

DERLEME

CBU-SBED, 2016, 3(2):165-168

İleri Evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Hedef Driver Mutasyonların Tespitinde Likit Biyopsi Doku Biyopsisinin Yerini Alabilir mi?

Ahmet Dirican¹, Nigar Dirican², Ali Ölmezoğlu³

Yayınlanma: 30.06. 2016

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıklar AD, Tıbbi Onkoloji BD, Manisa²Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları AD, Isparta³Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi AD, Manisa

*Sorumlu yazar: Ahmet Dirican, E-mail: ahmetdirican@yahoo.com

Özet

İleri evre küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'inde hedeflenmiş tedavinin etkinliğini ön görmek için en yararlı biyobelirteçler "driver mutasyon" olarak bilinen somatik genomik değişikliklerdir. Mümkün olan her durumda ileri evre KHDAK'li hastalarda driver mutasyonları tespit etmek için tümör dokusu değerlendirilmesi gerekir. Bununla birlikte KHDAK'inde genetik analiz için yeterli tümör materyali elde etmek klinik pratikte sıklıkla zordur. Bu nedenle KHDAK'li hastaların plazmalarında driver mutasyonların analizi değerlidir. Çünkü bu analizler tanı anında ve tedavi süresince oluşan driver mutasyonları tespit edebilir. Driver mutasyonlarının tespit etmek için plazma örneklerinin alınma işlemine likit biyopsi olarak adlandırılır. Likit biyopsi sonuçları yüksek spesifisite oranlarına sahipken sensivite oranları düşüktü. Çalışmaların sonuçlarına göre %90-100 aralığındaki yüksek spesifisite değerleri umut vericidir bununla birlikte düşük sensivite oranları (%70 ile 80) doku bazlı testlerin hastalarda standart kalacağını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, Likit Biyopsi, Driver mutasyon.

Abstract

The most useful biomarkers for predicting the efficacy of targeted therapy in advanced non-small cell carcinoma (NSCLC) are somatic genome alterations known as "driver mutations." Whenever feasible, tumor tissue should be evaluated for the identification of a driver mutation in patients with advanced NSCLC. However, in NSCLC, it is often difficult to obtain sufficient tumor material for genetic analyses in clinical practice. Therefore, analyses of driver mutations in the plasma of the patients with NSCLC are valuable. These analyses can identify driver mutations present at the diagnosis time as well as the ones that arise during therapy. The procedure of taking plasma samples to detect driver mutations is named 'liquid biopsy'. High level of specificity that ranged from 90% to 100%, seen across the studies, is promising; however, the low sensitivity rate (70% to 80%) suggests that tissue-based testing will remain the standard of care.

Keywords: NSCLC, Liquid biopsy, Driver mutation.

GİRİŞ

Akciğer kanseri tüm kanserler arasında birinci sıklıkta yer almakta ve her yıl dünyada yaklaşık 1,38 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır (1). Tedaviye hücre tipi, tümör evresi, moleküler özellikler ve hastanın performans durumu değerlendirilerek karar verilmektedir. Metastatik hastalıkta genellikle sistemik tedaviler uygulanmaktadır.

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'ni oluşturmaktadır (2). Metastatik KHDAK'nin geçmişine bakıldığında başlıca tedaviyi sistemik kemoterapilerin oluşturduğu görülmektedir. Ancak 2000'li yılların başından itibaren KHDAK' inde ve diğer birçok kanserde karsinogeneze etkili olduğu düşünülen moleküler yollarla anlaşılma başlanmıştır. Kanser hücrelerinde bu moleküler yollardaki spesifik hedeflere karşı yeni ajanlar geliştirilmeye başlanmıştır. Gelecek adına umut verici olan bu ajanların, kanser hücrelerinde ölüme yol açarken normal hücrelere zarar vermemesi amaçlanmıştır.

KHDAK'de, 2008 yılından bu yana adenokarsinom ve squamöz hücreli karsinom ayırımının belirlenmesi, özellikle metastatik hastalığın optimal tedavisinde

önemli olmuştur. Karsinogeneze etkili bu moleküler yollardaki "driver" mutasyonları bu iki alt tipte farklıdır (3). İleri evre KHDAK-adenokanserde "epidermal büyüme faktör reseptör" (EGFR) ve "anaplastik lenfoma kinaz" (ALK) genlerindeki onkogenik aktivasyona neden olan driver mutasyonları, bireyselleştirilmiş tedaviler için en önemli iki hedefi oluşturmaktadır (4). Bugün için akciğer kanseri ile ilgili bütün rehberler, metastatik adenokarsinomlu vakaların hepsinde ya primer tümörden veya metastazından alınan biyopsi örneklerinde, bahsedilen iki onkogenin driver mutasyonlarının değerlendirilmesini yüksek kanıt düzeyinde önermektedir (4,5). Ayrıca, bireyselleştirilmiş tedavi sonrası hastalığın progresyonu durumunda tedaviye direnç geliştiren yeni mutasyonların saptanması ve başka hedefleyici tedavinin kullanılabilmesi için yeni biyopsiler önerilmektedir. Bu driver mutasyonların tespitine ilişkin testlerde şu an için tam bir standardizasyon sağlanamamıştır. En sık kullanılan yöntemler arasında genin tam sekans analizi, polimeraz zincir reaksiyon (PCR) ile allel spesifik analiz, immünohistokimyasal (IHC) analiz ve gen translokasyonlarını tespit etmek için kullanılan Floresans in-situ testi (FISH) yer almaktadır. Ancak bu

mutasyonların tespiti her zaman mümkün olmamaktadır. Mutasyon analizi tespitinin başarısız olmasının nedenleri arasında çoğunlukla ilk biyopsi materyalinin az olması ve az olan bu materyalin histolojik ayrımın yapılmasında İHK boyamalar için kullanılması yer almaktadır. Ayrıca komorbid hastalıkların varlığı, primer tümör ya da metastazının biyopsi için uygun bölgede olmaması, hastanın kabul etmemesi gibi sebeplerle çoğu zaman yeni biyopsi de alınmamaktadır. Bu gibi nedenlerle mutasyon analizinin yapılamaması, hastanın sağ kalımına olumlu etki yapması beklenen hedefleyici tedavileri almasına engel olmaktadır. Ek olarak günlük onkoloji pratiğimizde sık karşılaşılan bu durum hasta ve hasta yakınları ile onkolojiyle uğraşan hekimleri karşı karşıya getirebilmektedir. Tüm bu zorluklar driver mutasyonların tespiti için tümör dokusuna alternatif yeni örneklerin değerlendirilmesine neden olmuştur. Özellikle de son dönemde likit biyopsi olarak adlandırılan, hasta kan plazma örneklerinde bu driver mutasyonların tespitine ilişkin çalışmalar dikkat çekmektedir.

KHDAK' de Driver Mutasyonlar

Bir hücrenin hayatta kalma ve çoğalması için selektif avantaj sağlayan, diğer bir deyişle kanserleşmesine neden olan mutasyonlara driver mutasyon denilmektedir (6). HER1 olarak da isimlendirilen EGFR ekstrasellüler, membran içi ve adenosin trifosfat (ATP)'ın bağılandığı tirozin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler domaininden oluşmaktadır. EGFR'ne ekstrasellüler ligandı bağılandıktan sonra intrasellüler domain tirozin kinaz aktive olmaktadır. Sonrasında hücrenin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan proteinlerin sentezlenmesine yol açan intrasellüler sinyal yollarının aktivasyonu sağlanmaktadır. EGFR genindeki bazı mutasyonlar tirozin kinaz domaininde yapısal değişikliğe neden olarak ligand bağımsız bir şekilde sürekli intrasellüler sinyal iletimine yol açmaktadır. Bunun sonucunda mutasyonlu hücrenin anormal kontrolsüz çoğalması kanserleşmeye neden olmaktadır. KHDAK' inde EGFR mutasyon sıklığı batı toplumlarında % 15 saptanırken, Asya kökenlilerde bu oran % 62'dir (7). EGFR mutasyonlarının % 90'ını exon 19 delesyonu ve exon 21 mutasyonu (L858R) oluşturmaktadır. Daha az sıklıkta ise exon 18 mutasyonu ve exon 20 mutasyonu (T790M) görülmektedir. Çalışmalar KHDAK' de, EGFR driver mutasyonlarının varlığında, tirozin kinaz inhibitör (TKİ)'lerinin (Erlotinib, Gefitinib ve Afatinib) kullanımının, standart kemoterapiye göre, hem ortalama genel sağ kalımda (mOS) hem de ortalama hastaliksiz sağ kalımda (mPFS) anlamlı bir artış sağladığını göstermiştir (8-10). T790M mutasyonu, özellikle EGFR-TKİ ile hastalık progresyonunda TKİ'lerine karşı gelişen sekonder direncin yaklaşık % 60'dan sorumludur (11). T790M mutasyonu varlığında tirozin kinaz domaininde yapısal değişiklik olmakta ve mevcut EGFR-TKİ'lerinin bağlanması engellenmektedir. Bu durumda, osimertinib isimli irreversible ve daha kuvvetli bağlanma sağlayan son kuşak EGFR-TKİ kullanılmaktadır. Osimertinib bu endikasyonda US Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay almıştır (12). Ancak bu ilacın kullanılabilmesi için ilk TKİ tedavisi sonrası progresyon geliştiğinde alınacak yeni biyopsi materyalinde bu mutasyonun gösterilme şartı aranmaktadır.

KHDAK'de, ALK tirozin kinazını içeren translokasyonlar yaklaşık % 3-7 oranında saptanmaktadır. EGFR mutasyonları genç ve sigara içmeyen hastalarda daha sık saptanmaktadır. ALK translokasyonun varlığı ALK-TKİ (crizotinib, ceritinib) kullanımı için kuvvetli bir prediktördür (13).

Likit Biyopsi

Kanser tanısı ve moleküler testler için yapılan girişimsel işlemler, gelişebilecek komplikasyonlar nedeniyle risklidir. Ayrıca bu işlemlerle, teknik nedenlerden dolayı her zaman sonuca ulaşmak mümkün olmamakta ve tekrar edilmesi gerekebilmektedir. Bu sorunları aşmak için hızlı, düşük maliyetli, invaziv olmayan ve tedavi sonrası tekrarlanabilecek yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu yöntemlerden birisi de likit biyopsilerdir. Sıvı veya sıvı faz biyopsisi olarak da bilinen likit biyopsi, kan gibi solid olmayan biyolojik dokunun örneklenmesi ve analizidir (14). Dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC), likit biyopsi ile tespiti-analiz edilmesi ve prognostik bir model olarak kullanılması birçok kanserde FDA tarafından kabul edilmiştir (15). Ancak rutin klinik kullanımı bugün için yaygın değildir.

Kanser çalışmalarında, likit biyopsilerinde CTC veya hücreden ayrı serbest dolaşımdaki DNA (cell free DNA) çoğunlukla kullanılmaktadır. Ayrıca tümör hücreleri DNA fragmantlerini dolaşıma salabilir. Bu fragmente DNA parçaları da genomik analiz için kullanılabilir (16).

KHDAK' de Likit Biyopsinin Klinik Kullanımı

2016 Avrupa Akciğer Kanser Kongresi'nde plazma bazlı genetik testlerin kullanıldığı ve KHDAK' inde doku biyopsisinde EGFR mutasyon analizinin gerekli olup olmadığını değerlendiren iki tane çalışma sunuldu. Bu iki çalışma doku ve plazma temelli EGFR mutasyon testleri arasındaki uyumu değerlendirmekteydi. Bu çalışmalardan en kapsamlısı, Avrupa ve Japonya'dan, histolojiden bağımsız 1162 metastatik KHDAK tanı hastanın alındığı ASSESS çalışmasıydı (17). Bu çalışmaya göre artmış metastatik alan sayısı ve ileri yaş ile plazma temelli testin sensitivitesi arasında pozitif ilişki vardı. Buna göre, akciğer ve plevra dışındaki uzak metastaza sahip hastalarda testin sensitivitesi % 63.4 saptanırken, bu değer akciğer ve plevra metastazlı hastalarda %22.8 idi. 65 yaş üstündeki hastalarda plazma temelli testin sensitivitesi daha yüksek saptandı (% 63.5 karşı % 37.8) ancak araştırmacılar tarafından tam bir ilişki kurulamadı. Araştırmacılar, bu çalışmanın sonucuna göre EGFR mutasyon durumunun belirlenmesinde plazma testin kullanılmasının yeterli olabileceği, ancak düşük sensitivite değerleri nedeniyle test sonucunda mutasyon saptanmayanlarda doku biyopsinin hala gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bu konuda aynı kongrede sunulan ikinci çalışma; Oxnard ve ark.'larının yapmış olduğu 216 hastalık AURA çalışmasıydı (18). Bu çalışmada, birinci sırada EGFR-TKİ tedavisine direnç gelişmiş 216 hastada osimertinib tedavisi öncesi cobas testi kullanılarak plazma ve doku örneklerinde EGFR T790M mutasyonu değerlendirildi. Dokuda ve plazmada bakılan testlerin pozitiflik oranı benzer saptandı (sırasıyla 179 ve 167 hasta). Osimertinib

tedavisine doku testi sonucuna göre T790M mutasyonu pozitif saptananlarda tümör yanıt oranları % 62 ve mPFS 9,7 ay saptanırken plazma testine göre mutasyon saptananlarda bu oranlar % 63 ve 8,2 aydı. Plazma testine göre T790M mutasyonu saptanmayanlarda osimertinib tedavisinin sonuçlarına bakıldığında tümör yanıt oranları % 46 ve mPFS 8,2 ay saptandı. Bu sonuçlar plazma testinin sonuçlarıyla beklenmedik bir şekilde uyumsuz saptandı. Tümör biyopsisinde T790M mutasyonu saptanmayan hastalarda tümör yanıt oranları % 26 ve mPFS 3,4 aydı. Bu sonuçlar daha gerçekçi görünmekteydi. Bu çalışmanın temel amacı EGFR-TKİ karşı gelişen T790M mutasyonunu likit biyopsiyle doku biyopsisi olmadan tespit etmek mümkün mü ve bu teste göre verilen osimertinib tedavisinin sonuçlarının nasıl olacağını göstermekti. Bu çalışmanın sonucuna göre yalancı negatiflik oranları nedeniyle plazma testiyle EGFR mutasyonu saptanmayan hastalarda biyopsi materyalinde de çalışılmasının gerekliliğini göstermiştir. Plazma testi pozitif çıkanlarda osimertinib sonuçlarının iyi olması likit biyopsinin yeterli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca yine bu çalışmada bir hasta grubunda plazma testinde pozitif sonuç saptanırken tümör dokusunda negatif sonuç saptanmıştı. Araştırmacılar bu sonucun yalancı pozitiflik olabileceği veya oluşan rezistansın tümörde heterojen olabileceği yorumunu yapmışlardır. Bunun gerçekten daha ileri araştırmalarla aydınlatılması gerekmektedir. Bu konuyla ilgili Sacher ve arkadaşları tarafından prospektif bir çalışma yayımlandı (19). Çalışmaya 120 yeni ve 60 EGFR-TKİ tedavisine direnç gelişmiş skuamöz hücreli dışı KHDAK' li hasta dahil edilmiş. Tüm hastalarda hem dokuda hem plazmada droplet dijital PCR (dtPCR) yöntemiyle EGFR ve KRAS mutasyonlarına bakılmış (exon 19 del, L858R, T790M, ve/veya KRAS G12X). Tüm hastalara yeni sistemik tedavi planlanmış. Plazma ddPCR testinin pozitif prediktif değeri EGFR 19 delesyonu, L858R mutasyonu ve KRAS mutasyonu için % 100 saptanırken T790M mutasyonu için düşük saptanmış (%79). Plazma testi sensitivite değeri ise EGFR 19 delesyonu için % 82, L858R mutasyonu için % 74 ve T790 mutasyonu için % 77 saptanırken KRAS mutasyonu için daha düşük saptanmış (% 64). EGFR ve KRAS mutasyonları için multipl metastatik alana sahip olanlarda ve onların da karaciğer veya kemik metastazına sahip olanlarda daha yüksek sensitivite değerine sahip bulunmuş. Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde T790M dışındaki mutasyonlarda plazma ddPCR testinin yüksek spesifisite değerine sahipken sensitivite değerinin buna göre daha düşük olduğu görülmektedir. EGFR T790M rezistan mutasyonu ise düşük spesifisite ve sensitivite değerine sahipti. ddPCR testinin avantajları arasında hedef mutasyonu hızlı saptanması (yeni tanı alan hastalarda ortalama 3 iş günü ve rezistan gelişen hastalarda ortalama 2 iş günü) ve dezavantajı arasında ise translokasyon ve kopya sayı değişiklikleri gibi mutasyonları kolay tespit edememesi yer almaktadır. Özellikle hem tanı anında hem de tedaviye direnç gelişimi durumunda hedef mutasyonları hızlı saptaması klinisyenlerin tedavi kararında daha hızlı olmalarını sağlayacaktır. Tümör yükü fazla olanlarda testin sensitivitesinin artması bu testin erken evre akciğer

kanserinden ziyade metastatik aşamada uygulanması gerektiğini düşündürmektedir. T790M mutasyonu sensitivite ve spesifitesi her ne kadar diğer mutasyonlara göre likit biyopside düşük olsa da osimertinib tedavisi için uygulanabilir bir test olarak görünmektedir. Daha önceki çalışmalarda kanser hücrelerine ait RNA içeren membran veziküllerinin trombositler içine geçişi gösterilmiştir. Bu amaçla kanserli hastalarda trombositler likit biyopsi için iyi bir belirteç olabilir. Nilsson ve arkadaşları, KHDAK tanılı hastaların trombositlerinde real time PCR (RT-PCR) yöntemi ile EML4-ALK translokasyonunu incelemiştir. Doku biyopsisiyle kıyaslandığında testin sensitivitesi % 65 saptanırken spesifitesi % 100 saptanmış.

Sonuç

KHDAK'inde likit biyopsi uygulamaları moleküler hedeflerin ve buna bağlı olarak hedefli tedavi tedavilerin erken belirlenmesinde umut vermektedir. Geleneksel tümör biyopsi işlemlerine göre daha minimal invaziv bir işlemdir ve böylece hastayı işleme bağlı birçok komplikasyondan kurtarabilir. Kısmen düşük sensitivite ve yüksek spesifisite değerleriyle belki şu aşamada geleneksel biyopsinin yerini alması düşünülmemelidir. Ancak herhangi bir nedenle biyopsi yapılamayan hastalarda uygun bir seçenek olarak düşünülebilir. Likit biyopsinin KHDAK'inde geleneksel biyopsinin yerini alması için daha geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
2. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer*.2005;117:294-9.
3. Heist RS, Sequist LV, Engelman JA. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol*. 2012; 7: 924-33.
4. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137:828.
5. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137:828.
6. Leighl NB, Rekhman N, Biermann WA, 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. *J Clin Oncol* 2014; 32:3673.
7. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;458:719-724.
8. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol* 2014; 9:154.
9. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T and Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: Biological and clinical implications. *Cancer Res*. 2004; 64: 8919-23.
10. Sequist LV, Yang JC-H, Yamamoto N, O'Byrne M, Hirsh V, Mok T, Geat SL, Orlov S, Tsai CM Boyer M, Su WC, Benno J, Kato T, et al. Phase III study of pemetrexed plus cisplatin or

- afatinib in Hasta with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR Mutations. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 3327-34.
11. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, and Massuti B. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239-46.
12. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352:786.
13. Jänne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:1689.
14. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2167-77.
15. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring of cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2013;10: 472-484.
16. Karachaliou N, Mayor-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosella R. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Annals of Translational Medicine* 2015;3: 36.
17. Gingras I, Salgado R, Ignatiadis M. Liquid biopsy: will it be the "magic tool" for monitoring of Solid Tumors response to anticancer therapies?. *Current Opinion in Oncology* 2015; 27: 560-567.
18. Heitz, E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry* 2014;61: 112-123.
19. Normanno N, Brown H, Haddad V, et al. Clinical and demographic features that influence EGFR mutation detection in plasma from patients (pts) with aNSCLC: The ASSESS experience. Presented at the European Lung Cancer Conference, April 13-16; Geneva, Switzerland. Abstract 58O_PR.
20. Oxnard G, Thress K, Alden R, et al. Plasma genotyping for predicting benefit from osimertinib in patients with advanced NSCLC. Presented at the European Lung Cancer Conference, April 13-16; Geneva, Switzerland. Abstract 135O_PR.
21. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer *JAMA Oncol.* Published online April 07, 2016.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

