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p<0.05$).

TTF-1 ile baskın patern arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; TTF-1 pozitif olguların %54.3'nün asiner, %3.9'unun ise mikropapiller patern içerdiği gözlenmiştir. TTF-1 ile baskın patern arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

TTF-1, müsin arasındaki ilişkiye bakıldığında, TTF-1 pozitif 361 olgunun 70'inde (%19.4) müsin varlığı saptanmıştır. TTF-1 pozitifliği ile müsin varlığı arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki görülmemiştir.

4.2.4 Napsin A

Napsin A açısından değerlendirilen toplam 403 olgunun 292'si pozitif, 111'i negatif bulunmuştur. Napsin A pozitif olgularda ortalama yaşın 61.26 (30-84), Napsin A negatif olgularda ise 60.15 (32-82) olduğu görülmüştür. Napsin A ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.403$).

NapsinA cinsiyet ilişkisine bakıldığında Napsin A pozitif olguların 197'sinin (%67.5) erkek ve 95'inin (%32.5) kadın olduğu görülmüştür. Napsin A negatif olguların %80.2'si erkek, %19.8'i kadın hastalardır. Napsin A ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.05$).

Napsin A ile baskın patern ilişkisi karşılaştırıldığında Napsin A pozitif olguların daha yüksek oranda asiner patern (%54.2), daha düşük oranda ise papiller (%5.9) ve mikropapiller patern (%3.4) içerdiği gözlenmiştir. Napsin A ile baskın patern arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Napsin A ile müsin karşılaştırıldığında Napsin A pozitif 64 (%21.9) olguda müsin varlığı izlenirken, 228 (%78.1) olguda müsin saptanmamıştır. Napsin A negatif olguların 21'inde (%18.9) müsin izlenirken, 90'ında (%81.1) müsin varlığına rastlanmamıştır. Napsin A ile müsin varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

TTF-1 ile Napsin A arasındaki ilişkiye bakıldığında, bu iki belirteç arasında bir uyum olduğu gözlenmiştir (k=0.812) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Akciğer adenokarsinomalarında TTF-1 ve Napsin A açısından olguların dağılımı.

	Napsin A pozitif n (%)	**Napsin A negatif n (%)**
TTF-1 pozitif n (%)	277 (82.9)	18 (5.5)
TTF-1 negatif n (%)	6 (1.8)	33 (9.8)

4.3 ALK

Bu serideki olgular içerisinde ALK açısından da değerlendirilmiş olan 487 olgu mevcuttur. Bu olgulardan 468 tanesi (%96.1) immünhistokimyasal olarak ALK negatif bulunmuştur. 19 (%3.1) olgu ise, immünhistokimyasal olarak ALK pozitifliği gösteren ve/veya FISH ile gösterilen ALK yeniden düzenlenmesi içeren ALK pozitif olgulardır. ALK pozitif olgularda yaş ortalamasının 52.26 (30-77), ALK negatif olgularda ise yaş ortalamasının 61.56 (30-83) olduğu saptanmıştır. ALK pozitif ve negatif olguların yaşları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Kadın hastaların 9'unda (%6.5), erkek hastaların 10'unda (%2.9) ALK pozitif olarak saptanmıştır. Diğer taraftan bakıldığında ise ALK pozitif olguların 9'unun (%47.4) kadın ve 10'nun (%52.6) erkek olduğu görülmüştür. ALK durumu ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

ALK baskın patern ilişkisi karşılaştırıldığında, baskın patern açısından değerlendirilebilen ALK pozitif olguların 3'ünün (%60) solid ve 2'sinin (%40) asiner patern içerdiği saptanmıştır. ALK ile baskın patern arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Müsin ile ALK arasındaki ilişki karşılaştırıldığında; 19 ALK pozitif olgunun 9'unda (%47.4) müsin varlığı saptanmıştır. ALK ile müsin arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.05$).

TTF-1 ile ALK arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; ALK pozitif olguların 14'ünde (%93.3) TTF-1 pozitif izlenirken, 1'inde (%6.7) negatif olarak saptanmıştır. ALK pozitifliği ile TTF-1 arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Napsin A ile ALK arasındaki ilişki karşılaştırıldığında; ALK pozitif 12 olgunun hepsinin (%100) Napsin A pozitif olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan bakıldığında ALK negatif 233 (%71.5) olgunun Napsin A pozitif, 93'ünün (%28.5) ise Napsin A negatif olduğu görülmüştür. ALK pozitifliği ile Napsin A arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.05$).

4.4 EGFR

4.4.1 EGFR Mutasyon Analizinin Teknik Başarısı

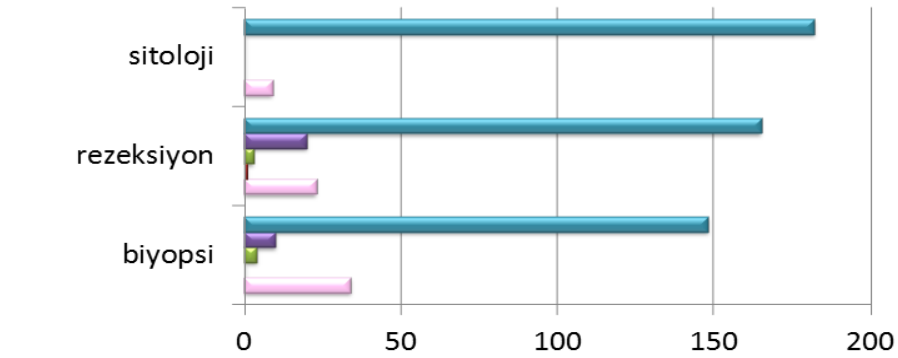
4.4.1.1 Materyal tipine göre

EGFR mutasyon analizi yapılmış 600 olgunun 495'inde 4 ekzon, 30'unda 3 ekzon, 7'inde 2 ekzon, 1'inde ise sadece 1 ekzon mutasyon açısından değerlendirilebilmiş; 67 olguda ise ya hiç DNA elde edilememiş ya da elde edilmesine karşın, hiçbir ekzonda başarı elde edilememiştir. DNA elde edilebilen 581 olguda ortalama DNA fragman uzunluğunun 390.01 (100-600) olduğu saptanmıştır. Biyopsi materyallerinde ortalama DNA fragman uzunluğu 365.05 (100-600), rezeksiyon materyallerinde 341.35 (100-600) ve sitoloji materyalinde ise 468.98 (100-600) olarak saptanmıştır. Materyal tipi ile elde edilen DNA fragman uzunluğu arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Bu ilişki Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. DNA fragman uzunluğu ve materyal tipi ilişkisi

Materyal tipi	N	Ortalama	Standart sapma	Ortanca
Biyopsi materyali	186	365.05 (100-600)	128.249	400
Rezeksiyon materyali	208	341.34 (100-600)	122.067	400
Sitoloji materyali	187	468.98 (100-600)	155.889	600
Total	581	390.01 (100-600)	146.090	400

Analiz başarısının materyal tipi ile ilişkisi incelendiğinde: sitoloji materyallerinin %94.8'inde, rezeksiyon materyallerinin %77.8'inde ve biyopsi materyallerinin %75.5'inde 4 ekzonun analizinin de başarılı olduğu saptanmıştır. Materyal tipi ve başarılı ekzon sayısı arasında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu ilişki Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

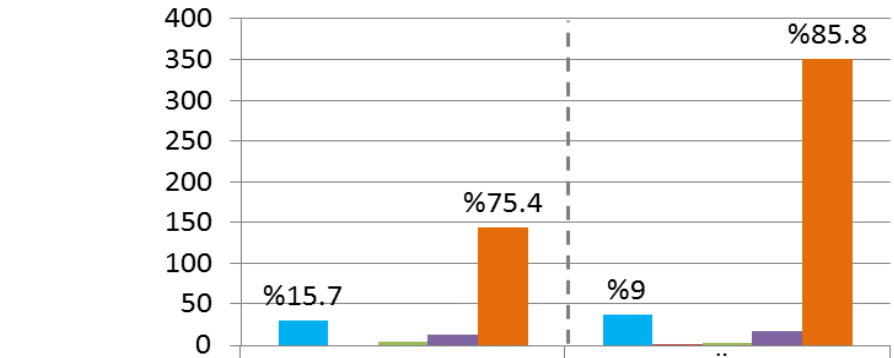


	biyopsi	rezeksiyon	sitoloji
4 ekzon başarılı	148	165	182
3 ekzon başarılı	10	20	0
2 ekzon başarılı	4	3	0
1 ekzon başarılı	0	1	0
başarısız	34	23	9

Şekil 4.2. Materyal tiplerine göre analiz başarısı.

4.4.1.2 Materyal kaynağına göre

AÜTF hastanelerinde tanı alan ve tespit/takip işlemleri anabilim dalımız patoloji laboratuarında yapılmış olan olgularda DNA fragman uzunluğu ortalamasının 405.76 (100-600) ve dış merkez kaynaklı olgularda ise 355.49 (100-600) olduğu saptanmıştır. Materyal kaynağı ile elde edilen DNA fragman uzunluğu arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Analiz başarısının materyal kaynağı ile ilişkisi incelendiğinde: AÜTF hastanelerinde tanı alan ve tespit/takip işlemleri anabilim dalımız patoloji laboratuarında yapılmış olan olguların 351'inde (%85.8), dış merkez kaynaklı olguların 144'ünde (%75.4) 4 ekzonun da başarılı olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan bakıldığında AÜTF kaynaklı olguların 37'sinde (%9) ve dış merkez kaynaklı olguların 30'unda (%15.7) hiçbir ekzonun analiz edilemediği saptanmıştır. Analiz başarısı ile materyal kaynağı arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu ilişki Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



	Kons	AÜTF
tümü başarısız	30	37
1 ekzon başarılı	0	1
2 ekzon başarılı	4	3
3 ekzon başarılı	13	17
4 ekzon başarılı	144	351

Şekil 4.3. Materyal kaynağına göre analiz başarısı.

4.4.1.3 Asit takibi işlemine göre

Bu çalışmada, dekalsifikasyon amacı ile asit takibine girmiş olan olguların DNA fragman uzunluğu ortalamasının 288.24 (100-600) ve girmemiş olgularda ise 393.83 (100-600) olduğu saptanmıştır. EGFR mutasyon analizinde DNA fragman

uzunluğu ile materyalin asit takibine girip girmemesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Asit takibine girmiş olan olguların %47.1'inde, asit takibine girmeyen olguların ise sadece %10.1'inde 4 ekzonda da başarısızlık olduğu görülmüştür. EGFR mutasyon analizinde başarı sağlanan ekzon sayısı ile materyalin asit takibine girip girmemesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

4.4.2 EGFR mutasyon oranı, dağılımı, klinikopatolojik özellikler ile karşılaştırılması

EGFR mutasyonu açısından değerlendirilebilen 499 olguya ait genel veriler Tablo 4.2'de verilmiştir. 499 olgunun 70'nin (%14.1) EGFR mutant, 426'sının ise EGFR"wild" tip olduğu görülmüştür. 70 olguda toplam 75 mutasyon saptanmıştır. Mutasyonların ekzonlara göre dağılımına bakıldığında; ekzon18'de 5 (%6.7), ekzon 19'da 40 (%53.3), ekzon 20 'de 7 (%9.3) ve ekzon 21'de 23 (%30.7) mutasyon saptanmıştır Bu mutasyonlardan en sık izlenenleri ekzon 19'da izlenen "in frame" delesyon ve insersiyonlar (%53.3) ile, ekzon 21'de izlenen L828R mutasyonudur (% 28). Bu seride 5 olguda çift mutasyon saptanmıştır (Şekil 4.4 ve 4.5).

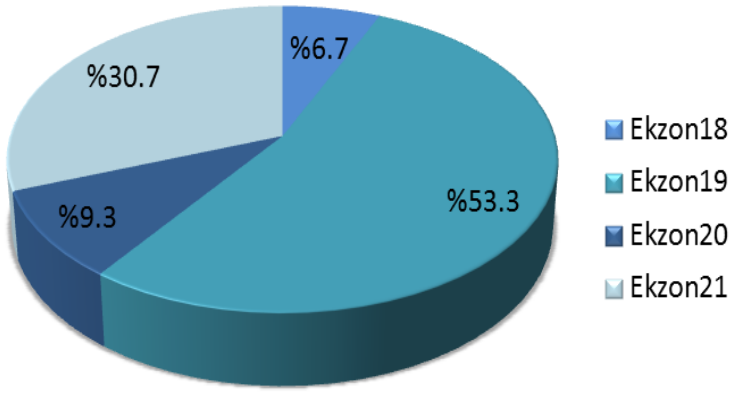
EGFR geni ekzon 20'de yer alan Q787QSNP'i bu seri içerisinde çok sık olarak izlenmiştir. Bu SNP'in varlığı açısından değerlendirilmiş olan 68 EGFR mutant olgunun 54'ünde (%79.4) ve 417 EGFR "wild" tip olgunun 336'sında (%80.6) Q787Q SNP varlığı izlenmiştir. EGFR mutasyon durumu ile SNP varlığı arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.4.2.1 EGFR mutasyonu ile materyal özelliklerinin karşılaştırması

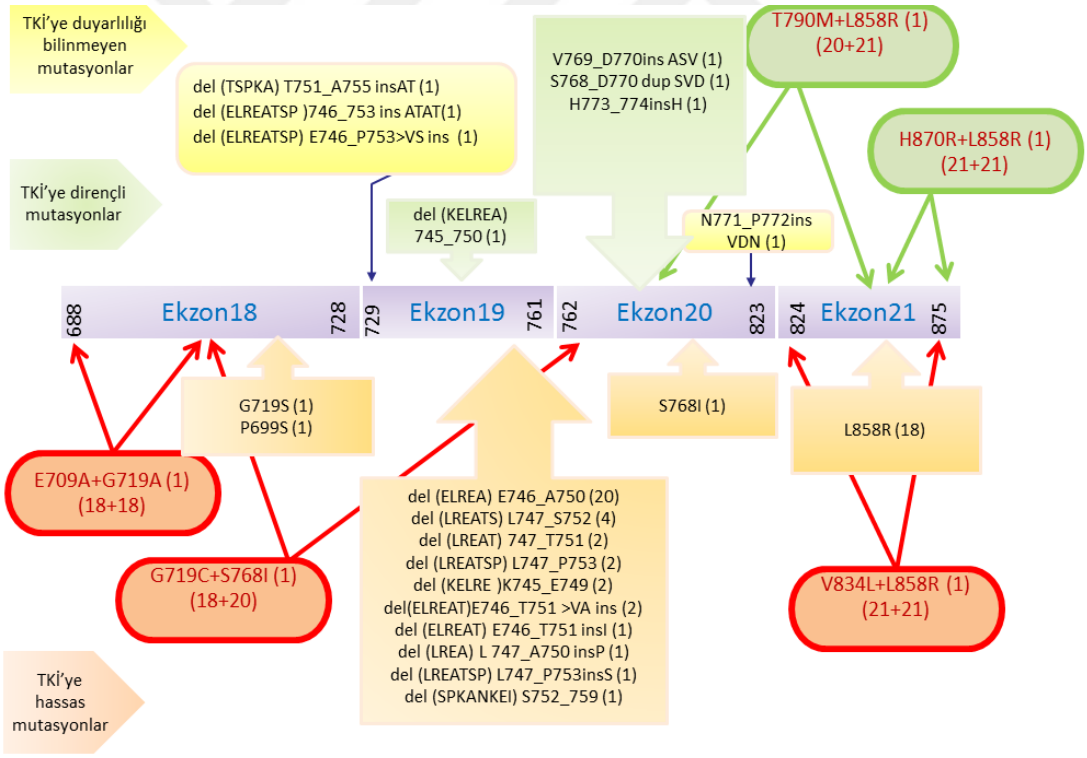
Rezeksiyon materyallerinin 26'sında (%15.4), biyopsi materyallerinin 20'sinde (%13.5) ve sitoloji materyallerinin 24'ünde (%13.2) EGFR mutant olarak saptanmıştır. EGFR mutasyon durumu ile materyal tipi arasında istatiksel anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

Primer ve metastatik olgularda EGFR mutasyon durumu karşılaştırıldığında; primer olguların 51'inde (%15.6) ve metastatik olguların 19'unda (%11.1) EGFR

mutant bulunmuştur. EGFR mutasyon durumu ile, olguların primer veya metastatik olması arasında istatiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır (p>0.05).



Şekil 4.4. EGFR mutasyonlarının (n:75) ekzonlara dağılımı.



Şekil 4.5. Saptanan mutasyonların ekzonlara göre dağılımı ve EGFR TKİ tedavisine muhtemel yanıtları

AÜTF Patoloji ABD'de tanı alan olguların 49'unda (%13.8), dış merkezden konsülte edilen olguların 21'inde (%14.6) EGFR mutant olarak saptanmış ve bu parametre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.4.2.2 EGFR mutasyonu ile yaş ve cinsiyet özelliklerinin karşılaştırılması

EGFR mutant olgularda yaş ortalamasının 62.1 (31-82) ve EGFR "wild" tip olgularda ise 60.6 yıl (30-84) olduğu saptanmıştır. EGFR mutasyonu ile yaş arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

EGFR mutant olguların 43'ünün (%61.4) kadın, 27'sinin (%38.6) erkek olduğu görülmüştür. EGFR mutasyon oranı kadın hastalar için %30.5, erkekler için % 7.5'dir. EGFR mutasyonu ile cinsiyet arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.6).

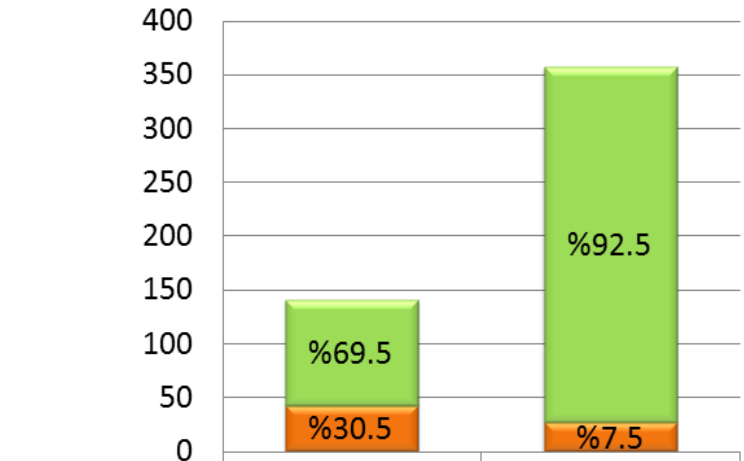
4.4.2.3 EGFR mutasyonu ile histopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

EGFR mutant olguların 66'sının (%94.3) adenokarsinoma, 4'ünün (%5.7) ise KHDAK-NOS tanısı almış olduğu saptanmıştır. 'Diğer' olgular arasında mutant olgu görülmemiştir. Adenokarsinoma olgularının %17.1'de, KHDAK-NOS olgularının %4.9'unda EGFR mutant olarak saptanmıştır. EGFR mutasyonu ile tanı kategorisi arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.05$).

Baskın paterni değerlendirilebilen 150 olgunun 28'inde EGFR mutant olarak saptanmıştır. EGFR mutasyonu en sık olarak mikropapiller paternin baskın olduğu olgularda (5 olgunun 2'sinde, %40) ve en düşük oranda da solid patern içeren olgularda (37 olgunun 2'sinde, %5.4) saptanmıştır. Adenokarsinoma olgularında izlenen baskın patern ile EGFR mutasyon durumu arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.7).

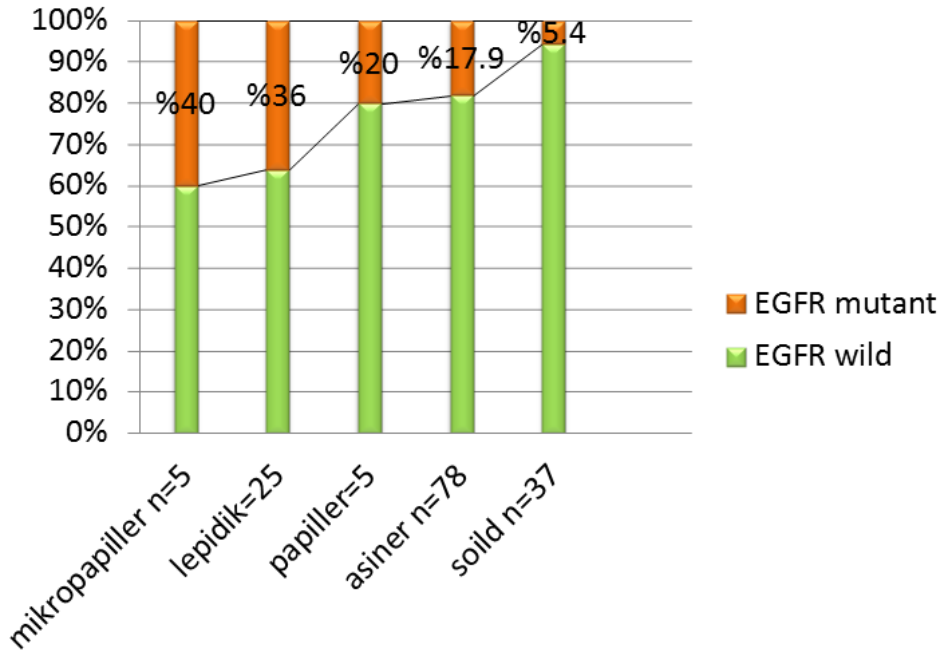
EGFR mutant olgularda, izlenen baskın patern ile mutasyonun izlendiği ekzon arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; asiner patern içeren 14 olgunun 11'inde (%78.6) mutasyonun ekzon 19'da yer aldığı dikkati çekmiştir. Ancak bu ilişki istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.8).

Ekstraselüler ya da intraselüler müsin içeren olguların 84'ü (%93.3) EGFR "wild" tip, sadece 6'sı (%6.7) EGFR mutant olarak saptanmıştır. EGFR mutasyon durumu ile müsin varlığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 4.9).

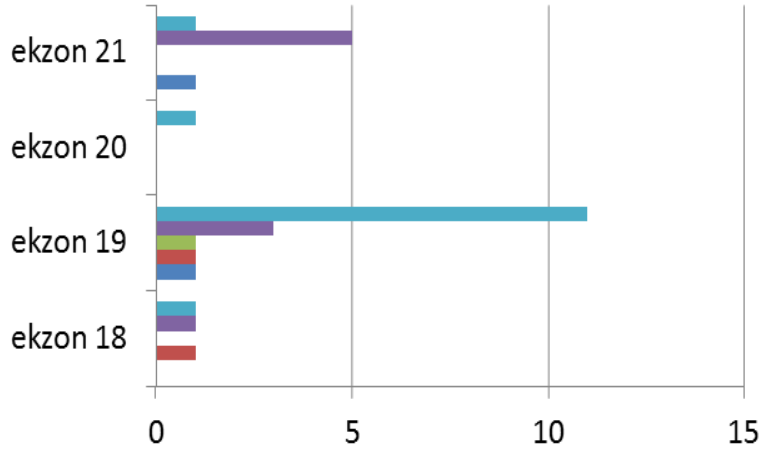


	Kadın n=146	Erkek n=386
Wild tip	98	331
EGFR mutant	43	27

Şekil 4.6. EGFR mutasyonu bulunduran ve bulundurmayan olguların cinsiyet açısından dağılımı

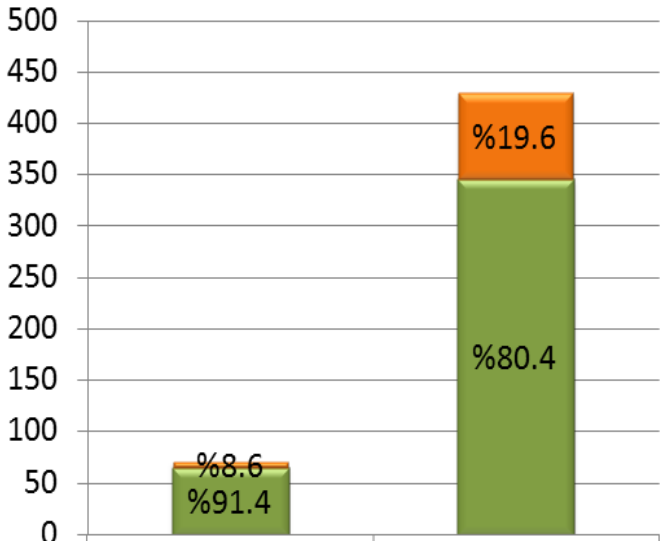


Şekil 4.7. EGFR mutasyon durumunun baskın patern ile ilişkisi



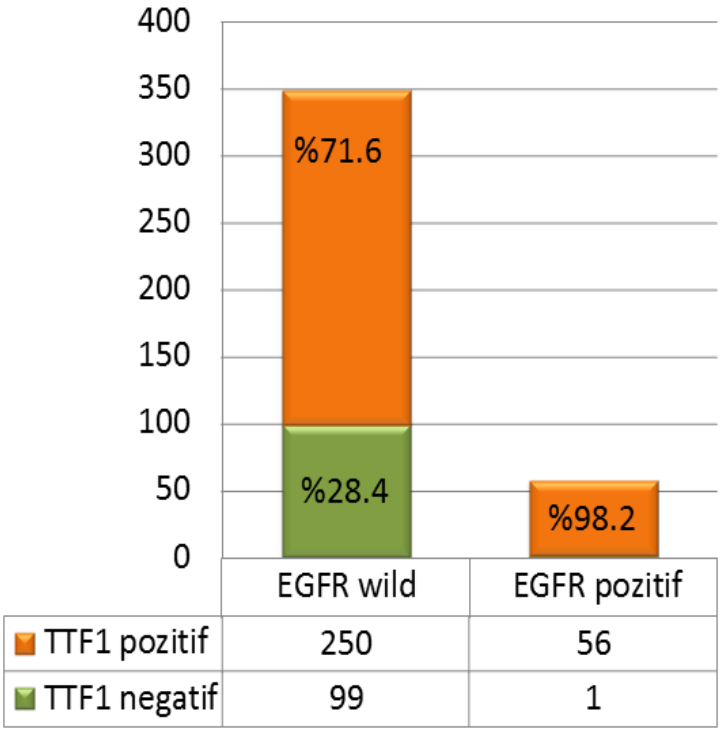
	ekzon 18	ekzon 19	ekzon 20	ekzon 21
asiner	1	11	1	1
lepidik	1	3	0	5
papiller	0	1	0	0
mikropapiller	1	1	0	0
solid	0	1	0	1

Şekil 4.8. Baskın patern ile mutasyonun izlendiği ekzonların ilişkisi

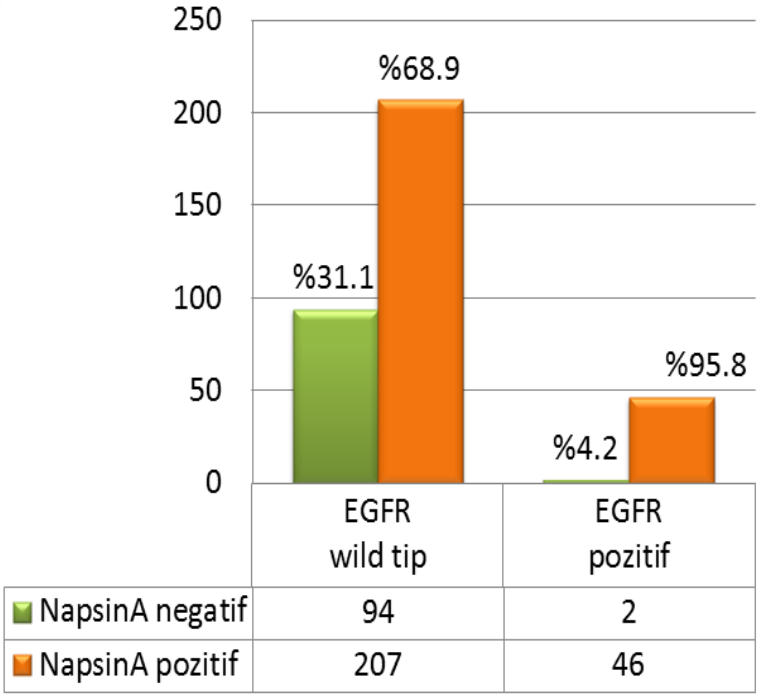


	EGFR mutant	EGFR wild
Müsin pozitif	6	84
Müsin negatif	64	345

Şekil 4.9. EGFR mutasyonu ve müsin varlığı ilişkisi



Şekil 4.10. EGFR mutasyonu ve TTF-1



Şekil 4.11. EGFR mutasyonu ve Napsin A

Daha önce TTF-1 açısından incelenmiş 373 olgu mevcuttur; ayrıca 57 olgu da bu çalışma kapsamında, TTF-1 ile boyanarak değerlendirilmiştir. Hem EGFR hem TTF-1 açısından değerlendirilebilen 406 olgu mevcuttur. 406 olgu arasında toplam 57 adet EGFR mutant ve 349 adet "wild" tip olgu bulunmaktadır. EGFR mutant olguların 56'sı (%98.2) TTF-1 pozitif ve 1'i (%1.8) TTF-1 negatif özelliktedir. Başka bir deyişle, TTF-1 negatif olguların %99 oranında EGFR "wild" tip olduğu görülmüştür. EGFR mutasyon durumu ile TTF-1 arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.10). TTF-1 negatif olduğu halde, EGFR mutant olarak bulunan tek olgu anabilim dalımızda ilk incelemesi yapılan ya da bu çalışma kapsamında boyanan olgulardan biri değildir. Bu olgu dış merkezde incelenmiş ve daha önce TTF-1 negatif olarak raporlanmış bir olgudur.

Daha önce Napsin A açısından değerlendirilmiş 349 olgu mevcuttur; ayrıca 57 olgu da bu çalışma kapsamında, Napsin A ile boyanarak değerlendirilmiştir. Hem Napsin A hem EGFR açısından değerlendirilebilen 349 olgu arasında, toplam 48 adet EGFR mutant ve 301 adet "wild" tip olgu bulunmaktadır. 48 EGFR mutant olgunun 46'sı (%95.8) Napsin A pozitif ve 2'si (%4.2) Napsin A negatif özelliktedir. EGFR mutasyon durumu ile Napsin A arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.11).

Bu seride yer alan olgular içerisinde hem EGFR hem de ALK açısından değerlendirilmiş olan 411 olgu mevcuttur. EGFR mutant 53 olgunun tümü ALK negatif özelliktedir; bu seride hem ALK pozitifliği gösteren, hem de EGFR mutant olgu mevcut değildir. Ancak EGFR mutasyon durumu ile ALK arasında istatiksel olarak anlam düzeyine ulaşan bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri tüm dünyada çok sık görülen ve kansere bağlı ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer alan bir kanser türüdür. Türkiye'de de TC Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın 2012 verilerine göre kanser sıralamasında erkeklerde en sık, kadınlarda ise beşinci sıklıkta yer almaktadır (128). Akciğer kanserinin temelinde yer alan genetik değişiklikler, sinyal iletim moleküllerinin kontrolsüz sentezi ya da sinyal iletim yollarının aktivasyonuna yol açarak kanser hücrelerinin çoğalmasını sağlamaktadır. Tümör dokusunda tanımlanan yolakların bloke edilmesi, hedefe yönelik tedavinin başlıca ilkesini oluşturmaktadır. Akciğer karsinomalarında da çeşitli moleküler hedefler belirlenmiştir ve bunlara yönelik tedavi arayışları sürmektedir (129). Bugün için akciğer adenokarsinomalarında en önde görünen hedefler EGFR, RAS, BRAF, HER2, ALK, ROS-1, RET ve MET genleridir (108, 112, 127). Özellikle EGFR genindeki mutasyonları hedefleyen EGFR tirozin kinaz inhibitörleri, bu mutasyonları içeren hastalarda yaygın olarak kullanıma girmiştir (39).

EGFR tirozin kinaz aktivitesine sahip bir reseptör olup, erbB ailesinin bir üyesidir. Reseptör, ekstraselüler, transmembran ve intraselüler (tirozin kinaz bölgesi) bölgeden oluşmaktadır. Spesifik ligandın (EGF) ekstraselüler bölgeye bağlanması ile oluşan şekil değişikliği intraselüler bölgeye ATP'nin bağlanmasını ve fosforilasyonunu sağlamaktadır. Sonuç olarak alt yolakların (PI3K/Akt, JAK/STAT ya da Ras/Raf/MEK/ERK) aktivasyonu ile hücre proliferasyonu ve apopitoziste ise azalma ortaya çıkmaktadır (63, 103, 129, 130). Son dekatta yapılan çalışmalar, reseptörün tirozin kinaz bölgesini ilgilendiren genlerde oluşan mutasyonların büyük çoğunlukla geç evrede prezente olan KHDAK'nın tedavisinde önemli yere sahip olduğunu göstermektedir (39, 131). Klinik tedavide önemi olan mutasyonlar genin 18-21. kodonlarında izlenmektedir. EGFR mutasyonu Asyalı, sigara içemeyen, adenokarsinoma histolojisine sahip, kadın hastalarda daha yüksek oranda (%40-50) gözlenmektedir (31, 36). 2013 yılında EGFR mutasyon analizi için CAP/IASLC/AMP (The College of American Pathologists, The International Association for the Study of Lung Cancer, The Association for Molecular Pathology) klavuzu yayınlanmıştır (Ek). Klavuzda EGFR mutasyon analizi için

materyallerin seçimi, mutasyon tetkik yöntemleri ve tümör tipleri ile ilgili öneriler yer almaktadır (132).

5.1 EGFR mutasyon analizinde kullanılan materyaller

Genellikle geç evrede prezente olan KHDAK'da tanı çoğunlukla biyopsi ya da sitoloji materyallerinden konulmaktadır. Bu açıdan tedavi hedefini belirlemek için moleküler çalışmaların rezeksiyon materyallerinden çok, biyopsi ve sitoloji materyallerinden yapılması gerekmektedir. EGFR mutasyon analizi için sitoloji materyalleri kullanılan 33 farklı çalışmanın sonucunu ele alan bir çalışmada sitoloji materyallerinin (iğne aspirasyon ve plevral efüzyon) de mutasyon analizi için doku örneklerine alternatif olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuştur (133). Bizim çalışmamızda yer alan olgular birbirine yakın oranda biyopsi (%29.7), rezeksiyon (%33.9) ve sitolojik materyalden (%36.5) oluşmaktadır. Bu çalışmada, elde edilen DNA örnekleri, kontrol primerleri kullanılarak DNA kalitesi açısından incelenmiş; sitolojik materyallerde ortanca DNA fragman uzunluğunun 600 baz, biyopsi ve rezeksiyon materyallerinde ise 400 baz olduğu saptanmıştır. Sitoloji materyallerinin %94.8'inde analiz edilen 4 ekzonun tümünde başarılı sonuç alınmıştır. Bu oran rezeksiyon materyalleri için % 77.8, biyopsi materyalleri için % 75.5'dir ($p<0.05$). Bu bulgular sitolojik materyalin DNA kalitesi açısından, biyopsi ve rezeksiyon materyallerine göre daha üstün olduğunu göstermektedir.

Olgularımız arasında yer alan rezeksiyon materyallerinin %15.4'ü, sitolojik materyallerin %13.2'si ve biyopsi materyallerinin %13.5'i EGFR mutasyonu göstermiştir. Rezeksiyon materyallerinde, biyopsi ve sitoloji materyallerine göre izlenen yüksek EGFR pozitifliği, biyopsi ve sitoloji materyallerinde stromal ve inflamatuar hücrelerin kontaminasyonu ile mutasyonlu tümör hücrelerinin dilusyona uğraması ile ilişkili olabilir. Rezeksiyon materyalleri ise daha bol tümör içermeleri nedeni ile, makrodisseksiyon esnasında tümörden zengin alanların seçilebilmesine olanak vermektedir (50, 134, 135). Rezeksiyon materyallerinde daha yüksek oranda EGFR pozitifliği izlenmiş olmasına karşın, literatürdeki çalışmalara benzer şekilde; bizim çalışmamızda da materyal tipi ile EGFR mutasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Literatürdeki veriler ve bizim bulgularımız akciğer karsinoması gibi olguların çoğunluğunda yüksek evrede ortaya çıkan ve operasyon imkanı bulunmayan bir hasta grubunda, daha kolay elde edilebilecek bir materyal tipi olan sitolojik materyallerin EGFR analizi için etkin bir şekilde kullanılabildiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle hem tiplendirme hem de moleküler analizler için hücre bloğu elde edilmesinin önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır (120, 134, 136).

Akciğer adenokarsinomalarında %30-50 oranında kemik metastazları görülmektedir. Primer akciğer tümörünün ulaşılabilir olmadığı durumlarda ya da metastatik olgularda tanı kemik metastazlarından verilmektedir. Kemik dokudan alınan biyopsilerin dekalsifikasyon işlemi görmesi gerekmektedir. Bunun için çözülebilir kalsiyum tuzu oluşturan asitler (nitrik ve hidroklorik asit) ya da hidroklorik asit içeren hızlı dekalsifikasyon solusyonları (HDS) kullanılmaktadır. HDS ile dekalsifikasyon kısa sürede gerçekleşse de bu çözeltiler, nükleer kromatini bozarak DNA kalitesi üzerine negatif etki oluşturmakta ve moleküler analizlerin başarısını önlemektedir. Dekalsifikasyon amacı ile kullanılan etilen diaminotetra asetik asit (EDTA) gibi şelatör ajanlar, daha uzun sürede dekalsifikasyon yapsa da, bunların DNA kalitesi üzerine çok az etkili olduğu ya da hiç etkisinin olmadığı bildirilmektedir. HDS ve EDTA'nın DNA kalitesi üzerine etkisini araştıran çalışmalar HDS ile dekalsifikasyon işlemi gören olgularda DNA kalitesinin kötü olduğunu, ancak EDTA ile dekalsifikasyon işlemi gören olgularda ise daha iyi DNA elde edildiğini göstermiştir (137-139). Nitrik asit, formik asit ve EDTA ile dekalsifikasyon işlemi yapılan dokularda mRNA kalitesini araştıran başka bir çalışmada; EDTA ile dekalsifikasyon işlemi gören dokuların HE kesitteki morfolojik görünüm ve mRNA kalitesi açısından formik asit takibine giren dokulara benzer özellik sergilediğini, nitrik asit ile dekalsifiye dokularda ise mRNA kalitesinin diğer iki ajana göre daha düşük olduğunu saptamıştır (140). EDTA ve formik asit ile dekalsifikasyon işlemi gören dokularda DNA ve RNA kalitesine yönelik yapılan çalışmada bu iki dekalsifikasyon ajanın nitrik asit ve hidroklorik asite göre daha üstün olduğu gösterilmiştir (141). Bizim laboratuarımızda dekalsifikasyon amacı ile formik asit kullanılmaktadır. Serimizde asit ile dekalsifikasyon işlemi görmüş olan, bir bölümü konsültasyon niteliğinde toplam 17 olgu yer almaktadır. Bu dokular asit takibine girmemiş dokularla kıyaslandığında, DNA kalitesinin göstergesi olan DNA

fragman uzunluğunun daha düşük ve 4 ekzonda başarısızlık oranın daha yüksek (%47.1'e karşılık, %10.1) olduğu bulunmuştur. Özetle, dekalsifikasyon işleminin DNA kalitesi üzerine önemli etkisinin bulunduğu, asit takibi yapılan kemik dokularda DNA kalitesinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Kemik içeren dokularda, EDTA gibi alternatif solüsyonların kullanımı ya da bunlarda, tümör içermesi muhtemel yumuşak dokuların ayıklanarak, asitsiz olarak ayrı işlem yapılmasının fayda sağlayabileceği düşünülmüştür.

5.2 EGFR mutasyon analizinde kullanılan yöntemler

EGFR mutasyon analizi tarama yöntemleri ya da belirli bir mutasyonu/ mutasyonları hedef alan yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Tarama yöntemleri (HRMA, DHPLC, pirosekans, direkt sekanslama, fragman uzunluk analizi) ve hedefe yönelik yöntemlerin (ARMS, TaQMAn-PCR, RT-PCR) kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (133, 142). Tarama yöntemlerinden biri olan direkt sekans analizi, yeni mutasyonları da içerecek şekilde tüm mutasyonları saptamakta, yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemin sensitivitesi nispeten düşüktür; genellikle tümör hücre miktarını artırmak için makro ya da mikrodiseksiyon yapılmakta, tecrübe sahibi operatöre ihtiyaç duyulmakta ve belirli mutasyonları hedefleyen yöntemlere göre daha fazla emek ve zaman harcanmaktadır (133). Belirli bir mutasyonu/ mutasyonları hedef alan yöntemler genel olarak daha duyarlıdırlar ve daha kısa zamanda sonuca ulaşabilirler; ancak bunlarla nadir mutasyonlar saptanamamakta ve maliyet çoğu kez tarama yöntemlerine (direkt sekans) göre daha yüksek olmaktadır (133). Bizim çalışmamızda EGFR açısından değerlendirilen olgular direkt sekans yöntemi analiz edilmiştir.

5.3 KHDAK'da EGFR mutasyon sıklığı ve dağılımı

EGFR mutasyonu KHDAK'da farklı etnik gruplar arasında oransal farklılık göstermektedir. Bu çalışmada dünya genelinde yapılan, çalışmamıza benzer şekilde, EGFR geni 18, 19, 20 ve 21. ekzon mutasyonu açısından, değerlendirilmiş çalışmalar gözden geçirilmiştir. EGFR mutasyon oranı Asya Pasifik kökenli (Çin, Japonya, Kore, Malezya, Singapur) çalışmalarda %17.4-58.8; Hindistan alt kıtası kökenli

(Hindistan) çalışmalarda %23.1-47.8; Güney Avrupa kökenli (İtalya, Yunanistan, Portekiz) çalışmalarda %4.5-13.1; Kuzey Avrupa kökenli (Danimarka, Finlandiya, Norveç) çalışmalarda %5.4-14.6; Avrupa'nın diğer ülkelerinden (Bulgaristan, Polonya, Almanya, Belçika, Slovakya, Fransa) kaynaklanan çalışmalarda %5.2-17.9; Rusya kökenli çalışmalarda %9.6-20.6; Birleşik Krallık kökenli çalışmalarda %10.3-25.2, Kuzey Amerika'ya ait çalışmalarda %15-25; Avustralya kökenli çalışmalarda %15.6-17; Afrika kaynaklı bir çalışmada %21.1 ve Güney Amerika kökenli (Brezilya, Kolumbiya, Meksika, Perui, Kosta Rika, Panama) çalışmalarda ise %14-51 olarak bulunmuştur (40-82). Bu konudaki seriler Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Türkiye genelinde yapılmış olan çalışmalara bakıldığında, farklı çalışmalarda EGFR mutasyon oranı %4-48.1 arasında değişik oranlarda saptanmıştır (143-151). Türkiye kökenli seriler Tablo 5.2'de özetlenmiştir. Serilerde izlenen farklı mutasyon oranları muhtemelen olgu sayılarının azlığı ile ilişkilidir. Bizim serimizin daha büyük bir seri olması nedeni ile, Türkiye toplumundaki mutasyon oran ve dağılımını daha iyi yansıttığını düşünüyoruz.

Daha önceki serilere bakıldığında, EGFR mutasyonu kadınlarda %12-72.7, erkeklerde ise %2.8-73.5 sıklıkta görülmektedir (40-81). Akciğer karsinomu erkeklerde daha sık görülmesine karşın, EGFR mutasyonu daha çok kadın hastalarda izlenmektedir. Bizim serimizde de benzer şekilde, kadın hastaların %30.5'inde erkeklerin ise %7.5'inde EGFR mutasyonu saptanmıştır. EGFR mutasyonu önceki serilerde 26-84 yaş arasında tespit edilmiştir. Bu seride ise, EGFR mutant olgularda yaş ortalaması 62.15 (31-82) olarak bulunmuştur.

Bizim serimizde EGFR mutasyonu açısından değerlendirilebilen 499 KHDAK olgusunun 70'inde (%14), beş olguda çift mutasyon olmak üzere toplam 75 adet EGFR mutasyonu bulunmuştur. Sadece adenokarsinoma olguları dikkate alındığında, serimizdeki EGFR mutasyon oranı %17.1'e çıkmaktadır. Bu oran göz önüne alındığında, Türkiye'de EGFR mutasyonu görülme sıklığının Avrupa serilerine daha yakın olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda izlenen mutasyonlar, sıklıkları ve TKİ tedavisine beklenen yanıtları Tablo 5.3'de gösterilmiştir.

5.3.1 Ekzon 18

Ekzon 18'de izlenen mutasyonlar nokta mutasyonlarıdır (152). Dünya genelinde EGFR mutasyonları arasında, ekzon 18 mutasyon oranına bakıldığında Asya Pasifik kökenli (Çin, Japon, Kore, Malezya, Singapur) çalışmalarda %17-18.8; Hindistan alt kıtası kökenli (Hindistan) çalışmalarda %5.3-6.5; Güney Avrupa'ya (İtalya, Yunanistan, Portekiz) ait çalışmalarda %0.7-10.2; Kuzey Avrupa' ya (Danimarka, Finlandiya, Norveç) ait çalışmalarda %1.9-11.2; Avrupa kökenli diğer (Bulgaristan, Polonya, Almanya, Belçika, Slovakya, Fransa) çalışmalarda %0.4-17.2; Rusya kökenli çalışmalarda %7.1; Birleşik Krallık kökenli çalışmalarda %10.3-14.2, Kuzey Amerika kökenli çalışmalarda %15.3; Avustralya kökenli bir çalışmada %5.9, Afrika kökenli bir çalışmada ise %7 olarak bulunmuştur (40-82). Bu konudaki veriler Tablo 5.1'de özetlenmiştir. Bizim çalışmamızda ekzon 18 mutasyonları, akciğer adenokarsinoma olgularında izlenen EGFR mutasyonlarının %6.1'ni, tüm serideki EGFR mutasyonlarının ise %6.7'sini oluşturmaktadır.

Ekzon 18 mutasyonu literatür bilgilerine göre, sigara içmeyen kadın hastalarda daha sık olarak görülmektedir (152). Bizim çalışmamızda ise ekzon 18 mutasyonu bulunduran 4 hastanın da erkek olduğu saptanmıştır.

Literatür bilgilerine göre, bu ekzonda en sık izlenen mutasyonlar sıklık sırasıyla E709X ve G719C, G719S, G719A nokta mutasyonlarıdır; bu mutasyonların TKİ tedavisine duyarlı mutasyonlar olduğu bildirilmektedir. G719A mutasyonu tek başına veya başka mutasyonlar ile birlikte (EGFR 18 mutasyonu+ diğer EGFR mutasyonları) çift mutasyon şeklinde görülebilir (152). Bizim çalışmamızda 18. ekzonda P699S ve G719S şeklinde 2 adet tek mutasyona ek olarak; G719C + (Ekzon 20) S768I ve E709A+ G719A çift mutasyonları şeklinde, toplam 5 adet ekzon 18 mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonların tedavi ilişkilerine yönelik özet Tablo 5.3'de gösterilmiştir.

5.3.2 Ekzon 19

Ekzon 19'da izlenen mutasyonlar, EGFR mutasyonları arasında görülme sıklığı açısından ilk sırada yer almakta ve bunların EGFR TKİ'ye iyi yanıt ile ilişkili mutasyonlar olduğu bildirilmektedir (88, 153). Dünya genelinde EGFR mutasyonları

arasında ekzon 19 mutasyon oranına bakıldığında Asya Pasifik kökenli (Çin, Japon, Kore, Malezya, Singapur) çalışmalarda %39.4-69.4; Hindistan alt kıtası kökenli (Hindistan) çalışmalarda %27.2-51, Güney Avrupa'ya (İtalya, Yunanistan, Portekiz) ait çalışmalarda %38.8-78.9; Kuzey Avrupa'ya (Danimarka, Finlandiya, Norveç) ait çalışmalarda %33.8-44.4; Avrupa kökenli diğer (Bulgaristan, Polonya, Almanya, Belçika, Slovakya, Fransa) çalışmalarda %38.7-70; Rusya kökenli çalışmalarda %57.1-67.8; Birleşik Krallık kökenli çalışmalarda %27.6-28.5; Kuzey Amerika'ya ait çalışmalarda %46.1-57; Avustralya kökenli bir çalışmada %46.7; Afrika'ya ait bir çalışmada ise %69 olarak bulunmuştur (40-82). Bu konudaki veriler Tablo 5.1'de özetlenmiştir. Bizim çalışmamızda ekzon 19 mutasyonları, akciğer adenokarsinoma olgularında izlenen EGFR mutasyonlarının %59.1'ini, tüm serideki EGFR mutasyonlarının ise % 53.3'ünü oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalardan birinde ekzon 19'da izlenen mutasyonların %64'ünün kadınlarda, %36'sının erkeklerde olduğu görülmüştür (154). Bu seride de ekzon 19'da izlenen mutasyonların %62.5'i kadınlarda ve %37.5'i erkek hastalarda gözlenmiştir.

Ekzon 19 mutasyonları çoğunlukla kalıp kaymasına yol açmayan 15-18 bazlık "in frame" delesyonlar şeklinde izlenmektedir. E746-A750 (ELREA) ve E747-A749 (LRE) delesyonları en sık olarak izlenen mutasyon tipidir (155). Bu mutasyonlar TKİ tedavisine duyarlı mutasyonlardır. Ayrıca yapılan çalışmalarda ekzon 19 delesyonlarının, bir diğer sık görülen mutasyon olan ekzon 21 L858R mutasyonuna kıyasla tedaviye daha iyi yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (154, 156). Diğer yandan ekzon 19'da mutasyon bulunduran akciğer adenokarsinom olgularının santral sinir sistemine metastaz yapma olasılığının daha yüksek olduğu ve bu olgularda hastalıksız sağkalım süresinin EGFR "wild" tip olgulara göre daha kısa olduğu bir çalışmada gösterilmiştir. Ancak TKİ kan-beyin bariyerini geçebildiği için, bunlarla tedavi gören hastaların sağkalım süresinin daha uzun olduğu bildirilmektedir (42, 157). Farklı delesyon tiplerinin EGFR TKİ ile tedaviye cevap açısından birbirine göre farklılık gösterdiği bildirilmektedir. Örneğin delE746'nın delL747'ye göre EGFR TKİ ile tedaviye daha duyarlı olduğu ve sağ kalım süresinin daha uzun olduğu bir çalışmada gösterilmiştir (155). Delesyonlar dışında ekzon 19'da nokta mutasyonları da izlenebilir. P753S mutasyonu ekzon 19'da ender olarak görülmektedir. Bu mutasyonun tedaviye iyi yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (158). Bizim serimizde de izlenen

mutasyonların büyük çoğunlukla kalıp kaymasına yol açmayan delesyonlar olduğu saptanmıştır; bunların da %50'si L746_E750 mutasyonudur. Ayrıca del (ELREAT) E746_T751 >VA ins, del (ELREAT) E746-T751ınsI, del (LREA) L747_A750insP, del (LREATSP) L747-P753insS, del (SPKANKEI) S752_I759 insersiyon mutasyonları saptanmıştır. Bu mutasyonların tamamı tedaviye iyi yanıt ilişkili mutasyonlardır. Ayrıca serimizde izlenen del (ELREATSP) 746_753ins ATAT, del (TSPKA) T751_A755insAT, del (ELREATSP) E746_P753>VSins insersiyon mutasyonlarının ise tedaviye yanıt ilişkileri bilinmemektedir.

5.3.3 Ekzon 20

EGFR ekzon 20 mutasyonları tüm EGFR mutasyonları arasında üçüncü sıklıkta görülmektedir. Bu mutasyonların TKİ'ye de novo direnç ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (159). Dünya genelinde EGFR mutasyonları arasında ekzon 20 mutasyon oranına bakıldığında Asya Pasifik kökenli (Çin, Japon, Kore, Malezya, Singapur) çalışmalarda %0-17.6, Hindistan alt kıtası kökenli (Hindistan) çalışmalarda 1.9-2.5; Güney Avrupa'ya (İtalya, Yunanistan, Portekiz) ait çalışmalarda %0-18.4; Kuzey Avrupa (Danimarka, Finlandiya, Norveç) kaynaklı çalışmalarda %9.6-16.6; Avrupa'nın diğer ülkelerine (Bulgaristan, Polonya, Almanya, Belçika, Slovakya, Fransa) ait çalışmalarda %0-20.3; Rusya kaynaklı çalışmalarda %0-17.8; Birleşik Krallık kökenli çalışmalarda %14.2-27.6; Kuzey Amerika kaynaklı çalışmalarda %0-17.8; Avustralya kökenli bir çalışmada %10.3, Afrika'ya ait çalışmada ise %3 olarak bulunmuştur (40-81, 160). Bu konudaki veriler Tablo 5.1'de özetlenmiştir. Bizim çalışmamızda ekzon 20 mutasyonları, akciğer adenokarsinoma olgularında izlenen EGFR mutasyonlarının %6.1'ini, tüm serideki EGFR mutasyonlarının ise % 9.3'ünü oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda izlenen ekzon 20 mutasyonları ve literatürdeki bilgilere göre beklenen tedavi ilişkileri Tablo 5.3'de verilmiştir.

Ekzon 20'de izlenen mutasyonlar bir çalışmaya göre, sigara içmeyen kadın hastalarda, sık olarak izlenmektedir (90). Bizim çalışmamızda ekzon 20'de mutasyon içeren 6 olgunun 4'ü kadın, 2'si erkek hastalardan oluşmaktadır.

Ekzon 20'de izlenen mutasyonlar temel olarak, insersiyon ya da nokta mutasyonu şeklinde izlenmektedir (90). EGFR ekzon 20 insersiyonu, EGFR ekzon 19 insersiyonlarından farklı olarak yerleşim yeri, aminoasit içeriği ve uzunluk açısından oldukça farklılık göstermektedir. 9 farklı çalışmada 40 EGFR ekzon 20 insersiyon varyantı tanımlanmıştır (90, 159, 161). Ekzon 20'de en sık izlenen TKİ tedavisine dirençli insersiyon mutasyonları V769_D770insASV, D770-N771insNPG, D770-N771insSVD, D770-N771insGL, D770-N771insGT, A767_V769 dup ASV, P772_H773ins YNP, P772_V773insPNP, H773_V774insH ve H773_V774insNPH olarak özetlenebilir. Bu ekzonda izlenen A763_Y764insFQEA insersiyonunun ise, TKİ'ye cevapla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada 20. ekzonda, tedaviye dirençli olduğu bilinen V769_D770insASV, H773_774 insH, D770_N771ins SVD insersiyon mutasyonları ve tedaviyle ilişkisi bilinmeyen N771_P772insVDN insersiyon mutasyonu saptanmıştır.

Bu ekzonda izlenen başlıca nokta mutasyonları ise T790M, V769L, N771T mutasyonlarıdır ve bunlar da TKİ tedavisine dirençlidir (91, 108). T790M nokta mutasyonu EGFR TKİ ile tedavi sırasında gelişen direncin %50 kadarından sorumludur (106, 162). Genel olarak tedaviyi takiben ortaya çıkan bu mutasyon, tedavi öncesi dönemde de ender olarak saptanmaktadır (88). Tedavi almamış hastalardan oluşan serimizde, bir olguda T790M mutasyonu izlenmiştir; ancak bu mutasyon bizim olgumuzda L858R mutasyonu ile birlikte görülmüştür. Bu çift mutasyonun tedaviye direnç ilişkili olduğu bildirilmektedir (158). Ekzon 20'de izlenen diğer bir ender nokta mutasyonu ise S768I olup, tedavi yanıtı net değildir (163-165). Bizim serimizde bu nadir mutasyonu tek başına bulunduran bir olgu ve buna ek olarak S768I mutasyonu ile birlikte G719C mutasyonunu içeren ikinci bir olgu izlenmiştir. Bu ikili mutasyon kombinasyonunun tedaviye iyi yanıt ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (166).

5.3.4 Ekzon 21

Ekzon 21 mutasyonu, EGFR mutant olgular arasında ikinci sıklıkta görülen mutasyon tipidir (167). Dünya genelinde EGFR mutasyonları arasında, ekzon 20 mutasyon oranına bakıldığında Asya Pasifik kökenli (Çin, Japon, Kore, Malezya,

Singapur) çalışmalarda %28-50; Hindistan alt kıtası kökenli (Hindistan) çalışmalarda %15.5-43; Güney Avrupa'ya (İtalya, Yunanistan, Portekiz) ait çalışmalarında %15.8-46; Kuzey Avrupa'ya (Danimarka, Finlandiya, Norveç) ait çalışmalarda %27.8-46.5; Avrupa' nın diğer bazı ülkelerinde (Bulgaristan, Polonya, Almanya, Belçika, Slovakya, Fransa) %15-54.8; Rusya kökenli çalışmalarda %25-32.2; Birleşik Krallık kaynaklı çalışmalarda %34.5-42.8; Kuzey Amerika çalışmalarında %31-38.4; Avustralya kökenli bir çalışmada %35.5 ve Afrika kaynaklı bir çalışmada ise %21 olarak bulunmuştur (40-82). Bu konudaki veriler Tablo 5.1'de özetlenmiştir. Bizim çalışmamızda ekzon 21 mutasyonları, akciğer adenokarsinoma olgularında izlenen EGFR mutasyonlarının %28.8'ini, tüm serideki EGFR mutasyonlarının ise %30.7'sini oluşturmaktadır.

Yapılan bir çalışmada ekzon 21'de izlenen mutasyonların %58.3'i kadın, %41.7'si erkek hastalarda görülmüştür (158). Bizim çalışmamızda ekzon 21'de mutasyon içeren 20 olgunun 14'ü (%70) kadın, 6'sı (%30) erkek hastadan oluşmaktadır.

Ekzon 21 mutasyonlarının çoğu nokta mutasyonu özelliğindedir; bunların en sık görülenleri sırasıyla L858R, L861Q mutasyonlarıdır (153). İlk sırada izlenen L858R mutasyonu EGFR TKİ'ye duyarlıdır (158). Ekzon 21'de izlenen diğer bir nokta mutasyonu olan L861Q mutasyonun TKİ tedavisine cevap ilişkili mutasyon olduğu, ancak bu hastaların sağkalım sürelerinin daha kısa olduğu bildirilmektedir (32, 168, 169). Ekzon 21'de ayrıca EGFR TKİ tedavisi sonrası gelişen, tedaviye dirençle ilişkili T854A mutasyonu da tanımlanmıştır (170). Bu seride, 18 olguda L858R mutasyonu tek mutasyon şeklinde izlenmiştir. Bu mutasyonun tek başına görülmesi dışında, diğer ekzonlarda yer alan başka mutasyonlarla (delE746-A750, P753S, S768I ya da E709K) bir arada izlendiği bazı olgular da bildirilmiştir. Bu çift mutasyonların çalışmada tedaviye iyi yanıt ilişkili olduğu bildirilmektedir (158). Ancak L858R mutasyonuna ek olarak T790M ya da H870R mutasyonu içeren olguların EGFR TKİ'ye daha kötü cevap verdiği; bu mutasyon ile birlikte görülen V834L mutasyonun ise tedaviye iyi yanıt ilişkili olduğu gösterilmiştir (158, 171). Bizim serimizde de üç olguda L858R mutasyonunu da içeren çifte mutasyon (T790M+L858R, H870R+L858R, V834L+L858R) saptanmıştır. Serimizde ekzon 21'de izlenen mutasyon tipleri ve muhtemel tedavi yanıtları Tablo 5.3'de özetlenmiştir.

5.4 SNP (Q787Q)

EGFR geninde ekzon 20'de her ikisi de Glisin aminoasidini kodlayan G-A değişimi (CAG/CAA) ile karakterli Q787Q SNP daha önceki çalışmalarda da ortaya çıkmış bir polimorfizmdir. Farklı organ tümörlerinde izlenen tümör ile bu polimorfizm arasındaki ilişkiye yönelik araştırılmalar yapılmıştır (86, 118-120, 147, 172-175). Bu araştırmaların kısa özeti Tablo 5.4'te gösterilmiştir. Bunlardan Uzak Doğu kökenli 4'ü akciğer karsinomu, biri endometriozis ve biri baş boyun kökenli YHK olmak üzere toplam 6 çalışmada Q787Q SNP'nin %23-28.3 arasında saptandığı görülmüştür. Beyaz ırka mensup olguların dahil olduğu; biri kolorektal kanserlerde, diğeri ise akciğer kanserlerinde yapılan iki çalışmada ise Q787Q SNP oranı %83.11 ve 83.17 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda tüm seride bu oran %79.6 bulunmuştur. EGFR mutant olgularda bu oran %79.4, EGFR "wild" tipte ise %80.5 kadardır. Bu veriler bu SNP'nin hastalıkla ilişkili bir faktör olmaktan çok, etnik bir farklılık olduğunu düşündürmektedir.

5.5 Histopatolojik özellikler ve EGFR

DSÖ 2015 sınıflamasında ve bunun temelini oluşturan 2011 (IASLC/ATS/ERS) akciğer adenokarsinomaları sınıflamasında akciğer adenokarsinomaları için paternler tanımlanmakta ve akciğer adenokarsinomaları baskın olan paterne göre isimlendirilmektedir (16). Bu histopatolojik paternlerin tümörün moleküler özellikleri ve dolayısı ile tedavi hedefleri ile ilişkili olup olmadığını araştıran çalışmalar mevcuttur (68, 176-189). Bu çalışmalar akciğer adenokarsinomalarındaki baskın patern ve varyantların EGFR mutasyonu ile ilişkisini araştırmaktadır. Bu çalışmaların kısa özeti Tablo 5.5'de gösterilmiştir. Çoğunluğu Doğu Asya kökenli olan bu çalışmaların ortak noktası, tamamında bizim çalışmamızda olduğu gibi, en düşük EGFR mutasyonu gösteren tipin solid tip adenokarsinoma olarak ortaya çıkmasıdır. Bu çalışmalarda solid tipte, EGFR mutasyon oranı %5 ile %60.9 arasında değişmektedir. Solid tip tümörlerde en sık izlenen mutasyonun KRAS mutasyonu olduğu bildirilmektedir (177, 190). Tablo 5.5'de özetlenen bu çalışmaların altısında bizim çalışmamıza benzer şekilde, mikropapiller tip, en sık EGFR mutasyonu gösteren tip olarak ortaya çıkmıştır (176,

179, 183, 184, 187, 189). Bizim çalışmamızda EGFR mutasyon oranı mikropapiller, lepidik, papiller, asiner ve solid tiplerde sırası ile %40, %36, %20, %17.9 ve %5.4 olarak izlenmiş ve baskın tip ile EGFR mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

EGFR mutant olgularda, mutasyonun yeri ile baskın patern arasındaki ilişkinin araştırılmasına yönelik çalışmalar ise çok sınırlıdır (Tablo 5.6). Ekzon 18 mutasyonu içeren tümörlerde asiner paternin (152, 188) ve lepidik paternin (191) daha yüksek oranda izlendiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışmamızda ekzon 18 mutasyonu bulunduran ve patern açısından değerlendirilebilen 3 olgunun baskın paterni asiner, lepidik ve mikropapiller şeklinde dağılım göstermiştir. Ekzon 19 mutasyonlarının asiner ya da lepidik paterni baskın adenokarsinomalarda daha sık olarak izlendiği öne sürülmektedir (188, 191, 192). Bizim çalışmamızda da ekzon 19 mutasyonu gösteren tümörlerin büyük bir kısmının (%64.7) asiner paternli adenokarsinomalar olduğu dikkat çekmektedir. Ekzon 20'de izlenen mutasyonlar bir çalışmaya göre, histolojik olarak solid paterni baskın adenokarsinom olgularında sık olarak izlenmektedir (90). Ancak Lu ve arkadaşlarının çalışmasında ekzon 20 mutasyonlarında asiner paternin baskın olduğu gösterilmiştir (188). Bizim çalışmamızda ekzon 20'de mutasyon içeren ve baskın patern açısından değerlendirilebilen tek olgunun asiner baskın olduğu görülmüştür. İki ayrı çalışmada, ekzon 21 mutasyonlarında lepidik ve asiner paternin hakim olduğu bildirilmiştir (191, 192). Bizim çalışmamızda da ekzon 21'de izlenen baskın paternler lepidik (%71.4), asiner (%14.3) ve solid (%14.3) olarak sıralanmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmaların büyük bir kısmında non-müsinöz MİA olgularının yüksek oranda (%20-100) EGFR mutant oldukları gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da tespit edilen 3 non-müsinöz MİA olgusundan 2'sinde EGFR mutasyonu saptanmıştır. Ayrıca yeni sınıflamada tanımlanan müsinöz AİS, müsinöz MİA ve akciğer adenokarsinoma varyatı olan invaziv müsinöz adenokarsinoma ile EGFR mutasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu; bu tümörlerde EGFR'nin hemen daima "wild" tip olarak izlendiği ve bu olguların büyük çoğunlukla (%80-90) KRAS mutasyonu bulundurduğu yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da tespit edilen 3 İMA olgusu EGFR "wild" tip olarak saptanmış ve EGFR

mutasyonu varlığı ile tümörün müsin içerip içermemesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Seriler arasında solid tipte ve müsin içeren olgularda EGFR mutasyonunun azlığı ve non-müsinöz MİA'da yüksek mutasyon oranı konularında bir görüş birliği olmakla birlikte; seriler arasında patern ve EGFR mutasyonu konusunda mevcut olan farklılıkların bu çalışmalara dahil edilen olgu tiplerinin dağılımı ve etnisite farklılığına bağlı olabileceği düşünülebilir (183). Bu konudaki çalışmalar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, tümörde izlenen baskın paternin "driver" mutasyon tipi ile ilişkili olduğu, ancak tümör paternini temel alarak tedavi seçiminin yapılamayacağı anlaşılmaktadır.

5.6 TTF-1, Napsin A ve EGFR mutasyonu

TTF-1 normal tiroid foliküler ve parafoliküler (C) hücreleri, beyin dokusunun bir kısmında, akciğerde Clara hücreleri, tip 2 pnömositler ve silyasız bronş epitel hücreleri tarafından eksprese edilen, NKX-2 gen ailesine ait nükleer transkripsiyon faktörüdür. Tiroglobulin, tiroid peroksidaz, sekretuar proteinler ve surfaktan proteinlerinin regülasyonundan sorumludur (18). Nükleer lokalizasyonlu bir immünhistokimyasal belirteç olan TTF-1'in akciğer adenokarsinomalarda %70-90 oranında pozitiflik gösterdiği bildirilmektedir (18, 193). TTF-1'in özellikle kanser hücrelerinin hayatta kalmasını etkileyen genleri regüle ettiği, akciğer adenokarsinoma gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir (18, 194). İmmünhistokimyasal çalışmalarda, TTF-1 SPT24 klonunun, 8G7G1/1 klonuna göre daha yüksek sensitiviteye (sırasıyla %84 ve %65) sahip olduğu saptanmıştır (20). Bizim çalışmamızda 8G7G3/1 klonu kullanılmış ve akciğer adenokarsinomalarında %86.4 oranında TTF-1 pozitifliği saptanmıştır. Farklı çalışmalarda TTF-1'in akciğer adenokarsinomalarında %64-87 sensitivite ve %62-100 arasında değişen spesifitiye sahip olduğu bildirilmektedir (22, 193, 195-199) (Tablo 5.7). Yapılan çalışmalarda kadınlarda izlenen tümörlerde erkeklere kıyasla daha yüksek oranda TTF-1 pozitifliği bildirilmektedir (18, 198, 199). Bizim çalışmamızda da kadın hastalarda (%85.4) erkeklere (%71.8) oranla daha yüksek oranda TTF-1 pozitifliği saptanmıştır.

Napsin A ise bir aspartik proteaz olup, tip 2 pnömositlerde sürfaktan B'nin matürasyonunda rol almaktadır. Normal akciğer dokusunda tip 2 pnömositlerde, alveoler makrofajlarda ve akciğer adenokarsinomalarında sitoplazmik granüler boyanma göstermektedir. Çalışmalarda Napsin A'nın immünohistokimyasal olarak akciğer adenokarsinomlarında %65-89.6 sensitivite; %85.3-97 spesifite gösterdiği saptanmıştır (22, 193, 195-199) (Tablo 5.7). Bizim çalışmamızda akciğer adenokarsinomlarında Napsin A boyanma oranı (%84.1) olarak tespit edilmiştir. Çalışmalarda Napsin A pozitivitesinin kadınlarda erkeklere oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır (200, 201). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Napsin A pozitivitesi kadınlarda daha yüksek oranda saptanmış ve cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda akciğer adenokarsinoma belirteci olarak, Napsin A ve TTF-1'in sensitivitesi birbirine oldukça yakın bulunmuştur. TTF-1-'in daha sensitif olduğunu ileri süren çalışmalar olduğu gibi, Napsin A'nın daha sensitif olduğu sonucuna ulaşan çalışmalar da mevcuttur. Ancak literatürdeki genel görüş, spesifite konusunda Napsin A'nın TTF-1'e üstün olduğu yönündedir. Bu çalışmada da Napsin A ve TTF-1 arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, iki belirteç arasındaki uyumun yüksek olduğu saptanmıştır (k=0.812). Buna göre akciğer adenokarsinoması olgularının büyük kısmında (%82.9) hem TTF-1, hem de Napsin A pozititir. Ancak TTF-1 pozitif/ NapsinA negatif (%5.5) ya da tersine TTF-1 negatif/ NapsinA pozitif (%1.8) az sayıda olgu bulunmaktadır. Rossi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada akciğerin müsinöz adenokarsinomalarını tespit etmekte TTF-1'in Napsin A' ya göre daha üstün olduğunu (pozitiflik oranı %41.5'e karşılık %36) ileri sürmüşlerdir (17). Ancak bizim çalışmamızda bundan farklı olarak müsin içeren primer akciğer adenokarsinoma olgularında Napsin A pozitifliği (%24), TTF-1 pozitifliğine göre (%20.2) daha yüksek oranda bulunmuştur.

Daha önce yapılan çalışmalar akciğer adenokarsinomalarında EGFR mutasyonu ile TTF-1 pozitivitesi arasında yakın bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Daha önce bu konuda yapılan çalışmalarda, EGFR mutant olgularda TTF-1 pozitifliği oranı %60 ile % 100 arasında değişmektedir (18, 19, 62, 160, 182, 185, 200, 202-207) (Tablo 5.8). Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalara benzer şekilde EGFR mutasyonu bulunduran olguların %98.2'si, TTF-1 pozitiftir. Diğer

taraftan bakılacak olursa: TTF-1 pozitif bir tümörde EGFR mutasyon oranı %18.5 düzeyinde iken, TTF-1 negatif bir tümörde EGFR mutasyonuna rastlama oranı sadece %1'dir. Literatürde TTF-1 negatif, ancak EGFR mutant olgular bildirilmektedir. Bazı yazarlar bu durumun kullanılan TTF-1 klonu veya materyalin takibi ile ilişkili olabileceği fikrini ileri sürmüştür (204). Bizim çalışmamızda tespit edilen tek EGFR mutant ve TTF-1 negatif olgu da, dış merkezden konsültasyon olarak gönderilen bir olgudur; bu olguda izlenen TTF-1 negatifliğinin teknik nedenlere bağlı olabileceği akla gelmektedir. Bu nedenle TTF-1 negatif olan olgularda EGFR mutasyonuna rastlamanın çok düşük bir olasılık olduğu söylenebilir. Test maliyetinin ya da hızının sorun olduğu durumlarda, ya da test edilecek doku miktarı sınırlı olduğunda; TTF-1 negatif bir akciğer tümöründe önceliğin EGFR dışındaki tedavi hedeflerine yöneltilmesi daha akılcı bir seçenek olacaktır. Bu nedenle, TTF-1 durumunun akciğer karsinomunda moleküler testlerin sıralanmasına ilişkin algoritmalarda bir yeri olabileceği düşünülmüştür.

Napsin A ile EGFR mutasyon durumu arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Lee ve arkadaşları, Liu ve arkadaşları ile Warth ve arkadaşlarının yapmış olduğu üç çalışmada EGFR mutant olgularda Napsin A pozitifliği sırası %94.6, %72.3 ve %84.8 oranında izlenmiştir (Tablo 5.9). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde EGFR mutant olguların %95.8'inde Napsin A pozitifliği izlenmiş ve EGFR mutasyonu ile Napsin A pozitifliği arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

5.7 ALK

EML4-ALK KHDK'da tedavi hedefi olarak tanımlanan ilk onkokinaz füzyon proteinidir. ALK insülin reseptör ailesinden olup 2. kromozomda yerleşim gösteren transmembran tirozin kinaz özelliğinde bir reseptördür. ALK 2p23'de, EML4 2p21'de yerleşim göstermektedir. Kromozomal yeniden düzenlenme olduğu taktirde, kromozom 2'nin kısa kolunda inversiyon sonucu EML4'ün 1-13 ekzonu ile ALK'nın 20-29. ekzonu arasında füzyon gerçekleşmekte ve yeni bir protein ortaya çıkmaktadır. Normalde ALK reseptörü hücre zarında yerleşim göstermektedir ve aktif hale gelmek için liganda gereksinim duymaktadır. İnversiyon sonucu ortaya

çıkan füzyon proteini ise liganda gereksinim duymadan, alt yolakları aktive ederek karsinogeneze katkıda bulunmaktadır (124, 208-210). ALK füzyonun mevcut olduğu olgularda tedavide crizotinib kullanılmaktadır. Akciğer adenokarsinomalarında bu translokasyon %4-6 oranında izlenmektedir (4). Bizim çalışmamızda da bu oran %4.9 olarak bulunmuştur. Çalışmalarda morfolojik olarak tümörün solid patern ve kribriform özellikte olması (211-213), taşlı yüzük hücresi benzeri morfoloji içermesi (21, 214), intrasellüler ya ekstrasellüler müsin bulundurması (211, 213) ALK pozitifliğini öngören bulgular olarak gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da ALK pozitif olguların % 60'ını solid paternin hakim olduğu olgular oluşturmaktadır (26). Çalışmamızda müsin içeren tümörlerin daha yüksek oranda ALK pozitifliği gösterdiği ve ALK pozitifliği ile müsin varlığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır.

Akciğer adenokarsinomalarında EGFR mutasyonu ve ALK gen rearanjmanı genel olarak birbirini dışlayan gen değişiklikleri olsa da; şimdiye kadar akciğer kanserlerini her iki mutasyon açısından araştıran 16 farklı çalışmada iki gen değişikliğini birlikte gösteren toplam 20 kadar olgu gösterilmiştir (123, 208, 215-219). Bizim olgularımız arasında her iki mutasyonu birlikte bulunduran olgu yoktur.

Tablo 5.1. Dünya genelinde akciğer karsinomunda EGFR mutasyonu açısından yapılan çalışmaların özeti

Çalışma/yıl	Etnisite	EGFR (+)/ total olgu sayısı n (%)	EGFR (+)/ ADK sayısı n (%)	Ekzon 18 n (%)	Ekzon 19 n (%)	Ekzon 20 n (%)	Ekzon 21 n (%)	Yöntem	K/E n (%)
Sonobe M ve ark. 2004	Japonya	60/154 (38.9)	60/108 (55)	2 (3.3)	35 (58.3)	4 (6.6)	22 (36.6)	Direkt sekans ve SSCP	42/55 (76.3), 18/53 (34)
Antonio M ve ark. 2004	İtalya	39/860 (4.5)	39/375 (10)	3 (8)	18 (46)	0	18 (46)	Direkt sekans ve SSCP	21/112 (18), 18/748 (2.4)
Bae NC ve ark. 2006	Kore	20/115 (17.4)	20/55 (36.4)	0	9 (45)	1 (5)	10 (50)	Direkt sekans	13/24 (54.1), 7/31 (22.5)
Mounawar M ve ark. 2007	Rusya	20/116 (20.6)	15/33 (50)	2 (7.1)	16 (57.1)	5 (17.8)	7 (25)	Direkt sekans	15/31 (48), 8/85 (6)
Xu M J ve ark. 2008	Çin	32/106 (30.2)	28/76 (36.8)	6 (18.8)	17 (53.1)	0	7 (21.9)	Direkt sekans	19/51 (25.4), 13/55 (23.6)
Zimmer S ve ark. 2008	Almanya	12/67 (17.9)	12/52 (3.8)	2 (16.6)	6 (50)	0	4 (33.4)	Cycle sekans	10/24 (41.6), 2/41 (8.3)
Reinmuth N ve ark. 2008	Almanya	20/120 (16.6)	20/120 (16.6)	1 (5)	14 (70)	2 (10)	3 (15)	Sekans analiz	11/46 (23.9), 9/74 (12.1)
Ninomiya H ve ark. 2009	Japonya	63/107 (58.8)	63/107 (58.8)	2 (3)	30 (48)	4 (6)	27 (43)	Direkt sekans	40/55 (72.7), 23/52 (44.2)
Sartori G ve ark. 2009	İtalya	51/418 (12.2)	49/286 (17.1)	1 (1.9)	27 (52.9)	0	23 (45)	Direkt sekans	42/199 (21.1), 9/219 (4.1)
McCray MD ve ark. 2010	ABD	13/60 (21.6)	13/60 (21.6)	2 (15.3)	6 (46.1)	0	5 (38.4)	Pyrosekans	?
Gandara DR ve ark. 2010	ABD	183/1207 (15.2)	144/712 (20.2)	?	106 (57.9)	?	57 (31.1)	RT-PCR	74/335 (22) 33/213 (15.4)
McMillen E ve ark. 2010	Çin	64/218 (29.3)	48/128 (37.5)	3 (4.5)	39 (59)	4 (6)	20 (30.3)	Sanger sekans	34/79 (43), 30/179 (16.7)
Keong C ve ark. 2010	Singapur	39/109 (35.7)	39/109 (35.7)	7 (17.9)	21 (53.8)	7 (17.9)	4 (10.3)	HPLC	?
Lee YJ ve ark. 2010	Kore	108/327 (33)	100/233 (42.9)	0	75 (69.4)	8 (6.5)	27 (24.1)	Direkt sekans	68/145 (46.9), 39/178 (21.9)
Santis G ve ark. 2011	BK	13/126 (10.3)	11/89 (12.3)	2 (14.2)	4 (28.5)	2 (14.2)	6 (42.8)	Direkt sekans	?
Penzel R ve ark. 2011	Almanya	163/1047 (15.6)	66/425 (15.5)	17 (10.4)	81 (49.7)	9 (5.5)	56 (34.4)	Therascreen	?
Ciećkiewicz A ve ark. 2011	Polonya	29/273 (10.6)	26/186 (65.6)	1 (0.4)	17 (55)	3 (9.6)	10 (35)	Direkt sekans	22/122 (18.7), 7/151 (4.6)
Helland A ve ark. 2011	Norveç	18/240 (7.5)	16/142 (11.2)	2 (11.2)	8 (44.4)	3 (16.6)	5 (27.8)	Therascreen	14/116 (12), 4/124 (3.2)
Kim J ve ark. 2011	Kore	83/240 (34.5)	78/152 (51.3)	0	54 (58.7)	1 (0.2)	37 (40.1)	PNA-mediated RT- PCR	49/89 (55), 34/116 (29.3)

Tablo 5.1. Devamı

Çalışma/yıl	Etnisite	EGFR (+)/ total olgu sayısı n (%)	EGFR (+)/ ADK sayısı n (%)	Ekzon 18 n (%)	Ekzon 19 n (%)	Ekzon 20 n (%)	Ekzon 21 n (%)	Yöntem	K/E n (%)
Castroa A ve ark. 2012	Portekiz	49/374 (13.1)	29/216 (13.4)	5 (10.2)	19 (38.8)	9 (18.4)	16 (32.6)	Direkt sekans	25/108 (23.1), 24/266 (9)
Pennycuick A ve ark. 2012	BK	29/215 (13.4)	?	3 (10,3)	8 (27,6)	8 (27,6)	10 (34,5)	Sekans	?
Girard N ark. 2012	ABD	604/2392 (25)	604/2392 (25)	?	? (54)	?	? (37)	Direkt sekans	?
Bacchi CE ve ark. 2012	Brezilya	63/207 (30.4)	57/169 (33.7)	5 (7.9)	38 (59.1)	3 (4.8)	18 (28.2)	Taqman	80/120 (66.6), 64/87 (73.5)
Murray S ve ark. 2012	Yunanistan	133/698 (19)	?	1 (0.7)	105 (78.9)	6 (4.6)	21 (15.8)	HRMA	?
Shi Yeen N ve ark. 2012	Malezya	221/484 (45.7)	220/467 (47.1)	4 (1.7)	134 (58)	13 (5.6)	80 (34.6)	ARMS	140/231 (60.6), 81/253 (32)
Sun PL ve ark. 2012	Kore	196/382 (51.3)	190/358 (53.1)	9 (4.4)	80 (39.4)	19 (9.3)	95 (47.3)	Direkt sekans	136/207 (65.7), 60/175 (34.3)
Chougule A ve ark. 2013	Hindistan	210/907 (23.1)	202/780 (25.9)	(6.5)	(51)	(2.5)	(43)	Sekans	79/265 (29.8), 131/645 (20.3)
Kim HR ve ark. 2013	Kore	70/131 (53.4)	55/131 (41.9)	3 (4)	50 (66.6)	1 (1.3)	21 (28)	Direkt sekans	49/85 (57.6), 21/44 (47.7)
Lai Y ve ark. 2013	Çin	235/679 (33.7)	189/379 (49.8)	16 (6.8)	106 (45.1)	8 (3.4)	113 (48.1)	ARMS	127/221 (57.5), 108/476 (22.7)
Carnerio JG ve ark. 2013	Brezilya	4/88 (45.4)	3/45 (6.6)	0	3 (75)	0	1 (25)	Sanger sekans	?
He Y ve ark. 2013	Çin	220/538 (40.8)	198/441 (44.8)	0	114 (48.2)	13 (5.4)	110 (46.4)	Fluorescence PCR	118/238 (49.6), 102/300 (34)
Boch C ve ark. 2013	Almanya	27/552 (4.9)	23/259 (8.8)	3 (11)	16 (57)	0	9 (32)	Pyrosekans	17/200 (8.5), 10/352 (2.8)
Gahr S ve ark. 2013	Almanya	118/1201 (9.8)	93/944 (9.8)	6 (4.1)	73 (61.3)	0	40 (33.6)	Sanger sekans + Pyrosekans	81/466 (17.4), 37/735 (5)
Sanchez M ve ark. 2013	Fransa	121/753 (16)	118/601 (19.6)	10 (7.5)	70 (52.6)	18 (13.5)	35 (26.3)	Direkt sekans	76/286 (68), 45/467 (37)
Peters M J ve ark. 2014	Avustralya	337/1717 (17)	?	20 (5.9)	158 (46.7)	35 (10.3)	120 (35.5)	Sanger sekans	?
Errihani H ve ark. 2014	Fas	29/137 (21.1)	29/ 137 (21.1)	2 (7)	20 (69)	1 (3)	6 (21)	Tagman	22/46 (47.8), 7/91 (7.6)
Hantson I ve ark. 2014	Belçika	37/ 297 (12.4)	37/297 (12.4)	2 (5.4)	12 (32.4)	5 (13.5)	18 (54.8)	Therascreen	26/113 (23), 6/184 (3.2)
Ragusa M ve ark. 2014	İtalya	22/230 (9.5)	20/102 (19.6)	2 (1)	12 (54.5)	0	8 (36.3)	Cycle sekans	12/50 (24), 10/180 (5.5)
Mäki-Nevala S ve ark. 2014	Finlandiya	58/510 (14.6)	58/398 (14.5)	8 (12.9)	21 (33.8)	6 (9.6)	27 (46.5)	Therascreen	40/274 (16.6), 18/339 (6.7)

Tablo 5.1. Devamı

Çalışma/yıl	Etnisite	EGFR (+)/ total olgu sayısı n (%)	EGFR (+)/ ADK sayısı n (%)	Ekzon 18 n (%)	Ekzon 19 n (%)	Ekzon 20 n (%)	Ekzon 21 n (%)	Yöntem	K/E n (%)
Hlinkova K ve ark. 2014	Slovakya	83/835 (10)	60/220 (27.2)	16 (17.2)	36 (38.7)	2 (2.1)	39 (41.9)	HRMA+direkt sekans	?
Bichev SN ve ark. 2014	Bulgaristan	153/1427 (10.7)	127/1427 (8.7)	1 (0.7)	66 (43.1)	29 (20.3)	55 (35.9)	SARMS	69/355 (19.4), 28/1072 (5.4)
Han B ve ark. 2015	Rusya	87/902 (9.6)	76/902 (8.4)	0	59 (67.8)	0	28 (32.2)	?	?
Krawczyk P ve ark. 2015	Polonya	221/2229 (9)	199/1796 (10)	?	123	?	98	Direkt sekans	132/815 (13.9), 89/1414 (5.9)
Skov BG ve ark. 2015	Danimarka	63/1161 (5.4)	56/700 (8)	2 (1.9)	29 (42.8)	5 (8.9)	27 (46..4)	Sanger sekans+ ARMS	?
Arrieta O ve ark. 2015	Arjantin	247/1713 (14.4)	(26.4) Mestizo/yerel (33.7)	?	?	?	?	ARMS+ RT PCR	(30.7), (18.4)
	Kolumbiya	472/1417 (36.7)		?	?	?	?		
	Meksika	456/1939 (25.2)		?	?	?	?		
	Peru	201/393 (51.1)		?	?	?	?		
	Kosta Rika	32/102 (32.7)		?	?	?	?		
	Panama	41/174 (25.5)		?	?	?	?		
Veldor VH ve ark. 2016	Hindistan	97/206 (47)	?	11 (5.3)	56 (27.2)	4 (1.9)	31 (15.5)	ARMS	?
Barlesi F ve ark. 2016	Fransa	1947/17664 (11)	1647/13425 (12.2)	?	?	?	?	Sanger sekans	1319/6252 (21), 617/11316 (5.4)
Bizim çalışmamız 2016	Türkiye	70/499 (14)	70/386 (17.1)	5 (6.7)	40 (53.3)	7 (9.3)	23 (30.7)	Direkt sekans	43/141 (30.5), 27/331 (7.5)

Tablo 5.2. Akciğer karsinomunda EGFR mutasyonunu araştıran Türkiye kökenli çalışmaların özeti

Çalışma/yıl	Olgu sayı (n)	EGFR (+)/ Tanı n(%)	EGFR (+)/ADK n (%)	Ekzon 18 n (%)	Ekzon 19 n (%)	Ekzon 20 n (%)	Ekzon 21 n (%)	EGFR K/E n (%)
Çetin Z ve ark. 2009	50	2/50 (4)	2/9 (22.2)	?	2	?	?	1/2 (50), 1/48 (2)
Baykara O ve ark. 2012	50	4/50 (8)	3/20	0	2 (50)	0	2 (50)	2/6 (33.3), 2/44 (4.5)
Akca H ve ark. 2013	52	25/52 (48.1) 24/36ADK 18/16YHK	24/36 (66.7)	?	19 (76)	0	6 (24)	11/13 (84.6), 14/39 (35.9)
Ünal OU ve ark. 2013	48	18/48 (37.5) 13/32 ADK 5/16 diğer	13/32 (40.6)	0	7 (38.8)	9 (50)	2 (11.2)	5/7 (71.4), 13/41 (31.7)
Sağ SÖ ve ark. 2013	132	19/132 (14.39)	18/127 (14.2)	2 (10.5)	9 (47.37)	0	8 (42.1)	9/34 (26.5) 10/98 (10.2)
Bircan S ve ark. 2014	25	11/25KHDAK(44) 5/11ADK (45.5) 6/11YHK (54.5)	5/14 (35.7)	0	8 (61.5)	0	5 (38.5)	1/4 (25), 10/21 (47.6)
Doğan M ve ark. 2014	42	3/42 (7.1)	?	?	2 (100)	?	0	?
Kus T ve ark. 2015	60	26/60 (12.5)	?	?	?	?	?	?
Dilek KZ ve ark. 2016	218	63/218 (28.9)	63/218 (28.9)	9 (14.2)	25 (39.6)	12 (19)	17 (26.9)	33/67 (49.2), 30/151 (19.8)
Bizim çalışmamız 2016	499	70/499 ADK+KDAK (14)	66/386 (17.1)	5 (6.7)	40 (53.3)	7 (9.3)	23 (30.7)	43/141 (30.5), 27/331 (7.5)

Tablo 5.3. Çalışmamızda izlenen EGFR mutasyonlarının dökümü ve bu mutasyonların TKİ tedavisine yanıtlarına ilişkin literatür verileri

*Nadir mutasyon

Mutasyon	Ekzon	Hasta sayı	TKİ tedavisine duyarlı (literatür numarası)	TKİ tedavisine duyarsız (literatür numarası)
G719S	18	1	(220)	(156)
P699S*	18	1	(221)	
del (ELREA) E746_A750	19	20	(153, 155, 222-224)	
del (LREATS) L747_S752	19	4	(223)	
del (LREAT) E747_T751	19	2	(222)	
del (LREATSP) E747_P753	19	2	(222)	
del (KELRE) K745_E749	19	2	(225)	
del (ELREAT) E746_T751>VAins	19	2	(224)	(223)
del (ELREAT) E746_T751insI	19	1	(224)	
del (LREA) L747_A750 insP	19	1	(222, 226)	
del (LREATSP) E747_P753insS	19	1	(153, 227)	
del (SPKANKEI) S752_I759	19	1	(228)	
del (KELREA) K745_E750*	19	1		(229)
delE746_P753 >VSins*	19	1	?	?
del (ELREATSP) 746_753insATAT*	19	1	?	?
del (TSPKA) T751_A755insAT *	19	1	?	?
H773_774 insH	20	1		(91)
S768I*	20	1	(163)	(165)
V769_D770insASV	20	1		(91)
N771_P772ins VDN*	20	1	?	?
S768_D770 dup SVD	20	1		(91, 222)
L858R	21	18	(153, 158, 228)	
E709A+G719A*	18+18	1	(171, 230)	
G719C+S768I*	18+20	1	(231, 232)	
T790M+L858R*	20+21	1		(228, 229, 233)
H870R+L858R*	21+21	1		(233, 234)
V834L+L858R*	21+21	1	(171, 220)	

Tablo 5.4. EGFR geninde SNP (Q787Q) ile ilişkili çalışmaların özeti

Çalışma /yıl	Etnik grup	Tanı	Hasta grubu n, homozigot veya heterozigot SNP oranı n(%)	Kontrol grubu n, homozigot veya heterozigot SNP oranı n(%)
Zhang W ve ark. 2006	ABD Beyaz ırk	Akciğer (ADK+KHDAK)	122 (83.7)	147 (73.4)
Choi J ve ark. 2007	Kore	Akciğer kanseri	582 (26.8)	582 (26.3)
Sasaki H ve ark. 2008	Japonya	Akciğer (ADK+KHDAK)	303 (28.3)	?
Jin T ve ark. 2009	Çin	Baş ve boyun YHK	96 (23)	?
Metzger B ve ark. 2011	Avrupa	Kolorektal kanser	225 (83.11)	61 (91.88)
Lee GH ve ark. 2012	Kore	Endometriozis	299 (23)	286 (22.1)
Akca H ve ark. 2013	Türkiye	Akciğer kanseri	52 (28.8)	?
Koh JW ve ark. 2016	Kore	Akciğer (ADK+KHDAK)	152 (23.9)	?
Bizim çalışmamız 2016	Türkiye	Akciğer (ADK+KHDAK)	506 (79.6)	?

Tablo 5.5. Akciğer adenokarsinomunda EGFR mutasyonu ile baskın patern ilişkisine yönelik çalışmaların özeti

Çalışma/yıl	Toplam olgu/ADK n	EGFR mutant n (%)	EGFR mutant	EGFR "wild"
			Paternler (%)	Paternler (%)
Shim ve ark. 2011	107	54 (50.5)	Mikropapiller (83.3)>lepidik (62.5)> asiner (50)=papiller (50) >solid (28.6)	Solid (71.4)> asiner (50)=papiller (50) >lepidik (37.5) >mikropapiller (16.7) (10 İMA)
Lu F ve ark. 2011	219	132 (87)	Mikropapiller (100) > papiller (72.5) >lepidik (70.6)>asiner (64.8) > solid (33.3) (1İMA)	Solid (66.7) >asiner (35.2) >lepidik (29.4) >papiller (27.5)
Sun PL ve ark. 2012	389	196 (51.3)	Papiller (70) >asiner (56.6) > mikropapiller (50) >lepidik (42.9) > solid (38.9) (1 İMA)	Solid (61.1) >lepidik (57.1) > mikropapiller (50) > asiner (43.4) > papiller (30) (2 İMA)
	249 Paterni belirli	138 (55.4)		
Zhang Y ve ark. 2012	349	266 (76.2)	AIS=MIA (100) >asiner (83.3) >mikropapiller (83.1) >lepidik (82.4) > papiller (72.2) > solid (60.9) (%28.6 İMA)	Solid (39.1) > papiller (27.8) > lepidik (17.6) > mikropapiller (16.9) >asiner (16.7)
Russell PA ve ark. 2013	59	17 (29)	Asiner (44) > mikropapiller (38) >solid (5)	Solid (95) >mikropapiller (62) > asiner (66)
Song Z ve ark. 2013	161	67 (41.6)	Mikropapiller (73.9) >lepidik (72.2)>asiner (42.1) > papiller > (40.5) MIA (16.7) = solid (16.7)	Solid (83.3)=MIA (83.3) > papiller (59.5) >asiner (57.9) > lepidik (27.8) > mikropapiller (26.1)
Yoshizawa A ve ark. 2013	167	90 (53.9)	AIS (85.7) >MIA (83.3) > lepidik (71.4) > papiller (68.5)>mikropapiller (40.1)>asiner (57.9>solid (14.3)	Solid (85.7) >asiner (42.1) > mikropapiller (59.9) > papiller (31.5) > lepidik (28.6) >MIA (16.7) > AIS (14.3)
Warth A ve ark. 2013	425	66 (15.5)	Mikropapiller (32) >lepidik (23.3)>asiner (18.8) > papiller (14.3) >solid (9.4)	Solid (90.6) > papiller (85.7) >asiner (81.2) > lepidik (76.7) > mikropapiller (68)
Villa C ve ark. 2014	200	41 (20.5)	Lepidik (44) >papiller (28.5) >asiner (13.5) > solid (13)	Solid (87) >asiner (86.5) >papiller (71.5) >lepidik (56)
Sun Y ve ark. 2014	102	39 (38.2)	Mikropapiller (70.6) >lepidik (50)>papiller (33.3) >asiner (30) >solid (8.4)	Solid (91.6) >asiner (70) >papiller (66.6) >lepidik (56) >mikropapiller (20.4)
Chen Z ve ark.2014	206	123 (59.7)	Mikropapiller (80) >papiller (70.7) >asiner (69.5) > lepidik (68.85) > solid (16.7)	Solid (83.3) >lepidik (31.15) > asiner (30.5) > papiller (29.3) >mikropapiller (20)
Kim H J ve ark. 2014	359	135 (37.6)	Papiller (77.8) > lepidik (61.1) >asiner (57.6) > mikropapiller (33.3) > solid (16.7)	Solid (83.3) > mikropapiller (66.7) >asiner (42.4) >lepidik (38.9) > papiller (22.2) (7 İMA)
	135 Paterni belirli	60 (44.4)		
Qiang G ve ark. 2016	97	44 (45.4)	Low grade (AIS+MIA+lepidik) (65) >İntermediate grade (asiner+papiller) (32.5) >High grade (mikropapiller+solid) (29.4)	High grade (mikropapiller+solid) (70.6) >İntermediate grade (asiner+papiller) 67.5) >Low grade (AIS+MIA+lepidik) (35)
Zhang R ve ark. 2016	637	276 (43.3)	Lepidik (53.8) >papiller+mikropapiller (49.5) >asiner (44.6) > solid (40.7)	Solid (59.3) >asiner (55.4) >papiller+mikropapiller (50.5) >lepidik (46.2)
Bizim çalışmamız 2016	386	66 (17)	Mikropapiller (40) > lepidik (36) > papiller (20) > asiner (17.6) > solid (5.4)	Solid (94.6) >asiner (82.4) >papiller (80) >lepidik (74) >mikropapiller (60)
	150 Paterni belirli	28		

Tablo 5.6. Baskın patern ile EGFR mutant ekzon arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların özeti

Çalışma/yıl	EGFR mutant n (%)	Mutasyon yerine göre baskın patern dağılımı
Nakamura R ve ark. 2010	130/320 (40.6)	18 (8):lepidik 2 (25), asiner 2 (25), papiller 2 (25), solid 2 (25) 19 (51): asiner 24 (47), papiller 15 (29.4), AIS+MIA 6 (11.7), lepidik 3 (5.8), mikropapiller 2 (3.9), solid 1 (1.9) 21 (71): papiller 32 (45), asiner 24 (33.8), lepidik 9 (12.6), AIS+MIA 8 (11.2), solid 1 (1.4)
Isaka T ve ark. 2014	212/410 (51.7)	19: lepidik (50.9), asiner (29.6), papiller (12.3), solid (4.4), mikropapiller (2.6) 21: lepidik (56.3), asiner (29.1), papiller (9), solid (3.2), mikropapiller (2.3)
Cheng C ve ark. 2015	737/1201 (61.4)	18 (34): asiner 16 (47.1), papiller 8 (23.5), solid 4 (11.8), lepidik 4 (11.8) ve MIA 2 (5.9)
Lu F ve ark. 2015	132/219 (60.3)	19: asiner 38 (66.6), papiller 11 (19.2), lepidik 6 (10.5,) solid 2 (3) 18,20,21: asiner (60), papiller 18 (24), lepidik 6 (8), solid 3 (4), 2 mikropapiller (3)
Bizim çalışmamız 2016	66/499 (17.1) (paterni değerlendirilen 28 olgu)	18 (3):asiner 1 (33.3), lepidik 3 (33.3), mikropapiller 1 (33.3) 19 (17): asiner 11 (64.7), lepidik 3 (17.6), papiller 1 (5.9), mikropapiller 1 (5.9), solid 1 (5.9) 20 (1): asiner (100) 21: asiner 1 (14.3), lepidik 5 (71.4), solid 1 (14.3)

Tablo 5.7. TTF-1 ve Napsin A'nın sensitivite ve spesifitesine yönelik çalışmaların özeti

Çalışma /yıl	Etnisite	Olgu sayı/ materyal	Sensitivite		Spesifite	
			TTF1 (%)	NapsinA (%)	TTF1 (%)	NapsinA (%)
Zhang P ve ark. 2010	Çin	212ADK/rezeksiyon	84.4	84.9	83.9	93.8
Stoll LM ve ark. 2010	ABD	75ADK/ sitoloji	81	65	81	96
Fatima N ve ark. 2011	ABD	35ADK/sitoloji	80	82	62	87
Turner BM ve ark. 2012	Japonya	303ADK/rezeksiyon	64	87	90	97
Ao MH ve ark. 2014	ABD	77ADK/rezeksiyon	85.7	89.6	75	90
Ma Y ve ark. 2015	Çin	119 ADK/rezeksiyon	87	72.2	83.9	85.3
Ikeda S ve ark. 2015	Japonya	40ADK/rezeksiyon	88	85	100	95
Bizim çalışmamız 2016	Türkiye	398 ADK –TTF-1, 335 ADK – NapsinA/rezeksiyon, biyopsi, sitoloji	88.2	84.8	?	?

Tablo 5.8. EGFR mutasyonu ve TTF-1 ilişkisine yönelik çalışmaların özeti

Çalışma/yıl	EGFR mutant TTF-1 (+) /TTF-1 (-) n (%)	EGFR "wild" TTF-1 (+) /TTF-1 (-) n (%)	TTF1 (+) K/E n (%)	Tanı
Tang X ve ark. 2011	14/6 (64/36)	45/137 (33/67)	56/29	179ADK+104YHK
Leary AF ve ark. 2011	15/0 (100/0)	40/15 (73/27)	?	70 KHDAK
Sun PL ve ark. 2012	77 /6 (92.8/7.2)	74 /33 (69.2/30.8)	?	196 ADK
Vincenten J ve ark. 2012	105/9 (92.1/7.9)	403/228 (63.8/36.2)	?	745 ADK+Diğerleri
Valle A ve ark. 2013	145/3 (98/2)	675/218 (76/24)	?	1,243 ADK+ 49 YHK+ 111 KHDAK
Gahr S ve ark. 2013	101/7 (93.5/6.5)	526/220 (70.5/29.5)	?	944ADK+178KHDAK
Warth A ve ark. 2013	56/9 (84.8/15.2)	310/43 (87.8/12.2)	?	425ADK
Villa C ve ark. 2014	32/0 (100/0)	101/12 (89/11)	?	200ADK
Kim HJ ve ark. 2014	126/6 (95.5/4.5)	150/60 (69.4/36)	?	359ADK
ShanzhiW ve ark. 2014	261/1 (99/1)	393/9 (93/7)	99.31/97.83	664ADK
Sheffield BS ve ark. 2014	58/4 (93/7)	178/66 (73/27)	?	563ADK+85KHDAK
Jie Liu ve ark. 2014	63/2 (96.9/3.1)	59/15 (79.7/20.3)	?	169 ADK
Somaiah Nve ark. 2014	222/2 (99.1/0.01)	49/28 (63.6/36.4)	?	301 ADK
Hantson I ve ark. 2014	29/1 (96.6/3.4)	140/43 (76.5/23.5)	?	297 ADK+KHDAK
Bizim çalışmamız 2016	56/1 (98.2/1.8)	250/99 (71.4/28.6)	82.8/67.6	406ADK+KHDAK

Tablo 5.9. EGFR mutasyonu ve Napsin A ilişkisine yönelik çalışmaların özeti.

Çalışma/yıl	EGFR mutant Napsin A+/Napsin A- n (%)	EGFR "wild" Napsin A+/Napsin A- n (%)	Napsin A+ K/E n (%)	Tanı n
Lee JG ve ark. 2011	53/3 (94.6/5.4)	38/16 (70.3/29.7)	50/41 (54.9/45.1)	110 ADK
Warth A ve ark. 2013	56/10 (84.8/15.2)	261/93 (73.7/26.3)	?	420 ADK
Liu J ve Ark. 2014	47/18 (72.3/27.7)	40/34 (54.1/45.9)	44/43 (65.7/59.7)	139 ADK
Bizim çalışmamız 2016	46/2 (95.8/4.2)	207/94 (69.1/30.9)	89/197 (80.2/67.5)	349ADK+KHDAK

6. SONUÇLAR

- Çalışmamızda 600 olgu üzerinden EGFR mutasyonu bulunduran ve bulundurmayan küçük hücreli dışı akciğer karsinoması olgularında morfolojik ve immünhistokimyasal özellikler araştırılmıştır.

- Sitoloji materyallerinin DNA fragman uzunluğu ve analiz başarısı açısından rezeksiyon ve biyopsi materyallerinden daha üstün olduğu görülmüştür. EGFR mutasyon analizi için rezeksiyon, biyopsi ve sitoloji materyallerinin eşit derecede kullanılabilir olduğu saptanmıştır.

- Asit takibinin DNA kalitesi üzerine önemli etkisinin bulunduğu, asit takibi yapılan kemik dokularda DNA kalitesinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Kemik içeren dokularda, EDTA gibi alternatif solüsyonların kullanımı ya da bunlarda, tümör içermesi muhtemel yumuşak dokuların ayıklanarak asitsiz olarak ayrı işlem yapılması faydalı olacaktır.

- Takip ve tespit işlemi kendi laboratuarımızda yapılan olgularda DNA fragman uzunluğu ve analiz başarısı dış merkezlerden konsülte edilen olgulardan daha yüksek bulunmuştur. Bunun dokuların tespiti ve doku takibi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Moleküler çalışmalarda güvenilir sonuçlar için doku tespiti ve takibi esnasında işlem standardizasyonu önemlidir.

- Çalışmamızda EGFR mutasyonu genel olarak akciğerin küçük hücreli karsinoması dışındaki kanserlerinde %14, adenokarsinomalarda ise %17.1 oranında saptanmıştır. Bu oranların Avrupa serilerine ait çalışmaların verilerine daha yakın olduğu görülmüştür. EGFR mutant olgularda yaş ortalaması 62.15'dir. EGFR mutasyonu kadın adenokarsinoma olgularında, erkeklere göre daha yüksek oranda (%33.9'a karşılık %9.4) bulunmuştur.

- Bu seride en sık görülen mutasyon ekzon 21 (L858R) nokta mutasyonudur (%28). En sık mutasyon izlenen bölge ise ekzon 19 olarak bulunmuştur (%53.3). Ekzon 19 mutasyonları içinde en sık görülen mutasyon, tüm

mutasyonların %26.6'sını ve ekzon 19 mutasyonlarının da % 50'sini oluşturan L746-E750 "in frame" delesyonudur.

- EGFR mutant olgularda %79.4, EGFR "wild" tip olgularda ise %80.5 oranında SNP (Q787Q) varlığı görülmüştür. Bu değişikliğin tümör tipi ya da mutasyon varlığı ile değil, etnisite ile ilgili bir değişiklik olabileceği düşünülmüştür.

- EGFR mutasyonu mikropapiller paterne sahip adenokarsinomalarda en yüksek (%40), solid paterne sahip adenokarsinomalarda en düşük (%5.4) olmak üzere tüm tiplerde izlenmiştir. Bu açıdan tümörde izlenen paternin EGFR mutasyonu varlığı açısından rehberlik edemeyeceği düşünülmüştür.

- Müsin içeren olguların büyük çoğunlukla (%91.4) EGFR "wild" tip olduğu görülmüştür.

- EGFR mutant olguların %98.2'si TTF-1 pozitif olarak saptanmıştır. TTF-1 negatif olgular %99.1 oranında EGFR "wild" tip olarak görülmüştür. Bu açıdan test maliyeti ya da testin yapılma süresi ilgili sorun olduğu durumlarda, ya da test edilecek doku miktarı sınırlı olduğunda; TTF-1 negatif bir akciğer tümöründe öncelikle EGFR dışındaki tedavi hedeflerine yönelmenin daha doğru olacağı düşünülmüştür.

- EGFR mutant olgularda %95.8'de Napsin A pozitif olarak saptanmıştır. Napsin A negatif olgular %97.9 oranında EGFR "wild" olarak bulunmuştur.

- Çalışmamızda EGFR mutant olguların hepsi (%100) ALK negatif olarak bulunmuştur.

- Direkt sekanslama ile yapılan bu çalışmada %16 oranında nadir EGFR mutasyonları izlenmiştir. Mutasyon profili bilinmeyen, Türkiye toplumu gibi toplumlarda mutasyon analizinin, beklenmeyen mutasyonları da ortaya çıkartabilecek tarama yöntemleri ile yapılmasının daha doğru olduğu düşünülmüştür.

ÖZET

EGFR Mutasyonu Bulunduran ve Bulundurmayan Akciğer Karsinoması Olgularında Morfolojik ve İmmünhistokimyasal Özellikler

Amaç: Akciğer adenokarsinomasında Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) mutasyonları sık görülen bir bulgudur ve bu mutasyonları bulunduran olgularda EGFR tirozin kinaz inhibitörleri bir tedavi alternatifi oluşturmaktadır. Bu çalışmada Türkiye toplumunda akciğer adenokarsinomalarında EGFR mutasyon oranının, mutasyon dağılımı ve tiplerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca EGFR mutasyonu ile morfolojik özellikler, TTF-1 ve Napsin A boyanması arasındaki ilişkiler irdelenmiştir. Ek olarak, mutasyonu tespit etmede kullanılan materyal tipi ile mutasyon analizinin teknik başarısı arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.

Materyal ve Metod: 2012-2015 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Patoloji ABD, Moleküler Patoloji Laboratuarı'da EGFR mutasyon analizi yapılmış olan toplam 600 olgu geriye dönük olarak değerlendirilmiştir. Hastalara ait verilere bilgisayar kayıtlarından ve arşiv sisteminden ulaşılmıştır. Veri tabanından hastanın yaşı, cinsiyeti, örneğin tipi (sitoloji/biyopsi/rezeksiyon), lokalizasyon (metastatik/primer), materyalin kaynağı (AÜTF hastaneleri ya da konsültasyon), tanı verilirken yapılan immünhistokimyasal incelemeler, DNA analizinde elde edilen fragman uzunluğu, EGFR mutasyon durumu (var/yok), EGFR geninde SNP varlığı (var/yok), ALK gen rearanjman durumu (var ya da yok) kaydedilmiştir. Tüm materyallerin önceki rutin, özel ve immünhistokimyasal boyalı kesitleri yeniden değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede tanılar gözden geçirilmiş, yeterli miktarda doku içeren tüm adenokarsinoma olguları patern açısından ve müsin varlığı açısından yeniden değerlendirilmiştir. Yeterli doku içeren olgularda da doku "array" blokları elde edilerek TTF-1 ve Napsin A immünhistokimyasal boyamaları yapılmıştır. İstatiksel analizler 'SPSS for Windows 15' paket programında yapılmış ve $p < 0.05$ için sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar:

- EGFR mutasyon analiz yapılmış 600 olgunun 495'inde 4 ekzon, 30'unda 3 ekzon, 7'inda 2 ekzon, 1'inde ise sadece 1 ekzon mutasyon açısından değerlendirilebilmiş, 67 olguda ise ya DNA elde edilememiş ya da elde edilmesine karşın, hiçbir ekzonda başarı elde edilememiştir. Sitoloji materyalleri DNA fragman uzunluğu ve analiz başarısı açısından rezeksiyon ve biyopsi materyallerinden daha üstün olarak bulunmuş; EGFR mutasyon analizi için rezeksiyon, biyopsi ve sitoloji materyallerinin eşit derecede kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Asit takibinin DNA kalitesi üzerine önemli etkisinin bulunduğu, asit takibi yapılan kemik dokularda DNA kalitesinin daha düşük olduğu saptanmıştır.
- Çalışmamızda EGFR mutasyon oranı genel olarak akciğer kanserlerinde %14 adenokarsinomalarda ise %17.1 oranında saptanmıştır. Bu oranların Avrupa serilerine ait çalışmaların verilerine daha yakın olduğu görülmüştür. EGFR mutant olgularda yaş ortalaması 62.15 yıl, EGFR mutant olmayan olgularda 60.63 yıl olarak bulunmuştur. Kadın adenokarsinoma olgularında EGFR mutasyon oranı %33.9, erkeklerde %9.4'dur.
- Bu seride en sık görülen mutasyon ekzon 21 (L858R) nokta mutasyonudur (%28). En sık mutasyon izlenen bölge ise ekzon 19 olarak bulunmuştur (%53.3). Ekzon 19 mutasyonları içinde en sık görülen mutasyon, tüm mutasyonların %26.6'sını ve ekzon 19 mutasyonlarının da % 50'sini oluşturan L746-E750 "in frame" delesyonudur. Bu seride 5 olguda çift mutasyon saptanmıştır. İzlenen mutasyonların %16 kadarı nadir EGFR mutasyonlarından oluşmaktadır.
- EGFR mutasyonu mikropapiller paterne sahip adenokarsinomalarda en yüksek (%40), solid paterne sahip adenokarsinomalarda (%5.4) en düşük olmak üzere tüm tiplerde izlenmiştir. Müsin içeren olguların büyük çoğunlukla (%91.4) EGFR "wild" tip olduğu görülmüştür.
- EGFR mutant olguların %98.2'si TTF-1 pozitif olarak saptanmıştır. TTF-1 negatif olgular %99.1 oranında EGFR "wild" tip olarak görülmüştür. TTF-1 negatif olgularda EGFR mutasyonuna rastlama olasılığının çok

düşük olduğu ve TTF-1 negatif olgularda diğer tedavi hedeflerinin ele alınmasının daha doğru olacağı düşünülmüştür.

- EGFR mutant olguların %95.8'inde Napsin A pozitif olarak saptanmıştır. Napsin A negatif olgular %97.9 oranında EGFR "wild" tip olarak bulunmuştur.
- Çalışmamızda EGFR mutant olguların hepsi (%100) ALK negatif olarak saptanmıştır.
- EGFR mutant olgularda %79.4, EGFR "wild" tip olgularda ise %80.5 oranında SNP (Q787Q) varlığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Akciğer adenokarsinoma, EGFR, TTF-1, Napsin A, ALK

SUMMARY

Morphological and Immunohistochemical Features of Lung Carcinoma with or without EGFR Mutation

Objective: Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations are common in lung adenocarcinomas. EGFR tyrosine kinase inhibitors are indicated in tumors with these mutations. In this study, we aimed to investigate the frequency and distribution of EGFR mutations in Turkey. In addition, relationships between EGFR mutation and morphological (predominant pattern and mucin) and immunohistochemical (TTF-1 and Napsin A staining) features were evaluated. Furthermore, the relationships between material type (cytological, biopsy or resection) and the success of mutation analysis were investigated.

Methods: 600 primary and metastatic, therapy-naive non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cases, that were investigated for EGFR mutation by Sanger sequencing in Ankara University Medical School Pathology Department between the 2012-2015, were retrospectively evaluated. Archival records, routine and immunohistochemically stained sections were re-examined. TTF-1 and Napsin A immunohistochemical stains were performed, by forming a tissue array, when adequate paraffin embedded tumor tissues were available. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows 15 and $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results: Mutation analysis was successful in 499 (83.1%) cases. A total of 75 mutations were detected in 70 (%14) patients. Success rate of mutation analysis and DNA fragment length were higher in cytology specimens, when compared with biopsy and resection specimens. EGFR mutation rate in adenocarcinoma was 33.9% for women and 9.4% for men. The distribution of mutations was: 6.7, 53.3, 9.3 and 30.7%, in exons 18, 19, 20 and 21 respectively. In this series, the most common mutation was exon 21 (L858R) point mutation (28%), followed by exon 19 L746-E750 "in frame" deletion (26.6%) The highest frequency of EGFR mutations was found in adenocarcinomas with a predominantly micropapillary pattern (40%), and

the lowest frequency was found in adenocarcinomas with a predominantly solid pattern (5.4%). All EGFR mutant cases, except for one case, were positive for TTF-1. All mutant cases were also positive for Napsin A, except for two cases. Q787Q SNP was a frequent finding in our series (79.6%).

Conclusion: EGFR mutation rate is lower than that of Asia Pacific in Turkish NSCLC cases. Mutation rate and distribution are similar to other European countries. TTF-1 negativity is a good predictor of a wild type EGFR. We think that, TTF-1 status could be incorporated in molecular algorithm of NSCLC cases in resource poor countries.

Key Word: Non-small cell lung cancer (NSCLC), EGFR, ALK, TTF-1, Napsin A

KAYNAKLAR

1. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition American Cancer Society. 2012.

2. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. Avaible www.kanser.gov.tr. 2015.

3. MacConaill LE. Advancing personalized cancer medicine in lung cancer. Archives of pathology & laboratory medicine. 2012;136(10):1210-6.

4. Kumarakulasinghe NB, van Zanwijk N, Soo RA. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). Respirology. 2015;20(3):370-8.

5. Khoo C, Rogers TM, Fellowes A, Bell A, Fox S. Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. Translational lung cancer research. 2015;4(2):126-41.

6. Cancer Facts Figures 2015. American Cancer Society 2015.

7. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clinics in Chest Medicine. 2011;32(4):605-44.

8. Boyle JM, Tandberg DJ, Chino JP, D'Amico TA, Ready NE, Kelsey CR. Smoking history predicts for increased risk of second primary lung cancer: A comprehensive analysis. Cancer. 2015;121(4):598-604.

9. Bastian LA, Gray KE, DeRycke E, Mirza S, Gierisch JM, Haskell SG, et al. Differences in Active and Passive Smoking Exposures and Lung Cancer Incidence Between Veterans and Non-Veterans in the Women's Health Initiative. The Gerontologist. 2016;56(Suppl 1):S102-S11.

10. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. BMJ 1997;315:980-88.

11. Hırayama T. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. Br Med J. 1981; 282(6259): 183–185.

12. Lung Cancer (Non-Small Cell) What is non-small cell lung cancer? Available website: www.lungusa.org. 2016.

13. Richer AL, Friel JM, Carson VM, Inge LJ, Whitsett TG. Genomic profiling toward precision medicine in non-small cell lung cancer: getting beyond EGFR. Pharmacogenomics and personalized medicine. 2015;8:63-79.

14. Travis WD, Brambilla E, Burke A.P., Marx A., Nicholson A.G. (2015). World Health Organization Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2015.

15. 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;120(10):1471-81.

16. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2011;6(2):244-85.

17. Rossi G, Tiseo M, Cavazza A and Colby TV. Is Immunohistochemistry Always Required to Diagnose Lung Cancer? Adv Anat Pathol. 2013;20(5):327-33.

18. Tang X, Kadara H, Behrens C, Liu DD, Xiao Y, Rice D, et al. Abnormalities of the TITF-1 lineage-specific oncogene in NSCLC: implications in lung cancer pathogenesis and prognosis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011;17(8):2434-43.

19. Vincenten J, Smit EF, Vos W, Grünberg K, Postmus PE, Heideman DAM, et al. Negative NKX2-1 (TTF-1) as Temporary Surrogate Marker for Treatment Selection During EGFR-Mutation Analysis in Patients with Non–Small-Cell Lung Cancer. Journal of Thoracic Oncology. 2012;7(10):1522-7.

20. Siddiqui MT. TTF-1 and Napsin a Double Staining in Diagnosing Lung Adenocarcinoma. Journal of Cytology & Histology.2012 3:e103

21. Rossi G, Cavazza A, Righi L, Sartori G, Bisagni A, Longo L, et al. Napsin-A, TTF-1, EGFR, and ALK Status Determination in Lung Primary and Metastatic Mucin-Producing Adenocarcinomas. International journal of surgical pathology. 2014;22(5):401-7.

22. Turner BM, Cagle PT, Sainz IM, Fukuoka J, Shen SS. Napsin A, a New Marker for Lung Adenocarcinoma, Is Complementary and More Sensitive and Specific Than Thyroid Transcription Factor 1 in the Differential Diagnosis of Primary Pulmonary Carcinoma. Archives of pathology & laboratory medicine. 2012;136(2):163-71.

23. Pao W, Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. Nature medicine. 2012;18(3):349-51.

24. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. Cell. 2012;150(6):1121-34.

25. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. The New England Journal of Medicine. 2004;350(21):2129-39.

26. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nature medicine. 2012;18(3):378-81.

27. Bobbio A, Alifano M. Immune therapy of non-small cell lung cancer. The future. Pharmacological research. 2015;99:217-22.

28. Waqar SN, Morgensztern D. Immunotherapy for non-small cell lung cancer: are we on the cusp of a new era? Expert review of clinical immunology. 2015;11(8):871-3.

29. Serracino HS, Franklin WA, Aisner DL. Molecular Pathology of Non-Small Cell Lung Cancer. Surgical pathology clinics. 2012;5(4):903-18.

30. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2014;25(9):1681-90.

31. da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer. Annual review of pathology. 2011;6:49-69.

32. Prabhakar CN. Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. Translational lung cancer research. 2015;4(2):110-8.

33. Ferguson KM. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. Annual review of biophysics. 2008;37:353-73.

34. Yousem SA. Role of molecular studies in the diagnosis of lung adenocarcinoma. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2012;25 Suppl 1:S11-7.

35. Meert AP, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Lafitte JJ, Mascaux C, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. European Respiratory Journal. 2002;20(4):975-81.

36. Chan BA, Hughes BG. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. Translational lung cancer research. 2015;4(1):36-54.

37. Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, Dennis PA, Otterson GA, Bueno R et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. Oncotarget. 2014;5(6):1392-433.

38. Aggarwal C. Targeted therapy for lung cancer: present and future. Annals of palliative medicine. 2014;3(3):229-35.

39. Ogunleye F, Ibrahim M, Stender M, Kalemkerian G, Jaiyesimi I. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. THE American Journal of Hematology/Oncology. 2015;11(1):229-35.

40. Ninomiya H, Hiramatsu M, Inamura K, Nomura K, Okui M, Miyoshi T, et al. Correlation between morphology and EGFR mutations in lung adenocarcinomas Significance of the micropapillary pattern and the hobnail cell type. Lung cancer. 2009;63(2):235-40.

41. Veldore VH, Patil S, Prabhudesai S, Satheesh CT, Shashidhara HP, Krishnamoorthy N, et al. Targeted Therapy Management in NSCLC Patients Using Cytology: Experience from a Tertiary Care Cancer Center. Molecular diagnosis & therapy. 2016;20(2):119-23.

42. Noronha V, Joshi A, Gokarn A, Sharma V, Patil V, Janu A, et al. The Importance of Brain Metastasis in EGFR Mutation Positive NSCLC Patients. Chemotherapy research and practice. 2014:856156.

43. Mäki-Nevala S, Rönty M, Morel M, Gomez M, Dawson Z, Sarhadi VK, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in 510 Finnish Non–Small-Cell Lung Cancer Patients. Journal of Thoracic Oncology. 2014;9(6):886-91.

44. Hlinkova K, Pavel B, Peter B, Ivan M, Zdenka MB, Barbora P, Denisa I. Evaluation of 2-Year Experience With EGFR Mutation Analysis of Small Diagnostic Samples. Diagnostic Molecular Pathlogy. 2013;22(2):70-75.

45. Santis G, Nickless G, Quinn A, Herbert A, Cane P, Spicer J, McLean E, Tobal K. Screening for EGFR and KRAS Mutations in Endobronchial Ultrasound Derived Transbronchial Needle Aspirates in Non-Small Cell Lung Cancer Using COLD-PCR. PLoS One. 2011;6(9):1.

46. Errihani H, Inrhaoun H, Boukir A, Kettani F, Gamra L, Mestari A, et al. Frequency and Type of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Moroccan Patients with Lung Adenocarcinoma. Journal of Thoracic Oncology. 2013;8(9):1212-4.

47. Tang X, Varella-Garcia M, Xavier AC, Massarelli E, Ozburn N, Moran C, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Abnormalities in the Pathogenesis and Progression of Lung Adenocarcinomas. Cancer Prevention Research. 2008;1(3):192-200.

48. Munfus-McCray D, Harada S, Adams C, Askin F, Clark D, Gabrielson E, et al. EGFR and KRAS mutations in metastatic lung adenocarcinomas. Human pathology. 2011;42(10):1447-53.

49. McMillen E, Ye F, Li G, Wu Y, Yin G, Liu W. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and p-EGFR expression in resected non-small cell lung cancer. Experimental Lung Research. 2010;36(9):531-7.

50. Lai Y, Zhang Z, Li J, Sun D, Zhou Ya, Jiang T, et al. EGFR Mutations in Surgically Resected Fresh Specimens from 697 Consecutive Chinese Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Their Relationships with Clinical Features. International journal of molecular sciences. 2013;14(12):24549-59.

51. Xu JM, Han Y, Duan HQ, Gao EM, Zhang Y, Liu XQ, et al. EGFR mutations and HER2/3 protein expression and clinical outcome in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. Journal of cancer research and clinical oncology. 2008;135(6):771-82.

52. He Y, Li S, Ren S, Cai W, Li X, Zhao C, et al. Impact of family history of cancer on the incidence of mutation in epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer patients. Lung cancer. 2013;81(2):162-6.

53. Szumera-Ciećkiewicz A, Olszewski WT, Andrzej T, Kowalski DM, Glogowski M, Krzkowski M, et al. EGFR mutation testing on cytological and histological samples in non-small cell lung cancer: a Polish, single institution study and systematic review of European incidence. Clin Exp Pathol. 2013;6(12):2800-12.

54. Chougule A, Noronha V, Joshi A, Thavamani A, Chandrani P, Upadhyay P, et al . Frequency of EGFR Mutations in 907 Lung Adenocarcioma Patients of Indian. PLoS ONE. 2013;8(10):e76164.

55. Bichev SN, Marinova DM, Slavova YG, Savov AS. Epidermal growth factor receptor mutations in East European non-small cell lung cancer patients. Cellular oncology. 2015;38(2):145-53.

56. Bae NC, Chae MH, Lee MH, Kim KM, Lee EB, Kim CH, et al. EGFR, ERBB2, and KRAS mutations in Korean non-small cell lung cancer patients. Cancer Genetics and Cytogenetics. 2007;173(2):107-13.

57. Krawczyk P, Ramlau R, Chorostowska-Wynimko J, Powrozek T, Lewandowska MA, Limon J, et al. The efficacy of EGFR gene mutation testing in various samples from non-small cell lung cancer patients: a multicenter retrospective study. Journal of cancer research and clinical oncology. 2015;141(1):61-8.

58. Carneiro JG, Couto PG, Bastos-Rodrigues L, Bicalho MAC, Vidigal PV, Vilhena A, et al. Spectrum of somatic EGFR, KRAS, BRAF, PTEN mutations and TTF-1 expression in Brazilian lung cancer patients. Genetics Research. 2014;96:1-9.

59. 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. 2012;67(5):419-24.

60. Arrieta O, Cardona AF, Martin C, Mas-Lopez L, Corrales-Rodriguez L, Bramuglia G, et al. Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in NonSmall-Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP). Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2015;10(5):838-43.

61. Boch C, Roth A, Stephan-Falkenau S, Misch D, Grüning W, Bauer TT, 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;3(4):e002560.

62. Gahr S, Stoehr R, Geissinger E, Ficker JH, Brueckl WM, Gschwendtner A, et al. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. British journal of cancer. 2013;109(7):1821-8.

63. Zimmer S, Kahl P, Buhl TM, Steiner S, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer

influence downstream Akt, MAPK and Stat3 signaling. Journal of cancer research and clinical oncology. 2008;135(5):723-30.

64. Reinmuth N, Jauch A, Xu EC, Muley T, Granzow M, Hoffmann H, et al. Correlation of EGFR mutations with chromosomal alterations and expression of EGFR, ErbB3 and VEGF in tumor samples of lung adenocarcinoma patients. Lung cancer. 2008;62(2):193-201.

65. Helland A, Skaug HM, Kleinberg L, Iversen ML, Rud AK, Fleischer T, et al. EGFR Gene Alterations in a Norwegian Cohort of Lung Cancer Patients Selected for Surgery. Journal of Thoracic Oncology. 2011;6:947-950.

66. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, et al. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS Mutations of p14arf Expression in Non-Small Cell Lung Cancers in Relation to Smoking History. Cancer research. 2007;67(12):5667-72.

67. Lee YJ, Shim HS, Kang YA, Hong SJ, Kim HK, Kim H, et al. Dose effect of cigarette smoking on frequency and spectrum of epidermal growth factor receptor gene mutations in Korean patients with non-small cell lung cancer. Journal of cancer research and clinical oncology. 2010;136(12):1937-44.

68. Sun PL, Seol H, Lee HJ, Yoo SB, Kim H, Xu X, et al. High Incidence of EGFR Mutations in Korean Men Smokers with No Intratumoral Heterogeneity of Lung Adenocarcinoma: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features J Thorac Oncol. 2012;323-330.

69. Kim H-R, Lee JC, Kim Y-C, Kim K-S, Oh I-J, Lee SY, et al. Clinical characteristics of non-small cell lung cancer patients who experienced acquired resistance during gefitinib treatment. Lung cancer. 2014;83(2):252-8.

70. Kim HJ, Lee KY, Kim Y-C, Kim K-S, Lee SY, Jang TW, et al. Detection and comparison of peptide nucleic acid-mediated real-time polymerase chain reaction clamping and direct gene sequencing for epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. Lung cancer. 2012;75(3):321-5.

71. Toh CK, Ahmad B, Soong R, Chuah KL, Tan SH, Hee SW, et al. Correlation between Epidermal Growth Factor Receptor Mutations and Expression of Female Hormone Receptors in East-Asian Lung Adenocarcinoma. J Thorac Oncol. 2010;5 (1):17-22.

72. Yeen TNS, Pathmanathan R, Shiran MS, Zaid FAA, Cheah YK. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in formalin fixed paraffin embedded biopsies in Malaysian non-small cell lung cancer patients. Journal of Biomedical Science. 2013; 20(1):22.

73. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(4):857-65.

74. Sartori G, Cavazza A, Sgambato A, Marchioni A, Barbieri F, Longo L, et al. EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a combined clinicopathologic and molecular scoring system to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors. American journal of clinical pathology. 2009;131(4):478-89.

75. Ragusa M, Vannucci J, Ludovini V, Bianconi F, Treggiari S, Tofanetti FR, et al. Impact of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutations on Clinical Outcome in Resected Non–Small Cell Lung Cancer Patients. American Journal of Clinical Oncology. 2014;37(4):343-9.

76. Skov BG, Hogdall E, Clementsen P, Krasnik M, Larsen KR, Sorensen JB, et al. The prevalence of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in an unselected Caucasian population. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2015;123(2):108-15.

77. Castro AS, Parente B, Goncalves I, Antunes A, Barroso A, Conde S, et al. Epidermal growth factor receptor mutation study for 5 years, in a population of patients with non-small cell lung cancer. Revista portuguesa de pneumologia. 2013;19(1):7-12.

78. Peters MJ, Bowden JJ, Carpenter P, Lewis J, Solomon B. Outcomes of an Australian testing programme for epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. Internal medicine journal. 2014;44(6):575-80.

79. Han B, Tjulandin S, Hagiwara K, Normanno N, Wulandari L, Konstantin Konstantinovich L, et al. Determining the prevalence of EGFR mutations in Asian and Russian patients (pts) with advanced non-small-cell lung cancer (aNSCLC) of adenocarcinoma (ADC) and Non-ADC histology:IGNITE study. Annals of Oncology. 2015; 26(1):29-44

80. Penzel R, Sers C, Chen Y, Lehmann-Muhlenhoff U, Merkelbach-Bruse S, Jung A, et al. EGFR mutation detection in NSCLC--assessment of diagnostic application and recommendations of the German Panel for Mutation Testing in NSCLC. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2011;458(1):95-8.

81. Sonobe M, Manabe T, Wada H, Tanaka F. Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma. British journal of cancer. 2005;93(3):355-63.

82. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). The Lancet. 2016;387(10026):1415-26.

83. Toyooka S, Mitsudomi T, Soh J, Aokage K, Yamane M, Oto T, et al. Molecular oncology of lung cancer. General thoracic and cardiovascular surgery. 2011;59(8):527-37.

84. Nakamura R, Inage Y, Tobita R, Mori K, Numata T, Yanai H, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations: Effect on Volume Doubling Time of Non–Small-Cell Lung Cancer Patients. Journal of Thoracic Oncology. 2014;9(9):1340-4.

85. Soh J, Toyooka S, Matsuo K, Yamamoto H, Wistuba I, Lam S, et al. Ethnicity affects EGFR and KRAS gene alterations of lung adenocarcinoma. Oncology letters. 2015;10(3):1775-1782

86. Sasaki H, Endo K, Takada M, Kawahara M, Tanaka H, Kitahara N, et al. EGFR polymorphism of the kinase domain in Japanese lung cancer. The Journal of surgical research. 2008;148(2):260-3.

87. Yang SY, Yang TY, Li YJ, Chen KC, Liao KM, Hsu KH, et al. EGFR exon 19 in-frame deletion and polymorphisms of DNA repair genes in never-smoking female lung adenocarcinoma patients. International journal of cancer Journal international du cancer. 2013;132(2):449-58.

88. He M, Capelletti M, Nafa K, Yun CH, Arcila ME, Miller VA, et al. EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012;18(6):1790-7.

89. Sasaki H, Endo K, Takada M, Kawahara M, Kitahara N, Tanaka H, et al. EGFR exon 20 insertion mutation in Japanese lung cancer. Lung cancer. 2007;58(3):324-8.

90. Arcila ME, Nafa K, Chaft JE, Rekhtman N, Lau C, Reva BA, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. Molecular cancer therapeutics. 2013;12(2):220-9.

91. Yasuda H, Park E, Yun CH, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo WL, et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. Science translational medicine. 2013;5(216):216ra177.

92. de Biase D, Visani M, Malapelle U, Simonato F, Cesari V, Bellevicine C, et al. Next-generation sequencing of lung cancer EGFR exons 18-21 allows effective molecular diagnosis of small routine samples (cytology and biopsy). PloS one. 2013;8(12):e83607.

93. Querings S, Altmuller J, Ansen S, Zander T, Seidel D, Gabler F, et al. Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. PloS one. 2011;6(5):e19601.

94. Cappuzzo F. Guide to targeted therapies: EGFR mutations NSCLC. Springer International Publishing Switzerland 2014.

95. Allo G, Bandarchi B, Yanagawa N, Wang A, Shih W, Xu J, et al. Epidermal growth factor receptor mutation-specific immunohistochemical antibodies in lung adenocarcinoma. Histopathology. 2014;64(6):826-39.

96. Kozu Y, Tsuta K, Kohno T, Sekine I, Yoshida A, Watanabe S, et al. The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma. Lung cancer. 2011;73(1):45-50.

97. Seo AN, Park TI, Jin Y, Sun PL, Kim H, Chang H, et al. Novel EGFR mutation-specific antibodies for lung adenocarcinoma: highly specific but not sensitive detection of an E746_A750 deletion in exon 19 and an L858R mutation in exon 21 by immunohistochemistry. Lung cancer. 2014;83(3):316-23.

98. Jeon YK, Sung SW, Chung JH, Park WS, Seo JW, Kim CW, et al. Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer. Lung cancer. 2006;54(3):387-98.

99. Cappuzzo FH, F. R. Rossi, E. Bartolini, S. Ceresoli, G. L. Bemis, L. Haney, J. Witta, S. Danenberg, K. Domenichini, I. Ludovini, V. Magrini, E. Gregorc, V. Doglioni, C. Sidoni, A., Tonato MF, W. A. Crino, L. Bunn, P. A., Jr., Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. Journal of the National Cancer Institute. 2005;97(9):643-55.

100. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, et al. Erlotinib in Lung Cancer — Molecular and Clinical Predictors of Outcome. J Med. 2005;353:133-144

101. Sean Tracy TM, Mukohara T, Hansen M, Meyerson M, Johnson BE and Janne PA. Gefitinib Induces Apoptosis in the EGFR L858R Non–Small-Cell Lung Cancer Cell Line H3255. Canser Res. 2004;64(20):7241-4

102. Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(28):6838-45.

103. Bethune G, Bethune D, Ridgway N, Xu Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. Journal of thoracic disease. 2010;2:48-51.

104. Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. Cancer. 2005;103(6):1265-73.

105. Leidner RS, Fu P, Clifford B, Hamdan A, Jin C, Eisenberg R, et al. Genetic Abnormalities of the EGFR Pathway in African American Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2009;27(33):5620-6.

106. Jotte RM, Spigel DR. Advances in molecular-based personalized non-small-cell lung cancer therapy: targeting epidermal growth factor receptor and mechanisms of resistance. Cancer medicine. 2015;4(11):1621-32.

107. Cortot AB, Janne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society. 2014;23(133):356-66.

108. Cheng L, Alexander RE, Maclennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2012;25(3):347-69.

109. Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. Clinical lung cancer. 2009;10(4):281-9.

110. Lee JK, Shin JY, Kim S, Lee S, Park C, Kim JY, et al. Primary resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with non-small-cell lung cancer harboring TKI-sensitive EGFR mutations: an exploratory study. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2013;24(8):2080-7.

111. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. Oncogene. 2009;28 Suppl 1:S24-31.

112. Jorge SEDC, Kobayashi SS, Costa DB. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2014;47(11):929-39.

113. Stewart EL, Tan SZ, Liu G, Tsao MS. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. Translational lung cancer research. 2015;4(1):67-81.

114. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, Nebhan CA, Song X, de Stanchina E, et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFRT790M mutation. Cancer discovery. 2012;2(10):922-33.

115. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011;17(5):1169-80.

116. Uramoto H, Onıtsuka T, Shımokawa H, Hanagarı T, OYAMA T. Epithelial–Mesenchymal Transition in EGFR-TKI Acquired Resistant Lung Adenocarcinoma. Anticanser Research. 2010;30(7):2513-17.

117. Tang S, Nipper R, Gribbin J, Johnson E, Lillegard N, Greene T,Thompson S, Kumpatla S. SNP Discovery Using Restriction-Site Associated DNA (RAD) LongRead Sequencing in Brassica napus, a Polyploid Species. Floragenex. USA. 2008.

118. Koh YW, Kim HJ, Kwon HY, Han JH, Lee CK, Lee MS, et al. Q787Q EGFR Polymorphism as a Prognostic Factor for Lung Squamous Cell Carcinoma. Oncology. 2016;90(5):289-98.

119. Choi JE, Park SH, Kim KM, Lee WK, Kam S, Cha SI, et al. Polymorphisms in the epidermal growth factor receptor gene and the risk of primary lung cancer: a case-control study. BMC cancer. 2007;7:199.

120. Zhang W, Stabile LP, Keohavong P, Romkes M, Grandis JR, Traynor AM et al. Mutation and Polymorphism in the EGFR TK Domain Associated with Lung Cancer. Journal of Thoracic Oncology. 2006;1(7):635-47.

121. Kalikaki A, Koutsopoulos A, Hatzidaki D, Trypaki M, Kontopodis E, Stathopoulos E, et al. Clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving front-line chemotherapy according to EGFR and K-RAS mutation status. Lung cancer. 2010;69(1):110-5.

122. Li W, Qu J, Xu Z. Clinical features and mutation status of EGFR, KRAS, BRAF, EML4-ALK and ROS1 between surgical resection samples and non surgical resection samples in lung cancer. Journal of thoracic disease. 2015;7(5):875-80.

123. Miyanaga A, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihira S, Minegishi Y, et al. Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4–ALK-rearranged non–small–cell lung harbored coexisting EGFR mutation. BMC cancer. 2013;13(262).

124. Jin G, Jeon HS, Lee EB, Kang HG, Yoo SS, Lee SY, et al. EML4-ALK fusion gene in Korean non-small cell lung cancer. Journal of Korean medical science. 2012;27(2):228-30.

125. Cagle PT, Allen TC, Olsen RJ. Lung cancer biomarkers: present status and future developments. Archives of pathology & laboratory medicine. 2013;137(9):1191-8.

126. Zhou C. Lung cancer molecular epidemiology in China: recent trends. Translational lung cancer research. 2014;3(5):270-9.

127. Roh MS. Molecular pathology of lung cancer: current status and future directions. Tuberculosis and respiratory diseases. 2014;77(2):49-54.

128. Uluç BO, Çelik İ, Çetingöz R, Altın S, Eser S, Göksel T, et al. Yol Haritası.2016.

129. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2008;65(10):1566-84.

130. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacological research. 2014;79:34-74.

131. Nishii T, Yokose T, Miyagi Y, Daigo Y, Ito H, Isaka T, et al. Clinicopathological features and EGFR gene mutation status in elderly patients with resected non–small-cell lung cancer. BMC cancer. 2014;14:1471-2407.

132. Leighl NB, Rekhtman N, Biermann WA, Huang J, Mino-Kenudson M, Ramalingam SS, et al. Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the study of lung cancer/association for molecular pathology guideline. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2014;32(32):3673-9.

133. Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. Journal of clinical pathology. 2013;66(2):79-89.

134. Yi S, Zhuang Y, Zhou J, Ma H, Huang J, Wang L, et al. A comparison of epidermal growth factor receptor mutation testing methods in different tissue types in non-small cell lung cancer. International journal of molecular medicine. 2014;34(2):464-74.

135. Smouse JH, Cibas ES, Janne PA, Joshi VA, Zou KH, Lindeman NI. EGFR mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer. Cancer. 2009;117(1):67-72.

136. Savic S, Tapia C, Grilli B, Rufle A, Bihl MP, de Vito Barascud A, et al. Comprehensive epidermal growth factor receptor gene analysis from cytological specimens of non-small-cell lung cancers. British journal of cancer. 2008;98(1):154-60.

137. Confavreux CB, Girard N, Pialat JB, Bringuier PP, Devouassoux-Shisheboran M, Rousseau JC, et al. Mutational profiling of bone metastases from lung adenocarcinoma: results of a prospective study (POUMOS-TEC). BoneKEy reports. 2014;3:580.

138. Janneke C. Alers P-JK, Kees J. Vissers, and Herman van Dekken. Effect of Bone Decalcification Procedures on DNA In Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization: EDTA Is Highly Preferable to a Routinely Used Acid Decalcifier. 1999;47:703-9.

139. Brown RSD, Edwards J, Bartlett JW, Jones C and Dogan A. Routine Acid Decalcification of Bone Marrow Samples Can Preserve DNA for FISH and CGH Studies in Metastatic Prostate Cancer. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2002;50:113-5.

140. Walsh L, Freemont J and Hoyland JA. The effect of tissue decalcification on mRNA retention within bone for in-situ hybridization studies. 1993;74(3):237-41.

141. Singh VM, Salunga RC, Huang VJ, Tran Y, Erlander M, Plumlee P, et al. Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies. Annals of diagnostic pathology. 2013;17(4):322-6.

142. 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;8:142.

143. Bircan S, Baloglu H, Kucukodaci Z, Bircan A. EGFR and KRAS mutations in Turkish non-small cell lung cancer patients: a pilot study. Medical oncology. 2014;31(8):87.

144. Baykara O, Tansarikaya M, Demirkaya A, Kaynak K, Tanju S, Toker A, et al. Association of epidermal growth factor receptor and K-Ras mutations with smoking history in non-small cell lung cancer patients. Experimental and therapeutic medicine. 2013;5(2):495-8.

145. Kus T, Aktas G, Sevinc A, Kalender ME, Yilmaz M, Kul S, et al. Prognostic impact of initial maximum standardized uptake value of (18)F-FDG PET/CT on treatment response in patients with metastatic lung adenocarcinoma treated with erlotinib. OncoTargets and therapy. 2015;8:3749-56.

146. Unal OU, Oztop I, Calibasi G, Baskin Y, Koca D, Demir N, et al. Relationship between Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Clinicopathological Features in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer in Western Turkey. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013;14(6):3705-9.

147. Akca H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, et al. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. Cancer genetics. 2013;206(3):73-80.

148. Dogan M. The Relationship Between Common EGFR, BRAF, KRAS Mutations and Prognosis in Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer with Response to the Treatment in Turkey. International Journal of Hematology and Oncology. 2014;24(1):1-10.

149. Kanmaz ZD, Aras G, Tuncay E, Bahadir A, Kocaturk C, Yasar ZA, et al. Contribution of18Fluorodeoxyglucose positron emission tomography uptake and TTF-1 expression in the evaluation of the EGFR mutation in patients with lung adenocarcinoma. Cancer biomarkers : section A of Disease markers. 2016;16(3):489-98.

150. Sag SO, Gorukmez O, Ture M, Gorukmez O, Deligonul A, Sahinturk S, et al. Spectrum of EGFR gene mutations and ALK rearrangements in lung cancer patients in Turkey. SpringerPlus. 2016;5:482.

151. Cetin Z, Ozbilim G, Erdogan A, Luleci G, Karauzum SB. Evaluation of PTEN and Mcl-1 expressions in NSCLC expressing wild-type or mutated EGFR. Medical oncology. 2009;27(3):853-60.

152. Cheng C, Wang R, Li Y, Pan Y, Zhang Y, Li H, et al. EGFR Exon 18 Mutations in East Asian Patients with Lung Adenocarcinomas: A Comprehensive Investigation of Prevalence, Clinicopathologic Characteristics and Prognosis. Scientific reports. 2015;5:13959.

153. Mu XL, Zhang XT, Wang MZ, Feng RE, Cui QC, Zhou HS, et al. Gefitinib-Sensitive Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Domain in Chinese Patients with NonSmall Cell LungCancer. Human Cancer Biology. 2005;11(12):4289-94.

154. Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, Lindeman N, Holmes AJ, Joshi VA, et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2006;12(13):3908-14.

155. Kaneda T, Hata A, Tomioka H, Tanaka K, Kaji R, Fujita S, et al. Possible differential EGFR-TKI efficacy among exon 19 deletional locations in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. Lung cancer. 2014;86(2):213-8.

156. Sheng M, Wang F, Zhao Y, Li S, Wang X, Shou T, et al. Comparison of clinical outcomes of patients with non-small-cell lung cancer harbouring epidermal growth factor receptor exon 19 or exon 21 mutations after tyrosine kinase inhibitors treatment: a meta-analysis. European journal of clinical pharmacology. 2016;72(1):1-11.

157. Li B, Sun SZ, Yang M, Shi JL, Xu W, Wang XF, et al. The correlation between EGFR mutation status and the risk of brain metastasis in patients with lung adenocarcinoma. Journal of neuro-oncology. 2015;124(1):79-85.

158. Peng L, Song Z, Jiao S. Comparison of uncommon EGFR exon 21 L858R compound mutations with single mutation. OncoTargets and therapy. 2015;8:905-10.

159. Oxnard GR, Lo PC, Nishino M, Dahlberg SE, Lindeman NI, Butaney M, et al. Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2013;8(2):179-84.

160. Hantson I, Verbeken E, Vandenberghe P, Vliegen L, Roskams T, Vander Borght S, et al. Performance of standard procedures in detection of EGFR mutations in daily practice in advanced NSCLC patients selected according to the ESMO guideline: a large Caucasian cohort study. Translational Respiratory Medicine. 2014;2(1):9.

161. Woo HS, Ahn HK, Lee HY, Park I, Kim YS, Hong J, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer and resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. Investigational new drugs. 2014;32(6):1311-5.

162. Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. Journal of thoracic disease. 2011;3(1):10-8.

163. Masago K, Fujita S, Irisa K, Kim YH, Ichikawa M, Mio T, et al. Good clinical response to gefitinib in a non-small cell lung cancer patient harboring a rare somatic epidermal growth factor gene point mutation; codon 768 AGC > ATC in exon 20 (S768I). Japanese journal of clinical oncology. 2010;40(11):1105-9.

164. Kancha RK, von Bubnoff N, Peschel C, Duyster J. Functional analysis of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and potential implications for EGFR targeted therapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(2):460-7.

165. Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2014;94(2):129-37.

166. Wu JY, Wu SG, Yang CH, Gow CH, Chang YL, Yu CJ, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(15):4877-82.

167. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. Expert opinion on therapeutic targets. 2012;16(1):15-31.

168. Kancha RK, Peschel C and Duyster J. The Epidermal Growth Factor Receptor-L861Q Mutation Increases Kinase Activity without Leading to Enhanced Sensitivity Toward Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2011;6(2):387-92.

169. Watanabe S, Minegishi Y, Yoshizawa H, Maemondo M, Inoue A, Sugawara S, et al. Effectiveness of Gefitinib against Non–Small-Cell Lung Cancer with the Uncommon EGFR Mutations G719X and L861Q. J Thorac Oncol. 2014;9(2):189-94.

170. Bean J, Riely GJ, Balak M, Marks JL, Ladanyi M, Miller VA, et al. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(22):7519-25.

171. Wu SG, Chang YL, Hsu YC, Wu JY, Yang CH, Yu CJ, et al. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma of complex epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations with the classical mutation pattern. Oncologist. 2008;13(12):1276-84.

172. Fung C, Zhou P, Joyce S, Trent K, Yuan JM, Grandis JR, et al. Identification of epidermal growth factor receptor (EGFR) genetic variants that modify risk for head and neck squamous cell carcinoma. Cancer letters. 2015;357(2):549-56.

173. Metzger B, Begon D, Faber C, Kayser J, Berchem G, Pauly M, et al. The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in tyrosine kinase domain. BMC Medical Genetics. 2011;12(144).

174. Lee GH, Choi YM, Kim JM, Shin JJ, Kim JG, Moon SY. Association of epidermal growth factor receptor gene polymorphisms with advanced

endometriosis in a Korean population. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology. 2012;164(2):196-9.

175. Jin T, Yu CX, Jin T, Yu CX, Lei DP, Liu DY, et al. Identification of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 single nucleotide polymorphism in Chinese squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN). Acta oto-laryngologica. 2009;129(11):1306-12.

176. Shim HS, Lee H, Park EJ, Kim SH. Histopathologic Characteristics of Lung Adenocarcinomas With Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/ American Thoracic Society/European Respiratory Society Lung Adenocarcinoma Classification. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2011;135(10):1329-34.

177. Zhang Y, Sun Y, Pan Y, Li C, Shen L, Li Y, et al. Frequency of driver mutations in lung adenocarcinoma from female never-smokers varies with histologic subtypes and age at diagnosis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012;18(7):1947-53.

178. Russell PA, Barnett SA, Walkiewicz M, Wainer Z, Conron M, Wright GM, et al. Correlation of Mutation Status and Survival with Predominant Histologic Subtype According to the New IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification in Stage III (N2) Patients. Journal of Thoracic Oncology. 2013;8(4):461-8 .

179. Song Z, Zhu H, Guo Z, Wu W, Sun W, Zhang Y. Correlation of EGFR mutation and predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in Chinese patients. Medical oncology. 2013;30(3):645.

180. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, et al. Validation of the IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification for Prognosis and Association with EGFR and KRAS Gene Mutations Analysis of 440 Japanese Patients. Journal of Thoracic Oncology. 2013;8(1):52-61.

181. Tsuta K, Kawago M, Inoue E, Yoshida A, Takahashi F, Sakurai H, et al. The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for

disease prognosis and correlation of driver gene alterations. Lung cancer. 2013;81(3):371-6.

182. Villa C, Cagle PT, Johnson M, Patel JD, Yeldandi AV, Raj R, et al. Correlation of EGFR mutation status with predominant histologic subtype of adenocarcinoma according to the new lung adenocarcinoma classification of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society. Archives of pathology & laboratory medicine. 2014;138(10):1353-7.

183. Sun Y, Yu X, Shi X, Hong W, Zhao J, Shi L. Correlation of survival and EGFR mutation with predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in stage IB patients. World journal of surgical oncology. 2014;12:148.

184. Chen Z, Liu X, Zhao J, Yang H, Teng X. Correlation of EGFR mutation and histological subtype according to the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma. Clin Exp Pathol. 2014;7(11):8039-45

185. Kım HJ, Choı EY, JınHJ and Shın KC, Relationship Between EGFR Mutations and Clinicopathological Features of Lung Adenocarcinomas Diagnosed via Small Biopsies. Antıcanser Research. 2014;34:3189-96

186. Qiang G, Huang W, Liang C, Xu R, Yan J, Xu Y, et al. Association between histopathological subtype, F-fluorodeoxyglucose uptake and epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. Oncology letters. 2016;11(3):1769-77.

187. Warth A, Penzel R, Brandt R, Sers C, Fischer JR, Thomas M, et al. Optimized algorithm for Sanger sequencing-based EGFR mutation analyses in NSCLC biopsies. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2012;460(4):407-14.

188. Lu F, Li S, Dong B, Zhang S, Lv C, Yang Y. Identification of lung adenocarcinoma mutation status based on histologic subtype: Retrospective analysis of 269 patients. Thoracic Cancer. 2016;7(1):17-23.

189. Zhang R, Li Y, Nie X, Dong X, Wu G. Prognostic implications of immunohistochemistry markers for EGFR-TKI therapy in Chinese patients with advanced lung adenocarcinoma harboring EGFR mutations. OncoTargets and therapy. 2016;9:355-66.

190. Kadota K, Yeh YC, D'Angelo SP, Moreira AL, Kuk D, Sima CS, et al. Associations between mutations and histologic patterns of mucin in lung adenocarcinoma: invasive mucinous pattern and extracellular mucin are associated with KRAS mutation. The American journal of surgical pathology. 2014;38(8):1118-27.

191. Nakamura H, Mochizuki A, Shinmyo T, Ando K, Kurimoto N, Yokote K, et al. Immunohistochemical Detection of Mutated Epidermal Growth Factor Receptors in Pulmonary Adenocarcinoma. Anticanser Research. 2010;30(12):5233-7.

192. Isaka T, Yokose T, Ito H, Nagata M, Furumoto H, Nishii T, et al. Correlations Between the EGFR Mutation Status and Clinicopathological Features of Clinical Stage I Lung Adenocarcinoma. Medicine. 2015;94(42):e1784.

193. Ma Y, Fan M, Dai L, Kang X, Liu Y, Sun Y, et al. The expression of TTF-1 and Napsin A in early-stage lung adenocarcinoma correlates with the results of surgical treatment. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2015;36(10):8085-92.

194. Tanaka H, Yanagisawa K, Shinjo K, Taguchi A, Maeno K, Tomida S, et al. Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. Cancer research. 2007;67(13):6007-11.

195. Fatima N, Cohen C, Lawson D, Siddiqui MT. TTF-1 and Napsin A double stain: a useful marker for diagnosing lung adenocarcinoma on fine-needle aspiration cell blocks. Cancer cytopathology. 2011;119(2):127-33.

196. Stoll LM, Johnson MW, Gabrielson E, Askin F, Clark DP, Li QK. The utility of napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas. Cancer cytopathology. 2010;118(6):441-9.

197. Ikeda S, Naruse K, Nagata C, Kuramochi M, Onuki T, Inagaki M, et al. Immunostaining for thyroid transcription factor 1, Napsin A, p40, and cytokeratin 5 aids in differential diagnosis of non-small cell lung carcinoma. Oncology letters. 2015;9(5):2099-104.

198. Zhang P, Han YP, Huang L, Li Q, Ma DL. Value of napsin A and thyroid transcription factor-1 in the identification of primary lung adenocarcinoma. Oncology letters. 2010;1(5):899-903.

199. Ao MH, Zhang H, Sakowski L, Sharma R, Illei PB, Gabrielson E, et al. The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer. Human pathology. 2014;45(5):926-34.

200. Jie L, Li XY, Zhao YQ, Liu RQ, Zhang JB, Ma J, et al. Genotype-phenotype correlation in Chinese patients with pulmonary mixed type adenocarcinoma: Relationship between histologic subtypes, TITF-1/SP-A expressions and EGFR mutations. Pathology, research and practice. 2014;210(3):176-81.

201. Lee JG, Kim S, Shim HS. Napsin A is an independent prognostic factor in surgically resected adenocarcinoma of the lung. Lung cancer. 2012;77(1):156-61.

202. Zhao Q, Xu S, Liu J, Li Y, Fan Y, Shi T, et al. Thyroid transcription factor-1 expression is significantly associated with mutations in exon 21 of the epidermal growth factor receptor gene in Chinese patients with lung adenocarcinoma. OncoTargets and therapy. 2015;8:2469-78.

203. Vallee A, Sagan C, Le Loupp AG, Bach K, Dejoie T, Denis MG. Detection of EGFR gene mutations in non-small cell lung cancer: lessons from a single-institution routine analysis of 1,403 tumor samples. International journal of oncology. 2013;43(4):1045-51.

204. Sheffield BS, Bosdet IE, Ali RH, Young SS, McNeil BK, Wong C, et al. Relationship of thyroid transcription factor 1 to EGFR status in non-small-cell lung cancer. Current oncology. 2014;21(6):305-8.

205. Warth A, Penzel R, Lindenmaier H, Brandt R, Stenzinger A, Herpel E, et al. EGFR, KRAS, BRAF and ALK gene alterations in lung adenocarcinomas: patient outcome, interplay with morphology and immunophenotype. The European respiratory journal. 2014;43(3):872-83.

206. Somaiah N, Fidler MJ, Garret-Mayer E, Wahlquist A, Shirai K, Buckingham L et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations are exceptionally rare in thyroid transcription factor (TTF-1)- negative adenocarcinomas of the lung. Oncoscience. 2014;1(8):522-8.

207. Leary AF, Castro DG, Nicholson AG, Ashley S, Wotherspoon A, O'Brien ME, et al. Establishing an EGFR mutation screening service for non-small cell lung cancer - sample quality criteria and candidate histological predictors. European journal of cancer. 2012;48(1):61-7.

208. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(13):4275-83.

209. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2011;22(12):2616-24.

210. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A, Menju T, Nakayama E, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. Annals of surgical oncology. 2010;17(3):889-97.

211. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(16):5216-23.

212. Takamochi K, Takeuchi K, Hayashi T, Oh S, Suzuki K. A Rational Diagnostic Algorithm for the Identification of ALK Rearrangement in Lung

Cancer: A Comprehensive Study of Surgically Treated Japanese Patients. PLoS One. 2014;8(8):e69794.

213. Zhang YG, Jin ML, Li L, Zhao HY, Zeng X, Jiang L, et al. Evaluation of ALK Rearrangement in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Using FISH, Immunohistochemistry, and Real-Time Quantitative RT- PCR on Paraffin-Embedded Tissues. PLoS One. 2013;8(5): e64821.

214. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(26):4247-53.

215. Zhang X, Zhang S, Yang X, Yang J, Zhou Q, Yin L, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. Molecular cancer. 2010;9:188.

216. Tiseo M, Gelsomino F, Boggiani D, Bortesi B, Bartolotti M, Bozzetti C, et al. EGFR and EML4-ALK gene mutations in NSCLC: a case report of erlotinib-resistant patient with both concomitant mutations. Lung cancer. 2011;71(2):241-3.

217. Yang JJ, Zhang XC, Su J, Xu CR, Zhou Q, Tian HX, et al. Lung cancers with concomitant EGFR mutations and ALK rearrangements: diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2014;20(5):1383-92.

218. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Nikiforow S, Zheng W, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. Cancer research. 2011;71(18):6051-60.

219. Tanaka H, Hayashi A, Morimoto T, Taima K, Tanaka Y, Shimada M, et al . A case of lung adenocarcinoma harboring EGFR mutation and EML4-ALK fusion gene. BMC cancer. 2012;12(558).

220. Wu JY, Yu CJ, Chang YC, Yang CH, Shih JY, Yang PC. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011;17(11):3812-21.

221. Hsieh MH, Fang YF, Chang WC, Kuo HP, Lin SY, Liu HP, et al. Complex mutation patterns of epidermal growth factor receptor gene associated with variable responses to gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. Lung cancer. 2006;53(3):311-22.

222. Yang CH, Yu CJ, Shih JY, Chang YC, Hu FC, Tsai MC, et al. Specific EGFR mutations predict treatment outcome of stage IIIB/IV patients with chemotherapy-naive non-small-cell lung cancer receiving first-line gefitinib monotherapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008;26(16):2745-53.

223. Costa DB, Nguyen KS, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(21):7060-7.

224. Taron M, Ichinose Y, Rosell R, Mok T, Massuti B, Zamora L, et al. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11(16):5878-85.

225. Benedetti G, Latini L, Galetta D, Colucci G, Crino L. Epidermal growth factor receptor exon 19 deletions predict complete regression of multiple intracranial metastases in two cases of non-small cell lung cancer treated with erlotinib. Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2009;4(7):936-7.

226. Huang SF, Liu HP, Liu LH, Ku YC, Fu YN, Tsai HY, et al. High Frequency of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations with Complex Patterns in Non–Small Cell Lung Cancers Related to Gefitinib Responsiveness in Taiwan. Clinical Cancer Research 8195. 2004;10 (24):8195-203.

227. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, et al. EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. British journal of cancer. 2006;95(10):1390-5.

228. Kubota K, Nishiwaki Y, Tamura T, Nakagawa K, Matsui K, Watanabe K, et al. Efficacy and Safety of Erlotinib Monotherapy for Japanese Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer A Phase II Study. Journal of Thoracic Oncology. 2008;3(12):1439-45.

229. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. Cancer research. 2006;66(16):7854-8.

230. van Zandwijk N, Mathy A, Boerrigter L, Ruijter H, Tielen I, de Jong D, et al. EGFR and KRAS mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small-cell lung cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2007;18(1):99-103.

231. Khan NA, Mirshahidi S, Mirshahidi HR. A novel insertion mutation on exon 20 of epidermal growth factor receptor, conferring resistance to erlotinib. Case reports in oncology. 2014;7(2):491-6.

232. Han SW, Kim TY, Jeon YK, Hwang PG, Im SA, Lee KH, et al. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2006;12(8):2538-44.

233. Tam IY, Leung EL, Tin VP, Chua DT, Sihoe AD, Cheng LC, et al. Double EGFR mutants containing rare EGFR mutant types show reduced in vitro response to gefitinib compared with common activating missense mutations. Molecular cancer therapeutics. 2009;8(8):2142-51.

234. De Pas T, Toffalorio F, Manzotti M, Fumagalli C, Spitaleri G, Catania C, et al. Activity of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer harboring rare epidermal growth factor receptor mutations. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2011;6(11):1895-901.

EK

EGFR mutasyon analizi için CAP/IASLC/AMP (The College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, the Association for Molecular Pathology) klavuzu önerileri

Hasta seçimi	- Klinik özelliklerinden bağımsız (yaş, cins, sigara öyküsü) adenokarsinoma tanısı almış hastalar - Adenokarsinoma tanısı almış ileri evre hastalar (TNM 7'ye göre evre 4) - Erken evre hastalar için onkoloji ile ortak karara göre - Yeni örnekler alınarak, lokal progresyon ve tedavi direnci oluşan hastalar
EGFR analizi için materyal seçimi	- Rezeksiyon materyallerinde histolojik derecesinden bağımsız adenokarsinomalar veya adenokarsinoma komponenti içeren diğer akciğer tümörleri - Adenokarsinoma komponentinin varlığının tam olarak dışlanamadığı, sınırlı miktarda tümör içeren klinik özellikler (genç yaş, sigara öyküsü bulunmayan) dikkate alınarak, yassı hücreli veya küçük hücreli kanser morfolojisine sahip biyopsi ve sitolojik materyaller - Primer ve metastatik tümörler - Multipl primer odak içeren tümörlerde her bir odak ayrı ayrı incelenmelidir.
	- İmmünhistokimyasal olarak adenokarsinoma diferansasyonu göstermeyen pür yassı hücreli, küçük hücreli ve büyük hücreli kanserlerde EGFR analizi önerilmemektedir. - Aynı tümörün farklı alanları için birden fazla EGFR analizi önerilmemektedir.
EGFR analiz yöntemi	- PCR bazlı EGFR mutasyon analizi - EGFR mutasyon analizi yeterli performans özelliklerine sahip her hangi bir valide yöntem - En az %50 oranında tümör içeren örnekleri analiz edebilen bir yüntem kullanılmalıdır - %1 sıklıkta görülen tüm mutasyon tiplerini saptayabilen bir yöntem kullanılmalıdır.
	- EGFR kopya sayısının (FISH veya CISH yöntemi ile) saptanması veya immünhistokimya ile EGFR değerlendirilmesi önerilmemektedir.
EGFR mutasyon analizi için seçilecek dokular	- Parafine gömülü dokular, taze, dondurulmuş dokular, formalin veya alkol ile tespit edilmiş dokular - Sitoloji materyallerinde hücre bloklarının, yayma preparatlara tercih edilmesi; ancak yayma preparatların da kullanılabileceği önerilmektedir.
	- Dekalsifiye dokular, asidik veya ağır metal fiksatifleri ile tespit edilmiş dokular önerilmemektedir.
Patoloğun rolü	- DNA miktarı ve kalitesi açısından tümör alanını seçerek dokunun yeterliliğini belirlemeli - Analiz edilecek her bir örnek tümör içeriği açısından değerlendirmeli, gerektiğinde tümör hücre oranını artırmak için deneyimli teknoloğa lazer mikrodiseksiyon için yönlendirmelidir.
EGFR mutasyon analiz sonuçları	EGFR mutasyon analiz sonuçlarına 2 hafta (10 iş günü) içerisinde ulaşılmalıdır.