

Akciğer Kanserinde Güncel Genetik Algoritma ve Tedavi Seçenekleri

Serap Arslan¹

Özet

Kanserin moleküler özelliklerinin anlaşılmasına başlamasıyla birlikte çalışmalar hedefe yönelik tedaviler üzerine yoğunlaşmıştır. Akciğer kanseri ile ilgili yapılan hücresel ve moleküler mekanizma çalışmaları sayesinde hastalığın epidemiyolojisi, prognozu, tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Akciğer kanseri dünyada %11,4 insidans ve %18 mortalite oranıyla en yaygın görülen kanser tiplerinden biridir. Akciğer kanseri etiyojisinde sigara, yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, genetik ve immünolojik faktörler de etiyojik faktörler arasında yer almaktadır. Akciğer kanseri biyolojisi, tedavisi ve prognozuna göre başlıca küçük hücreli (%15) ve küçük hücreli dışı (%85) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır.

Akciğer kanseri gelişiminde onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu en önemli genetik etkidir. Akciğer adenokarsinomlarında günümüzde kullanılan onaylı ajanlarla hedeflenebilir değişiklikler, EGFR, ALK, BRAF, RET, NTRK1-2-3, ROS1, MET, ERBB2 ve KRAS gibi genlerdeki nokta mutasyonları, in-frame delesyonlar, splice varyantları ve translokasyonları içerir.

NCCN KHDAK Paneli, metastatik KHDAK'li uygun hastalar için moleküler testler önermektedir. Klinik kılavuzlar tüm ileri evre veya metastatik akciğer adenokarsinomlarında *EGFR-ALK-ROS* panelinin klinisyen tarafından istenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Hedefe yönelik tedavi alan olgularda sağ kalım oranı daha uzundur. Özellikle *EGFR* E19 del, L858R mutasyonu, *ALK* ve *ROS* yeniden düzenlenmelerinde TKI karşı yanıt söz konusudur. Tedavi sonrası hastalarda direnç gelişebilir. Hedefe yönelik tedavilerde bu direnç mekanizmaları karşı terapötik ajan geliştirme üzerine birçok umut vaat eden çalışma devam etmektedir. Çalışmalardan elde edilen veriler arttıkça gelecekte kişiye özel alternatif tedavi seçenekleri de karşımıza çıkacaktır.

1 Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD, ORCID: 0000-0002-7112-5658, serkus76@gmail.com

EPİDEMİYOLOJİ

Akciğer kanseri dünyada %11,4 insidans ve %18 mortalite oranıyla en yaygın görülen kanser tiplerinden biridir (1, 2). Tüm kanser ölümlerinin yaklaşık 1/3'ünü oluşturur. Ülkemizde yıllık insidansı erkeklerde 61,6/100.000 ve kadınlarda 5,1/100.000'dir ve yaşla birlikte insidansın artış söz konusudur (3).

Akciğer kanseri etiyojisinde sigara kullanımı en önemli etkenlerden biridir. Tanı alan hastalarda erkeklerin %85'i ve kadınların %47'sinde etiyoji tütün kullanımındır. Ancak sigara kullanmayan olgular da söz konusudur. Dünya çapında elde edilen verilere göre olguların erkeklerin %15'i ve kadınların da %53'ü hiç tütün kullanmamış bireylerden oluştuğunu göstermektedir. Sigara kullanımı dışında yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, genetik ve immünolojik faktörler de etiyojik faktörler arasında yer almaktadır (4).

Akciğer adenokarsinomunda gözlenen genetik değişikliklerin sıklığı cinsiyet, yaş, sigara içme durumu ve coğrafi bölgelere göre incelenmiştir. *KRAS* mutasyonları, özellikle transversiyon tipi mutasyonlar sigara içenlerde bulunurken, *EGFR* mutasyonları (5) ve *ALK*, *ROS1* ve *RET* translokasyonları daha çok hafif veya hiç sigara içmeyenlerde bulunur. *TP53* (6), *NRAS* (7) ve *MAP2K1* (8) gibi diğer değişiklikler de sigara içenlerde daha yaygındır; *BRAF* ve *MET* hem sigara içenlerde hem de içmeyenlerde bulunur; *EGFR* değişiklikleri genç hastalarda ve kadınlarda daha sık bulunurken, *ALK*, *ROS1* ve *RET* değişiklikleri genç hastalarda daha yaygındır, ancak cinsiyet farklılığı yoktur. Ayrıca *EGFR* mutasyonunun Doğu Asya'da ve *KRAS* mutasyonunun ABD/Avrupa popülasyonlarında daha sık gözleendiği bildirilmiştir (9). Bununla birlikte bu epidemiyolojik ilişkilerin hastaya uygulanacak test ve tedavi seçiminde belirleyici olmaması gerektiği yönünde genel bir görüş birliği söz konusudur.

SINIFLANDIRMA

Akciğer kanseri patolojik olarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2004 sınıflamasında, akciğer kanseri biyolojisi, tedavisi ve prognozuna göre başlıca küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı (KHDAK) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Akciğer kanseri olgularının %80-85'i KHDAK ve %15-20'ini KHAK oluşturur (10). Bu ayırım tedavinin seçilmesi ve prognozun belirlenmesi için gereklidir.

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

Küçük hücreli akciğer kanseri büyük oranda sigara içenlerde ortaya çıkan ve son derece kötü bir prognoza sahip olan yüksek dereceli bir nöroendokrin

karsinomdur. KHAK'li olgularda etiyolojik faktör olarak çoğunlukla sigara ilk sırada yer alır. KHAK tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Hastalığın klinik seyri çok hızlı ve agresiftir. KHAK, submukozal yerleşimli nöroendokrin hücrelerden köken alır. Küçük hücreli karsinoma ve kombine küçük hücreli karsinoma olmak üzere iki alt tipi vardır. Erkeklerde görülme oranı kadınlara göre daha sıktır. Olgular sıklıkla ileri evrede ya da metastatik evrede tanı alır. Yüksek proliferasyon hızı nedeniyle erken ve yaygın metastaz sık görülür. Hastaların 2/3'de tanı anında uzak metastaz oluşumu saptanır. En yaygın metastaz bölgeleri kontralateral akciğer, beyin, karaciğer, adrenal bezler ve kemikte yerleşim gösterir. Akciğer kanseri olgularının her 10 hastadan 8'i KHDAK, 1'i ise KHAK oluşturmaktadır (11).

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri tüm olguların yaklaşık %85'ini oluşturur. Başlıca üç tipi vardır; sküamöz (yassı) hücreli kanser, adeno kanser ve büyük hücreli kanser şeklinde gözlenmektedir. Adenokarsinomlar tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %50'sini oluşturur. Büyük hücreli karsinom ise nadir görülür. Sigara içmeyenlerde ve kadınlarda en sık görülen KHDAK tipini adenokanserler oluşturur. Adenokanserler heterojen periferik kitle ile ve erken metastaz yaparak kendini gösterir. Sküamöz hücreli kanserler tipik olarak santral yerleşimli olup geç metastaz yaparlar (12). Kemoterapiye cevap vermesine rağmen teşhis sırasında genellikle ileri evrede oldukları için hastaların prognozları kötüdür (13). Bazı prognostik faktörler, KHDAK'li hastalarda sağkalımı öngörmektedir. İyi prognostik faktörler arasında, tanı anında erken evre hastalık, iyi performans durumu, anlamlı kilo kaybı olmaması (<%5) ve kadın cinsiyeti yer alır (14).

Hastaların çoğunluğu metastatik ya da ileri evre tanı almaktadır. Tüm akciğer kanseri hastalarının sadece %15'i tanıdan sonra 5 yıl ve daha fazla yaşama süresine sahip olduğu bilinmektedir. Akciğer kanserinde 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %10-15'dir (14).

AKCİĞER KANSERİNDE MOLEKÜLER MEKANİZMA

Akciğer kanserlerinde onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikte genlerin aktivasyon kazancı ya da fonksiyon kaybı sonucu tümör hücresinin lehine genetik değişimler söz konusudur. Bu değişimler genellikle tümör baskılayıcı genlerde hipermetilasyon, onkogen hipometilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, DNA tamir genlerinde hatadan kaynaklı fonksiyon kaybı, hücrel sinyal yollarında yer alan *EGFR*, *ALK*, *ROS1* ve *HER2* gibi reseptör tirozin kinaz (RTK) genlerinde, *RAS*, *RAF* ve *MEK1* gibi Map Kinaz sinyal yolağı genlerinde ve *PIK3CA*, *AKT1* gibi *PI3K/Akt* sinyal yolağındaki

genlerde ortaya çıkan mutasyonlar şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Sküamöz hücreli karsinomlarda sıklıkla *PIK3CA*, *FGFR1* ve *PTEN* genlerinde değişim söz konusu iken, adenokarsinomlarda *KRAS*, *EGFR*, *ALK* ve *MET* genlerinde genetik değişiklikler görülmektedir (15).

KHAK'de Moleküller Mekanizma

KHAK olgularının büyük çoğunluğunda hastalık gelişiminde, tümör baskılayıcı özelliğe sahip olan *TP53* ve *RB* genlerinde görülen eş zamanlı inaktivasyonun rol aldığı gösterilmiştir. Bunun dışında yapılan çalışmalarda *MYC* ve *FGFR1* geni amplifikasyonları, *PTEN* fonksiyon kaybı, *NOTCH*, *CREBBP* ve *GNAS* genlerindeki genetik değişikliklerin hastalık patogenezinde etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca KHAK tümörlerinin yaklaşık %8'inde bir histon metiltransferaz olan *KMT2D*'nin (*MLL*) mutasyonlar sonucu inaktive olduğu saptanmıştır (11).

Lambert-Eaton miyastenik sendromu, ensefalomiyelit ve duyuşal nöropati gibi birçok nörolojik ve endokrin paraneoplastik sendrom, KHAK ile ilişkilidir. NCCN (National Comprehensive Cancer Network) KHAK Paneli, nörolojik paraneoplastik sendromdan şüpheleniliyorsa kapsamlı bir paraneoplastik antikor panelinin çalışılmasını önerir. KHAK hücreleri bazen vazopressin (antidiüretik hormon [ADH]) ve adrenokortikotropik (ACTH) içeren polipeptit hormonları üretir. Bu hormonlardan ADH, malignite hiponatremisine (uygunsuz ADH sekresyonu sendromu [SIADH]) ve ACTH ise Cushing sendromuna neden olur. KHAK'li olgularda SIADH sendromu daha sık gözlenir (16,).

KHDAK'de Moleküller Mekanizma

Akciğer kanseri ile ilgili yapılan hücrel ve moleküler mekanizma çalışmaları sayesinde hastalığın epidemiyolojisi, prognozu, tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Akciğer kanserinin moleküler mekanizmasının anlaşılması için yapılan çalışmalar göstermiştir ki, farklı evrelerde ve farklı histopatolojik tiplerde rol oynayan genlerde değişiklik söz konusudur. Akciğer kanseri gelişiminde onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu en önemli genetik etkendir. Bu onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkan mutasyonların hastalığın prognoz ve progresyonunda farklı genetik değişimlerin birikiminin etkili olduğunu ortaya koymaktadır. KHDAK formdaki tümörler sıklıkla patolojik olarak adenokarsinom fenotipi sergiler. Olguların klinik özelliklerine göre cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi stratejileri uygulanır. Özellikle kemoterapi uygulanacak olgularda kişiye özel moleküler hedefe yönelik alternatif tedavi protokolleri uygulanabilmektedir.

DSÖ'nün 2021'de yenilenen akciğer kanserleri sınıflandırma kılavuzuna göre, adenokarsinomlarda gözlenen moleküler anomalilerin hastalığın etiolojisinde, patogenezi ve tanısında çok önemli bir etken olduğu vurgulanmıştır. Birçok moleküler değişiklik rapor edilmiştir ve bunlar adenokarsinomun patogenezi, ilerlemesi ve daha da önemlisi tedavisi ile ilişkilidir. Özellikle akciğer adenokarsinomuna spesifik olan onkogenik sürücü mutasyonlarına (*EGFR* ekzon 19 delesyonları ve ekzon 21 nokta mutasyonları, *EMLA-ALK* translokasyonları) özgü hedefli terapötik ajanlar tanımlanmıştır. Akciğer adenokarsinomlarında günümüzde kullanılan onaylı ajanlarla hedeflenebilir değişiklikler, *EGFR* (17-20), *ALK* (21, 22), *BRAF* (23,24), *RET* (25,26), *NTRK1-2-3* (27), *ROS1*(25,28), *MET* (29, 30), *ERBB2* (31) ve *KRAS* (32) gibi genlerdeki nokta mutasyonları, in-frame delesyonlar, splice varyantları ve translokasyonları içerir. Bu değişiklikler genellikle ileri evre hastalarda tedaviyi yönlendirmek için kullanılsa da *EGFR* hedefli tedavi kullanımı erken evre hastalara doğru genişlemektedir (33). Bunlar dışında tek başına ya da diğer mutasyonlarla birlikte *TP53*, *STK11* ve *KEAPI* genlerindeki değişimler akciğer adenokarsinomlarında bulunabilen diğer değişikliklerdir. Şu an için doğrudan bu genleri hedefleyen ajanlar söz konusu değil ancak *STK11*'in tümör ilerlemesi ve ICP'ye (immün checkpoint inhibitör) direnç ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (34, 35).

PREDİKTİF VE PROGNOTİK BİYOBELİRTEÇLER

NCCN KHDAK Paneli, metastatik KHDAK'li uygun hastalar için moleküler testler önermektedir. Akciğer kanseri için FDA onaylı çok sayıda ajanlar ve biyobelirteçler mevcuttur. Metastatik adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom KHDAK 'li hastalar için moleküler testler önerilir. Metastatik sküamöz hücreli karsinomlu hastalar için de moleküler test düşünülebilir (35, 36). NCCN KHDAK Paneli ayrıca, FDA onaylı bir immün biyobelirteç olan PD-L1 inhibitörü gibi immünoterapi ajanları bulunduğundan, metastatik KHDAK'li tüm hastalarda PD-L1 IHC testini önerir (37).

KHDAK için prediktif ve prognostik belirteçler olarak bazı biyobelirteçler tanımlanmıştır. Bir prediktif biyobelirteç terapötik etkinliğin göstergesidir, biyobelirteç ile hastaya uygulanan tedavi sonucu arasında bir etkileşim vardır. Bir prognostik biyobelirteç ise, alınan tedaviden bağımsız olarak hastanın hayatta kalmasının göstergesidir, çünkü biyobelirteç doğuştan gelen tümör davranışının bir göstergesidir. KHDAK Paneli, geleneksel kemoterapi rejimlerine kıyasla hedefe yönelik tedaviler veya immünoterapiler alan hastalarda genel hayatta kalmada iyileşme gösteren verilere dayanarak, hastaların hedefe yönelik tedaviler veya immünoterapiler için uygun olup

olmadığını değerlendirmek için tüm uygun hastalarda belirli moleküler ve immün biyobelirteçlerin test edilmesini önerir (38, 39).

KHDAK'te günümüzde prediktif moleküler biyobelirteçler arasında, *ALK* yeniden düzenlemelerini, *BRAF* p.V600E nokta mutasyonları, *EGFR*, *ERBB2 (HER2)*, *KRAS* ve *MET*ex14skipping mutasyonları, *RET* ve *ROS1* yeniden düzenlenmeleri, *NTRK1/2/3* gen füzyonları ve prediktif bir immün biyobelirteç olan PD-L1 ekspresyonu yer alır. Ayrıca yüksek düzeyde *MET* amplifikasyonları olan KHDAK hastaları için hedefe yönelik ajanlar mevcuttur (40, 41). Ancak, bu ajanların kullanımını destekleyecek daha az veri olduğundan henüz KHDAK için FDA onayı almamıştır.

EGFR ekzon 19 delesyonlarının veya ekzon 21 L858R mutasyonlarının varlığı, osimertinib gibi *EGFR* tirozin kinaz inhibitörü (*EGFR* TKI) tedavisinden elde edilen tedavi yararının öngörüsüdür. Belirli *EGFR* TKI'lerin etkinliğini gösteren verilere dayanarak, metastatik KHDAK'li uygun hastalarda yeni *EGFR* mutasyonları (*EGFR* S768I, L861Q ve G719X değişiklikleri dahil) için de moleküler testler önerilir (42, 43). Panel ayrıca, ikinci basamak tedavi seçenekleri olarak yeni ajanların etkinliğini gösteren verilere dayanarak, metastatik KHDAK'li uygun hastalarda *EGFR* ekzon 20 insersiyon mutasyonları için test yapılmasını önerir. Test uygun şekilde valide edilmişse, bu *EGFR* mutasyonlarının tümü aynı testte değerlendirilebilir. Ancak *EGFR* mutasyonlarını saptamak için hedeflenen PCR tabanlı yöntemler, *EGFR* ekzon 20 insersiyonlarını saptamada yetersiz kalabileceğinden, yeni nesil dizileme (NGS) tabanlı stratejiler tercih edilir (44, 45).

ALK yeniden düzenlemeleri, asalectinib, brigatinib veya lorlatinib gibi hedefe yönelik tedaviden fayda sağlamayı öngörür. *ALK* yeniden düzenlemeleri ve *EGFR* mutasyonları için test yapılması, metastatik sküamöz olmayan KHDAK veya KHDAK NOS'lu hastalar için önerilir, böylece bu sürücü mutasyonlarına sahip hastalar, *BRAF* p.V600E, *ERBB2 (HER2)* mutasyonları, *KRAS*, *MET*ex14 skipping, *NTRK1/2/3*, *RET* ve *ROS1*'in dahil olduğu hedeflenen ajanlarla etkili tedavi alabilirler (46, 47).

KRAS onkogeni prognostik bir biyobelirteçtir. *KRAS* mutasyonlarının varlığı, tedaviden bağımsız olarak, *KRAS* mutasyonlarının yokluğu ile karşılaştırıldığında, KHDAK'li hastalar için kötü prognostiktir. *KRAS* mutasyonları ayrıca *EGFR* TKI tedavisinden fayda sağlanmadığının bir göstergesidir (47).

Likit biyopsi (cfDNA) testi bir biyobelirteç olarak önerilmektedir. Ancak KHDAK paneli, plazma cfDNA/ctDNA DNA testinin KHDAK'in tanısı

sirasında bu testi kullanmayı önermemektedir. Tanı sırasında mutlaka tümörlü doku örneği kullanılmalıdır. Çünkü somatik varyantlar/mutasyonlar için plazma cfDNA/ctDNA testi için standartlar ve yönergeler yayınlanmamıştır, %30'a varan yanlış negatiflik oranı söz konusudur ve tümörle ilgili olmayan varyantlar tespit edilebilir. Bununla birlikte, plazma cfDNA testi bazı özel durumlarda kullanılabilir: 1) hasta tıbbi olarak invazif doku örnekleme için uygun değilse, 2) moleküler analiz için yeterli doku yoksa ve onkojenik bir sürücü mutasyon saptanmazsa cfDNA testi kullanılabilir. Ancak hastanın takibi doku bazlı analizlerle yapılmalıdır. Veriler, plazma cfDNA testinin, metastatik KHDAK'li hastalara özgü *EGFR*, *ALK* ve diğer onkogenik biyobelirteçleri tanımlamak için kullanılabileceğini göstermektedir (48).

AKCİĞER KANSERİNDE HEDEFE YÖNELİK TEDAVİDE KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER

Hedefe yönelik tedavilerin mevcut olduğu onkojenik genomik sürücü olaylarını test etmek için moleküler testler kullanılır; bu somatik genomik değişiklikler (moleküler biyobelirteçler), gen mutasyonlarını ve füzyonlarını içerir. Rezeke edilebilir erken evre ve lokal olarak ilerlemiş KHDAK'li uygun hastalar için belirli biyobelirteçler için test yapılması da önerilir. Hedefe yönelik tedavide progresyon gelişen hastalarda direnç mekanizmalarını değerlendirmek için geniş genomik profillemeye kullanılabilir. Ek olarak, ayrı primer akciğer kanserlerini intrapulmoner metastazlardan ayırt etmek için geniş moleküler profillemeye kullanılabilir (49). Geniş genomik profillemeye, belirli moleküler odaklı klinik deneyler için uygunluğun belirlenmesine de yardımcı olabilir.

Farklı biyobelirteçleri değerlendirmek için kullanılacak çeşitli test yöntemleri NCCN kılavuzunda yer alan algoritmada açıklanmıştır. Geniş moleküler profillemeye sistemleri, çoklu biyobelirteçleri eş zamanlı olarak test etmek için kullanılabilir. Bu geniş moleküler profillemeye sisteminde validasyonu yapılmış NGS yöntemi oldukça avantaj sağlar. NGS platformları somatik genomik değişiklikleri saptamak üzere tasarlanmış ve doğrulanmışsa, mutasyon panellerini ve gen füzyonlarını algılayabilen geniş moleküler profil oluşturma olanağı sunar. Bazı NGS platformları hem mutasyonları hem de gen füzyonlarını ve ayrıca kopya sayısı varyasyonlarını saptayabilir. Birden fazla mutasyonu saptamak için multiplaks PCR ve real-time PCR gibi başka mutasyon tarama testleri de mevcuttur. Ancak multiplaks PCR sistemleri tipik olarak gen füzyonlarını saptayamaz. *ROS1* ve *ALK* gibi gen yeniden düzenlemeleri, FISH ve NGS gibi diğer yöntemler kullanılarak tespit edilebilir (50).

Geniş moleküler profillemeye sistemlerinde genellikle NGS tekniği kullanılmaktadır. Testler sonucu elde edilen varyantların patojenitesini sınıflandırmak için çeşitli sistemler mevcuttur. Bu sınıflandırma sistemlerinden birinde, 1) güçlü klinik öneme sahip varyantları (Tier I); 2) potansiyel klinik önemi olan varyantlar (Tier II); 3) klinik önemi bilinmeyen varyantlar (Tier III) ve 4) benign veya likely benign varyantlar (Tier IV) olarak sınıflandırılır. Başka bir sınıflandırma sisteminde ise, patojenik, likely patojenik, önemi belirsiz varyantları (VUS), likely benign ve benign sınıflandırması kullanılır. Ancak bu sınıflandırma çoğunlukla germline hastalıklarda kullanılmaktadır. Tedavi seçeneğini belirlerken VUS varyantların kullanılması önerilmemektedir (50, 51).

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) Mutasyonları

Hücre membran reseptörü olan EGFR ailesi yapısal olarak benzer dört reseptör kinaz proteininden oluşur. Bu RTK proteinler arasında EGFR (ERBB19, HER2(ERBB2), HER3 (ERBB3) ve HER4 (ERBB4) yer alır. Bu protein ailesi, EGF, TGF- α , AR, BTC, HB-EGF, EPR, EPG ve NRG gibi çeşitli büyüme faktörleri ile etkileşim kurar (18).

7p11.2'de lokalize *EGFR* geni bir RTK kodlar. Hücrede proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen önemli sinyal iletim yollarında rol alan tirozin kinaz özelliğinde bir hücre yüzey reseptörüdür. EGFR, epidermal büyüme faktörüne bağlanan, böylece reseptör dimerizasyonunu ve hücre proliferasyonuna yol açan tirozin otoposforilasyonunu indükleyen bir hücre yüzey proteinidir. Aktivasyon sonucu proliferasyon, adezyon, migrasyon, diferansiyasyon, anjiyogenezis ve apoptozis gibi hücresel süreçler üzerinde etkili olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar akciğer kanseri ile ilişkilidir. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %20'sinde *EGFR* mutasyonu gözlenmektedir. *EGFR* mutasyonları adenokarsinomlarda, sigara içmeyenlerde, kadınlarda ve Doğu Asya kökenli olgularda daha sık gözlenir. Mutasyonlar genellikle *EGFR* geni üzerinde 18-21. ekzonları arasındaki hotspot bölgelerde saptanmakta olup en sık gözlenen mutasyonlar ekzon 19 ve ekzon 21 üzerinde yer alır (42-45).

Olguların %85-90'de en yaygın gözlenen *EGFR* mutasyonları; Ekzon 19 delesyonları (E19del) ve Ekzon 21'deki L858R mutasyonudur. Bu mutasyonların saptandığı olgularda erlotinib ve gefitinib TKI tedavisine iyi yanıt söz konusudur. EGFR ekzon 19 delesyonlarının ve L858R'nin öngörücü etkileri mutasyonlar iyi tanımlanmıştır. Bu yaygın EGFR mutasyonlarına sahip hastalar, afatinib, dakomitinib, erlotinib, gefitinib veya osimertinib'e önemli ölçüde daha iyi yanıt verir. Progresyonsuz sağ kalım (PFS) daha uzundur. Bununla birlikte Ekzon 19 insersiyonları, L861Q,

G719X ve S768I mutasyonları daha az sıklıkla gözlenir (KHDAK'ların %10). Uzun süreli tedavilerde TKİ karşı direnç gelişebilmektedir. Bu direnç primer ve sekonder direnç olmak üzere iki farklı formda görülebilir (42-45).

Başlıca EGFR TKİ primer direnç mekanizmaları, *PTEN* fonksiyon kaybı, *KRAS* mutasyonları, *ALK* yeniden düzenlenmeleri, *EGFR* mutasyonları ve amplifikasyonu ve *HER* reseptör ailesinde amplifikasyon veya mutasyonlardır. Sekonder direnç mekanizmaları ise *EGFR* genindeki ikincil mutasyonlar, *MET* amplifikasyonu, *HGF* (hepatosit büyüme faktörü) veya *ILGF-1* (insülin benzeri büyüme faktörü 1)'de overekspresyon şeklinde karşımıza çıkmaktadır. EGFR TKİ tedavisine dirençli mutasyonlar ekzon 20'de insersiyonlar (%5-10) ve T790M (%60) mutasyonudur. EGFR TKİ dirençte en önemli mekanizma EGFR geninde oluşan sekonder mutasyonlardır. Bu mutasyon, olguların %50'sinde 1. nesil EGFR TKİ karşı direnç olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak T790M mutasyonu primer dirence de neden olabilir. Aynı zamanda T854A, D761Y ve L747S mutasyonları da 1. nesil TKİ karşı sekonder direnç oluşturabilir. Direnç gelişen olgularda lapatinib, neratinib gibi TKİ'lerinin başarılı olduğu prelinik çalışmalarda bildirilmektedir. FDA onayı alan afatinib TKİ direnç gelişen olgularda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (46).

Günümüzde *EGFR* mutasyonlarının saptanmasında en yaygın kullanılan yöntem ekzon 18-21 arasındaki bölgenin real-time PCR ve dizi analizi ve *EGFR* amplifikasyonlarının saptanmasında FISH (Floresan insitu hibridizasyon) metotlarıdır.

Akciğer kanseri tedavi algoritmalarında sıklıkla NCCN (National Comprehensive Cancer Network) kılavuzları kullanılmaktadır. Bu kılavuzlar belirli periyotlarda güncellenerek kullanıcılara sunulmaktadır. Kılavuzlara göre KHDAK ileri evre/metastatik adenokarsinom ve sküamöz hücreli karsinomlarda *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *NTRK1/2/3*, *Met* ex14 skipping, *RET*, *HER2* ve *PDL-1* testinin yapılması önerilmektedir (46, 47).

KHDAK'de tedavide EGFR mutasyon sonucu pozitif olan olgularda tedavi algoritmasında, 1. basamak sistemik tedavi öncesi ve sonrası mutasyon saptanması durumuna göre izlenecek yol belirlenmiştir. 1.basamak sistemik tedavi öncesi EGFR mutasyonu saptanan olgularda osimertinib, erlotinib, afatinib, gefitinib veya dacomitinib hedefe yönelik tedavilerden biri kullanılması önerilmektedir. Eğer 1.basamak tedavi sırasında mutasyon saptanırsa sistemik tedavinin tamamlanması ve devamında osimertinib, erlotinib, afatinib, gefitinib veya dacomitinib hedefe yönelik tedavi uygulanması önerilir (46, 47).

ALK (Anaplastic Lymphoboma Kinase) Yeniden Düzenlenmeleri

ALK 2p23'de lokalize reseptör tirozin kinaz olarak işlev gören bir proteindir. KHDAK adenokarsinomların %5-7'sinde gözlenir. *ALK* en yaygın füzyon partneri *EML4* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4)'dir. Bunun yanı sıra *KIF5B*, *KLC1*, *TFG* ve *PTPN3* gibi başka füzyon partnerleri de vardır (21). *ALK*'nın ligandına bağlanması sonucu MAPK, JAK/STAT ve PIK3-Akt gibi hücrel sinyal ileti yolları aktivasyonu gerçekleşerek hücre proliferasyonu tetiklenir. *ALK* rearranjmanı saptanan hastaların çoğu genç ve sigara kullanmayan adenokarsinom tipindedir. Olguların %33'de sigara içme öyküsü yoktur ve *EGFR* mutasyonu negatiftir. Bu olgularda *KRAS* ve *EGFR* mutasyonu birlikteliği görülmez (22).

Bir *ALK* yeniden düzenlemesinin varlığı, oral ALK TKI'lere (krizotinib) yanıt verme ile ilişkilidir. *ALK* füzyonu sonucu oluşan mutasyonlar ALK aktivitesinde artışa yol açar ve ALK inhibitörlerine yanıtta iyi prognostik belirteç olarak kabul edilir. ALK TKI direnç gelişiminde, *ALK* füzyon geninde amplifikasyonlar, sekonder *ALK* mutasyonları, *EGFR* ve *KRAS* mutasyonları, *KIT* amplifikasyonları, *ALK* rearrangement kaybı ve sarkomatoid karsinoma transformasyonu gibi moleküler mekanizmalar etkilidir. ALK TKI krizotinibe karşı direnç gelişiminde sorumlu mutasyonlar arasında L1196M, G1202R, S1206Y, L1152R, C1156Y, F1174L, G1269A ve 1151insT olarak bildirilmiştir. Krizotinibe direnç durumunda ceritinib, alectinib veya brigatinib gibi daha etkili tirozin kinaz inhibitörleri ile tedaviye devam edilmesi önerilmektedir. Füzyonun saptanmasında en yaygın kullanılan yöntem FISH olmakla birlikte özellikle yeni füzyon partnerlerinin saptanmasında NGS analizi önerilmektedir (25, 46).

ROS1 (ROS proto-oncogene 1) Yeniden Düzenlenmeleri

ROS1 6q22 'de lokalize olan bir transmembran RTK kodlayan bir genidir. KHDAK'lerde sigara içmeyen genç hastalarda ve adenokarsinomlarda *ROS1* yeniden düzenlenmeleri sıklıkla görülür. Anormal *ROS1* kinaz aktivitesi PIK3/AKT/mTOR, STAT3, RAS/MAPK/ERK gibi hücrel sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur. En yaygın füzyon partnerleri; *CD74*, *SLC34A2*, *CCDC6* ve *GOPC (FIG)*'dir. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %2'de *ROS1* füzyonları görülmektedir. Tüm KHDAK'lerin %0,9-1,7 oranında görülür. Metastatik skuamöz olmayan KHDAK ve skuamöz hücreli KHDAK'li hastalarda *ROS1* testi önerilir (25, 28).

Bir *ROS1* yeniden düzenlemesinin varlığı, oral *ROS1* TKI'lerine yanıt verme ile ilişkilidir. NGS, FISH, IHC ve PCR analizleri dahil olmak üzere *ROS1* yeniden düzenlemelerini tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanılabilir.

ROS1 füzyonlarının saptanmasında FISH metodolojisi kullanılabilir; ancak *FIG-ROS1* varyantının tespitinde yetersiz kalabilir. NGS yöntemiyle *ROS1* füzyonları tespit edebilir, ancak DNA tabanlı NGS, *ROS1* füzyonlarını eksik tespit edebilir. Bu nedenle RNA tabanlı NGS teknikleri kullanılması daha sağlıklı sonuçlar verecektir. Yeni ortaklarla füzyonları saptama olasılığı olmasa da bazı durumlarda hedeflenen real-time PCR yöntemleri de kullanılabilir. *ROS1* rearranjanı *EGFR*, *KRAS* ve *BRAF* diğer onkojenik değişikliklerle bir arada görülebilir. Akciğer adenokarsinomlarında, özellikle *EGFR/KRAS/ALK* negatif hastalarda rutin olarak *ROS1* füzyon varyantlarına bakılması önerilmektedir. KHDAK'lerin %7,4'te triple negatif (*KRAS*, *EGFR* ve *ALK* negatif) bir durum söz konusudur. NCCN KHDAK Paneli *ROS1* füzyonu pozitif metastatik KHDAK hastalarda birinci basamak monoterapi seçenekleri olarak krizotinib, entrectinib veya seritinib önermektedir (25, 28).

BRAF (B-Raf proto-oncogene) Mutasyonları

BRAF geni 7q34'de lokalize, hücre proliferasyonunda etili bir serin treonin kinazı kodlar. RAF ailesi üyesidir. Bu gen ailesi serin treonin kinaz özelliğine sahiptir ve Ras-GTP'ye bağlanarak plazma membranına translokasyonunu indükler. BRAF, standart MAP/ERK sinyal yolunun bir parçası olan bir serin/treonin kinazdır. Kinaz aktivitesindeki artışa bağlı olarak RAS/RAF/MAPK/ERK yolağının aktivasyonuna ve hücresel proliferasyona sebep olur. *BRAF*'taki aktive edici mutasyonlar, MAP/ERK sinyal yolunda kontrolsüz sinyalleşmeye neden olur. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %5'inde *BRAF* mutasyonu saptanır, bu mutasyon grubunun yaklaşık %50'sini ekzon 15'te yer alan V600E mutasyonu oluşturur. V600E mutasyonu sigara içmeyen ve kadın olgularda daha sık gözlenir. Bunun dışında yine 600. kodonda V600K ve V600D gibi farklı nokta mutasyonları da görülebilir. Spesifik bir mutasyonun varlığı, oral BRAF ve MEK inhibitörleri ve kombine tedaviye yanıt verme ile ilişkilendirilmiştir. Real-time PCR, Sanger sekanslama ve NGS, *BRAF* mutasyon durumunu incelemek için en yaygın kullanılan metodolojilerdir (24, 47).

KRAS (Kirsten rat sarkoma viral onkogen homologu) Mutasyonları

Ras gen ailesi HRAS, KRAS ve NRAS olmak üzere üç üyeden oluşan, mitojenik sinyal iletiminde önemli rolü olan bir protein grubudur. Ras proteinleri hücre döngüsü, apoptoz ve adezyon gibi hücresel süreçlerde kritik öneme sahiptir. Bu aile Ras-GTP bağlı formdayken GTPaz aktivitesi ile hem kendisinde hem de sinyal yolunun aşağı kısımlarında bulunan efektör moleküllerde değişikliğe sebep olur. Ras'ın en iyi bilinen efektör yolağı RAF/MEK/ERK yolağıdır. Bu yolağın en önemli özelliği, mitojenik sinyalleşme

yoluyla büyüme, diferansiyasyon, apoptoz ve inflamasyon gibi hücrenel süreçlere dahil olmasıdır. Ras ailesi arasında en sık onkojenik aktivasyon değişiminin gözleendiği gen *KRAS* genidir ve 12p12.1'de lokalizedir. *KRAS*, MAP/ERK yolağının bir parçası olan GTPaz aktivitesine sahip bir G-proteinidir. Akciğer adenokarsinomlarının %25'de mutasyon gözlenir. Mutasyon saptanan olgularda genellikle sigara kullanma öyküsü mevcuttur. *KRAS* mutasyonlarının çoğu kodon 12, 13 ve 61'de meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlardır. *KRAS*'taki nokta mutasyonları en yaygın olarak kodon 12'de meydana gelir. Bunun yanı sıra 59, 63 ve 146. kodonlarda da mutasyonlar gözlenebilir. Mutasyonlar Ras-GTP bağının sürekli olmasına sebep olur ve bunun sonucunda da sinyal iletiminin kontrolü bozulmasıyla hücrenel proliferasyon tetiklenir. *KRAS* mutasyonları olan hastaların sağkalımı daha kısadır. *KRAS* mutasyonları hem prediktif hem de prognostik biyobelirteçlerdir ve bir *KRAS* mutasyonunun varlığı kötü prognostiktir (47). Metastatik KHKDAK olgularında *KRAS* mutasyon testi yapılması önerilir. Özellikle p.G12C mutasyonları için FDA onayı alan oral bir ajan olan sotorasib geliştirilmiş ve güncel 2022 NCCN kılavuzunda algoritmaya dahil edilmiştir (32).

KHKDAK'ların yaklaşık %40'ta *KRAS* geninin aktivasyon artışına sebep olan mutasyonlar saptanır. *KRAS*'ta bilinen bir aktive edici mutasyonun varlığı, ileri moleküler testlerden fayda görme olasılığı düşük olan hastaları tanımlar. *EGFR* ve *KRAS* mutasyonu birbirini dışlayan mutasyonlardır. *KRAS* mutasyonları, *EGFR* uyarısından bağımsız olarak aynı yolak efektörlerini aktive etmeleri sebebiyle *KRAS* mutasyonu saptanan tümörler TKI'lerine dirençlidir. *KRAS* TKI olarak tivantinib + erlotinib kombine hedefe yönelik tedavi uygulanır (47).

NGS, real-time PCR ve Sanger sekanslama *KRAS* mutasyon durumunu incelemek için en yaygın kullanılan metodolojilerdir. Sonuçların değerlendirilmesinde mutasyonların somatik/germline ayrımının yapılması ve klonalitenin göz önünde bulundurulması yanlış pozitif ve negatiflik oranını azaltacak ve testin güvenilirliğini arttıracaktır.

MET (Mezenkimal Epitelyal Transition Factor) Mutasyonları

Hepatosit büyüme faktörü (HGF) reseptörü olan C-MET, hücrenin hayatta kalması ve çoğalması ile ilgili olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. *MET*'deki onkojenik sürücü genomik değişiklikleri, *MET*ex14 skipping mutasyonlarını, *MET* gen kopya sayısı kazancını veya amplifikasyonunu ve *MET* proteini aşırı ekspresyonunu içerir. *MET*, HGF ligandının bağlandığı bir reseptör tirozin kinazdır. *MET* geni 7q21-q31'de lokalize, 21 ekzonlu bir genidir. Tipik *MET* genomik değişiklikleri *EGFR*, *ROS1*, *BRAF* ve *ALK*

genetik varyantları ile görülmez. Ancak *MET*ex14 skipping mutasyonları ve *MET* amplifikasyonu birlikte oluşabilir. *MET*ex14 skipping mutasyonları, KHDAK adenokarsinom hastalarının %3-4'ünde ve diğer KHDAK histolojilerine sahip hastaların %1-2'sinde görülür. *MET*ex14 atlama mutasyonları, sigara içmeyen yaşlı kadınlarda daha sık görülür (29, 30).

MET amplifikasyonu FISH ve yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemleriyle saptanır. *MET* mutasyonu sekanslama ve real-time PCR yöntemleriyle gösterilebilir. *MET* mutasyonları çoğunlukla ekzon 14'te lokalizasyon gösterir. Bu mutasyonlar skipping(ekzon atlama) ya da delesyon şeklinde ortaya çıkar. KHDAK'lerde ekzon 14'ün kaybıyla sonuçlanan *MET* ex14 skipping varyantları görülebilir. *MET*ex14 atlama mutasyonunun varlığı, oral *MET* TKI'lere yanıt verme ile ilişkilidir. NGS tabanlı testler, *MET*ex14 atlama olaylarının saptanması için birincil yöntemdir. *MET*ex14 atlamasını saptamak için immünohistokimya (IHC)analizi önerilmemektedir. *MET* amplifikasyonu ve mutasyonları birbirini dışlamaz, *MET* amplifikasyonu olan hastalarda eş zamanlı *MET* mutasyonu olan ekzon 14 kaybı da görülebilir. EGFR TKI tedavisi gören hastaların %20'de *MET* amplifikasyonu ile direnç gelişir. NCCN KHDAK Paneli, metastatik KHDAK'li uygun hastalarda *MET*ex14 skipping testi yapılmasını önerir. NCCN Paneli *MET*ex14 atlama mutasyonları için FDA onayları olan kapmatinib veya tepotinib gibi çeşitli ajanların pozitif metastatik KHDAK'li hastalarda birinci basamak tedavide kullanılması önermektedir (40, 41).

RET (Rearranged during transfection) Yeniden Düzenlenmeleri

RET, hücre çoğalmasını ve farklılaşmayı etkileyen bir tirozin kinaz reseptörüdür. *RET*, KHDAK'de yeniden düzenlenebilen bir reseptör tirozin kinazdır. En yaygın füzyon partnerleri *KIF5B*, *NCOA4* ve *CCDC6*'dır; ancak çok sayıda başka füzyon paterni de tanımlanmıştır. Bu yeniden düzenlenmeler sonucu *RET* proteini aşırı ekspresyonuna uğrar. *RET* füzyonları KHDAK'ın yaklaşık %1-2'sinde görülür ve sıklıkla sigara kullanmamış adenokarsinom hastalarda saptanır. Bir *RET* yeniden düzenlenmesinin varlığı, füzyon partnerinden bağımsız olarak oral *RET* TKI'lere yanıt verme ile ilişkilidir. *RET* füzyon varlığını saptamak için FISH metodolojisi kullanılabilir; ancak bazı füzyonları saptamada yetersiz kalabilir. Bazı durumlarda RT-PCR da kullanılabilir ama bu yöntem yeni füzyonları saptayamaz. NGS tabanlı metodolojiler yüksek bir özgüllüğe sahiptir ve füzyon tespiti için RNA tabanlı NGS kullanımı tercih edilir. NCCN KHDAK Paneli, metastatik KHDAK'li uygun hastalarda *RET* yeniden düzenlenmelerinin test edilmesini ve *RET* yeniden düzenlenmeleri olan hastalarda FDA onaylı selpercatinib ve pralsetinib önermektedir (25, 26).

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) Mutasyonları

Onkogenik özellikte olup, 17q12'de lokalize olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. *HER2*, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonunu sağlayan PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MEK yollarını aktive eder. *EGFR*, *KRAS* ve *ALK*'de mutasyon saptanmayan olguların yaklaşık %6'da *HER2(ERBB2)* mutasyonları saptanır. Bu gendeki mutasyonlar sıklıkla sigara içmeyenlerde, kadınlarda, gençlerde, Asya kökenlilerde ve adenokarsinomlarda saptanır. Akciğer adenokarsinomlarında *HER2* amplifikasyonu görülme oranı yaklaşık %20 iken, *HER2* mutasyon oranı %3 olarak bildirilmektedir. *HER2*'deki mutasyonlar en yaygın olarak ekzon 20'de insersiyon/duplikasyon şeklinde gözlenir. NCCN KHDAK Paneli, metastatik nonsküamöz KHDAK'li tüm hastalarda *ERBB2 (HER2)* mutasyonları için test yapılmasını önerir. Bunun yanında daha az sıklıkta diğer aktive edici mutasyonlar gözlenir. *HER2*'deki aktive edici mutasyonlar, anti-*HER2* hedefli tedavi ajanlarına yanıt verme ile ilişkilidir. *HER2* mutasyonlarını incelemek için Sanger dizileme ve hedefli PCR teknikleri kullanılabilirken, çeşitlilik ve mutasyon spektrumunu ortaya koymak için en iyi yöntem NGS tabanlı yaklaşımlardır. *HER2* mutasyon tabanlı tedavide hedefe yönelik trastuzumab tedavisi önerilir (48).

NTRK1/2/3 (Neurotrophic tyrosine receptor kinase) Gen Füzyonları

NTRK gen füzyonları, akciğer, tükürük bezi, tiroid ve sarkom gibi solid tümörlerde onkogenik sürücüler olarak hareket eden proteinler (örn. TRKA, TRKB, TRKC) olan tropomiyosin reseptör kinaz (TRK) füzyonunu kodlar. *NTRK1/2/3* füzyonlarının KHDAK'li hastaların %0,2'sinde meydana geldiği ve tipik olarak *EGFR*, *ALK* veya *ROS1* gibi diğer onkogenik sürücülerle birlikte görülmediği tahmin edilmektedir. *NTRK1/2/3* gen füzyonlarının varlığı, oral TRK inhibitörlerine yanıt verme ile ilişkilidir. *NTRK1/2/3*, KHDAK'de ve diğer tümör tiplerinde nadiren yeniden düzenlenen, kontrolsüz sinyalleme ile sonuçlanan tirozin reseptör kinazlardır. Çok sayıda füzyon partneri belirlenmiştir. Bugüne kadar, bu füzyonlarla ilişkili diğer sürücü değişikliklerinin olmaması dışında hiçbir spesifik klinikopatolojik özellik tanımlanmamıştır. *NTRK1/2/3*'teki nokta mutasyonları genellikle aktive edici değildir ve hedefe yönelik tedavi ile bağlantılı olarak incelenmemiştir. *NTRK1/2/3* gen füzyonlarını saptamak için NGS, FISH, IHC ve PCR gibi çeşitli metodolojiler kullanılabilir. FISH testi, tam analiz için en az 3 prob seti gerektirebilir. NGS testi, çok çeşitli değişiklikleri tespit edebilir. DNA tabanlı NGS, *NTRK1* ve *NTRK3* füzyonlarını yetersiz tespit edebilir. Bu nedenle RNA tabanlı NGS yaklaşımları kullanılması daha doğru sonuç elde edilmesini sağlayacaktır. Metastatik KHADK hastalarda *NTRK1/2/3*

füzyon testi yapılması önerilmektedir. *NTRK1/2/3* füzyonlarında 1. basamak tedavide larotrectinib ve entrectinib kullanılması önerilir (27).

PD-L1 (programmed death ligand 1)

PD-L1, tümör hücreleri üzerinde ifade edilebilen ve T hücresi aracılı hücre ölümünü inhibe edebilen çekirdek düzenleyici bir moleküldür. T-hücreleri, PD-L1 (CD274) veya PD-L2 (CD273) gibi ligandlara bağlanan bir negatif regülatör olan PD-1'i eksprese eder. PD1/PD-L1 yolağı tümör hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasını engelleyerek tümörün gelişimine neden olan mekanizmalardan biridir. PD-L1'in varlığında, T hücresi aktivitesi baskılanır. Kontrol noktası inhibitörü antikoru, PD-1 ve PD-L1 etkileşimini bloke ederek endojen T hücrelerinin antitümör etkilerini geliştirir. KHDAK'lerin %24-60'ta PD-L1 ekspresyonu saptanır (37).

Hedefe yönelik tedavi temelli çalışmalarda PD1/PD-L1 yolağının blokajı temeline dayanan immünoterapiler geliştirilmiştir. Yakın zamanda KHDAK karsinomlarda anti PD1 ve PD-L1 ajanların tümöre karşı etkili olduğunu ve genel sağ kalımı belirgin olarak uzattığını gösteren birçok çalışma literatüre girmiştir. Özellikle hücre membranında ve sitoplazmasında eksprese olan PD-L1'in immünohistokimyasal yolla boyanarak saptanmasıyla immünoterapi için en uygun hasta adayları belirlenir. PD-L1 için IHC, birinci basamak anti PD-1/PD-L1'e yanıt verme olasılığı en yüksek olan hastaları belirlemek için kullanılabilir. Yapılan çalışmalar, PD-L1 ekspresyonunun, tekrarlayan ve ilerlemiş KHDAK olan kişilerin pembrolizumabı önemli ölçüde iyi tolere ettiğini desteklemektedir (49). FDA, 2016 yılında PD-L1 proteini pozitif metastatik KHDAK'li olgularda ilk seçenek tedavisinde kullanımını onaylamıştır. Anti-PD-1 monoklonal antikoru PD-1'e bağlanarak ligandların bağlanmasını engelleyip immünojenik aktivasyonun inhibe edilmeden devam etmesini sağlar (37).

Likit Biyopsi (Plazma Cell-free/circulating tumor DNA-cfDNA)

Bazı merkezler, likit biyopsi olarak da anılan genellikle işlenmiş plazmada periferik dolaşımdaki nükleik asitleri inceleyen moleküler değişiklikler için test olanağı sunar. Sıvı biyopsi (likit biyopsi) genellikle kanser hastalarının periferik kan örneğidir. Hastanın tümör hücrelerinden kaynaklanan ve plazmasında bulunan dolaşan tümör hücreleri, dolaşan tümör DNA'sı, eksozomlar, mikro RNA veya plateletler gibi pek çok materyal bu örneklemeden elde edilebilir. cfDNA kanser gelişiminin erken dönemlerinden itibaren apoptotik ve nekrotik kanser hücrelerinden salınır. Kolay ulaşılabilir olması nedeniyle, sıvı biyopsi yaklaşımları içerisinde en sık tercih edilen yaklaşımdır. Sirküle tümör hücrelerinde tanınal işlemler ve moleküler incelemeler yapılabilmektedir.

Özellikle akciğer adenokarsinomlarında *EGFR* mutasyonu, tedavi sonrası gelişen dirençten sorumlu *EGFR* T790M mutasyonu ve *ALK* rearranjmanı taramasının uygulanabildiği gösterilmiştir. Çalışmalar, cftDNA testinin genel olarak çok yüksek özgüllüğe sahip olduğunu, ancak %30'a varan yanlış negatif oranıyla duyarlılığı önemli ölçüde tehlikeye attığını göstermiştir; ancak veriler, testin geri dönüş süresini azaltmak ve hedeflenebilir değişiklik saptama verimini artırmak için tamamlayıcı testi desteklemektedir. cfDNA'sının analitik performans özelliklerine ilişkin standartları detaylandıran yayınlanmış kılavuzlar oluşturulmamıştır ve doku tabanlı testin aksine, bu tür testlerin önerilen performans özelliklerine ilişkin herhangi bir kılavuz bulunmamaktadır. Hücresiz/dolaşımdaki tümör DNA (cfDNA) testi, histolojik doku teşhisi yerine kullanılmamalıdır (52, 53).

Akciğer kanseri tedavisi gören hastalarda; tümör gelişimini ve yayılımını, tedavinin başarısı ve tümör profiline göre kişiye özgü tedavi belirlenmesinde likit biyopsiden yararlanılabilir. Yine tedavi sonrası, rezidüel hastalık izlemi, tekrarlama riskinin takibi, tedaviye direnç durumunda diğer tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesine yardımcı olmak amacıyla göz önünde bulundurulabilir. cfDNA PCR bazlı veya NGS gibi yöntemlerle tespit edilebilir. Özellikle *EGFR* mutasyonu ve tedaviye dirençten sorumlu *EGFR* T790M mutasyonu taraması için rutin uygulama sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

Hücresiz/dolaşımdaki tümör DNA testinin kullanımı, özellikle aşağıda belirtilen belirli klinik durumlarda düşünülebilir:

1. Bir hasta tıbbi olarak invaziv doku örnekleme için uygun değilse,
2. Primer tümör dokusu alındıktan sonra nüks gelişimi söz konusuysa,
3. Başlangıç tanı anında, bir KHDAK tanısının patolojik olarak doğrulanmasının ardından moleküler analiz için yetersiz materyal varsa, hücresiz/dolaşımdaki tümör DNA'sı kullanılabilir; ancak, onkojenik bir sürücünün tanımlanmadığı tüm hastalar için doku bazlı takip analizi planlanmalıdır.
4. Başlangıç tanı anında, doku miktarı veya mevcut test metodolojileri nedeniyle doku bazlı testler önerilen tüm biyobelirteçleri tam olarak değerlendiremiyorsa, tekrar biyopsi ve/veya hücresiz/dolaşımdaki tümör DNA testini düşünülebilir.
5. İlk teşhis anında, zamanında doku bazlı testin uygulanabilirliği belirsizse, yukarıdaki sınırlamalara göre negatif sonuçların dikkate alınması koşuluyla, eş zamanlı cfDNA testi tedavi seçimi için biyobelirteç değerlendirmesine yardımcı olabilir.

6. Tedaviye direncin doku biyopsisi ile tespit edilemediği durumlarda kullanılması önerilmektedir.

Şu an ki rutin klinik uygulamada öncelikle tanısal biyopsi uygulanamayan, moleküler inceleme için yeni biyopsi yapılması gereken ama yapılamayan ya da tedavi sırasında hedefe yönelik ajana dirençten şüphelenilen akciğer kanseri hastalarında uygulanmaktadır.

Tümör Mutasyon Yükü (TMB)

TMB, somatik mutasyonların toplam sayısının yaklaşık bir ölçüsüdür. Teorik olarak, yüksek TMB seviyeleri, bir antitümör bağışıklık tepkisini aktive edecek olan yüksek neoantijen seviyeleri ile ilişkili olacaktır. Sigara içen veya sigarayı bırakmış KHDAK hastalarında TMB seviyeleri tipik olarak yüksektir. Düşük TMB, hiç sigara içmeyenlerde daha yaygın olarak saptanır. Karmaşık bir tasarıma sahip bir faz 3 randomize çalışma olan CHECKMATE 227'den PFS için ön veriler, TMB'nin metastatik KHDAK'li hastalarda immünoterapi kullanılıp kullanılmayacağına karar vermede yararlı bir immün biyobelirteç olabileceğini öne sürmektedir. Bununla birlikte, CHECKMATE 227'den alınan güncellenmiş veriler, TMB veya PD-L1 ifade düzeylerinden bağımsız olarak nivolumab ve ipilimumab ile genel sağkalımın iyileştiğini göstermiştir (54, 55). Ancak TMB hala ideal bir immün biyobelirteç değildir çünkü düşük TMB seviyelerine sahip bazı hastalar immünoterapiye yanıt verirken yüksek seviyeleri olan diğerleri immünoterapiye yanıt vermez. TMB ölçümüyle ilgili teknik problemler söz konusudur. Bu problemler: 1) yüksek TMB seviyelerini belirlemek için fikir birliğine varılmış bir cutt-off değerinin olmaması, 2) laboratuvarlar arasında TMB ölçümlerinin standardizasyon eksikliği. 2020'de NCCN Paneli, klinik deney verilerine, değişken TMB ölçümleriyle ilgili endişelere dayalı olarak metastatik KHDAK'li hastalar için gelişmekte olan bir immün biyobelirteç olarak TMB'yi kaldırmıştır.

KHAK Sistemik Tedavi

Kombine KHAK'li hastalar, daha agresif kanser olduğu için KHAK rejimleri kullanılarak tedavi edilir. Çalışmalar, KHDAK'li hastaların epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) tirozin kinaz inhibitörleri veya immün kontrol noktası inhibitörleri ile tedaviden sonra KHAK'e dönüşebileceğini göstermiştir. Nadir vakalarda, hiç sigara içmemiş veya hafif tütün içmiş (<10 sigara/gün) ileri evre KHAK'li hastalarda veya patolojik ikilemlerde tanıyı netleştirmeye yardımcı olması için moleküler profillemeye düşünülebileceği önerilmektedir (10,33-35).

İleri evre hastalık, kilo kaybı ve aşırı hastalık yüküyle ilişkili belirteçler (laktadehidrojenaz [LDH] gibi) KHAK'de en önemli kötü prognostik faktörlerdir. Kadın cinsiyet, <70 yaş, normal LDH ve evre I hastalık, sınırlı evre hastalığı olan hastalarda prognoz daha iyi seyreder. Yaygın evre hastalığı olan olgularda, hastanın genç yaşta olması, normal kreatinin düzeyi, normal LDH ve tek bir metastatik bölge, iyi prognostik faktörlerdir (36).

KHAK olguları, ilk kemoterapi ve radyasyon terapisine (RT) oldukça duyarlıdır; ancak, çoğu hasta tedavi sonrasında tekrarlayan hastalıktan dolayı hayatını kaybeder. Ameliyat seçeneğinden önce multidisipliner değerlendirme yapılması önerilir. Sınırlı evre hastalığı olan çoğu hasta ameliyat için uygun değildir. Cerrahi yaklaşım, yalnızca cerrahi olarak rezeke edilebilir evre I ve IIA KHAK'si olan bazı hastalar için önerilir. KHAK'li hastaların sadece yaklaşık %5'i ameliyat için uygundur. Tıbbi olarak ameliyat edilemeyen veya cerrahi rezeksiyon yapmak istemeyen sınırlı evre I ve IIA (T1-2, N0) KHAK'li hastalar için eş zamanlı kemoradyoterapi önerilir. KHAK'li hastaların çoğunda ileri evre hastalık vardır ve bu ortamda tek başına sistemik tedavi (palyatif RT ile veya palyatif RT olmadan) önerilir. Yaygın evre hastalığı olan çoğu hastada, RT'li veya RT'siz sistemik tedavi semptomları hafifletebilir ve sağkalımı uzatabilir; ancak, uzun süreli sağkalım nadirdir (37). KHAK'li hastalar üzerine yapılan klinik deneyler hala yeterli sayıda değildir. Elde edilen veriler tedavinin iyileştirilmesine ve daha fazla klinik araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

NCCN KHAK Paneli, KHAK'li hastalar için tüm adjuvan, birinci basamak ve sonraki tedavi seçeneklerini sınıflandırmıştır. Rezeke edilmiş erken evredeki hastalarda adjuvan kemoterapi önerilir. Cerrahi için uygun olmayan sınırlı evre hastalığı olan olgular için önerilen birincil tedavi, eşzamanlı torasik RT ile kemoterapiden oluşur. Yaygın evre hastalığı olan hastalarda sistemik tedavi tek başına önerilir.

Progresyon Sırasında Tedavi Algoritmaları

Hedefe yönelik tedavide progresyon gösteren herhangi bir hasta için histolojik transformasyon (küçük hücre gibi) olası bir direnç mekanizmasıdır. İlerleyen bir lezyonun doku biyopsisi, morfoloji ve biyobelirteç analizini değerlendirmek için düşünülmelidir. Yukarıda belirtilen analizlerin çoğu için, tedaviye direncin moleküler mekanizmalarının tanınması giderek artmaktadır. Hedefe yönelik tedavi sırasında aktif olarak ilerleyen bir tümörden alınan numunenin yeniden test edilmesi, sonraki uygun terapötik adımlara ışık tutabilir.

NCCN kılavuzuna göre, altta yatan bir *EGFR* duyarlı mutasyonu olan ve *EGFR* TKI ile tedavi edilmiş hastalar için minimum uygun test, p.T790M için yüksek duyarlılık içeren bir değerlendirmenin yapılmasıdır. Alternatif direnç mekanizmaları için *MET* amplifikasyonu ve *ERBB2* amplifikasyonu gibi testler yapılabilir ve hastaları ek tedavilere yönlendirmek için kullanılabilir. p.T790M'nin varlığı, hastaları üçüncü nesil *EGFR* TKI tedavisine yönlendirebilir. *EGFR* p.T790M'nin tespiti için kullanılacak testler, minimum %5 alelik fraksiyonun analitik duyarlılığına sahip olacak şekilde tasarlanmalıdır. Orijinal duyarlı bir mutasyon olan p.T790M'nin subklonal olarak ortaya çıkması durumunda tespit aralığı içinde olup olmadığını belirlemek için bir internal kontrol olarak kullanılabilir.

ALK TKI ile tedavi edilmiş altta yatan *ALK* yeniden düzenlemesi olan hastalar için, spesifik tirozin kinaz alanı mutasyonunun tanımlanmasının tedavide sonraki uygun adımları tanımlayıp tanımlamayacağı net değildir, ancak bazı ön veriler spesifik kinaz alanı mutasyonlarının sonraki tedavi basamağını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Geniş genomik profillemeye, potansiyel direnç mekanizmalarını incelemek için en bilgilendirici yaklaşım olabilir. Hastanın bireysel profillemesi için test planlanırken hastadan birden fazla örneğin alınması gerektiği dikkate alınmalıdır. Analiz metodolojisi seçimi, alt klonal olayları tanımlama yeteneğini etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

SONUÇ

Kanserin moleküler özelliklerinin anlaşılmaya başlamasıyla birlikte çalışmalar hedefe yönelik tedaviler üzerine yoğunlaşmıştır. Akciğer kanseri ile ilgili yapılan hücresel ve moleküler mekanizma çalışmaları sayesinde hastalığın epidemiyolojisi, prognozu, tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Hedefe yönelik tedavide, doğru hastaya doğru tedavinin uygulanabilmesi için moleküler testler oldukça önem kazanmaktadır. Moleküler testler hem tedavi sürecinin belirlenmesi hem de tedavi direnç mekanizmalarının anlaşılması ve çözümü, aynı zamanda hastalıkların prognozunun tahmini ve en önemlisi kanserin patogenezi hakkında daha fazla bilgi elde etmemize yardımcı olmaktadır.

Akciğer karsinomlu hastaların yaklaşık %70'i ileri evrede tanı almaktadır. Bu hastalarda genellikle cerrahi tedavi şansı olmadığı için hastalar kısıtlı tümör örnekleriyle değerlendirilmektedir. Hastalardan alınan örnekler hem tanıda hem de ileri genetik ve immünohistokimyasal testler için kullanılmaktadır. Bu senaryolar göz önüne alınarak hastadan yeterli biyopsi örneği alınması oldukça önemlidir. Özellikle genetik testler için tümürlü hücre oranı %40'ın

altında ise mutasyon saptanamayabilir. Günümüzde tümör içeren formalin fikse parafin blok kesitleri (FFPE doku) veya sitoloji örneklerinde yukarıda anlatılan biyobelirteçlerin moleküler analizleri, akciğer kanserlerinin klinik yönetimi için standart laboratuvar testleri haline gelmiştir. Bu bağlamda, işlemlerin standardizasyonu için her ne kadar uluslararası güncellenmiş ve kapsamlı kılavuzlar (NCCN ve CAP/IASLC/AMP Molecular Testing Guideline gibi) olmasına rağmen ulusal rehberlere ve merkezlerin dış kalite kontrol sağlayacak, sertifikasyon verecek sistemlerin kurulmasına da ihtiyaç vardır.

Günümüzde akciğer kanseri hastalarda *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* genlerindeki bilinen hot spot nokta mutasyonlarının analizinde hızlı ve uygun maliyetli olmasından dolayı sıklıkla real-time PCR yöntemi kullanılmaktadır. Bununla birlikte daha duyarlı ve aynı anda birden fazla genetik mutasyonları saptayabilen NGS yöntemleri de artık rutin klinik kullanımda hızla yerini almaktadır.

Akciğer kanserinin sistemik tedavisinde son yıllarda özellikle KHAK'de çok fazla ilerleme kaydedilmemiştir. Bu agresif kanser genellikle rezeke edilemeyen aşamalarda teşhis edildiğinden, histopatolojik veya sitolojik tanımlama için yetersiz olan sadece küçük biyopsi veya sitoloji örnekleri akciğer kanserinin ayırıcı tanısını zorlaştırır. Son gelişmeler ışığında, KHDAK'de hedefe yönelik tedavide, tedaviye dirençte, prognoz ve progresyon takibinde en önemli moleküler genetik testlerin *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, *MET*, *RET*, *ERBB2(HER2)* ve *NTRK1/2/3* füzyonlarının yanı sıra PD-1 ve PDL-1 olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte yeni hedefe yönelik tedavilerin keşfine yönelik çalışmalar artan bir hızda devam etmektedir. Hastadan moleküler genetik test isteneceği zaman çok sayıda parametreye bakılacağı düşünülerek, biyopsi örnekleri sadece tanı için kullanılmamalı, moleküler çalışmalar için maksimum miktarda doku kullanılabilir olmalıdır.

Ayrıca akciğer kanseri etiyojisinde en önemli etkenlerden biri sigara içme öyküsüdür. Ancak yapılan çalışmalarda, pek çok önemli genetik değişikliğinin esas olarak hiç sigara içmeyenlerde ve hafif sigara içenlerde de hastalık patogenezinin neden olduğu bildirilmiştir. Klinik uygulamalarda kullanılan kılavuzlar, hastaların sadece sigara içme öyküsü veya tümör alt tipine bakarak değerlendirilmemesini ve bu durumun moleküler testlerden bu hastaları dışlamak için kullanılmamasını önermektedir. Son zamanlarda doku biyopsisinin yapılamadığı durumlarda non invaziv bir girişim olan likit biyopsi ile yapılan çalışmalarda da önemli sonuçlar elde edilmiştir. Ancak testin yalancı pozitiflik ve negatiflik oranları hala kabul edilebilir seviyede

olmadığı için kılavuzlarca tanı ya da tedavi amaçlı tek başına likit biyopsi testini önerilmemektedir. Bu nedenle likit biyopsinin hastadan yeterli ve uygun biyopsi alınmadığı veya tedaviye direnç gelişmesi durumlarında sadece tamamlayıcı test olarak kullanılmasını önermektedir.

Klinik kılavuzlar tümüleri evre veya metastatik akciğer adenokarsinomlarında *EGFR-ALK-ROS* panelinin klinisyen tarafından istenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi sağ kalım oranları açısından karşılaştırıldığında hedefe yönelik tedavi alan olgularda sağ kalım oranının daha uzun olduğu bildirilmektedir. Özellikle *EGFR* E19 del, L858R mutasyonu, *ALK* ve *ROS* yeniden düzenlenmelerinde TKI karşı yanıt söz konusudur. Tedavi sonrası hastalarda direnç gelişebilmektedir. Hedefe yönelik tedavilerde bu direnç mekanizmaları karşı terapötik ajan geliştirme üzerine birçok umut vaat eden çalışma devam etmektedir. Çalışmalardan elde edilen veriler arttıkça gelecekte kişiye özel alternatif tedavi seçenekleri de karşımıza çıkacaktır.

KAYNAKLAR

- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [06/02/2023].
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022; 72:7-33.
- Fidaner C, Eser SY, Parkin DM. Incidence in İzmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer* 2001; 37:83-92.
- Halilçolar H, Tatar D, Ertuğrul G, Çakan A, Acıtaş MG, Kömürçüoğlu B. Epidemiyoloji. In: Akkoçlu A, Öztürk C; eds. Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım. Toraks Kitapları, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1999:17-22
- Dogan S, Shen R, Ang DC, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smokingrelated KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res.*2012;18:6169–6177.
- Aisner DL, Sholl LM, Berry LD, et al. The impact of smoking and TP53 mutations in lung adenocarcinoma patients with targetable mutations—The Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC2). *Clin Cancer Res.*2018;24:1038–1047.
- Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, et al. Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:2584–2591.
- Arcila ME, Drilon A, Sylvester BE, et al. MAP2K1 (MEK1) mutations define a distinct subset of lung adenocarcinoma associated with smoking. *Clin Cancer Res.*2015;21:1935–1943.
- Carrot-Zhang J, Soca-Chafre G, Patterson N, et al. Genetic ancestry contributes to somatic mutations in lung cancers from admixed Latin American populations. *Cancer Discov.* 2021; 11:591–598.
- Travis, W. D. et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J. Thorac. Oncol.* 10, 1243–1260 (2015).
- Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 3.
- Patz EF Jr. Imaging bronchogenic carcinoma. *Chest* 2000; 117(4 suppl 1):90-5.
- Midthun DE, Jett JR. Clinical presentation of lung cancer. In: *Lung Cancer: Principles and Practice*. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven, 1996:421.
- Finkelstein DM, Ettinger DS, Ruckdeschel JC. Long-term survivors in metastatic non-small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1986; 4:702-709.

- Oxnard GR, Binder A, Janne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31:1097-1104.
- Delisle L, Boyer MJ, Warr D, et al. Ectopic corticotropin syndrome and small-cell carcinoma of the lung. Clinical features, outcome, and complications. *Arch Intern Med* 1993; 153:746-752
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004; 350:2129–2139.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004; 304:1497–1500.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:13306–13311.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009; 361:947–957.
- Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2020; 383:2018–2029.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007; 448:561–566.
- Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17:984–993.
- Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2046–2051.
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012; 18:378–381.
- Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, et al. Efficacy of selpercatinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2020; 383:813–824.
- Farago AE, Taylor MS, Doebele RC, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer harboring an NTRK gene fusion. *JCO Precis Oncol*. 2018;2018:PO.18.00037.
- Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014; 371:1963–1971.
- Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*. 2015; 5:842–849.

- Wolf J, Seto T, Han JY, et al. Capmatinib in MET Exon 14-mutated or MET-amplified non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2020; 383:944–957.
- Chang JC, Offin M, Falcon C, et al. Comprehensive molecular and clinicopathologic analysis of 200 pulmonary invasive mucinous adenocarcinomas identifies distinct characteristics of molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2021; 27:4066–4076.
- Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, et al. KRASG12C inhibition with sotorasib in advanced solid tumors. *N Engl J Med.* 2020; 383:1207–1217.
- Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2020; 383:1711–1723.
- Hu X, Fujimoto J, Ying L, et al. Multi-region exome sequencing reveals genomic evolution from preneoplasia to lung adenocarcinoma. *Nat Commun.*2019;10:2978.
- Lam VK, Tran HT, Banks KC, et al. Targeted Tissue and Cell-Free Tumor DNA Sequencing of Advanced Lung Squamous-Cell Carcinoma Reveals Clinically Significant Prevalence of Actionable Alterations. *Clin Lung Cancer* 2019; 20:30-36 e33.
- Sands JM, Nguyen T, Shivdasani P, et al. Next-generation sequencing informs diagnosis and identifies unexpected therapeutic targets in lung squamous cell carcinomas. *Lung Cancer* 2020; 140:35-41.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375:1823-1833
- Qian J, Zhao S, Zou Y, et al. Genomic underpinnings of tumor behavior in in situ and early lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med.*2020;201:697–706.
- Liguori NR, Lee Y, Borges W, et al. Absence of Biomarker-Driven Treatment Options in Small Cell Lung Cancer, and Selected Preclinical Candidates for Next Generation Combination Therapies. *Front Pharmacol* 2021; 12:747180.
- Le X, Paz-Ares LG, Van Meerbeeck J, et al. Tepotinib in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with MET amplification (METamp). *Journal of Clinical Oncology* 2021; 39:9021-9021.
- Wolf J, Seto T, Han JY, et al. Capmatinib in MET Exon 14-Mutated or MET-Amplified Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383:944-957.
- Sequist LV, Martins RG, Spigel D, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2008; 26:2442-2449.
- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353:133-144.

- Park K, Haura EB, Leighl NB, et al. Amivantamab in EGFR Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Progressing on Platinum Chemotherapy: Initial Results From the CHRYSALIS Phase I Study. *J Clin Oncol* 2021; 39:3391-3402.
- Zhou C, Ramalingam SS, Kim TM, et al. Treatment Outcomes and Safety of Mobocertinib in Platinum-Pretreated Patients With EGFR Exon 20 Insertion-Positive Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase 1/2 Open-label Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2021;7: e214761.
- Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, et al. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *J Thorac Oncol* 2015; 10:768-777.
- Kim AS, Bartley AN, Bridge JA, et al. Comparison of Laboratory-Developed Tests and FDA-Approved Assays for BRAF, EGFR, and KRAS Testing. *JAMA Oncol* 2018; 4:838-841.
- Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2022; 386:241-251.
- Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol* 2020; 21:1353-1365.
- Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017; 19:341-365.
- Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017; 19:4-23.
- Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *J Thorac Oncol* 2018; 13:1248-1268.
- Wakuda K, Kenmotsu H, Serizawa M, et al. Molecular profiling of small cell lung cancer in a Japanese cohort. *Lung Cancer* 2014; 84:139-144.
- Su S, Zou JJ, Zeng YY, et al. Tumor Mutational Burden and Genomic Alterations in Chinese Small Cell Lung Cancer Measured by Whole-Exome Sequencing. *Biomed Res Int* 2019; 2019:6096350.
- Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med* 2018; 378:2093-2104.

Hematolojik Malignitelere Sitogenetiğin Tanısal ve Terapötik Yönleri

Hilal Şahin¹

Özet

Pek çok hematolojik malignite, her biri kendi klinik, morfolojik, immünofenotipik ve moleküler genetik özellikleri kombinasyonuna sahip klinikopatolojik olarak sınıflandırılmıştır. Moleküler ve sitogenetik anomaliler, geleneksel karyotiplemeden, tek nükleotid polimorfizm analizine kadar çok çeşitli tekniklerle tespit edilebilir. Kansere ilgili bilgilerimizi kanseri önleme ve tedavisinde daha hızlı sonuç alma yönünde geliştirmek gerekmektedir. Kansere mücadelede en etkili yol, hastalığı ortaya çıkmasını önlemektir. İkinci en etkili yol ise, tümör gelişimi daha malign hale dönüşmeden önce erken safhada saptamaktır. Tanıdan tedaviye giden bu süreçte hastalığın moleküler mekanizmasını anlamak oldukça önemlidir. Farklı malignite tiplerine uygulanan farklı sitogenetik teknikler ve farklı terapötik yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu bölümde tanı için kullanılan sitogenetik teknikler ve kronik Miyeloid Lösemi, Akut Lenfoblastik Lösemi, Polisitemia Vera ve Akut Myeloid Lösemi gibi bazı hematolojik malignitelere moleküler mekanizmalar ve terapötik yaklaşımlar üzerinde durulmuştur.

Giriş

Hematolojik maligniteler homojen olmayan bir grup tümörü temsil eder ve kanser istatistiklerinde genellikle üç ana başlıkta gruplanır: lösemi, lenfoma ve multipl myeloma. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre hematolojik maligniteler tüm kanserlerin %6,5'ini oluşturur ve kanser ilişkili ölümlerin %7,2'sinden sorumludur. İnsan kanserlerinin gelişiminden sorumlu moleküler mekanizmaların anlaşılması ile hastalığın tanısı konusunda artık daha geniş bir bilgiye sahibiz. Kansere ilgili bilgilerimizi kanseri önleme ve tedavisinde daha hızlı sonuç alma yönünde geliştirmek

1 Dr. Öğretim Üyesi, İstanbul Atlas Üniversitesi Tıp Fakültesi- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı- İstanbul, ORCID: 0000-0001-7989-2037, hilal.sahin@atlas.edu.tr

gerekmektedir. Kanserle mücadelede en etkili yol, hastalığı ortaya çıkmasını önlemektir. İkinci en etkili yol ise, tümör gelişimi daha malign hale dönüşmeden önce erken safhada saptamaktır. Kanserde metastaz olmadan önce tanı konulabildiğinde cerrahi müdahale ya da radyasyon tedavisi gibi lokal tedavi girişimleri ile bu hastalık iyileştirilebilmektedir. Metastaz yapmamış, yani oluştuğu bölgeden başka dokulara yayılmamış olan erken-evre karsinomlarda iyileşme oranı oldukça yüksektir. Kalıtsal kansere yatkınlık bazı ongenlerde, tümör baskılayıcı genlerde, genomik instabilite ile oluşan mutasyonlar sonucunda ya da yanlış eşleşme onarımından sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda görülür. Solid tümörler dâhil pek çok farklı kanser türlerinde hastalığın tanısı ve tedavinin yönlendirilmesi için günümüzde kullanılan pek çok farklı teknik vardır. Çeşitli kanser türlerinde özellikle de hematolojik malignitelere, sitogenetik analizler ön plana çıkmaktadır.

Sporadik veya kalıtsal kanser, çoklu genetik değişikliklerle gelişen genetik bir hastalıktır. Spesifik genetik kusurların, çeşitli neoplazi türlerinin yatkınlığı, oluşumu, ilerlemesi ve metastazı ile rastgele olmayan bir şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, bu genetik değişikliklerin doğru ve verimli bir şekilde sitogenetik analiz ile tanımlanması, insan neoplazisinin erken teşhisine, prognozuna ve terapötik tedavisine yardımcı olabilir. Son zamanlarda, çeşitli moleküler sitogenetik metodolojilerin geliştirilmesi, kanser sitogenetiğinin temel araştırmalarını ve klinik uygulamalarını kolaylaştırmıştır.

Bu bölümde, çeşitli konvansiyonel ve moleküler sitogenetik metodolojilerin avantajları ve sınırlamaları ve bazı hematolojik malignitelere tedaviye yönelik klinik uygulamaları anlatılmaktadır.

Sitogenetik

Sitogenetik, somatik hücre bölünmesi sırasında kromozom yapısı ve özelliklerinin incelenmesidir. Klinik sitogenetik ise bu yapıların kalıtımlarını genetik çerçevesinde inceleyen bir bilim dalıdır. Kromozomlardaki sayısal ya da yapısal değişikliklerin fenotipe yansıdığını ve bazı klinik durumlara neden olduğunu biliyoruz. Bugün çok daha yüksek çözünürlük ve ileri teknolojiler kullanarak bu değişimlerin analizine imkân tanıyan moleküler sitogenetik yöntemlerin klinik tıbbın pek çok alanında tanısal yöntem olarak kullanılması, sitogenetiğin önemini göstermektedir.

Tanısal rutin testlerde kromozomlardaki değişiklikleri gözlemlemek için kromozom analizi yapılmaktadır. Bu analiz için ilk in vitroda çoğalabilen ve hızlı bölünen hücreler tercih edilmektedir. Bu özellikleri taşıyan ve en

kolay elde edilebilen hücreler beyaz kan hücreleri özellikle T-lenfositleridir. Kültürde çoğaltabilmek için bir miktar periferik kan örneğinin Heparin'le yıkanmış enjektöre alınması yeterli olacaktır. Bu hücreler doku kültürü yapılmak üzere tüplere alınarak uygun koşullarda ve uygun besi yerinde çoğalmaları teşvik edilerek analize hazırlanmalıdır.

Kromozom analizleri, herhangi bir anomali içermeyen kromozomlar sabit bir morfoloji ve boyuta sahip olduğundan, genetik hastalıklar, ya da hematolojik maligniteler gibi kromozom anomalilerine bağlı sendromlar hakkında ya da düşükle sonuçlanan gebeliklerle ilgili bize değerli bilgiler sağlar. Döllenmedeki başarısızlıkların nedenleri, konjenital malformasyonlar, cinsiyet tayini, kalıtsal hastalıklar ve kanser taramalarının bir kısmı bu analiz sayesinde belirlenebilmektedir.

Sitogenetik analizi gerektiren bazı klinik endikasyonlar ve bulgular vardır. Bunlara örnek olarak; büyüme geriliği ve gelişme sorunları, yeni doğan (neonatal) ölüm ve ölü doğum, fertilité sorunları, aile öyküsü ve neoplaziler verilebilir. Özellikle neoplazilerde sitogenetik analiz, tanısal ve prognostik bilgi sağlamaktadır. Hastalık durumlarının daha doğru ve spesifik teşhisi ile ilgili bilgilerin sağlanmasında moleküler sitogenetiğin önemli bir katkısı olmuştur. Bu tür bilgilerle hekim, tedaviyi planlamak, prognozu değerlendirmek ve takibi planlamak için daha elverişli bir konumdadır.

Çeşitli lösemilerden lenfomalara ve solid tümörlere kadar geniş bir kanser yelpazesinde kromozomal değişiklikler tespit edilmiştir. Bu sitogenetik değişikliklerin klinik uygulamasına ek olarak, bu değişikliklerden etkilenen spesifik kromozomların veya kromozomal bantların oluşturulması, moleküler biyologların çalışılan koşullardan etkilenen ve muhtemelen sorumlu olan genleri tanımasını, karakterize etmesini ve izole etmesini sağlamıştır. Bu tür bilgiler yalnızca tanısal olarak kullanılmamış, aynı zamanda kanser yatkınlığı için moleküler testlerin geliştirilmesine de imkân sağlamıştır. Tanı koyma konusundaki bu ilerleme, gen veya diğer terapi biçimlerine yönelik yaklaşımlar tasarlamak için temel oluşturacaktır. Tümör oluşumunun genellikle rastgele olmayan kromozomal anormalliklerin ortaya çıkmasıyla ve çok basamaklı bir süreç sonucu hastalığın ortaya çıktığını gösteren pek çok çalışma vardır.

Genel olarak, karsinomlar ve bazı lenfoma türleri kademeli olarak düzenlenmiş genetik değişiklikler süreciyle uyumlu çok sayıda karyotipik değişiklik ile ilişkilidir. Bir hücrenin proliferasyondan malign transformasyona, (kromozomal) invazivliğe ve metastazlara ilerlemesi için karyotipik değişiklikler gereklidir. Bununla birlikte, çoğu lösemi ve sarkomda, tipik olarak translokasyonları ve daha az yaygın olarak lösemi veya sarkom

formunun teşhisi olabilen inversiyonları veya insersiyonları içeren nispeten basit karyotipler de bulunur (Zhong Chen 2019).

Herhangi bir durumda yeni ve ek kromozom değişiklikleri geliştikçe, hastalık ilerleme eğilimi gösterir ve terapötik yaklaşımların buna göre değerlendirilmesi gerektirir.

Hematolojik malignitelerin tanısında farklı sitogenetik teknikler kullanılmaktadır. En sık kullanılanlar konvensiyonel sitogenetik dediğimiz daha çok boyamaya dayalı analizlerdir. Daha kompleks karyotiplerde ise tamamlayıcı olarak ya da daha hassas sonuçlar veren moleküler sitogenetik yöntemler kullanılır. Solid tümörlerde de kullanılabilen bu teknikler hızlı bölünebilen hücrelerde nispeten daha hızlı sonuç verirler.

Konvensiyonel Sitogenetik

G Bantlama

Kromozomların elde edilen bant özellikleri hem fonksiyonel hem de yapısal kompozisyonu yansıtmaktadır. Tüm kromozomlar açık ve koyu renklerde bantlanır. Preparatlar bir proteaz olan tripsin ile muamele edilerek histon ve non-histon proteinler denatüre edilir. Sonuçta proteinlerinden ayrılan DNA Giemsa ile boyanır. G bantlama ile 400-700 arasında bant değerlendirilir. G bantlamada Giemsa yerine Wright ve Leishman boyaarı da kullanılmaktadır. Hematolojik tüm malignitelerde kromozom analizi için en sık kullanılan ve en ekonomik yöntemdir. Bu bantlama ile translokasyon, inversiyon, delesyon gibi kromozomal anomaliler belirlenebilmektedir. Neoplazinin kromo bazı bileşimleri hakkında en temel analizi sağlar ve kanser vakalarının teşhisine, prognozuna ve terapötik değerlendirmesine yardımcı olmak için yaygın olarak klinik sitogenetik laboratuvarlarında kullanılır.

G bandının çözünürlüğü daha küçük gen gruplarının analizi veya karmaşık kromozomal sapmalar için sınırlıdır, ancak G bandından elde edilen sonuçta göre, diğer tamamlayıcı sitogenetik ve moleküler sitogenetik analiz ihtiyacı belirlenebilir.

R- Bantlama (Reverse Bantlama)

R- Bantlama ile G- bantlamanın tam tersi bir bant örneği elde edilir. Ökromatin bölgeler koyu renk veya parlak floresan ile boyanırken, heterokromatin bölgeler ise açık renkli veya mat floresan ile boyanırlar.

Kromozomların uç kısımlarını kapsayan anomalilerin tespitinde ve değerlendirilmesinde kullanılır. R bandının çözünürlüğü G bandınıninkine benzer, ancak ilgili karmaşık prosedürler nedeniyle, R-bandı G-bandından daha az kullanılır.

Q- Bantlama (Quinacrine Bantlama)

Kromozomlar floresan boya ile boyanır. Floresan mikroskopta incelendiğinde parlak olan ve olmayan bantlar gözlenir. Boyama için kullanılan Quinacrine hücre içine girebilen ve potansiyel mutajen bir ajandır. Q-bantlama, hem metafaz hem de interfaz yaymalarında Y kromozomlarının tanımlanmasına yönelik en etkili ve ekonomik yaklaşımlardan birini sağlar.

C-Bantlama ve NOR-Boyama

C-bantlama, yapıcı heterokromatin bölgelerini tanımlarken, NOR boyama kromozomlar üzerindeki aktif nükleolar düzenleyici bölgeleri tanımlar. Hem C-bantlama hem de NOR bantlama paternleri normal kişiler arasında farklılık gösterebilir. Bu nedenle, lösemi vakalarında kemik iliği naklinin sonucunu değerlendirmek için donör ve alıcı hücrelerin polimorfizm analizine uygulanabilirler.

Kardeş Kromatid Değişimi (SCE)

Kromozomlarda meydana gelen kırıkların gösterilmesinde kullanılır. Somatik hücrelerde replikasyon esnasında bir Timidin analogu olan BrDU (Bromodeoksiüridin) tek iplikli DNA'nın yapısına katılır ve bu sayede iki kromatid farklı renkte boyanır. Bu teknik, Bloom sendromu ve xeroderma pigmentosum gibi kansere yatkın hastalıklarda yüksek taban çizgisinin ve indüklenen kardeş kromatid değişimlerinin saptanması için kullanılabilir.

Moleküler Sitogenetik

Floresan in-situ Hibridizasyon (FISH)

Tek başına rutin kromozom bantlama analizi, yapısal anomalilerin kimliği hakkında yalnızca sınırlı bilgi sağlar. Floresans in-situ hibridizasyon (FISH) prosedürlerinin ortaya çıkışı, tamamen yeni bir moleküler sitogenetik alanını başlatmıştır. Bu teknik, yapısal kromozom yeniden düzenlemelerinin tanımlanmasına ve tümör hücrelerinde kırılma noktalarının tanımlanmasına yardımcı olmuştur. FISH ile birleştirilmiş G- bantlama, özellikle karmaşık veya küçük gen dizilerini kapsayan yapısal sapmaların çözülmesinde yararlıdır.

FISH, hangi prob(lar)ın uygulanacağı bilindiği takdirde güçlü bir sitogenetik yaklaşımdır. Bu nedenle, tipik olarak kromozomal anomalilerin doğrulanması için kullanılır. Farklı malignite tipleri için farklı proplar tasarlanmıştır. Bunları üç grupta toplamak mümkündür; tam kromozom boyama probu, sentromere özgü prob ve gen/lokusa özgü prob. Bir translokasyonda belirli kromozomların tutulumunun doğrulanmasında en çok 'tam kromozom boyama probu' kullanılır. Metafaz kromozomlarına

uygulanabilir olduğundan kullanımı yaygındır. ‘Sentromere özgü problu’ FISH, örnekleme boyutunu artıran ve belirli bir kromozomun sayısal sapmalarını doğrulamada en çok yardımcı olan probtur. Hem metafaz yaymalarına hem de fazlar arasındaki nukleuslara uygulanabilir. ‘Gen/lokusa özgü prob(lar)’ ile FISH analizi, çift renkli problemler mevcut olduğunda, olası bir mikrodelsiyon (DiGeorge ve Prader-Willi sendromları), duplikasyon/amplifikasyon ve yapısal yeniden düzenlemelerin saptanması için hem metafazlara hem de interfazlara uygulanabilir. Günümüzde, t(9;22)(q34;q11.2), t(15;17)(q21;q22) ve inv(16)(p13q21) gibi çeşitli hematolojik malignitelere özgü yapısal sapmaların saptanması için çift renkli FISH kitleri mevcuttur. FISH çözünürlüğü, kullanılan prob(lar)ın boyutuna bağlıdır (Nancy Wang 2002).

Flouresan boyalı problemlerin kullanıldığı M-FISH, SKY-FISH, Reverse FISH ve High-Resolution Fiber-FISH gibi farklı FISH teknikleri bulunmaktadır. Özellikle hematolojik malignitelerde hangi tip FISH tekniği uygulanacağı, hastanın anamnezine, sitogenetikçinin tecrübesine, hastanın durumunu iyi analiz etmesine, olası kromozomal anomali kuşkularına ve hangi gen ya da genlerde sapmanın olabileceği öngörüsüne bağlıdır.

Hematolojik Malignitelerde Sitogenetik Analizler ile İlişkili Terapötik Yaklaşımlar

Kanserden korunma ve erken teşhis konusunda önce gözlemlenmesi gereken durum, bireylerin kalıtsal kanser gelişimine yatkınlık taşıyıp taşımadığının belirlenmesi olmalıdır. Son zamanlarda, kronik miyeloid lösemi (KML), akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), miyeloproliferatif neoplazm (MPN), kronik lenfoblastik lösemi (KLL), malign lenfoma ve multipl miyelom dahil olmak üzere hemen hemen tüm hematolojik maligniteler için moleküler hedefleme tedavisinde büyük ilerlemeler gözlemlenmiştir. Bu başarılı ilerlemeler, yeni nesil sekans (NGS) dahil olmak üzere yüksek verimli genetik/epigenetik analiz teknolojileri kullanılarak birkaç on yıl boyunca hematolojik malignitelerdeki “çok aşamalı tümörojenez” olarak adlandırılan birçok genetik/epigenetik olayın birikimi yoluyla geliştiği ve büyüdüğü gösterilmiştir. Tanı için kullanılan sitogenetik analiz yöntemlerinin yanında yeni nesil dizileme (tüm ekson dizilemesi-WES ya da yeni nesil sekanslama-NGS) yöntemleri de sıklıkla kullanılmaktadır (Akira Shimada 2019).

Tanıdan tedaviye giden bu yolda, hastalığın moleküler mekanizmasını anlamak ve gen/lokuslardaki sapmaları tanımlamak buna uygun tedavi protokolleri belirlemek açısından önemlidir.