

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**OPERE KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER KARSİNOMUNDA LENF
NODLARINDA MİKROMETASTAZ VARLIĞININ MOLEKÜLER
YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI VE PROGNOZA ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Gülnar FATALİZE

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Murat KARA

İSTANBUL
2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemedi benimsen paylaştan, akademik ve mesleki gelişimimde kıymetli katkıları bulunan Anabilim Dalı Başkanımız, tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Murat KARA'ya,

Emekli Anabilim Dalı Başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Alper TOKER'e,

Asistanlık eğitimimde mesleki ve kişisel özellikleriyle bana örnek olarak meslek hayatımda büyük katkıları olan sayın hocam Prof. Dr. Adalet DEMİR'e,

Kendisinden çok şey öğrendiğim ve meslek hayatımda yetişmemi sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Berker ÖZKAN'a,

Eğitimim boyunca, sahip olduğu mesleki bilgi ve deneyimlerini samimiyetle paylaşarak bana yol gösteren, kıymetli ağabeyim Op. Dr. Salih DUMAN'a,

Asistanlık sürecimin başından itibaren, her zaman bana destek olan değerli ağabeyim Op. Dr. Fahmin AMİROV'a,

Uzmanlık eğitimim sürecini daha anlamlı kılan, bu sürecin güzelliklerini ve zorluklarını paylaşarak, çalışma ortamını daha samimi ve keyifli hale getiren değerli meslektaşlarım Op. Dr. Melike Güler ÜLKER, Op. Dr. Eren ERDOĞDU, Op. Dr. Melek AĞKOÇ, Dr. Şeyhmus ÇUHATUTAR, Dr. Berna KARATAŞ, Dr. Ömer Faruk AYDOĞAN ve Dr. Rasim KASSIM Dr. Tuğba ÇETİN'e;

Kısa dönem olsa bile, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Ramazan ÖZTÜRK ve Dr. Merve KESER'e,

Çalışma ortamımızı güzelleştiren İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nın tüm hemşirelerine, sekreterlerine ve personellerine;

Tezimde bana yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Şeref Buğra TUNÇER'e, Öğr. Gör. Doğu VURALLI BAKKALOĞLU'na,

Fikir ve önerileriyle tez yazımının her aşamasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Jamila BAYRAMOVA ve Aynur ABDULOVA'ya,

Ve her zaman yanımda olan sevgili annem Mehriban FATALİYEVA ve babam Nabi FATALİYEV başta olmak üzere canım ailem ve sevgili arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40236

Dr. Gülnar FATALİZADE

İstanbul Üniversitesi, 2024

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLOLAR DİZİNİ.....	VIII
ETİK KURUL ONAYI	IX
DESTEK BİLDİRİMİ	XI
ÖZET	XII
ABSTRACT	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK).	3
2.2. Evreleme ve TNM Sınıflandırması (TNM 9).	5
2.3. Lenf Nodu Diseksiyonu ve Önemi.	7
2.3.1. Mediastinal Lenf Nodu Haritası	7
2.3.2. Akciğerlerin Mediastinal Lenf Nodlarına Drenajı	11
2.3.3. Mediastinal Lenf Nodu evrelemesinde kullanılan teknikler	12
2.3.3.1. Görüntüleme Teknikleri	12
2.3.3.1.1. Bilgisayar Tomografisi (BT)	12
2.3.3.1.2. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET-BT).	12
2.3.3.1.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)	13
2.3.3.2. Endoskopik Teknikler	13
2.3.3.3. Cerrahi Teknikler	14
2.3.4. N sınıflandırmasının prognoza etkisi (TNM 9)	15
2.3.5. Lenf Nodu Evrelemesinde Yenilikler	16
2.3.5.1. TNM 9 Evreleme Sisteminin Etkisi	16
2.3.5.2. Robotik Cerrahi.	16
2.3.5.3. Lenf Nodu Disseksiyonunun İmmunobiyolojik Etkileri.	17

2.4. Lenf Nodlarında Mikrometastaz (LNMM).	17
2.4.1. Mikrometastaz tespiti için kullanılan teknikler	18
2.4.1.1. Yeni Nesil Teknolojiler ve dPCR.	18
2.4.1.2. dPCR'ın Avantajları ve Uygulamaları	19
2.4.2. Mikrometastaz Tespiti için Biyobelirteçler	19
2.4.2.1. Claudin-4 (CLDN4).	19
2.4.2.2. EpCAM.....	20
2.4.3. Mikrometastazın prognostik önemi.	20
3. HASTALAR ve YÖNTEM	22
3.1. Deneysel Yöntemler	23
3.1.1. RNA izolasyonu.....	23
3.1.2. cDNA Sentezi.....	25
3.1.3. Nanoplaka tabanlı dPCR.....	25
3.2. İstatistiksel Yöntemler.....	26
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA.....	39
5.1. Kısıtlılıklar.....	42
6. SONUÇ	44
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGİ VE KISALTMALAR

AJCC:	American Joint Committee on Cancer (Amerikan Kanser Ortak Komitesi)
ATS:	American Thoracic Society (Amerikan Toraks Derneği)
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
CLDN4:	Claudin-4
DFS:	Disease-Free Survival (Hastalıksız Sağkalım)
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
dPCR:	Dijital PCR
EBUS:	Endobronşiyal Ultrason
EpCAM:	Epithelial Cell Adhesion Molecule (Epitel Hücre Adezyon Molekülü)
EUS:	Endoskopik Ultrason
EUS-FNA:	Endoskopik Ultrason Rehberliğinde İnce İğne Aspirasyonu
FFPE:	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (Formalin Fikse Parafine Gömülü)
H&E:	Hematoksilen ve Eozin (boyama yöntemi)
IASLC:	International Association for the Study of Lung Cancer (Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırma Derneği)
IHC:	İmmünohistokimya
KHDAK:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
LNMM:	Lenf nodu Mikrometastazı
MM:	Mikrometastaz
MRG:	Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA:	Messenger Ribonükleik Asit
NGS:	Next-Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
NPV:	Negative Predictive Value (Negatif Prediktif Değer)
NSCLC:	Non-Small Cell Lung Cancer
OS:	Overall Survival (Genel Sağkalım)
OSNA:	One Step Nucleic Acid Amplification
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD-L1:	Programmed Death-Ligand 1
PET-BT:	Pozitron Emisyon Tomografisi ve Bilgisayarlı Tomografi
RT-qPCR:	Reverse Transcription Quantitative PCR
RATS:	Robot-Assisted Thoracic Surgery (Robot Yardımlı Torasik Cerrahi)
SCC:	Skvamöz Hücreli Karsinom
STAS:	Spread Through Air Spaces (Hava Boşlukları Yoluyla Yayılım)
SUVmax:	Maximum Standardized Uptake Value (Maksimum Standardize Edilmiş Alım Değeri)
TBNA:	Transbronşiyal İğne Aspirasyonu
TDLN:	Tümör Drenaj Lenf nodları
TEMLA:	Transservikal Genişletilmiş Mediastinal Lenfadenektomi
VAMLA:	Video-Assisted Mediastinoscopic Lymphadenectomy (Video Yardımlı Mediastinoskopik Lenfadenektomi)
VATS:	Video-Assisted Thoracic Surgery (Video Yardımlı Torasik Cerrahi)
WHO:	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Akciğer kanserine bağlı güncel istatistik verileri	4
Şekil 2. IASLC Lenf Nodu Haritası	8
Şekil 3. TNM 9. baskısında güncellenen yenilikler	16
Şekil 4. RNEasy FFPE Prosedürü	24
Şekil 5. ROC eğrisi (Recevier Operating Characteristic/ Alıcı İşletim Karakteristiği). ROC Analiz Sonucu	27

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. T (Primer Tümör) Kategorisi	5
Tablo 2. N- Bölgesel lenf nodları	6
Tablo 3. M – Uzak metastaz.....	6
Tablo 4. Evreleme (TNM 9)	7
Tablo 5. Lenf nodlarının anatomik bölgeleri.....	9
Tablo 6. Lenfatik Drenaj.....	11
Tablo 7. N1 Lenf nodlarında Mikrometastaz ile klinikopatolojik özelliklerin ilişkisinin 5 yıllık hastalıklı ve genel sağkalım sonuçları.....	29
Tablo 8. Cox proportional - Hazards modelinde univariant analiz ile HASTALIKSIZ sağkalıma etkili prognostik faktörleri-N1.....	32
Tablo 9. Cox proportional - Hazards modelinde univariant analiz ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörleri-N1	33
Tablo 10. Cox proportional – Hazards modelinde multivariant analiz ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörleri-N1.....	33
Tablo 11. N2 Lenf nodlarında mikrometastaz ile klinikopatolojik özelliklerin ilişkisinin 5 yıllık hastalıklı ve genel sağkalım sonuçları.....	34
Tablo 12. Cox proportional- Hazards modelinde univariant analiz ile HASTALIKSIZ sağkalıma etkili prognostik faktörleri-N2.....	36
Tablo 13. Cox proportional - Hazards modelinde univariant analiz ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörleri-N2	37
Tablo 14. Cox proportional - Hazards modelinde multivariant analiz ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörleri-N2.....	38

ETİK KURUL ONAYI

Tarih ve Sayı: 26.05.2023-1779044

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ FİZİK TEDAVİ BİNASI KAT:2 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Opere Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda lenf nodlarında mikrometastaz varlığının moleküler yöntemle araştırılması ve prognoza etkisi"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Murat KARA			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Göğüs Cerrahisi			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ □	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI □

Tarih ve Sayı: 26.05.2023-1779044

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Opere Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda lenf nodlarında mikrometastaz varlığının moleküler yöntemle araştırılması ve prognoza etkisi"
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	14.04.2023		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐				
	SİGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐				
	İLAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Olgular Raporu, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV			
	KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 10	Tarih: 12/05/2023			
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Murat KARA' nın sorumluluğunda ve Dr. Gülnar FATALİZADE' nin yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI			İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof. Dr. Fatma Aytül UYAR	Fizyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza

Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 4 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.
"Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında çalışmaya katılan gönüllülerin verilerinin korunması ile ilgili tedbirleri almak Araştırmacının sorumluluğundadır"

DESTEK BİLDİRİMİ

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40236



ÖZET

Amaç: Çalışmamız, opere edilen Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarında lenf nodlarındaki mikrometastaz (MM) varlığını dijital polimeraz zincir reaksiyonu (dPCR) yöntemiyle tespit etmeyi, bu durumun genel sağkalım (OS) ve hastalıksız sağkalım (DFS) üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 2019-2022 yılları arasında opere edilen ve patolojik olarak N0 olarak değerlendirilen 44 KHDAK hastası dahil edilmiştir. EpCAM ve Claudin-4 gen ekspresyonları dPCR ile analiz edilerek MM varlığı tanımlanmıştır. Sağkalım analizleri Kaplan - Meier yöntemiyle yapılmıştır ve MM'nin prognostik etkisi Cox regresyon modeli ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: N1 lenf nodlarında MM oranı % 29, N2 lenf nodlarında ise % 20 olarak saptanmıştır. Beş yıllık OS, N1 lenf nodlarında MM pozitif olanlarda % 90, negatif olanlarda % 96 olarak tespit edilmiştir ($p > 0.1$). N2 lenf nodlarında ise bu oranlar sırasıyla % 100 ve % 93'tür ($p > 0.1$). Beş yıllık DFS, N1 bölgesinde MM pozitif grupta % 70, negatif grupta % 68 olarak bulunmuştur ($p > 0.1$). N2 bölgesinde MM pozitif grupta DFS % 100 iken negatif grupta % 74 olarak gözlenmiştir ($p = 0.170$). STAS varlığı ve vasküler invazyon gibi ek klinikopatolojik özellikler sağkalımı olumsuz etkilemiştir. MM'nin genel veya hastalıksız sağkalım üzerinde bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterilememiştir.

Sonuç: Dijital PCR yöntemi, KHDAK hastalarında lenf nodu mikrometastazlarının hassas ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesini sağlamaktadır. Ancak MM varlığının sağkalım üzerindeki etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. STAS ve vasküler invazyon gibi faktörlerin sağkalım üzerindeki etkileri dikkat çekmektedir. Bu sonuçlar, MM'nin prognostik önemini daha geniş örneklemlemlerle araştıran ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40236

ABSTRACT

Objective: Our study aims to detect the presence of lymph node micrometastases (LNMM) using the digital polymerase chain reaction (dPCR) method in surgically treated non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and to evaluate its impact on overall survival (OS) and disease-free survival (DFS).

Materials and Methods: The study included 44 NSCLC patients who underwent surgery between 2019 and 2022, were pathologically classified as N0. EpCAM and Claudin-4 gene expressions were analyzed using dPCR to define the presence of MM. Survival analyses were performed using the Kaplan - Meier method, and the prognostic significance of MM was evaluated with the Cox regression model.

Results: The rate of MM in N1 lymph nodes was found to be 29%, and in N2 lymph nodes, 20%. The five-year OS was 90% in MM-positive N1 nodes and 96% in MM-negative N1 nodes ($p > 0.1$). For N2 nodes, the OS rates were 100% and 93%, respectively ($p > 0.1$). The five-year DFS in the MM-positive group was 70% for N1 nodes and 68% for MM-negative N1 nodes ($p > 0.1$). In the N2 region, the DFS was 100% in the MM-positive group and 74% in the MM-negative group ($p = 0.170$). Additional clinicopathological features such as the presence of STAS and vascular invasion adversely affected survival. MM was not shown to be an independent prognostic factor for OS or DFS.

Conclusion: The digital PCR method provides a sensitive and reliable means for detecting lymph node micrometastases in NSCLC patients. However, the presence of MM did not have a statistically significant impact on survival outcomes. The effects of factors such as STAS and vascular invasion on survival were notable. These findings underscore the need for further studies with larger sample sizes to better elucidate the prognostic significance of MM.

This study was supported by the Scientific Research Projects Unit of Istanbul University. Project ID: 40236

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebeplerindendir. Günümüzde erken evre akciğer kanseri tanısı alan hastaların yaklaşık % 20'sinde, tümör rezeksiyonunu takiben iki yıl içinde nüks gözlenmektedir. Bu hastalarda 5 yıllık sağkalımın % 60-70 olduğu bilinmektedir [1].

Erken evre akciğer kanseri vakalarında tümör rezeksiyonu sonrası prognozu belirleyen en önemli faktörlerden biri lenf nodu metastazlarının değerlendirilmesidir. Lenf nodu metastazları, kanserin evrelemesinde ve adjuvan tedavi kararlarının alınmasında kritik bir rol oynamaktadır. TNM evreleme sisteminde, "N" durumu, lenf nodu metastazının varlığını gösterir. N0, lenf nodu metastazı saptanmayan hastaları ifade ederken, N1-3, lenf nodu metastazı tespit edilen hastaları tanımlar. N durumu ne kadar yüksekse, primer tümörden olan yayılım o kadar uzak ve prognoz o kadar kötüdür. Bu nedenle nodal hastalığın patolojik olarak doğru değerlendirilmesi evrelemede çok önemlidir [2].

Lenf nodu mikrometastazı (LNMM), erken nüks ile ilişkilendirilmektedir. Mikrometastatik tümör hücreleri, metastatik tümör hücresinin boyutuna bağlı olarak 0.2 mm'den büyük, ancak 2.0 mm'den küçük hücre kümeleri olarak tanımlanır. İzole tümör hücreleri ise, 0.2 mm'den küçük olan kümeler ve tek hücreler olarak tanımlanmaktadır [3].

LNMM güncel incelemeler ve geleneksel histopatolojik tekniklerle saptanamayabilir. İmmünohistokimya (IHC), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), akış sitometrisi ve tek aşamalı nükleik asit amplifikasyonu (OSNA) gibi moleküler teknikler, MM'ların daha hassas bir şekilde saptanmasında kullanılmaktadır [4].

MM'ların hayatta kalma süresi üzerindeki etkisi henüz belirsizdir. Kanser hastalarında erken evrede MM'ların tespit edilmesi, hastalığın yönetimi açısından büyük önem taşımaktadır. Yeni moleküler yöntemlerin kullanımı, tedavi stratejilerinin belirlenmesi açısından değerli olacaktır.

Ters transkriptaz kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) gibi moleküler yöntemlerin, kolorektal, meme ve prostat kanseri gibi diğer kanser türlerinde MM tespiti konusunda immünohistokimyasal çalışmalara (IHC) göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. Dijital PCR'nin MM tespiti için duyarlılığı ise, şu anda yaygın olarak kullanılan IHC, RT-PCR ve OSNA yöntemlerinden çok daha yüksektir [5].

Araştırmamızın amacı, opere KHDAK'li hastalarda Dijital polimeraz zincir reaksiyonu dPCR ile saptanan LNMM'nin cerrahi rezeksiyondan sonra genel sağkalım (OS) ve hastalıksız sağkalım (DFS) ile ilişkili olup olmadığını, aynı zamanda LNMM'nin klinik etkisini araştırmaktır. Bu çalışma ile erken evre akciğer kanserinde MM saptanan vakaların nüks ile ilişkisinin olması halinde erken evre akciğer kanserinde adjuvan onkolojik tedavi ve postoperatif takip protokolünün yeniden planlanması amaçlanmaktadır. Çalışmamız KHDAK kanserinde LNMM'nin moleküler yöntemle araştırılması açısından yapılan dünya literatüründeki sınırlı çalışmalardan biridir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

Akciğer kanseri, dünyada en sık görülen ikinci malign tümördür ve kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir. KHDAK, tüm akciğer kanseri vakalarının % 85' ini oluşturmaktadır. Yeni KHDAK vakalarının yaklaşık % 30'u lokal ileri evrede tanı alır [1].

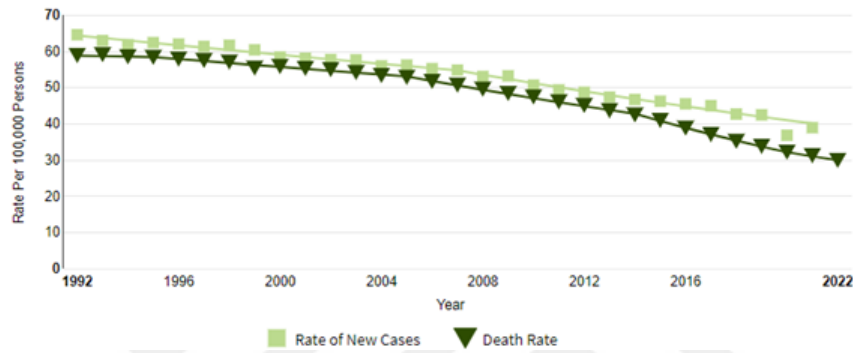
Son on yılda, akciğer kanserinin tanı ve tedavisinde gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmeler hastaların hayatta kalma oranını artırmış ve akciğer kanserine bağlı ölüm oranlarını azaltmıştır. Amerikan Kanser Derneği verilerine göre, son beş yılda kansere bağlı ölüm oranlarındaki genel düşüş saptanan olguların neredeyse yarısını akciğer kanserli olgular oluşturmaktadır. Bu olumlu klinik sonuçlara pek çok faktör katkıda bulunmaktadır. Özellikle, 2011 yılında IASLC/ATS/ERS tarafından ve 2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan yeni sınıflandırmalar, KHDAK tedavisinde önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu sınıflandırmalar, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi için moleküler ve biyobelirteç testlerinin kullanımını teşvik ederek doğru tanı konmasını ve hastalara özgü tedavi seçeneklerinin belirlenmesini sağlamıştır [6].

Şekil 1. Akciğer kanserine bağlı güncel istatistik verileri (Yeni vakalar SEER 12 kayıtlarından, ölüm oranları ise ABD Mortality veritabanından alınmıştır.)

At a Glance

Estimated New Cases in 2024	234,580
% of All New Cancer Cases	11.7%
Estimated Deaths in 2024	125,070
% of All Cancer Deaths	20.4%

5-Year Relative Survival
26.7%
2014–2020



Bununla birlikte, akciğer kanseri hala dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Akciğer kanseri hastalarında 2013-2019 arası 5 yıllık genel sağkalım oranı % 25 olarak rapor edilmiştir. Bu oran, hastaların tanı aldıkları evreye göre önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Lokal evrede % 63, bölgesel evrede % 35 ve uzak evrede % 8'dir. KHDAK hastalarının sağkalım süresi hastalığın tanı anındaki evresine göre değişmektedir [6, 7].

WHO ve IASLC tarafından 2021'de yayımlanan son sınıflandırmaya göre, adenokarsinom KHDAK'nin en yaygın alt tipi olup, bu alt tip tüm vakaların yaklaşık % 40'ını oluşturur. Adenokarsinom, genellikle sigara içmeyenlerde ve genç hastalarda daha sık görülür. Glandüler hücrelerden köken alır ve çoğunlukla sürfaktan üreten hücrelerden gelişir. Diğer yandan, skuamöz hücreli karsinom (% 25), Türkiye'de en yaygın görülen akciğer kanseri alt tipidir ve özellikle erkeklerde ve sigara içen bireylerde daha yaygındır. Skuamöz hücreli karsinomlar, genellikle santral yerleşim gösterir ve düzensiz çoğalan yassı hücrelerle karakterizedir [8, 9].

KHDAK'nin diğer alt tipleri arasında büyük hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, sarkomatoid karsinomlar, tükürük bezi tipi tümörler, karsinoid tümörler ve sınıflandırılmamış karsinomlar yer alır. Bu farklı alt tipler, her biri kendine özgü histopatolojik ve klinik özellikler gösteren çeşitli alt gruplara ayrılabilir. Bu sınıflamalar, KHDAK'nin tedavi planlarının oluşturulmasında ve hastaların prognozlarının değerlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Her bir alt tipin histopatolojik analizi ve moleküler biyobelirteç analizi kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

2.2. Evreleme ve TNM Sınıflandırması (TNM 9)

TNM sınıflaması, Amerikan Kanseri Derneği (AJCC) ve Uluslararası Akciğer Kanseri Derneği (IASLC) tarafından kanserin evresini belirlemek ve tedavi planlamasında rehberlik etmek amacıyla oluşturulmuştur. Bu sistem, T (Tümör), N (Nod) ve M (Metastaz) olarak üç ana bileşenden oluşmaktadır. T, tümörün boyutunu ve yerleşimini ifade eder. T0, tümörün var olmadığını, T1-T4 ise tümörün büyüklüğünü ve invazyon derinliğini gösterir. N, lenf nodlarındaki durumu belirtir. N0, lenf nodlarında metastaz olmadığını, N1-N3 ise metastazın sayısını ve yerini tanımlar. M, uzak metastaz varlığını ifade eder. M0, uzak metastazın olmadığını, M1 ise uzak metastazın bulunduğunu gösterir. TNM 9. sınıflaması, aşağıda yer alan tablolarda kapsamlı bir şekilde açıklanmıştır [10].

Tablo 1. T (Primer Tümör) Kategorisi.

Tx	Primer tümör değerlendirilemediği veya malign hücrelerin balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile saptanamadığı durumlar.
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 akciğere veya visseral plevraya ilerlemeyen, en geniş çapı ≤ 3 cm olan tümör. ○ T1mi: Minimal invaziv adenokarsinom ○ T1a: Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm. ○ T1b: Tümörün en geniş çapı > 1 cm, ≤ 2 cm. ○ T1c: Tümörün en geniş çapı > 2 cm, ≤ 3 cm.

T2	Tümörün en geniş çapı $> 3 \text{ cm}$, $\leq 5 \text{ cm}$ veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör: ○ Karina'ya invaze etmeden, ana bronş tutulumu. ○ Visseral plevra invazyonu. ○ Hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni. T2a: Tümörün en geniş çapı $> 3 \text{ cm}$, $\leq 4 \text{ cm}$. T2b: Tümörün en geniş çapı $> 4 \text{ cm}$, $\leq 5 \text{ cm}$
T3	Tümörün en geniş çapı $> 5 \text{ cm}$, $\leq 7 \text{ cm}$ veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon: ○ Göğüs duvarı, frenik sinir, pariyetal plevra, perikard. ○ Primer tümörle aynı lobda nodül(ler).
T4	Tümörün en geniş çapı $> 7 \text{ cm}$ veya aşağıdaki yapılardan birine invazyon: ○ Diyafram, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra korpusu, karina. ○ Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül(ler).

Tablo 2. N- Bölgesel lenf nodları.

Nx	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1	İpsilateral peribronsiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve/veya intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2a	İpsilateral tek istasyon mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodu metastazı
N2b	İpsilateral çoklu istasyon mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarına metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf bezlerine metastaz

Tablo 3. M – Uzak metastaz.

M0	Uzak metastaz yok										
M1	<table> <tr> <td></td><td>Uzak metastaz var</td></tr> <tr> <td>M1a</td><td>Karşı akciğerde metastatik nodül(ler), plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon</td></tr> <tr> <td>M1b</td><td>Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz</td></tr> <tr> <td>M1c1</td><td>Bir organda multipl ekstratorasik metastaz</td></tr> <tr> <td>M1c2</td><td>Birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz</td></tr> </table>		Uzak metastaz var	M1a	Karşı akciğerde metastatik nodül(ler), plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon	M1b	Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz	M1c1	Bir organda multipl ekstratorasik metastaz	M1c2	Birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz
	Uzak metastaz var										
M1a	Karşı akciğerde metastatik nodül(ler), plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon										
M1b	Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz										
M1c1	Bir organda multipl ekstratorasik metastaz										
M1c2	Birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz										

Tablo 4. Evreleme (TNM 9)

TABLE TNM stage grouping according to the proposed 9 th edition of the TNM classification of lung cancers						
T/M	Label	N0	N1	N2		N3
				N2a	N2b	
T1	T1a ≤ 1 cm	IA1	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1b > 1 to ≤ 2 cm	IA2	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1c > 2 to ≤ 3 cm	IA3	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2a > 3 to ≤ 4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2b > 4 to ≤ 5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
T3	T3 > 5 to ≤ 7 cm	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Invasion	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Satellite nodules	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 > 7 cm	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 Invasion	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 Ipsilateral nodules	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
M1	M1a Contralateral nodules	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a Pleural, pericardial effusion	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b Single extra-thoracic lesion	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c1 Multiple extra-thoracic lesions in a single organ system	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB
	M1c2 Multiple extra-thoracic lesions in multiple organ systems	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB

2.3. Lenf nodu Diseksiyonu ve Önemi

KHDAK olan ve sistemik metastazı olmayan hastalarda mediastinal evreleme, hastalığın yayılımı hakkında doğru bilgi sağlaması, tedavi seçimine yön vermesi ve hastanın prognozunu belirlemesi açısından kritik öneme sahiptir [11].

2.3.1. Mediastinal Lenf nodu Haritası

IASLC tarafından 2016 yılında yayınlanan TNM 8. Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi, mediastinal ve supraklaviküler lenf nodu bölgelerinde detaylı sınıflandırmalar yaparak kanser yayılımının daha doğru tespit edilmesine olanak tanımaktadır.

Şekil 2. IASLC Lenf nodu Haritası.

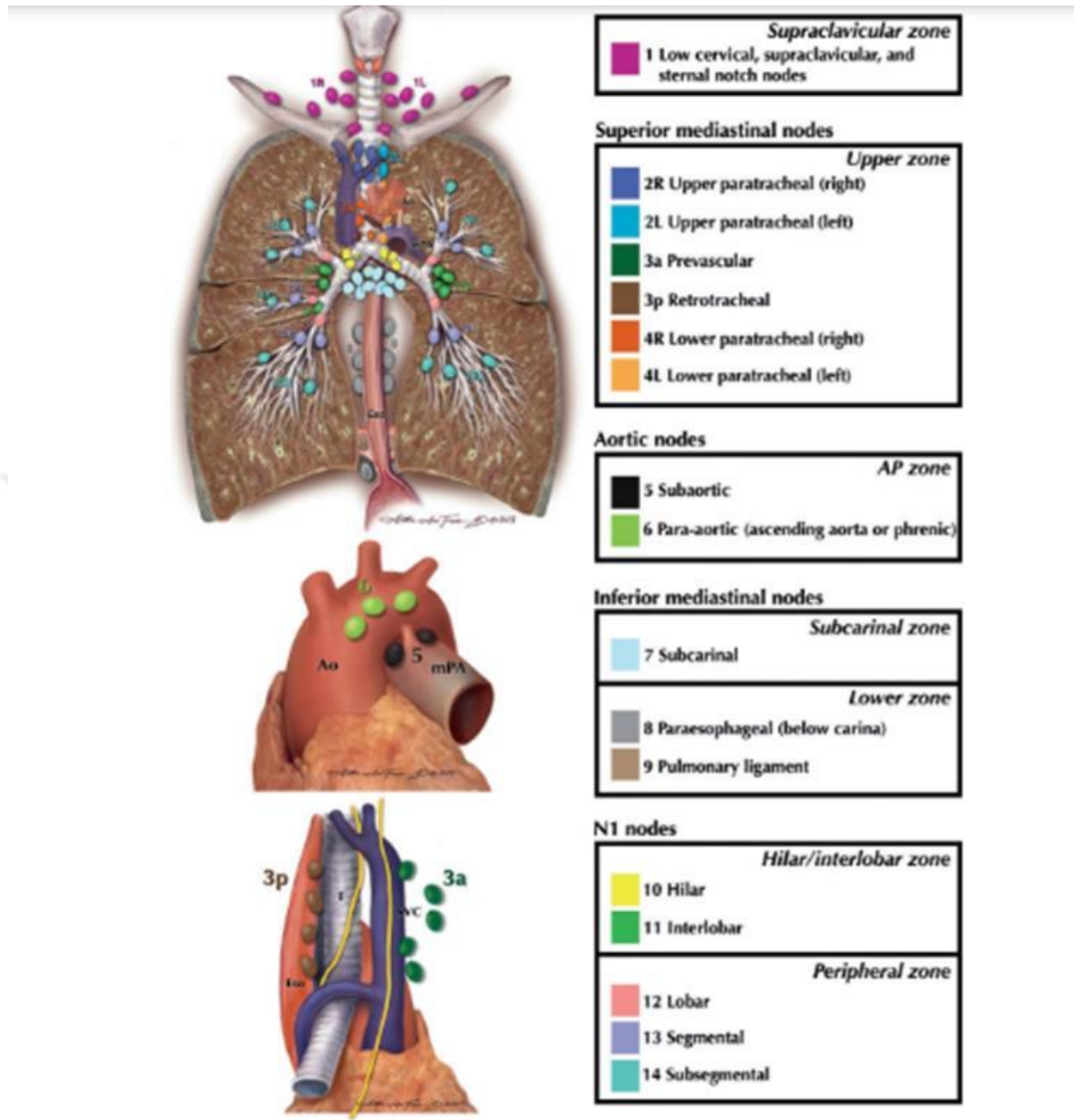


Figure 1: The IASLC lymph node map including the proposed grouping of lymph node stations into 'zones' for the purposes of prognostic analysis (Rusch et al [3] with permission).

Torasik lenf düğümleri, onkolojik evreleme amaçlı 14 istasyona bölünmüştür. IASLC lenf nodu haritasında parakardiyak, internal mammarian, diyafragmatik, aksiller ve interkostal lenf nodları tanımlanmamıştır [12]. Bu bölgesel olmayan lenf nodlarının metastatik hastalık olarak kabul edilmesi önerilmektedir [13].

Tablo 5. Lenf nodlarının anatomik bölgeleri

İstasyon	Konum	Üst Sınır	Alt Sınır	Diğer Açıklamalar
1 (sol/sağ)	Alt servikal, supraklaviküler lenf nodu	Krikoid kartilajın alt kenarı	Klavikulalar ve orta hatta manubriumun üst sınırı	Mediasteninin dışındadır ve N3 hastalığı olarak evrelendirilir.
2 (sol/sağ)	Üst paratrakeal lenf nodu	Akciğer apeksi, torasik giriş	2R: Sol brakiosefalik venin kaudal kenarının trakea ile kesişimi, 2L: Aort arkının üst sınırı	2R'nin alt sınırı 4R'ye, 2L'nin alt sınırı 4L'ye bitişiktir.
3A	Pre-vasküler lenf nodu	Toraks girişi	Karina	Büyük damarların önünde (sağda superior vena kava, solda sol common karotid arter), sternumun arkasında
3P	Retrotrakeal lenf nodu	Toraks girişi	Karina	Trakeanın arkasında
4 (sol/sağ)	Alt paratrakeal lenf nodu	4R: Sol brakiosefalik venin kaudal kenarının trakea ile kesişimi, 4L: Aortik arkın üst sınırı	4R: Azigos veninin alt sınırı, 4L: Sol ana pulmoner arterin üst sınırı	Sol ve sağ trakeanın orta hattı boyunca değil, sol lateral sınırı boyunca bölünmüştür.
5	Subaortik lenf nodu (aortopulmoner pencere)	Aort arkının alt sınırı	Sol ana pulmoner arterin üst sınırı	Ligamentum arteriosumun lateralinde

6	Para-aortik lenf nodu	Aortik arkın üst sınırı	Aortik arkın alt sınırı	Asendan aort ve aort arkının ön ve yan tarafları
7	Subkarinal lenf nodu	Karina	Sol: Alt lob bronşunun üst sınırı, Sağ: Intermedier bronşun alt sınırı	
8 (sol/sağ)	Para-özofageal lenf nodu	İstasyon 7 (sol: alt lob bronşunun üst sınırı, sağ: intermedier bronşun alt sınırı)	Diyafram	Karınanın altında
9 (sol/sağ)	Pulmoner ligaman lenf nodu	Alt pulmoner ven	Diyafram	Pulmoner ligamanın içinde yer alır.
10 (sol/sağ)	Hiler lenf nodu	Sağda azigos veninin alt sınırı, solda pulmoner arterin üst sınırı		Ana bronş ve hilus damarlarının hemen bitişiğinde
11	İnterlobar lenf nodu			Lobar bronşların kökeni arasında
12	Lobar lenf nodu			Lobar bronşlara bitişik
13	Segmental lenf nodu			Segmental bronşlara bitişik
14	Subsegmental lenf nodu			Subsegmental bronşlara bitişik

2.3.2. Akciğerlerin Mediastinal Lenf nodlarına Drenajı

Sağ Akciğerin drenajı genellikle tek taraflıdır ve karşı tarafa geçiş nadirdir. Sağ üst lob tümörlerinde karşı mediastene metastaz oranı % 5-9, alt lob tümörlerinde % 5-7' dir.

Sol Akciğerde subkarinal lenf nodları üzerinden karşı tarafa geçiş daha yaygındır. Sol üst lob tümörlerinde % 21-22, alt lob tümörlerinde % 33-40 oranında karşı tarafa metastaz görülür. Tüm sol akciğer kanseri hastalarında karşı tarafa metastaz oranı % 6-11' dir.

Riquet, otopsi çalışmasında subplevral plexus lenfatiklerinin enjeksiyonu yöntemiyle, bronkopulmoner lenf nodlarına uğramadan mediastene metastaz yapan doğrudan lenfatik yolların olduğunu göstermiştir (skip metastaz). Bu hastaların sağ kalımlarının, N1+N2'ye kıyasla daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Bu kanalların çoğu yüzeysel olup, bir kısmı parankimi penetre etmektedir. Her iki akciğerde de bu yolların en sık üst lobdan kaynaklandığı görülmüştür [14].

Tablo 6. Lenfatik Drenaj.

Akciğer Bölgesi	Drenaj Yolu
Sağ Akciğer	
Apikal ve Posterior Segmentler	Hiler lenf nodları → Alt-üst paratrakeal lenf nodları → İpsilateral skalen ve servikal lenf nodları
Anterior Segment	Subkarinal veya anterior mediastinal lenf nodları → İpsilateral paratrakeal ve üst seviyeler; az bir kısmı karşı tarafa
Orta lob	Subkarinal veya ipsilateral trakeobronşiyal lenf nodları → Sağ üst paratrakeal lenf nodları; bir kısmı karşı tarafa geçebilir
Alt Lob	Bronkopulmoner lenf nodları → Subkarinal nodlar → Aynı taraftaki paratrakeal bölge

Sol Akciğer	
Apikoposterior Segment	Subaortik lenf nodu → Sol nervus vagus boyunca sol skalen bölgeye ve sol rekürren sinir boyunca sol üst mediastinal lenf nodları
Anterior Segment ve Lingula	Paraaortik lenf nodu → Sol frenik sinir boyunca sol skalen bölgeye
Superior Segment	Subkarinal bölgeden ve ana bronş boyunca sağ üst paratrakeal lenf nodları ve trakeanın solu boyunca sol üst mediastinal bölge
Commonbazal Segment	Sol ana bronş altından subkarinal bölgeye → Karşı tarafa paratrakeal bölgeye; bir kısmı trakeanın solu boyunca üst mediastinal lenf nodlarına

2.3.3. Mediastinal lenf nodu evrelemesinde kullanılan teknikler

2.3.3.1. Görüntüleme Teknikleri

2.3.3.1.1. Bilgisayarlı Tomografi (BT)

Akciğer kanserinin erken teşhisinde en yaygın kullanılan yöntemdir. Yüksek çözünürlükte kesitsel görüntüler sağlar ve tümörlerin boyutunu, yerini ve yayılma durumunu değerlendirmede yardımcı olur. Duyarlılığı % 55 ve özgüllüğü % 81'dir [15].

2.3.3.1.2. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET- BT)

PET taraması, kanser hücrelerinin metabolik aktivitesini gösterir. Genellikle BT ile birlikte kullanılarak tümörlerin ve metastazların yayılmasını daha ayrıntılı bir şekilde görüntülemeye yardımcı olur. BT'ye PET'in eklenmesiyle lenf nodu evrelemesinde % 80-90 duyarlılık ve % 85-95 özgüllük elde edilir. PET-BT, özellikle periferik yerleşimli KHDAK'da mediastinal nodal hastalığın tespiti için yüksek bir negatif prediktif değere (NPV) sahiptir. BT'de N1 hastalığı olan hastaların % 30'u patolojik olarak N2-N3 hastalığına sahip olabilir. PET-BT'nin, ≤ 3 cm tümörler için NPV'si % 94, > 3 cm tümörler için ise % 89'dur. Periferik tümörler (≤ 3 cm) için daha ileri mediastinal evreleme gerekmezken, > 3 cm tümörler ve santral yerleşimli tümörler için ileri mediastinal evreleme teknikleri düşünülmelidir [16].

2.3.3.1.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

MRG, akciğer kanserini değerlendirmede küçük lezyonların tespitinde hassasiyeti düşük olduğundan ilk tercih olmasa da, özellikle tümörün göğüs duvarı, diyafram, mediasten ve vertebra invazyonunu değerlendirmede, uzak metastazların tespitinde önemli rol oynar [17].

2.3.3.2. Endoskopik Teknikler

Transbronşiyal İğne Aspirasyonu (TBNA) yaklaşık otuz yıldır var olmasına rağmen, klinik uygulamada yeterince kullanılmamaktadır. TBNA'nın klinik N2 hastalığındaki duyarlılığı % 78, yanlış negatiflik oranı % 28'dir. TBNA, N3 hastalığının tespitinde faydalı olabilir ancak N2 hastalığını dışlamada yetersizdir [18].

EBUS ve EUS, genellikle lokal anestezi ve orta derecede sedasyonla yapılır. EBUS, 2R/2L, 4R/4L, 7, 10, 11 ve 12 numaralı lenf nodu istasyonlarını görselleştirirken, EUS özellikle 4L, 7, 8 ve 9 numaralı istasyonlardaki lenf nodlarını görselleştirir. Kısa eksen >5 mm olan lenf nodlarını görüntülemek ve örneklemek mümkündür. Optimal aspirasyon sayısı istasyon başına 3' dür. Sistemik nodal örneklem yapılabilir ve genellikle hasta başına ortalama 3-4 mediastinal nodal istasyon örneklenir. Buna ek olarak, 4R, 4L ve 7 numaralı istasyonlar daima örneklenmelidir [19, 20].

EUS-FNA, EBUS-TBNA ve kombine EUS+EBUS'un duyarlılığı % 83-94 arasında değişmektedir. ASTER çalışmasının ardından, endosonografi kullanımı artarken, tek başına mediastinoskopi kullanımı azalmıştır. Endosonografi, mediastinoskopi ihtiyacını azaltır, ancak negatif endosonografi sonrası cerrahi evreleme önerilir. Negatif endosonografi sonrası mediastinal nodal tutulum olasılığı % 13-15' tir. EBUS-TBNA ve EUS-FNA, güvenli prosedürler olup minör komplikasyonlar <% 1 oranında bildirilmiştir [21]. MEDIATrial çalışması, EBUS'un, mediastinoskopi ile karşılaştırıldığında lenf nodu metastazlarını tespit etmede yeterli olduğunu ve negatif olduğu durumlarda mediastinoskopinin atlanabileceğini göstermektedir [22].

2.3.3.3. Cerrahi teknikler

Mediastinoskopi, genellikle genel anestezi altında yapılır. Küçük bir kesi ile sternumun üst kısmından bir mediastinoskop yerleştirilir. Video Yardımlı Mediastinoskopi, konvansiyonel mediastinoskopi ile karşılaştırıldığında daha fazla lenf nodu istasyonu örnekleyebilir, ancak duyarlılık ve negatif prediktif değer açısından fark yoktur [23].

VAMLA ve TEMPLA, mediastinal lenf nodlarının çevresindeki yağ dokusuyla birlikte tamamen çıkarılmasını amaçlayan daha radikal evreleme teknikleridir. VAMLA, videomediastinoskop kullanılarak yapılırken, TEMPLA boyunda Collar insizyonu ile başlar. Subplatismal flepler geniş diseke edilerek kas ve vasküler yapılar işlem sırasında daha iyi bir gözlem için serbestleştirilir [24]. Transservikal Genişletilmiş Mediastinal Lenfadenektomi (TEMPLA) yüksek doğruluk oranlarına sahiptir. Duyarlılığı % 95.5, özgüllüğü % 100 ve doğruluğu % 98.3 olarak bildirilmiştir. Ancak, bu teknikler daha yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir ve bu nedenle rutin kullanımları önerilmemektedir [25].

Video Yardımlı Torakoskopik Cerrahi (VATS), hemen hemen her mediastinal lenf nodu istasyonuna ulaşabilir, ancak daha invazivdir. Büyümüş PET pozitif lenf nodlarının biyopsisi için kullanılır ancak sadece aynı taraftaki lenf nodu hastalığını değerlendirebilir. Para-aortik ve subaortik lenf nodları için sol VATS tercih edilir. Duyarlılığı % 67, özgüllüğü % 100 ve NPV'si % 73 olarak bildirilmiştir [23].

2.3.3.3.1. İntraoperatif Lenf nodu Diseksiyon Yöntemleri

Lenf Bezi Örneklemesi, sadece şüpheli görünen lenf bezlerinden biyopsi alınmasıdır.

Sistematik Lenf Bezi Örneklemesi, metastaz ihtimalinin yüksek olduğu tüm ilgili lenf bölgelerinden örnek alınmasıdır.

Komplet Mediastinal Lenf Nodu Diseksiyonu, rezeksiyon yapılan tümör ile aynı hemitoraksta bulunan tüm lenf bezlerinin, etrafındaki yağlı doku ile birlikte parçalanmadan çıkarılmasıdır. Biri subkarinal olmak üzere en az üç mediastinal istasyondan, toplamda en az altı lenf nodunun çıkarılması gerekir.

Loba Spesifik Sistematik Lenf Nodu Diseksiyonu, tümörün yerleştiği loba göre belirlenen lenf bezlerinin çıkarılmasıdır. Sağ üst ve orta lob tümörlerinde 2R, 4R, 7 numaralı lenf bezleri, sağ alt lob tümörlerine sağ 4, 7, 8, 9 numaralı lenf bezleri, sol üst lob tümörlerinde

5, 6, 7 numaralı lenf bezleri ve sol alt lob tümörlerinde 7, 8, 9 numaralı lenf bezleri diseke edilmelidir.

Radikal Lenf Nodu Diseksiyonu, sağ tümörlerde tüm mediastinal lenf nodlarının çıkarılması, sol tümörlerde ise duktus arteriosus "botalli" kesilerek aort kavsinin mobilize edilmesi ardından üst ve alt paratrakeal lenf nodlarının da diğer mediastinal lenf bezleri ile birlikte çıkarılmasıdır.

Genişletilmiş Lenf Nodu Diseksiyonu, median sternotomi ve servikotomi ile her iki tarafın mediastinal ve servikal lenf nodlarının çıkarılmasıdır [11].

2.3.4. N sınıflandırmasının prognoza etkisi (TNM 9)

N1 lenf nodları akciğerde hiler nodlara kadar aynı taraftaki lenf nodlarıdır. N1 lenf nodu pozitifliği prognozu olumsuz etkiler. Çok istasyonlu N1 hastalığının prognozu, tek istasyonlu N1 hastalığından daha kötüdür. Tutulan N1 istasyonu ne kadar proksimaldeyse prognoz o kadar kötüdür [26]. Metastatik yayılma riski daha yüksek olduğundan, ek tedavi yöntemleri (örneğin, kemoterapi veya immunoterapi) gerekebilir [27].

N2 lenf nodları ipsilateral mediastinal veya subkarinal lenf nodlarını temsil eder. N2a1, tek bir bölgedeki, hacimli olmayan lenf düğümü yayılımını, yani skip metastazı tanımlar. N2a2, N1 tutulumu ile birlikte tek bir bölgedeki, hacimli olmayan lenf düğümü yayılımını, N2b ise çoklu istasyonda veya hacimli lenf düğümü metastazlarını tanımlar.

Rezeksiyondan fayda gören N2 hastalığı olan kısıtlı bir hasta grubu vardır. Bunlar, negatif mediastinoskopi sonrası torakotomi sırasında mikroskopik metastatik hastalık saptanan hastalar ve tek istasyon N2 pozitifliği saptanan hastalardır. Bu hastaların prognozu klinik olarak doğrulanmış ve çoklu N2 hastalığı olanlara göre daha iyidir [28].

N3 düğümleri, kontralateral mediastinal veya kontralateral hiler lenfadenopatiyi ya da skalen veya supraklaviküler lenf nodlarını temsil eder. Bu hastalar rezeksiyona uygun değildir. Çalışmalar, supraklaviküler lenf nodu metastazı olan N3 hastalarında sağkalımın daha düşük olduğunu ancak bu farkın her zaman istatistiksel olarak anlamlı olmadığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, bazı analizler, supraklaviküler lenf nodu tutulumunun, hastaların prognozunu olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir [29, 30].

2.3.5. Lenf Nodu evrelemesinde Yenilikler

2.3.5.1. TNM 9 Evreleme Sisteminin Etkisi

N0'dan N3'e kadar olan durumlar, patolojik olarak farklı grupları yansıtır ve her ilerleyen evre hayatta kalma oranında azalmayı gösterir. Tek istasyonlu N2 tutulumu (N2a), çok istasyonlu N2'den (N2b) daha iyi bir prognoz sergiler. Bu, tek istasyonda bile okült N2 tespiti anlamı prognostik değere sahip olduğunu ve sistematik diseksiyonla tespit şansının daha yüksek olduğunu gösterir [31].

Şekil 3. TNM 9. baskısında güncellenen yenilikler

8 th Ed TNM Categories						Proposed 9 th Ed TNM Categories						
8 th Ed TNM Categories						Proposed 9 th Ed TNM Categories						
T/M	Label	N0	N1	N2	N3	T/M	Description	N0	N1	N2		N3
										N2a	N2b	
T1	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB	T1	T1a ≤1 cm	IA1	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB		T1b >1 to ≤2 cm	IA2	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB		T1c >2 to ≤3 cm	IA3	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a Inv	IB	IIB	IIIA	IIIB	T2	T2a Visceral pleura / central invasion	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2a >3-4	IB	IIB	IIIA	IIIB		T2a >3 to ≤4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2b >4-5	IIA	IIB	IIIA	IIIB		T2b >4 to ≤5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
T3	T3 >5-7	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	T3	T3 >5 to ≤7 cm	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Inv	IIB	IIIA	IIIB	IIIC		T3 Invasion	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Same Lobe Nod	IIB	IIIA	IIIB	IIIC		T3 Same lobe tumor nodule	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 >7	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	T4	T4 >7 cm	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 Inv	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC		T4 Invasion	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 Ipsi Nod	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC		T4 Ipsilateral tumor nodule	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
M1	M1a Pl Dissem	IVA	IVA	IVA	IVA	M1	M1a Pleural / pericardial dissemination	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a Contr Nod	IVA	IVA	IVA	IVA		M1a Contralateral tumor nodule	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b Single Les	IVA	IVA	IVA	IVA		M1b Single extrathoracic lesion	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c Mult Les	IVB	IVB	IVB	IVB		M1c1 Multiple lesions, 1 organ system	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB
							M1c2 Multiple lesions, >1 organ system	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB

2.3.5.2. Robotik Cerrahi

Robotik cerrahi, göğüs cerrahisinde hızla gelişen bir alandır. Üç randomize çalışma (RAVAL, ROMAN ve RVLoB), RATS (Robotik Yardımlı Torasik Cerrahi) ve VATS (Video Yardımlı Torasik Cerrahi) yaklaşımlarını karşılaştırmıştır. RAVAl çalışması, RATS'ın VATS'a göre daha fazla lenf nodu örneklediğini ve kısa vadede hasta tarafından bildirilen sağlık fayda indeksinin benzer olduğunu göstermiştir [32]. ROMAN çalışmasında ise robotik teknikle daha fazla sayıda lenf nodu değerlendirilmiştir. Bu veriler, robotik cerrahinin lenf nodu diseksiyonunda faydasını göstermektedir [33].

2.3.5.3. Lenf nodu Disseksiyonunun İmmünobiyolojik Etkileri

Fare tümör modelleri, tümör drenaj lenf nodlarının (TDLN'ler) PD-L1+ dendritik hücreler açısından zengin olduğunu ve TDLN'lerin antitümör bağışıklıkta önemli bir rol oynadığını göstermiştir [34, 35]. TDLN'lerin genişletilmiş disseksiyonu, immün bozulmaya yol açabilir. İnsan çalışmalarında, daha az sayıda TDLN çıkarılmasının progresyonsuz sağkalım ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, adjuvan immünoterapi planlanan hastalar için genişletilmiş lenfadenektomi yerine daha sınırlı bir lenfadenektomi stratejisi önerilebilir [11].

2.4. Lenf Nodlarında Mikrometastaz (LNMM)

LNMM, ameliyat öncesi standart tanısal testlerle tespit edilemeyen, ancak cerrahi piyesin patolojik incelemesi sonrasında ortaya çıkan, boyutları 0,2 ila 2 mm arasında değişen bir grup tümör hücresidir. MM'ler, 0,2 mm ve üzeri bulunan tümör hücrelerini ifade ederken, daha küçük hücreler izole tümör hücreleri olarak tanımlanır [36]. Erken evre KHDAK hastalarında cerrahi rezeksiyon tedavinin temelini oluşturur. Ancak cerrahi tedaviye rağmen, evre I hastalarının % 30'unda, evre IIB hastalarının ise % 60'ından fazlasında hastalığın tekrarladığı gösterilmiştir [37]. Nükslerin çoğu uzak metastazlardır ve genellikle operasyondan sonraki ilk 2 yıl içinde meydana gelir [38]. Bu uzak nükslerin, ameliyat öncesi tespit edilemeyen mikrometastazlardan kaynaklandığı düşünülmektedir [39].

Cerrahi rezeksiyon uygulanan klinik olarak lenf nodu negatif hastalarda MM prevalansı % 20 civarında olduğu bildirilmiştir, bu da oldukça yüksek bir orandır [36]. MM varlığı, tam rezeksiyon sonrası hayatta kalma süresinin azalmasıyla ilişkilidir. Mevcut veriler, mediastinal LNMM'nin klinik önemini doğrular. Bunun için operasyon sırasında lenf nodlarının tam olarak rezeke edilmesi ve postoperatif dönemde MM'nin belirlenmesi gerekmektedir. Mediastinal LNMM'nin ameliyat öncesi tespiti, daha iyi hasta evrelemesi ve optimal tedavi seçimi yapılmasına olanak tanıyabilir. KHDAK hastalarının prognozunu belirleyen en önemli faktör, mediastinal lenf nodlarının durumudur [40].

Günümüzde KHDAK hastalarının mediastinal preoperatif evrelemesi, görüntüleme çalışmaları, endoskopik incelemeler ve cerrahi örneklerin histopatolojik incelemesine dayanmaktadır. Ancak, bu yöntemler mediastinal LNMM'yi saptamakta yeterince etkili değildir.

Bu nedenle, mediastinal lenf nodlarındaki MM'yi daha hassas yöntemlerle tespit etmek, hastaların tedavi ve prognozlarını iyileştirmek açısından büyük önem taşımaktadır.

2.4.1. Mikrometastazın Tespiti İçin Kullanılan Teknikler

MM, ameliyat öncesi standart tanısal testlerle genellikle tespit edilemez ve cerrahi piyesin patolojik incelemesi sonrasında belirlenebilir. Bu nedenle, doğru evreleme için MM'ın saptanması kritik öneme sahiptir.

MM'ı tespit etmek için kullanılan teknikler arasında hematoksilen ve eozin (H&E) boyama, immünohistokimya (IHC) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler yer alır.

H&E boyama, temel bir histolojik inceleme yöntemidir, ancak MM'lerin tespitinde sınırlı hassasiyete sahiptir. IHC, antikorlar kullanarak doku kesitlerindeki proteinleri tanır ve MM'leri daha hassas bir şekilde tespit edebilir. Özellikle, bu yöntemle sitokeratin gibi spesifik proteinlerin tespiti yapılarak LNMM'lerin daha doğru bir şekilde tanımlanması sağlanabilir [41].

PCR ise MM'ın tespitinde daha yüksek duyarlılık sunar [3, 41]. Bu teknik, mRNA düzeyindeki belirli genlerin ekspresyonunu ölçerek, MM'ın varlığını objektif ve hassas bir şekilde ortaya koyar. PCR, aynı anda birden fazla numunenin analiz edilmesine olanak tanıyarak yüksek verim sağlar ve bu da onu klinik uygulamalar için cazip kılar. Sonuç olarak, PCR gibi moleküler tespit yöntemleri, kanser tanısında ve tedavisinde yeni ufuklar açmıştır. MM gibi önemli bir parametrenin hassas ve objektif bir şekilde tespit edilmesi, hastaların tedavi planlarının daha iyi yapılandırılmasına ve sonuçların iyileştirilmesine katkı sağlayabilir. Bu nedenle, moleküler tespit yöntemlerinin kanser araştırmalarında ve klinik uygulamalarda daha geniş bir şekilde benimsenmesi gerekmektedir [3].

2.4.1.1. Yeni Nesil Teknolojiler ve dPCR

Son yıllarda, Yeni Nesil Dizileme (NGS) ve çeşitli dPCR platformları gibi son derece hassas tekniklerin geliştirilmesi, tümör heterojenitesini anlama ve tedavi stratejilerini geliştirme konusunda yeni fırsatlar sunmuştur. NOS, nokta mutasyonları, translokasyonlar ve çoklu gen füzyonları gibi genomik değişiklikleri aynı anda tespit edebilir. Ancak klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaları, uzun geri dönüş süreleri ve maliyetleri nedeniyle sınırlıdır [42].

Buna karşılık, dPCR teknolojileri, hedefe yönelik bir yaklaşım benimseyerek seçilmiş biyobelirteçleri yüksek hassasiyet, düşük maliyet ve kısa geri dönüş süresi ile değerlendirmeye olanak tanır [42, 43].

2.4.1.2. dPCR'nin Avantajları ve Uygulamaları

dPCR, düşük maliyetli, hızlı ve yüksek hassasiyetli olması nedeniyle tedaviye yanıtın belirlenmesi veya minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesi için ideal bir yöntemdir. dPCR, nadir mutasyon tespiti, kopya sayısı varyasyonlarının analizi, DNA metilasyonu ve yeniden gen düzenlemeleri için uygulanmaktadır. Bu teknoloji, arşiv tümör dokularının değerlendirilmesinde de yararlı olup, düşük DNA kalitesi ve sınırlı numune mevcudiyeti gibi standart yöntemler için engel oluşturan durumlarda bile etkili sonuçlar sağlar [43].

2.4.2. Mikrometastaz Tespiti İçin Biyobelirteçler

PCR ile MM tespitinde, özellikle tümöre özgü belirteçler kullanılır. Örneğin, akciğer kanseri gibi kanserlerde, yüzey aktif madde proteinleri, sitokeratinler ve EpCAM gibi belirteçler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu belirteçler, lenfatik dokularda veya hematopoetik hücrelerde bulunmadığı için, LNMM'nin tespitinde değerlidir [4].

PCR'ın tüm bu avantajlarına rağmen, tümör heterojenitesi nedeniyle tek bir belirteç yerine birden fazla belirtecin kullanılması daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlar [44]. Bu doğrultuda, MM'nin klinik önemi ve prognostik değeri üzerine daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu tür çalışmalar, hastaların tedavi planlarının belirlenmesinde ve prognozlarının daha iyi anlaşılmasında büyük rol oynayabilir.

2.4.2.1. Claudin-4 (CLDN4)

Claudin ailesinin önemli bir üyesi olan CLDN4, sıkı bağlantıların kritik bir bileşenidir. Claudin, doğal olarak akciğer epitel hücreleri gibi normal dokularda gözlemlenirken, patolojik durumlarda aşırı veya az eksprese edilir . Ayrıca, claudinler hücre döngüsü kontrolüne ve hücre içi sinyalleşmeye katılarak tümörögenesi, nüksü ve metastazı etkilerler [45, 46].

CLDN4'ün aşırı ekspresyonu, mide, pankreas, kolorektal, meme, oral skuamöz hücreli, over, mesane, kolanjiyokarsinom ve ileri evre akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde rapor edilmiştir [45]. Bu vakalarda, CLDN4 ekspresyonu genellikle hastalığın ilerlemesi ve kötü

prognoz ile ilişkilendirilmiştir. CLDN4'ün karsinogenezdeki rolü, bariyer fonksiyonu, intratümöral mikroçevrenin korunması, apoptoz, kök hücre işlevleri ve epitelyal-mezenkimal geçiş ile ilişkilidir [46].

2.4.2.2. EpCAM

EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), hücre yapışmasından hücre çoğalmasına, farklılaşmasına ve göçüne kadar birçok süreçte rol oynayan bir transmembran glikoproteinidir [47].

EpCAM, çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese edilerek tümör hücrelerinin metastatik potansiyelini artırmaktadır. Bu nedenle, EpCAM, kanser biyolojisinde ve tedavi stratejilerinde önemli bir biyobelirteç ve potansiyel terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir [48].

Son çalışmalar, EpCAM'ın aşırı ekspresyonunun meme, kolorektal ve tiroid kanserlerinde tümör metastazını kolaylaştırdığını göstermektedir [49, 50, 51]. EpCAM, tümör hücrelerinin ekstraselüler matriksle olan etkileşimlerini modüle ederek hücrelerin doku bariyerlerini aşmasını ve uzak organlara yayılmasını kolaylaştırır [47].

EpCAM, hem biyobelirteç hem de terapötik hedef olarak kanser araştırmalarında ve klinik uygulamalarda büyük bir potansiyele sahiptir.

Claudinler ve EpCAM gibi hücre yapışma molekülleri, kanser biyolojisinde kritik rol oynayan proteinlerdir. Bu moleküllerin ekspresyon düzeylerinin ve işlevlerinin incelenmesi, kanser prognozunun ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bilgiler sağlamaktadır. Gelecekte yapılacak araştırmalar, bu moleküllerin klinik uygulamalarda daha geniş bir şekilde kullanılmasına ve kanser tedavisinde daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2.4.3. Mikrometastazın Prognostik Değeri

KHDAK hastalarında MM'nin tespiti, hastalığın tekrarlamasını ve uzun süreli sağkalım oranlarını etkileyebilir [39]. Bu nedenle, MM'nin tanı ve tedavi süreçlerinde doğru bir şekilde belirlenmesi, hastaların tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bölgesel lenf düğümlerine tümör metastazı, genellikle tümör yayılmasının ilk adımını temsil eder ve tümör progresyonu için önemli bir prognostik gösterge olarak kabul edilir [41].

Literatürde mediastinal LNMM'nin prognostik değeri tartışmalı olsa da, MM'nin tespiti hastalarda nüks ve sağkalım öngörüsüne yardımcı olabilir. Örneğin, birden fazla mediastinal lenf nodu istasyonunda MM tespiti, tek bir istasyonda tespit edilmesine göre daha kötü sağkalım sonuçlarına yol açabilir.

Lenf nodu metastazı, lokorejyonel akciğer kanserinde en önemli prognostik faktördür [41]. Ancak, hastalardaki tüm lenf nodu tutulumunu doğru bir şekilde tanımlamak zorlu bir hedef olmaya devam etmektedir. Bu durum, Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Birliği (IASLC) tarafından KHDAK'ın en erken evresi olan Evre IA'da bildirilen 5 yıllık sağkalım % 73 olarak bildirilmektedir [37]. Lenf nodu negatif hastaların yaklaşık % 40'ında tekrarlayan hastalık gelişecek ve 2 yıl içinde hayatlarını kaybedeceklerdir [52]. Bu durumun, akciğer kanseri hastalarının yetersiz evrenmesinden, yani LNMM'lerin standart H&E boyamasıyla yeterince tanınamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir [53].

Hastaların doğru bir şekilde sınıflandırılması, terapötik seçimler yapmak ve klinik araştırmalarda çeşitli tedavi yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmek için daha iyi evreleme yöntemlerine ihtiyaç vardır. Seri kesit alma, immünohistokimya ve PCR gibi teknikler, MM'lerin saptanmasında daha duyarlıdır. Bu tekniklerin pahalı olması ve kolay ulaşılabilir olmaması, sınırlı hastada ve sınırlı sayıda lenf noduna uygulanabilmesi ile sonuçlanmaktadır [53, 41].

MM'nin hassas ve doğru bir şekilde tespit edilmesi, KHDAK hastalarının tedavi planlarının daha iyi yapılandırılmasına ve sonuçların iyileştirilmesine katkı sağlayabilir. Moleküler tespit yöntemlerinin kanser araştırmaları ve klinik uygulamalarda daha geniş bir şekilde benimsenmesi, hastaların sağkalım oranlarını artırmada önemli bir rol oynayabilir.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

Çalışmamızda Ocak 2019 - Aralık 2022 tarihleri arasında ITF Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda opere edilen, histopatolojik incelemede patolojik lenf nodu metastazı saptanmayan KHDAK tanılı hastalar değerlendirme kapsamına alındı.

Hastalara ait Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı arşivinde saklanan lenf nodu örneklerinden elde edilen kesitlerden, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Laboratuvarlarında dPCR yöntemiyle gen ekspresyonu analizi yapıldı.

Power ve Sample Size programı analizine göre hasta sayısının seçimi sağlandı. Yapılan power analizi sonucunda hasta analizi için Tip I Hata = 0,13, Test Gücü (Güven Aralığı) = % 85 olarak ele alındı. Minimum hasta katılımcı oranı 34 olarak hesaplandı. Çalışmaya patolojik N0 kabul edilen 44 hasta dahil edildi. Patolojik N0 olan 44 hastadan peroperatif elde edilmiş lenf nodlarında dPCR yöntemi ile moleküler MM'lerin saptanması planlandı. Aynı zamanda hasta ve sağlıklı lenf nodu grubu olarak iki ayrı kontrol grubu oluşturuldu. Hasta kontrol grubuna makroskopik metastaz saptanan 24 lenf nodu ve sağlıklı kontrol grubuna benign hastalıklar nedeniyle opere edilen hastalardan alınan 10 lenf nodu örneği dahil edildi. Bu çalışmada, 44 hastanın N1 ve N2 lenf nodu istasyonlarındaki EpCAM ve Claudin-4 gen ekspresyon düzeyleri incelendi. EpCAM ve Claudin-4 genleri için eşzamanlı pozitiflik gösteren LNMM olarak kabul edilerek hastalar moleküler MM varlığına göre iki gruba ayrıldı.

Ek malignite öyküsü olan, neoadjuvan tedavi alan, patolojik lenf nodu metastazı saptanan, aydınlatılmış onamı olmayan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Hastaların yaşı, cinsiyeti, malignite öyküsü, komorbid hastalıkları, soygeçmişi, sigara kullanımı, toraks bilgisayarlı tomografisinde lezyonun boyutu, kontürü, dansitesi, PET-BT'de saptanan SUV-max değeri, operasyona alınma süresi, lezyonun bulunduğu lob, uygulanan tanısal girişim, tanısal girişim sonucu alınan tanı kliniğimiz veritabanı taranarak bulundu. Ayrıca yapılan operasyon, lenf nodu örneklenen istasyonlar ve örnekleme yöntemi, drenaj süresi, hastane yatış süresi, operasyon piyesinin patolojik tanısı, malignite hastalarının TNM 9 evrelemesi, adjuvan tedavi protokolü, hastalısız - genel sağkalım süreleri ve nüks saptanan lokasyon alanları yine aynı şekilde belirlendi.

Patoloji laboratuvarından Patoloji Uzmanı ile seçilen lenf nodu istasyonlarına ait parafin bloklardan 10'ar µ kalınlıkta 5'er kesit alınarak ependorf tüpler içine konuldu. Bu tüpler Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Kanser Genetiği Bilim Dalı Laboratuvarında incelendi. LNMM'lerin belirlenmesi için dPCR yöntemi kullanıldı. Dijital

PCR yöntemi, nükleik asitlerin spesifik tespiti ve mutlak ölçümü için tasarlanmış üçüncü nesil, en gelişmiş PCR teknolojisidir. Standart eğrilere bağlı olmadan ≥ 0.001 % hassasiyette mutlak kantifikasyon sağlar [54]. Gerçek zamanlı qPCR'nin aksine, dPCR hedef molekülün nispi miktarını belirlemek için her amplifikasyon döngüsüne güvenmez; bunun yerine, bir son nokta amplifikasyonunun ardından mutlak hedef miktarı belirlemek için Poisson istatistiklerine dayanır. Hedef molekül, mevcut tüm bölümlere rastgele dağıtıldığından, Poisson dağılımı bölüm başına ortalama molekül sayısını sıfır, bir veya daha fazla olacak şekilde tahmin eder ve pozitif bölüm başına hedef molekülün kopyalarını hesaplar. Pozitif ve negatif reaksiyonların sayısının Poisson istatistiksel analizi, hedef dizinin kesin, mutlak nicelleştirilmesini sağlar [55]. Bu amaçla çalışmamızda tam otomatize QIAcuity Digital PCR Sistemi (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Bu sistem, Nanoplaka tabanlı dPCR teknolojisi kullanır. Nanoplakaya yüklenen reaksiyon karışımı cihaz tarafından otomatik olarak dağıtılır ve PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir. Çalışmamızda CLDN4 ve EPCAM genlerine ait amplifikasyonlar dPCR yöntemi ile incelenmiştir.

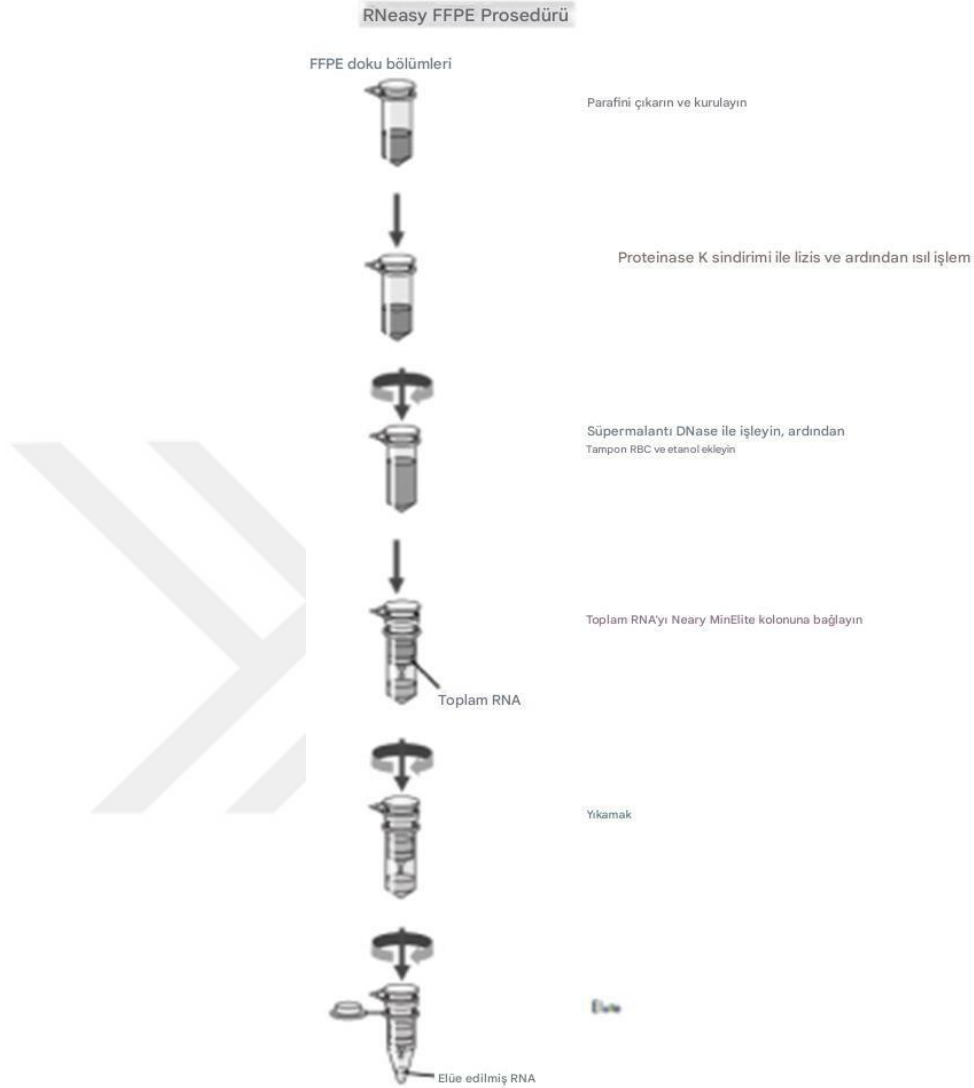
3.1. Deneysel yöntemler

3.1.1. RNA izolasyonu

Formalin fikse parafine gömülü dokulardan (FFPE) total RNA izolasyonu, The RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Almanya) standart protokoller takip edilerek yapıldı.

RNeasy FFPE Kiti, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) doku kesitlerinden toplam RNA'nın saflaştırılması için özel olarak tasarlanmıştır. Toplam 70 nükleotidden uzun RNA moleküllerini izole ederek, kit RT-PCR, dPCR gibi uygulamalar için kullanılabilir. RNA parçalarının geri kazanılmasını sağlar. Fiksasyon ve gömme koşulları nedeniyle, FFPE örneklerindeki nükleik asitler genellikle formaldehit tarafından ağır şekilde parçalanır ve kimyasal olarak modifiye edilir. Bu nedenle, FFPE örneklerinden izole edilen nükleik asitler genellikle taze veya dondurulmuş örneklerden elde edilenlerden daha düşük moleküler ağırlığa sahiptir. Parçalanma derecesi, örneğin türüne, yaşına, örneğin fiksasyon, gömme ve saklama koşullarına bağlıdır.

Şekil 4. RNeasy FFPE Prosedürü



FFPE, numune bloğundaki fazla parafini kesildi. FFPE örneğinden 10 µm kalınlığında kesitler alındı. Numune yüzeyi havaya maruz kalmışsa, ilk 2–3 kesiti atıldı. Kesitleri hemen 2 ml mikro santrifüj tüpüne yerleştirildi. Daha sonra 320 µl Deparafinizasyon Çözeltisi eklendikten sonra 10 saniye boyunca kuvvetlice karıştırıldı. Numuneyi tüpün dibine getirmek için kısa bir süre santrifüj edilerek 56°C'de 3 dakika inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında (25°C) soğumaya bırakıldı, 240 µl Tampon PKD eklendi ve vorteksleyerek karıştırıldı. Bir dakika süreyle 11.000 x g'de (10.000 rpm) santrifüj edildi. Altaki berrak faza 10 µl Proteinase K eklendi. Yukarı ve aşağı pipetleyerek nazikçe karıştırılarak, 56°C'de 15 dakika, ardından

80°C'de 15 dakika inkübe edildi. Isıtma bloğu her 3–5 dakikada bir vorteksleyerek kısaca karıştırıldı. Alttaki renksiz fazı yeni bir 2 ml mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Üç dakika buzda inkübe edildi. Ardından, 20.000 x g'de (13.500 rpm) 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı yeni bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Toplam numune hacminin onda birine eşdeğer DNase Booster Tamponu (yaklaşık 20 µl) ve 10 µl DNase I stok solüsyonu eklendi. Tüpü ters çevirerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Bağlanma koşullarını ayarlamak için 400 µl Tampon RBC eklendi ve lizat iyice karıştırıldı. Örneğe 1000 µl etanol (% 100) eklendi ve pipetleme yoluyla iyice karıştırıldı. Oluşmuş olabilecek herhangi bir çökelti dahil olmak üzere 700 µl örnek 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş bir RNeasy MinElute spin kolonuna aktarıldı ve $\geq 8000 \times g$ 'de ($\geq 10.000 \text{ rpm}$) 15 saniye santrifüj edildikten sonra sıvı fazı atıldı. Tüm örnek RNeasy MinElute spin kolonundan geçene kadar işlem tekrarlandı. RNeasy MinElute spin kolonuna 500 µl Tampon RPE eklendi ve $\geq 8000 \times g$ 'de ($\geq 10.000 \text{ rpm}$) 15 saniye santrifüj edilerek sıvı fazı atıldı. RNeasy MinElute spin kolonuna 500 µl Tampon RPE eklendi ve $\geq 8000 \times g$ 'de ($\geq 10.000 \text{ rpm}$) 2 dakika santrifüj ederek spin kolon membranı yıkandı. RNeasy MinElute spin kolonunu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve beş dakika boyunca yüksek hızda santrifüj edildi. RNeasy MinElute spin kolonunu yeni bir 1,5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 30 µl RNase içermeyen suyu doğrudan spin kolonu membranına eklendi. RNA'yı elüe etmek için tam hızda 1 dakika santrifüj edilerek, 28 µl RNase içermeyen elüat elde edildi.

3.1.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Öncelikle genomik DNA'nın eliminasyonu için; Hastaya ait 1 µl RNA (50 ng/ µl) üzerine 2 µl gDNA Wipeout tamponu (7x) ve 11 µl steril dH₂O eklenerek 42°C'de 2 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra RT tamponu (5x) 4 µl, RT primer mix 1 µl ve Reverse Transkriptase enzimi 1 µl kullanılarak master mix hazırlandı ve önceki karışımın üzerine eklendi. Karışım sırasıyla 42°C'de 15 dakika ve 95°C'de 3 dakika inkübasyona bırakılarak cDNA elde edildi.

3.1.3. Nanoplaka tabanlı dPCR

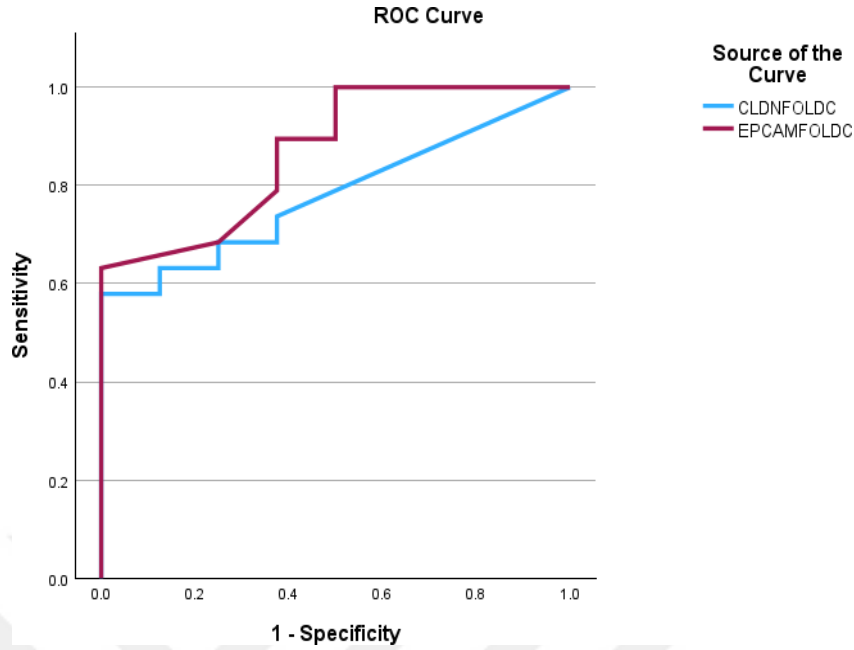
Digital PCR yapmak için hazırlanan cDNA'lar 1/20 oranında dilüe edildi. Her örnek için, 4 µl QIAcuity EG PCR mix (Qiagen, Almanya), 0,6 µl primer, 4,4 µl dH₂O ve 3 µl dilüe edilmiş cDNA örneği kullanılarak bir reaksiyon karışımı oluşturuldu. Hazırlanan karışım QIAcuity Nanoplate 8.5k 96-well kuyucuklarına konuldu ve üzeri seal kullanarak kapatıldı. Nanoplate QIAcuity digital PCR cihazına (Qiagen, Almanya) yerleştirildi. PCR döngü koşulları; 95 °C'de 2 dakika denatürasyon, ardından 40 döngü 95 °C'de 15 sn, 55 °C'de 15 sn,

72 °C’de 15 sn ve son döngü 40 °C’de 5 dk şeklinde ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında ham verilerin analizi QIAcuity Software Suite kullanılarak yapıldı.

3.2. İstatistik Analiz

LNMM oranı ve LNMM’nin mevcut parametrelerle ilişkisi incelendi. Kategorik değişkenler ise uygun şekilde chi - square veya Fisher’s exact testi ile karşılaştırıldı. Sayısal bağımsız gruplar arası analiz için çift kuyruklu Student t-testi kullanıldı. Hasta sayısının sınırlı olması nedeniyle p-değeri < 0.1 ise anlamlı olarak kabul edildi. Ölçüm sonuçlarına ait tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma olarak verildi. Yaş, tümör çapı, lenf nodu çapı, SUVmax değeri, EPCAM ve CLDN4 median değerlerine göre kategorize edildi. Pozitif ve negatif kontrol grubunda gen ekspresyon düzeylerine bakılarak ROC analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına göre EPCAM ve CLDN4 genleri için eşik değerleri belirlendi.

Şekil 5. ROC eğrisi (Receiver Operating Characteristic/ Alıcı İşletim Karakteristiği). ROC analiz sonucu



Area Under the ROC Curve

Test Result Variable(s)	Area
EPCAMFOLD	.868
CLDNFOLD	.780

The test result variable(s): EPCAMFOLD, CLDNFOLD has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

Classifier Evaluation Metrics

Test Result Variable(s)	Gini Index	K-S Statistics	
		Max K-S ^a	Cutoff ^b
CLDNFOLD	.167	.258	.8150
EPCAMFOLD	.542	.500	1.0250

a. The maximum Kolmogorov-Smirnov (K-S) metric. Also the maximum value of Youden's index.

b. In case of multiple cutoff values associated with Max K-S, the largest one is reported.

Hastaların N1 ve N2 istasyonlarındaki lenf nodları, ayrı ayrı istatistiksel olarak analiz edildi. Sağkalım analizleri ise Kaplan - Meier yöntemi sağkalım eğrileri ile karşılaştırıldı. MM ve histopatolojik parametrelerin sağkalım üzerindeki etkisi ise Cox proportional hazards modeli ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.1$ ve iki yönlü olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen toplam 44 hastanın yaş ortalaması 62.3 yıl, median yaş değeri ise 64.5 yıl olarak hesaplanmıştır (aralık: 37 - 82 yıl). Hastaların 30'u (% 68) erkek, 14'ü (% 32) kadın olarak saptanmıştır.

Lezyon SUVmax ortalaması 9.1, median değeri ise 8.6 olarak belirlenmiştir (aralık: 0.00-31.2). Lezyon boyutları 9-70 mm arasında değişiklik göstermiştir. Boyut ortalaması 30.3 mm, median değeri 25 mm olarak hesaplanmıştır. Lezyonların lokalizasyonu sağ akciğerde 23 hasta (%52) ve sol akciğerde 21 hasta (% 48) olarak dağılım göstermiştir. Sağ üst lobda 12 hasta (% 28), sağ orta lobda 2 hasta (% 4.5), sağ alt lobda 9 hasta (% 20.5), sol üst lobda 13 hasta (% 29) ve sol alt lobda 8 hasta (% 18) lezyon saptanmıştır.

Cerrahi tedavi uygulanan hastaların 37'sine (% 84) lobektomi, 1'ine (% 2) superior segmentektomi, 2'sine (% 5) trisegmentektomi, 2'ine (% 5) lobektomi + göğüs duvarı rezeksiyonu, 1'ine (% 2) bilobektomi + göğüs duvarı rezeksiyonu ve 1'ine (% 2) bilobektomi uygulanmıştır.

Mediastinoskopi, hastaların 26'sına (% 59) uygulanırken, 18'ine (% 41) uygulanmamıştır. Hastaların çoğunda PET-BT'de lenf nodu tutulumu yoktu. Lenf nodu çapı ortalama 8.4 mm, median 8.0 mm olarak kaydedilmiştir (aralık: 1-17 mm).

Hastaların 28'i (% 64) adenokarsinom, 15'i (% 34) skuamöz hücreli karsinom, 1'i (% 2) adenoskuamöz hücreli karsinom alttipindeydi.

Tümör evresi dağılımı, Evre 1A1 3 hasta (% 7), Evre 1A2 5 hasta (% 11), Evre 1A3 5 hasta (% 11), Evre 1B 15 hasta (% 34), Evre 2A 3 hasta (% 7) ve Evre 2B 11 hasta (% 25) olarak bulunmuştur.

T sınıflamasına göre dağılım, T1a 3 hasta (% 7), T1b 6 hasta (% 14), T1c 5 hasta (% 11), T2a 16 hasta (% 36), T2b 3 hasta (% 7) ve T3 11 hasta (% 25) şeklindedir.

Vasküler invazyon 29 hastada (% 66) bulunmazken, 15 hastada (% 34) vasküler invazyon saptanmıştır. Lenfatik invazyon 25 hastada (% 57) saptanmazken, 19 hastada (% 43) saptandı. STAS 27 hastada (% 61) negatifken, 17 hastada (% 39) pozitifdir. Plevral invazyon 19 hastada (% 43) oranında tespit edilmiştir. Bu hastaların 11'inde (% 25) PL1, 3'ünde (% 7) PL2, 2'sinde (% 5) PL3 plevral invazyon gözlenmiştir. Göğüs duvar invazyonu 3 hastada (% 7) bulunmuştur. Perinöral invazyon 7 hastada (% 16) saptanırken, 37 hastada (% 84) bulunmamıştır.

Histolojik grade verisi bulunan 9 hastanın 1'i (% 2) Grade 1, 3'ü (% 7) Grade 2 ve 5'i (% 11) Grade 3 olarak sınıflandırılmıştır.

Adjuvan tedavi, hastaların 20'ine (% 45) uygulanırken, 24'üne (% 55) uygulanmamıştır. Toplam 8 hastada nüks ve toplam 2 ölüm vakası saptanmıştır.

Dijital PCR analizi, 40 hastanın N2 istasyonunda, 38 hastanın ise N1 istasyonunda başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

Bulgular- N1

Tablo7. N1 Lenf nodlarında mikrometastaz ile klinikopatolojik özelliklerin ilişkisinin 5 yıllık hastalıksız ve genel sağkalım sonuçları

Değişkenler	(n)	Mikrometastaz [Hasta sayısı]		P value	5 yıllık DFS (%)		P value	5 – yıllık OS		P value
		(%) (+)	(-) (-)		(+)	(-) (-)		(+) (+)	(%) (-)	
Toplam	38	11 (29)	27 (71)		70	68	0.704	90	96	0.521
Yaş (yıl)		63.6 ± 8.2	62.2 ± 10.6	0.697						
Yaş (yıl)										
≤ 65	20	5 (25)	15 (75)		80	84	0.732	100	93	0.564
> 65	18	6 (33)	12 (67)	0.724	62	78	0.561	83	100	0.157
Cinsiyet										
Erkek	27	6 (22)	21 (78)		66	78	0.586	100	100	-
Kadın	11	5 (45)	6 (55)	0.238	80	100	0.273	80	83	0.949
Histolojik tümör çapı (cm)		29.6± 23.2	30.8 ± 15.5	0.852						
Histolojik tümör çapı (cm)										
≤ 2.5	21	7 (33)	14 (66)		64	90	0.238	100	100	-
> 2.5	17	4 (23)	13 (77)	0.721	75	73	0.974	75	92	0.396
Histolojik tümör çapı (cm)										
≤ 3	23	7 (30)	16 (70)		64	80	0.482	100	93	0.508
> 3	15	4 (27)	11 (73)	1.000	75	81	0.775	75	100	0.097
SUV max		10.9 ± 9.6	9.1 ± 5.3	0.466						
SUV max										
≤ 8.8	19	6 (32)	13 (68)		55	88	0.196	100	100	-

> 8.8	19	5 (26)	14 (74)	1.000	80	75	0.912	80	92	0.465
SUV max										
≤ 2.5	4	2 (50)	2 (50)		100	100	-	100	100	-
> 2.5	34	9 (26)	25 (74)	0.564	62	81	0.308	88	96	0.461
Lenf nodu çapı (mm)		8.9 ± 3.7	8.4 ± 4.5	0.747						
Lenf nodu çapı (mm)										
≤ 8.5	19	4 (21)	15 (79)		50	84	0.115	75	100	0.053
> 8.5	19	7 (37)	12 (63)	0.476	80	75	0.651	100	91	0.445
<u>Histolojik altgrup</u>										
Adenokarsinom	24	6 (25)	18 (75)		62	77	0.603	100	94	0.564
Skuamoz hücreli karsinom	14	5 (36)	9 (64)	0.712	80	88	0.614	80	100	0.180
Mikroskopik vasküler invazyon										
Var	14	3 (21)	11 (79)		66	79	0.506	66	100	0.056
Yok	24	8 (33)	16 (67)	0.488	72	84	0.598	100	93	0.480
Mikroskopik lenfatik invazyon										
Var	17	6 (35)	11 (65)		50	78	0.212	83	90	0.689
Yok	21	5 (24)	16 (76)	0.491	100	84	0.399	100	100	-
Perinöral invazyon										
Var	7	1 (14)	6 (86)		-	83	0.683	-	100	-
Yok	31	10 (32)	21 (68)	0.419	66	79	0.397	90	95	0.604
Plevral invazyon										
Var	16	5 (31))	11 (69)		60	80	0.369	80	90	0.592
Yok	22	6 (27)	16 (73)	1.000	75	85	0.820	100	100	-
STAS (Havayolu yayılımı)										
Var	15	3 (20)	12 (80)		100	64	0.319	100	100	-
Yok	23	8 (35)	15 (65)	0.470	60	100	0.018	87	93	0.670
EVRE										
I	26	8 (31)	18 (69)		70	85	0.436	100	94	0.505
II	12	3 (25)	9 (75)	1.000	66	77	0.707	66	100	0.083
Adjuvan tedavi										
Var	19	6 (32)	13 (68)		83	83	0.962	83	92	0.596
Yok	19	5 (26)	14 (74)	1.000	40	82	0.173	100	100	-

Toplam 38 hastanın 11'inde (% 29) MM tespit edildi. Beş yıllık DFS oranı MM saptanan hastalarda % 70, mikrometastaz saptanmayan hastalarda ise % 68 bulundu ($p = 0.704$). Beş yıllık OS oranı MM saptanan hastalarda % 90, saptanmayan hastalarda ise % 96 bulundu ($p = 0.521$).

MM görülme sıklığı yaş, cinsiyet, tümör çapı ve lenf nodu çapına göre anlamlı farklılık göstermedi. Lenf nodu çapı 8.5 mm üstünde olanlarda daha fazla MM oranı saptandı (% 37'ye karşın % 21), fakat anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.1$). MM oranları adenokarsinom (% 25) ve skuamöz hücreli karsinom (% 36) alt gruplarında benzer bulundu ($p = 0.712$). MM, vasküler invazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, plevral invazyon veya STAS ile anlamlı bir ilişki göstermediği tespit edildi ($p > 0.1$).

Beş yıllık DFS, 65 yaş üstü % 62, 65 yaş altı % 80 ve OS 65 yaş üstü % 83, 65 yaş altı % 100, 65 yaş üstünde sağkalım oranları daha düşük bulundu, ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.1$).

Tümör çapı 3 cm üstü olanlarda genel sağkalım MM saptanan grupta % 75 iken, MM saptanmayan grupta % 100, anlamlı olarak daha düşük saptandı (**$p = 0.097$**). Tümör çapı 3 cm altında olan hastalarda MM saptanan grupta hastalısız sağkalım % 64'e karşın % 80, azalmış olduğu görüldü fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.1$).

Lenf nodu çapı 8.5 mm altı olan grupta DFS % 50'ye karşın % 84 daha düşük ($p = 0.115$), genel sağkalım % 75'e karşın % 100 anlamlı düşük saptanmıştır (**$p = 0.053$**). Lenf nodu çapı 8.5 mm üstü olan grupta sağkalım açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

Skuamöz hücreli karsinom olan olgularda genel sağkalım, MM pozitif saptanan grupta % 80'e karşın % 100 olarak daha düşük saptanmıştır ancak anlamlı fark bulunmamıştır ($p = 0.180$).

Vasküler invazyon saptanan hastalarda, MM pozitif olan grupta genel sağkalım % 66'ya karşın % 100 olarak anlamlı düşük izlendi (**$p = 0.056$**).

Lenfatik invazyon saptanmayan hastalarda, MM varlığı ile sağkalım arasında ilişki saptanmazken, lenfatik invazyon saptanan hastalarda MM saptanan grupta DFS (% 50'ye karşın % 78) ve OS (% 83'e karşın % 90) oranları daha düşük izlendi, fakat anlamlı fark bulunmadı (DFS için $p = 0.212$, OS için $p = 0.689$).

STAS olmayan hastalarda 5 yıllık DFS oranı MM saptanmayan hastalara göre sırasıyla % 100 ve % 60 olacak şekilde anlamlı ve daha yüksek bulundu (**$p = 0.018$**).

MM varlığı ile evre I hastalarda OS ve DFS, evre II hastalarda DFS arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi. Beş yıllık OS oranı Evre II MM saptanan hastalarda % 66,

saptanmayanlarda ise % 100 olarak istatistiksel anlamlı saptandı ($p = 0.083$).

Adjuvan tedavi almayan hastalar arasında MM saptanan grupta 5 yıllık DFS oranının % 40'a karşın % 82 daha düşük olduğu saptandı ($p = 0.173$).

Tablo 8. Cox proportional hazards modelinde univariant analiz ile HASTALIKSIZ sağkalıma

Değişkenler	Hazard oranı	95 % CI	P değeri
Mikrometastaz(Pozitif /Negatif)	1.749	0.390 – 7.832	0.474
Yaş (> 65 versus ≤65)	1.471	0.329 – 6.577	0.611
Cinsiyet (kadın/erkek)	1.900	0.226– 15.957	0.525
Histolojik tümör çapı (cm) (> 2.5/ ≤ 2.5)	1.713	0.383 – 7.664	0.479
Histolojik tümör çapı (cm) (≤ 3/> 3)	1.130	0.252 – 5.067	0.874
SUV max (>8.8/≤8.8)	1.303	0.291 – 5.842	0.728
SUV max (> 2.5/≤2.5)	23.849	0.001– 955523	0.223
Lenf nodu çapı (mm) (> 8.5/≤ 8.5)	1.370	0.306 – 6.127	0.679
Histolojik altgrup (Adenokarsinom/SCC)	1.515	0.293 – 7.823	0.610
Mikroskopik vasküler invazyon (Var /Yok)	1.384	0.310 – 6.189	0.674
Mikroskopik lenfatik invazyon (Var /Yok)	2.976	0.576– 15.364	0.168
Perinöral invazyon (Yok/Var)	1.515	0.181– 12.661	0.687
Plevra invazyonu (Var /Yok)	2.570	0.568– 11.627	0.218
STAS (Havayolu yayılımı) (Var /Yok)	2.008	0.449– 8.981	0.358
EVRE II/I	1.946	0.434– 8.723	0.396
Adjuvan tedavi (Yok /Var)	1.181	0.264- 5.283	0.827

etkili prognostik faktörler - N1

Hastalıksız sağkalım açısından Cox analizine göre hiçbir değişkenin anlamlı bir etkisi bulunmadı (tüm p değerleri > 0.1).

Genel sağkalım açısından Univaryant Cox analizinde cinsiyet ($p = 0.024$), tümör çapı (2.5 cm, $p = 0.072$), SUVmax ($p = 0.096$), plevra invazyonu ($p = 0.062$), mikroskopik lenfatik invazyon ($p = 0.072$) ve adjuvan tedavi ($p = 0.096$) değişkenleri için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildi ancak multivaryant analizde hiçbir değişkenin genel sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmadı (tüm p değerleri > 0.1).

Tablo 9. Cox proportional hazards modelinde univariant ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörler -N1

Değişkenler	Hazard oranı	95 % CI	P değeri
Mikrometastaz (Pozitif/ negatif)	2.409	0.151 – 38.513	0.541
Yaş (> 64 versus ≤ 64)	1.083	0.068 – 17.318	0.955
Cinsiyet (kadın/erkek)	290.567	0.000 – 814574	0.024
Histolojik tümör çapı (cm) (> 2.5 / ≤ 2.5)	85.396	0.001 – 857058	0.072
Histolojik tümör çapı (cm) (> 3/≤ 3)	1.500	0.094 – 23.979	0.775
SUV max (> 8.8/≤ 8.8)	67.130	0.001 – 583167	0.096
SUV max (> 2.5/≤ 2.5)	23.861	0.000– 846941	0.511
Lenf nodu çapı (mm) (> 8.5/≤ 8.5)	1.027	0.064 – 16.430	0.985
Histolojik altgrup (SCC/Adenokarsinom)	1.678	0.105 – 26.834	0.716
Mikroskopik vasküler invazyon (Var /Yok)	1.678	0.105 – 26.834	0.716
Mikroskopik lenfatik invazyon (Var /Yok)	85.396	0.001– 857058	0.072
Perinöral invazyon (Yok/Var)	27.656	0.000– 126739	0.373
Plevra invazyonu (Var /Yok)	98.290	0.001 – 117779	0.062
STAS (Havayolu yayılımı) (Yok/Var)	46.243	0.000– 561009	0.159
EVRE II/I	2.125	0.133– 33.971	0.598
Adjuvan tedavi (Var/Yok)	65.130	0.001- 583167	0.096

Tablo 10. Cox proportional - Hazards modelinde multivariant ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörler - N1

Değişkenler	Hazard oranı	95 % CI	P değeri
Cinsiyet (kadın / erkek)	476.825	0.000 – 4124	0.597
Histolojik tümör çapı (cm) (> 2.5 / ≤ 2.5)	157.522	0.000 – 950985	0.624
SUV max (> 8.8/ ≤ 8.8)	1.130	0.000 – 3600	0.993
Mikroskopik lenfatik invazyon (Var /Yok)	34.312	0.000– 6470	0.905
Plevra invazyonu (Var /Yok)	36.947	0.000-3246	0.889
Adjuvan tedavi (Var/Yok)	5.883	0.000-3564	0.961

Bulgular - N2

Tablo 11. N2 Lenf nodlarında mikrometastaz ile klinikopatolojik özelliklerin ilişkisinin 5 yıllık hastalıksız ve genel sağkalım sonuçları

Değişkenler	(n)	Mikrometastaz [Hasta sayısı] (%)		P value	5 yıllık HS (%)		P value	5 – yıllık GS (%)		P value
		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
Toplam	40	8 (20)	32 (80)		100	74	0.170	100	93	0.476
Yaş (yıl)		65 ± 9.6	62.2 ± 8.8	0.444						
Yaş (yıl)										
≤ 64	20	3 (15)	17 (85)		100	79	0.416	100	94	0.674
> 64	20	5 (25)	15 (75)	0.695	100	69	0.271	100	93	0.564
Cinsiyet										
Erkek	26	4 (15)	22 (85)		100	69	0.234	100	100	-
Kadın	14	4 (29)	10 (71)	0.416	100	90	0.527	100	80	0.358
Histolojik tümör çapı (cm)		28 ± 15.6	29.9 ±17.5	0.781						
Histolojik tümör çapı (cm)										
≤ 2.5	23	6 (26)	17 (74)		100	80	0.370	100	100	-
> 2.5	17	2 (12)	15 (88)	0.428	100	68	0.394	100	86	
Histolojik tümör çapı (cm)										
≤ 3	25	6 (24)	19 (76)		100	74	0.304	100	94	0.574
> 3	15	2 (13)	13 (87)	0.686	100	76	0.478	100	92	0.695
SUV max		8.8 ± 5.9	9 ± 7.1	0.885						
SUV max										
≤ 8.1	21	5 (24)	16 (76)		100	73	0.391	100	100	-
> 8.1	19	3 (16)	16 (84)	0.698	100	73	0.345	100	87	0.534
SUV max										
≤ 2.5	6	0 (0)	6 (100)		-	100	-	-	100	-
> 2.5	34	8 (23)	26 (77)	0.318	100	69	0.128	100	92	0.428
Lenf nodu çapı (mm)		9.3± 4.7	8.2 ±3.9	0.496						
Lenf nodu çapı (mm)										

≤ 8	21	3 (14)	18 (86)		100	76	0.404	100	94	0.683
> 8	19	5 (26)	14 (74)	0.442	100	69	0.252	100	92	0.550
<u>Histolojik altgrup</u>										
Adenokarsinom	26	5 (19)	21 (81)		100	70	0.257	100	95	0.626
Skuamoz hücreli karsinom	14	3 (21)	11 (79)	1.000	100	81	0.449	100	90	0.602
Mikroskopik vasküler invazyon										
Var	12	3 (25)	9 (75)		100	64	0.307	100	88	0.564
Yok	28	5 (18)	23 (82)	0.677	100	78	0.329	100	95	0.641
Mikroskopik lenfatik invazyon										
Var	17	4 (23)	13 (77)		100	57	0.161	100	84	0.423
Yok	23	4 (17)	19 (83)	0.702	100	87	0.546	100	100	-
Perinöral invazyon										
Var	6	3 (50)	3 (50)		100	66	0.317	100	100	-
Yok	34	5 (15)	29 (85)	0.082	100	74	0.317	100	93	0.554
Plevral invazyon										
Var	17	2 (12)	15 (88)		100	72	0.434	100	86	0.599
Yok	23	6 (26)	17 (74)	0.428	100	79	0.364	100	100	-
STAS (Havayolu yayılımı)										
Var	16	4 (25)	12 (75)		100	64	0.280	100	100	-
Yok	24	4 (17)	20 (83)	0.690	100	81	0.409	100	90	0.522
EVRE										
I	29	6 (21)	23 (79)		100	80	0.362	100	95	0.610
II	11	2 (18)	9 (82)	1.000	100	66	0.384	100	88	0.637
Adjuvan tedavi										
Var	18	3 (17)	15 (83)		100	79	0.415	100	86	0.520
Yok	22	5 (23)	17 (77)	0.709	100	74	0.345	100	100	-

Toplam 40 hastanın 8'inde (% 20) MM saptandı, 32'sinde (% 80) MM tespit edilmedi.

MM varlığı ile yaş, cinsiyet, tümör çapı, SUVmax değerleri, lenf nodu çapı veya histolojik alt grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Mikroskopik vasküler invazyon, lenfatik invazyon, plevral invazyon ve STAS varlığı ile MM pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (tüm $p > 0.1$). Perinöral invazyon olmayanlarda MM oranı % 15, perinöral invazyon olanlarda ise % 50 anlamlı fark izlendi ($p = 0.082$).

N2 subgrup analizinde LNMM ile 5 yıllık DFS ve 5 yıllık OS arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0.1$).

Cox proportional hazards modeline dayanan univaryant analizde, DFS üzerinde anlamlı bir prognostik etki saptanmadı (tümü için $p > 0.1$). Mikroskopik lenfatik invazyonun varlığı, DFS için daha yüksek bir riskle ilişkilendirildi (HR: 3.249; 95 % CI: 0.629–16.777), ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p = 0.136$).

Tablo 12. Cox proportional hazards modelinde univariant analiz ile HASTALIKSIZ sağkalıma etkili prognostik faktörler - N2

Değişkenler	Hazard oranı	95 % CI	P değeri
Mikrometastaz(Negatif /Pozitif)	29.168	0.012 – 70017.8	0.073
Yaş (> 64 versus ≤64)	1.332	0.298 – 5.956	0.706
Cinsiyet (kadın/erkek)	2.683	0.321– 22.426	0.309
Histolojik tümör çapı (cm) (2.5/≤ 2.5)	2.161	0.482 – 9.683	0.311
Histolojik tümör çapı (cm) (≤ 3/> 3)	1.424	0.318 – 6.376	0.648
SUV max (>8.1/≤8.1)	1.339	0.297 – 6.035	0.702
SUV max (> 2.5/≤2.5)	25.739	0.003– 227408	0.143
Lenf nodu çapı (mm) (> 8/≤ 8)	1.244	0.278 – 7.241	0.680
Histolojik altgrup (Adenokarsinom /SCC)	1.403	0.272 – 4.849	0.860
Mikroskopik vasküler invazyon (Var /Yok)	1.861	0.416 – 8.328	0.427
Mikroskopik lenfatik invazyon (Var /Yok)	3.249	0.629– 16.777	0.136
Perinöral invazyon (Yok/Var)	1.138	0.136– 9.505	0.903
Plevra invazyonu (Var /Yok)	2.383	0.529 – 10.729	0.256
STAS (Havayolu yayılımı) (Var /Yok)	2.041	0.456– 9.128	0.347
EVRE II / I	2.779	0.613– 12.605	0.204
Adjuvan tedavi (Yok /Var)	1.139	0.254- 5.118	0.865

Genel sağkalım açısından kadın cinsiyet (HR: 158.436; p = 0.039), tümör çapının 2,5 cm üzerinde olması (HR: 95.923; p = 0.064), SUVmax (> 8.1) (HR: 74.693; p = 0.085), lenfatik invazyon (HR: 95.923; p = 0.064) ve plevra invazyonu (HR: 95.923; p = 0.064) anlamlı bir risk faktörüydü. Adjuvan tedavi alanlarda risk oranı yüksekti (HR: 84.111; p = 0.074). Multivaryant analizde ise değişkenler ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Tablo 13. Cox proportional hazards modelinde univariant analiz ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörler - N2

Değişkenler	Hazard oranı	95 % CI	P değeri
Mikrometastaz(Negatif/pozitif)	28.542	000 – 780205	0.351
Yaş (> 64 versus ≤ 64)	1.026	0.064 – 16.407	0.986
Cinsiyet (kadın/erkek)	158.436	0.000 – 526915	0.039
Histolojik tümör çapı (cm) (> 2.5 / ≤ 2.5)	95.923	0.001 – 119173	0.064
Histolojik tümör çapı (cm) (> 3 / ≤ 3)	1.633	0.102 – 26.111	0.730
SUV max (> 8.1/ ≤ 8.1)	74.693	0.001 – 673230	0.085
SUV max (> 2.5 / ≤ 2.5)	25.880	0.000– 498124	0.427
Lenf nodu çapı (mm) (> 8 / ≤ 8)	1.136	0.071 – 18.159	0.928
Histolojik altgrup (SCC / Adenokarsinom)	1.821	0.114 – 29.118	0.674
Mikroskopik vasküler invazyon (Var /Yok)	2.291	0.143 – 36.636	0.563
Mikroskopik lenfatik invazyon (Var /Yok)	95.923	0.001– 119173	0.064
Perinöral invazyon (Yok/Var)	25.880	0.000– 498124	0.427
Plevra invazyonu (Var /Yok)	95.923	0.001 – 110973	0.064
STAS (Havayolu yayılımı) (Yok/Var)	46.954	0.000– 551337	0.155
EVRE II/I	2.591	0.162– 41.420	0.509
Adjuvan tedavi (Var/Yok)	84.111	0.001- 831311	0.074

Tablo 14. Cox proportional hazards modelinde multivariant analiz ile GENEL sağkalıma etkili prognostik faktörler - N2

Değişkenler	Hazard oranı	95 % CI	P değeri
Cinsiyet (kadın / erkek)	470.651	0.000 – 7034	0.607
Histolojik tümör çapı (cm) (> 2.5 / ≤ 2.5)	337.880	0.000 – 4311	0.682
SUV max (> 8.1/ ≤ 8.1)	1.180	0.000 – 2008	0.993
Mikroskopik lenfatik invazyon (Var /Yok)	139.931	0.000– 4825	0.838
Plevra invazyonu (Var /Yok)	40.928	0.000-4628	0.875
Adjuvan tedavi (Var/Yok)	22.539	0.000-1269	0.911

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda N1 ve N2 istasyonlardaki lenf nodlarında dPCR yöntemi ile saptanan MM'nin akciğer kanseri hastalarında sağkalım sonuçlarına etkisi ve çeşitli klinikopatolojik faktörlerle ilişkisi değerlendirildi.

Çalışmamızın N1 subgrup analizinde, MM prevalansı (% 29), literatürde bildirilen oranlarla uyum göstermekte ve klinik önemini vurgulamaktadır [5]. MM bulunan hastalarda DFS ve OS oranları biraz daha düşük olsa da, bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç, MM'nin tek başına güçlü bir prognostik faktör olarak değerlendirilemeyebileceğini düşündürmekle birlikte, hasta sayısının kısıtlı olması nedeniyle bu ilişkinin daha kapsamlı çalışmalarda yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir.

İleri yaş, büyük tümör çapı ve yüksek SUVmax değerleri daha kötü sağkalım oranları ile ilişkilendirilmiş, ancak bu faktörlerin MM ile doğrudan ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, MM'nin geleneksel yüksek risk faktörlerinden bağımsız olarak gelişebileceğini göstermektedir.

STAS varlığı olmayan hastalarda daha iyi DFS oranları gözlenmiştir. Bu bulgu, STAS'ın rekürrens ve sağkalım üzerindeki öngörücü rolünü desteklemekte ve daha fazla araştırmayı gerekli kılmaktadır.

Sağkalım oranlarında anlamlı bir fark gözlenmemesine rağmen kadınlarda MM prevalansının daha yüksek bulunmasının biyolojik faktörlerle ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir.

Adjuvan tedavi almayan hastalarda 5 yıllık DFS oranının MM pozitif grupta % 40'a karşın, MM saptanmayan grupta % 82 olarak anlamlı olarak daha düşük olması ($p = 0.173$), MM saptanan hastalarda adjuvan tedavinin potansiyel yararlarının gelecekteki çalışmalarda daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Cox analizinde mikroskopik lenfatik invazyon ve plevra invazyonu gibi bazı değişkenlerde sağkalım açısından nispeten yüksek risk görüldü, bu da daha geniş çaplı çalışmalarda doğrulanmayı gerektirir.

Kanserin diğer faktörleri, örneğin tümörün evresi, histolojik tipi, genetik mutasyonlar ve tedaviye yanıt, hastaların sağkalımını daha fazla etkileyebilir ve MM'lerin bu faktörlerle karşılaştırıldığında prognostik önemi daha düşük olabilir. SENTICOL1 çalışmasında, serviks kanseri hastalarında MM'lerin DFS üzerine etkisi incelenmiş ve anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada, MM'ler ve izole tümör hücrelerinin tespiti, tedavi stratejilerini değiştirmemiştir. Ancak, çalışmanın sınırlamaları, düşük hacimli metastazların uzun dönem etkilerini

değerlendirecek kadar güçlü olmadığını ortaya koymuştur [59].

Erken evre kanserlerde MM tespiti ve klinik anlamı, sağkalım sonuçlarının tahmininde giderek daha fazla dikkat çeken bir araştırma alanıdır. Literatürde MM'lerin genellikle erken metastaz belirtisi olabileceği ve hastaların prognozuna ilişkin değerli bilgiler sunduğu öne sürülse de, bazı çalışmalarda LNMM'lerin hastalığın seyriyle ilişkili olmadığı gözlemlenmektedir [5, 56].

Gwozdz ve arkadaşlarının çalışmasında MM'lerin DFS ve OS ile ilişkisi değerlendirilmiş ve MM'lerin tespiti, hastaların sağkalım oranlarını tahmin etmede önemli bir faktör olarak öne çıkmıştır [57]. Dai ve arkadaşlarının çalışmasında da, nodal MM'li olan hastalarda hastalıksız sağkalım ve genel sağkalımın önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır [58].

P. E. Postmus and D. Cohen'in yaptığı meta-analiz çalışmasında, MM'lerin DFS ve OS ilişkisi incelenmiş ve genetik yöntemlerle tespit edilen MM'lerin özellikle düşük hacimli hastalıkta sağkalım tahminleri üzerinde önemli etkiler yarattığı bulunmuştur. Çalışma, MM'lerin OS ve DFS üzerine prognostik değer sunduğunu, ancak bu ilişkinin klinik anlamının daha fazla araştırılması gerektiğini belirtmiştir [56].

Bizim çalışmamızda da N1 mikrometastazı, 5 yıllık sağkalım sonuçlarını anlamlı şekilde etkilemedi. Bununla birlikte, STAS ve histolojik alt gruplar gibi klinikopatolojik özelliklerle etkileşimi daha fazla çalışmayı hak etmektedir. Bu bulguların doğrulanması ve hasta yönetiminin optimize edilmesi için geniş ölçekli, prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Martin ve arkadaşlarının çalışmasında, genel sağkalım ve hastalıksız sağkalımın, nodal MM için PCR pozitifliği ile ilişkili olmadığı görülmüştür [40]. C.Lung ve arkadaşları, MM'lerin erken evre akciğer kanseri olan hastalarda prognostik bir belirteç olup olmadığını tartışmış ve tespit edilen mikrometastazların klinik sonuçlarla korelasyon göstermediğini belirtmişlerdir [60].

Bizim çalışmamızın N2 subgrup analizinde, MM, 8 hastada (% 20) tespit edildi, 5 yıllık DFS ve OS oranları açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlendi. Bu bulgular, literatürde LNMM'lerin prognostik etkisinin tartışmalı olduğunu ve ek biyolojik veya klinik faktörlere bağlı olabileceğini öne süren çalışmalarla uyumludur. Bununla birlikte, hasta sayısının sınırlı olması, nüks ve ölüm oranlarının düşük olması, çalışmanın istatistiksel gücünü sınırlayan önemli bir faktör olarak değerlendirildi.

Histolojik tümör çapı ve mikroskopik lenfatik invazyon gibi faktörler yüksek risk oranları göstermiş olsa da, hem univaryant hem de multivaryant analizlerde anlamlı bulunmamıştır.

Mikroskopik lenfatik invazyonun DFS ile ilişkili potansiyel bir risk faktörü olarak öne çıkması, literatürdeki lenfatik invazyonun metastatik potansiyel üzerindeki etkilerini vurgulayan çalışmalarla uyumludur [61, 62]. Bununla birlikte, diğer klinikopatolojik özelliklerin DFS üzerinde belirgin bir etkisinin olmaması, sağkalımın yalnızca bu faktörlere bağlı olmadığını ve daha karmaşık biyolojik mekanizmaların rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bu bulgular, N2 lenf nodu MM'nin klinik yönetimde dikkate alınması gerektiğini, ancak karar süreçlerinin çok boyutlu değerlendirmelerle desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Gelecekteki çalışmalarda daha geniş hasta gruplarının yanı sıra moleküler ve genetik analizlerin de dahil edilmesi, bu faktörlerin prognostik rollerini daha iyi anlamaya katkı sağlayacaktır.

Adjuvan tedavinin yüksek hazard oranına rağmen anlamlı olmaması, tedaviye verilen yanıtın bireysel farklılıklar içerdiğini göstermektedir.

Sonuçlarımız, MM'nin klinik yönetim ve sağkalım üzerindeki rolünü netleştirmek için daha geniş örneklemli, çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca, MM'lerin moleküler ve genetik profillenmesi, biyolojik davranışlarına ve potansiyel terapötik hedeflerine ilişkin daha derin bilgiler sağlayabilir.

Primer akciğer kanserinde farklı bölgelerdeki LNMM'lerin tespit oranı hala tartışmalı olsa da, dPCR MM tespitinde geleneksel moleküler yöntemlere kıyasla daha yüksek hassasiyet ve özgüllük sunmaktadır [63]. Güncel çalışmalarda, dPCR'nin düşük genetik materyal yüklerini tespit etmedeki üstünlüğü vurgulanmıştır [64]. Dijital PCR'nin MM tespitinde kullanımı, özellikle meme kanseri gibi diğer kanser türlerinde yaygın olarak incelenmiş olsa da, KHDAK kanserlerinde LNMM'lerin dPCR ile araştırıldığı çalışmaya güncel literatür taramasında rastlanmamıştır. Bu durum, çalışmamızın literatürdeki önemini daha da artırmaktadır.

LNMM'lerin tespiti için kullanılan biyobelirteçler konusunda literatürde hala bazı boşluklar bulunmaktadır. EpCAM ve CLDN4 gibi epitel hücrelerine özgü biyomarkerler, genellikle epitel hücrelerine bağlı malignite tespiti için kullanılmaktadır. EpCAM, son yıllarda dolaşımdaki tümör hücrelerinin ve MM'lerin tespitinde en güvenilir biyobelirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir [47, 48]. Claudin ailesine ait proteinlerin MM'lerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği çeşitli kanser türlerinde tartışılmıştır; ancak bu yöntemlerin lenf nodu analizine entegrasyonu sınırlıdır [65, 66]. KHDAK'da yüksek CLDN4 ekspresyonu, kanser metastazında kritik bir süreç olan epitelden-mezenkimal geçiş ile bağlantılıdır [65]. Ayrıca, CLDN4, tümör mikroçevresini etkileyerek hücre proliferasyonunu ve göçünü destekler. Bu durumun tümör hücrelerinin invaziv özelliklerini artırarak kötü prognozla ilişkili olabileceği

bildirilmektedir [66]. Çoklu marker testlerinin MM tespiti için doğruluğunu artırdığı güncel çalışmalarla gösterilmiştir [44].

Çalışmamızda, dPCR yöntemi kullanılarak EPCAM ve CLDN4 genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiş; her iki genin ekspresyonunun eşik değerinin üzerinde olduğu lenf nodları mikrometastaz olarak değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, moleküler düzeyde daha hassas bir mikrometastaz tespit yöntemi sunmaktadır [44].

Çalışmamızda, negatif kontrol grubu olarak granüloamatöz hastalık tanısı almış lenf nodları, pozitif kontrol grubu olarak ise akciğer kanseri (SCC ve adenokarsinom) metastazı bulunan lenf nodları kullandık. Ancak, granüloamatöz hastalıkların EpCAM ve CLDN4 gen ekspresyon seviyelerine ilişkin elimizde yeterli veri bulunmamaktadır. Bu eksiklik, kontrol gruplarının karşılaştırılabilirliği açısından bir sınırlılık yaratabilir ve gelecekteki çalışmalarda bu eksikliğin giderilmesi önerilmektedir. Literatürde, granüloamatöz hastalıkların biyobelirteç profillerine dair daha fazla veri gerekliliği de vurgulanmıştır [67].

Çalışmamızda, birden fazla istasyondan elde edilen lenf nodu parafin blokları pooling yöntemi ile incelenmiştir. Pooling yöntemi, birden fazla istasyondan elde edilen lenf nodlarının aynı havuzda toplanarak analiz edilmesi esasına dayanır. Ancak bu yöntem, özellikle düşük tümör yüküne sahip olan veya tek bir mikrometastazın bulunduğu durumlarda, dilüsyon etkisi nedeniyle hassasiyeti düşürebilir. Bu durum, tek bir mikrometastazın tespit edilmesini zorlaştırabilir. Lenf nodlarından alınan kesit sayısının artırılması ve istasyonların ayrı ayrı değerlendirilmesi, mikrometastaz tespit oranını artıracak önemli bir stratejidir. Literatür, pooling yönteminin hassasiyet üzerinde etkili olabileceğini ve özellikle düşük tümör yüküne sahip örneklerde dikkatli uygulanması gerektiğini desteklemektedir [68].

Mikrometastazların tespitine ilişkin standart bir yöntem bulunmaması, farklı biyobelirteçlerin kullanılması ve çalışmalara sınırlı sayıda hastanın dahil edilmesi, değişen sağkalım oranları üzerinde etkili bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelecekte, her lenf nodu istasyonunun ayrı ayrı incelendiği daha kapsamlı çalışmaların yapılması, mikrometastazların klinik öneminin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayabilir.

5.1. Kısıtlılıklar

Hasta sayısının sınırlı olması, bu sebeple MM, nüks ve ölüm oranlarının düşük olması, çalışmanın istatistiksel gücünü sınırlayan önemli bir faktör olarak değerlendirilmiştir.

DPCR yöntemini kullanarak LNMM'lerin tespiti ve CLDN4 ekspresyonu üzerine literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunması, elde edilen sonuçların mevcut bilgilerle doğrudan

karşılaştırılmasını zorlaştırmıştır.

Çalışma retrospektif olarak tasarlandığı için kullanılan preparatların kalitesi zamanla bozulmuş olabilir. Bu durum, mikroskopik ve moleküler analizlerde hassasiyeti olumsuz etkileyebilir.

Erken evre KHDAK hastalarında MM ile nüks ve genel sağkalım arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için mevcut takip süresi yeterli olmayabilir. Uzun dönemli takip çalışmalarının (örneğin 10 yıllık prognoz değerlendirmesi) gerçekleştirilmesi, KHDAK hastalarındaki moleküler MM'lerin prognostik değerini daha net bir şekilde ortaya koyabilir.

İncelenen lenf nodu sayısının fazla olması nedeniyle N2 lenf nodları için pooling yöntemi uygulanmıştır. Bu yaklaşım, MM tespiti için hassasiyeti etkileyebilecek bir sınırlamadır.

Çalışma tek bir hastanede yürütülmüştür. Bu nedenle, sonuçlarımız farklı coğrafi bölgelerde veya popülasyonlarda genelleştirilemeyebilir.

Çalışma sürecinde maddi kaynakların sınırlı olması, analiz kapasitemizi ve kapsamımızı etkileyen bir diğer faktör olmuştur.

6. SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, KHDAK hastalarında dPCR yöntemiyle lenf nodu mikrometastazlarının hassas ve güvenilir bir şekilde tespit edilebileceğini göstermektedir. MM'nin sağkalım üzerine etkisi sınırlı vaka sayısı nedeniyle anlamlı bulunmasa da, bazı klinikopatolojik özelliklerle olan ilişkileri potansiyel prognostik değer taşıyabilir. Bu durumun geniş çaplı ve prospektif çalışmalarla desteklenmesi gereklidir. Moleküler yöntemlerin klinik uygulamalarda yaygınlaştırılması, akciğer kanseri tedavi protokollerinin daha iyi yapılandırılmasına yardımcı olabilir.



KAYNAKLAR

- [1] A. C, Tomohiro, V. di Carlo, R. Harewood, M. Matz, and A. Bonaventura, “Concord-3,” *Lancet*, vol. 391, no. 10125, pp. 1023–1075, 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.Global.
- [2] T. Luo, Q. Chen, and J. Zeng, “Analysis of lymph node metastasis in 200 patients with non-small cell lung cancer,” *Transl. Cancer Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 1577–1583, 2020, doi: 10.21037/tcr.2020.01.67.
- [3] J. H. Jeong, N. Y. Kim, and J. S. Pyo, “Prognostic roles of lymph node micrometastasis in non-small cell lung cancer,” *Pathol. Res. Pract.*, vol. 214, no. 2, pp. 240–244, 2018, doi: 10.1016/j.prp.2017.11.005.
- [4] S. Benlloch *et al.*, “Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC): Prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases,” *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 1, pp. 91–97, 2009, doi: 10.1093/annonc/mdn538.
- [5] J. Sun *et al.*, “Lymph node micrometastasis in non–small cell lung cancer,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 149, no. February, p. 112817, 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.112817.
- [6] The Lancet Regional Health – Europe, “NSCLC: bridging the gap between clinical progress and real-world application,” *Lancet Reg. Heal. - Eur.*, vol. 38, p. 100878, 2024, doi: 10.1016/j.lanepe.2024.100878.
- [7] American Cancer Society, “2024-Cancer-Facts-and-Figures-Acs,” *Cancer Facts and Figures*. pp. 4–5, 2024, [Online]. Available: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2024/2024-cancer-facts-and-figures-acf.pdf>.
- [8] *Non- Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ)- Health Professional Version*. 2024.
- [9] W. D. Travis, “Pathology of Lung Cancer,” *Clin. Chest Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 669–692, 2011, doi: 10.1016/j.ccm.2011.08.005.
- [10] “WCLC Attendees hear Preview of Proposed Changes for the 9th Edition of the TNM Staging Classification for Thoracic Cancers.” 2023.
- [11] A. J. Patel and A. Bille, “Lymph node dissection in lung cancer surgery,” *Front. Surg.*,

- vol. 11, no. April, pp. 1–5, 2024, doi: 10.3389/fsurg.2024.1389943.
- [12] A. H. El-Sherief, C. T. Lau, C. C. Wu, R. L. Drake, G. F. Abbott, and T. W. Rice, “International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) lymph node map: Radiologic review with CT illustration,” *Radiographics*, vol. 34, no. 6, pp. 1680–1691, 2014, doi: 10.1148/rg.346130097.
 - [13] P. Goldstraw *et al.*, “The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 11, no. 1, pp. 39–51, 2016, doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
 - [14] Z. Wang *et al.*, “Skip metastasis in mediastinal lymph node is a favorable prognostic factor in N2 lung cancer patients: a meta-analysis,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 9, no. 3, pp. 218–218, 2021, doi: 10.21037/atm-20-3513.
 - [15] G. A. Silvestri *et al.*, “Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines,” *Chest*, vol. 143, no. 5 SUPPL, pp. e211S–e250S, 2013, doi: 10.1378/chest.12-2355.
 - [16] A. Gómez-caro *et al.*, “False-negative rate after positron emission tomography/computer tomography scan for mediastinal staging in ci stage non-small-cell lung cancer,” *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 42, no. 1, pp. 93–100, 2012, doi: 10.1093/ejcts/ezr272.
 - [17] L. M. Wu *et al.*, “Preoperative mediastinal and hilar nodal staging with diffusion-weighted magnetic resonance imaging and fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in patients with non-small-cell lung cancer: Which is better?,” *J. Surg. Res.*, vol. 178, no. 1, pp. 304–314, 2012, doi: 10.1016/j.jss.2012.03.074.
 - [18] F. C. Detterbeck, M. A. Jantz, M. Wallace, J. Vansteenkiste, and G. A. Silvestri, “Invasive mediastinal staging of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition),” *Chest*, vol. 132, no. 3 SUPPL., pp. 202S–220S, 2007, doi: 10.1378/chest.07-1362.
 - [19] V. W. Rusch, H. Asamura, H. Watanabe, D. J. Giroux, R. Rami-Porta, and P.

- Goldstraw, “The IASLC lung cancer staging project : A proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 4, no. 5, pp. 568–577, 2009, doi: 10.1097/JTO.0b013e3181a0d82e.
- [20] M. B. Von Bartheld, M. I. M. Versteegh, J. Braun, L. N. A. Willems, K. F. Rabe, and J. T. Annema, “Transesophageal ultrasound-guided fine-needle aspiration for the mediastinal restaging of non-small cell lung cancer,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 6, no. 9, pp. 1510–1515, 2011, doi: 10.1097/JTO.0b013e31821e1a64.
- [21] L. D. Sharples *et al.*, “Clinical effectiveness and cost-effectiveness of endobronchial and endoscopic ultrasound relative to surgical staging in potentially resectable lung cancer: Results from the ASTER randomised controlled trial,” *Health Technol. Assess. (Rockv.)*, vol. 16, no. 18, pp. 1–81, 2012, doi: 10.3310/hta16180.
- [22] J. E. Bousema *et al.*, “MEDIAStinal staging of non-small cell lung cancer by endobronchial and endoscopic ultrasonography with or without additional surgical mediastinoscopy (MEDIAStrial): a statistical analysis plan,” *Trials*, vol. 22, no. 1, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1186/s13063-021-05127-6.
- [23] R. Rami-Porta and S. Call, “Invasive Staging of Mediastinal Lymph Nodes: Mediastinoscopy and Remediastinoscopy,” *Thorac. Surg. Clin.*, vol. 22, no. 2, pp. 177–189, 2012, doi: 10.1016/j.thorsurg.2011.12.003.
- [24] M. Hürtgen, G. Friedel, H. Toomes, and P. Fritz, “Radical video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy (VAMLA) - Technique and first results,” *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 21, no. 2, pp. 348–351, 2002, doi: 10.1016/S1010-7940(01)01125-3.
- [25] J. Kuzdzał *et al.*, “Transcervical extended mediastinal lymphadenectomy - The new operative technique and early results in lung cancer staging,” *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 27, no. 3, pp. 384–390, 2005, doi: 10.1016/j.ejcts.2004.12.008.
- [26] C. Obiols *et al.*, “Survival of patients with unsuspected pN2 non-small cell lung cancer after an accurate preoperative mediastinal staging,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 97, no. 3, pp. 957–964, 2014, doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.09.101.
- [27] G. Wang *et al.*, “Value of N1 Lymph Node Examination in the Prognosis of Patients

- With pT1-3N0M0 Non-Small Cell Lung Cancer,” *Front. Oncol.*, vol. 10, no. December, pp. 1–8, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.603378.
- [28] S. E. AKIN and F. M. DURAN, “Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarda Tümör Histopatolojisinin Lokal Ve Uzak Nüks Etkileri,” *SDÜ Tıp Fakültesi Derg.*, vol. 26, no. 4, pp. 480–485, 2019, doi: 10.17343/sdutfd.647664.
- [29] D. Oh *et al.*, “The prognostic impact of supraclavicular lymph node in N3-IIIB stage non-small cell lung cancer patients treated with definitive concurrent chemo-radiotherapy,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 22, pp. 35700–35706, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16054.
- [30] S. Park, W. S. Yoon, M. H. Jang, and C. H. Rim, “Clinical impact of supraclavicular lymph node involvement of stage iiic non-small cell lung cancer patients,” *Med.*, vol. 57, no. 3, 2021, doi: 10.3390/MEDICINA57030301.
- [31] R. Osarogiagbon, P. Van Schil, ... D. G.-J. of thoracic, and undefined 2022, “The IASLC Lung Cancer Staging Project: Overview of Challenges and Opportunities in Revising the Nodal Classification of Lung Cancer,” *Elsevier*, vol. 18, no. 4, pp. 410–418, 2024, doi: 10.1016/j.jtho.2022.12.009.The.
- [32] Y. Bayrak and Ş. Dilege, “Erken evre akciğer kanserinde robotik lobektomi,” *Turkish J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 21, no. 1, pp. 229–231, 2013, doi: 10.5606/tgkdc.dergisi.2013.4724.
- [33] E. Lim *et al.*, “Video-Assisted Thoracoscopic or Open Lobectomy in Early-Stage Lung Cancer,” *NEJM Evid.*, vol. 1, no. 3, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1056/evidoa2100016.
- [34] M. J. O’Melia, M. P. Manspeaker, and S. N. Thomas, “Tumor-draining lymph nodes are survival niches that support T cell priming against lymphatic transported tumor antigen and effects of immune checkpoint blockade in TNBC,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 70, no. 8, pp. 2179–2195, 2021, doi: 10.1007/s00262-020-02792-5.
- [35] M. K. Rahim *et al.*, “Dynamic CD8⁺ T cell responses to cancer immunotherapy in human regional lymph nodes are disrupted in metastatic lymph nodes,” vol. 186, no. 6, pp. 1127–1143, 2024, doi: 10.1016/j.cell.2023.02.021.Dynamic.
- [36] A. R. Belanger *et al.*, “Incidence and clinical relevance of non-small cell lung cancer lymph node micro-metastasis detected by staging endobronchial ultrasound-guided

- transbronchial needle aspiration,” *J. Thorac. Dis.*, vol. 11, no. 8, pp. 3650–3658, 2019, doi: 10.21037/jtd.2019.05.36.
- [37] P. Goldstraw *et al.*, “The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 2, no. 8, pp. 706–714, 2007, doi: 10.1097/JTO.0b013e31812f3c1a.
- [38] S. C. Immerman, R. M. Vanecko, W. A. Fry, L. R. Head, and T. W. Shields, “Site of Recurrence in Patients with Stages I and II Carcinoma of the Lung Resected for Cure,” vol. 32, no. 1, pp. 23–27, 1981, doi: 10.1016/S0003-4975(10)61368-9.
- [39] N. C. Lung, A. F. Verhagen, J. Bulten, and H. Shirango, “The Clinical Value of Lymphatic Micrometastases in,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 5, no. 8, pp. 1201–1205, 2010, doi: 10.1097/JTO.0b013e3181e29ace.
- [40] L. W. Martin *et al.*, “Detection of occult micrometastases in patients with clinical stage I non-small-cell lung cancer: A prospective analysis of mature results of CALGB 9761 (Alliance),” *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. 13, pp. 1484–1491, 2016, doi: 10.1200/JCO.2015.63.4543.
- [41] L. Xi *et al.*, “A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 8, pp. 2484–2491, 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2037.
- [42] S. Crucitta *et al.*, “Comparison of digital PCR systems for the analysis of liquid biopsy samples of patients affected by lung and colorectal cancer,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 541, no. December 2022, p. 117239, 2023, doi: 10.1016/j.cca.2023.117239.
- [43] A. Moreno-Manuel *et al.*, *dPCR application in liquid biopsies: divide and conquer*, vol. 21, no. 1. Taylor & Francis, 2021.
- [44] H. Süer *et al.*, “Combination of CEACAM5, EpCAM and CK19 gene expressions in mediastinal lymph node micrometastasis is a prognostic factor for non-small cell lung cancer,” *J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–10, 2023, doi: 10.1186/s13019-023-02297-z.
- [45] X. Zhang, X. Wang, Y. Wen, S. Chen, C. Zhou, and F. Wu, “Single-cell transcriptomics reveal metastatic CLDN4 + cancer cells underlying the recurrence of

- malignant pleural effusion in patients with advanced non-small-cell lung cancer ,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 14, no. 4, 2024, doi: 10.1002/ctm2.1649.
- [46] M. C. Chae, C. K. Park, D. Y. Keum, I. Hwang, K. Y. Kwon, and B. C. Jang, “Prognostic significance of claudin 4 in completely resected adenocarcinoma of the lung,” *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 47, no. 3, pp. 262–268, 2014, doi: 10.5090/kjtcs.2014.47.3.262.
- [47] C. Patriarca, R. Maria, A. K. Marschner, and H. Mellstedt, “Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer : A short review,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 38, no. 1, pp. 68–75, 2012, doi: 10.1016/j.ctrv.2011.04.002.
- [48] N. Zhou *et al.*, “MTA1-upregulated EpCAM is associated with metastatic behaviors and poor prognosis in lung cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1186/s13046-015-0263-1.
- [49] W. A. Osta *et al.*, “EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy,” pp. 5818–5824, 2004.
- [50] S. Kuhn *et al.*, “A Complex of EpCAM , Claudin-7 , CD44 Variant Isoforms , and Tetraspanins Promotes Colorectal Cancer Progression,” vol. 5, no. June, pp. 553–568, 2007, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0384.
- [51] T. Okada, T. Nakamura, T. Watanabe, N. Onoda, and A. Ashida, “Coexpression of EpCAM , CD44 Variant Isoforms and Claudin-7 in Anaplastic Thyroid Carcinoma,” vol. 9, no. 4, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094487.
- [52] C. F. Mountain, “special report Revisions in the International System for Staging Lung Cancer *,” pp. 2–9, 1997.
- [53] C. E. Nwogu *et al.*, “NIH Public Access,” vol. 145, no. 3, pp. 702–708, 2014, doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.12.023.Lung.
- [54] P. Quan, M. Sauzade, and E. Brouzes, “dPCR : A Technology Review,” 2018, doi: 10.3390/s18041271.
- [55] A. Mirabile *et al.*, “Advancing Pathogen Identification : The Role of Digital PCR in Enhancing Diagnostic Power in Different Settings,” 2024.

- [56] P. E. Postmus and D. Cohen, “Systematic review and meta-analysis of the prognostic impact of lymph node micrometastasis and isolated tumour cells in patients with stage I – IIIA non-small cell lung cancer,” pp. 650–663, 2023, doi: 10.1111/his.14831.
- [57] P. Gwóźdź *et al.*, “Prognosis of Patients with Stages I and II Non–Small Cell Lung Cancer With Nodal Micrometastases,” *Ann. Thorac. Surg.*, no. 2018, 2017, doi: 10.1016/j.athoracsur.2017.12.006.
- [58] C. Dai, J. Li, L. Yu, and X. Li, “Molecular diagnosis and prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative non-small cell lung cancer,” pp. 1245–1253, 2013, doi: 10.1007/s13277-013-0667-5.
- [59] B. Guani, V. Balaya, L. Magaud, F. Lecuru, and P. Mathevet, “The Clinical Impact of Low-Volume Lymph Nodal Metastases in Early-Stage Cervical Cancer : The Senticol 1 and Senticol 2 Trials,” vol. L.
- [60] C. Lung, C. Patients, Á. Zúñiga, N. J. Martínez-hernández, and J. M. Galbis-caravajal, “Clinical Significance of Molecular Micrometastasis in the Sentinel Lymph Node of Early-stage Non – Small,” vol. 00, no. 00, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1097/COC.0000000000000432.
- [61] X. Zhang, L. Ma, M. Xue, Y. Sun, and Z. Wang, “Advances in lymphatic metastasis of non- small cell lung cancer,” vol. 1, pp. 1–16, 2024.
- [62] J. Wang *et al.*, “Clinical Significance and Role of Lymphatic Vessel Invasion as a Major Prognostic Implication in Non-Small Cell Lung Cancer : A Meta-Analysis,” vol. 7, no. 12, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0052704.
- [63] I. K. Ruf, B. J. Hindson, R. L. Vessella, and M. Tewari, “HHS Public Access,” vol. 10, no. 10, pp. 1003–1005, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2633.Absolute.
- [64] S. Park, A. Rana, and W. Sung, “Competitiveness of Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) Technologies , with a Particular Focus on Detection of Antibiotic Resistance Genes (ARGs),” pp. 426–444, 2021.
- [65] T. Z. Arabi, W. Alkattan, and N. A. Osman, “Deciphering the role of claudins in lung cancer,” no. September, pp. 1–8, 2024, doi: 10.3389/fonc.2024.1435535.

- [66] R. Fujiwara-tani *et al.*, “Claudin-4 : A New Molecular Target for Epithelial Cancer Therapy,” pp. 1–15, 2023.
- [67] C. J. O. Donovan, L. T. Tan, M. A. Z. Abidin, M. R. Roderick, A. Grammatikos, and J. Bernatoniene, “Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease : Strengths and Challenges in the Genomic Era,” 2024.
- [68] N. Rakislova *et al.*, “Lymph node pooling : a feasible and efficient method of lymph node molecular staging in colorectal carcinoma,” *J. Transl. Med.*, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1186/s12967-016-1114-3.

