

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKCİĞERİN İLERİ EVRE SKUAMÖZ HÜCRELİ
KARSİNOMUNDA *DEK* GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN PROGNOZ
VE İMMÜNOTERAPİ TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. HANDE KARABAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. FERDA BİR**

DENİZLİ – 2024

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKCİĞERİN İLERİ EVRE SKUAMÖZ HÜCRELİ
KARSİNOMUNDA *DEK* GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN PROGNOZ
VE İMMÜNÖTERAPİ TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. HANDE KARABAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. FERDA BİR**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 05/02/2024 tarih ve 2024TIPF003 sayılı kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ – 2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, başta tez danışmanım Prof. Dr. Ferda Bir olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Neşe Çallı Demirkan, Prof. Dr. Nagihan Yalçın, Prof. Dr. Nilay Şen Türk, Doç. Dr. Yeliz Arman Karakaya, Dr. Öğr. Üyesi Emel Kılıçarslan, Dr. Öğr. Üyesi Erdem Çomut, Dr. Öğr. Üyesi Gülsün Gülten ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yavuz Dodurga'ya;

Asistanlık hayatım boyunca birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum ve desteklerini her zaman hissettiğim Uzm. Dr. Duygu Akça, Uzm. Dr. Ubeydullah Öztürk ve Uzm. Dr. Nursinem Alkan'a, asistan arkadaşlarım Dr. Gökçe Can'a, Dr. Zülal Seçil İPİN'e ve Dr. Elif Ayyüce Toprak'a ve Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda çalışan tüm laboratuvar ekibine;

Hayatım boyunca beni destekleyen ve tüm zor zamanlarımda yanımda olan başta sevgili annem Ayşe Karabaş, babam Rahmi Karabaş ve kuzenim Uzm. Dr. Nurdane Türkmen olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimle...

Dr. Hande Karabaş

Haziran 2024

Denizli

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xv
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
AKCİĞER KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ VE ETYOLOJİSİ.....	3
AKCİĞER KANSERİ PATOFİZYOLOJİSİ.....	5
AKCİĞER TÜMÖRLERİNİN SINIFLANDIRILMASI.....	9
Skvamöz prekanseröz lezyonlar: Skvamöz Displazi ve Skvamöz Karsinoma İn Situ:.....	11
Skvamöz Hücreli Karsinom.....	12
EVRELEME.....	14
AKCİĞER KANSERİNDE MOLEKÜLER PATOGENEZ.....	15
Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR).....	15
<i>ALK</i> Yeniden Düzenlenmesi.....	16
<i>ROS1</i> Yeniden Düzenlenmesi.....	17
<i>KRAS</i> Mutasyonları.....	18
<i>HER2</i> Mutasyonları.....	19
<i>MET</i> Amplifikasyon ve Nokta Mutasyonları.....	19
<i>BRAF</i> Mutasyonları.....	20
<i>RET</i> Mutasyonları.....	20
<i>PIK3CA</i> Mutasyonları.....	21
AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE İNTRATÜMÖRAL HETEROJENİTE.....	22
AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE STROMAL DEĞİŞİKLİKLER.....	22
TÜMÖR VE İMMÜN SİSTEM.....	23

İMMÜN KONTROL NOKTALARI VE KANSER TEDAVİSİNDEKİ YERİ.....	25
İmmünoterapi	26
PD-L1	27
PD-L1 İmmünohistokimyasını Değerlendirirken Dikkat Edilmesi Gerekenler	30
DEK PROTEİNİ	30
DEK Tespitinde Kullanılan Test Yöntemleri.....	32
GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
OLGU SEÇİMİ VE DOKU BLOKLARIN HAZIRLANMASI.....	34
İMMÜNOHİSTOKİMYA	36
İMMÜNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	36
FLORESAN İN-SİTU HİBRİDİZASYON	36
RNA İZOLASYONU.....	38
Parafine Gömülü Dokudan Kit ile RNA İzolasyonu.....	38
cDNA (Komplementer DNA) sentezi	39
cDNA sentez kit karışımı (AB).....	39
Real- Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	40
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	40
BULGULAR.....	42
KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR.....	42
İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR	45
FISH BULGULARI	48
RT-PCR BULGULARI.....	50
DEK REARRANJMANI VE PD-L1 EKSPRESYONU İLİŞKİSİ	51
SAĞKALIM ANALİZİ.....	52
TARTIŞMA	56
SONUÇLAR.....	65
KAYNAKÇA	67

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD: Amerika Birleşik Devleti

GLOBOCAN: Global Cancer Statistics

AJCC: American Joint Committee of Cancer, Amerika Kanser Komitesi

ASH: Antijen Sunan Hücre

ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz

BRAF: V-raf murin sarkom viral onkogen homolog B1

DNA: Deoksiribonükleik asit

EBV: Epstein Barr virüsü

EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptörü

ERBB2: İnsan epidermal büyüme faktörü 2

FDA: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi

İC: İmmün Hücre Skoru

İHK: İmmünohistokimya

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

PD-1: Programlı ölüm-1 reseptörü

PD-L1: Programlı ölüm ligandı 1

RNA: Ribonükleik Asit

SCC: Skuamöz Hücreli Karsinom

TCR: T Cell Reseptör

TKİ: Tirozin Kinaz İnhibitörü

TPS: Tümör Proporsiyon Skoru

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. PD-L1 tedavisindeki ilaçlar ve hangi moleküllere karşı geliştirildikleri özetlenmiştir.....	26
Şekil 2. Günlük rutinde kullanılan KHDAK için ilaç firmaları ile ilişkili 5 PD- L1 primer antikoru ve immünohistokimya cihazı ile çalışma önerileri	28
Şekil 3. Preanalitik Aşamada Önemli Noktalar	29
Şekil 4. Sağkalım Analizi	51
Şekil 5. DEK rearranjmanı için sağkalım analizi	52

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. FISH incelemesinde DEK füzyonu saptanan biri yan yana biri ise ayrılmış olarak izlenen yeşil ve turuncu sinyal çifti..... 47

Resim 2. FISH incelemesinde DEK füzyonu tespit edilmeyen her ikisi de yan yana izlenen yeşil ve turuncu sinyal çiftleri 47

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. WHO 2021 Akciğer Kanseri Sınıflandırması.....	9
Tablo 2. IASCL'nin 8. Evreleme Sistemi – T, N ve M Evresi.....	34
Tablo 3. Olguların yaşa ve cinsiyete göre dağılımı.....	41
Tablo 4. Olguların klinikopatolojik özelliklerine göre dağılımı.....	41
Tablo 5. Olguların <i>EGFR</i> mutasyonu, <i>ALK</i> ve <i>ROS1</i> rearanjmanına göre dağılımı	43
Tablo 6. Olgulara ait PD-L1 skor bilgileri.....	44
Tablo 7. Klinikopatolojik parametreler ile PD-L1 TPS skoru ilişkisi.....	45
Tablo 8. PD-L1 IC skoru ile çalışma parametrelerinin ilişkisi.....	46
Tablo 9. <i>DEK</i> rearanjmanı varlığının klinikopatolojik verilerle ilişkisi.....	48
Tablo 10. <i>AFF2</i> füzyonu varlığının klinikopatolojik verilerle ilişkisi.....	49
Tablo 11. <i>DEK</i> rearanjmanı ile PD-L1 TPS skoru ilişkisi.....	50
Tablo 12. Mortalite ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi.....	52

ÖZET

AKCİĞERİN İLERİ EVRE SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMUNDA *DEK* GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN PROGNOZ VE İMMÜNÖTERAPİ TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Hande KARABAŞ

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomları akciğer kanserlerinin en sık rastlanan tipidir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının büyük bir kısmını skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom oluşturmaktadır. Daha seyrek olarak diğer histolojik tipler görülmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında prognoz ve tedavideki en önemli parametre hastalığın evresidir. Erken evre tümörlerde klasik olarak cerrahi rezeksiyon önerilirken, ileri evre tümörlerde ise kemoradyoterapiye ek olarak özellikle son yıllarda, geçerliliği onaylı bir belirteç ile duyarlılığı saptanan tümörlerde immünoterapi ve genetik değişiklikler içeren tümörlerde sürücü onkogenin hedeflendiği tedaviler kullanılmaktadır.

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında terapötik ajanlara uygun hedeflenebilir spesifik genetik değişikliklerin keşfedilmesi, rutin uygulamada bu genetik değişiklikleri saptayan moleküler testlerin önemini artırmıştır. *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *BRAF V600E*, *MET Ekson 14* ve *NTRK* genetik değişikliklerini hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının bazı alt tipleri için Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almıştır.

Son zamanlarda sinonazal bölgede yeni bir antite olarak *DEK::AFF2* füzyonu içeren skuamöz hücreli karsinomlar tanımlanmaya başlamıştır. Baş ve boyun bölgesinin *DEK::AFF2* nonkeratinize skuamöz hücreli karsinomları agresif klinik davranışa sahip olmasına rağmen immünoterapiye karşı duyarlılığı bazı HPV negatif karsinomlarda bildirilmiş bir tümördür [1, 2]. Ancak akciğerin skuamöz hücreli karsinomlarında bu gen ile ilgili araştırma sayısı çok kısıtlıdır.

DEK geni, birçok kanserde bildirilen potansiyel bir biyobelirteç ve onkogendir. *DEK* onkogeni, transkripsiyonel düzenleme, sinyal iletimi, diferansiyasyon, apoptoz, RNA işleme ve DNA replikasyonu gibi çeşitli önemli nükleer süreçleri yönlendirmek

için SAP domaini ile DNA'ya bağlanır. Son zamanlarda DEK proteininin artan ekspresyonunun meme kanseri, serviks kanseri, nöroendokrin prostat kanseri, hepatoselüler karsinom, hematolojik maligniteler, mide adenokarsinomu ve akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli neoplazmlarla ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durum DEK proteininin tümörün ilerlemesi ve tedavisi için potansiyel bir biyobelirteç ve belirleyici olabileceğini düşündürmektedir. Ancak DEK proteininin akciğer kanserindeki rolü tam olarak bilinmemektedir [3].

AFF2 geni, X kromozomunun (Xq28) uzun kolunda yer alan X'e bağlı bir gendir. Bu gen, *AFF1/AF4*, *AFF2/FMR2*, *AFF3/LAF4* ve *AFF4/AF5q31*'i içeren *AFF* gen ailesine aittir. *AFF2* geni esas olarak beyinde ifade edilir ve kodlanan protein sinaptik plastisitede rol alır. *AFF2* proteini, transkripsiyon aktivatörü olarak işlev gören bir RNA bağlayıcı proteindir. *AFF2* yeniden düzenlemeleri birçok malign neoplazi ile ilişkilendirilmiştir [4].

Öte yandan torasik malignitelerdeki terapötik fırsatlar, ileri evre akciğer kanserinin tedavisinde immün kontrol noktası inhibitörlerinin çoklu faz III çalışmaları ile önemli ölçüde değişmiştir. Artık en azından bir hasta alt grubunda immünoterapinin sitotoksik kemoterapiye üstünlüğü kanıtlanmıştır. Ayrıca birinci basamakta immünoterapi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı tedavilerin kanıtları da vardır. Programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1)/programlanmış hücre ölümü-ligandı 1 (PD-L1) yolu hedefli immünoterapi, akciğer kanserinin tedavisinde etkili bir seçenek haline gelmiştir. Temel olarak PD-1 ligandının reseptörlerine, PD-L1 veya PD-L2'ye bağlanması, T hücresi aktivasyonunda rol oynayan kinazları inhibe ederek tümöre karşı doğuştan gelen sitotoksik T hücresi tepkisini önleyebilir [5]. Akciğer kanserinde PD-L1 proteininin ekspresyonunun prognostik bir faktör olması veya PD-1 bloke edici antikörelere yanıtı öngörmesi beklenir [6].

Biz bu çalışmada akciğerin ileri evre skuamöz hücreli karsinomunda floresan in situ hibridizasyon tekniği (FISH) ile DEK rearranjmanının sıklığını saptamak, reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu testi (rt-PCR) ile *DEK:AFF2* füzyonlu olguları belirlemek, bu gen değişikliğinin prognoza etkisini, PDL1 pozitifliği ve immünoterapi yanıtı ile ilişkisini araştırmayı planladık.

Çalışmamıza Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda 2017-2023 yılları arasında skuamöz hücreli karsinom tanısı alan; bronkoskopik biyopsi veya iğne biyopsi materyallerinden rastgele seçilmiş 128 hastayı aldık. Olguların tümünde *DEK* gen rearranjmanı, PD-L1 immünohistokimyasal ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler ve prognoz arasındaki ilişkiyi inceledik. *DEK* gen rearranjmanı tespit edilen 29 olguda rt-PCR yöntemi ile uygun primerler kullanarak *DEK::AFF2* füzyonunu araştırdık.

Olgularımızın tümüne (n=128) immünohistokimyasal yöntemle Ventana SP 263 klonu kullanarak PD-L1 uygulandı. Tümör hücrelerinde tümör proporsiyon skoru (TPS); PD-L1 membranöz boyanması %1'in altında olan %15.8 olgu, %1-50 arasında %62.4 olgu, %50'nin üstünde boyanma saptanan %21.8 olgu bulundu. PD-L1 boyanması ile cinsiyet, yaş, tümör çapı, tümör evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, nüks ve ölüm durumuna göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0,05$). PD-L1 skorlaması ile total yaşam süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

FISH yöntemi ile araştırmaya alınan 128 olgunun tümünde *DEK* rearranjmanı araştırıldı. Hastaların %21.8'inde *DEK* rearranjmanı tespit edildi. *DEK* rearranjmanı ile cinsiyet, yaş, tümör çapı, tümör evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, nüks ve sağkalım durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0,05$). *DEK* gen rearranjmanı pozitif ve negatif olgular arasında total yaşam süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

FISH yöntemiyle *DEK* rearranjmanı saptanan 29 olguya uygun primerler kullanarak rt-PCR testi uygulandı. Yirmi dokuz olgunun tümünde *DEK::AFF2* füzyonu tespit edildi. *AFF2* füzyonu ile cinsiyet, yaş, tümör çapı, tümör evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, nüks ve sağkalım durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0,05$). *AFF2* füzyonu pozitif ve negatif olgular arasında total yaşam süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

DEK rearranjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonu tespit edilen olgularda PD-L1 ekspresyonunun %1'in altında olma oranı anlamlı şekilde yüksekti ($p:0.010$; $p<0.05$).

DEK proteini birçok organdaki skuamöz hücreli karsinomlarda aşırı eksprese edilir ve tümörün başlatılmasında ve sürdürülmesinde aktif rol oynar. Bu proteinin düzenlenmesi ve fonksiyonu ile ilgili hala birçok açık soru olmasına rağmen, yüksek DEK protein ekspresyonu, yeni bir prognostik faktör olarak faydalı olabilir ve yeni bir terapötik hedef olabilir [7]. Sonuç olarak *DEK* rearranjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonu araştırılan ilk akciğer skuamöz hücreli karsinom serisidir. Ayrıca PD-L1 ve *DEK* rearranjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonu ilişkisi akciğerin skuamöz hücreli karsinom olgularında hiç karşılaştırılmamış olduğu için bizim çalışmamız literatürde bir ilktir. Bulgularımızın immünoterapi verilecek hastaları seçimine, prognoza ve hastaların skuamöz hücreli karsinomlarının patogenezi açıklamaya yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

ABSTRACT

DEK GENE REARRANGEMENT IN ADVANCED STAGE SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE LUNG THE RELATIONSHIP WITH PROGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY TREATMENT

Dr. Hande KARABAŞ

Non-small cell lung carcinomas are the most common type of lung cancer. Squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and large cell carcinoma constitute the majority of non-small cell lung carcinomas. Other types are seen less frequently. The most important parameter in prognosis and treatment in nonsmall cell lung carcinomas is the stage of the disease. While surgical resection is recommended for early-stage tumors, immunotherapy and treatments targeting the driver oncogene have come to the fore in recent years in addition to chemoradiotherapy for advanced-stage tumors.

The discovery of specific targetable genetic changes suitable for therapeutic agents in non-small cell lung carcinomas has increased the importance of molecular diagnostic tests that detect these genetic changes by routine practice. Tyrosine kinase inhibitors targeting genetic changes in *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *BRAF V600E*, *MET Exon 14*, and *NTRK* genes have been approved for certain subtypes of non-small cell carcinomas. United States Food and Drug Administration (FDA) for some subtypes of lung carcinomas has received approval.

Recently, a new entity in the sinonasal region has been described as squamous cells containing *DEK::AFF2* fusion. cell carcinomas are beginning to be identified. Head and neck area *DEK::AFF2* nonkeratinizing squamous cell carcinomas have aggressive clinical behavior. However, its sensitivity to immunotherapy is limited in some HPV-negative carcinomas. It is a reported tumor [1, 2]. However, in squamous cell carcinomas of the lung, this gene is not detected. The number of relevant studies is very limited.

The *DEK* gene is a potential biomarker and oncogene reported in many cancers. Until oncogene, transcriptional regulation, signal transduction, differentiation, apoptosis, RNA processing and the SAP domain to direct various important nuclear processes such as DNA replication. It binds to DNA. It has recently been revealed that increased expression of DEK protein is associated with a variety of neoplasms,

including breast cancer, cervical cancer, neuroendocrine prostate cancer, hepatocellular carcinoma, hematological malignancies, gastric adenocarcinoma, and lung cancer. This suggests that DEK protein may be a potential biomarker and determinant for tumor progression and treatment. However, the role of protein in lung cancer is not fully known [3].

The *AFF2* gene is an X-linked gene located on the long arm of the X chromosome (Xq28). This gene *AFF* gene including *AFF1/AF4*, *AFF2/FMR2*, *AFF3/LAF4* and *AFF4/AF5q31* belongs to his family. The *AFF2* gene is expressed mainly in the brain and the protein encoded by synaptic. It plays a role in plasticity. *AFF2* protein, an RNA that functions as a transcription activator binding protein. *AFF2* rearrangements are associated with many malignant neoplasias [4]. On the other hand, therapeutic opportunities in thoracic malignancies have changed significantly with multiple phase III studies of immune checkpoint inhibitors in the treatment of advanced lung cancer. It is now possible to use immunotherapy over cytotoxic chemotherapy in at least a subgroup of patients.

Its superiority has been proven. In addition, the combination of immunotherapy and chemotherapy in first-line. There is also evidence of the treatments used. Programmed cell death-1 (PD-1)/programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) pathway-targeted immunotherapy, lung It has become an effective option in the treatment of cancer. There is also evidence of first-line treatments using a combination of immunotherapy and chemotherapy. Programmed cell death-1 (PD-1)/programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) pathway-targeted immunotherapy has become an effective option in the treatment of lung cancer. Essentially, binding of PD-1 ligand to its receptors, PD-L1 or PD-L2, can prevent the innate cytotoxic T cell response against the tumor by inhibiting kinases involved in T cell activation [5]. Expression of PD-L1 protein in lung cancer is expected to be a prognostic factor or predict response to PD-1 blocking antibodies [6].

In this study, we evaluated fluorescence in situ in advanced squamous cell carcinoma of the lung. To determine the frequency of *DEK* rearrangement by hybridization technique (FISH), reverse transcriptase to identify cases with *DEK:AFF2* fusion by polymerase chain reaction test (rt-PCR), The effect of gene

alteration on prognosis, its relationship with PDL1 positivity and immunotherapy response. We planned to research.

Our study included patients diagnosed with squamous cell carcinoma between 2017 and 2023 at Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology; We recruited 128 randomly selected patients from bronchoscopic biopsy or needle biopsy materials. *DEK* gene in all cases rearrangement, PD-L1 immunohistochemical expression and clinicopathological parameters and we examined the relationship between prognosis. We investigated the *DEK::AFF2* fusion using the rt-PCR method and appropriate primers in 29 cases in which *DEK* gene rearrangement was detected.

Ventana SP 263 clone was detected in all of our cases (n=128) by immunohistochemical method. We applied PD-L1 using Tumor proportion score (TPS) in tumor cells; PD-L1 15.8% cases with membranous staining below 1%, 62.4% cases with 1-50%, 50% with 21.8% of the cases were found to have staining. PD-L1 staining and gender, age, tumor diameter, between groups according to tumor stage, lymph node metastasis, distant metastasis, recurrence and death. No statistically significant difference was observed ($p>0.05$). Disease-free life with PD-L1 scoring. There was no statistically significant difference between duration and total survival ($p>0.05$).

DEK rearrangement was investigated in all 128 cases included in the study using the FISH method. *TEC* rearrangement was detected in 21.8% of the patients. With *DEK* rearrangement, gender, age, tumor diameter, tumor stage, lymph node metastasis, distant metastasis, recurrence and survival status. No statistically significant difference was observed between them ($p>0.05$). *DEK* gene rearrangement positive and in terms of disease-free survival and total survival among negative cases. There was no statistically significant difference ($p>0.05$).

rt-PCR using appropriate primers for 29 cases in which *DEK* rearrangement was detected by FISH method. *DEK::AFF2* fusion was detected in all 29 cases. No statistically significant difference was observed between *AFF2* fusion and gender, age, tumor diameter, tumor stage, lymph node metastasis, distant metastasis, recurrence

and survival ($p>0.05$). There was no statistically significant difference in disease-free survival and total survival between *AFF2* fusion positive and negative cases ($p>0.05$).

PD-L1 expression is less than 1% in cases with *DEK rearrangement/DEK::AFF2* fusion. The rate of being under was significantly higher ($p:0.010$; $p<0.05$).

DEK protein is overexpressed in squamous cell carcinomas in many organs and it plays an active role in tumor initiation and maintenance. Although there are still many open questions regarding the regulation and function of this protein, high DEK protein expression may be useful as a novel prognostic factor and a new therapeutic target [7]. In conclusion, this is the first lung squamous cell carcinoma series in which *DEK rearrangement/DEK::AFF2* fusion has been investigated. In addition, our study is a first in the literature, as the relationship between PD-L1 and *DEK rearrangement/DEK::AFF2* fusion has never been compared in squamous cell carcinoma cases of the lung.

We think that our findings may help in the selection of patients to receive immunotherapy, their prognosis, and to explain the pathogenesis of their squamous cell carcinomas.

GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri morfolojik olarak küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer karsinomu olarak ikiye ayrılır; KHDAK, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturur. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının büyük bir kısmını skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom oluşturmaktadır. Daha seyrek olarak diğer tipler görülmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında prognoz ve tedavideki en önemli parametre hastalığın evresidir. Erken evre tümörlerde cerrahi rezeksiyon önerilirken, ileri evre tümörlerde ise kemoradyoterapi tedavisine ek olarak özellikle son yıllarda immünoterapi ve sürücü onkogenin hedeflendiği tedaviler öne çıkmaktadır. Akciğer kanserinin multimodal tedavisindeki ilerlemeye rağmen, %10-15'lik 5 yıllık sağkalım oranıyla prognozu hala kötüdür. Bu nedenle, nüksü tahmin etmek ve tümörleri tanımlamak için güvenilir biyobelirteçlerin tanımlanması, yalnızca ilgili moleküler ve hücresel süreçlerin anlaşılması için değil, aynı zamanda olası yeni terapötik moleküler hedeflerin araştırılması için de önemlidir [8].

Son yıllarda KHDAK'de iki önemli terapötik gelişme olmuştur. Bunlardan ilki olan immünoterapi, adenokarsinomların ve skuamöz hücreli karsinomların prognozunu büyük ölçüde iyileştirmiştir. İkincisi olan, hedeflenebilir sürücü mutasyonlarının tedavisi ise şu ana kadar yalnızca adenokarsinom olgularında fayda sağlamıştır. Skuamöz hücreli karsinom çoğunlukla sigara içenlerde görülen ve yüksek oranda mutasyon taşıyan bir hastalıktır. Bu durum da, skuamöz hücreli karsinomlarda sürücü mutasyonların belirlenmesini ve klinik açıdan anlamlı olanların bulunmasını zorlaştırmaktadır [9].

Kanser Genomu Atlası gibi büyük ölçekli genomik analizler, birçok tümör türü hakkında veri toplanmasına, sık görülen gen değişikliklerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır; ancak bunların hedefe yönelik tedavideki rolü ve potansiyeli bilinmemektedir [9].

Bizim bu çalışmadaki amacımız sinonazal karsinomların bir kısmında yeni tanımlanan bir gen olan *DEK* geninin akciğer skuamöz hücreli karsinomlarındaki

yaygınlığını, prognoza etkisini belirlemek ve bu gen ile immünoterapi için kullandığımız bir belirteç olan PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi saptamaktır. Şimdiye kadar *DEK* geninin prognostik değerlendirmedeki rolü ve KHDAK'de sağkalımla ilişkisini araştıran bir çalışma yoktur [8]. Bulgularımızın immünoterapi verilecek hastaları seçimine, prognoza ve skuamöz hücreli karsinomların patogenezi açıklamaya yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

GENEL BİLGİLER

AKCİĞER KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ VE ETYOLOJİSİ

Son 15 yıl boyunca dünya, akciğer kanseri hastalarının tedavisinde hızlanan gelişmelere tanık olmuştur ve bu da hastaların hayatta kalmasını önemli ölçüde arttırmıştır. Moleküler anormallikler hakkındaki bilgilerimiz artmış, bu anormallikleri tespit eden teknolojik ilerlemeler olmuştur. Tanımlanan moleküler anormalliklerin üstesinden gelmek için yeni terapötikler geliştirilmeye başlanmıştır. Ancak, tüm bu ilerlemelere rağmen tümörlerin histolojik sınıflandırması akciğer kanseri tanısının ve hasta yönetiminin temel yapı taşını oluşturmaya devam etmektedir [1]. İmmünojenik kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerine yönelik ilerlemelere rağmen, akciğer kanseri hâlâ kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir [10].

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından 2020 yılında kanser insidansı ve mortalite tahminlerini kullanarak küresel kanser yükü hakkında bir güncelleme sunulmuştur. Akciğer kanseri, tahmini 1,8 milyon ölümle (%18) kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri izlemektedir [11].

Ülkemizde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 raporuna göre yılda 34.703 (%16,5) yeni akciğer kanseri tanısı konulmuştur. Erkeklerde akciğer kanseri insidansı Türkiye’de yüz binde yaklaşık 69, dünya ortalaması ise yüz binde yaklaşık 30-35, Avrupa Birliği ortalaması ise 100.000’de 48 civarındadır. Akciğer kanserinin hem dünyada hem de Avrupa’da kadınlarda görülme insidansı ise yüz binde 13-14 iken, ülkemizde bu oran yüz binde 7-8’dir [12].

Türkiye’deki olgular ortalama 64 yaşında tanı alır ve 40 yaşın altındaki bireylerde daha nadir görülür. Ülkemizdeki akciğer kanserlerinin %80’i dünya verilerine benzer şekilde, küçük hücreli dışı kanser histolojisinde bulunmaktadır. Bunların %38’i skuamöz hücreli karsinom, %47’si adenokarsinomdur. Genellikle ileri evrelerde tanı konulmaktadır. Ülkemizde görülen vakaların %15’i lokalize hastalık, %27’si bölgesel, %58’i ise uzak metastazla gelir [13].

Akciğer tümörlerinin etiyolojisinde sigara öyküsü, hava kirliliği, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer enfeksiyonları, mesleki maruziyet, immünolojik ve genetik faktörler gibi pek çok faktör rol oynamaktadır. Sigara kullanımı akciğer kanseri için en büyük risk faktörü olmaya devam etmektedir. Akciğer kanseri uzun süredir erkeklerde kadınlardan daha yaygın görülmektedir, ancak ABD, Danimarka ve İsveç gibi yüksek gelirli birçok ülkede, erkeklerde ve kadınlarda görülme oranları birbirine yaklaşılmaya başlamıştır [1].

Araştırmacılar yıllar içerisinde kadınlar arasında akciğer kanseri sıklığının arttığını saptamışlar ama artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulmuşlardır. Kadınlarda sigara içme oranlarının düşük olduğu bölgelerde, tütün dışı risk faktörleri muhtemelen akciğer kanseri gelişiminde daha önemli bir rol oynamaktadır. Van'da yapılan bir çalışmada ilginç bir şekilde akciğer kanseri tanısı alan olguların %22.3'ünün kadın cinsiyetinde olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar kadın oranının fazla saptanmasını bölgede tandır dumanı maruziyetinin yoğun olmasına bağlamışlardır [12].

Batı dünyasındaki akciğer kanseri vakalarının %80'den fazlasının sigara ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tütünün yanması ile polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve N-nitrozaminler dahil olmak üzere 60'tan fazla bilinen kanserojen madde ortaya çıkar. Bu bileşikler, kullanımdan yıllar sonra karsinogenez riskini artıran deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına ve mutasyonlara neden olur [14].

Pasif içiciliğe bağlı duman maruziyeti de benzer şekilde akciğer kanseri riski ile doza bağımlı bir ilişki göstermiştir. Pasif sigara içicileri dumandaki belirli kanserojenlere, sigara filtreleri nedeniyle, sigara içen kişilere göre daha yüksek konsantrasyonlarda maruz kalır [15]. Sigara içenlerin sigara içmeyen eşlerinde akciğer kanseri riskinin %20-30 oranında arttığı bilinmektedir.

Esrarın yanmasıyla, katran ve poliaromatik hidrokarbonlar gibi kanserojen maddelerin, tütünün yanmasına kıyasla daha yüksek miktarda ortaya çıktığı bilinmektedir. Esrar kullanımının, tütüne benzer şekilde bronş epitelinde premalign histolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir [16].

Mesleki karsinojenlere maruziyet, küresel akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %5-10'unda mevcuttur. Bunun en yaygın nedeni asbesttir [17]. Asbest, genellikle inşaatlarda kullanılan, alev geciktirici özelliği bulunan bir mineraldir. Asbestin akciğerlerde lif biriktirdiği bilinmektedir. Asbest pnömokonyoz, akciğer kanseri ve mezoteliyoma gibi çeşitli akciğer patolojileri ile ilişkilendirilmiştir [18]. Kuzey Amerika'da düzenli olarak asbestle çalışan, ancak sigara içmeyen kişilerde akciğer kanseri oranının 3,5 kat arttığı bulunmuştur. Asbestin sigara içimi ile birlikte akciğer kanseri üzerinde sinerjik bir etkisi mevcuttur. Bir kohort çalışmasında bu sinerjik etkinin akciğer kanseri riskini 14,4 kat arttırdığı bildirilmiştir [19].

Radon, mutajenik özellikleri olan, topraktaki uranyumun bozunmasıyla doğal olarak ortaya çıkan bir gazdır. Yüksek uranyum konsantrasyonuna sahip coğrafi bölgelerde, bodrum katlar ve madenler gibi yer altı ortamlarında radon maruziyeti artar. Metal veya uranyum madenciliği yapan yeraltı işçilerinde, akciğerlerde ve diğer organlarda SCC riskinde belirgin şekilde artış bildirilmektedir [20]. Sigara içmeyenlerde akciğer kanseri vakalarının %30 kadarı radon ile ilişkilidir [21].

Kötü hava kalitesi akciğer kanseri için risk faktörleri arasındadır. Hava kalitesini fosil yakıtların yanmasından kaynaklanan ve havada asılı kalan kanserojen maddeler belirler. Araç dumanına kronik olarak maruz kalan kamyon şoförlerinde akciğer kanseri riskinin %50 arttığı bildirilmiştir [10]. ABD'deki büyük şehirler üzerinde yapılan bir araştırmada, havada en yüksek partikül madde seviyelerine sahip 6 şehir arasında akciğer kanseri riskinin %40 arttığı saptanmıştır [22].

AKCİĞER KANSERİ PATOFİZYOLOJİSİ

Akciğer, gaz değişimini destekleyen farklı işlevlere sahip birçok hücre türünden oluşan karmaşık bir organdır. 2.000 km'lik hava yolu ve 50 m²'den fazla son derece ince alveoler membranlar sayesinde birçok fonksiyona sahiptir. Kan ve çevre arasında oksijen ve karbondioksitin değişimini sağlar. Bu işlevi sağlarken bulaşıcı ajanlara, zehirli gazlara ve küçük partiküllü kirletici maddelere maruz kalabilir. İn hale edilen büyük partiküller, büyük hava yollarındaki siliyer hareketle temizlenirken, enfeksiyöz ajanlar immün ve fagositik hücreler tarafından elimine edilir. Mukus üreten hücreler ve nöroendokrin hücrelerin de gaz değişim fonksiyonunun sürdürülmesinde rolleri

vardır [23, 24]. Bu farklı hücre topluluklarının bulunduğu ortamda, hücre bölünmesi ve ölüm dengesini değiştiren, bağışıklık sisteminin çalışmasını önleyen ve kansere yol açan mikroçevresel adaptasyonların birikimi gerçekleşir. Kansere yol açan bu değişikliklerin birikmesi, yıllarca tütün dumanına maruz kalmaktan kaynaklanabilir ve bu da kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve amfizem olarak kendini gösteren yapısal hasara neden olabildiği gibi dumana maruz kalma, bazal hücre hiperplazisinden metaplaziye, şiddetli displaziden in situ karsinoma ve son olarak da invaziv karsinoma kadar ilerleyen bronş epitelinde iyi karakterize edilmiş bir dizi morfolojik değişikliğe yol açabilir [24].

Akciğer kanseri, temel olarak küçük hücreli akciğer karsinomu ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom, KHDAK'nun ana histolojik tipleridir. Diğer epitelyal malignitelerde olduğu gibi, akciğer kanserlerinin de bronşiyal epiteldeki bir dizi ilerleyici histopatolojik değişiklik yani preneoplastik lezyondan sonra ortaya çıktığına inanılmaktadır [1]. DSÖ akciğer tümörü sınıflandırması üç tip preinvaziv lezyonu tanımlar: skuamöz hücreli karsinom için skuamöz displazi ve karsinoma in situ (CIS); adenokarsinom için atipik adenomatöz hiperplazi ve nöroendokrin tümörler için diffüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi [1, 25].

Akciğer karsinogenezi çok aşamalı bir süreç olduğundan, preneoplastik veya preinvaziv bronşiyal lezyonların bronşiyal karsinoma dönüşmesi, zaman içinde gelişen moleküler ve genetik anormalliklere bağlıdır [26]. Skuamöz hücreli karsinom için morfolojik preneoplastik adımlar arasında hiperplazi, skuamöz metaplazi, düşük dereceli displazi, yüksek dereceli displazi ve karsinoma in situ yer alır [27]. Hiperplazi ve skuamöz metaplazi geri dönüşümlü lezyonlar olarak kabul edilirken displazi ve karsinoma in situ böyle değildir [26].

Belirli proteinler ve genler, akciğer karsinogenesinde anahtar rol oynar ve bunların bu süreçteki anormal ekspresyonları, onları özellikle aktif mutajenez, ilerleyici kanserizasyon süreci ve akciğer kanseri geliştirme riski çok yüksek olan hastaların bir alt popülasyonunu ayırt etmeye duyarlı potansiyel biyobelirteçler haline getirir [9].

Akciğer karsinogenezinde, proto-onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin ve DNA onarım genlerinin kaybı dahil olmak üzere çeşitli moleküler ve genetik anormallikler tanımlanmıştır. Bu genomik ve moleküler anormallikler, akciğer karsinogenezindeki erken olaylardır ve bronşiyal lezyonlarda aylarca veya yıllarca devam edebilir ve bunların kalıcılığı veya gerilemesi, lezyonların evrimi ile ilişkilidir [28]. Moleküler değişiklikler sadece akciğer kanserinde değil, aynı zamanda akciğer kanseri gelişmeden önceki ve sigara içenlerin bronş epitelinde de fark edilmektedir.

Akciğer kanserinde birçok mutasyon tanımlanmıştır. Polimorfik mikrosatellit DNA işaretleyicilerini kullanan heterozigotluk kaybı analizleri, spesifik kromozomal lokuslardaki alelik kayıpları tanımlamak için sıklıkla kullanılır. 3p, 9p ve 17p kromozomal bölgelerindeki alel kayıpları, invaziv akciğer kanserinin çok aşamalı gelişimi sırasında nispeten erken ortaya çıkar [29]. 3p ve 9p21'de heterozigotluk kaybı, normal epitelden başlayarak erken dönemde ortaya çıkar. Kromozom 3q amplifikasyonu, pre-invaziv skuamöz hücreli karsinomun evriminde rol oynayan en yaygın genomik sapmayı temsil eder [9]. Sonraki değişiklikler 8p21-p23, 13q14 (*RBI* yeri), 17p13 (*TP53* yeri) ve 5q21 (*APC*) bölgelerini etkiler. *TP53* mutasyonları değişken zamanlarda oluşur. Skuamöz karsinoma in situ ile ilgili analizler *TP53*, *CDKN2A*, *SOX2* ve *AKT2* genlerinde sık somatik ve kopya sayısı değişikliklerinin yanı sıra hücre döngüsü ve DNA onarımı ile ilişkili kromozomal instabilite ve bütün mutasyon imzasını saptamıştır [1].

Hedefe yönelik tedavinin sınırlı olması nedeniyle skuamöz hücreli karsinomlardaki genomik değişiklikler kapsamlı bir şekilde tanımlanmamıştır [30]. Akciğerin skuamöz hücreli karsinomlarında en sık görülen genetik değişiklikler 3q (*SOX2*, *TP63*), 7p (*EGFR*) ve 8p (*FGFR1*) kromozomlarında kazanımlar/amplifikasyonlar, kromozom 9p'nin (*CDKN2A*) delesyonudur. Yaygın olarak mutasyona uğramış genler arasında *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KEAP1*, *KMT2 (MLL2)*, *HLA-A*, *NFE2L2*, *NOTCH1* ve *RBI* bulunur [1]. Ayrıca sigara kullanmayan bazı SCC hastalarında *EGFR* ve *ALK* gibi genlerde sürücü mutasyonları saptanabilir [31].

Akciğerin skuamöz hücreli karsinom hastalarını kapsayan büyük ölçekli bir WES çalışması, tümör başına ortalama 360 ekzonik mutasyon, 165 genomik yeniden

düzenleme ve 323 segment kopya sayısı değişikliği ile karmaşık genomik değişiklikleri tanımladı. Vakaların neredeyse tamamında *TP53* mutasyonunu da içeren 11 gende tekrarlayan mutasyonlar meydana geldi. %34'ünde *NFE2L2* ve *KEAP1* , %47'sinde *PTEN* ve *PIK3CA* ve %72'sinde *CDKN2A* ve *RBI* mutasyonu görüldü [32]. *TP53*, *RBI*, *PTEN*, *NFE2L2*, *KEAP1*, *MLL2*, *PIK3CA* ve *FGFR3-TACC3* füzyonları, akciğerin skuamöz hücreli karsinomları için potansiyel genomik hedef adayları olarak önerilmiştir [33].

Skuamöz hücreli karsinomlarda sık görülen mutasyon, *TP53* olsa da, diğer yaygın potansiyel olarak hedeflenebilir değişiklikler arasında *FGFR1* amplifikasyonu ve *PI3K* anormallikleri de yer alır [9]. *FGFR1* amplifikasyonu skuamöz hücreli karsinomların yaklaşık %20'sinde tanımlanabilir. Sigara içmeyle bağlantılıdır ancak yaştan ve patolojik özelliklerden bağımsızdır. Aktivasyonu, PI3K/AKT ve RAS/MAPK yollarını aşağı regüle eder. EGFR ve trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), RAS/MAPK yolağında en iyi bilinen reseptörlerdir. Bu nedenle, EGFR olduğu gibi, PDGFR'nin terapötik bir hedef olup olmadığını daha iyi tanımlamak için çeşitli çalışmalar devam etmektedir [34].

Görülme sıklığı göz önüne alındığında, SOX2 transkripsiyon faktörünün amplifikasyonu özellikle ilginçtir. SOX2 bir "soy hayatta kalma onkogenidir". SOX2 aktivasyonu skuamöz hücrelere diferansiyasyonu ve skuamöz hücrelerin çoğalmasını teşvik eder. Transkripsiyon faktörü SOX2 hücre popülasyonlarının kendini yenilemesinde, büyümesinde ve genişlemesinde önemli bir rol oynar. SOX2'nin normal ve tümör hücresi gelişimini düzenlemedeki karmaşık etkilerinin ışığında, SOX2'ye bağımlı yolların aydınlatılması, akciğer kanserinde yeni terapötik hassasiyetleri tanımlayabilir [35].

DNA metilasyonu epigenetik gen düzenleme kompleksinin bir parçasıdır ve kanserin patogenezinde önemli bir rol oynar [30]. DNA metilasyonunu ve mRNA ekspresyonunu birleştiren genom ölçekli bir çalışma, RAS ve WNT sinyal yollarının anahtar genlerinden bir tümör baskılayıcı olarak LGALS4'ü, sigara içenlerde hipermetile edilmiş, aşağı regüle edilmiş ve *KRAS* mutasyonu ile ilişkilendirmiştir [36].

AKCİĞER TÜMÖRLERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Akciğer tümörlerinin sınıflandırılması; epidemiyolojik ve biyolojik çalışmaların temelini oluşturur. Ayrıca hastaların tedavilerin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Toraks Tümörleri Sınıflandırması 2021 yılında revize edilerek yayınlanmıştır. İmmünohistokimyasal belirteçler ve moleküler testlerin kullanılmaya başlanması, akciğer tümörlerinin daha kesin patolojik ve genetik sınıflandırmasını ortaya çıkarmış, bu sayede daha iyi tedavi stratejileri geliştirilmiştir [25]. Akciğer tümörlerinin 2021 yılındaki sınıflaması Tablo 1'de gösterilmiştir [25].

Tablo 1. WHO 2021 Akciğer Kanseri Sınıflandırması [25].

EPİTELYAL TÜMÖRLER	
Papillomlar Skvamöz hücreli papillom, NOS Skvamöz hücreli papillom, inverted Glandüler papilloma Mikst skvamöz ve glandüler papilloma	Skvamöz prekürsör lezyonlar Skvamöz hücreli karsinoma in situ Hafif skvamöz displazi Orta dereceli skvamöz displazi Ağır dereceli skvamöz displazi
Adenomlar Sklerozan pnömositom Alveolar adenoma Papiller adenoma Bronşiole adenom/silyalı mukonodüler papiller tümör Müsinöz kistadenom Müköz bez adenoma	Skvamöz hücreli karsinomlar Skvamöz hücreli karsinom, NOS Skvamöz hücreli karsinom, keratinize Skvamöz hücreli karsinom, non-keratinize Bazaloid skvamöz hücreli karsinom Lenfoepitelyal karsinom
Prekürsör glandüler lezyonlar Atipik adenomatöz hiperplazi Adenokarsinoma in situ Non-müsinöz Müsinöz	Büyük hücreli karsinom Adenoskvamöz karsinom
Adenokarsinomlar Minimal invaziv adenokarsinom Non-müsinöz Müsinöz İnvaziv non müsinöz adenokarsinom	Sarkomatoid karsinomlar Pleomorfik karsinom İğsi hücreli karsinom Dev hücreli karsinom Karsinosarkom Pulmoner blastom Diğer epitelyal tümörler

<p>Lepidik adenokarsinom Asiner adenokarsinom Papiller adenokarsinom Mikropapiller adenokarsinom</p> <p>Solid adenokarsinom İnvaziv müsinöz adenokarsinom Mikst invaziv müsinöz ve non müsinöz adenokarsinom</p> <p>Kolloid adenokarsinom Fetal adenokarsinom Adenokarsinom, enterik tip Adenokarsinom, NOS</p>	<p>NUT karsinom Torasik SMARCA4- kaybı gösteren indiferansiye tümör</p> <p>Tükrük bezi tipi tümörler Mukoepidermoid karsinom Adenoid kistik karsinom Epitelyal-miyoepitelyal karsinom Hyalinize berrak hücreli karsinom Pleomorfik adenoma Miyoepitelyoma Miyoepitelyal karsinom</p>
AKCİĞER NÖROENDOKRİN NEOPLAZİLERİ	MEZENKİMAL TÜMÖRLER
<p>Prekürsör lezyon Diffüz idiopatik nöroendokrin hücre hiperplazisi</p> <p>Nöroendokrin tümörler Karsinoid tümör, NOS/ nöroendokrin tümör, NOS Tipik karsinoid/ nöroendokrin tümör, grade 1 Atipik karsinoid/ nöroendokrin tümör, grade 2</p> <p>Nöroendokrin karsinomlar Küçük hücreli karsinom Kombine küçük hücreli karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p>	<p>Pulmoner hamartom Kondrom</p> <p>Diffüz lenfanjiomatozis Plöropulmoner blastom İntimal sarkom</p> <p>Konjenital peribronşial miyofibroblastik tümör EWSR1-CREB1 füzyonlu pulmoner miksoid sarkom PEComatöz tümörler Lenfanjioleiomyomatozis Benign PEComa Malign PEComa</p>

EKTOPIK ORJİNLİ TÜMÖRLER	HEMATOLENFOİD TÜMÖRLER
Melanom Meningiom	MALT lenfoma Diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS Lenfomatoid granüloatozis, NOS Grade 1 Grade 2 Grade 3 İntravasküler büyük B hücreli lenfoma Langerhans hücreli histiyositozis Erdheim Chester hastalığı

Skumöz prekanseröz lezyonlar: Skumöz Displazi ve Skumöz

Karsinoma İn Situ:

Akciğerin kronik inflamasyonu sırasında meydana gelen bronş epitelindeki morfolojik değişikliklerden kaynaklanan skumöz hücreli karsinom öncülleridir. Tüm trakeobronşial ağacı etkileyebilir, tek veya çok sayıda olabilir [37]. Preinvaziv skumöz lezyonlar, sigaraya maruz kalma sonucu oluşan genetik ve epigenetik değişikliklerden kaynaklanır [38]. 1-2 mm'lik polipoid bir lezyon, mukozada düzensizlik ve fokal kalınlaşma şeklinde görülebilir [39].

İrritan maddelere ve karsinojenlere maruziyet sonucunda epitelde goblet hücrelerinin kaybıyla birlikte bazal hücre hiperplazisi ve/veya skumöz metaplazi gelişir. Devam eden maruziyet sonucunda bu lezyonlar hafif, orta, yüksek dereceli displazi ve nihayetinde skumöz hücreli karsinoma in situya ilerleyebilir. Displaziler histolojik olarak anjiogenik veya papiller tipte olabilir ancak bu histolojik paternlerin prognostik bir önemi yoktur [40, 41]. İHK'sal olarak preinvaziv skumöz lezyonlar invaziv SCC'ye benzer profil gösterir; CK5/6, p40 ve p63 ile pozitifdir. Preinvaziv skumöz lezyonlarda p16 gibi tümör baskılayıcı gen belirteçlerinin ekspresyonu artar. Ki67 proliferasyon indeksinde ve p53 ekspresyonunda artış izlenir [28]. Şiddetli displazilerin yaklaşık %37'si, skumöz karsinoma in situ'ların ise %88'i invaziv lezyonlara ilerler [42].

Skumöz Hücreli Karsinom

Morfolojik olarak keratinizasyon, hücreler arası köprüleşme içeren ve İHK'sal olarak da gösterilebilen skumöz diferansiasyonun görüldüğü malign epitelyal bir tümördür. Genellikle santral yerleşimli olsa da yaklaşık üçte biri periferik yerleşimlidir. Periferik yerleşim insidansı gün geçtikçe artmaktadır [43]. Sigara ile ilişkisi diğer tiplere göre daha yüksektir [44]. SCC'lerin klinik semptomları arasında öksürük, göğüs ağrısı, nefes darlığı, balgamda kan, hırıltı, ses kısıklığı, bronşit ve pnömoni gibi tekrarlayan göğüs enfeksiyonları, kilo kaybı, iştah kaybı ve yorgunluk yer alır. Bununla birlikte, sıklıkla hastalığın erken evrelerinde asemptomatiktir. İlerlemiş hastalıkta metastazlar ortaya çıktığında kemik ağrısı, beyin metastazı veya nörolojik semptomlar baş ağrısı, kol ve bacaklarda güçsüzlük veya uyuşma, baş dönmesi ve nöbet gibi ortaya çıkar. Akciğer SCC'si beyin, omurga, kemikler, adrenal bezler ve karaciğer dahil olmak üzere birçok bölgeye yayılabilir. SCC için biyolojik olarak ilgili moleküler hedeflerin daha az olması ve tümörlerin geç tespit edilmesi nedeniyle bu hastalar için prognoz genellikle kötüdür [45].

Klinik muayene ardından, tümör görüntüleme de tespit edilebilecek kadar büyük ise SCC'yi değerlendirmek için başlangıçta bilgisayarlı tomografi kullanılır. Tümör kitlesi içinde gaz veya sıvıyla dolu bir boşluğun varlığı, SCC'nin klasik bir radyolojik bulgusudur [45].

Makroskopik olarak sert, beyaz-gri renkli kesi yüzüne sahiptir. Daha büyük tümörü olanlarda nekroza bağlı merkezi kavitasyon oluşturabilir. DSÖ 2021 sınıflamasına göre histopatolojik olarak skumöz hücreli karsinom (keratinize, nonkeratinize ve bazaloid alt tip) ve lenfoepiteliyal karsinom olmak üzere iki tiptir. Ayrıca papiller, clear, küçük hücreli ve psödoasküler varyantları mevcuttur [25].

Keratinize Skumöz Hücreli Karsinom: Keratinizasyon yanısıra interselüler köprüler görülür. Keratinizasyonun derecesi tümörün diferansiasyonu ile ilişkilidir. Daha az diferansiye tümörlerde keratinizasyon fokal alanlarda görülebilir.

Nonkeratinize Skumöz Hücreli Karsinom: Keratinizasyon görülmediği için skumöz diferansiasyonun İHK'sal olarak p40, p63, CK5/6 gibi belirteçler ile gösterilmelidir.

Bazaloid Skuamöz Hücreli Karsinom: Bazaloid tipte skuamöz morfoloji olmaksızın periferik palisadlanma gösteren bazaloid hücreler mevcuttur. Ancak bu tümör İHK'sal olarak skuamöz belirteçler ile pozitifdir. Ki67 proliferasyon indeksi yüksektir. Bazaloid komponent %50'den fazla ise bazaloid SCC olarak isimlendirilir.

İHK'sal olarak p40 SCC'ler için en spesifik belirteç olarak kabul edilirken, yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinler, desmoglein ve p63 skuamöz diferansiyasyon için daha az spesifik belirteçlerdir [46, 47]. P40'ın yaygın kullanımından önce p63 skuamöz diferansiyasyonu göstermek için daha yaygın kullanılmaktaydı. Ancak akciğer adenokarsinomlarının bazılarında, bazı sarkomlarda, myoepitelyal tümörlerde ve lenfomalarda p63 reaktivitesi görülebildiği için daha spesifik bir belirteç olan p40 tercih edilmeye başlanmıştır [47]. Skuamöz hücreli karsinomlarda p40 için tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasının boyanması pozitif boyanma olarak kabul edilir [47].

Lenfoepitelyal Karsinom: Lenfoepitelyal karsinom genellikle EBV ile ilişkili, değişken oranda lenfoplazmositik infiltrasyon ile birliktelik gösteren, az diferansiye bir SCC'dir. Sıklıkla periferik yerleşimli bu tümör nadiren intrabronşiyal bir bileşen barındırır [48]. Çoğu tesadüfen fark edilse de en sık hemoptizi ve öksürük ile karşımıza çıkar [48]. Nadir görülür. Daha çok kadın, genç, Asyalı, sigara içmeyen bireylerde saptanır. Ortalama görülme yaşı 51'dir [49]. Makroskopik olarak pembe renkli, oval, yuvarlak, soliter, çapı 10-110 mm arasında değişen bir tümördür [49]. Histopatolojisinde sinsityal bir büyüme paterni gösteren tümör adaları arasına yerleşmiş belirgin lenfoplazmositik infiltrasyon dikkat çeker. Fokal keratinizasyon ve amiloid birikimi olabilir [49]. İHK'sal olarak tümör hücreleri CK5/6, p40 ve p63 ile yaygın boyanma gösterir. Lenfositik infiltratta CD3 ve CD20 ile mikst paternde boyanma saptanır. Nadir görülen tümörler olduğu için her zaman metastaz olasılığı akılda bulundurulmalıdır [48]. Bu tümörde EBER probu kullanılarak yapılan in situ hibridizasyon yöntemi ile latent EBV enfeksiyonu gösterilir. Prognozu diğer KHDAK'a göre daha iyidir. Erken evre hastalarda tam rezeksiyon ile kür sağlanırken, lokal ileri evre hastalar neoadjuvan/adjuvan kemoradyoterapi ve immünoterapi ile tedavi edilir [50].

Kanser tedavisinde geleneksel olarak kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi ve radyoterapidir. Cerrahi tedavi genellikle hastalığın erken evresinde, kür sağlamak amaçla yapılan tedavi şeklidir. Ancak ileri evre kanserli hastalarda da semptomatik iyileşme sağlamak için gereken durumlarda başvurulabilir. Radyoterapi esas olarak lokal ileri evredeki kanserlerde başvurulan lokal bir tedavi şeklidir.

EVRELEME

Akciğer tümörlerinin evrelemesi klinik ve patolojik olmak üzere iki şekilde yapılır. Klinik evrelemede görüntüleme yöntemlerinden yararlanır. Akciğer tümörü evrelemesinde tümör çapı, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz (TNM) modeli prognozu öngörmede değeri en yüksek olan evreleme sistemidir.

Yeni 8. baskı evreleme sistemi ile ilgili başlıca düzenlemeler T ve M evrelemesini içerirken, N evrelemesini büyük ölçüde değiştirmemiştir. Sağkalımdaki önemli farklılıklara dayanarak, T evresi çapı, 10-50 mm arasındaki T1 ve T2 tümörler her 10 mm'de bir alt bölümlere ayrılır (T1a–c; T2a–b) ve çapı > 50 mm ancak ≤ 70 mm olan tümörler artık T3 olarak evrelendirilir. > 70 mm olanlar T4 olarak sınıflanır.

T2 tümörler artık ana bronşu tutan, visseral plevraya invaze olan veya akciğerin bir kısmını veya tamamını kapsayan hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile ilişkili tümörler için kullanılmaktadır. Diyaframın tutulumu varsa tümör T4'tür. Mediastinal plevranın invazyonu artık T evresinde yer almamaktadır [25].

Büyük bir değişiklik ise, lepidik bileşenli müsinoz olmayan adenokarsinomlu subsolid nodüllerin patolojik T boyutu için yalnızca invaziv tümör bileşeninin kullanılması önerisini içermektedir. Bu bağlamda, Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği'nin (IASLC) Patoloji Komitesi tarafından invaziv tümör bileşenini tanımlamak için daha net histolojik kriterler tespit etmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Çünkü daha önceki çalışmalar teşhiste tutarlı bir tekrarlanabilirlik sağlamamıştır [51].

M evresi için, M1a kategorisine ilişkin kriterler yedinci baskıdan itibaren değişmeden kalırken, tek bir uzak organdaki tek metastatik lezyonlar yeni evreleme sisteminde M1b olarak belirlenmiş ve tek bir organdaki çoklu lezyonlar veya birden

fazla organdaki çoklu lezyonlar M1c olarak yeniden sınıflandırılmıştır [1]. TNM evreleme sistemi Tablo 2’de özetlenmiştir [52].

AKCİĞER KANSERİNDE MOLEKÜLER PATOGENEZ

Kanser patogeneğinde rol oynayan hücresel yolların keşfedilmesiyle birlikte bu yollarda görev alan proteinleri kodlayan genler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaya başlanmıştır. Günümüzde akciğer kanseri de dahil pek çok kanser türünde moleküler genetik çalışmalar hem tanıda hem de hedefe yönelik tedavi olarak da bilinen hastaya uygun tedavinin belirlenmesinde oldukça önem kazanmıştır. Akciğer kanseri onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör inaktivasyonu dahil çok sayıda genetik ve/veya epigenetik değişimlerin birikimiyle karakterizedir [53].

Hedefe yönelik tedavinin hangi hastada etkili olacağına dair en önemli biyobelirteçler mutasyonlardır. Günümüzde çok sayıda mutasyon belirlenmesine rağmen halen akciğer kanseri vakalarının %50’sinde hangi mutasyonun rol oynadığı bilinmemektedir. Akciğer kanseri vakalarının sadece %20’sinde terapötik hedefler belirlenmiştir. Bu terapötik hedeflerden bazıları; *ALK*, *EGFR*, *ROS1*, *Her2*, *MET*, *RET*, *AKT1*, *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MAP2K1* [53].

Sigara içenlerden kaynaklanan akciğer tümörleri, megabaz başına yaklaşık on mutasyonla en yüksek sayıda somatik değişikliğe sahiptir. Hiç sigara içmeyenlerden kaynaklanan tümörler, sigara içenlerden kaynaklananların yaklaşık onda biri kadar somatik mutasyona sahiptir [24].

Moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, daha etkin erken tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

EGFR ekspresyonu, preneoplastik lezyonlarda erken bir olaydır; ekspresyonu normal mukozadan hiperplaziye, metaplaziye ve displaziye doğru artmaktadır. EGFR proteini, skuamöz hücreli karsinomların %84’ünde, adenokarsinomların %65’inde ve büyük hücreli akciğer karsinomlarının %68’inde aşırı eksprese edilir [28]. EGFR proteini, KHDAK’lerin %62’sinde aşırı eksprese edilir ve ekspresyonu, kötü prognozla

ilişkilendirilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer adenokarsinomu hastalarının yaklaşık %10'unda ve Doğu Asya'da %30 ila %50'sinde *EGFR* mutasyonlarıyla ilişkili akciğer tümörleri vardır. Skuamöz hücreli karsinomlarda ise *EGFR* mutasyonlarının görülme sıklığının son derece nadir olduğunu kanıtlanmıştır [54]. *EGFR* geni 7. kromozomun kısa kolunda 12. pozisyonda bulunur [55]. EGFR büyüme sinyallerini hücreye ileten, ErbB tirozin kinaz reseptör ailesindeki dört yüzey reseptöründen biridir. Bu reseptörlere hücre dışı bir sinyal (ligand) bağlandığında aktive olur. EGFR sinyali solid tümörlerde 2 majör yolağı aktive eder; RAS/RAF/MEK/MAPK yolağı ve PI3K/AKT/mTOR yolağı. Bu yolakların hepsi de hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, invazyon, metastaz, apoptoz ve tümör anjiogenezinde rol oynar [56]. *EGFR* TK domainindeki mutasyonlar *EGFR* geninin ilk 4 ekzonuna sınırlıdır (ekzon 18-21), 3 sınıfa ayrılır: insersiyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonları. En yaygın *EGFR* mutasyonları ekzon 19 delesyonu (E746-A750), ekzon 21 (L858R) ve ekzon 18 (G719C, G719S, G719A) süstitüsyonlarıdır. *EGFR* mutasyonları, hiç sigara içmeyen kadınlarda ve lepidik özelliklere sahip adenokarsinomlarda daha sık saptanır. Erlotinib, gefitinib, afatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri ile tedaviye yanıt oranları başarılıdır ve bu hastalarda progresyonsuz sağkalım uzamaktadır. Ancak bu hastalarda tedavi esnasında ek farklı mutasyonların oluşması, tedaviye direncin ortaya çıkmasına neden olabilir. Maalesef genellikle tedavinin başlamasından sonraki 1-2 yıl içinde kaçınılmaz olarak tedaviye direnç ortaya çıkar. Bu direnç mutasyonlarından en sık rastlanılan EGFR kinaz bölgesinde görülen T790M mutasyonudur.

Diğer edinilmiş direnç mekanizmaları arasında yan yolakların aktivasyonları yani *KRAS* mutasyonları, *c-MET* amplifikasyonları ya da *HER2* amplifikasyonları vardır. EGFR mutant vakalarda kazanılan diğer bir direnç mekanizması ise, kanser hücrelerinin genel morfolojisindeki değişikliktir. Küçük hücreli akciğer kanserine veya epitelyal-mezenkimal transformasyon (EMT) ile birlikte başka bir KHDAK'ye fenotipik değişiklik ortaya çıkabilir [57].

***ALK* Yeniden Düzenlenmesi**

Anaplastik lenfoma kinaz (ALK), ilk defa anaplastik büyük hücreli lenfomada saptanan t(2,5) (p23,q35) translokasyonun sonucunda ortaya çıkan, insülin reseptör

ailesinin üyesi bir tirozin kinaz reseptörüdür [58]. Tüm akciğer tümörlerinin yaklaşık % 3–7' sinde *ALK* mutasyonları bulunmaktadır. Bu mutasyonlar genç yaş hastalarda daha sık görülmektedir. *ALK* gen füzyonunun tahmini prevalansı akciğer SCC'sinde yaklaşık %1'dir [59]. KHDAK'lerin %6.7'sinde ise *ALK* yeniden düzenlemelerinde, en yaygın partner ekinoderm mikrotübül-ilişkili protein benzeri-4 (*EML4*) genidir [60]. Bu füzyon ile tirozin kinaz bölgesinde ligand bağımsız bir aktivasyona neden olarak aşağı akış sinyalinin kontrolsüz aktiflenmesi ile karsinogenez uyarılır [61]. *EML4-ALK* füzyonu daha çok genç, sigara içmeyen ve ileri evre hastalığı olanlarda görülür. Akciğer adenokarsinomlarının solid, taşlı yüzük, müsinöz ve kribriform histolojisinde daha sık rastlanır. *ALK* rearranjmanlarının rutinde FISH yöntemi ile füzyon partnerine bakılmaksızın tamamına yakını tespit edilebilmektedir. *ALK* rearranjmanı bulunan hastalarda hedefe yönelik krizotinib inhibitör tedavisinin kullanımını FDA tarafından onaylanmıştır [62].

***ROS1* Yeniden Düzenlenmesi**

ROS1 geni 6. kromozomun q21 lokusunda bulunan, tirozin kinazın yapısal olarak sürekli aktif hale gelmesine neden olan başka bir sürücü onkogendir. *ROS1* rearranjmanı KHDAK'da %1-2 oranında bulunur. Ancak akciğer skuamöz hücreli karsinomlarında son derece nadirdir. Genellikle sigara içmeyen genç kadın popülasyonunda saptanır. Krizotinib ve seritinib gibi hedefe yönelik ajanların *ROS1* füzyonu olan hastalarda etkinliği gösterilmiştir [63]. Klinik ve histolojik özellikleri bakımından *ALK* rearranjmanı bulunan hastalar ile benzerlik göstermekle birlikte *ROS1* rearranjmanı sigara öyküsü olmayan, genç hastalarda daha sık görülür [64, 65]. Hepatoid morfolojiye sahip tümörlerde de saptanmıştır [66]. FISH yöntemi ile *ROS1* rearranjmanı saptanan hastalarda *ALK* inhibitörleri kullanılarak hedefe yönelik tedaviden yanıt alındığı saptanmıştır [67]. *ALK* yeniden düzenlenmiş KHDAK'lu hastalar ile *ROS1* yeniden düzenlenmiş KHDAK'lu hastalar benzer klinikopatolojik özelliklere sahiptir. Ek olarak, ikisi de krizotinibe oldukça duyarlıdır [67].

***KRAS* Mutasyonları**

Kristen rat sarkoma viral onkogen homologu olan *KRAS*, akciğer adenokarsinomlarında batı toplumlarında %20-25 oranında görülürken Asya'da bu oran %10-15'dir. Genel olarak düşündüğümüzde *KRAS*, KHDAK'de en sık görülen moleküler anomalilerden biridir. KHDAK alt tiplerinden olan adenokarsinomada *KRAS* mutasyonlarına çok sık rastlanırken skuamöz hücreli karsinomlarda %1-7 oranında bulunur [68]. Sigara kullanımı ile doğru orantılı olarak *KRAS* mutasyonlarının da sıklığının arttığı görülür. *KRAS* 12. kromozomun kısa kolu olan 12p12.1'de bulunur. 6 ekzondan oluşur ve kodladığı protein 189 aminoasit uzunluğunda 21kDA ağırlığındadır. *KRAS* hücrede işlev görmediği koşullarda *KRAS*-GDP halinde inaktif durumda bulunur. Hücre zarında bulunan reseptör tirozin kinaza EGFR gibi büyüme faktörleri bağlanması ile aktive olur. Aktif haldeki reseptör tirozin kinaza adaptör proteinler olan Grb2 ve SOS bağlanır; bağlı olan aktif SOS proteini *KRAS*-GDP'yi *KRAS*-GTP'ye çevirir ve aktif hale getirir. Aktif hale gelen *KRAS* hücredeki efektör proteinler olan MEK'i fosforlayarak aktifleştirir. Aktif hale gelen MEK, ERK'i aktive eder ve MAPK yolağı aktive olur. Ayrıca *KRAS*, RAS proteinleri aracılığı ile PI3K/AKT yolağını da aktive eder. Böylece *KRAS* hücre döngüsü ve proliferasyonu ile hücrenin sağkalımını düzenlerken aktifleştirdiği yollar ile hücre göçü, hücre iskelet proteinlerinin sentezi hücrel kalsiyum metabolizması gibi oldukça önemli hücrel süreçlerde görev alır [55, 69].

RAS genleri içerisinde *KRAS* en sık mutasyona uğrayan genidir. Bu geni *NRAS* (%17) ve *HRAS* (%7) takip etmektedir. *HRAS* çoğunlukla baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda (%5-9), tükürük bezlerinde (%15) ve mesane kanserinde (%5-30) mutasyona uğrar. *HRAS* mutasyonları akciğer adenokarsinomu ve skuamöz hücreli akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %0,2-0,8'inde görülmektedir [70]. KHDAK'de *KRAS* geninin 2. ekzonunda bulunan G12C mutasyonu en sık gözlenen mutasyondur. Diğer yaygın mutasyonlar *KRAS*-G12V ve *KRAS*-G12D mutasyonlarıdır. *KRAS* mutasyonları sigara içen ve içmeyen bireyler arasında farklılık göstermektedir. Transisyon mutasyonları hiç sigara içmeyenlerde görülürken, transversiyon mutasyonları daha önce sigara içmiş veya halen sigara kullanımı olan bireylerde daha yaygındır. Akciğer kanserlerinde özellikle ileri evrelerde, sağkalımı düşük ve prognozu kötü hastalarda *KRAS* mutasyonu tespit edilmektedir. *KRAS* mutant

KHDAK'lerinde standart kemoterapinin etkinliğinin düşük olması ve akciğer kanserinde sık mutasyona uğraması, onu terapötik bir hedef haline getirmiştir [69]. Ancak akciğerin SCC'lerinde, *KRAS* mutasyonları nadirdir ve bunların klinik sonuç üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır [68]

***HER2* Mutasyonları**

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2 (ERBB2) (*HER2/neu*), tıpkı EGFR gibi ErbB ailesine üye bir tirozin kinazdır. Bir TK reseptörünü kodlar ve hücre proliferasyonunu regüle eder. *HER2* reseptörü güçlü kinaz aktivitesi göstermesine karşın bir ligandı yoktur. *HER2*, PI3K/mTOR ve RAS/RAF/MEK yolaklarını aktive eder. Yirmi yıldan uzun bir süredir protoonkogen olarak tanımlanan *HER2*'nun, ilk olarak meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda amplifiye olduğu bildirilmiştir [71].

HER2 mutasyonları, çoğunlukla kadınlarda, hiç sigara içmeyenlerde ve adenokarsinom histolojisinde olmak üzere KHDAK'nin yaklaşık %2'sinde bulunur [64].

HER2 reseptörü, aktive edici mutasyonu olan hastalarda kanser tedavisinde dikkat çekici bir hedef durumundadır. Anti-*HER2* antikoru (trastuzumab) ve *HER2* inhibitörleri (afatinib, neratinib, lapatinib, dacomitinib) ile ilgili klinik çalışmalar halen devam etmektedir. Akciğer adenokarsinomunda *HER2* mutasyonunu hedef alan afatinib tedavisi halen uygulanmakta olmasına karşın, akciğer SCC'lerinde görülen *HER2* mutasyonuna karşı tedavi halen tanımlanmamıştır [72].

***MET* Amplifikasyon ve Nokta Mutasyonları**

Akciğer tümörlerinin spesifik alt gruplarında *MET* reseptör tirozin kinazın anormal aşırı ekspresyonu, amplifikasyonu ve aktive edici mutasyonları gözlemlenmiştir. *MET* gen amplifikasyonu akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %4'ünde ve skuamöz hücreli akciğer kanserlerinin %1'inde meydana gelir [64]. *MET*; RAS/RAF/MEK, STAT ve PI3K/AKT/mTOR yolakları üzerinden hücre sağkalımı, motilitesi ve proliferasyonunda rol oynar. Ekson 14'teki somatik değişiklikler anjiogenezi ve metastazi indükler. Bu mutasyon, tipik olarak diğer faktörlerin

yokluğunda, akciğer adenokarsinomlarının %3-4'ünde görülür. Özellikle sarkomatoid akciğer kanserlerinde bu oranın arttığı bildirilmiştir. FDA, METex14 değişiklikleri gösteren metastatik akciğer karsinomu olan hastalar için kapmatinib ve temotinib gibi ajanlara onay vermiştir [61].

***BRAF* Mutasyonları**

BRAF mutasyonları akciğer kanserlerinin %3-5'inde, özellikle de adenokarsinomlarda ve sigara içenlerde tespit edilir [64]. *BRAF*, hücre proliferasyonunu kontrol eden RAS GTPazlarıyla ve MAPK ailesiyle ilişkisi olan bir serin/treonin kinazdır. Esas olarak melanomlarda tanımlanan *BRAF* mutasyonlarının yaklaşık %80'ini ekzon 15'deki T1799A (V600E) oluşturur. Bu mutasyon enzimin inaktif formunu destabilize ederek sürekli kinaz aktivitesine yol açar. Somatik *BRAF* mutasyonları KHDAK'lerin %1-3'ünde bulunmaktadır. Melanomlardan farklı olarak KHDAK hastalarında non-Val600Glu mutasyonları içinde kinaz domainindeki Leu596Val mutasyonu ve aktivasyon domaininin G lupundaki Gly468Ala mutasyonu, vakaların %88'inde saptanan en sık görülen *BRAF* mutasyonlarıdır [73]. Mutant *BRAF*'ın akciğer adenokarsinom gelişimi için yeterli olduğu ve bu tümörlerin büyümesinin mutant *BRAF* ekspresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir [74]. Biyolojik olarak *BRAF* mutasyonları artmış kinaz aktivitesiyle ilişkilidir. MAPK2 ve MAPK3'ün sürekli aktivasyonuna yol açar.

Çeşitli *BRAF* inhibitörleri halen geliştirilme aşamasındadır. Bir *BRAF* inhibitörü olarak tasarlanan sorafenib TK reseptörünü de inhibe eden bir multikinaz inhibitörüdür. KHDAK'de monoterapi ve kombinasyon tedavisiyle kullanımında faz çalışmaları devam etmektedir.

***RET* Mutasyonları**

RET 10q11.2 kromozomunda yerleşimli nöral krest gelişimini düzenleyen tirozin kinaz aktivitesi olan bir protoonkogendir. *RET* rearranjmanları KHDAK'nin %1-3'ünde saptanmıştır. Özellikle adenokarsinom morfolojisinde, genç ve kadın hastalarda sık görülür [75]. *RET* ile ilgili değişikliklerin papiller tiroid karsinomu ve medüller tiroid karsinomunda rol oynadığı uzun süredir bilinmektedir. KHDAK

hastalarında *RET* genlerinin *CCDC6*, *KIF5B*, *NCOA4* ve *TRIM33* gibi çeşitli füzyon partnerleri bulunmaktadır. Akciğer kanserlerinin %1-2'lik çok az bir kısmında *RET* füzyonu tespit edilmiştir [76, 77].

Wang R ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 936 KHDAK hastasının %1,4'ünde *RET* füzyon geni saptandığı bildirilmiştir [78]. *RET* kinaza karşı aktivite gösteren çeşitli TKI'leri bulunmaktadır ve *KIF5B-RET* füzyonu taşıyan hücre serilerinde etkinlikleri gösterilmiştir. Vandetanib, *RET*'i de hedef alan bir multikinaz inhibitörüdür ve medullar tiroid kanserinde kullanımı için FDA onay vermiştir. İn vitro ortamda sorafenib, sunitinib ve cabozantinibin *RET* yeniden düzenlenmelerine karşı aktivitesi gösterilmiştir. *RET* füzyonlu KHDAK hastalarında cabozantinib ile faz II çalışmaları devam etmektedir [79]. Selpercatinib ve pralsetinib FDA tarafından onaylanmış güçlü seçici *RET* inhibitörleridir [80, 81].

***PIK3CA* Mutasyonları**

PI3K/AKT/mTOR hücre proliferasyonu, diferansiyasyon, adezyon ve motilitede görev alan sinyal iletim yolağıdır. Fosfatidil inozitol 3 kinaz'ın PIP, PI4P, PI4,5P'yi fosforillemek için ATP kullanan 110 kDa'luk katalitik altbirimini kodlar. *PIK3CA* somatik mutasyonları saptanan hastalıklar; meme kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, hepatoselüler karsinom, seboreik keratoz, epidermal nevüs, over kanseri, glioblastom, baş/boyun tümörleri ve lenfomadır. KHDAK'de *PIK3CA*'nın nokta mutasyonları ve amplifikasyonlarının etkili olduğu bilinmektedir. PI3K/AKT/mTOR yolağında meydana gelen değişiklikler hem KHDAK hem de KHAK'e de bildirilmiştir. EGFR, HER2, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü üzerinden aktiflenebilir. Deregülasyonu KHDAK'lerin %50-70 kadarında görülebilir [82]. *EGFR*, *KRAS*, *PI3K* veya *AKT*'de oluşan mutasyonlar ile veya tümör baskılayıcı gen olan *PTEN*'in inaktivasyonu gibi birden fazla mekanizma ile bu yolak aktiflenebilir. *PIK3CA* mutasyonu KHDAK'nin %1-3 kadarında görülebilir [83]. *PIK3CA* mutasyonu, özellikle erkeklerde, sigara içenlerde ve skuamöz hücreli karsinomlar da görülmüştür [73]. Literatürde KHDAK ve KHAK tedavisinde rapamisin gibi hedefe yönelik tedavilere cevap alındığı bazı çalışmalar mevcuttur [84].

AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE İNTRATÜMÖRAL HETEROJENİTE

Akciğer tümörleri hem histolojik hem de genetik olarak heterojendir. Primer tümör ve metastazları arasında farklı genetik anormalliklere rastlanabilir [24]. Tümörlerdeki moleküler ve genetik heterojenite sadece akciğer tümörlerinde değil diğer organlarda da tanımlanmıştır. Akciğer kanserinin yanı sıra meme, mide, mesane, prostat, pankreas kanserlerinde de moleküler/genetik heterojenite tanımlanmıştır. Aynı tümörün farklı bölgelerinde aynı somatik mutasyonların 1/3'ü mevcuttur. Tümör heterojenliği, tümör içi ve tümörler arası heterojenite ile ilişkili tanımlanan genetik heterojenite, mikroçevre, bağışıklık sistemi gibi iç ve dış baskılar tarafından gelişen genetik olmayan heterojenlik ile açıklanmaktadır. Moleküler heterojenite, kök hücre teorileri, genomik veya kromozomal instabilite, epigenetik modifikasyonlar ve mikro çevre uyarılarına yanıt olarak adaptasyon mekanizmaları gibi çeşitli teorilerle açıklanabilir. *EGFR* mutasyonlu hastalarda tirozin kinaz inhibitörü tedavisine dirençle ilişkilidir. Tümör heterojenliğinin sadece tümör sınıflandırmasında değil aynı zamanda prognozun belirlenmesinde ve tedavi kararı üzerinde de önemli bir etkisi vardır [85].

AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE STROMAL DEĞİŞİKLİKLER

Kanserin başlaması ve progresyonu, yalnızca kanser hücrelerinin kendi davranışları ile ilişkili değildir. Aynı zamanda bu hücrelerin mikroçevresi ile aralarındaki karşılıklı iletişimde rol oynayan moleküllerle de kontrol edilir. Bu moleküller tümörü başlatmanın yanı sıra gelişimine de katkı sağlar [86].

Hiçbir tümör konakçı olmadan büyüyemez. Tümörlerin büyümesi ve metastaz yapabilmesi için elverişli bir ortama ihtiyaçları vardır. Tümör hücreleri yeterli kan akımını sağlamak için vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılar. Büyümeye yardımcı olan diğer faktörler arasında fibroblast büyüme faktörleri ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü yer alır. Bu faktörlerden bazıları şu anda tümörün progresyonunu engellemeyi hedefleyen bir terapötik olarak kullanılmaktadır. Örneğin anti-VEGF monoklonal antikoru bevacizumab ve tirozin kinaz inhibitörleri sunitinib ve sorafenib ile bu yolların engellenmesi hedeflenmektedir [24].

TÜMÖR VE İMMÜN SİSTEM

İmmün sistem organizmanın varlığının devamının sağlanmasında konağı dış ve iç tehditlere karşı korumakla görevli birçok hücre, sitokin ve proteinlerden oluşan kompleks ve organize bir sistemdir. Tümörlerin gelişmesine karşı vücudu koruyan en önemli savunma mekanizmasıdır. Tümör hücreleri sağ kalabilmek için, immün sisteme yakalanmamalıdır. Tümörler immün sistemle baş edebilmek için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bazı tümörler, immün sistemin tanıyıp yok edebileceği antijenleri eksprese etmeyi durdurarak veya dendritik hücrelerin tümör antijenlerini, tümör hücrelerini öldüren sitotoksik T hücrelerine sunmasını engelleyerek kendini immün sistemden koruyabilmektedir. Bazı tümörler ise immün sistemi baskılayacak TNF- α , PD-L1 gibi moleküller üreterek canlılıklarını devam ettirebilmektedirler [87].

İmmün sistemin gözcüsü olarak görev yapan makrofaj ve dendritik hücreler karşılaştıkları yabancı antijen veya hücreyi yakalayıp olgunlaşma fazına girerler. Bu sayede hareket kabiliyetleri artar ve ko-sitümülator (eş-uyaran) proteinler üretebilen profesyonel antijen sunan hücrelere (ASH) dönüşürler. Dendritik hücreler, T hücresine antijen sunmakla görevli hücrelerdir. Dendritik hücreler, tümörle karşılaştıkları yerden bölgesel lenf noduna doğru göç etmeye başlarlar. Bu esnada fagosite ettikleri antijenik proteinleri proteolitik olarak parçalayıp işleyerek küçük bir peptid parça elde ederler. Bunu da endoplazmik retikulumda üretilen MHC proteinlerinin 'cep' kısmına takarak hücre yüzeyine çıkarırlar. Bu yapıya MHC-peptid kompleksi denilmektedir. Antijeni MHC sınıf I proteinlerine bağlayarak CD8+ T hücrelere, MHC sınıf II reseptörlerine bağlayarak CD4+ T hücrelerine sunarlar. T hücrelerinin büyük bir kısmı protein yapıdaki antijenleri sadece ASH'ler tarafından MHC molekülleri aracılığıyla sunulduğunda tanıyabildikleri için antijen sunumu aşaması T hücre aktivitesi için oldukça önemlidir [88].

T hücre antijen reseptörü tarafından antijen-MHC komplekslerinin tanınması, aktive olmamış yani naif T hücrelerinin aktive edilmesi için yeterli değildir. T hücrelerinin aktivasyonu için iki sinyale ihtiyaç duyulmaktadır. İlk sinyal, tümör hücrelerini yakalayan dendritik hücrelerinin tümör antijenini ekleyip antijeni MHC kompleksi ile birlikte yüzeyinde sunması sonucu T hücrelerinin üzerinde bulunan T hücre reseptörünün (TCR), MHC kompleksine bağlanması ile oluşur. İkinci sinyal ise,

T hücreleri üzerinde bulunan CD28 molekülü ile dendritik hücreleri üzerindeki B7 moleküllerinin bağlanması ile olmaktadır [89].

Tümör antijeninin T hücreleri tarafından tanınması sonucu tümöre özgü T hücreler, tümörün bulunduğu bölgeye gidip tümör hücreleri ile savaşır. Ancak tümör hücreleri stromayı, regülatör T hücrelerini, baskılayıcı hücreleri, inhibitör sitokinleri ve tümör mikroçevresindeki diğer hücreleri kendi lehine kullanarak antitümör immün cevaplarının azalmasını sağlar [89].

İmmün sistemin tümör hücreleri üzerinde ikili bir rolü dikkati çekmektedir. Bu rollerden ilki immün gözetim denen bir mekanizmadır. İmmün sistem tümör hücrelerini tanıyarak ortadan kaldırır. Makrofajlar, NK (doğal öldürücü) hücreleri, dendritik hücreler, T lenfositler ve B lenfositler rol oynar. İkinci rolü de, immün sistemin tümörü yok etmeye çalışırken, tümörün de immün sistemi şekillendirmesini içeren karşılıklı bir etkileşimin oluşmasıdır. Bu etkileşim de üç fazdan oluşmaktadır. Eliminasyon fazında immün sistem etkili bir şekilde aktiftir ve tümör hücrelerine üstün gelir. Bu durum genel olarak premalign lezyonlarda görülür, ancak bu evreden kaçabilen tümör hücreleri çoğalmaya devam ederek bir sonraki faz olan denge fazına doğru ilerler. Eliminasyon fazı aynı zamanda immün gözetim mekanizması olarak da adlandırılmaktadır. Denge fazında tümör ve immün sistemin ikisi de aktiftir. İmmün sistem tümör hücrelerini tanıyıp yok etmeye çalışırken, tümör hücreleri de içinde bulunduğu mikroçevreyi, ürettiği sitokinlerin yardımıyla kendisi için uygun hale getirmeye çalışır. İnterlökin-10 (IL10), Prostoglandin E2 (PGE2), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) gibi ürettiği sitokinler ile immün hücrelerini bazı dönüşümlere zorlayarak immün yanıtı etkisizleştirip inflamatuvar yanıtı ortadan kaldırmaya çalışırlar. Denge fazı yıllarca sürebilir. Sonucunda ya immün sistem üstün gelerek tümörü yok eder, ya da tümör kontrolü ele alır. Kaçış fazında kontrol tümör hücrelerindedir. Dokudaki immün hücreler etkisiz hale gelmiştir. Böylece tümör, immün sistem engeli olmadan büyümeye devam eder [90].

İMMÜN KONTROL NOKTALARI VE KANSER TEDAVİSİNDEKİ YERİ

Normal fizyolojik koşullar altında, çevredeki normal dokuya hasarı en aza indirgeyen ve otoimmün reaksiyonları engelleyen immün kontrol noktaları bir denge durumundadır [91]. İmmün kontrol noktaları, immün sistemin yabancı maddelere karşı gösterdiği immün cevabın aşırıya kaçmasını önler ve vücudun kendi hücrelerini tanıyıp onlara karşı tolerans göstermesine katkıda bulunur. Bu mekanizma gerçekleşirken reseptör-ligand karşılaşmaları olur. Bazı tümör hücrelerinin hayatta kalabilmek için kontrol noktalarında normal sağlıklı hücre gibi etkileşim mekanizmaları geliştirdiği ve immün sisteme yakalanmadan kaçabildiği saptanmıştır [64].

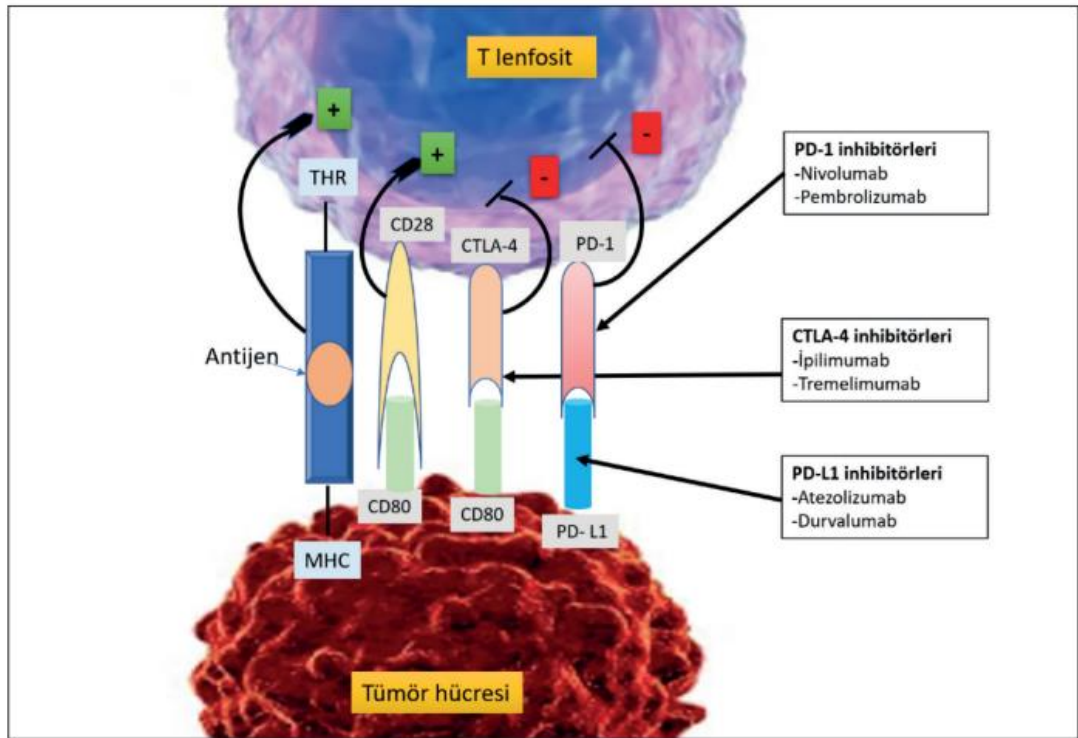
Akciğer kanserinin tedavisinde de araştırılan ve etkinlikleri gösterilen iki önemli immün kontrol noktası vardır; sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4) yolağı ve programlanmış hücre ölümü-1/programlanmış hücre ölümü ligandı-1 (PD-1/PD-L1) yolağı. PD-1; T hücreleri ve B hücreleri üzerindeki hücre yüzeyi reseptörüdür. Bağışıklık sisteminin insan vücudundaki hücrelere tepkisini düzenlemede rolü vardır. Tümörde CTLA-4' e göre daha fazla üretilir, çünkü sadece T hücresinde değil, NK ve B hücresi üzerinde de etkilidir. Bu nedenle PD-1 blokajı yalnız T hücre aktivitesine değil, aynı zamanda NK aktivitesine ve B hücre kaynaklı antikor üretimine de yol açabilir. PD-1'in monositler, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler ve tümörü infiltre lenfositler (TİL'ler) gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinde eksprese edildiği saptanmıştır [91, 92]. PD-1'in etkileştiği iki ligandı vardır; bunlar PDL1 ligandı 1 (PD-L1; ayrıca B7-H1 ve CD274 olarak da bilinir) ve PDL 2'dir (ayrıca B7-DC ve CD273 olarak da bilinir) [92]. PD-L1 endotelial, epitelyal ve hematopoetik hücrelerde eksprese edilirken PD-L2 dendritik hücreler ve makrofajlarda eksprese edilir. PD-L1 ve ligandlarının başlıca rolü, inflamatuvar yanıt sırasında periferik dokularda T hücrelerinin aktivitesini sınırlayıp otoimmüniteyi baskılamaktır [93].

CTLA4; klinik çalışmalarda hedef seçilmiş en erken tespit edilmiş immün kontrol noktasıdır. T hücrelerinin erken evrelerindeki aktivasyonunda görev alır. T hücresi yüzeyindeki TCR ve CD28'in antijen sunan hücre yüzeyindeki sırasıyla MHC sınıf I molekülü ve B7 ile birleşmesiyle T hücre aktivasyonu gerçekleşir. Eğer B7 molekülü yine T hücresinde bulunan CD28 yerine CTLA-4 ile birleşirse ters etkiye

sebepler olarak T hücrelerinin inhibisyonuna sebep olur. CTLA-4 inhibitörleri ile bu mekanizmadan yola çıkılarak reseptörlerin bloke edilir. İmmün reaksiyon ile tümör hücrelerinin yok edilmesi hedeflenir. İpilimumab, CTLA-4' e bağlanan ve ligandına bağlanmasını engelleyen monoklonal bir antikordur [92, 94].

İmmünoterapi

İmmün kontrol noktası inhibitörleri, ileri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinin tedavisinde yeni bir çığır açmıştır. İmmünoterapi seçeneği için belirlenecek hastalarda biyobelirteç arayışı henüz son halini almasa da tümör dokusunda PD-L1 ekspresyonunun araştırılması önerilmektedir. Farklı ilaçlar günlük hayattaki yerlerini almaya başlamıştır [92, 95]. Bu ilaçlar ve neye karşı geliştirildikleri Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1: Tedavideki ilaçlar ve neye karşı geliştirildikleri özetlenmiştir [95].

PD-L1

PD-L1, özellikle KHDAK, melanom, böbrek hücreli karsinom, meme kanseri, mide kanseri, hepatoselüler karsinom, çeşitli lösemi, multipl myelom gibi tümör tiplerinde ifade edilir. Ancak tüm tümörlerde ya da tüm tümör hücrelerinde bulunmamaktadır [91]. Tümör hücre yüzeyinde eksprese edilen PD-L1, regülatör T-hücresi üzerinde eksprese edilen PD-1 bağlanarak T hücresinin inflamatuvar aktivitesini azaltır ve tümörün yabancı olarak tanınmasını inhibe eder; böylece immün sistemin self toleransını (down regülasyonunu) sağlar [96]. PD-L1, başlıca membran inhibitör ligandır ve KHDAK’de immünoterapi biyobelirteç arayışında şimdiye kadar en çok üzerinde çalışılan metabolittir. Tümör hücrelerinde %50 ve üzeri membranöz boyanma saptanan PD-L1 pozitif hastalarda immünterapötik ilaçların etkinliği yüksek olduğu bildirilmiştir [96]. PD-L1, KHDAK hastalarında sigara içenlerde daha yüksek oranda pozitifdir [97]. Akciğer adenokarsinom ve SCC olgularında PD-L1 pozitifliği karşılaştırıldığında benzer pozitiflik oranları bildirilmektedir [96]. PD-L1 pozitifliği KHDAK’lerde çoğunlukla kötü prognozla ilişkilidir.

Genetik değişikliklerin SCC’de PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır [98]. PD-L1 bağışıklıkla ilgili bir molekül olduğundan, ekspresyon düzeyi tümör mikro ortamını yansıtabilecek şekilde değişiklik gösterebilir. Tümörde PD-L1 pozitifliği dinamik bir süreçtir, hastanın aldığı tedaviler sonrası değişim gösterebilir. Örneğin kemoterapi ve radyoterapi bağışıklık yanıtını indükleyebilir. Birçok çalışma, tümörlerin kemoterapi öncesi ve sonrası, radyasyon tedavisi sonrası PD-L1 ekspresyonunu karşılaştırmıştır. PD-L1 ekspresyonundaki değişim paterni artma, stabil kalma veya azalma gibi çok çeşitli farklılıklar göstermektedir. Kemoterapiden sonra PD-L1 ekspresyonundaki değişiklik vakaların %14-57,1’inde rapor edilmiştir. PD-L1 ekspresyonundaki artış, tedaviye daha iyi yanıt ile ilişkili olsa da kötü prognostik bir faktördür [99].

Tümörlerdeki PD-L1 pozitivitesi heterojendir. Bu nedenle mümkün olan en büyük tümör alanında çalışılmalıdır [100]. Primer tümör ve eş zamanlı gelişen lenf nodu metastazındaki PD-L1 ekspresyonları oldukça paralel bulunmuştur ancak daha sonra gelişen metastazda PD-L1 pozitifliği değişebilmektedir [96]. İleri evre KHDAK hastalarında en az 100 hücre içeren ve en güncel olan doku biyopsisi PD-L1 testi için tercih edilmelidir [101].

Anti PD-1 ve Anti PD-L1 ajanlarının verileceği hasta seçimleri için ilaç üreticisi firmalar farklı tanısal firmalar ile işbirliği içerisinde çalışmıştır. İmmünohistokimyasal boyama cihazları olarak iki firma öne çıkmaktadır; Agilent firmasına ait DAKO ve Roche Diagnostics. Bu iki firmanın ürettiği farklı klonlarda PD-L1 primer antikolarının KHDAK’lerdeki ekspresyonunu değerlendiren retrospektif, prospektif çalışmalar ve ilaç yanıtını test eden pek çok araştırma literatürde yerini almıştır [95, 99]. Şekil 4’te ilaç firmaları ve çalışma prensipleri gösterilmiştir [102]. Bugün artık Amerika’da CAP /AMP ve Akciğer patoloğları ile pek çok Avrupa ülkesinde KHDAK hastalarında moleküler testler yanı sıra immünoterapi verilecek hastaların seçimi için PD-L1 testi de uygulanmaktadır [95].

İlaç	PD-L1 Diyagnostik Antikor Klonu	PD-L1 “+”lik sınırı	Platform
Nivolumab	28-8	≥%1 tümör hücresi (TH)	DAKO Link 48 Autostainer
	SP263	≥ %1, ≥ %5 ve ≥ %10 TH	VENTANA BenchMark
Pembrolizumab	22C3	≥%1 TH %1-49 TH PD-L1 + ≥%50 tümör hücresi	DAKO Link 48 Autostainer
	SP263	≥%50 TH 1.basamak ≥%1 TH 2.basamak	VENTANA BenchMark
Atezolizumab	SP142	≥%50 TH veya ≥%10 TIL	VENTANA BenchMark
Durvalumab	SP263	≥%1 TH Kemoradyoterapi sonrası	VENTANA BenchMark
Avelumab	73-10	≥%1 TH	DAKO Link 48

Şekil 2. Günlük rutinde kullanılan KHDAK için ilaç firmaların da ilişkili olduğu 5 PD-L1 primer antikoru ve immünohistokimya cihazı ile çalışma önerileri [102]

Yapılan çalışmalarda 22C3 (DAKO), 28-8 (DAKO) ve SP263 (ROCHE Ventana) PD-L1 klonları oldukça birbirine yakın boyanma sonuçları vermiştir. Sonuçlar araştırmaya katılan patoloğlar arasında yüksek tutarlılıkla değerlendirilmiştir [103]. Bazı güncel çalışmalarda VENTANA platformu ile SP263 klonu uygulamasının

diğerlerine üstün olduğu belirtilmektedir [104]. Her bir ilaç için farklı eşik değer önerisi olması uygulama zorluklarına neden olabilmektedir. Bu nedenle patoloğun yapması gereken, raporunda hangi primer antikoru hangi platformla uyguladığını ve açıklama kısmında, tümör hücrelerinde ve immün hücrelerde pozitiflik durumunu belirtmesi olacaktır [99].

PD-L1 değerlendirmeden önce preanalitik dönemde dikkat edilmesi gereken önemli noktalar vardır. Bunlar IASLC PD-L1 değerlendirme klavuzundaki tabloda özetlenmiştir (Şekil 3) [99]. Bu rehberde göre optimum immünohistokimyasal sonuçlar için biyopsiler için 6-48 saat, rezeksiyon örnekleri için 24-48 saat arasındaki fiksasyon önerilmektedir. Ancak Dako'nun 22C3 ile 28-8 PharmDx kitleri ve Ventana'nın SP263 klonu için 72 saate kadar nötr tamponlu formalin fiksasyonunu da önerilmektedir [99].

Parametre	Öneri
Soğuk İskemi Süresi	Mümkünse 30 dakikadan daha kısa; en fazla 1 saat
Fiksatif	%10 nötral tamponlu formalin
Fiksasyon süresi (Doku)	6-48 saat
Fiksasyon süresi (Rezeksiyon)	24-48 saat
Hazırlık	3-5 µm kalınlıkta kesilmiş parafine gömülü kesitler
Örneğin saklanması	Doku blokları
Bloklar için saklama süresi	PD-L1 İHK için 3 yıldan daha az
Bloklar için saklama koşulları	Işıktan, sıcaktan, nemden korunmalı
Kesitler için saklama süresi	Saklama koşullarına göre değişken. Kullanılacak testin içeriğine göre karar verilmeli
Dekalsifikasyon	Gerekli ise EDTA

Şekil 3. Preanalitik Aşamada Önemli Noktalar [99].

PD-L1 İmmünohistokimyasını Değerlendirirken Dikkat Edilmesi

Gerekenler

İmmünohistokimyasal olarak tespit edilen PD-L1 protein ekspresyonu, anti-PD1/PD-L1 tedavileri için öngörücü bir biyobelirteç testi olarak kullanılmaktadır. PD-L1 ekspresyonunu değerlendirmeye yönelik IHC testleri, immünoterapilerle hem birinci basamak hem de ikinci basamak tedavi için uluslararası düzeyde ABD FDA ve EMA tarafından [5], Türkiye’de de sağlık bakanlığı tarafından onaylıdır. Tümörün H&E kesitleri ile birlikte değerlendirilmesi morfolojiye hakimiyeti sağlar; böylece kesitteki tüm tümör alanları değerlendirilmiş olur. Tümördeki PD-L1 heterojen ise tüm kesit taranarak ortalama değer verilmelidir. PD-L1, immün hücreler (IC'ler) ve tümör hücrelerini (TC'ler) boyar. İmmün hücreler, intratümöral ve peritümöral immün hücreler (lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve granülositler) olarak ele alınır. PD-L1 protein ekspresyonu, kesitteki canlı tümör hücrelerinde değerlendirilir. Herhangi bir yoğunlukta kısmi veya çepeçevre tam membranöz boyanma gösteren canlı tümör hücrelerinin, alandaki tüm canlı tümör hücrelerine oranının yüz ile çarpımı tümör proporsiyon skoru (TPS)’dur [105]. Tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği hiç yoksa (0) ya da %1 den az ise TPS negatif PD-L1 Skoru, PD-L1 pozitifliği %1-49 ise düşük PD-L1 skoru, PD-L1 pozitifliği >%50 ise yüksek PD-L1 skoru olarak kategorize edilir [106].

DEK PROTEİNİ

DEK geni, 6p22.3 kromozomunda yer alan bir proto-onkogendir [7, 107]. *DEK* geni, 11 ekzon ve TATA dizisi bulunmayan promotör bölgesi içermektedir. *DEK* geninin transkripsiyonu, CpG adalarınca zengin bu transkripsiyon başlama bölgesine, bazı transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasıyla kontrol edilmektedir. *DEK* gen ifadesi hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişmektedir. Transforme hücreler ya da kanser hücrelerinde *DEK* mRNA seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir [108].

DEK geninin promotör bölgesi kullanılarak yapılan çalışmalar, transkripsiyon başlama noktasından 170 ve 135 baz uzaklıkta sırasıyla Nükleer Transkripsiyon Faktör-Y (NF-Y) ve Yin Yang 1 (YY1) transkripsiyon faktörleri için bağlanma dizileri bulunduğunu ve bu bölgelerin *DEK* gen transkripsiyonunda rol oynadığını ortaya

konmuştur [109]. *DEK* gen ifadesinin proliferasyon ve transformasyondaki rollerinin bu iki transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmesi, *DEK* geninin aşırı ekspresyonu ve tümör gelişimi arasında mekanik bir bağlantı olabileceğini düşündürse de, kanserlerde hangi üst sinyal yollarının NF- κ B ve YY1 proteinlerini aktive ederek gerçekleştirdiği henüz bilinmemektedir [110]. DNA'ya bağlanan protein olan *DEK*'in fonksiyonlarının ilki DNA'nın kromatin yapısının değiştirilmesidir. Yapılan çalışmalarda *DEK* proteininin DNA üzerinde farklı yapısal bölgelerde lokalize olabildiği ve DNA topolojisi ile yakından ilgili olabileceği gösterilmiştir [108].

DEK proteini ilk olarak akut myeloid lösemi hastalarında görülen 6. ve 9. kromozomlar arası translokasyon sonucunda oluşan füzyon NUP214 (CAN) proteini ile tanımlanmıştır [111]. Son zamanlarda ise bu genin, meme kanseri, malign melanom, akut miyeloid lösemi, retinoblastoma, glioblastoma, hepatoselüler karsinom ve baş boyun SCC'si dahil olmak üzere birçok kanserde upregüle edildiği bulunmuştur. *DEK* geni p53, p63 ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu gibi çeşitli proteinler ve sinyal yolları aracılığıyla etki eder. *DEK* geninin aşırı ekspresyonu, mitotik defektlerin artmasına, hücre proliferasyonuna, hücre transformasyonuna ve karsinogeneze neden olur. Bu proteinin düzenlenmesi ve işlevi hakkında hala birçok açık soru bulunmaktadır [7, 112].

DEK gen ekspresyonu ve *DEK-CAN* füzyon geninin varlığı agresif tümörler, kemorezistans ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Keratinositlerde *DEK* aşırı ekspresyonu, p53 kararsızlığını teşvik ederek yaşlanmayı ve apoptozu engelleyebilir. *DEK* aşırı ekspresyonu ayrıca farklılaşmayı geciktirirken keratinosit proliferasyonunu da teşvik eder ve keratinosit transformasyonuna katkıda bulunabilir [112]. Hepatoselüler karsinom, beyin kanseri, mesane kanseri, retinoblastom, meme kanseri, serviks kanseri, melanom, kolon kanseri, skuamoz hücreli baş/boyun karsinomları ve prostat kanseri gibi solid kanserler ile bazı hematolojik kanserlerde *DEK* gen ifadesinin arttığı ve bu kanserlerden bazılarında *DEK* geninin tümör gelişimi ve ilaç direnci ile ilgili hücre süreçleri ilişkili olduğu bildirilmiştir [110, 112].

Matrka ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma birçok tümör gelişimiyle ilişkili olan *DEK* proteininin hücre metabolizması üzerindeki etkilerine ışık tutmuştur. Büyüme ve çoğalma hızındaki artışa bağlı olarak tümör hücrelerinin enerji ve makromolekül

ihtiyacının da artması kanserin en tipik özelliklerindedir. Baş/boyun skuamöz hücreli karsinom hücre hatlarında DEK'in aşırı ifadesinin NAD⁺, laktat, alanin gibi glikoliz son ürünlerinin, fumarat, süksinat gibi TCA döngüsü ara ürünlerinin ve aminoasit miktarının artışına neden olduğu gösterilmiştir. Böylece, DEK'in önemli metabolik yolları değiştirerek tümör hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasına katkı sağlayabileceği ile ilgili yeni ve farklı bir model ortaya konulmuştur [113].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Baş ve Boyun Tümörleri Sınıflandırmasının son beşinci baskısına, ileri moleküler testlerin bir sonucu olarak DEK::*AFF2* füzyon karsinomu, keratinize olmayan skuamöz hücreli karsinomun bir alt tipi olarak eklenmiştir [4]. Benzer histopatolojik bulgular içeren DEK::*AFF2* füzyon karsinomları, geniş papiller yapraklar şeklinde anastomoz yapan lobüller, solid alanlar barındıran endofitik ve ekzofitik büyüme gösterebilen karmaşık tümörlerdir. Tümör hücreleri, çoğu durumda bazoloid; yer yer amfofilik, eozinofilik ve hatta fokal olarak berrak sitoplazmaya sahiptir. Mitotik oran genel olarak düşüktür ve nekroz izlenmez. Tümörü nötrofillerin belirgin bir şekilde infiltre ettiği izlenmiştir [1, 114].

AFF2 geni, X kromozomunun (Xq28) uzun kolunda yer alan X'e bağlı bir gendir. Bu gen, *AFF1/AF4*, *AFF2/FMR2*, *AFF3/LAF4* ve *AFF4/AF5q31*'i içeren AFF gen ailesine aittir. Bu gen esas olarak beyinde ifade edilir ve kodlanan protein sinaptik plastisitede rol alır. *AFF2* proteini, transkripsiyon aktivatörü olarak işlev gören bir RNA bağlayıcı proteindir. *AFF2* yeniden düzenlemeleri birçok malign neoplazi ile ilişkilidir [4]. DEK::*AFF2* füzyonunun onkogenik mekanizması hala bilinmemektedir ve daha fazla araştırma gerektirmektedir.

DEK Tespitinde Kullanılan Test Yöntemleri

DEK gen ilişkili proteinin tespitinde immünohistokimya, *DEK* gen değişimlerinin saptanmasında FISH, rt-PCR gibi yöntemler kullanılır [115, 116].

İmmünohistokimya, sonuç verme süresi kısa, ulaşılabilirliği kolay ve ucuz bir test yöntemidir. Yapılan bazı çalışmalarda DEK tavşan poliklonal antikorunu (Proteintech, Chicago, IL, Katagori No: 66194-1-Ig) kullanılmıştır. Tümör hücrelerinde nükleer boyanma izlenir [117]. FISH yönteminde ilgili genin bulunduğu alanı işaretleyen DNA probunu kullanılır. Birçok laboratuvarında bulunan ve nispeten ucuz bir yöntem olan

FISH, kısa sürede sonuç verebilen bir yöntemdir. Ancak test sonuçlarının yorumlanmasında, işlem sırasında oluşabilecek artefaktlar doğru sonuca ulaşma konusunda engel teşkil edebilir. Bu sebeple test sonuçlarının yorumlanması özel bir uzmanlık ve dikkat gerektirmektedir. Baş ve boyun bölgesinin *DEK::AFF2* füzyonu ile ilişkili yapılan bir çalışmada eşik değer olarak %20 kullanılmıştır [116].

RT-PCR, füzyon genlerinin ribonükleik asit (RNA) transkriptlerini saptama prensibiyle çalışır. RT-PCR testi, yaklaşık olarak 1 µg RNA (50.000 tümör hücresi) gerektirmektedir. Bu testin güvenilirliğindeki en önemli nokta RNA örneğinin kalitesidir [118]. RT-PCR hızlı sonuç veren, ucuz ve yaygın olarak kullanılan bir testtir. Multiplex RT-PCR, tek analizle bir dizi DEK geninin primer setlerinin kullanıldığı bir tekniktir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada etik açıdan sakınca olmadığı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Toplantısı'nda 12.12.2023-E.46233 Evrak Tarih ve Sayılı belge ile bildirilmiştir. Bu proje Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

OLGU SEÇİMİ VE DOKU BLOKLARIN HAZIRLANMASI

Bu çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda 2017-2023 yılları arasında skuamöz hücreli karsinom tanısı alan; bronkoskopik biyopsi veya tru-cut biyopsi materyallerinden rastgele seçilmiş 128 hasta dahil edildi. Olgulara ait preparatlar ve parafin bloklar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden alındı. Olgulara ait yaş, cinsiyet, histolojik tümör tipi, tümör çapı, lenf nodu metastazı, uzak metastaz durumu, total yaşam süresi, neoadjuvan tedavi durumu bilgileri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji, Göğüs hastalıkları hasta dosyalarından ve Tıbbi Patoloji raporlarından elde edildi. Olgularımızın hepsi neoadjuvan tedavi olarak paklitaksel ve karboplatin tedavisi almıştı. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASCL) 8. Evreleme Sistemi ile olguların klinik evresi belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. IASCL'nin 8. Evreleme Sistemi – T, N ve M Evresi [52]

Tx		Primer tümör değerlendirilemiyor veya malign hücrelerin balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında saptandığı ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile saptanamadığı
T0		Primer tümör kanıtı yok
Tis		Karsinoma in situ (adenokarsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinoma in situ'yu kapsar)
T1		Ana bronş tutulumu olmadan akciğer veya visseral plevra ile çevrili, en geniş çapı ≤ 3 cm, bronkoskopik olarak lob bronşundan distalde invazyon bulgusu olmayan tümör (örn. ana bronşta olmayan) ¹
	T1m	Minimal invaziv adenokarsinom ²
	T1a	Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm ²
	T1b	Tümörün en geniş çapı > 1 cm, ≤ 2 cm

	T1c	Tümörün en geniş çapı > 2 cm, ≤ 3 cm
T2		Tümörün en geniş çapı > 3 cm, ≤ 5 cm; veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör ³
	T2a	Tümörün en geniş çapı > 3 cm, ≤ 4 cm
	T2b	Tümörün en geniş çapı > 4 cm, ≤ 5 cm
T3		Tümörün en geniş çapı > 5 cm, ≤ 7 cm veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon; *Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikard*Primer tümörle aynı lobda nodül(ler)
T4		Tümörün en geniş çapı > 7 cm veya aşağıdaki yapılardan birine invazyon; *Diyafraam, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra gövdesi, karina *Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül(ler)
Nx		Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0		Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1		İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve/veya intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2		İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3		Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklavikuler lenf bezlerine metastaz
M		Uzak metastaz yok
M		Uzak metastaz var
	M1a	Karşı akciğerde metastatik nodül(ler), plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon ⁴
	M1b	Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz ⁵
	M1c	Bir veya birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz

1 Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayımı da T1a olarak sınıflandırılır.

2 Soliter adenokarsinom (3 cm'den daha büyük boyutta olmayan), daha baskın olarak lepidik paternli ve herhangi bir odakta 5 mm'den daha büyük boyutta invazyona sahip olmayan

3 Bu özellikleri ile T2 tümör; eğer ≤ 4 cm veya büyüklüğü belirlenemiyor ise T2a; eğer > 4 cm fakat ≤ 5 cm ise T2b olarak sınıflandırılır.

4 Akciğer kanseriyle birlikte olan çoğu plevral (perikardiyal) efüzyonlar tümöre bağlı gelişir. Bazı hastalarda multipl mikroskopik incelemelerde plevral (perikardiyal) sıvı tümör açısından negatiftir ve sıvı hemorajik ve eksudatif değildir. Bu bulgular varsa ve klinik değerlendirme efüzyonun tümörle ilgili olmadığı yönündeyse, efüzyon evreleme belirleyicisi olmaktan çıkarılmalıdır.

5 Bu durum bölgesel olmayan tek bir uzak lenf bezi metastazını kapsar.

Yine iki patolog tarafından preparatlardaki nekroz içermeyen, selülaritesi yüksek ve tümör dışı doku en az izlenen alanlar seçildi. Seçilen preparatlara ait bloklar arşivden çıkarıldı.

İMMÜNOHİSTOKİMYA

En az 100 hücre içeren ve en güncel olan doku biyopsisinden, pozitif şarjlı lamlara 3-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler ilk deparafinizasyon işlemi için bir gece etüvde 56- 60 °C sıcaklıkta bekletildi. Daha sonra kesitler, antijen retrieval işlemi de dahil olmak üzere tüm boyama aşamalarını sabit ısı ve koşullarda gerçekleştiren tam otomatik immünohistokimya cihazı VENTANA, Benchmark Ultra (Ventana Medical Systems, USA) ile , OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak boyandı. Her bir olguya ait kesitlere primer antikor olarak PD-L1 tavşan monoklonal antikor (Kullanıma hazır, Klon: SP263, Katalog No: 790-4905, Ventana, USA) damlatılarak hedeflenen proteinler görünür hale getirildi. Pozitif kontrol dokusu olarak her lamda PD-L1 için normal plasenta ve tonsil dokusu kullanıldı. Çalışmadaki tüm immünohistokimyasal incelemeler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

İMMÜNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Tüm kesitlerde tümör hücreleri ve immün hücreler değerlendirildi. PD-L1 ekspresyonu, en az 100 tümör hücresinde membranöz boyanma dikkate alınarak değerlendirildi. Membranöz boyanmaya eşlik etmeyen tek başına sitoplazmik boyanmalar pozitif kabul edilmedi. Tümörün heterojen boyanma gösterdiği olgularda sanal bölümlenme yapıldı. Her bir bölümün PD-L1 skoru çıkarılıp total bir tümör oranı ve immün hücrelerdeki boyanma yüzdesi verildi. Tümör hücrelerinde TPS skoru boyanma yüzdesine göre 3 şekilde kategorize edildi. Boyanma yoksa TPS <%1 negatif PD-L1 Skoru, PD-L1 pozitifliği %1-49 ise düşük PD-L1 skoru, PD-L1 pozitifliği >%50 ise yüksek PD-L1 skoru olarak kategorize edildi.

FLORESAN İN-SİTU HİBRİDİZASYON

Belirlenen tümörden zengin parafin bloklardan FISH yöntemi için, pozitif şarjlı lamlara 3 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Olguların tamamında Diagen

primeFISH® DEK (6p22) break apart DC prob kiti kullanılarak, FISH yöntemi ile füzyon durumu değerlendirildi.

İşlemler sırasıyla şu şekilde gerçekleştirildi. Hazırlanan parafin kesitler deparafinizasyon için 56-60°C'de 16 saat inkübe edildi. İki ayrı kaptaki %100 ksilenlerde 10'ar dakika bekletildi. Rehidratasyon için %100, %85, %70 etanollerden her birinde 3'er dakika olmak üzere geçirildi ve distile suda 3 dakika yıkandı. 99,9°C'de su banyosunda bekleyen pretreatment solüsyonu içinde lamalar 45 dakika bekletildi. Distile su içinde 2 dakika durulandı. Böylelikle hibridizasyon öncesi işlemler gerçekleştirilmiş oldu. Kesitler üzerine pepsin solüsyonu damlatılarak 15 dakika 37°C'de etüvde bekletildi. Bir dakika boyunca distile suda ve 5 dakika 2X SSC (Salin-sodyum sitrat) içinde yıkandı. Sırasıyla %70, %85, %100 etanollerde 1'er dakika bekleterek dehidratasyon gerçekleştirildi. Lamlar karanlık odada oda sıcaklığında kurulandı. Sonraki işlemlere karanlık ortamda devam edildi. FISH probu kesit üzerine eklendi ve doku büyüklüğüne göre uygun lamel kullanılarak kapatıldı. Lamel kenarları kauçuk çimento (rubber cement) ile kapatıldı. Su banyosunda, 80°C'de 5 dakika prob ve hedef DNA denatürasyonu gerçekleştirildi. 37°C'de gece boyu hibridizasyon için inkübe edildi. Yine karanlık ortamda; lamel kenarındaki rubber cement dikkatlice çıkarıldı ve lamelin lamdan ayrılması sağlandı. Wash buffer I (Thermofisher) solüsyonunda 2 dakika, 72°C su banyosunda wash buffer II (Thermofisher) solüsyonunda 30 dakika, wash buffer III (Thermofisher) solüsyonunda 1 dakika bekletildi. Sırasıyla %70, %85, %100 etanollerde 1'er dakika bekletilerek dehidratasyon gerçekleştirildi. Lamlar oda sıcaklığında kurutuldu. Her lam üzerine DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) zemin boyası damlatıldı, lamel ile kapatıldı. DAPI damlatıldıktan sonra en az +4°C'de, en az 2 saat bekletildikten sonra floresan mikroskopunda incelemeye hazır hale geldi.

primeFISH® DEK (6p22) break apart DC proba uygun dalga boyu aqua, yeşil, mavi ve turuncu filtre içeren Leica marka DM 6000 B model floresan mikroskopunda, karanlık ortamda değerlendirme gerçekleştirildi. Her bir vakada yeşil ve kırmızı floresan sinyaller, en az 50 adet üst üste binmeyen nukleusta uygun filtrelerle sayıldı. Hedef prob kırmızı floresan sinyal ile hibridize olurken, kontrol probu ise yeşil floresan sinyal ile hibridize oldu. Normal bir hücrede, iki adet kırmızı ve yeşil sinyal çifti yan yana görülmektedir. DEK füzyonu olan anormal bir hücrede bir çift yan yana

iken diğer kırmızı ve yeşil sinyal çiftinde ayrılma izlendi. Füzyon pozitif kabul etmek için %20'lik eşik değeri belirlendi.

RNA İZOLASYONU

Parafine Gömülü Dokudan Kit ile RNA İzolasyonu

Bu çalışmaya alınan ve FISH ile *DEK* rearranjmanı tespit edilen 29 olgudan ve negatif kontrol için, tümör tespit edilmemiş 10 adet büllöz akciğer dokusundan seçilen bloklardan her biri 20 mikron kalınlığında kesitler hazırlanarak, ayrı ayrı ependorf tüplerine alındı. Toplam 39 hastaya ait örneklerden RNA izolasyon işlemleri GeneAid (Presto FFPE RNA mini, RFD050) kiti ile yapıldı. Genel izolasyon protokolümüz aşağıda maddelendirildiği gibidir:

- Öncelikli olarak steril bisturi ve pens yardımıyla alınan mikrotom kesitlerinden parafinlerin uzaklaştırılmasına takiben 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin üzerine deparafinizasyon amacıyla 1200 µl ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve kuvvetli vorteksleme işlemi yapılarak homojenizasyon ve ksilenin tüm dokuya ksilenin nüfus etmesi sağlandı.
- Ksilen ilave edilen örnekler 56°C'ye ayarlı etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanarak süpernatant uzaklaştırıldı.
- Ksileni tamamen uzaklaştırmak için 1200 µl %100 etanol (Merck) ilave edilerek kuvvetli vorteksleme ile alkolün dokuya nüfus etmesi sağlandı ve takiben 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı.
- Süpernatanın uzaklaştırılmasını takiben, örnekler kapağı açık şekilde 37°C'ye ayarlı etüvde 10 dakika inkübe edildi. Böylece kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
- Parafini uzaklaştırılan örnekler kit içerisinde temin edilen 150 µl Buffer PKD eklenerek vortekslendi ve 10000 rpm'de 1dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Daha sonra 10 µl proteinaz K eklenerek pipetleme yapıldı. Sonrasında proteinaz K'nın aktivite göstermesi için 56 °C 15 dk ve takiben proteinaz K'nın inaktivasyonu için de 80 °C 15 dk inkübe edildi.

- Elde edilecek olan şeffaf faz 2 ml'lik yeni mikro santrifüj tüpüne aktarılarak buz üzerinde 3 dk inkübasyondan sonra 13 500 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- Süpernatant yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 16 µl DNA Booster Buffer ve üzerine 10 µl DNase I stok solüsyonundan eklenerek örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- 320 µl kit ile temin edilen Buffer RBC ve 720 µl %100 etanol eklendi ve 700 µl'lik örnek RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı. 10000 rpm'den büyük devirde 15 saniye santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrar edildi.
- 500 µl kit ile temin edilen buffer PBE RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı. 10000 rpm'den büyük devirde 2 dakika santrifüj işlemi uygulandı.
- RNeasy MinElute spin kolon yeni 2ml lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak 5dk yüksek devirde santrifügasyon yapıldı. Sonrasında yeni tüpe aktarılan RNeasy MinElute spin kolonlarda 25 µl RNase-free water eklenerek 1 dakika yüksek devirde santrifüj işlemi uygulandı.
- Örneklerden RNA konsantrasyonunun ve saflık durumlarının tespiti, izole edilen RNA'nın 1 µl hacminde NanoDrop (Thermo) cihazı'nın kaidesine yüklenerek spektrofotometrik olarak yapıldı. Konsantrasyon ve saflık ölçümü sonrasında RNA örnekleri bir sonraki çalışma zamanına (cDNA sentezi ve RT-PCR deneyleri) kadar -20°C'de saklandı.

cDNA (Komplementer DNA) sentezi

RT-PCR ile RNA düzeyindeki ekspresyon değişimlerini tespit etmek amacıyla öncelikle yapılan Total RNA izolasyonu için revers transkriptaz enzimi ile ticari kitler yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA sentez kit karışımı (AB)

	Hacim
Total RNA	Değişken
10X Random Primers	2 µl
25X dNTP karışımı	0,8 µl
10X RT tamponu	2 µl
RNAaz içermeyen su	Değişken
MultiScribe™ Reverse Transcritase	1 µl
Son hacim	20 µl

Real- Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

cDNA sentezi sonrasında aşağıda belirtilen reaksiyon karışımı hazırlanıp RT-PCR ile ekspresyon analizi yapıldı. Reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5,5 µl syber green, 6,5 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl (1Reverse+1 forward) primer ve 1 µl cDNA olacak şekilde 96-kuyucuklu plakada kuruldu ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle kapatıldı. Anabilim dalımızda bulunan RT-PCR cihazına yüklenen plaka, 40 döngü olacak şekilde, 95°C'de 10 dk, 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 1 dk olarak amplifiye edildi.

DEK-AFF2 Füzyon varyantlarına ait primerler

D7A4 forward 5'-ACAGTTCTGGAATGGCAAGG

D7A4 reverse 5'-GAGGAGTAGGCCAGGAATGG

D7A6 forward 5'-CAAGGAAGGCTAAGCGAACC

D7A6 reverse 5'-TAGAAGCTCTGGTGGTTGGG

D7A9 forward 5'-GCTAAGCGAACCAAATGTCC

D7A9 reverse 5'-CTCTCCGATTCGCTGGAG

GAPDH forward 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG

GAPDH reverse 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (minimum, maksimum, ortalama, standart sapma, medyan, frekans) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında parametrelerin ikiden fazla grup arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, iki grup arası karşılaştırmalarında

Mann Whitney U test kullanıldı. Sağkalım değerlendirilmesinde Kaplan Meier analizi ve Log Rank Test kullanıldı. Anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR

Kurumumuzda SCC tanısı alan rastgele seçilmiş toplam 128 olgu çalışmaya alındı. Olguların demografik özellikleri ve klinik özellikleri PAÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji ve Göğüs Hastalıkları arşiv kayıtlarından, olguların makroskopik özellikleri PAÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji raporlarından elde edildi. Olgulara ait tüm kesitler iki patolog (FB ve HK) tarafından tekrar değerlendirilerek, DSÖ 2021 kriterlerine göre güncel histopatolojik tiplendirme yapıldı ve patoloji raporlarında bulunan histopatolojik özellikler doğrulandı.

Çalışmaya alınan olguların yaşları 44 ile 87 arasında değişmekteydi. Yaş ortalaması 63.62 ± 8.47 yılıdır. Olguların %97,7'si erkek, %2,3'ü kadındır. %5,5'i 50 yaşından küçük, %51,6'u 50-65 yaş arasında, %43'ü 65 yaşından büyüktür. Olguların yaşlara ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Olguların yaşa ve cinsiyete göre dağılımı

		N	%
Cinsiyet	Erkek	125	97,7
	Kadın	3	2,3
Yaş	50 yaşından küçük	7	5,5
	50-65	66	51,6
	65 yaşından büyük	55	43

Cinsiyet grupları ve yaş grupları arasında tümör çapı, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, sağkalım durumu ve nüks durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Olguların klinikopatolojik özelliklerine göre dağılımı Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Olguların klinikopatolojik özelliklerine göre dağılımı

		N	%
Tümör Çapı	0-3 cm	17	13,5
	3-5 cm	33	27,1
	5-7 cm	40	30,8
	7 cm'den büyük	38	28,6
Lenf Nodu Metastazı	Yok	27	21,1
	Var	101	78,9
Lenf Nodu Metastazı	N0	27	22,6
	N1	58	43,6
	N2	7	6,0
	N3	36	27,8
Uzak Metastaz	Yok	106	82,8
	Var	22	17,2
Progresyon	Yok	123	96,1
	Var	5	3,9
Nüks	Yok	127	99,2
	Var	1	0,8
T Evresi	T1	10	9,8
	T2	14	11,3
	T3	25	19,5
	T4	79	59,4
T Evresi	T1 ve T2	26	21,1
	T3 ve T4	102	78,9
Klinik Evre	III	11	8,6
	IV	117	91,4
Mortalite	Ex	118	92,2
	Sağ	10	7,8

Tümör çapı 15 milimetre ile 150 milimetre arasında değişmekteydi. Ortalama tümör çapı $48 \pm 23,8$ milimetreydi. Olgular tümör çaplarına göre 0-3 cm, 3-5 cm, 5-7 cm ve 7 cm üzeri olmak üzere gruplara ayrıldı. Olguların %13,5'inde tümör çapı 0-3 cm aralığında, %27,1'inde tümör çapı 3-5 cm aralığında, %30,8'inde tümör çapı 5-7 cm aralığında, %28,6'sinde ise tümör çapı 7 cm'den büyük bulundu. Tümör çapı grupları arasında yaş grupları, cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre

grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Biyopsi materyallerinde ise radyolojik veriler ışığında klinik N evresi esas alındı. Olguların %78,9'ünde tanı anında lenf nodu metastazı vardı. N evresi 27 (%22,6) olguda N0, 58 (%43,6) olguda N1, 7 (%6,0) olguda N2, 36 (%27,8) olguda N3 olarak belirlendi. Lenf nodu metastazı ile yaş grupları, cinsiyet, tümör çapı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0,05$).

Laboratuvarımıza ait preparatlardan ve/veya görüntüleme bulgularından olguların %17,2'sinde uzak metastaz tespit edildi. Olguların uzak metastaz durumları ile yaş grupları, cinsiyet, tümör çapı, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Olguların tamamı neoadjuvan tedavi almıştı. Neoadjuvan tedavi durumlarına göre gruplar arasında ile yaş grupları, cinsiyet, tümör çapı, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Olguların 1 (%0,8)'inde radyolojik veya patolojik olarak nüks tespit edilirken, 127 (%99,2)'inde ise görülmedi. Olguların %4,5'inde progresyon görüldü. Sağkalım ile progresyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı ($p:0.001$; $p<0.05$). Sağ olan olguların %54,5'inde progresyon vardı.

Klinik evre referans alınarak evreleme yapıldı. Olguların tamamı evre III ve IV olarak saptandı. Evre III olgu sayısı 11, evre IV olgu sayısı 117 olarak bulundu.

Biyopsi materyallerinde ise radyolojik veriler ışığında klinik T evresi esas alındı. T evresi 10 (%9,8) olguda T1, 14 (%11,3) olguda T2, 25 (%19,5) olguda T3, 79 (%59,4) olguda T4 olarak belirlendi. Olgularda patolojik T evresi grupları arasında yaş grupları, cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, sağkalım durumu ve nüks durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Olgularımızdan az diferansiye karsinom olan 120 olguya İHK'sal olarak p40 yapılmıştı, 120 olgunun hepsi pozitif bulundu. 118 olguya da TTF-1 uygulanmıştı ve

118 olgunun hepsi negatifti. On üç iyi diferansiye SCC olgusuna ise İHK'sal inceleme yapılmamıştı. Hiçbir olguda mürin birikimi yoktu.

EGFR mutasyonu olguların tamamına uygulanmış ve sonuçları negatif bulunmuştu. *ALK* rearranjmanı araştırılan 57 olgunun (%45.1) tümü negatifti. *ROS1* rearranjmanı araştırılan 49 olgunun (%39.1) tümü negatifti. Olguların *EGFR* mutasyonu, *ALK* ve *ROS-1* rearranjmanı açısından dağılımı Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Olguların *EGFR* mutasyonu, *ALK* ve *ROS1* rearranjmanı dağılımı

		N	%
<i>EGFR</i> mutasyonu	Negatif	128	100
<i>ALK</i> rearranjmanı	Uygulanmadı	71	54,9
	Negatif	57	45,1
<i>ROS1</i> rearranjmanı	Uygulanmadı	79	60,9
	Negatif	49	39,1

İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Tümör hücrelerinde PD-L1 ile kısmi ya da total membranöz boyanma göstermeyen 20 olgu (%15,8) mevcuttu. Olgularımızın 81'inde (%62,4) %1-50 arasında membranöz boyanma, 27 olguda (%21,8) %50'nin üzerinde membranöz boyanma saptandı. İmmün hücrelerdeki membranöz boyanma değerlendirildi. Boyanma yüzdesi 0 ile 90 arasında değişmekteydi. Tümör ve immün hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonuna ait veriler Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. Olgulara ait PD-L1 skor bilgileri

	Minimum	Maximum	Ort±SS	Medyan
PD-L1 TPS skoru	0	100	29,62±32,26	15
PD-L1 IC skoru	0	90	7,59±12,35	3
PD-L1 TPS	N	%		
<1	20	15,8		
1-50	81	62,4		
>50	27	21,8		

PD-L1 TPS skoru ile tümör çapı, yaş grupları, cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). PD-L1 ekspresyonu TPS skorunun klinikopatolojik verilere göre dağılımı Tablo 7’de özetlenmiştir.

Tablo 7. Klinikopatolojik parametreler ile PD-L1 TPS skoru ilişkisi

		PD-L1 TPS			p
		<1	1-50	>50	
		n (%)	n (%)	n (%)	
Cinsiyet	Erkek	19 (%100)	77 (%94)	28 (%100)	¹ 0,424
	Kadın	0 (%0)	4 (%6)	0 (%0)	
Yaş Kategorik	50 yaşından küçük	2 (%14,3)	4 (%4,8)	0 (%0)	² 0,162
	50-65	8 (%42,8)	40 (%49,4)	17 (%65,5)	
	65 yaşından büyük	9 (%42,9)	38 (%45,8)	10 (%34,5)	
Tümör Çapı	0-3 cm	4 (%19)	8 (%9,7)	6 (%20,7)	³ 0,399
	3-5 cm	7 (%38,1)	18 (%26,5)	6 (%20,7)	
	5-7 cm	3 (%14,3)	29 (%34,9)	9 (%31)	
	7 cm'den büyük	6 (%28,6)	24 (%28,9)	8 (%27,6)	
Lenf Nodu Metastazı	Yok	3 (%14,3)	20 (%26,5)	4 (%17,2)	³ 0,362
	Var	17 (%85,7)	61 (%73,5)	23 (%82,8)	
Uzak Metastaz	Yok	16 (%85,7)	70 (%86,7)	21 (%72,4)	¹ 0,194
	Var	2 (%14,3)	11 (%13,3)	8 (%27,6)	
Progresyon	Yok	19 (%100)	75 (%92,8)	29 (%100)	¹ 0,264
	Var	0 (%0)	5 (%7,2)	0 (%0)	
T Evresi	T1	3 (%14,3)	7 (%8,4)	3 (%10,3)	³ 0,791
	T2	3 (%14,3)	10 (%12)	2 (%6,9)	
	T3	3 (%14,3)	19 (%22,9)	4 (%13,8)	
	T4	11 (%57,1)	45 (%56,7)	20 (%69)	
Klinik Evre	III	0 (%0)	8 (%4,8)	3 (%3,4)	¹ 0,826
	IV	20 (%100)	72 (%95,2)	25 (%96,6)	
Ölü yaşıyor	Ölü	20 (%100)	72 (%89,2)	25 (%93,1)	¹ 0,279
	Yaşıyor	0 (%0)	9 (%10,8)	2 (%6,9)	

¹Fisher Freeman Halton Exact test

²Fisher's Exact Test

³Ki-kare test

PD-L1 ekspresyonunun IC skorunun klinikopatolojik verilere göre dağılımı Tablo 8’de özetlenmiştir. PD-L1 IC skoru ile tümör çapı, yaş grupları, cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 8. PD-L1 IC skoru ile çalışma parametrelerinin ilişkisi

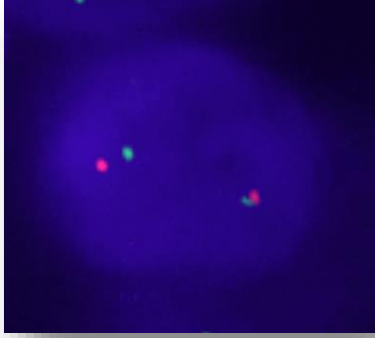
		PD-L1 IC		
		Ort±SS	Medyan	P
Cinsiyet	Erkek	6,95±10,12	3	¹ 0,306
	Kadın	24,2±37,66	10	
Yaş Kategorik	50 yaşından küçük	1,71±2,29	1	² 0,206
	50-65	7,48±9,62	5	
	65 yaşından büyük	8,46±15,53	2	
Tümör Çapı	0-3 cm	7,72±9,11	5	² 0,972
	3-5 cm	8,61±16,98	4	
	5-7 cm	7,51±10,15	3	
	7 cm'den büyük	6,66±10,93	2,5	
Lenf Nodu Metastazı	Yok	6,1±10,26	1,5	¹ 0,304
	Var	8,03±12,9	3	
Uzak Metastaz	Yok	7,57±12,98	3	¹ 0,856
	Var	7,73±8,65	4	
Progresyon	Yok	7,83±12,57	3	¹ 0,463
	Var	2,67±3,72	1	
T Evresi	T1	9,54±9,9	5	² 0,307
	T2	12,93±22,6	10	
	T3	6,08±9,88	1	
	T4	6,76±10,6	2	
Klinik Evre	III	24,2±36,99	10	¹ 0,076
	IV	6,95±10,2	3	
Ölü yaşıyor	Ölü	7,84±12,76	3	¹ 0,826
	Yaşıyor	4,91±5,75	3	

¹Mann Whitney U test

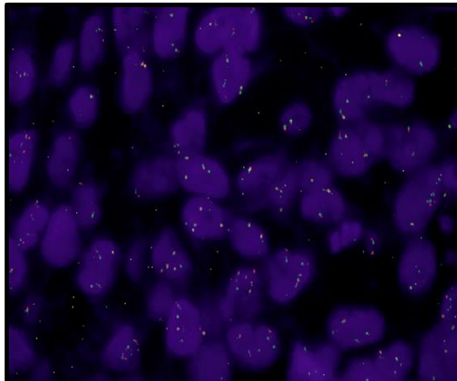
²Kruskal Wallis Test

FISH BULGULARI

Olgularımızın tümünde FISH tekniği ile *DEK* rearranjmanı *DEK* break apart (6p22) prob kullanılarak araştırıldı. Kesitteki tümör hücre oranına göre, her kesitte en az 50 en fazla 281 tümör hücresi sayıldı. *DEK* rearranjmanı 29 olguda (%21.8'inde) tespit edildi (Resim 1) Rearranjman saptanmayan 76 olguda iki füzyon (Resim 2) ve 23 olguda polizomi tespit edildi.



Resim 1. FİSH incelemesinde *DEK* füzyonu saptanan biri yan yana biri ise ayrılmış olarak izlenen yeşil ve turuncu sinyal çifti



Resim 2. FİSH incelemesinde *DEK* füzyonu tespit edilmeyen her ikisi de yan yana izlenen yeşil ve turuncu sinyal çiftleri

Tablo 9. DEK rearanjmanı varlığının klinikopatolojik verilerle ilişkisi

		FISH DEK rearanjmanı		P
		Yok	Var	
		n (%)	n (%)	
Cinsiyet	Erkek	98(%97,7)	28 (%93,1)	¹ 0,299
	Kadın	1 (%2,3)	1 (%6,9)	
Yaş	50 yaşından küçük	6 (%5,8)	1 (%3,4)	² 0,061
	50-65	55 (%56,7)	11 (%34,5)	
	65 yaşından büyük	38 (%37,5)	17 (%62,1)	
Tümör Çapı	0-3 cm	12 (%12,5)	5 (%17,2)	² 0,873
	3-5 cm	28 (%27,9)	7 (%24,1)	
	5-7 cm	31 (%31,7)	8 (%27,6)	
	7 cm'den büyük	28 (%27,9)	9 (%31,1)	
Lenf Nodu Metastazı	Yok	20 (%23,1)	7 (%20,7)	³ 0,983
	Var	79 (%76,9)	22 (%79,3)	
Uzak Metastaz	Yok	82 (%81,7)	24 (%89,7)	¹ 0,405
	Var	17 (%18,3)	3 (%10,3)	
Progresyon	Yok	95 (%96,1)	28 (%93,1)	¹ 0,611
	Var	4 (%3,9)	1 (%6,9)	
T Evresi	T1	8 (%8,7)	4 (%13,8)	⁴ 0,841
	T2	11 (%11,5)	3 (%10,3)	
	T3	20 (%20,2)	5 (%17,2)	
	T4	60 (%59,6)	17 (%58,7)	
Klinik Evre	III	10 (%3,8)	1 (%3,4)	¹ 1,000
	IV	89 (%96,2)	28 (%96,6)	
Ölü yaşıyor	Ölü	90 (%92,2)	28 (%93,1)	¹ 1,000
	Yaşıyor	9 (%7,8)	1 (%6,9)	

¹Fisher's Exact Test
Exact test

²Ki-kare test

³Continuity (yates) düzeltmesi

⁴Fisher Freeman Halton

DEK rearanjmanı varlığı ile tümör çapı, yaş grupları, cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). DEK rearanjmanı 65 yaşından büyük olgularda (%62,1) daha fazla görülmekle birlikte, bu farklılık anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). DEK rearanjmanı varlığının klinikopatolojik verilerle ilişkisi Tablo 9'da özetlenmiştir.

RT-PCR BULGULARI

FISH yöntemi ile *DEK* rearranjanı tespit edilen 29 olgu ve negatif kontrol için, tümör tespit edilmemiş 10 adet büllöz akciğer dokusunda uygun primerler kullanılarak Rt-PCR yapıldı. *DEK* rearranjanı tespit edilen 29 olgunun tümünde RT-PCR yöntemi ile *DEK::AFF2* füzyonu tespit edildi.

Tablo 10. *AFF2* füzyonu varlığının klinikopatolojik verilerle ilişkisi

		Rt-PCR <i>AFF2</i> Füzyonu		P
		Yok	Var	
		n (%)	n (%)	
Cinsiyet	Erkek	98 (%97,7)	28 (%93,1)	¹ 0,299
	Kadın	1 (%2,3)	1 (%6,9)	
Yaş Kategorik	50 yaşından küçük	6 (%5,8)	1 (%3,4)	² 0,061
	50-65	55 (%56,7)	11 (%34,5)	
	65 yaşından büyük	38 (%37,5)	17 (%62,1)	
Tümör Çapı	0-3 cm	12 (%12,5)	5 (%17,2)	² 0,873
	3-5 cm	28 (%27,9)	7 (%24,1)	
	5-7 cm	31 (%31,7)	8 (%27,6)	
	7 cm'den büyük	28 (%27,9)	9 (%31,1)	
Lenf Nodu Metastazı	Yok	20 (%23,1)	7 (%20,7)	³ 0,983
	Var	79 (%76,9)	22 (%79,3)	
Uzak Metastaz	Yok	82 (%81,7)	24 (%89,7)	¹ 0,405
	Var	17 (%18,3)	3 (%10,3)	
Progresyon	Yok	95 (%96,1)	28 (%93,1)	¹ 0,611
	Var	4 (%3,9)	1 (%6,9)	
T Evresi	T1	8 (%8,7)	4 (%13,8)	⁴ 0,841
	T2	11 (%11,5)	3 (%10,3)	
	T3	20 (%20,2)	5 (%17,2)	
	T4	60 (%59,6)	17 (%58,7)	
Klinik Evre	III	10 (%3,8)	1 (%3,4)	¹ 1,000
	IV	89 (%96,2)	28 (%96,6)	
Ölü yaşıyor	Ölü	90 (%92,2)	28 (%93,1)	¹ 1,000
	Yaşıyor	9 (%7,8)	1 (%6,9)	

¹Fisher's Exact Test
Exact test

²Ki-kare test

³Continuity (yates) düzeltmesi

⁴Fisher Freeman Halton

AFF2 füzyon varlığı ile tümör çapı, yaş grupları, cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). *AFF2* füzyonu tespit edilen olgulara yönelik klinikopatolojik özellikler Tablo 10'da özetlenmiştir.

Normal akciğer dokularında da düşük oranda *DEK::AFF2* füzyonu tespit edilmiştir. Ancak D7A4 primeri, tümörlü akciğer dokularında normal akciğer dokularına göre daha fazla saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0,000118$; $p<0,05$). D7A6 primeri, tümörlü akciğer dokularında normal akciğer dokularına göre daha az saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0,009556$; $p<0,05$). D7A9 primeri, tümörlü akciğer dokularında normal akciğer dokularına göre daha az saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p: 0,055031$; $p<0,05$).

DEK REARRANJMANI VE PD-L1 EKSPRESYONU İLİŞKİSİ

Tablo 11. *DEK* rearranjmanı ile PD-L1 TPS skoru ilişkisi

	<i>DEK</i> rearranjmanı		P
	Yok	Var	
PD-L1 TPS _{n(%)}			
<1	12 (%11,5)	9 (%31)	¹ 0,010*
1-50	61 (%62,5)	18 (%62,1)	
>50	26 (%26)	2 (%6,9)	
PD-L1 IC _{Ort±SS (medyan)}	7,12±11,83 (3)	9,31±14,14 (3)	² 0,659

¹Ki-kare test

²Mann Whitney U Test

* $p<0,05$

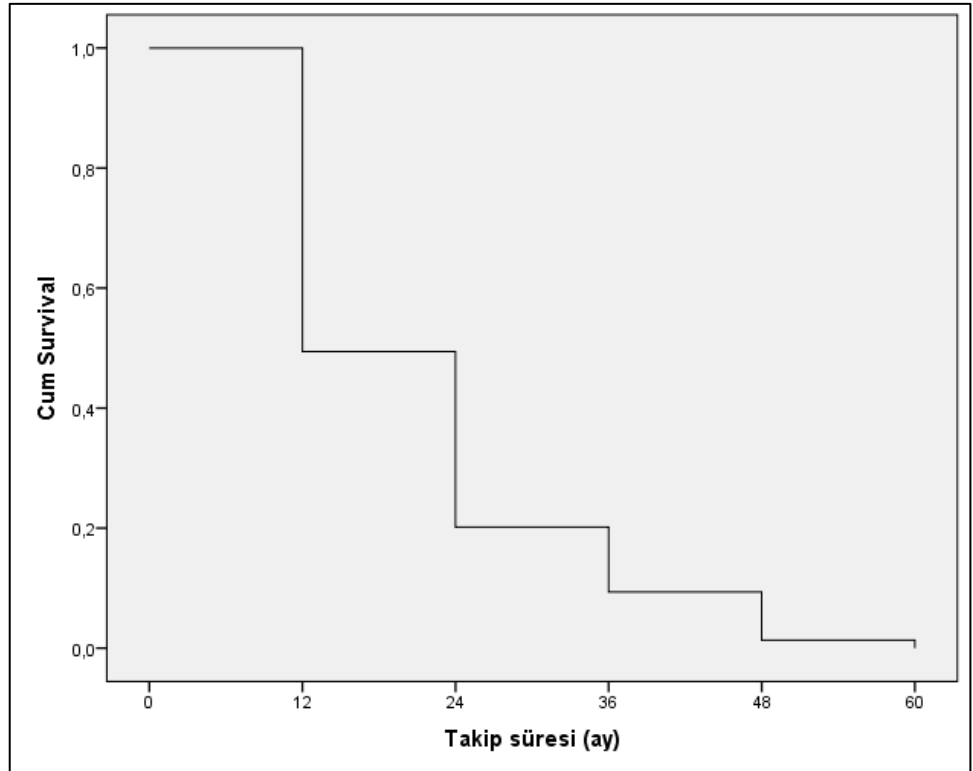
DEK rearranjmanı varlığı ile PD-L1 TPS skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı ($p:0,010$; $p<0,05$). *DEK* rearranjmanı tespit edilen 9 olguda (%31) PD-L1 ekspresyonu %1'in altında, 18 olguda (%62,1) PD-L1 ekspresyonu %1-50 arasında, 2 olguda (%6,9) PD-L1 ekspresyonu %50'nin üzerindeydi. *DEK* rearranjmanı tespit edilen olgularda PD-L1 ekspresyonunun %1'in altında olma oranı anlamlı şekilde yüksekti.

PD-L1 ekspresyonu ve *DEK* rearranmanı arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki saptandı. *DEK* rearranmanı ile PD-L1 TPS skoru ilişkisi Tablo 11’de özetlenmiştir.

DEK rearranmanı olan ve olmayan olgular arasında PD-L1 IC skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$).

SAĞKALIM ANALİZİ

Sağkalım analizine dahil olan 128 olgunun 118’i (%92,2) ex idi. En son ölüm 53. ayda görülmüş olup bu tarihteki kümülatif sağkalım oranı %0, standart hatası %0’dı. Ortalama sağkalım süresi 14.94 ± 1.07 ay, medyan süre 12 aydır.

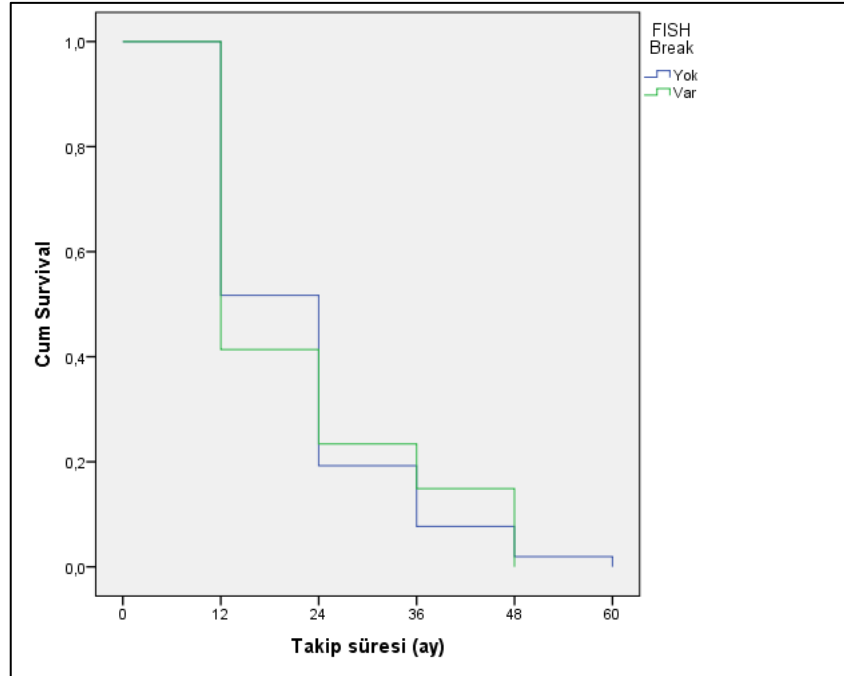


Şekil 4. Sağkalım grafiği

DEK rearranjanı olmayan olgularda mortalite görülme oranı %91.3 olup, en son ölüm 53. ayda görülmüştür. Bu tarihteki kümülatif sağkalım oranı %0, standart hatası %0'dır. Ortalama sağkalım süresi 14.83 ± 1.16 ay, medyan süre 12 aydır.

DEK rearranjanı olan olgularda mortalite görülme oranı %93.1 olup, en son ölüm 45. ayda görülmüştür. Bu tarihteki kümülatif sağkalım oranı %0, standart hatası %0'dır. Ortalama sağkalım süresi 15.40 ± 2.62 ay, medyan süre 10.6 aydır.

DEK rearranjanı olan ve olmayan olguların sağkalım oranları Log Rank test ile karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p:0.911$; $p>0.05$).



Şekil 5. *DEK* rearranjanı için Sağkalım grafiği

Tablo 12. Mortalite ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

		Ölü	Yaşiyor	p
		n (%)	n (%)	
Cinsiyet	Erkek	115 (%96,7)	9 (%90,9)	¹ 0,355
	Kadın	3 (%3,3)	1 (%9,1)	
Yaş	50 yaşından küçük	7 (%5,7)	0 (%0)	² 1,000
	50-65	60 (%51,7)	6 (%54,5)	
	65 yaşından büyük	51 (%42,6)	4 (%45,5)	
Tümör Çapı	0-3 cm	16 (%13,9)	1 (%9,1)	² 0,788
	3-5 cm	32 (%27,9)	1 (%18,2)	
	5-7 cm	36 (%29,5)	5 (%45,4)	
	7 cm'den büyük	34 (%28,7)	3 (%27,3)	
Lenf Nodu Metastazı	Yok	24 (%21,3)	3 (%36,4)	¹ 0,267
	Var	94 (%78,7)	7 (%63,6)	
Uzak Metastaz	Yok	97 (%82,8)	9 (%90,9)	¹ 0,691
	Var	21 (%17,2)	1 (%9,1)	
Progresyon	Yok	118 (%100)	4 (%45,5)	¹ 0,001*
	Var	0 (%0)	6 (%54,5)	
T Evresi I	T1	12 (%10,7)	0 (%0)	² 0,580
	T2	12 (%10,7)	2 (%18,2)	
	T3	21 (%18,9)	3 (%27,3)	
	T4	73 (%59,7)	5 (%54,5)	
Klinik Evre	III	10 (%3,3)	1 (%9,1)	¹ 0,355
	IV	108 (%96,7)	9 (%90,9)	
FISH DEK rearanjmanı var yok	Yok	91 (%77,9)	9 (%81,8)	¹ 1,000
	Var	27 (%22,1)	1 (%18,2)	
PD-L1 TPS Skoru Kategorik	<1	21 (%17,2)	0 (%0)	² 0,279
	1-50	71 (%60,7)	8 (%81,8)	
	>50	26 (%22,1)	2 (%18,2)	

¹Fisher's Exact Test²Fisher Freeman Halton Exact test

*p<0.05

Sağkalım ile tümör çapı, yaş grupları, cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, evre grupları, nüks ve sağkalım durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Sağkalım ile progresyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı ($p:0.001$; $p<0.05$). Sağ olan olguların %54,5'inde progresyon vardı. Sağkalım ile PD-L1 TPS skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$). Ölen olguların %60,7'sinde, sağ olanların %81,8'inde PD-L1 TPS skoru 1 ile 50 arasındaydı.

TARTIŞMA

Baş ve boyun bölgesinin sinonasal yüzey epiteli kaynaklı *DEK::AFF2* nonkeratinize skuamöz hücreli karsinomları, spesifik morfolojik özellikleri olan, yakın zamanda tanımlanmış ve agresif klinik davranışa sahip olmasına rağmen immünoterapiye duyarlılığı az sayıda olguda bildirilen bir karsinomdur [4, 119]. Sinonasal bölgedeki HPV-negatif nonkeratinize SCC'lerin neredeyse yarısının, 6p22.3 kromozomu üzerindeki *DEK* geni ile Xq28 kromozomu üzerindeki *AFF2* geni arasında tekrarlayan füzyonları barındırdığı gösterilmiştir[1]. Bu bilgiden yola çıkarak oluşturduğumuz çalışmamızda tümü neoadjuvan alan ileri evre akciğer skuamöz hücreli karsinomlu olgularımızın %21,8'inde *DEK* rearanjmanı saptadık. *DEK* rearanjmanı bulduğumuz tüm olgulara rt-PCR ile uygun primerler kullanarak *DEK::AFF2* füzyonunu araştırdık ve olguların tümünde *DEK::AFF2* füzyonunu gösterdik. Olgularımızın %21,8'inde %50 ve üzerinde PD-L1 ekspresyonu mevcuttu. *DEK* rearanjmanı/*DEK::AFF2* füzyonu bulunan olguların büyük kısmında immünhistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu saptamadık. Ancak *DEK* füzyonu bulunmayan hastalarda immünhistokimyasal yöntemle PD-L1 ekspresyonunu %50'nin üstünde bulduk.

Akciğer kanseri özellikle son yıllarda artan tedaviye yönelik yeni gelişmelere rağmen kanser ölümlerinin başta gelen nedenlerinden biri olmayı sürdürmektedir. İnsidans bakımından kadınlarda meme, erkeklerde ise prostat kanserinden sonra ikinci sırada gelse de, akciğer kanserinde diğer kanser türlerinden daha fazla mortalite oranı mevcuttur [120]. Bizim popülasyonumuzda en fazla 53 ay, ortalama 12 ay süre ile takip edilen hastalarımızın çoğu akciğer kanseri ve buna bağlı gelişen komplikasyonlardan dolayı ortalama 15 ayda vefat etmişti.

GLOBOCAN verilerine göre, akciğer kanseri 2020 yılında dünyada 2,2 milyon yeni olgu ile tüm kanserlerin %10'unu oluşturmaktadır. Yine 2020 yılında 1,8 milyon ölüm ile tüm kanser ölümlerinin %20'sinin sebebi akciğer kanseridir [121]. Erkeklerde akciğer kanseri insidansı ve ölüm oranı kadınlara göre dünya genelinde kabaca iki kat fazla olsa da bazı bölgelerde bu oran çok daha yüksektir. Türkiye erkek cinsiyetin kadınlara göre akciğer kanseri insidansı ve ölüm oranı en yüksek olan ülkelerin

başında gelmektedir [121]. Bizim grubumuzda da akciğer kanseri olgularının %97,7'si erkekti.

ABD'de akciğer kanseri tanısı konulan hastalarda medyan yaş 71'dir. Akciğer kanserine bağlı ölümlerin % 90 kadarı da 55 yaş üstündeki hastalardır [122]. Bizim popülasyonumuzda yaşı en küçük hasta 44, en büyük hasta yaşı 87, ortalama görülme yaşı 63'tü. Hastaların 7'si 50 yaşından küçük, 69 hasta 50-65 yaşları arasında, 57 hasta ise 65 yaşından büyüktü. Çalışma grubumuza ait yaş verileri literatür ile tutarlılık göstermekteydi.

Akciğer karsinomları temel olarak KHAK ve KHDAK olarak ikiye ayrılır. KHDAK, akciğer karsinomlarının yaklaşık %85'ini oluşturur. Tüm dünyada adenokarsinomlar %40, SCC'ler %25-30 ve büyük hücreli karsinomlar ise %10-15 dolayında görülmektedir. Daha az sıklıkta sarkomatoid karsinom, büyük hücreli nöroendokrin karsinom ve karsinoid tümör izlenmektedir [123]. Bizim çalışma grubumuzu oluşturan SCC'lerde biyolojik olarak ilgili moleküler hedeflerin daha az olması ve tümörlerin diğer akciğer tümörlerinden nispeten daha geç tespit edilmesi prognozu kötüleştirilmektedir [45]. Mediastinal bölgedeki lenf nodlarına metastaz, akciğer SCC'lerinde en yaygın metastaz yoludur. Bu durum olguların kötü prognozunda önemli bir faktördür [124]. Bizim olgularımızın %78,9'unda görüntüleme yöntemleri ile tespit edilen lenf nodu metastazı vardı.

Akciğer kanserinde beş yıllık sağkalım oranı tüm akciğer kanserlerinde yaklaşık %19, KHDAK'da ise %23'tür. Ancak sağkalım oranları evreler arasında belirgin bir farklılık göstermektedir. Lokalize tümörlerde beş yıllık sağkalım oranı %56,3, bölgesel lenf nodu metastazı yapmış tümörlerde %29,7, uzak metastaz gösteren tümörlerde ise yalnızca %4,7'dir [123]. Bizim çalışmamıza dahil edilen olguların tümü ileri evre (evre III/IV) tümörlerdir. Bununla birlikte T evresine göre beş yıllık sağkalım oranları giderek azalmaktaydı. Beş yıllık sağkalım uzak metastaz görülmeyenlerde %82,8, görülenlerde ise %17,2 bulundu.

SCC'ler genellikle ileri evrede teşhis edilir. Tedavisi evreye göre belirlenen SCC'lerde Evre 1 ve 2 tümörlerde klinik kontrendikasyon bulunmadığı takdirde rezeksiyon önerilir. İleri evre tümörlerde ise radyoterapi ve kemoterapi yanısıra özellikle son yıllarda kullanılmaya başlayan kemoimmünoterapi ile hedefe yönelik

tedavilerin umut verici sonuçlar ortaya çıkardığı görülmüştür [45, 122]. Bizim çalışma grubumuza seçtiğimiz olgularımızın hepsi neoadjuvan tedavi olarak paklitaksel ve karboplatin tedavisi alan ileri evre hastalardı.

Akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi uygulaması sonucunda klinik sonuçlarda düzelme dikkati çekmektedir. Bu nedenle karsinogenezdeki moleküler değişikliğin tanımlanması son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. KHDAK'lerin yaklaşık %10-20'sinde EGFR mutasyonu, %5'inde ALK rearranjanı, %1-2'sinde ROS1 rearranjanı, %1-2'sinde RET gen arranjmanları, %1-3'ünde ise BRAF V600E mutasyonları tanımlanmıştır [125]. Akciğerin SCC'lerinde *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *MET*, *BRAF*, *RET* ve *NTRK* genlerinde görülen sürücü mutasyonları hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri tedavide kullanılmak üzere onay almıştır. Akciğerin SCC'lerinde *EGFR* mutasyonlarının görülme sıklığının son derece nadir olduğu kanıtlanmıştır [54]. SCC'lerin %1'inde *ALK* rearanjmanı, %1-2'sinde *ROS1* rearanjmanı, %1-7'sinde *KRAS* mutasyonları tanımlanmıştır [40, 125]. Bizim olgularımızın da tamamında *EGFR* mutasyonu araştırılmış ve sonuçları negatif bulunmuştu. Tüm olguların %45.1'inde araştırılan *ALK* rearanjmanı olguların tümünde negatifti. Olguların %39.1'ine araştırılan *ROS1* rearanjmanının da tümü negatifti.

Günümüzde KHDAK'de prognozu iyileştiren bireyselleştirilmiş tedavi modelleri ön plana çıkmaktadır. KHDAK olgularında hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi tek başına ya da diğer tedavilerle kombine olarak uygulanmaktadır. İmmünoterapi için hedef bölgelerden biri PD-1/PD-L1 yolağıdır. Tedavi öncesi immünoterapi uygulanacak hasta seçimi için farklı PD-L1 antikörlerinin ekspresyonunu değerlendiren ve bu ekspresyonların ilaç kullanımı ile ilişkisini araştıran çok sayıda araştırma mevcuttur. Bu araştırmalarda PD-L1 için en yaygın kullanılan altı antikör klonu 22c3, SP142, E1L3N, 9A11, SP263 ve 28-8'dir. 22C3 (DAKO), 28-8 (DAKO) ve SP263(ROCHE Ventana) PD-L1 klonları arasında ekspresyon oranlarında ve patoloğ değerlendirmesinde uyumun yüksek olduğu gösterilmiştir [126]. Ancak bazı güncel çalışmalarda SP263 klonunun daha başarılı olduğu belirtilmektedir [104]. Biz bu çalışmada PD-L1 proteininin tespiti için membranöz boyanma yapabilen SP263 klonu kullandık. PD-L1'in immünohistokimyasal değerlendirmesi tümör içerisinde heterojenite gösterdiğinden patoloğlar için güçlük yaratmaktadır. Literatürde farklı eşik değerleri belirlenerek PD-

L1 ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da IASCL'nin 2016 yılındaki kılavuzu temel alınarak TPS skoru ile tümör hücreleri değerlendirildi. Tümör hücrelerinde kısmi ya da total membranöz boyanma yüzdesine göre tümörler 3 gruba ayrıldı. PD-L1 Skoru boyanma yoksa ya da $<1\%$ ise TPS negatif, $1-49\%$ ise düşük PD-L1 skoru, $>50\%$ ise yüksek PD-L1 skoru olarak kabul edildi. TPS skoru negatif $15,8\%$ olgu mevcuttu. Olgularımızın $62,4\%$ 'inde düşük TPS, $21,8\%$ 'inde yüksek TPS saptandı. Çalışmamızda literatürdeki birçok çalışmada da [127] olduğu gibi yaş ve PD-L1 TPS'si arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Ancak gençlerde PD-L1 ekspresyonunun daha fazla olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur [128]. Kadın ve erkek cinsiyette PD-L1 ekspresyon oranları benzerdir [129]. Bizim çalışmamızda kadın ve erkek cinsiyet arasında PD-L1 ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadık.

Li ve arkadaşlarının yaptığı 11.383 olguluk bir meta-analiz çalışmasında akciğer kanserlerinde PD-L1 ekspresyonları ile klinikopatolojik bulgular arasındaki ilişki araştırılmış, tümör boyutu 3 cm'den büyük olgularda PD-L1 ifadesinin arttığı bulunmuştur [130, 131]. Bizim çalışmamızda ise PD-L1 TPS skoru ile tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu. Bunun nedeni olgularımızın $59,4\%$ 'ünün 7 cm'in üzerindeki T4 olgulardan, $19,5\%$ 'inin 5-7 cm çaplı T3 olgulardan oluşması olabilir.

Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun ileri evre kanserlerde daha yüksek çıkması beklenen bir bulgu olsa da [132, 133] pek çok çalışmada hastalık evresi ile PD-L1 arasında ilişki saptanmamıştır [131, 132]. Bizim çalışmamızda yalnızca ileri evre olgular ele alındığı için, erken evre tümörlerdeki PD-L1 ekspresyonu ile evreler arasındaki farklılık olup olmadığı hakkında fikir yürütmek mümkün değildir.

Literatürde akciğer tümörlerinde immün hücrelerdeki boyanma varlığının prognostik önemini vurgulayan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğunluğu tümör heterojenitesini değerlendirmek için rezeksiyon materyalleri olan erken evre olgulardan oluşmaktadır. Çalışmaların bazılarında T hücreleri, bazılarında B hücreleri değerlendirilmiş ve büyük kısmında immün hücrelerdeki boyanmanın daha iyi prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır [134, 135]. Çalışmamıza dahil olan 128 olguda immün hücre boyanma yüzdeleri ile sağkalım açısından anlamlı bir farklılık

bulamadık. Akciğer karsinomlarında immün hücrelerdeki boyanmanın klinikopatolojik ve prognostik önemini daha iyi anlayabilmek için dinamik bir süreç olan tümör mikroçevresinin daha iyi aydınlatıldığı, komponentlerin tespit edildiği ve birbiriyle etkileşimlerinin değerlendirildiği çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KHDAK'de tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu yüksek olan hastalarda prognozun daha kötü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma literatürde mevcuttur [136, 137]. Çalışmamızda sağkalım analizinde PD-L1 yüksek ve düşük olan gruplar arasında yaşam süreleri açısından fark saptamadık.

Akciğerin SCC'lerinde birinci basamak kemoterapiden sonra ikinci basamak tedavide verilen PD-1'e karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikor olan nivolumabın genel sağkalımda yüksek etkinliği ortaya konmuştur [138]. SCC'lerde PD-L1 ekspresyonu yüksek olan hastalarda immünoterapinin, skuamöz olmayan histolojilere kıyasla daha iyi ve uzun süreli yanıtlar sağladığı bulunmuştur [45]. Okita ve ark tarafından akciğerde tümörü olan 91 olguya yapılan çalışmada, SCC histolojisine sahip tümörlerde PD-L1 ekspresyonunun daha fazla olduğu anlamlı şekilde bulunmuştur [137].

Akciğer SCC'lerinde karmaşık tümör genomisinin varlığı, onkogenik yolların etkileşimindeki bilginin sınırlı olması ve ilaç geliştirmek için yapılan deneylerin azlığı nedeniyle tedavi adenokarsinomlardan daha zordur. Bu tümörlerdeki yüksek mortalite göz önüne alındığında, SCC'lere karşı yeni tedavilerin geliştirilmesi elzem görünmektedir [139]. *DEK* geni, birçok kanserde bildirilen potansiyel bir biyobelirteç ve onkogendir. DEK proteini ilk olarak akut myeloid lösemi hastalarında görülen 6. ve 9. kromozomlar arası translokasyon sonucunda NUP214 (*CAN*) proteini ile füzyon halinde tanımlanmıştır [111]. Son zamanlarda ise bu genin, meme kanseri, malign melanom, akut miyeloid lösemi, retinoblastoma, glioblastoma, hepatoselüler karsinom ve baş boyun SCC'si dahil olmak üzere birçok kanserde upregüle edildiği bulunmuştur [3].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Baş ve Boyun Tümörleri Sınıflandırmasının son beşinci baskısında, ileri moleküler testlerin bir sonucu olarak sinonazal epitelden gelişen nonkeratinize skuamöz hücreli karsinomların yeni bir alt tipi olarak *DEK::AFF2* füzyon karsinomu tanımlanmıştır [4]. *AFF2* geni, X kromozomunun

(Xq28) uzun kolunda yer alan X'e bağılı bir gendir. AFF2 proteini, transkripsiyon aktivatörü olarak işlev gören bir RNA bağlayıcı proteindir. AFF2 yeniden düzenlemeleri birçok malign neoplazi ile ilişkilidir [4]. *DEK::AFF2* füzyonunun onkogenik mekanizması hala bilinmemektedir ve daha fazla araştırma gerektirmektedir. *DEK::AFF2* karsinomlarının baş ve boyun bölgelerine özel olmayan ancak üst ve alt solunum yollarını ve muhtemelen diğer bölgeleri de içerebilen bir tümör ailesini temsil ettiğini gösteren literatürde sınırlı çalışma bulunmaktadır [140].

Laforga ve ark yaptığı bir olgu sunumunda 53 yaşında bir kadın hastada sol konka büllozada tümör tespit edilmiştir. Hastanın klinik öyküsünde yaklaşık 20 sene önce aynı bölgeden bir tümör eksizyonu yapıldığı ve epitelyal/miyoepitelyal karsinom tanısı aldığı öğrenilmiştir. Lezyon eksize edilmiştir. Histopatolojik incelemede papiller yapraklar şeklinde ekzofitik ve endofitik büyüme gösteren tümöral proliferasyon izlenmiştir. Tümör hücreleri, fokal periferik palizadlanma gösteren bazaloid morfolojide izlenmiştir. Çok sayıda mitotik figür ve komedonekroz izlenmiştir. FISH yöntemi ile *DEK* rearranjmanı, immünohistokimyasal olarak AFF2 tespit edilmiştir. Böylece olgu *DEK::AFF2* nonkeratinize SCC tanısı almıştır. [141]. Rooper ve ark yaptığı sinonasal bölge yerleşimli 13 vakalık bir çalışmada *DEK::AFF2* füzyonu gösteren tümörlerde benzer histopatolojik özellikler izlemiştir. Vakaların çoğu, morfolojik olarak geniş papiller yapraklar şeklinde anastomoz yapan lobüller, solid alanlar içeren karmaşık ekzofitik ve endofitik büyüme gösteren tümörlerdir. Tümör hücreleri, çoğu durumda bazaloid; yer yer amfofilik, eozinofilik ve hatta fokal olarak berrak sitoplazmaya sahiptir. Vakaların 9'unda tamamen keratinizasyon görülmezken, 4'ünde en azından fokal, tümör hacminin %10'u kadar bir alanda iyi gelişmiş keratinizasyon ve kompakt keratin incileri izlenmiş, mitotik oran genel olarak düşük bulunmuş, nekroz izlenmemiştir. Tümörü nötrofillerin belirgin bir şekilde infiltre ettiği saptanmıştır [114]. Bizim olgularımızın tümü küçük biyopsilerden tanı alan ileri evre olgular olduğu için histopatolojik patern analizi yapmak mümkün olmamıştır. Ancak *DEK* rearranjmanı saptanan 1 olgumuzda tümörün belirgin papiller özellik gösterdiği dikkat çekmektedir.

DEK::AFF2 füzyonlu karsinomların agresif maligniteler olduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir [114]. Sinonazal SCC'de bölgesel lenf nodu metastazı oldukça nadir olmakla birlikte, *DEK::AFF2* karsinomların ortalama %33'ünde tanı

anında lenf nodu metastazı izlenmiştir [142]. Tümörler sinonazal sistem, orta kulak ve temporal kemik dahil olmak üzere baş ve boyunda birçok bölgede görülebilir. Bu tümör agresif davranır, sıklıkla tekrarlar, lenf nodu metastazı veya uzak metastaz yapar [4]. Sinonazal bölge ve kafa tabanı boyunca yer alan tümörlerin ayırıcı tanısında *DEK::AFF2* karsinomları dikkate alınmalıdır [114]. Joanna ve ark restrospektif olarak yaptığı çalışmada arşivdeki sinonazal papillom tanısı alan vakalar taranmıştır. Nüks görülen 43 hasta çalışmaya alınmış, olgular *AFF2* poliklonal antikoru (Sigma, HPA003139, Ventana) ile boyanmıştır. Herhangi bir düzeydeki nükleer boyanmaya sahip hastalarda FISH yöntemi ile *DEK* rearranjmanı, eşik değer olarak %20 kabul edilerek araştırılmıştır. İki hastada *DEK::AFF2* füzyonu tespit edilmiştir [143].

DEK geni ile ilgili akciğer kanserlerinde çok az sayıda çalışma mevcuttur. Yang ve ark A549 and H1299 hücre dizinleri ile yaptığı çalışmada *DEK*'in akciğer kanserlerinin patogenezindeki rolünü aydınlatmayı amaçlanmıştır. Normal akciğer dokularında ve akciğer kanserindeki *DEK* ekspresyonu, *DEK* ekspresyonu ile prognoz ilişkisi Kanser Genom Atlası verileri kullanılarak araştırılmıştır. *DEK* ekspresyonu akciğer kanserli hücre dizinlerinde normal akciğer dokularına göre daha yüksek bulunmuştur. *DEK* ifadesinin, Wnt sinyal yolunu ve EMT sürecini aktive ettiğini ve akciğer kanserlerinin proliferasyon ve invazyonunu uyardığını bulmuşlardır. Yüksek *DEK* ekspresyonu, akciğer adenokarsinomlarında kötü prognozu göstermiştir. Elde edilen veriler, akciğer adenokarsinomlarında ve akciğer SCC'lerinde *DEK* ekspresyon seviyesinin normal akciğer dokularındakinden anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. *DEK* ekspresyonu artan akciğer adenokarsinomlu hastalarda genel sağkalım anlamlı derecede kısa bulunmuştur. Ancak bu bulgu SCC hastalarının sağkalımı ile korele değildir [3].

Wang ve ark 112 KHDAK vakasında immünohistokimyasal olarak *DEK* tavşan poliklonal antikoru (1:200 seyreltme; Proteintech, Chicago, IL) kullanarak araştırmıştır. Tümör hücrelerinde nükleer boyanma tespit edilmiştir. Akciğer SCC'lerinde *DEK* ekspresyonu vakalarının %47,9'unda (23/48) tespit edilmiştir. Akciğer adenokarsinomunda *DEK* ekspresyonu vakaların %67,2'sinde (43/64) saptanmıştır. Akciğer adenokarsinomunda tespit edilen *DEK* ekspresyonu, SCC'deki *DEK* ekspresyonuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Düşük *DEK* ekspresyonuna sahip hastaların, yüksek *DEK* ekspresyonuna sahip

hastalarla karşılaştırıldığında genel sağkalımının daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir [117].

Zhou ve ark 81 olguda yaptığı çalışmada akciğer kanserli dokularda ve kanserli olmayan akciğer dokularında immünohistokimyasal olarak DEK protein ekspresyonu (seyreltme 1:300; ProteinTech Group, Inc., Chicago, IL, ABD) varlığını araştırmışlar . Seksen bir akciğer kanserli olgunun %50'sinden fazlasında immünohistokimyasal yöntemle DEK proteini ile boyanma görülmüştür; bu normal dokulardakilerden önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Ancak DEK proteininin güçlü pozitif boyanması ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır [144].

Wang ve ark 130 KHAK'si olan olgularda yaptığı çalışmada DEK proteini immünohistokimyasal yöntemle (1:50; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, ABD) tespit edilmiştir. DEK pozitifliği KHAK'de tümör içermeyen normal akciğer dokularıyla karşılaştırıldığında güçlü bir şekilde pozitif ve anlamlı derecede yüksek (%44,62) olduğunu saptanmıştır. İleri evre grupta, DEK ekspresyonu yüksek olan hastaların 5 yıllık sağkalım oranları, DEK ekspresyonu düşük olanlara göre anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur [145].

2022 yılında Savari ve ark yaptığı bir olgu sunumunda ise akciğerde ilk defa *DEK::AFF2* füzyonu içeren SCC tanımlanmıştır. 26 yaşında kadın hastada santral yerleşimli 5.2 cm çapında tümör tespit edilmiştir. Tümör, yoğun fibrotik stromaya sahip, anastomoz yapan kalın trabeküller ve fokal periferik palizadlı yuvalar halinde dizilen hücrelerle bazaloid görünümde izlenmiştir. RNA bazlı yeni nesil sekanslama yöntemi ile ekson 7 (NM_003472) yerleşimli DEK'in ile ekson 9 (NM_002025) yerleşimli AFF2'nin *DEK::AFF2* füzyonunu tespit etmişler [140]. Bizim çalışmamızda da akciğer SCC'lerinde D7A4 füzyonu, normal akciğer dokularına göre daha fazla saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Bishop ve ark yaptığı çalışmada baş boyun bölgesinde SCC tanısı alan 3 *DEK::AFF2*'li olgu tespit edilmiştir. Bu olgulardan birinde tümör kafa tabanı yerleşimliydi ve bu olgu anti-PDL1 tedavisine son derece iyi yanıt verdiği görülmüştür. Diğer bir vaka ise orta kulak yerleşimliydi ancak akciğere metastazı tespit edilmiştir. Bu olgu ise radyoterapiye dramatik bir yanıt vermiştir. 3. Olgu ise

burun boşluğu yerleşimliydi. Rezeksiyondan sonra sisplatin/5FU ile induksiyon kemoterapisine mükemmel yanıt vermiştir [146]. Miller ve ark yaptığı çalışmada baş boyun bölgesinde *DEK::AFF2* füzyonu tespit edilen hastalardan biri anti-PDL1 tedavisine son derece iyi yanıt verdiği için, bu füzyonun immünoterapiye verilen terapötik yanıtın biyolojik belirteci olup olmadığını belirlenmesi aktif bir araştırma alanı olduğu düşünülmüştür [2].

Bizim çalışmamızda FISH yöntemi ile *DEK* rearanjmanı popülasyonumuzun %21.8'inde saptandı. *DEK* geni ile immünoterapi arasındaki ilişkiyi de değerlendirdiğimizde *DEK* rearanjmanı varlığı ile PD-L1 TPS skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı ($p:0.010$; $p<0.05$). *DEK* rearanjmanı olan olgularda PD-L1 TPS skorunun 1'in altında olma oranı (%31), *DEK* rearanjmanı olmayan olgulardan (%11.5) anlamlı şekilde yüksekti.

Bizim çalışmamızda yaşayan 9 olguda *DEK* rearanjmanı tespit edilmemiştir. Ancak bu olgularda PD-L1 ekspresyonu %50'nin üzerindedir. Bu hastalar SCC tanısından sonra 2 kür paklitaksel+karboplatin kemoterapisini aldıktan sonra PD-L1 inhibitörü tedavisine devam etmektedir. Yaşayan 1 hastamız da ise *DEK* rearanjmanı tespit edilmiştir. Bu hastamızda da PD-L1 ekspresyonu %15'tir. Olgu, 18. kür PD-L1 inhibitörü tedavisini alırken primer mide adenokarsinomu tanısı almış ve tedavi değişikliğine gidilmiştir.

Biz bu çalışmada *DEK* rearanjmanı/*DEK::AFF2* füzyonunun akciğerin ileri evre SCC'lerinde tekrarlanan gen değişikliklerinden biri olduğunu gösterdik. *DEK* rearanjmanı/*DEK::AFF2* füzyonunun akciğer SCC'lerinin bir kısmının patogeneğinde yeri olduğunu ispatladık. Ayrıca PD-L1 negatif olgularda *DEK* rearanjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonunun daha fazla görüldüğünü bulduk. Daha önce bu iki parametre akciğerin skuamöz hücreli karsinom olgularında hiç karşılaştırılmamış olduğu için bizim çalışmamız literatürde bir ilk olacaktır. Bulgularımızın daha geniş serilerle yapılan çalışmalarla desteklenmesi gerektiğine inanmaktayız.

SONUÇLAR

Biz bu çalışmada akciğerin ileri evre SCC'lerinde FISH ile *DEK* rearranjmanının sıklığını saptamak, rt-PCR ile *DEK::AFF2* füzyonlu olguları belirlemek, bu gen değişikliğinin prognoza etkisini, PD-L1 pozitifliği ve immünoterapi yanıtı ile ilişkisini araştırmayı planladık.

Çalışmaya alınan olgularımızın tümünde immünohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu değerlendirildi. Olgularımızın %15,8'inde boyanma görülmedi. Olgularımızın %62,4'inde %1-50 arasında membranöz boyanma, %21,8'inde %50'nin üzerinde membranöz boyanma saptandı. FISH yöntemi ile araştırmaya alınan tüm olgularımızın %21,8'inde *DEK* rearranjmanı tespit edildi. *DEK* rearranjmanı saptanan 29 olguya uygun primerler kullanarak rt-PCR testi uygulandı. Yirmi dokuz olgunun tümünde *DEK::AFF2* füzyonu tespit edildi. Kontrol olarak kullandığımız normal akciğer dokularında düşük oranda *DEK::AFF2* füzyonu tespit edildi. D7A4 primeri, tümörlü akciğer dokularında normal akciğer dokularına göre daha fazla saptandı. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0,000118; p<0.05). D7A6 primeri, tümörlü akciğer dokularında normal akciğer dokularına göre daha az saptandı. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0,009556; p<0.05). Ancak D7A9 primeri, tümörlü akciğer dokularında normal akciğer dokularına göre daha az saptandı. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p: 0,055031; p<0.05). Bizim popülasyonumuz akciğerin ileri evre skuamöz hücreli karsinomlarında *DEK::AFF2* füzyonunu değerlendirmek için D7A4 primeri ve D7A6 primerinin daha değerli olduğunu gösterdi.

DEK rearranjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonu tespit edilen olgularda PD-L1 ekspresyonunun %1'in altında olma oranı anlamlı şekilde yüksekti (p:0.010; p<0.05). PD-L1 ekspresyonu ve *DEK* rearranjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki saptandı. Sonuç olarak *DEK* rearranjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonu bulunmayan hastalarda immünohistokimyasal yöntemle PD-L1 ekspresyonunu %50'nin üstünde bulduk. Bulgularımızın immünoterapi verilecek hastaların seçiminde yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Biz bu çalışmada *DEK* rearranjmanı/*DEK::AFF2* füzyonunun akciğer SCC'lerinin bir kısmının patogeneine katkı sağlayan tekrarlanan gen değişikliklerinden biri olduğunu gösterdik. PD-L1 negatif olgularda *DEK* rearranjmanı/ *DEK::AFF2* füzyonunun daha fazla görüldüğünü bulduk. Bulgularımızın daha geniş serilerle yapılan çalışmalarla desteklenmesi gerektiğine inanmaktayız.

KAYNAKÇA

1. Author AB, A.C., Author EF, et al. Title of the section. , *WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours [Internet]*. International Agency for Research on Cancer; 2021. , 2021. **WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 5.**
2. Miller, D.L., et al., *Unclassified Neuroendocrine Tumor with a Novel CHD4::AFF2 Fusion: Expanding the Family of AFF2-Rearranged Head and Neck Malignancies*. *Head Neck Pathol*, 2022. **16**(3): p. 928-933.
3. Yang, M.Q., et al., *DEK promotes the proliferation and invasion of lung cancers and indicates poor prognosis in lung adenocarcinomas*. *Oncol Rep*, 2020. **43**(4): p. 1338-1348.
4. Ruangritchankul, K. and A. Sandison, *DEK::AFF2 Fusion Carcinomas of Head and Neck*. *Adv Anat Pathol*, 2023. **30**(2): p. 86-94.
5. Yu, H., et al., *PD-L1 Expression in Lung Cancer*. *J Thorac Oncol*, 2016. **11**(7): p. 964-75.
6. Takada, K., et al., *The expression of PD-L1 protein as a prognostic factor in lung squamous cell carcinoma*. *Lung Cancer*, 2017. **104**: p. 7-15.
7. Ishida, K., et al., *Role of the DEK oncogene in the development of squamous cell carcinoma*. *Int J Clin Oncol*, 2020. **25**(9): p. 1563-1569.
8. Liu, X., et al., *Significance of DEK overexpression for the prognostic evaluation of non-small cell lung carcinoma*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(1): p. 155-62.
9. Friedlaender, A., et al., *Next Generation Sequencing and Genetic Alterations in Squamous Cell Lung Carcinoma: Where Are We Today?* *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 166.
10. Bade, B.C. and C.S. Dela Cruz, *Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention*. *Clin Chest Med*, 2020. **41**(1): p. 1-24.
11. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA Cancer J Clin*, 2021. **71**(3): p. 209-249.
12. Özsu, S. and T.J.G.G.H.S. Özlü, *Türkiye’de akciğer kanseri epidemiyolojisi*. 2013. **1**(3): p. 7-11.
13. Müdürlüğü, T.C.S.B.H.S.G., *2016 Türkiye Kanser İstatistikler*. 2019.
14. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.

15. Hackshaw, A.K., *Lung cancer and passive smoking*. Stat Methods Med Res, 1998. **7**(2): p. 119-36.
16. Berthiller, J., et al., *Cannabis smoking and risk of lung cancer in men: a pooled analysis of three studies in Maghreb*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(12): p. 1398-403.
17. Devesa, S.S., et al., *International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising*. Int J Cancer, 2005. **117**(2): p. 294-9.
18. Singh, N., et al., *Inflammation and cancer*. Ann Afr Med, 2019. **18**(3): p. 121-126.
19. Markowitz, S.B., et al., *Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer. New findings from the North American insulator cohort*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(1): p. 90-6.
20. Roscoe, R.J., et al., *Mortality among Navajo uranium miners*. Am J Public Health, 1995. **85**(4): p. 535-40.
21. Krewski, D., et al., *A combined analysis of North American case-control studies of residential radon and lung cancer*. J Toxicol Environ Health A, 2006. **69**(7): p. 533-97.
22. Alberg, A.J., et al., *Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. Chest, 2013. **143**(5 Suppl): p. e1S-e29S.
23. Weibel, E.R., *What makes a good lung?* Swiss Med Wkly, 2009. **139**(27-28): p. 375-86.
24. Gridelli, C., et al., *Non-small-cell lung cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15009.
25. Nicholson, A.G., et al., *The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015*. J Thorac Oncol, 2022. **17**(3): p. 362-387.
26. Nicholson, A.G., et al., *Reproducibility of the WHO/IASLC grading system for pre-invasive squamous lesions of the bronchus: a study of inter-observer and intra-observer variation*. Histopathology, 2001. **38**(3): p. 202-8.
27. Wistuba, II, et al., *Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma*. Oncogene, 1999. **18**(3): p. 643-50.
28. Sousa, V., et al., *EGFR/erB-1, HER2/erB-2, CK7, LP34, Ki67 and P53 expression in preneoplastic lesions of bronchial epithelium: an immunohistochemical and genetic study*. Virchows Arch, 2011. **458**(5): p. 571-81.

29. Wistuba, II, et al., *Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(18): p. 1366-73.
30. Zhang, Y., et al., *Genome analyses identify the genetic modification of lung cancer subtypes*. Semin Cancer Biol, 2017. **42**: p. 20-30.
31. Sands, J.M., et al., *Next-generation sequencing informs diagnosis and identifies unexpected therapeutic targets in lung squamous cell carcinomas*. Lung Cancer, 2020. **140**: p. 35-41.
32. *Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. Nature, 2012. **489**(7417): p. 519-25.
33. Kim, Y., et al., *Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients*. J Clin Oncol, 2014. **32**(2): p. 121-8.
34. Zhang, J., et al., *Translating the therapeutic potential of AZD4547 in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer through the use of patient-derived tumor xenograft models*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(24): p. 6658-67.
35. Postmus, P.E., et al., *Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2017. **28**(suppl_4): p. iv1-iv21.
36. Selamat, S.A., et al., *Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression*. Genome Res, 2012. **22**(7): p. 1197-211.
37. Franklin, W.A., et al., *Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2133-7.
38. Mao, L., et al., *Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(12): p. 857-62.
39. Usuda, K., et al., *Relation between bronchoscopic findings and tumor size of roentgenographically occult bronchogenic squamous cell carcinoma*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1993. **106**(6): p. 1098-103.
40. Keith, R.L., et al., *Angiogenic squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1616-25.
41. Shibuya, K., et al., *High magnification bronchovideoscopy combined with narrow band imaging could detect capillary loops of angiogenic squamous dysplasia in heavy smokers at high risk for lung cancer*. Thorax, 2003. **58**(11): p. 989-95.
42. Teixeira, V.H., et al., *Deciphering the genomic, epigenomic, and transcriptomic landscapes of pre-invasive lung cancer lesions*. Nat Med, 2019. **25**(3): p. 517-525.

43. Krinsky, W., et al., *The changing anatomic position of squamous cell carcinoma of the lung - a new conundrum*. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2016. **6**(6): p. 332-99.
44. Molina, J.R., et al., *Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(5): p. 584-94.
45. Sabbula, B.R., et al., *Squamous Cell Lung Cancer*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) with ineligible companies. Disclosure: David Gasalberti declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Shiva Kumar Mukkamalla declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Fatima Anjum declares no relevant financial relationships with ineligible companies.

46. Rossi, G., et al., *Subtyping non-small cell lung cancer: relevant issues and operative recommendations for the best pathology practice*. Int J Surg Pathol, 2013. **21**(4): p. 326-36.
47. Yatabe, Y., et al., *Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2019. **14**(3): p. 377-407.
48. Chang, Y.L., et al., *New aspects in clinicopathologic and oncogene studies of 23 pulmonary lymphoepithelioma-like carcinomas*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(6): p. 715-23.
49. Yeh, Y.C., et al., *Epstein-Barr Virus-Associated Pulmonary Carcinoma: Proposing an Alternative Term and Expanding the Histologic Spectrum of Lymphoepithelioma-like Carcinoma of the Lung*. Am J Surg Pathol, 2019. **43**(2): p. 211-219.
50. Liang, Y., et al., *Primary pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma: fifty-two patients with long-term follow-up*. Cancer, 2012. **118**(19): p. 4748-58.
51. Travis, W.D., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Coding T Categories for Subsolid Nodules and Assessment of Tumor Size in Part-Solid Tumors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(8): p. 1204-1223.
52. Rami-Porta, R., et al., *Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(2): p. 138-155.
53. Cagle, P.T. and L.R. Chirieac, *Advances in treatment of lung cancer with targeted therapy*. Arch Pathol Lab Med, 2012. **136**(5): p. 504-9.

54. Hata, A., et al., *How sensitive are epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors for squamous cell carcinoma of the lung harboring EGFR gene-sensitive mutations?* J Thorac Oncol, 2013. **8**(1): p. 89-95.
55. Villalobos, P. and Wistuba, II, *Lung Cancer Biomarkers*. Hematol Oncol Clin North Am, 2017. **31**(1): p. 13-29.
56. da Cunha Santos, G., F.A. Shepherd, and M.S. Tsao, *EGFR mutations and lung cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 49-69.
57. Camidge, D.R., W. Pao, and L.V. Sequist, *Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(8): p. 473-81.
58. Hallberg, B. and R.H. Palmer, *The role of the ALK receptor in cancer biology*. Ann Oncol, 2016. **27 Suppl 3**: p. iii4-iii15.
59. Zhao, W., et al., *ALK, ROS1 and RET rearrangements in lung squamous cell carcinoma are very rare*. Lung Cancer, 2016. **94**: p. 22-7.
60. Koivunen, J.P., et al., *EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4275-83.
61. Seegobin, K., et al., *Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer With Actionable Mutations Other Than EGFR*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 750657.
62. Kwak, E.L., et al., *Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(18): p. 1693-703.
63. Dong, J., et al., *Advances in Targeted Therapy and Immunotherapy for Non-small Cell Lung Cancer Based on Accurate Molecular Typing*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 230.
64. Hirsch, F.R., et al., *Lung cancer: current therapies and new targeted treatments*. Lancet, 2017. **389**(10066): p. 299-311.
65. Korpanty, G.J., et al., *Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 204.
66. Bergethon, K., et al., *ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers*. J Clin Oncol, 2012. **30**(8): p. 863-70.
67. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(21): p. 1963-71.
68. Acker, F., et al., *KRAS Mutations in Squamous Cell Carcinomas of the Lung*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 788084.
69. Ferrer, I., et al., *KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy*. Lung Cancer, 2018. **124**: p. 53-64.

70. Mathiot, L., et al., *HRAS Q61L Mutation as a Possible Target for Non-Small Cell Lung Cancer: Case Series and Review of Literature*. *Curr Oncol*, 2022. **29**(5): p. 3748-3758.
71. Shigematsu, H., et al., *Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas*. *Cancer Res*, 2005. **65**(5): p. 1642-6.
72. Gao, Y., et al., *Clinical benefit from afatinib in an advanced squamous cell lung carcinoma patient harboring HER2 S310Y mutation: a case report*. *Onco Targets Ther*, 2018. **11**: p. 8705-8710.
73. Pao, W. and N. Girard, *New driver mutations in non-small-cell lung cancer*. *Lancet Oncol*, 2011. **12**(2): p. 175-80.
74. Paik, P.K., et al., *Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(15): p. 2046-51.
75. Kohno, T., et al., *KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma*. *Nat Med*, 2012. **18**(3): p. 375-7.
76. Lipson, D., et al., *Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies*. *Nat Med*, 2012. **18**(3): p. 382-4.
77. Ju, Y.S., et al., *A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing*. *Genome Res*, 2012. **22**(3): p. 436-45.
78. Wang, R., et al., *RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(35): p. 4352-9.
79. Minuti, G., A. D'Incecco, and F. Cappuzzo, *Targeted therapy for NSCLC with driver mutations*. *Expert Opin Biol Ther*, 2013. **13**(10): p. 1401-12.
80. Drilon, A., et al., *Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2020. **383**(9): p. 813-824.
81. Gainor, J.F., et al., *Pralsetinib for RET fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study*. *Lancet Oncol*, 2021. **22**(7): p. 959-969.
82. Papadimitrakopoulou, V., *Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2012. **7**(8): p. 1315-26.
83. Yamamoto, H., et al., *PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers*. *Cancer Res*, 2008. **68**(17): p. 6913-21.
84. Maulik, G., et al., *Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer*. *J Cell Mol Med*, 2002. **6**(4): p. 539-53.

85. de Sousa, V.M.L. and L. Carvalho, *Heterogeneity in Lung Cancer*. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 96-107.
86. Suzuki, H.I., et al., *MicroRNA regulons in tumor microenvironment*. Oncogene, 2015. **34**(24): p. 3085-94.
87. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
88. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
89. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.
90. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Basic immunology : functions and disorders of the immune system / Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman ; illustrated by David L. Baker and Alexandra Baker*.
91. He, J., et al., *Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13110.
92. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
93. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
94. Postow, M.A., M.K. Callahan, and J.D. Wolchok, *Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy*. J Clin Oncol, 2015. **33**(17): p. 1974-82.
95. de Mello, R.A., et al., *Potential role of immunotherapy in advanced non-small-cell lung cancer*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 21-30.
96. Marino, M., P. Visca, and M. Ottaviano, *PD-L1 Testing in Lung Cancer: An International Pathologist's Initiative in an Unknown "Middle Earth"*. J Thorac Oncol, 2018. **13**(9): p. 1239-1241.
97. Sholl, L.M., *Biomarkers of response to checkpoint inhibitors beyond PD-L1 in lung cancer*. Mod Pathol, 2022. **35**(Suppl 1): p. 66-74.
98. Chen, Y., et al., *Genetic alteration and PD-L1 expression profiles of Chinese patients with lung squamous cell carcinoma*. Pathol Res Pract, 2022. **231**: p. 153761.
99. Lantuejoul, S., et al., *PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee*. J Thorac Oncol, 2020. **15**(4): p. 499-519.

100. Yuan, J., et al., *Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy*. J Immunother Cancer, 2016. **4**: p. 3.
101. Lozano, M.D., A. Argueta, and C. de Andrea, *Immunotherapy and lung cytopathology: Overview and possibilities*. Cytopathology, 2023.
102. Dr. Nalan Akyürek, D.D.N., Dr. Büge Öz, Dr. Serpil Dizbay Sak, *Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri İçin Moleküler Testler Tanı Rehberi* 2021.
103. Tsao, M.S., et al., *PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project*. J Thorac Oncol, 2018. **13**(9): p. 1302-1311.
104. Hendry, S., et al., *Comparison of Four PD-L1 Immunohistochemical Assays in Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2018. **13**(3): p. 367-376.
105. Park, S.G., et al., *Expression of Three Clones of PD-L1 in Lung Cancer: A Single-center Experience*. In Vivo, 2023. **37**(1): p. 233-241.
106. Gosney, J.R., M.D. Peake, and K.M. Kerr, *Improving practice in PD-L1 testing of non-small cell lung cancer in the UK: current problems and potential solutions*. J Clin Pathol, 2023.
107. Waldmann, T., et al., *The DEK protein--an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin*. Gene, 2004. **343**(1): p. 1-9.
108. Waldmann, T., et al., *Structure-specific binding of the proto-oncogene protein DEK to DNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(23): p. 7003-10.
109. Sitwala, K.V., K. Adams, and D.M. Markovitz, *YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter*. Oncogene, 2002. **21**(57): p. 8862-70.
110. Riveiro-Falkenbach, E. and M.S. Soengas, *Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(11): p. 2932-8.
111. Chen, Z., et al., *Nuclear DEK preserves hematopoietic stem cells potential via NCoR1/HDAC3-Akt1/2-mTOR axis*. J Exp Med, 2021. **218**(5).
112. Pease, N.A., T. Wise-Draper, and L. Privette Vinnedge, *Dissecting the Potential Interplay of DEK Functions in Inflammation and Cancer*. J Oncol, 2015. **2015**: p. 106517.
113. Matrkka, M.C., et al., *Overexpression of the human DEK oncogene reprograms cellular metabolism and promotes glycolysis*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0177952.
114. Rooper, L.M., et al., *DEK-AFF2 Carcinoma of the Sinonasal Region and Skull Base: Detailed Clinicopathologic Characterization of a Distinctive Entity*. Am J Surg Pathol, 2021. **45**(12): p. 1682-1693.

115. Kuo, Y.J., et al., *Nuclear expression of AFF2 C-terminus is a sensitive and specific ancillary marker for DEK::AFF2 carcinoma of the sinonasal tract*. *Mod Pathol*, 2022. **35**(11): p. 1587-1595.
116. Kuo, Y.J., et al., *DEK-AFF2 fusion-associated papillary squamous cell carcinoma of the sinonasal tract: clinicopathologic characterization of seven cases with deceptively bland morphology*. *Mod Pathol*, 2021. **34**(10): p. 1820-1830.
117. Wang, J., et al., *DEK depletion negatively regulates Rho/ROCK/MLC pathway in non-small cell lung cancer*. *J Histochem Cytochem*, 2013. **61**(7): p. 510-21.
118. Hechtman, J.F., *NTRK insights: best practices for pathologists*. *Mod Pathol*, 2022. **35**(3): p. 298-305.
119. *WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021 [cited YYYY Mmm D]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 5). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/35>. 2021.*
120. Oliver, A.L., *Lung Cancer: Epidemiology and Screening*. *Surg Clin North Am*, 2022. **102**(3): p. 335-344.
121. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020*. *CA Cancer J Clin*, 2020. **70**(1): p. 7-30.
122. Duma, N., R. Santana-Davila, and J.R. Molina, *Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment*. *Mayo Clin Proc*, 2019. **94**(8): p. 1623-1640.
123. Schabath, M.B. and M.L. Cote, *Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019. **28**(10): p. 1563-1579.
124. Li, G., et al., *Prediction of lymph node metastasis of lung squamous cell carcinoma by machine learning algorithm classifiers*. *J Cancer Res Ther*, 2023. **19**(6): p. 1533-1543.
125. Alexander, M., S.Y. Kim, and H. Cheng, *Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer*. *Lung*, 2020. **198**(6): p. 897-907.
126. Hirsch, F.R., et al., *PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project*. *J Thorac Oncol*, 2017. **12**(2): p. 208-222.
127. Jain, E., et al., *PD-L1 expression and its clinicopathologic and genomic correlation in the non-small cell lung carcinoma patients: An Indian perspective*. *Pathol Res Pract*, 2021. **228**: p. 153497.
128. Cooper, W.A., et al., *PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma*. *Lung Cancer*, 2015. **89**(2): p. 181-8.

129. Jin, Y., et al., *Correlation between PD-L1 expression and clinicopathological characteristics of non-small cell lung cancer: A real-world study of a large Chinese cohort.* J Thorac Dis, 2019. **11**(11): p. 4591-4601.
130. Li, H., et al., *The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression assessed by immunohistochemistry in lung cancer: a meta-analysis of 50 studies with 11,383 patients.* Transl Lung Cancer Res, 2019. **8**(4): p. 429-449.
131. Zhang, M., et al., *PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10255.
132. Chen, Y.B., C.Y. Mu, and J.A. Huang, *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study.* Tumori, 2012. **98**(6): p. 751-5.
133. Mu, C.Y., et al., *High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation.* Med Oncol, 2011. **28**(3): p. 682-8.
134. Wang, S.S., et al., *Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer.* Cell Mol Immunol, 2019. **16**(1): p. 6-18.
135. Yang, H., et al., *Prognostic value of PD-L1 expression in combination with CD8(+) TILs density in patients with surgically resected non-small cell lung cancer.* Cancer Med, 2018. **7**(1): p. 32-45.
136. Azuma, K., et al., *Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer.* Ann Oncol, 2014. **25**(10): p. 1935-1940.
137. Okita, R., et al., *PD-L1 overexpression is partially regulated by EGFR/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer.* Cancer Immunol Immunother, 2017. **66**(7): p. 865-876.
138. De Marinis, F. and A. Passaro, *[Nivolumab in second-line treatment of squamous non-small cell lung cancer.].* Recenti Prog Med, 2016. **107**(12): p. 634-640.
139. Lau, S.C.M., et al., *Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options.* Cancer Cell, 2022. **40**(11): p. 1279-1293.
140. Savari, O., et al., *First Report of Thoracic Carcinoma With DEK::AFF2 Rearrangement: A Case Report.* J Thorac Oncol, 2022. **17**(8): p. 1050-1053.
141. Laforga, J.B. and B. Abdullah, *Sinonasal DEK-rearranged Papillary Non-keratinizing Squamous Cell Carcinoma: Expanding the Emerging Entity.* Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2023. **75**(4): p. 3866-3870.
142. Castelnau-Marchand, P., et al., *Sinonasal squamous cell carcinoma without clinical lymph node involvement : Which neck management is best?* Strahlenther Onkol, 2016. **192**(8): p. 537-44.

143. Ng, J.K.M., et al., *Prevalence and interpretation of AFF immunostain of DEK::AFF2 fusion-associated papillary squamous cell carcinoma in a retrospective cohort of recurrent sinonasal papillomas*. *Virchows Arch*, 2024. **484**(1): p. 119-125.
144. Zhou, Q.C., et al., *Oncogene DEK is highly expressed in lung cancerous tissues and positively regulates cell proliferation as well as invasion*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(6): p. 8573-8581.
145. Wang, X., et al., *High expression of oncoprotein DEK predicts poor prognosis of small cell lung cancer*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(8): p. 5016-23.
146. Bishop, J.A., et al., *Nonkeratinizing Squamous Cell Carcinoma of the Sinonasal Tract With DEK-AFF2: Further Solidifying an Emerging Entity*. *Am J Surg Pathol*, 2021. **45**(5): p. 718-720.