

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KARSİNOMLARINDA PD-L1
EKSPRESYONUNUN
KLİNİKOPATOLOJİK VE PROGNOSTİK ÖZELLİKLER İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. GİZEM TOKER ÇALIŞKAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. NALAN AKYÜREK

ANKARA

HAZİRAN 2016

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER KARSİNOMLARINDA PD-L1
EKSPRESYONUNUN
KLİNİKOPATOLOJİK VE PROGNOTİK ÖZELLİKLER İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. GİZEM TOKER ÇALIŞKAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. NALAN AKYÜREK

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2015-57 proje kod numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
HAZİRAN 2016

TEŞEKKÜRLER

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD da araştırma görevlisi olarak çalıştığım süre içerisinde her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yetişmemde büyük katkıları bulunan, en başta tez danışmanım, Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nalan Akyürek'e değerli hocalarım Prof. Dr. Ömer Uluoğlu, Prof. Dr. Leyla Memiş, Prof. Dr. Ayşe Dursun, Prof. Dr. Gülen Akyol, Prof. Dr. Aylar Poyraz, Prof. Dr. Özlem Erdem, Doç. Dr. İpek Işık Gönül, Doç. Dr. Güldal Esendağlı, Doç. Dr. Pınar Uyar Göçün ve Yard. Doç. Dr. Özgür Ekinci'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık yıllarım boyunca beraber çalıştığım ve birbirimize destek olduğumuz çok sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve bana her konuda yardımcı olan tüm laboratuvar personeli, arşiv görevlileri ve sekreter arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Benim için elinden gelenin hep en iyisini yapmaya çalışan sevgili babam, küçücük kalbiyle beni hep destekleyen canım kardeşim ve hep kalbimde olan bugünlere gelmemde çok yardımcı olan canım anneme çok teşekkür ederim.

Son olarak beni her zaman cesaretlendiren, kötü anlarımda hep yanımda olan sevgili eşim Dikmen Çalışkan'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	İİ
TABLOLAR	İV
ŞEKİLLER	VI
GRAFİKLER	VII
RESİMLER	VIII
KISALTMALAR	IX
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 AKCİĞER ANATOMİSİ:.....	3
2.2 AKCİĞER KANSERİ ETYOLOJİSİ	3
2.2.1 Sigara:.....	3
2.2.2 Çevresel Kirlilik:	4
2.2.3 İyonize Radyasyon:	4
2.2.4 Asbestozis:.....	5
2.2.5 Diğer Endüstriyel Tehlikeler:	5
2.2.6 Pulmoner Fibrozis:	5
2.2.7 Virüsler:.....	6
2.2.8 Malformasyon:	6
2.3 KONAK İMMÜN SİSTEMİ VE TÜMÖR:	6
2.4 İMMÜN KONTROL NOKTALARI VE KANSER İMMÜNOTERAPİSİ:	11
2.5 AKCİĞER KANSERLERİ DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ 2015 SINIFLAMASI.....	16
2.6 AKCİĞER KANSERLERİNDE İMMÜNHİSTOKİMYA:	18
2.7 AKCİĞER KANSERLERİNİN PATOLOJİK TNM SINIFLAMASI VE EVRELENDİRİLMESİ:	19
3 GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 OLGULARIN SEÇİLMESİ, VERİLERİN TOPLANMASI VE MORFOLOJİK PARAMETRELER:.....	23

3.2	OLGULARIN HAZIRLANMASI:	24
3.3	İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA:	24
3.4	İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ:.....	25
3.5	İSTATİKSEL ANALİZ:	26
4	BULGULAR	27
4.1	HASTALARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ VE TÜMÖR KARAKTERİSTİKLERİ: 27	
4.2	İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULARIN KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ:	29
4.2.1	Tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi:	29
4.2.2	Tam doku kesitlerinde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi:.....	34
4.2.3	Tam doku kesitlerinde tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi	43
4.3	TAM DOKU KESİTLERİNDE PD-L1 EKSPRESYONU İLE MODİFİYE DOKU MİKRODİZİN YÖNTEMİ İLE HAZIRLANAN KESİTLERDE PD-L1 EKSPRESYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI:	52
4.4	KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLER VE PD-L1 EKSPRESYONUNUN HASTALIK SAĞKALIMI İLE İLİŞKİSİ:.....	57
5	TARTIŞMA	61
6	SONUÇLAR	75
7	ÖZET	79
8	SUMMARY	81
9	KAYNAKLAR	83

TABLÖLAR

Tablo 1: Akciğer kanserinde TNM evrelemesi

Tablo 2: Tümör hücrelerinde ve tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonu

Tablo 3: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularının demografik ve prognostik özellikleri

Tablo 4: PD-L1 ekspresyonu ile histolojik alt tip arasındaki ilişki

Tablo 5: Adenokarsinom alt tipleri ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 6: Skuamöz hücreli karsinom (SHK) alt tipleri ile PD-L1 arasındaki ilişki

Tablo 7: Klinik evre ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 8: PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Tablo 9: Tümörün histolojik alt tipi ile tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 10: Adenokarsinom alt tipleri ile tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 11: Skuamöz hücreli karsinom (SHK) alt tipleri ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 12: Klinik evre ile tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 13: Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özellikler ilişkisi

Tablo 14: Tümörün histolojik alt tipi ile tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonu oranları

Tablo 15: Adenokarsinom alt tipleri ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 16: Skuamöz hücreli karsinom (SHK) alt tipleri ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 17: Klinik evre ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 18: Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özellikler ile ilişkisi

Tablo 19: Tam doku ve modifiye doku kesitlerinde, tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması

Tablo 20: Tek değişkenli sağkalım analizleri

Tablo 21: Çok değişkenli sağkalım analizleri

Tablo 22: KHDAK'da PD-L1 ekspresyonunu gösteren çalışmalar

Tablo 23 : Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında PD-L1 ekspresyonun sağ kalım ilişkisini gösteren çalışmalar

ŞEKİLLER

Şekil 1: Tümör immün düzenleme (immünoediting)

Şekil 2: CTLA-4 aracılı immün sistem inhibisyonu

Şekil 3: PD-L1 aracılı immün sistem inhibisyonu

Şekil 4: İmmün kontrol noktaları ve immünoterapi



GRAFİKLER

Grafik 1: Tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonu

Grafik 2: Tam doku kesitlerinde, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu

Grafik 3: Tam doku kesitlerinde, tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu

Grafik 4: Tam doku ve modifiye doku mikrodizin kesitlerinde, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması

Grafik 5: Tam doku ve modifiye doku mikrodizin kesitlerinde, tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması

Grafik 6: Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki

Grafik 7: İnflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki

Grafik 8: PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki

RESİMLER

Resim 1A: Adenokarsinomda tümör hücrelerinde %50'den fazla, (+3) PD-L1 ekspresyonu

Resim 1B: Skuamöz hücreli karsinomda tümör hücrelerinde %50'den fazla, (+3) PD-L1 ekspresyonu

Resim 1C: Adenokarsinomda tümör hücrelerinde %5-50 oranında, (+2) PD-L1 ekspresyonu

Resim 1D: Skuamöz hücreli karsinomda tümör hücrelerinde %5-50 oranında, (+2) PD-L1 ekspresyonu

Resim 1E: Adenokarsinomda %5'ten az oranda tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu

Resim 1F: Skuamöz hücreli karsinomda %5'ten az oranda tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu

Resim 1G: Skuamöz hücreli karsinomda tümör hücrelerinde negatif PD-L1 ekspresyonu

Resim 1H: Kontrol olarak kullanılan tonsil dokusundaki PD-L1 ekspresyonu

Resim 2A: Adenokarsinomda tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında %10'dan fazla, (+3) PD-L1 ekspresyonu

Resim 2B: Skuamöz hücreli karsinomda tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında %10'dan fazla, (+3) PD-L1 ekspresyonu

Resim 2C: Adenokarsinomda tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında %5-10 arasında, (+2) PD-L1 ekspresyonu

Resim 2D: Skuamöz hücreli karsinomda tümörü infiltre eden inflamatuvar gruplarında %5-10 arasında, (+2) PD-L1 ekspresyonu

Resim 2E: Adenokarsinomda tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında %5'den az, (+1) PD-L1 ekspresyonu

Resim 2F: Skuamöz hücreli karsinomda tümörü infiltre eden inflamatuvar gruplarında %5'den az, (+1) PD-L1 ekspresyonu

Resim 3A: Tam doku kesitlerinde tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre grubunda (+3) boyanma

Resim 3B: Modifiye doku mikrodizin yöntemi ile hazırlanan kesitlerde, tümör hücrelerinde 0 ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında (+1) boyanma

Resim 4A: Tam doku kesitlerinde tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki negatif boyanma

Resim 4B: Modifiye doku mikrodizin yöntemi ile hazırlanan kesitlerde tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki (+3) boyanma

KISALTMALAR

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

CTLA-4: T-lenfosit ilişkili antijen 4

PD-1: Programlanmış hücre ölümü-1

PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligandı-1

PD-L2: Programlanmış hücre ölümü ligandı-2

TH: Tümör hücreleri

TİL: Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücreler

ADK: Adenokarsinom

SHK: Skuamöz hücreli karsinom

1 GİRİŞ

Akciğer kanseri dünyada görülen en sık kanser tipidir. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yayınlanan 2013 yılı Türkiye Kanser İstatistikleri'ne göre solunum yolu kanserleri (C 30-34, C 37-37) tüm yaş gruplarında, erkeklerde en sık görülen (%21,9) kanser iken, kadınlarda 4. sırada (%5,3) yer almaktadır. Solunum yolu kanserleri içerisinde en sık görülen kanser %97 oranı ile akciğer kanseridir. En sık görülen histolojik alt tip %40,2 oranı ile adenokarsinomlar iken bunu %39 oranı ile yassı hücreli karsinomlar takip etmektedir. Akciğer kanserlerinin %52'si tanı anında metastatiktir (1).

Akciğer karsinogenezi çok basamaklı bir süreç olup, bir çok genetik değişiklik meydana gelmektedir. Ancak tümör hücresinin yaşamı için temel olan belirli genetik anormallikler mevcuttur. Bu anormalliklere 'sürücü mutasyonlar' denilmektedir. Bunlar içinde en önemlileri EGFR, KRAS mutasyonu ve ALK rearranjmanıdır. EGFR mutasyonu ve ALK rearranjmanı genellikle sigara içmeyen, daha genç yaşta ve tümörün periferik yerleşimli olduğu hastalarda görülürken, KRAS mutasyonu sigara içen ve hiler yerleşimli bölge tümörlerinde sıktır. Bunların dışında akciğer kanserlerinde tanımlanan diğer genetik değişiklikler BRAF, ERBB2/HER2, PIK3CA, RB, TP53 mutasyonları, ERBB2/HER2, MET, MYC, FGFR1 amplifikasyonları, RET, ROS1, NTRK1, NRG1 gen rearranjmanlarıdır. Günümüzde karsinogenezdeki bu genetik değişikliklerin tanımlanması ile akciğer kanseri ile savaş konusunda hedef tedaviye yönelik umut verici gelişmeler olmuştur. Bunun en tipik örneği artık

rutin tedavi protokolüne giren EGFR mutasyonuna yönelik EGFR tirozin kinaz inhibitör tedavisi, ALK ve ROS1 rearranjmanına yönelik ALK tirozin kinaz inhibitör tedavileridir (2).

Bununla birlikte akciğer kanserlerinde umut verici tedaviler arasında immünoterapi de yer almaktadır. Programmed cell death (Programlanmış hücre ölümü)-1 /PD-1, aktive T- ve B- lenfositlerde bulunan inhibitör reseptör olup Programmed cell death ligand (Programlanmış hücre ölümü ligandı)-1/PD-L1 ve Programmed cell death ligand (Programlanmış hücre ölümü ligandı)-2/PD-L2 olmak üzere iki adet ligandı vardır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, tümör hücrelerinin PD-1/PD-L1 aktivasyonu ile organizmanın immün gözetiminden kaçınmasını sağlayacak immünsüpresif bir tümör mikroçevresi oluşumunu tetiklediğini göstermiştir. Bazı araştırmalarda PD-L1'in bazı kanser tiplerinde (pankreas kanseri (3), kolorektal kanserler (4), mide kanseri (5), serviks kanseri (6), over kanseri (7), renal hücreli karsinom ve malign melanom) kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu araştırmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde opere olmuş küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde (KHDAK) PD-L1 ekspresyonu ile hastaların klinikopatolojik özellikleri ve hastalık prognozu ile ilişkisi araştırılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Akciğer anatomisi:

Akciğerler tepesi yukarıda tabanı aşağıda koni biçiminde, orta mediasten yerleşimlidir. Akciğerlerin dış yüzleri visseral plevra ile örtülüdür. Hemen altlarında diyafram bulunmaktadır. Yetişkin bir erkekte sağ akciğer yaklaşık 625 gr, sol akciğer ise 597 gramdır. Erişkin bir erkekte akciğerler derin bir inspirasyonda, 3700 cm^3 hava alır.

Her iki akciğer, hilum pulmonalise kadar uzanan derin yarıklar ile sağda üç, solda iki loba ve loblar da kendi içinde toplam 19 adet olmak üzere segmentlere ayrılır. Her bir akciğer segmentinin kendine ait damarları, bronş segmenti ve sinirleri vardır.

Akciğerin fonksiyonel ve besleyici olmak üzere iki farklı arteriyel damar sistemi vardır. Organın fonksiyonel damarları a. pulmonalis ve v. pulmonalis, besleyici damarları ise a. bronşialis ve v. bronşialis'dir. Yüzeyel ve derin olmak üzere iki grup lenf damar ağı bulunur.

2.2 Akciğer kanseri etyolojisi

2.2.1 Sigara:

Akciğer karsinomlarının %80'ni, aktif olarak sigara içen veya daha önceden sigara içmiş bireylerde görülmektedir. Kanser gelişim risk faktörü ile 'paket yıl' olarak belirlenen sigara içilme miktarı arasında lineer bir ilişki vardır (8). Sigara içerisinde bir çok kanserojen madde tanımlanmıştır. Bu

karsinojenlerin bir kısmı direkt DNA'ya bağlanarak etki gösterirken, bir kısmı nitrozaminler, benzapiren gibi partiküler olarak bileşenler halindedir (9).

Sigaranın en sık santral hava yolları yerleşimli skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom olmak üzere, tüm ana akciğer kanseri tipleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (9, 10). Ayrıca akciğer kanseri karsinogenezinin anlaşılması ile ortaya çıkan hedefe yönelik tedavi yöntemlerinden biri olan epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR)-tirozin kinaz inhibitör tedavisi alan sigara içicilerinin bu tedaviye direnç gösterdikleri izlenmiştir (11).

2.2.2 Çevresel Kirlilik:

Hava kirliliği ile akciğer kanseri gelişimi farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Örneğin fosil yakıtlarından ve kömür yakıtlarından açığa çıkan polisiklin hidrokarbonlar akciğer kanseri için önemli çevresel etkenlerdir (2). Bununla birlikte yapılan araştırmalarda bakır, demir gibi partiküler elementlerin de akciğer kanseri gelişiminde rolü olduğu saptanmıştır (12).

Hayvanlar üzerindeki deneysel araştırmalarda dizel motor yakıtlarının yanması ile açığa çıkan gazın kanserojenik olduğu görülmüş olup, insanlar içinde bu etkinin olabileceği savunulmuştur (13, 14).

2.2.3 İyonize Radyasyon:

Yüksek doz iyonize radyasyon kanserojeniktir (15). Hiroshimo ve Nagasaki atomik bomba patlamasından sonra hayatta kalanlarda akciğer kanseri

insidansında artış izlenmiştir (16). Meme karsinomu gibi terapötik amaçla verilen radyasyon ile de aynı şekilde akciğer kanser riski artmaktadır (17).

2.2.4 *Asbestozis:*

Malign mezotelyomanın en önemli etyolojik faktörlerinden biri olan asbestozis ile akciğer karsinomları arasında da kesin olarak tanımlanmış ilişki mevcuttur (18, 19). En sık adenokarsinomlarla ilişkili olduğu bulunmuştur (19).

2.2.5 *Diğer Endüstriyel Tehlikeler:*

Arsenik, uranyum, nikel, vinil klorid gibi endüstriyel ürünlere maruz kalma kanser gelişim riskini arttırmaktadır. Bu tür maruziyete kalan hasta popülasyonunda sigara içiciliği de kanser gelişiminde önemli bir kofaktördür.

2.2.6 *Pulmoner Fibrozis:*

İdiyopatik pulmoner fibrozis akciğer kanseri insidansında artışa sebep olmaktadır. Bu tümörler sıklıkla akciğerlerin alt loblarında ve periferinde izlenmektedir (20). Sarkoidozun da bazı çalışmalarda karsinomlar ile ilişkisi ortaya konulmuştur (21).

Diffüz pulmoner fibrozis ile karsinom gelişim riskine karşılık lokalize skar ile kanser gelişimi arasındaki ilişki aydınlatılamamıştır. Bir çok adenokarsinom plevrada santral skar meydana getirdiği için ‘skar kanseri’ olarak

isimlendirilmektedir. Bununla birlikte skar formasyonunun kansere ikincil mi geliştiği, yoksa skar sonrası mı tümörün geliştiği bilinmemektedir (22).

2.2.7 *Virüsler*

Özellikle Human Papilloma Virüs (Tip 16,18,31,33,35)'ün bronşial skuamöz hücreli karsinomların etyopatogenezinde rol aldığı saptanmıştır (23).

Epstein Barr Virüs ile bronkopulmoner ve nazofaringeal lenfoepitelyal karsinomlar arasında da ilişki bulunmuştur (24).

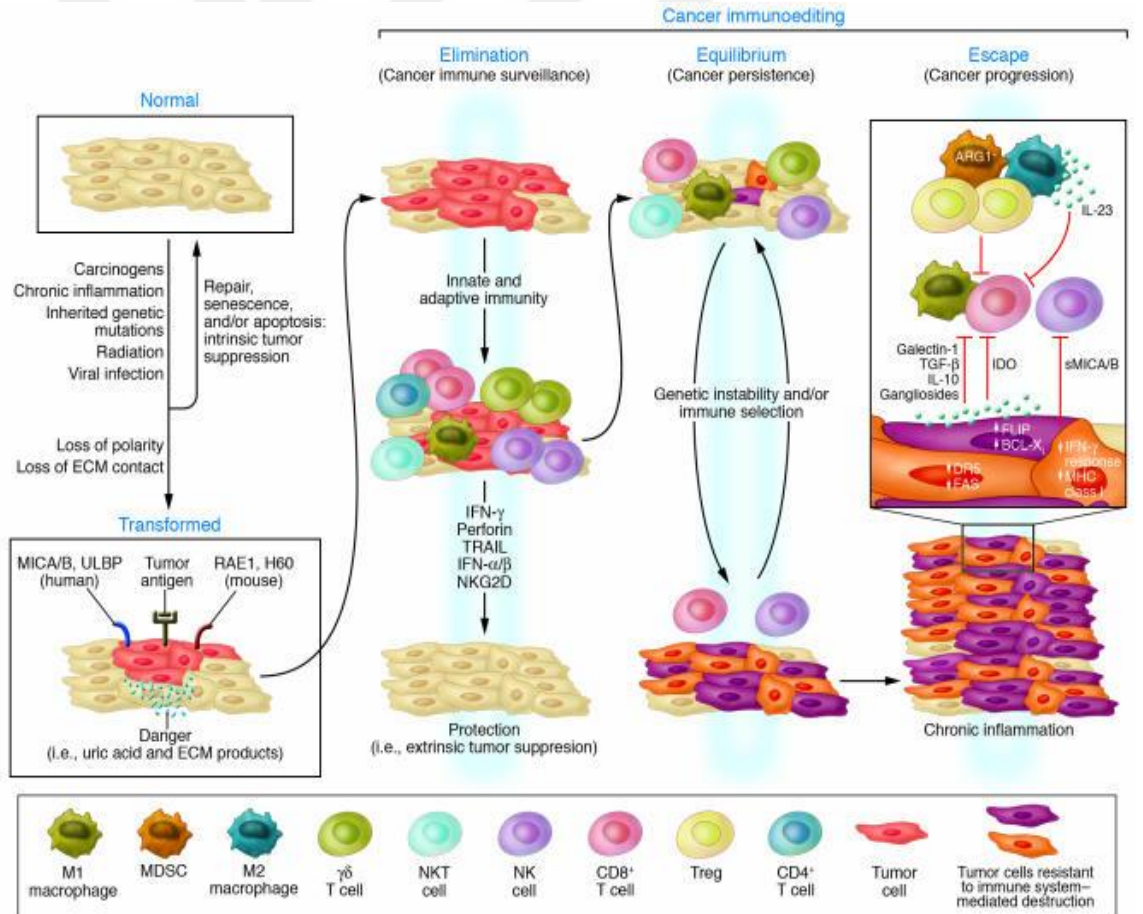
2.2.8 *Malformasyon:*

Tip-1 kistik pulmoner havayolu malformasyonuna sıklıkla fokal hücre hiperplazisi eşlik etmektedir. Bu antite nadir de olsa malign transformasyon ile lepidik patern baskın müsinöz adenokarsinoma dönüşebilir.

2.3 **Konak immün sistemi ve tümör:**

İmmün sistemin kanser ile savaşta üç rolü vardır: Birincisi, immün sistem konağı virüs aracılı oluşabilecek tümörlerden korur. İkincisi, patojenleri elimine eder ve tümör progresyonuna yardımcı olan inflamatuvar ortamın hızlı bir şekilde rezolüsyonunu sağlar. Üçüncüsü ise, tümör hücrelerinin yüzeyinde hücrel stres ile eksprese olan molekülleri ya da tümör-spesifik antijenleri tanıyarak tümör hücrelerini elimine eder. Bu üçüncü yöntem “tümör immün gözetim (immün sürveyans)” olarak adlandırılır (25).

Fonksiyonel olarak tam çalışan bir immün sistem varlığında “tümör immün gözetime” rağmen bile tümör gelişimi olabilmektedir. Bu yüzden tümör ve immün sistem ilişkisini açıklayan daha kompleks “tümör immün düzenleme” (tümör immünoediting) kavramı ortaya atılmıştır (26). Tümör immün düzenleme kavramı 3 fazdan oluşmaktadır: bertaraf etme (eliminasyon), denge ve kaçış (27) (Şekil 1).



Şekil 1: Tümör immün düzenleme (immünoediting) (27)

Eliminasyon (bertaraf etme) fazında hem doğal hem de kazanılmış immün sistem görev alır. Bu faz 4 başlık altında toplanmaktadır: (1) Tümör hücrelerinin doğal immün sistem tarafından tanınması: Bir solid tümör büyürken belli bir hacime ulaştığında hayatta kalmayı başarabilmesi için beslenmeye ve kendine uygun bir stromaya ihtiyaç duyar. Sonuç olarak çeşitli stromajenik, anjiogenik maddeler üretirler. İnvaziv paternde büyüyen tümör hücrelerinden, makrofajlardan ve tümör çevresindeki stromal hücrelerden sekrete edilen inflamatuvar sitokinler tarafından aktive olan $\gamma\delta$ T- hücreleri, Natural Killer (NK), Natural Killer T hücreleri (NKT) bu mücadelede ilk basamak olan doğal immün sistemde rol alırlar. Bu hücrelerden salınan IFN- γ etkisi ile çevredeki normal dokulardan CXCL10, CXCL9 ve CXCL11 gibi kemokinler salınır. Anjiostatik etkileri olan bu kemokinler tümör çevresinde yeni damar oluşumlarını durdurarak daha fazla tümör hücresinin ölümüne neden olur. Sekrete edilen diğer sitokinler ile de yeni immün hücreler mücadeleye katılır ve bu hücreler de diğer pro-inflamatuvar sitokinleri (IL-12 v.b.) salgılar. IFN- γ , Perforin, FasL, reaktif oksijen ve TRAIL aracılığı ile tümör hücreleri öldürülür ve tümör antijenleri (damage associated molecular patterns-DAMPs) ortaya çıkar. Böylece kazanılmış immün sistem olaya dahil olur (2). Dendritik hücrelerin matürasyonu ve migrasyonu: İmmün sistem tarafından parçalanan tümör hücreleri dendritik hücreler tarafından fagosit edilir. NK hücreleri, dendritik hücrelerin matürasyonunu ve tümörü drene eden lenf nodlarına gitmesini organize eder (28). (3) Tümör antijen spesifik T hücrelerinin doğuşu: Dendritik hücreler lenf nodunda tümör antijenlerini MHC sınıf II reseptörü ile naif CD4⁺ T hücrelerine ve MHC sınıf I reseptörü ile CD8⁺

T hücrelere sunarlar ve böylece klonal CD4+ efektör hücreler ve tümör-antijen spesifik CD8+ T hücreleri oluşur (4). Bu tümör-antijen spesifik T hücreleri primer tümör bölgesine gidip tümör hücrelerini elimine ederler. Bu immün sistem mekanizmaları ile tüm kanser hücreleri tamamen yok edilebilir ya da inkomplet bir eliminasyon olabilir. İnkomplet eliminasyon gerçekleştiğinde immün sistem ve tümör gelişimi arasında geçici bir kararlılık fazı gelişir.

Denge (Kararlılık): Bu periyod boyunca tümör hücreleri uyku halinde sessiz kalırlar ve daha fazla değişiklik yaparak (DNA mutasyonları ve gen ekspresyonunda değişiklikler) daha az immünojenik ve daha dayanıklı hale dönüşürler. Tümör, içinde bulunduğu mikroçevreyi sitokinlerinin etkisiyle kendisi için uygun hale getirmeye çalışır. Ürettiği sitokinler (IL10, PGE-2, TGF-beta vb.) aracılığıyla immün hücreleri bazı dönüşümlere (T helper 2, Treg, myeloid kökenli baskılayıcı hücreler, tümör ilişkili makrofajlar) zorlayarak immün yanıtı etkisizleştirip, inflamatuvar yanıtı söndürmeye çalışırlar. Bu oluşum devam ederken immün sistem tümör hücrelerine karşı olabildiğince hızlı bir şekilde hücum eder. Bu hızlı hücum fazı tümör progresyonunu kontrol etmek için yeterli olmadığında, kalan tümör hücreleri, dirençli bir hale gelip, anti-tümör immün cevabı başarılı bir şekilde azaltarak kaçış fazına geçer. Denge fazının tümör immün denetiminde en uzun süreç olduğu ve bu sürecin yıllar aldığı düşünülmektedir (29).

Kaçış: Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçış yolları çok çeşitlidir. Bunlar: (1) Antijen – negatif türlerin seçici olarak çoğalması: Tümör progresyonu sırasında güçlü immünolojik yanıtı yol açan klonlar Darwinian türü bir selektif

seçime uğrar (2). Antijenitelerini kaybetmeleri ve/veya immünojenitesini kaybetmeleri: Bu antijenite kaybını, antijen yapım ve sunumunda defekt ile gerçekleştirir (Major histokompatibilite ekspresyonu kaybı ya da disregülasyonu vb. (30, 31)). Ek olarak bu yolda rol alan TAP1 ve immünproteozom LMP2 ve LMP7'nin bazı tümörlerde eksik olduğu bulunmuştur (32). (3) Antijen maskeleye yöntemi: Birçok tümör hücresi, normal hücrelerdekinden daha kalın olan ve siyalik asit-içeren mukopolisakkaritler gibi glikokaliks moleküllerinden oluşan bir dış kılıf üretirler. Bu kalın kılıf, bağışıklık hücrelerinin antijen sunan hücrelere erişimini engelleyerek antijenin tanınmasını ve hücrelerin öldürülmesini önler (4). Dendritik hücrede eş-uyaran değişikliği: Tümör hücreleri CD28, CD40, CD137 gibi aktive edici eş uyaran reseptör sayısını azaltıp, inhibe edici eş uyaranların (LAG-3, CTLA4, B7-H3, PD-1) reseptör sayısında artmaya neden olabilir (5). Tümör mikroçevresinde immün süpresyon: Tümör hücreleri IL10, TGF-beta ve indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) gibi immünsüpresif sitokinler salgırlar. IDO triptofanı azaltarak T hücre disfonksiyonuna ve apoptozise sebep olur (33). Tümör aracılı üretilen solubl MHC class I zincir ilişkili molekül-A (MICA) CD8 T hücreleri ve NK hücrelerinin yüzeyinde eksprese olan NK2d'de sistemik down regülasyon ile bu hücreler tarafında efektif bir tümör eliminasyonunu azaltır (34). Bazı tümör hücrelerinin eksprese ettiğı FasL, bağışıklık hücrelerinin yüzeyindeki Fas'a bağlanır ve bağışıklık hücresinin apoptozise girmesine yol açar (35). Bazı hayvan deneylerinde IFN- γ reseptör sinyal yolağında eksiklik ile IFN- γ 'ya karşı cevapsızlık oluştuğı ve tümörün daha hızlı büyüdüğü gözlemlenmiştir (36). (6) Tümörde Toll-like reseptör üretimi: Tümörün TLR üretmesi, tümör

progresyonunu kolaylaştırır. Tümör hücreleri, aslında görevi self-toleransı önleme ve patolojik enfeksiyonlara karşı aşırı immün cevabı kontrol etmek olan immün kontrol mekanizmaları reseptörlerinde de disregülasyonuna sebep olur (29).

2.4 İmmün kontrol noktaları ve kanser immünoterapisi:

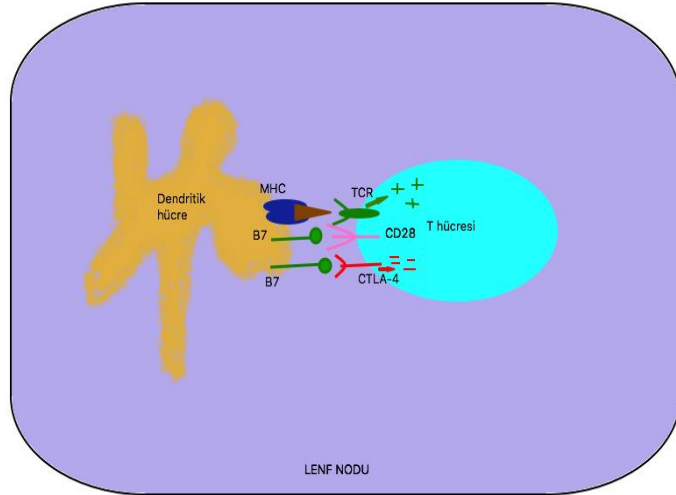
T hücrenin aktifleşmesini ve inflamatuvar yanıt sonlanması gerektiğinde de etkisizleştirilmesini sağlayan bazı kontrol mekanizmaları vardır. Antijen sunan hücrelerin yüzeyinde sunulan MHC-peptid kompleksine bağlı antijenin T hücre üzerindeki reseptöre (TCR) bağlanması T hücre yanıtı için yeterli değildir. Eş-uyaran molekülünde antijen sunan hücre üzerindeki domainleri ile bağlanması gerekir. Bu eş-uyaranlar T hücreyi aktive edici veya inhibe edici etkilere sahip olabilir. Bu eş-uyaran-ligand etkileşimleri immün sistemin kontrol noktalarıdır (Şekil 4).

Günümüzde bu immün kontrol noktaları üzerinde geliştirilen tedavi yöntemleri kanser ile savaşta umut veren yeni yöntemler arasına girmiştir. Bu tedavi yöntemlerine yönelik özellikle bazı reseptörler üzerinde çalışılmaktadır.

İmmün sistem kontrol noktalarından günümüzde en fazla araştırılanlar T-lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4), programlanmış hücre ölümü proteini-1 (PD-1) ve reseptörü PD-L1'dir. Bu reseptörler immün sistem üzerinde inhibitör etki göstermektedir. CTLA-4, üzerinde çalışılan ilk immün kontrol noktası reseptörüdür. CTLA-4 homoloğu olan CD28 ile T hücre yüzeyinde bulunup konağın kendi proteinlerine karşı self toleransın gelişmesinde rol oynar. T hücrelerinde bulunan CD28, dendritik hücrelerdeki B7 molekülleri ile etkileşime

geçerek immün aktivasyon sağlar. Bu aktivasyon belli bir düzeye gelince inhibe edilip otoimmün olayların gelişiminin engellenmesi gerekir. Bu basamakta CD28'in homologu olan, aktive T hücrelerinde bulunan CTLA-4, lenf nodunda dendritik hücreler veya antijen sunan hücrelerdeki ligandlarına bağlanarak immün sistemin aktivasyonunu inhibe eder (Şekil 2). CTLA-4 ile bağlandığı B7 ligandı immün sistem için bir çeşit fren görevi görür. CTLA-4'e karşı geliştirilen monoklonal antikorlar CTLA-4'ün ligandına bağlanmasını engelleyerek immün sistemin fren mekanizmasını ortadan kaldırır (37). Bu şekilde daha az inhibe edilen bir immünolojik aktivasyon olur. Artmış immün yanıt, tümör antijenlerine karşı verilen yanıtı artırır ve anti-tümöral etki artar .

Şekil 2: CTLA-4 aracılı immün sistem inhibisyonu



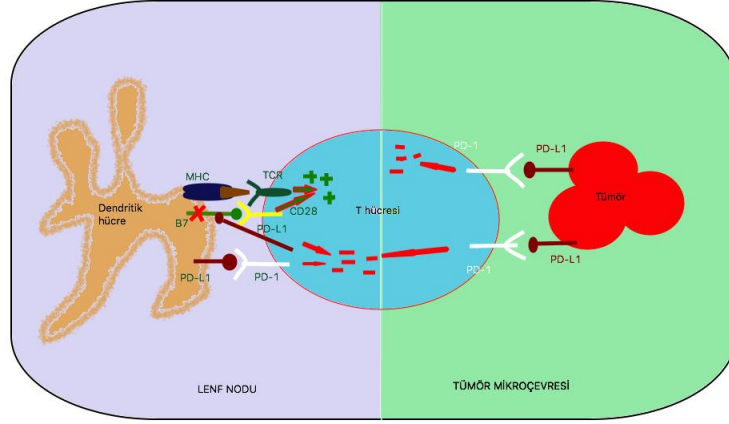
Bir diğ er immün kontrol noktasında görev alan reseptör immünglobülin süper-ailesinde yer alan PD-1 (CD279)'dir. PD-1, Tasuku Honjo ve ark. tarafından 1992'de ke fedilmi tir. PD-1, aktive olmuş T hücrelerinde (tümörü infiltr  eden T hücreleri dahil), regülatuar T hücrelerinde, B hücrelerinde, NK hücrelerinde, aktive monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olur. Görevi immünolojik aktivasyonu sınırlandırmak ve inhib  etmektir. PD-1'e bağlanarak bu inhibisyonun gerçekleşmesini sağlayan iki ligandı PD-L1 (B7-H1) ve PD-L2 (B7-DC) mevcuttur (38).

PD-L2 ligandı PD-L1 ligandına göre daha selektif bir ekspresyon profili göstermekte olup, dendritik hücreler ve makrofajlarda eksprese olur. Yapımı interlökin 4 tarafından indüklenir.

PD-L1, kromozom 9'da yer alan CD274 geni tarafından kodlanan 290 aminoasitlik tip 1 transmembran yüzey glikoproteinidir. PD-L1 aktive T hücreleri ve NK hücreleri tarafından salınan IFN-  ile indüklenir. Aktive B ve T hücrelerinde, antijen sunan hücrelerde, endotelial hücrelerde ve akciğer, meme, pankreas, kolon, böbrek kanserleri gibi bazı solid tümörlerde ekspresyonu mevcuttur (3, 4, 39-41). PD-L1'in tümör hücrelerindeki ekspresyonu iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Biri fosfoinozid 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/AKT), ekstrasellüler-sinyal-regülatuar protein kinaz/mitojen-aktif  edici kinaz (Erk/MAPK) gibi çeşitli genetik onkogenik sinyal yolakları tarafından aktive edilir (interensek immün direnç). Diğeri ise daha dinamik bir yolak olan tümör mikroçevresindeki bağımsız inflamatuvar (IFN- ) sinyaller ile ya da aktif anti-tümör immün yanıt tarafından aktive olan inflamatuvar hücrelere karşı indüklenmiş

cevaptır (adaptif immün direnç) (42, 43). Bu tür ekspresyonlar daha çok tümörün invaziv olduğu ve T hücrelerinden zengin olan alanlardaki tümör hücrelerinde görülür (43, 44). Ek olarak EGFR yolağı aktivasyonu PD-L1 ekspresyonunda azalmaya sebep olmaktadır (45). PD-L1 ligandı olan tümör hücreleri, aktive T hücrelerindeki PD-1'e bağlanarak, tümör mikroçevresinde ve PD-L1 ligandı olan tümör mikroçevresindeki dendritik hücreler aracılığıyla lenf nodunda, hem kazanılmış hem de doğal immün sistemi inhibe edilir (şekil 3).

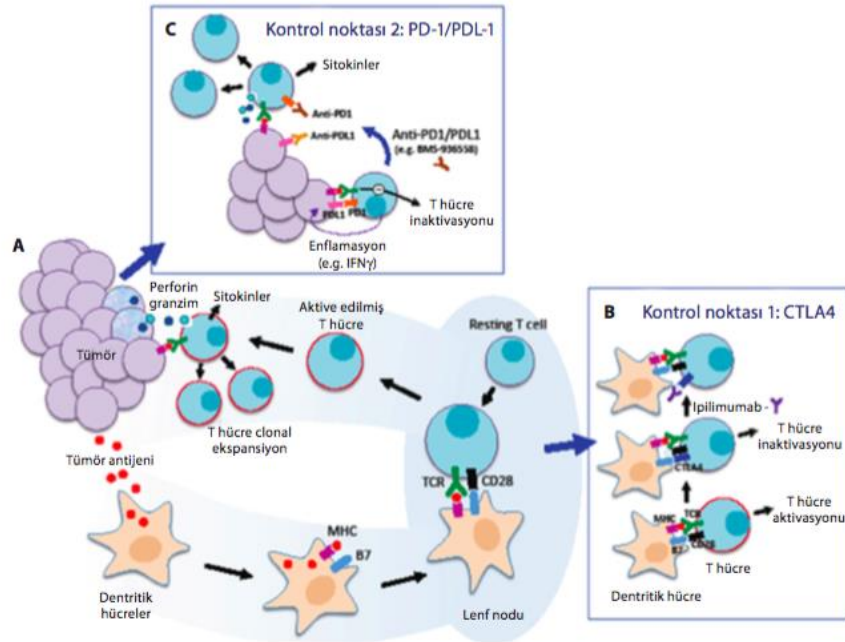
 n vivo hayvan deneylerinde PD-L1 blokajı ile anti-tümör T hücre fonksiyonunun geri çevrilebileceği gösterilmiştir (46). KHDAK'larında tümörü infiltrate eden lenfositlerde (T L) artmış PD-1 ekspresyonu ve bununla birlikte immün sistem disfonksiyonu gösterilmiştir. Bunun PD-L1 inhibisyonu ile geri çevrilebileceği  ne s r lm ştir (47).



ŞEKİL 3

Created by Paint X

Şekil 3 : PD-L1 aracılı immün sistem inhibisyonu



Şekil 4: İmmün kontrol noktaları ve İmmünoterapi

2.5 Akciğer kanserleri Dünya Sağlık Örgütü 2015 sınıflaması

1. EPİTELİYAL TÜMÖRLER:

Adenokarsinom

- Lepidik adenokarsinom
- Asiner adenokarsinom
- Papiller adenokarsinom
- Mikropapiller adenokarsinom
- Solid adenokarsinom
- İnvaziv müsinöz adenokarsinom
 - Mikst invaziv müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinom
- Kolloid adenokarsinom
- Fötal adenokarsinom
- Enterik adenokarsinom
- Minimal invaziv adenokarsinom
 - Non-müsinöz/ Müsinöz
- Preinvaziv lezyonlar
 - Atipik adenomatöz hiperplazi
 - Adenokarsinoma in situ
 - Non-müsinöz/ Müsinöz

Skumöz hücreli karsinom

- Keratinize skumöz hücreli karsinom
- Non-keratinize skumöz hücreli karsinom
- Bazaloid skumöz hücreli karsinom
- Preinvazin lezyon
 - Skumöz hücreli karsinoma in situ

Nöroendokrin tümörler

- Küçük hücreli karsinom
 - Kombine küçük hücreli karsinom
- Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
 - Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom
- Karsinoid tümör
 - Tipik karsinoid
 - Atipik karsinoid
- Preinvaziv lezyon
 - Difüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi

Büyük hücreli karşnom

Adenoskuamözkarşinom

Pleomorfik karsinom

İğsi hücreli karsinom

Dev hücreli karsinom

Karsinosarkom

Pulmoner blastom

Diğer ve sınıflandırılmayan karsinomlar

- Lenfoepitelyoma-benzeri karsinom
- Nut karsinomu

Tükrük bezi tipi tümörler

- Mukoepidermoid karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Epitelyal myoepitelyal karsinom
- Pleomorfik adenom

Papillomlar

- Skumöz hücreli papillom
 - Egzofitik/inverted
- Glandüler papillom
- Mikst skumöz hücreli ve glandüler papillom

Adenomlar

- Sklerozan pnömositom
- Alveolar adenom
- Papiller adenom
- Müsinöz kist adenom
- Müsinöz gland adenomu

2. MEZENKİMAL TÜMÖRLER

- Pulmoner hamartom
- Kondrom
- PEComatöz tümörler
 - Lenfanjiomyomatozis
 - PEComa benign
 - Şeffaf hücreli tümör
 - PEComa malign
- Konjenital peribronşial myofibroblastik tümör
- Difüz pulmoner lenfanjiomatosis
- İnflamatuvar myofibroblastik tümör
- Epiteloid hemanjiendothelyoma
- Plöropulmoner blastom
- Sinovial sarkom
- Pulmoner arter intimal sarkom
- EWSR-CERB1 translokasyonu gösteren pulmoner miksoid sarkom
- Myoepitelyal tümör
 - Myoepitelyoma
 - Myoepitelyal karsinom

3. LENFOHİSTİYOSİTİK TÜMÖRLER

- Mukoza ilişkili lenfoid dokunun ekstra nodal marjinal zon lenfoması
- Diffüz büyük B hücreli lenfoma
- Lenfomatoid granülomatozis
- İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
- Pulmoner langerhans hücreli histiyositosis
- Erdheim-Chester hastalığı

4. EKTOPIK ORJİNLİ TÜMÖRLER

- Germ hücreli tümörler
 - Teratom, matür
 - Teratom, immatür
- İntrapulmoner timoma
- Melanom
- Menenjiom, sınıflandırılmayan

5. METASTATİK TÜMÖRLER

2.6 Akciğer kanserlerinde immünhistokimya:

Günümüzde özellikle opere edilemeyen akciğer kanseri vakalarında küçük biyopsiler ile tümör alt tipini belirlemek oldukça önemli hale gelmiştir. Özellikle 2015 DSÖ Akciğer kanserleri sınıflamasında adenokarsinom-daha ileri sınıflanamayan (NOS) tanısının olabildiğince az kullanılması gerekliliği vurgulanmaktadır. Bununla birlikte adenokarsinom ya da ‘adenokarsinom’ komponenti içeren tümörleri tanımlamak hedefe yönelik tedavilerin uygulanması için gereklidir. Adenokarsinom diferansiyasyonunu göstermek için TTF-1 ve Napsin-A öne çıkmaktadır (48). Her iki belirteç de %80 sensitiviteye sahip olmakla birlikte TTF-1, nükleer boyanma gösterdiği için yorumlanması daha kolaydır. Skuamöz diferansiyasyonu göstermede en sensitif ve spesifik belirteç p40’tır. Diğer skuamöz diferansiyasyon belirteçleri CK5/6, p63 ve daha az oranda kullanılan desmokollin 3 ve desmoglein’dir. P63 belirtecinin düşünüldüğünden daha az spesifik olduğu ve adenokarsinomlarda pozitif boyanmalara rastlanabileceği görülmüştür (49).

İmmünhistokimyasal çalışmada sadece bir skuamöz ve bir adenokarsinom belirtecinin kullanılması gerekmektedir. Örneğin TTF-1 ve p40 kullanımı en uygun yaklaşım olarak gösterilmektedir (50). Ancak, immünhistokimyasal inceleme yaparken moleküler inceleme için doku ayırmak önemlidir (48).

2.7 Akciğer kanserlerinin patolojik tnm sınıflaması ve evrelendirilmesi:

Akciğer kanserinin evrelendirmesinde ‘America Joint Committee on Cancer/ Union for International Cancer Control’ (AJCC/UICC)’nin TNM sistemi kullanılmaktadır. T primer tümörü, N lenf bezi tutulumunu ve M uzak metastazı temsil etmektedir. TNM evreleme sistemi Tablo 1’de özetlenmiştir.

TNM SINIFLAMASI:

Primer Tümör: (pT)

pTx: Balgam ya da bronkoalveoler lavaj sitolojisinde malign hücreler tespit ediliyor fakat görüntüleme yöntemleri ya da bronkoskopide tümör gösterilemiyor.

T0: Primer tümör kanıtı yok.

Tis: Karsinoma in situ

T1: Tümör en büyük çapı ≤ 3 cm, akciğer ya da visseral plevra ile çevrili, lobar bronşun daha proksimaline invazyon bulgusu yok (Bronşun yüzeyel duvarıyla sınırlı süperfisyal tümörler ana bronşa ulaşsa bile T1 olarak değerlendirilir.)

T1a: Tümör en büyük çapı ≤ 2 cm

T1b: $2 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 3 \text{ cm}$

T2: $3 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 7 \text{ cm}$, karinaya 2 cm ve daha fazla uzaklıkta ana bronş tutulumu, visseral plevra invazyonu, hilusa uzanan fakat tüm akciğeri kapsamayan obstrüktif atelektazi ya da pnömoni

T2a: $3 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 5 \text{ cm}$

T2b: 5 cm < tümör en büyük çapı $\leq$ 7 cm

T3: Tümör en büyük çapı < 7 cm, göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikard invazyonu, ana bronşun karinaya 2 cm den daha az yakınlıkta invazyonu (karina tutulumu yok), tüm akciğeri kapsayan total atelektazi ya da obstrüktif pnömoni, aynı lobta tümörden anatomik olarak ayrı tümör nodülleri varlığı¹

T4: Her hangi bir boyuttaki tümörde mediasten, kalp, büyük damar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra korpusu, karina, aynı taraf farklı lobta tümör nodül ya da nodülleri varlığı.

Bölgesel Lenf Nodları (pN)

N0: Bölgesel lenf nodu tutulumu yok

N1: Aynı taraf hiler, peribronşial, interlober, lobar, segmental, subsegmental lenf nodu tutulumu, (#10, #11, #12, #13, #14)

N2: Subkarinal ve ipsilateral mediastinal lenf nodu (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #9)

N3: Kontralateral mediastinal, ipsilateral ya da kontralateral skalen ve supraklaviküler lenf nodu

Uzak metastaz (pM)

Mx: Metastaz değeriendirilemedi

M0: Metastaz kanıtı yok

M1a: Malign plevral efüzyon, malign perikardiyal efüzyon, malign plevral yayılım, kontralateral akciğerde metastaz

M1b: Uzak organ metastazı

Tablo 1: Akciğer kanserinde TNM evrelemesi

	Tümör	Lenf nodu	Metastaz
Okült karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a,b	N0	M0
Evre 1B	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Evre IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1,2	N2	M0
	T3	N1,2	M0
	T4	N0,1	M0
Evre IIIB	T4	N2	M0
	Tüm T	N3	M0
EVRE IV	Tüm T	Tüm N	M1a,b

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Olguların seçilmesi, verilerin toplanması ve morfolojik parametreler:

Çalışmamızda 2008 ile 2015 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında değerlendirilen akciğer segmentektomi, lobektomi ve pnömonektomi materyallerinde, daha önce neoadjuvan tedavi uygulanmamış KHDAK (adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, pleomorfik karsinom ve büyük hücreli karsinom) tanısı alan olgular değerlendirilmiştir.

Olgulara ait yaş, cinsiyet, tümör tipi, tümör çapı, histolojik tip, lenf nodu tutulumu, visseral plevral invazyon durumu, sigara içiciliği, T, N, M değerleri ve hastalığın klinik evresi, uzak organ metastazı, sağkalım bilgileri hastane Enlil otomasyon sistemi ve hasta takip dosyalarından taranmıştır.

Rezeksiyon materyallerine ait hematoksilen-eozin boyaları preparatları tek bir gözlemci tarafından tekrar incelenmiş ve DSÖ 2015 kriterlerine göre yeniden histopatolojik tiplendirme yapılmıştır. Hastaların klinik evrelendirmesi hastane Enlil otomasyon sistemi ve hasta takip dosyaları incelenerek America Joint Committee on Cancer/ Union for International Cancer Control' (AJCC/UICC)'nin 7. Versiyon TNM sistemine göre tek bir gözlemci tarafından tekrar evrelendirilmiştir.

Çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde 14 Aralık 2015 tarihinin 224 nolu karar ile yerel etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışma Gazi Üniversitesi

Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, 01/2015-57 No'lu proje kod numarası ile desteklenmiştir.

3.2 Olguların hazırlanması:

Olguların seçimi sırasında, her bir olgunun H&E boyalı tümör preparatları incelenerek tümör hücrelerinin en yoğun ve nekrozun en az olduğu her bir olguya ait iki ayrı lam seçilmiştir. PD-L1 immünohistokimyasal çalışması her bir olgu için hem tam doku lamında, hem de modifiye doku mikrodizini yöntemi ile hazırlanan lamlarda çalışılmıştır. Modifiye doku mikrodizini için seçilen lamlar x10'luk objektiflik büyütmede incelenerek, mikroskopik alanlar işaretlenmiştir. İşaretleme yapılırken bifazik (adenoskuamöz ve pleomorfik karsinomlar) tümörlerde seçilen alanın her iki paterni de içermesine dikkat edilmiştir. İşaretlenmiş alanlar kalıcı parafin bloklarından 3 mm'lik deri punch biyopsi aleti ile çıkarılmıştır. Çıkarılan dokular, satır ve sütünlarda hangi olgunun bulunduğunu gösteren haritalar hazırlanarak karışıklık önlenmiştir. Hazırlanan harita eşliğinde 4 satır ve 5 sütün içerecek şekilde ve bir blokta toplam 20 adet doku olacak şekilde tekrar bloklanmıştır. Rehber doku olarak plasenta dokusu kullanılmıştır.

3.3 İmmünohistokimyasal boyama:

Kullanıma hazır anti-PD-L1 (SP142) rabbit monoklonal primer antikoru ile hazırlanan 4 µm kalınlığındaki formalin fikse kesitler Ventana-XT kapalı boyama cihazında boyanmıştır. PD-L1 ekspresyonu her olgu için 2 farklı gözlemci tarafından değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanılmıştır.

3.4 İmmünohistokimyasal belirteçlerin değerlendirilmesi:

İmmünohistokimya boyalı lamalar, vakanın klinik özellikleri bilinmeden iki gözlemci tarafından değerlendirilmiştir. PD-L1 ekspresyonu, daha önceki çalışmalara benzer bir şekilde hem tümör hücrelerinde hem de tümöre eşlik eden inflamatuvar hücre gruplarında, sitoplazmik veya membranöz boyanma anlamlı kabul edilerek her iki grup ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Tümör hücrelerindeki (TH) boyanma skoru değerlendirilirken boyanma yoksa: 0, %1-5'i boyanmışsa: +1, %5-50'si boyanmışsa: +2, %50 ve üzeri boyanma: +3 skoru verilmiştir (Tablo 2).

İnflamatuvar hücrelerdeki (TİL) boyanma skoru değerlendirilirken boyanma yoksa: 0, %1-5 boyanmışsa: +1, %5-10 boyanmışsa: +2, %10 ve üzeri boyanmışsa: +3 skoru verilmiştir (Tablo 2).

+2 ve +3 skoru alan tümör hücreleri ve inflamatuvar hücreler PD-L1 ekspresyonu pozitif tümör olarak kabul edilmiştir.

Tablo 2: Tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonu

TH skoru	Boyanma Yüzdesi (TH)	TİL skoru	Boyanma yüzdesi (TİL)
0	<1	0	<1
+1	≥ 1 ve < 5	+1	≥1 ve <5
+2	≥ 5 ve < 50	+2	≥5 ve <10
+3	≥ 50	+3	≥10

3.5 İstatiksel analiz:

Verilerin analizi SPSS 21.0 Paket programında yapılmıştır. Kategorik değişkenler olgu sayıları, frekans dağılımları (%) biçiminde ifade edilmiş olup, kendi aralarındaki Ki-kare testleri ile karşılaştırılmıştır. Yaş için ortalama $\pm$ standart sapma, gruplar arasındaki değerlendirilmede ise bağımsız t testi kullanılmıştır. Hastaların klinikopatolojik özelliklerinin sağkalım üzerindeki etkisi için Kaplan Meirer testi kullanılmıştır ve Long- Rank analizi ile karşılaştırılmıştır. $P<0,20$ olan değişkenler Cox regresyon analizine alınmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı değişkenleri seçmek için backward likelihood ratio yöntemi kullanılmıştır. Cox regresyon modeline uygun olacak değerleri belirlemede Log-minus-log, Schoenfeld and Martingale artık yöntemleri kullanılmıştır. Tam doku örnekleri ve modifiye doku mikrodizini yöntemleri arasındaki uyum kappa istatistik yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Farklılıklar, p değeri 0.05 den küçük olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

4 BULGULAR

4.1 Hastaların demografik özellikleri ve tümör karakteristikleri:

Çalışmaya alınan küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgu sayısı 300'dür. Bunların 141'i (%47) adenokarsinom, 131'i (%43,7) skuamöz hücreli karsinom, 16'sı (%5,3) pleomorfik karsinom, 5'i (%1,7) adenoskuamöz, 7'si (%2,3) büyük hücreli karsinom tanısı almıştır. Adenokarsinom olgularının 85'i (%60,3) asiner, 10'u (%7,1) lepidik, 17'si (%12,1) papiller, 21'i (%14,9) solid, 8'i (%5,7) müsinöz tiptir. Skuamöz hücreli karsinomların 77'si (%57,5) keratinöz, 40'ı (%29,9) non-keratinöz, 15'i (%11,2) bazaloid tiptir. Hastaların yaş ortalaması $64,28 \pm 8,5$ olup, yaş aralığı 35 – 85'dir. Hastaların %86,6'sı erkektir. Tümör çapı ortalama 3,5 cm'dir. En büyük tümör çapı 12 cm olup, en küçük tümör çapı 0,6 cm'dir. Tüm olgularda eş zamanlı lenf nodu diseksiyonu yapılmış olup, 201 (%67) olguda lenf nodu metastazı saptanmamıştır. 54 (%18) olguda N1 seviyesinde, 45 (%15) olguda N2 seviyesinde lenf nodu metastazı saptanmıştır. Toplam 182 (%60,7) olguda visseral plevra invazyonu mevcuttur. 15 (%5) olguda tanı anında uzak metastaz mevcuttur. Hastaların 103'ü (%34,3) tanı anında evre I, 116'sı (%38,6) evre II, 58'i (%19,4) evre III, 23'ü (%7,7) evre IV' tür. Toplam 193 (%64,3) hastanın sigara içme hikayesi bulunmaktadır. Ancak 82 adet hastanın sigara öyküsüne ulaşılammıştır. Hastaların demografik ve prognostik özellikleri Tablo 3' te özetlenmiştir.

Tablo 3: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularının demografik ve prognostik özellikleri

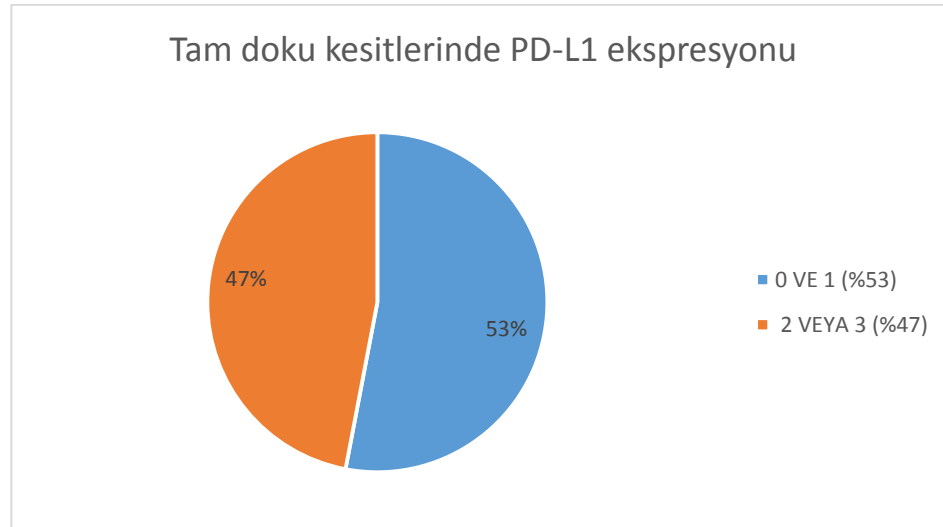
<u>Yaş</u>	Median yaş: 64,28± 8.5
<u>Cinsiyet</u> Kadın: Erkek:	42 (%14) 258 (%86)
<u>Sigara</u> İçmiş İçmemiş Bilinmiyor	193 (%64,3) 25 (%8,4) 82 (%27,3)
<u>Histolojik alt tip</u> Adenokarsinom Skvamöz hücreli karsinom Pleomorfik karsinom Adenoskuamöz karsinom Büyük hücreli karsinom	141 (%47) 131 (%43,7) 16 (%5,3) 5 (%1,7) 7 (%2,3)
<u>Tümör çapı</u> T1(<=3cm) T2(4-6cm) T3(>=7cm)	Ort: 3,5 cm (0,6-12) 105 (%35) 150 (%50) 45 (%15)
<u>Visseral plevra invazyonu</u> Var Yok	182 (%60,7) 118 (%39,3)
<u>Lenf bezi metastazı</u> N0 N1 N2	201 (%67) 54 (%18) 45 (%15)
<u>Metastaz</u> Var Yok	15 (%5) 285 (%95)

4.2 İmmünohistokimyasal bulguların klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi:

İmmünohistokimyasal çalışmada PD-L1 ekspresyonu tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde izlenmiştir. Boyanma yaygınlığı her iki grupta, daha önceki klinik çalışmalar temel alınarak semi-kantitatif bir yöntemle ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tümör hücrelerinde ve/veya tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında immünohistokimyasal boyanma skoru +2 veya +3 olan olgular PD-L1 ekspresyonu pozitif olarak kabul edilmiştir (51). Ayrıca tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonu ayrı kategoriler şeklinde de analiz edilmiştir.

4.2.1 Tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi:

PD-L1 ekspresyonu % 47 olguda pozitif, %53 olguda negatiftir (Grafik 1).



Grafik 1 : Tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonu

Tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonunun herhangi birinin pozitif (+2 veya +3) veya her ikisinin de negatif (0 ve +1) olmasının klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi Tablo 8’te özetlenmiştir. PD-L1 ekspresyonu olan hastalarda yaş ortalaması $63,058 \pm 8,45$ olup, PD-L1 ekspresyonu negatif olanlarda yaş ortalaması $65,16 \pm 8,64$ ’dir. PD-L1 ekspresyonu daha erken yaşta daha yüksek oranda görülmektedir ($p=0,04$).

Tümör hücrelerinde ve/veya tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonu adenokarsinomlarda %18,3, skuamöz hücreli karsinomlarda %22, pleomorfik karsinomlarda %4, adenoskuamöz karsinomlarda %1,7 ve büyük hücreli karsinomlarda %1 oranında bulunmuştur (Tablo 4). PD-L1 ekspresyonunun histolojik alt tip ile ilişkisine bakıldığında adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda diğer alt tiplere göre daha yüksek oranda PD-L1 ekspresyonu saptanmıştır ($p=0,004$).

Tablo 4 : PD-L1 ekspresyonu ile histolojik alt tip arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Adenokarsinom	86 (%28,7)	55 (%18,3)
Skuamöz hücreli karsinom	65 (%21,7)	66 (%22)
Pleomorfik karsinom	4 (%1,3)	12 (%4)
Adenoskuamöz karsinom	0 (%0)	5 (%1,7)
Büyük hücreli karsinom	4 (%1,3)	3 (%1)

Adenokarsinom olgularında PD-L1 ekspresyonu oranları Tablo 5’ de özetlenmiştir.

Tablo 5 : Adenokarsinom alt tipleri ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Asiner Patern	52 (%59,8)	33 (%61,1)
Lepidik Patern	7 (%8)	3 (%5,6)
Papiller Patern	11 (%12,6)	6 (%11,1)
Solid Patern	12 (%13,8)	9 (%16,7)
Müsinöz Patern	5 (%5,7)	3(%5,6)

Skumöz hücreli karsinom (SHK) alt tipleri ile PD-L1 ekspresyonu oranları Tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6 : Skumöz hücreli karsinom (SHK) alt tipleri ile PD-L1 arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Keratinize SHK	41 (%64,1)	36 (%52,9)
Non-keratinize SHK	12 (%18,8)	28 (%41,2)
Bazaloid SHK	11 (%17,2)	4 (% 5,9)

Cinsiyet ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,114$).

Sigara ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında sigara içenlerde daha az oranda PD-L1 ekspresyonu izlenmekle birlikte, sigara içmeyen hasta sayısının az olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir ($p=0,003$).

Tümör çapı ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,205$).

Lenf nodu metastazı ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,314$).

Lenf nodu evresi ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,83$).

Visseral plevral invazyonu ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,56$).

Tümörün uzak organ metastazı (M evresi) evresi ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,117$).

Tümörün patolojik evresi (pT) ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,89$).

Klinik evre, erken evre (evre I) ve ileri evre akciğer kanseri (evre II-IV) olarak gruplandırıldığında, klinik evre ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,793$). Klinik evre ve PD-L1 ekspresyonu ilişkisi Tablo 7’te gösterilmiştir.

Tablo 7 : Klinik evre ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

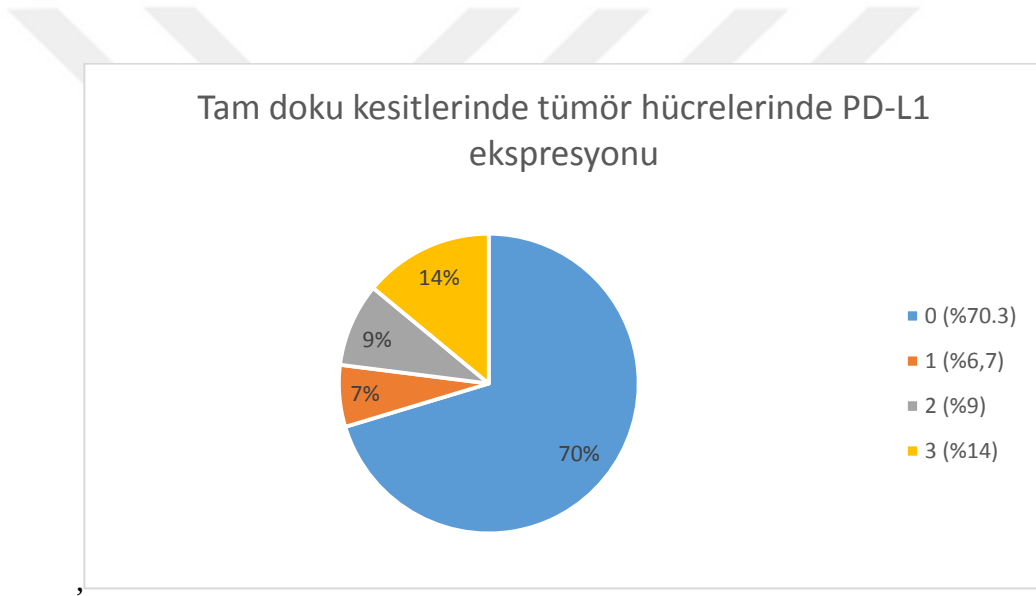
Klinik evre	Tümöre infiltrate inflamatuvar hücrelerki ve tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu		Toplam
	Her ikisinde 0/+1	Herhangi birinin +2/+3	
Evre 1	54 (%18)	49 (%16,4)	103 (%32,4)
Evre 2	63 (%21)	53 (%17,6)	116 (%38,6)
Evre 3	33 (%11)	25 (%8,4)	58 (%19,4)
Evre 4	9 (%3)	14 (%4,6)	23 (%7,6)

Tablo 8 : PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

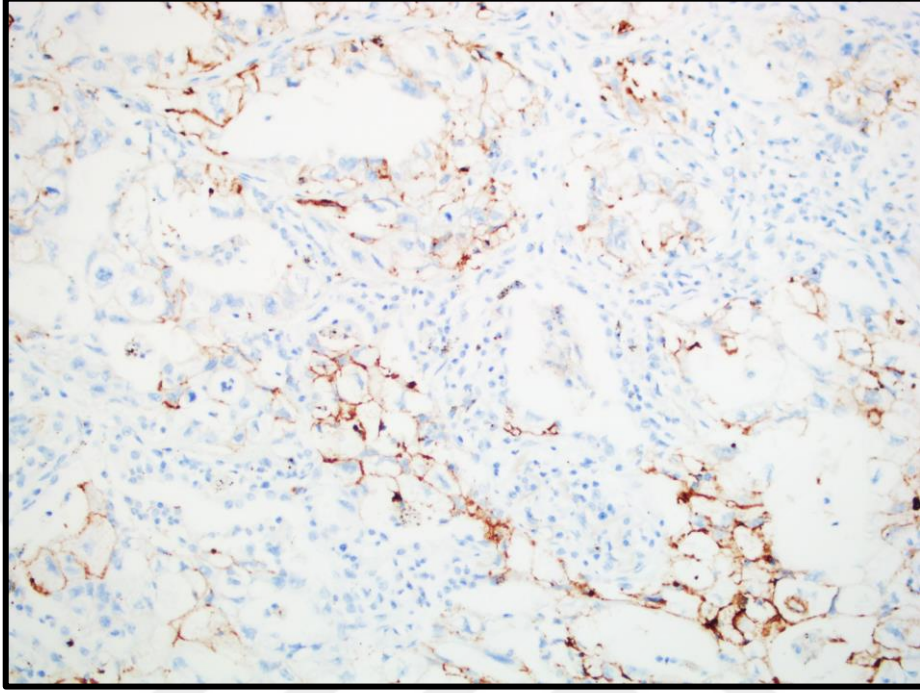
Değişkenler	PD-L1 skoru TC ve/veya IC 0,+1	PD-L1 skoru TC ve /veya IC +2,+3	p
<u>Yaş</u>	65,13±8,8	63,34±8,2,	0,04
<u>Cinsiyet</u> Kadın: Erkek:	27 (%9) 132 (%44)	15 (%5) 126 (%42)	0,114
<u>Histolojik alt tip</u> Adenokarsinom Skuamöz hücreli karsinom Diğer: Pleomorfik karsinom Adenoskuamöz karsinom Büyük hücreli karsinom	86 (%28,7) 65 (%21,7) 8 (%5)	55 (%18,3) 66 (%22) 20 (%6,7)	0,004
<u>Sigara</u> İçmiş İçmemiş Bilinmiyor	94 (%43,1) 20 (%9,2) 82	99 (%45,4) 5 (%2,3)	0,003
<u>Tümör çapı</u> T1 (<=3cm) T2 (4-6cm) T3 (>=7cm)	62 (%20,7) 72 (%24) 25 (%8,3)	40 (%14,3) 78 (%26) 20 (%6,7)	0,205
<u>Visseral plevra invazyonu</u> Var Yok	65 (%21,7) 94 (%31,3)	53 (%17,7) 88 (%29,3)	0,826
<u>Metastaz</u> Var Yok	5 (%1,7) 154(%51,3)	10 (%3,3) 131 (%43,7)	0,117
<u>Lenf bezi metastazı</u> N0 N1 N2	109 (%36,3) 27 (%9) 23 (%7,7)	92 (%30,7) 27 (%9) 22 (%7,3)	0,826
<u>Evre</u> Evre-I Evre-II-IV	54 (%18) 105 (%35)	49 (%16,3) 92 (%30,7)	0,793
<u>pT</u> pT1 pT2 pT3 pT4	47 (%15,7) 68 (%22,7) 31 (%10,4) 12 (%4)	40 (%13,4) 61 (%20,4) 31 (%10,4) 6,4 (%3)	0,939

4.2.2 Tam doku kesitlerinde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi:

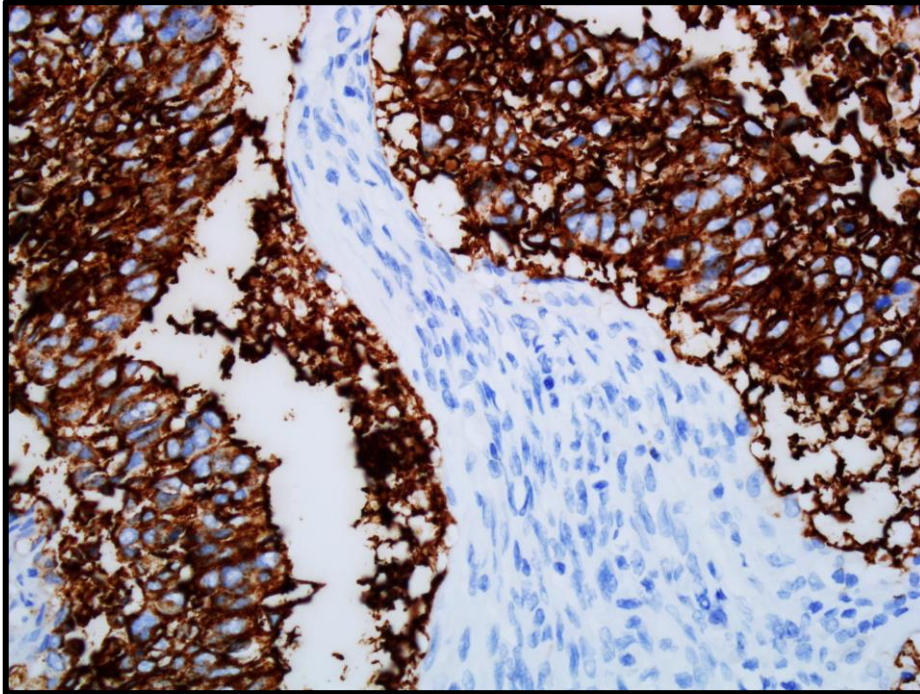
Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesinde 211 (%70,3) olgu: 0, 20 (%6,7) olgu: +1, 27 (%9) olgu: +2, 42 (%14) olgu: +3 bulunmuştur (Grafik 2), (Resim 1A-F).



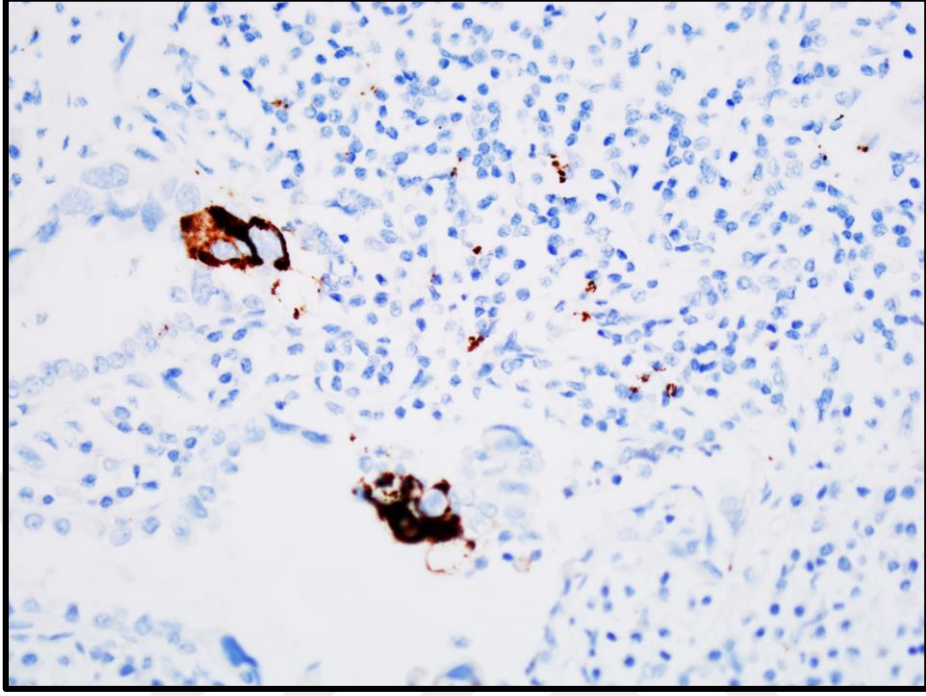
Grafik 2 : Tam doku kesitlerinde tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu



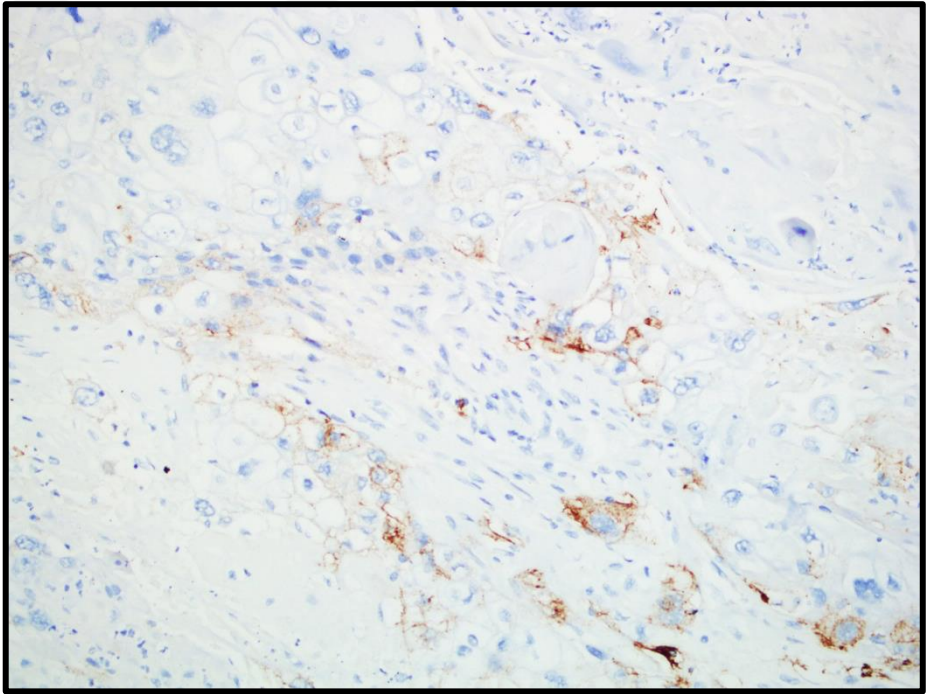
Resim 1A: Adenokarsinom tümör hücrelerinde %50'den fazla, (+3) PD-L1 ekspresyonu (X200)



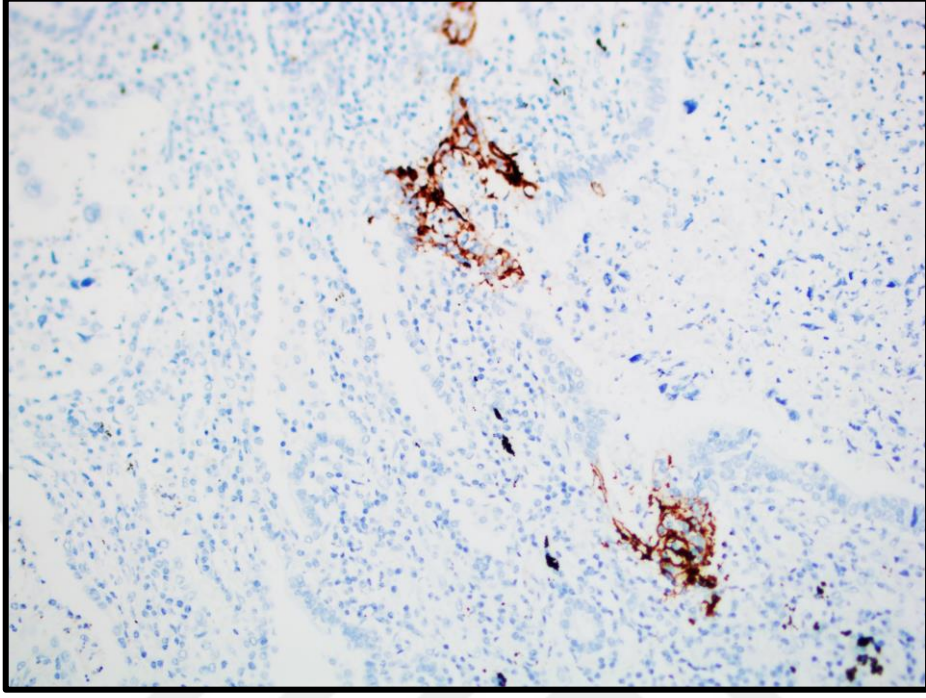
Resim 1B: Skuamöz hücreli karsinomda tümör hücrelerinde %50'den fazla, (+3) PD-L1 ekspresyonu (X400)



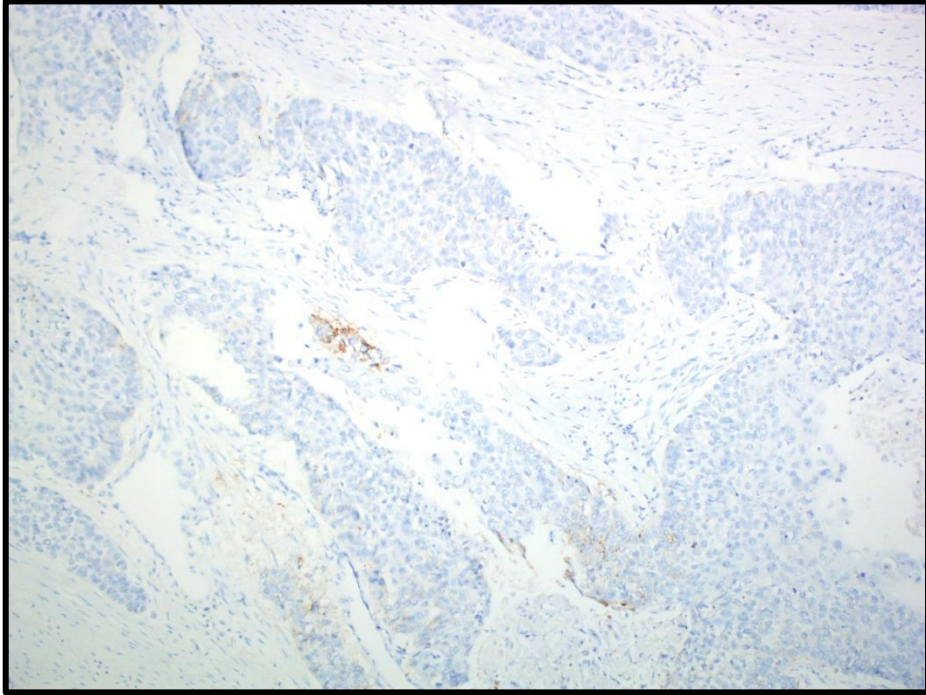
Resim 1C : Adenokarsinomda tümör hücrelerinde %5-50 oranında (+2) PD-L1 ekspresyonu (X400)



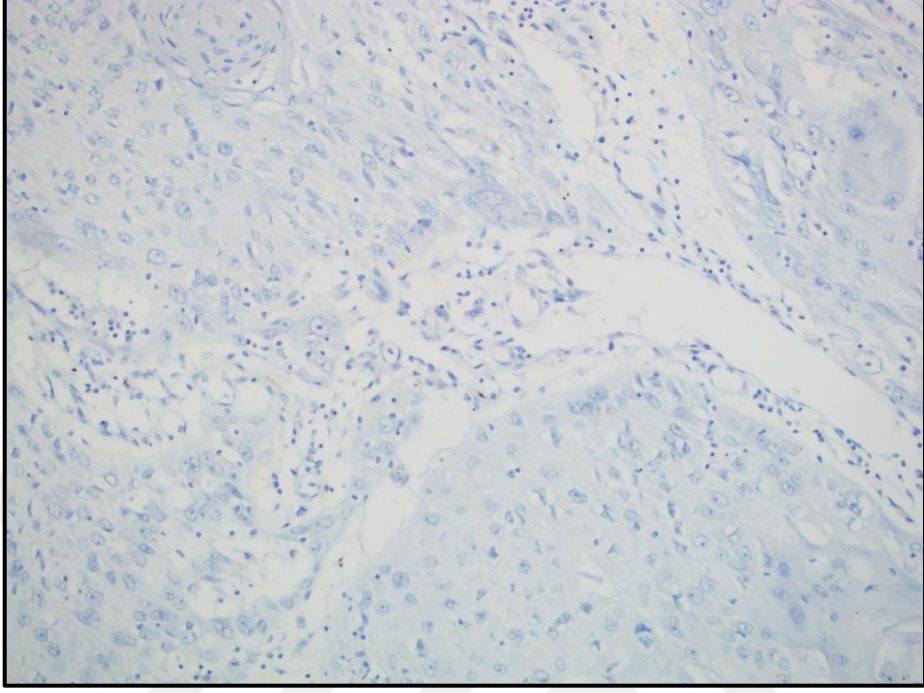
Resim 1D : Skuamöz hücreli karsinomda tümör hücrelerinde %5-50 oranında (+2) PD-L1 ekspresyonu (X400)



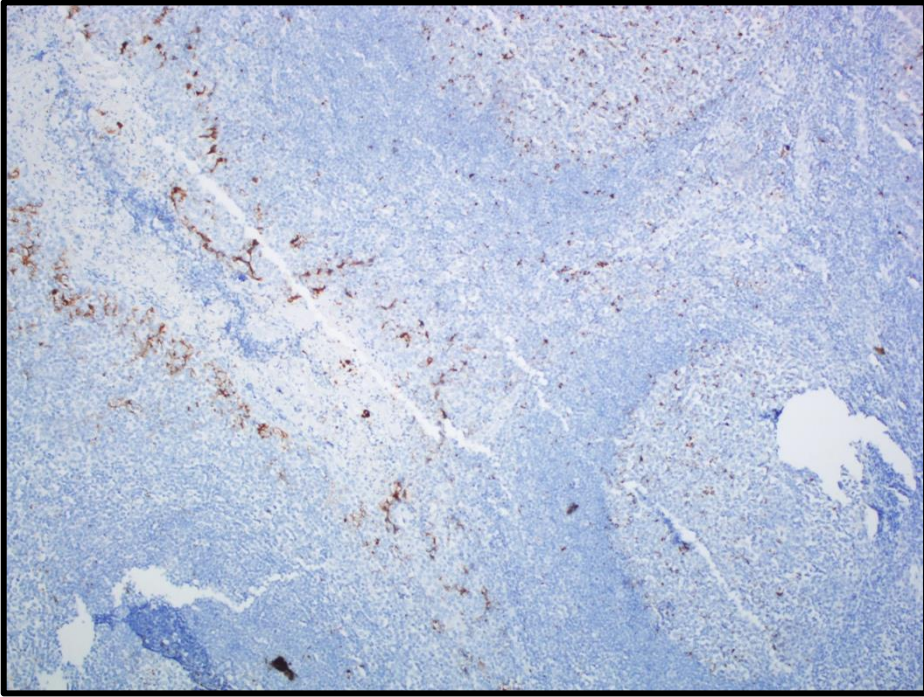
Resim 1E: Adenokarsinomda %5'ten az oranda tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu (X200)



Resim 1F.: Skuamöz hücreli karsinomda %5'ten az oranda tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu (X100)



Resim 1G : Skuamöz hücreli karsinomda tümör hücrelerinde negatif PD-L1 ekspresyonu (X400)



Resim 1H : Kontrol dokusu olarak kullanılan tonsil dokusundaki PD-L1 ekspresyonu (X40)

Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile hastanın klinikopatolojik özellikleri ilişkisi Tablo 13’de özetlenmiştir.

Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu pozitif olanların yaş ortalaması $62,01 \pm 6,75$, negatif olanların yaş ortalaması $64,97 \pm 8,99$ ’dur. İstatiksel olarak anlamlı şekilde PD-L1 ekspresyonu daha genç hastalarda görülmektedir ($p=0,004$).

PD-L1 ekspresyonu adenokarsinomlarda %9,7, skuamöz hücreli karsinomlarda %9, pleomorfik karsinomlarda %3,3, adenoskuamöz karsinomlarda %0,7 ve büyük hücreli karsinomlarda %0,3 oranında pozitif bulunmuştur (Tablo 9). Tümörün histolojik alt tipi ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu analiz edildiğinde, adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda diğer histolojik alt tiplere göre daha yüksek oranda PD-L1 ekspresyonu gözlenmiştir ($p=0,008$).

Tablo 9 : Tümörün histolojik alt tipi ile tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Adenokarsinom	112 (%37,3)	29 (%9,7)
Skuamöz hücreli karsinom	104 (%34,7)	27 (%9)
Pleomorfik karsinom	6 (%2)	10 (%3,3)
Adenoskuamöz karsinom	3 (%1)	2 (%0,7)
Büyük hücreli karsinom	6 (%2)	1 (%0,3)

Adenokarsinom alt tipleri ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonları oranları Tablo 10’ da özetlenmiştir.

Tablo 10 : Adenokarsinom alt tipleri ve tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Asiner Patern	63 (%58,9)	22 (%64,7)
Lepidik Patern	9 (%8,4)	1 (%2,9)
Papiller Patern	13 (%12,1)	4 (%11,8)
Solid Patern	16 (%15)	5 (%14,7)
Müsinöz Patern	6 (%5,6)	2 (%5,9)

Skumöz hücreli karsinom alt tipleri ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu oranları Tablo 11’de özetlenmiştir.

Tablo 11 : Skumöz hücreli karsinom (SHK) alt tipleri ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Keratinize SHK	64 (%61,5)	13 (%46,4)
Non-keratinize SHK	27 (%26)	13 (%46,4)
Bazaloid SHK	13 (%12,5)	2 (% 7,1)

Cinsiyet ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p= 0,512).

Sigara ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p= 0,280).

Tümör çapı ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p= 0,318).

Lenf nodu metastazı ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,314).

Lenf nodu evresi ile PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0,149).

Visseral plevral invazyonu ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,149).

Tümörün uzak organ metastazı (M evresi) evresi ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0,348).

Tümörün patolojik evresi (pT) ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,515).

Klinik evre ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 9).

Klinik evre, erken evre (evre I) akciğer kanseri ve ileri evre akciğer kanseri (evre II-IV) olarak grupladığımızda, tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p=0,842).

Tablo 12 : Klinik evre ile tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

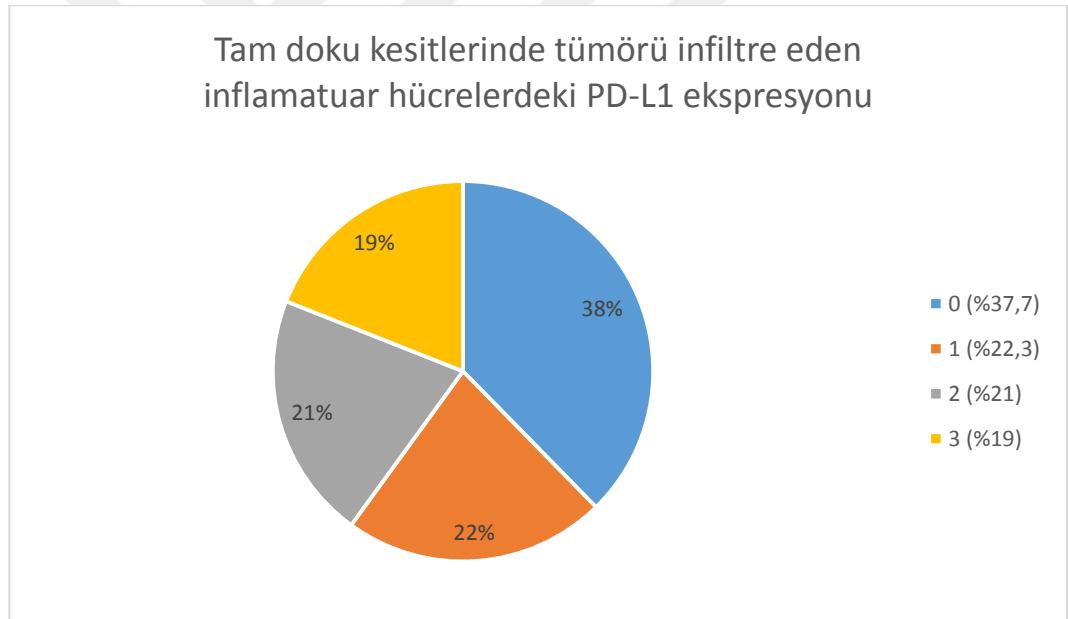
Klinik evre	Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu		Toplam
	0/+1	+2/+3	
Evre 1	80 (%26,6)	23 (%7,6)	103 (%34,3)
Evre 2	85 (%28,3)	31 (%10,3)	116 (%38,6)
Evre 3	50 (%16,6)	8 (%2,6)	58 (%19,3)
Evre 4	16 (%5,3)	7 (%2,3)	23 (%7,6)

Tablo 13 : Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özellikler ilişkisi

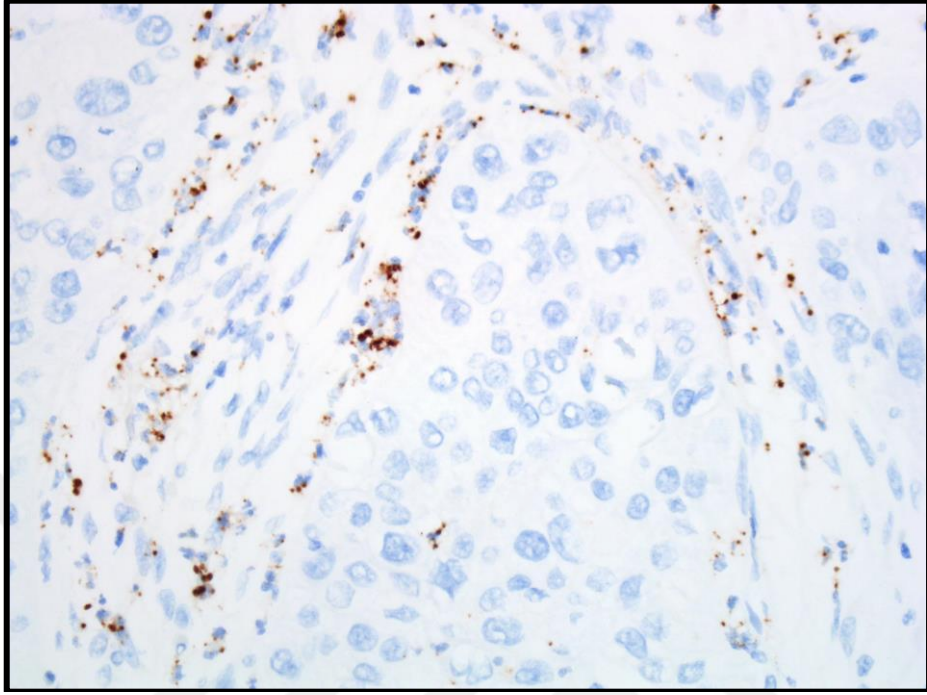
Değişkenler	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)	p
<u>Yaş</u>	64,8±8,9	62, ±7,0	0,019
<u>Cinsiyet</u> Kadın: Erkek:	34 (%11,3) 231 (%77)	8 (%2,7) 69 (%23)	0,512
<u>Histolojik alt tip</u> Adenokarsinom Skuamöz hücreli karsinom Diğerleri: Pleomorfik karsinom Adenoskuamöz karsinom Büyük hücreli karsinom	112 (%37,3) 104 (%45) 15 (%5)	29 (%9,7) 27 (%9) 11 (%4,3)	0,008
<u>Sigara</u> İçmiş İçmemiş Bilinmiyor	143 (%65,6) 21 (%9,6) 82	50 (%22,9) 4 (%1,8)	0,280
<u>Tümör çapı</u> T1(<=3cm) T2(4-6cm) T3(>=7cm)	85 (%28,3) 110 (%36,7) 36 (%12)	20 (%6,7) 40 (%13,3) 9 (%3)	0,318
<u>Visseral plevra invazyonu</u> Var Yok	96 (%32) 135 (%45)	22 (%7,3) 47 (%15,7)	0,149
<u>Lenf bezi metastazı</u> N0 N1 N2	157 (%52,3) 37 (%12,3) 37 (%12,3)	44 (%14,7) 17 (%5,7) 8 (%2,7)	0,220
<u>Metastaz</u> Var Yok	10 (%3,3) 221 (%73,7)	5 (%1,7) 64 (%21,3)	0,348
<u>Evre</u> Evre-I Evre-II -IV	80 (%34,6) 151 (%50,3)	23 (%33,3) 46 (%15,3)	0,842
<u>pT</u> pT1 pT2 pT3 pT4	66 (%22,1) 96 (%32,1) 50 (%16,7) 18 (%6)	21 (%7) 33 (%11) 12 (%4) 3 (%1)	0,591

4.2.3 Tam doku kesitlerinde tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi

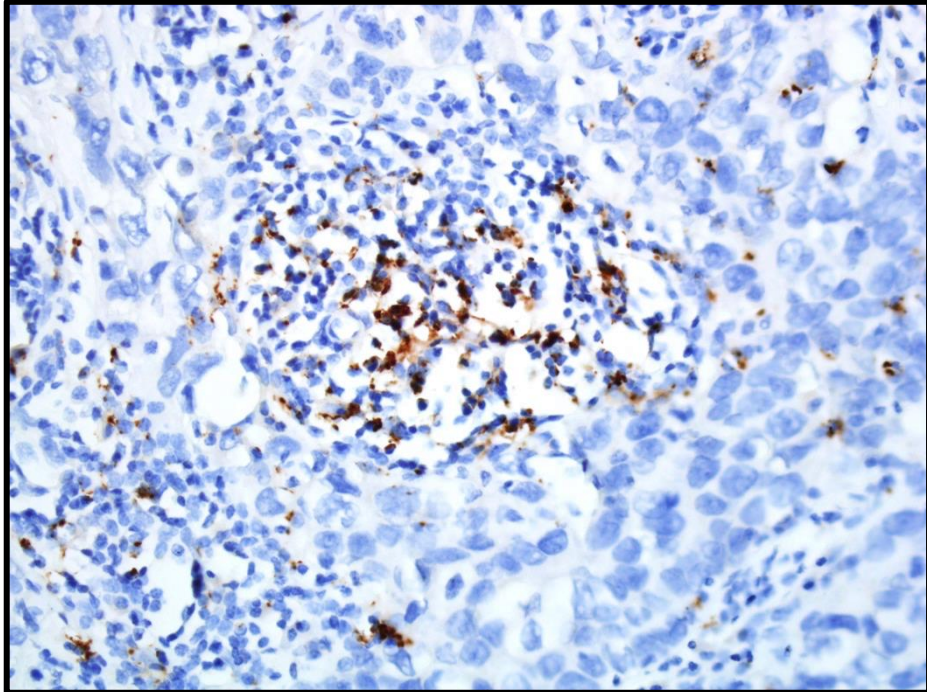
Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu, 113 (%37,7) olguda 0, 67 (%22,3) olguda +1, 63 (%21) olguda +2, 57 (%19) olguda +3 bulunmuştur (Grafik 3), (RESİM 2A-F).



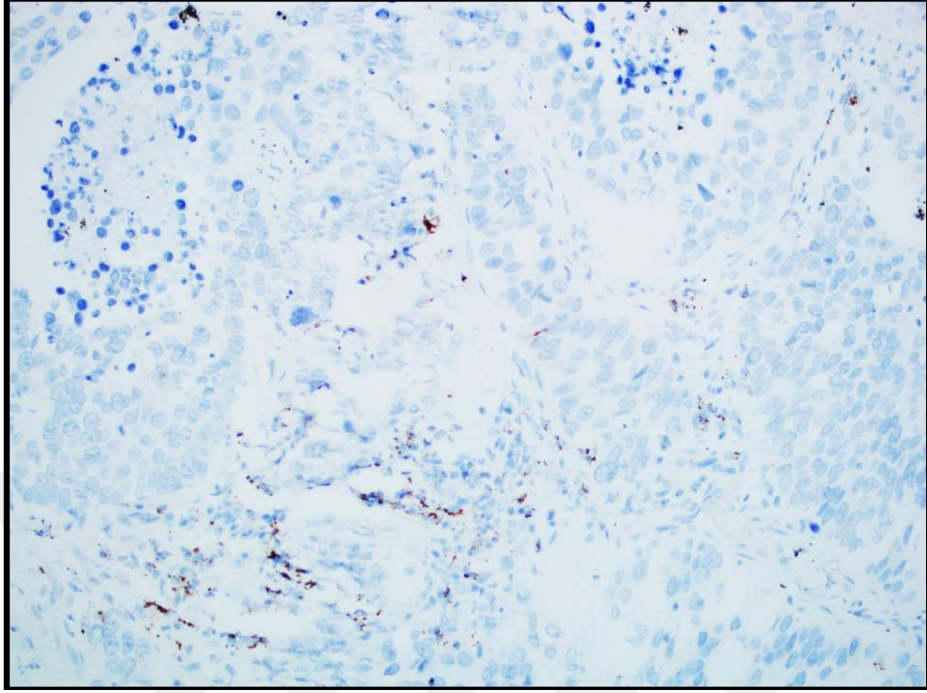
Grafik 3 : Tam doku kesitlerinde tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonunu



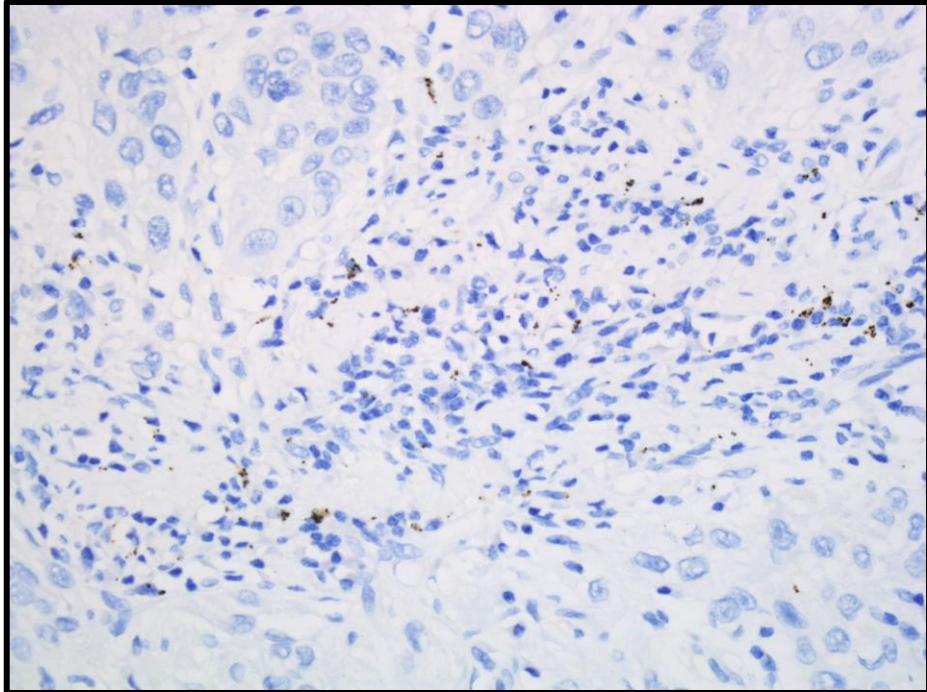
Resim 2A : Adenokarsinomda tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında %10'dan fazla (+3) PD-L1 ekspresyonu (X400)



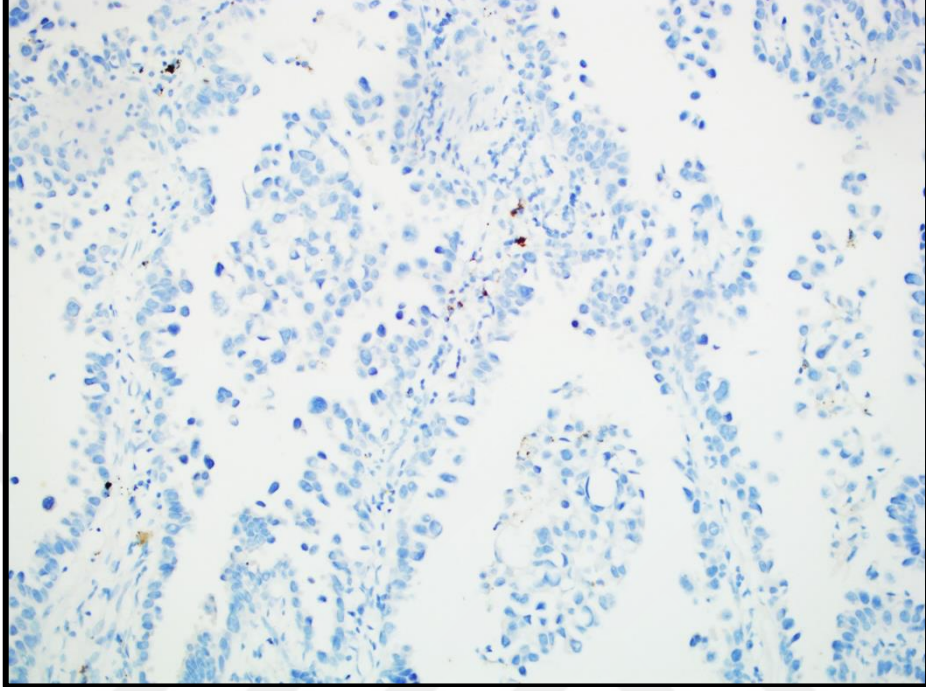
Resim 2B : Skuamöz hücreli karsinomda tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında %10'dan fazla (+3) PD-L1 ekspresyonu (X400)



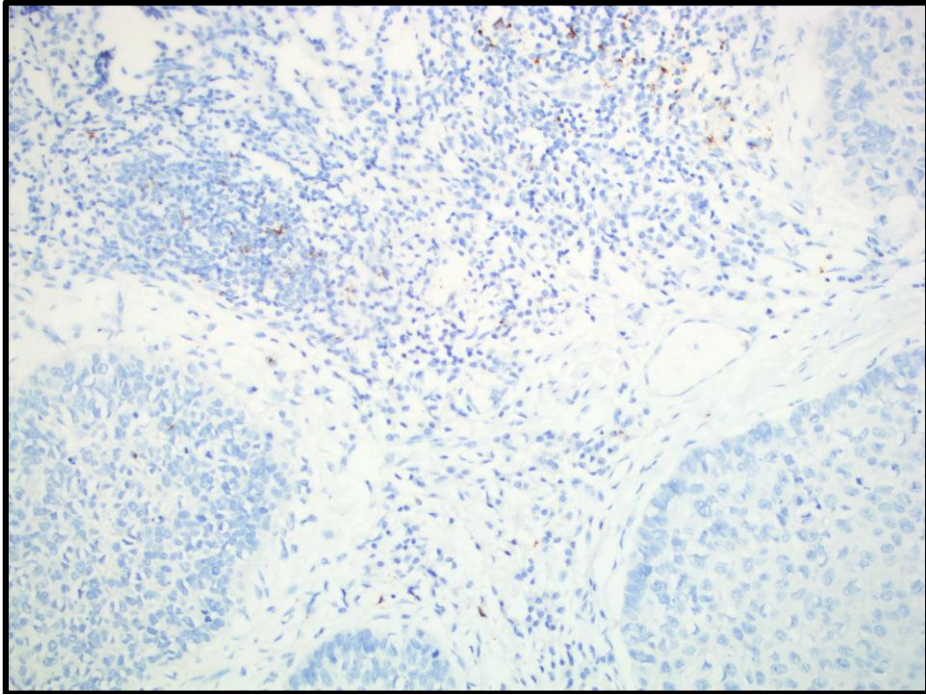
Resim 2C : Adenokarsinomda tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında %5-10 arasında (+2) PD-L1 ekspresyonu (X200)



Resim 2D : Skuamöz hücreli karsinomda tümörü infiltrate eden inflamatuvar gruplarında %5-10 arasında (+2) PD-L1 ekspresyonu (X400)



Resim 2E : Adenokarsinomda tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında %5'den az (+1) PD-L1 ekspresyonu (X200)



Resim 2F : Skuamöz hücreli karsinomda tümörü infiltrate eden inflamatuvar gruplarında %5'den az (+1) PD-L1 ekspresyonu (X200)

Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özellikleri ilişkisi Tablo 18’de özetlenmiştir.

Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu pozitif olanların yaş ortalaması $63,058 \pm 8,4$, negatif olanların yaş ortalaması $65,116 \pm 8,6$ ’dır. PD-L1 ekspresyonu anlamlı olarak daha erken yaşta ortaya çıkmaktadır ($p=0,004$).

Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu adenokarsinomlarda %15,7 skuamöz hücreli karsinomlarda %19,7, pleomorfik karsinomlarda %2,3, adenoskuamöz karsinomlarda %1,3 ve büyük hücreli karsinomlarda %1 oranında bulunmuştur (Tablo 14). Tümör histolojik alt tipleri ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,076$).

Tablo 14 : Tümörün histolojik alt tipi ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonu oranları

	PD-L1 skoru (0 veya+1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Adenokarsinom	94 (%31,3)	47 (%15,7)
Skuamöz hücreli karsinom	72 (%24)	59 (%19,7)
Pleomorfik karsinom	9 (%3)	7 (%2,3)
Adenoskuamöz karsinom	1 (%0,3)	4 (%1,3)
Büyük hücreli karsinom	4 (%2,2)	3 (%1)

Adenokarsinom alt tipleri ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerindeki PD-L1 ekspresyon oranları Tablo 15’ de özetlenmiştir.

Tablo 15: Adenokarsinom alt tipleri ve TİL’ de PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Asiner Patern	57 (%60)	28 (%60,9)
Lepidik Patern	7 (%7,4)	3 (%6,5)
Papiller Patern	13 (%13,7)	4 (%8,7)
Solid Patern	13 (%13,7)	8 (%17,4)
Müsinöz Patern	5 (%5,3)	3 (%6,5)

Skuamöz hücreli karsinom alt tipleri ile tümörü infiltre eden hücrelerindeki PD-L1 ekspresyon oranları Tablo 16’ da özetlenmiştir.

Tablo 16 : Skuamöz hücreli karsinom (SHK) alt tipleri ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 arasındaki ilişki

	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)
Keratinize SHK	45 (%63,4)	32 (%52,5)
Non-keratinize SHK	14 (%19,7)	26 (%42,6)
Bazaloid SHK	12 (%16,9)	3 (% 4,9)

Cinsiyet ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,342).

Sigara ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiye incelediğimizde sigara içmeyenlerde daha az oranda PD-L1 ekspresyonu izlenmekle birlikte, sigara içmeyen hasta sayısının az olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir (p=0,034).

Tümör çapı ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,353$).

Lenf nodu metastazı ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,328$). Lenf nodu evresi ile PD-L1 ekspresyonu arasında farklılık saptanmamıştır ($p=0,940$).

Visseral plevral invazyon ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,847$).

Tümörün uzak organ metastazı (M evresi) evresi ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,105$).

Tümörün patolojik evresi (pT) ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,619$).

Klinik evre ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 17).

Klinik evre, erken evre (evre I) akciğer kanseri ve ileri evre akciğer kanseri (evre II-IV) olarak gruplandığında klinik evre ile tümörü infiltre eden hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,758$).

Tablo 17: Klinik evre ile tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

Klinik evre	Tümöre infiltre inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu		Toplam
	0/+1	+2/+3	
Evre 1	61 (%20,3)	42 (%14)	103 (%34,3)
Evre 2	73 (%24,3)	43 (%14,3)	116 (%38,6)
Evre 3	35 (%11,6)	23 (%7,6)	58 (%19,3)
Evre 4	11 (%3,6)	12 (%4)	23 (%7,6)

Tablo 18 : Tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik özellikler ilişkisi

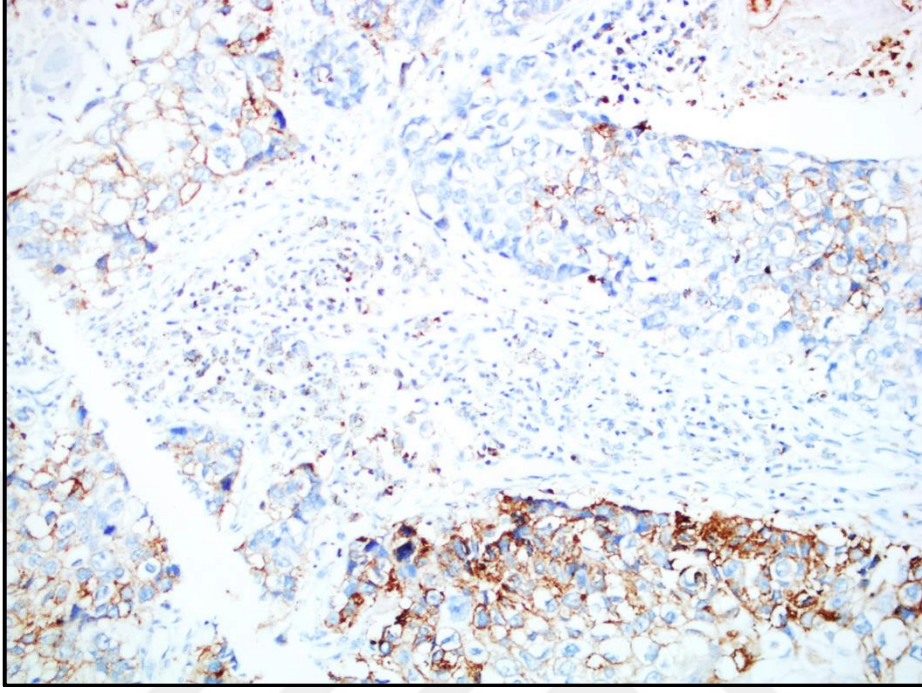
Değişkenler	PD-L1 skoru (0 veya +1)	PD-L1 skoru (+2 veya +3)	p
<u>Yas</u>	65,116±8,6	63,058±8,4	0,004
<u>Cinsiyet</u> Kadın: Erkek:	28 (%9,3) 152 (%50,7)	14 (%4,7) 106 (%35,3)	0,342
<u>Histolojik alt tip</u> Adenokarsinom Skvamöz hücreli karsinom Diğer: Pleomorfik karsinom Adenoskuamöz karsinom Büyük hücreli karsinom	94 (%31,3) 72 (%24) 14 (%4,7)	47 (%15,7) 59 (%19,7) 14 (%4,7)	0,076
<u>Sigara</u> İçmiş İçmemiş Bilinmiyor	112 (%51,4) 20 (%9,2) 82	81 (%37,2) 5 (%2,3)	0,034
<u>Tümör çapı</u> T1 (<=3cm) T2 (4-6cm) T3 (>=7cm)	68 (%22,7) 84 (%28) 28 (%9,3)	37 (%12,3) 66 (%22) 17 (%5,7)	0,353
<u>Visseral plevra invazyonu</u> Var Yok	70 (%23,3) 110 (%36,7)	48 (%16) 72 (%24)	0,847
<u>Lenf bezi metastazı</u> N0 N1 N2	121 (%40,3) 33 (%11) 26 (%8,7)	80 (%26,7) 21 (%7) 19 (%6,3)	0,940
<u>Metastaz</u> Var Yok	6 (%2) 174 (%58)	9 (%3) 111 (%37)	0,105
<u>Evre</u> Evre-I Evre-II-IV	61 (%20,3) 119 (%39,7)	42 (%14) 78 (%26)	0,843
<u>pT</u> pT1 pT2 pT3 pT4	54 (%18,1) 78 (%26,1) 34 (%11,4) 13 (%4,3)	33 (%11) 51 (%17,1) 28 (%9,4) 8 (%2,7)	0,829

4.3 Tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonu ile modifiye doku mikrodizin yöntemi ile hazırlanan kesitlerde PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması:

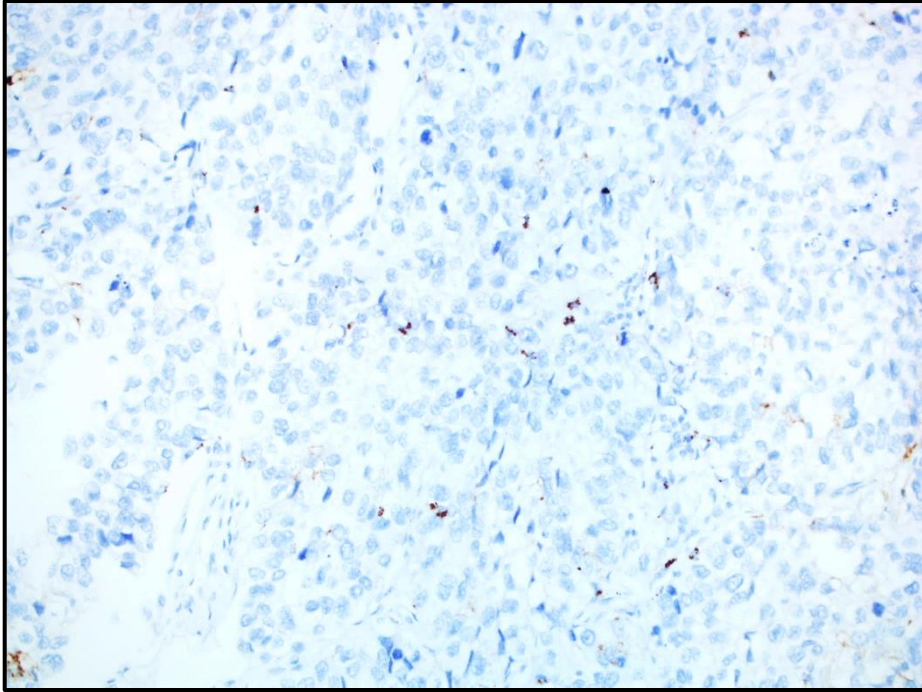
Tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonunun oldukça heterojen bir dağılım sergilediği gözlenmiştir. Örneğin bir skuamöz hücreli karsinom olgusunda tam doku kesitlerinin mikroskopik incelemesinde tümör hücrelerindeki boyanma skoru +3 (Resim 3A) iken aynı olgunun modifiye doku mikrodizini kesitlerinde tümör hücrelerindeki boyanma skoru negatif olarak görülmüştür (Resim 3B). Bir adenokarsinom olgusunda ise tam doku kesitlerinin mikroskopik incelemesinde tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında boyanma izlenmezken (Resim 4A) aynı olgunun modifiye doku mikrodizini kesitlerinde tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde +3 skorunda (Resim 4B) boyanma izlenmiştir.

Hazırlanan modifiye doku mikrodizininde tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonlarını değerlendirilmiştir.

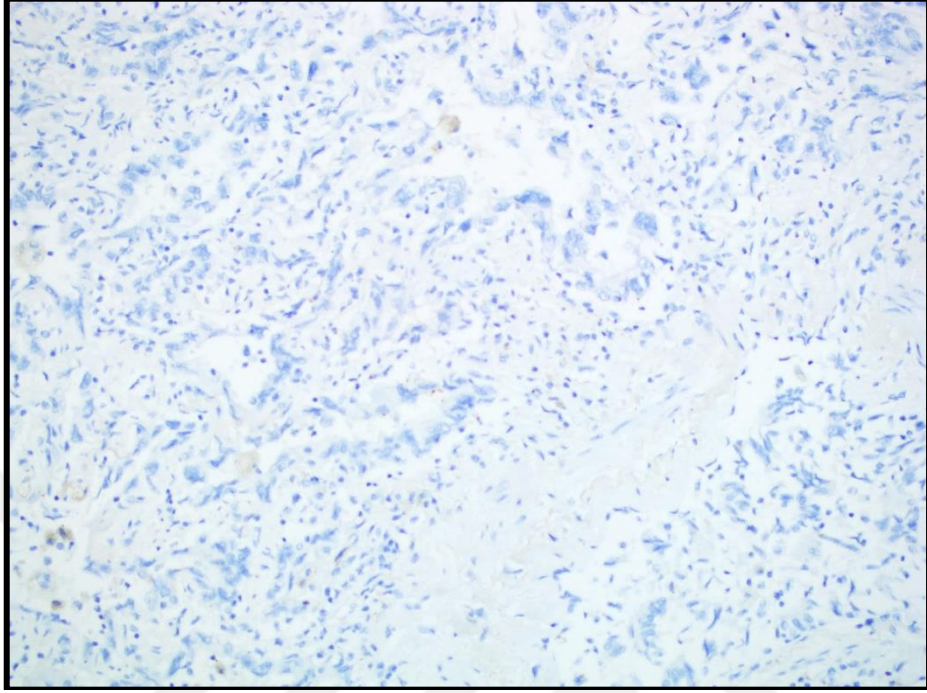
Tümör hücrelerinde PD-L1 skoru 223 (%83,2) olguda 0, 12 (%4,5) olguda +1, 16 (%6) olguda +2, 17 (%6,3) olguda +3 bulunmuştur (Grafik 4). Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 skoru 183 (%68,3) olguda 0, 23 (%8,6) olguda +1, 28 (%10,4) vakada +2, 34 (%12,7) olguda +3 bulunmuştur (Grafik 5).



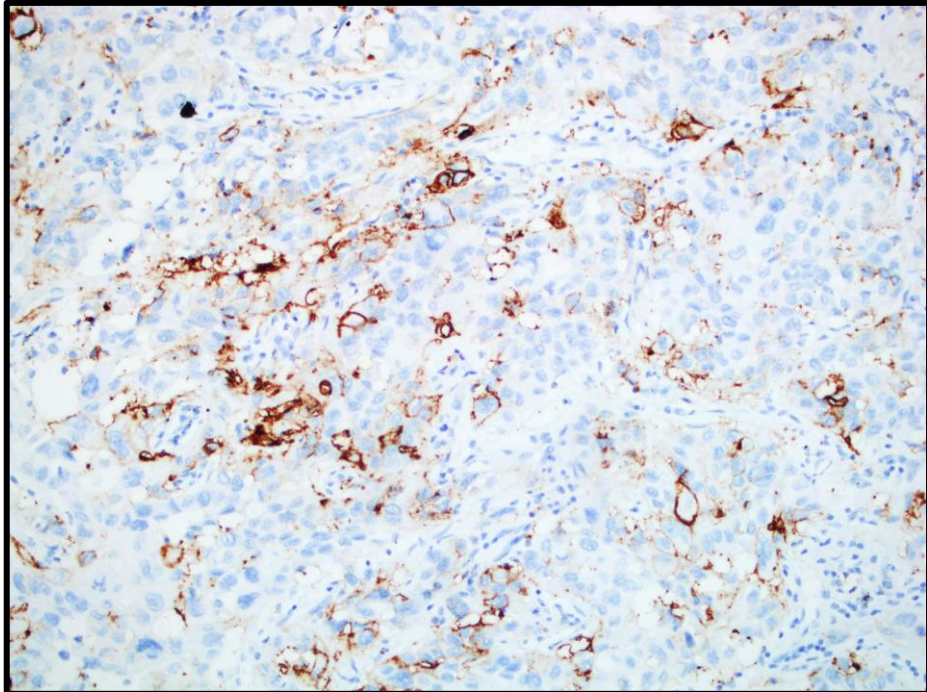
Resim 3A : Tam doku kesitlerinde tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre grubunda +3 boyanma



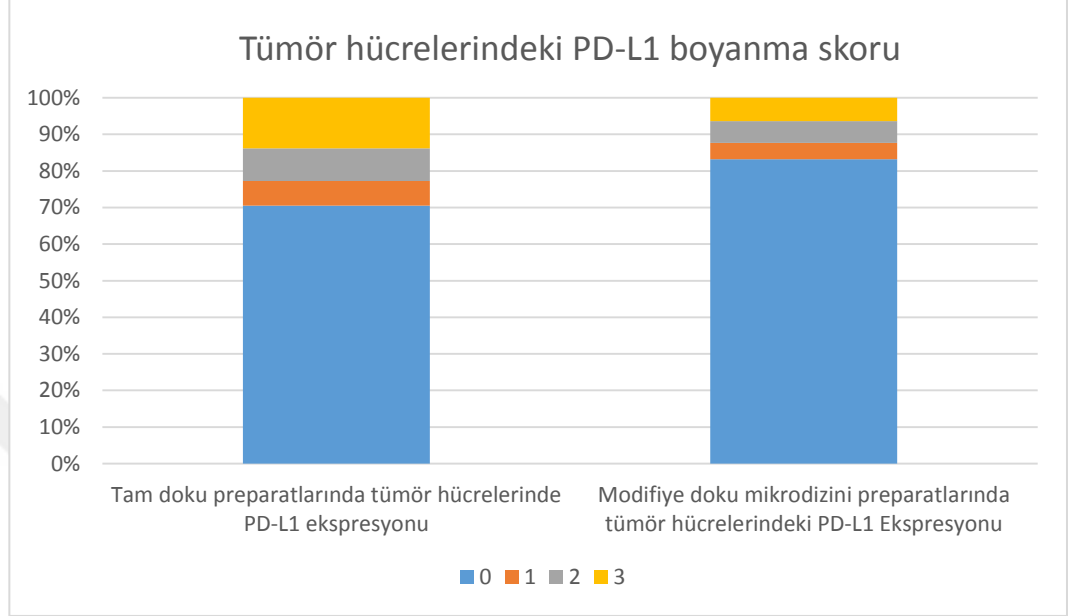
Resim 3B : Modifiye doku mikrodizin yöntemi ile hazırlanan kesitlerdeki tümör hücrelerinde 0, tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında +1 boyanma



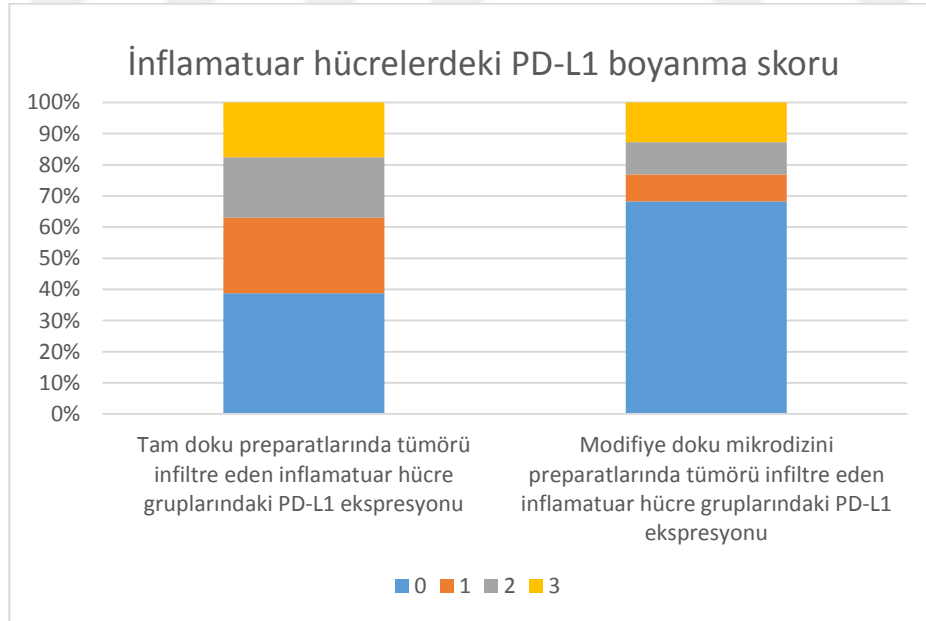
Resim 4A : Tam doku kesitlerinde tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki negatif boyanma



Resim 4B : : Modifiye doku mikrodizin yöntemi ile hazırlanan kesitlerdeki tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki (+3) boyanma skoru



Grafik 4 : Tam doku ve modifiye doku mikrodizini kesitlerinde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması



Grafik 5 : Tam doku ve modifiye doku mikrodizini kesitlerinde tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması

İmmünohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonunun tam doku kesiti ile modifiye doku mikrodizin yöntemi arasındaki uyumu Kappa istatistiksel yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

Tam doku kesitleri ile modifiye doku mikrodizin kesitlerinde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun kesme noktası değeri olarak tümör hücresindeki boyanma %5 ve üzeri seçildiğinde her iki grupta pozitifliğin istatistiksel olarak orta derecede uyumluluk gösterdiği izlenmiştir ($p<0,001$). Kesme noktası değeri olarak %1 ve üzerini kullandığımızda da orta derecede uyumluluk bulunmuştur ($p<0,001$).

Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonunun tam doku kesitlerinde ve hazırlanan modifiye doku kesitlerinde karşılaştırılmasında ise kesme değeri %1 veya %5 olarak seçildiğinde sonucun değişmediği ve zayıf derecede uyumluluk gösterdiği bulunmuştur ($p=0,001$).

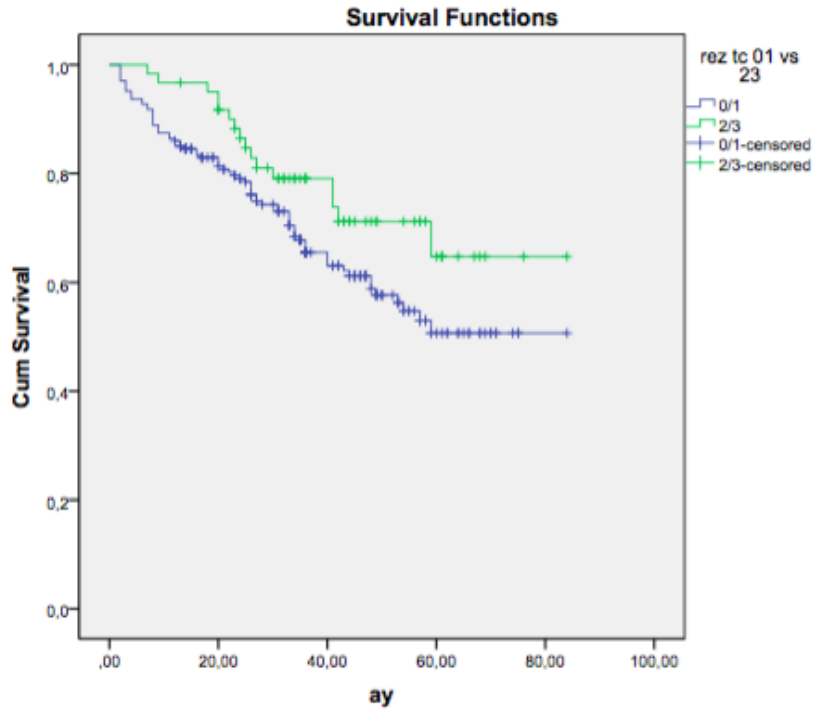
Tablo 19 : Tam doku ve modifiye doku kesitlerinde tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması

Karşılaştırma	Kappa (SE)	p	Yorum
RezTH 01/23 & mTH 01/23	0,468 (0,067)	<0,001	Orta düzeyde
RezTIL 01/23 & mTİL 01/23	0,193 (0,06)	0,001	Zayıf
RezTH 0/123 & mTH 0/123	0,549 (0,052)	<0,001	Orta düzeyde
RezTIL 0/123 & mTİL 0/123	0,138 (0,049)	0,007	Zayıf

4.4 Klinikopatolojik özellikler ve PD-L1 ekspresyonunun hastalık sağkalımı ile ilişkisi:

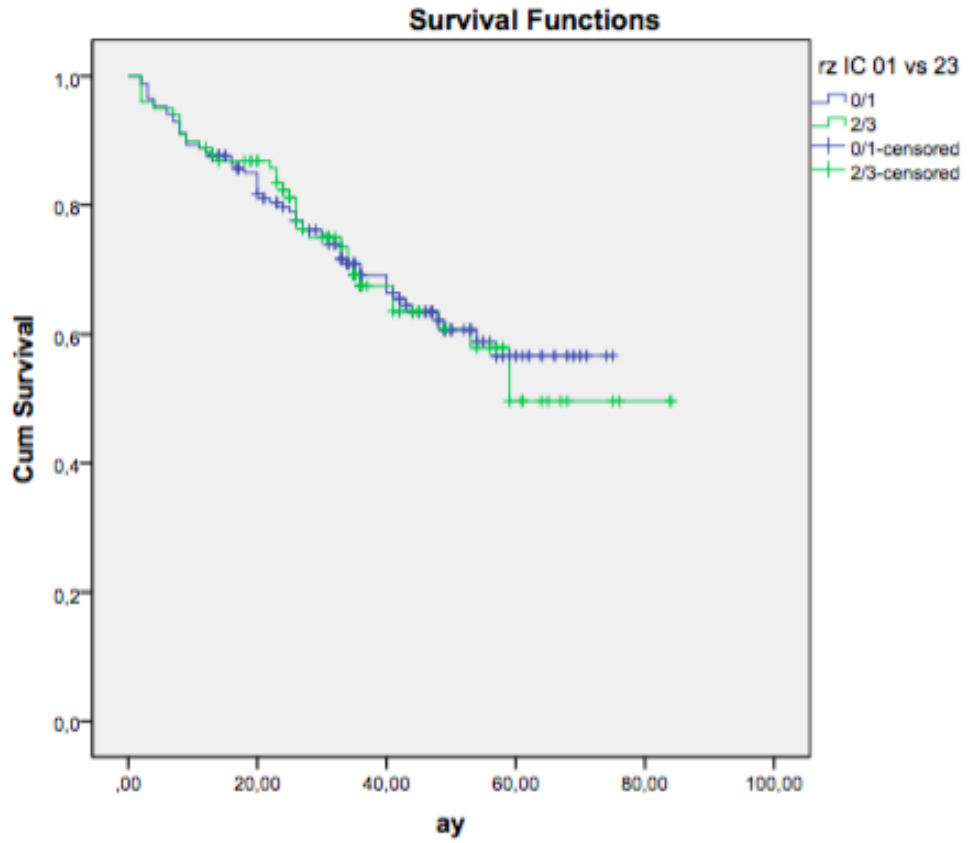
Çalışmamıza alınan 300 olgunun 268'inde (post-operatif ölümler ve klinik takibi 12 aydan kısa olan olgular çıkarılarak) hastaların klinikopatolojik özellikleri, tümör hücrelerindeki ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonunun genel sağkalıma etkisi araştırılmıştır. Hastaların medyan takip süresi 45 aydır. (%95 CI 42,1-47,9)

Kaplan Meier yöntemi ile yapılan tek değişkenli analizlerde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.07$). Ancak PD-L1 pozitif tümörlerin sağkalım oranının daha yüksek olma eğilimi vardır (Grafik 6).



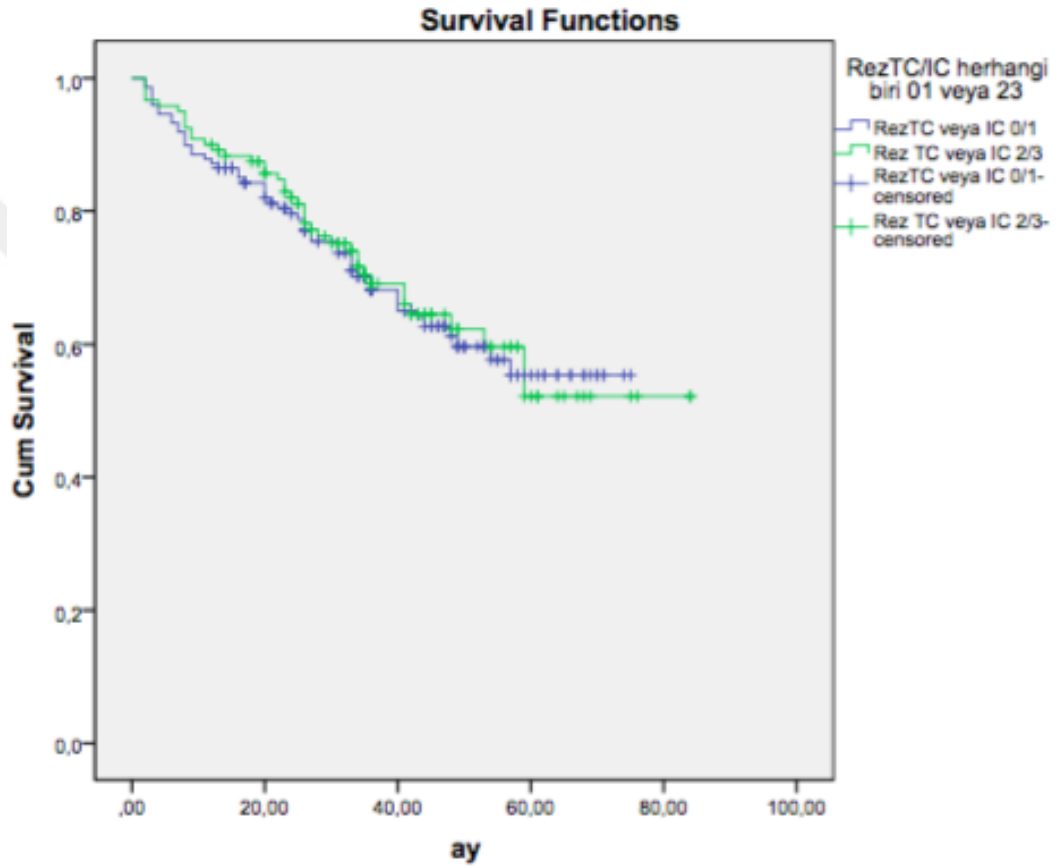
Grafik 6: Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki

Kaplan Meier yöntemi ile yapılan tek değişkenli analizlerde inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.852$), (Grafik 7).



Grafik 7: İnflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki

PD-L1 ekspresyonunun ile genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,828$), (Grafik 8)



Grafik 8: PD-L1 ekspresyonunun ile genel sağkalım arasındaki ilişki

Tek değişkenli analizlerde visseral plevral invazyon varlığı, lenf nodu metastazı varlığı, uzak organ metastazı varlığı, tümörün patolojik evresi (1/2, 3, 4) ve klinik evrenin (I/II, III, IV) genel sağkalımı azalttığı bulunmuştur (Tablo 14). Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ise, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, PD-L1 ekspresyonu yüksek olan hastaların genel sağkalım

oranlarının daha iyi olma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (HR=0,616 %95 CI=0,36-1,06 p=0,079).

Tablo 20 : Tek değişkenli sağkalım analizleri

	HR	%95 CI	P-değeri
Yaş (≤ 64 & > 64)	1,003	0,98-1,02	0,798
Rez TH 0/1 & 2/3	0,616	0,36-1,06	0,079
Visseral plevral invazyon	2,046	1,35-3,09	0,001
Lenf nodu metastazı (var & yok)	2,073	1,37-3,15	0,001
Metastaz (var & yok)	2,976	1,43-6,17	0,003
pT (1 & 2,3,4)	1,827	1,09-3,06	0,022
Klinik evre (I & III,IV)	3,210	1,83-5,65	<0,001

Hangi faktörlerin bağımsız prognostik öneme sahip olduğunu araştırmak için yaptığımız çok değişkenli Cox Regresyon testinde klinik evre ve visseral plevral invazyon varlığı bağımsız prognostik faktörler olarak bulunmuştur.

Tablo 21 : Çok değişkenli sağkalım analizleri

	HR	%95 CI	P-değeri
Rez TH 0/1 & 2/3	0,547	0,374-1,111	0,111
Visseral plevral invazyon	1,669	1,082-2,576	0,021
Klinik evre (I & II&III,IV)	1,638	1,222-2,194	0,001

5 TARTIŞMA

Akciğer kanseri hastalarının sağkalımları ve prognozları üzerinde etkili olabilecek klinik, patolojik ve genetik birçok faktör bulunmaktadır.

Akciğer kanserlerinin etyopatogenezi üzerinde etkili çeşitli genetik mutasyonlar, histopatolojik farklılıklar, yaş ve cinsiyet gibi bireysel özelliklerin yanı sıra sigara ve diğer çevresel karsinojen etkilere maruziyet derecesindeki farklılıklar nedeni ile tedaviye verilen bireysel yanıtlar ve sağkalımlar farklı olabilmektedir (52). Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalarda adenokarsinomlardaki genetik mutasyonların bulunmasıyla akciğer kanserlerinde hedefe yönelik tedavide önemli gelişmeler sağlanmıştır. Bu ajanlar özellikle ileri evre veya metastatik akciğer adenokarsinomu tedavisinde öne çıkmaktadır.

Gelişen tedavi yöntemlerine rağmen akciğer kanserlerinde ideal tedavi yönteminin seçilmesi halen önemli bir sorundur. Özellikle genetik mutasyonları hedef alan tedavi yöntemlerinde zamanla direnç gelişebilmektedir.

Tümörün konak immün ile ilişkisinin aydınlatılması ile immünonkoterapi bazı kanserlerin tedavisinde yerini almıştır. Fakat hastanın prognozu, tedaviye cevabı, tedavinin toksisitesini ve hastalık rekürrensini öngörmek için geçerli belirteçlere ihtiyaç vardır. Bu belirteçler ile immünonkoterapiye daha iyi cevap verebilecek ve ilaç toksitesinden daha az etkilenecek hasta popülasyonu seçilebilecektir.

İmmünoterapi ilk olarak mesane kanserinde BCG ile 1990 yılında FDA onayıyla onkolojik tedavide yerini almıştır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde immünoterapinin yeri, immün sistemin kanser takibi ve eradikasyonunu yaptığı esasına dayanmaktadır. Daha hızlı çoğalan hücreler üzerine direkt sitotoksik etki gösteren kemoterapinin aksine immünoterapi immün sistemin blokajını ortadan kaldırarak etki göstermektedir. Bu sayede kanserli hücreler yabancı cisim olarak algılanmakta ve immün cevap aktive edilebilmektedir. Bu amaçla geliştirilen ilaçlardan anti-PD-1 olan nivolumab ve pembrolizumab, skuamöz ve non-skuamöz akciğer kanseri tedavisinde PD-L1 düzeyine bakılarak kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. Atezomizulad (anti-PD-L1)'in ise KHDAK faz 3 çalışmaları devam etmekle birlikte mesane kanseri tedavisinde dokuda PD-L1 düzeyi değerlendirilerek kullanımı Mayıs 2016'da FDA onayı almıştır.

Çalışmamızda tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyon oranı %22,8 olarak bulunmuştur. Bu oran literatürde %23-65 arasında bildirilmektedir (53-70). PD-L1 ekspresyon oranındaki değişkenlik, PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesindeki tutarsızlıklar, farklı skorlama sistemlerinin kullanılması, hasta popülasyonunun heterojenitesi (ırksal farklılıklar vb.) ile ilişkili olabilir (Tablo 22).

Örneğin tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesinde, bazı çalışmalarda ortalama H-skor kesme değeri olarak kullanılırken (65, 70, 71), bazı çalışmalarda boyanma yüzdesinin medyan değeri (56), herhangi bir pozitif boyanma (66) veya daha önceki anti-PD-1 (72) ve anti PD-L1 faz çalışmalarında

kullanılan %5 ve daha fazla boyanmanın pozitif kabul edilmesi (57, 65) kesme değeri olarak kabul edilmiştir.

Bizim çalışmamızda SP142 klonu ile yapılan faz çalışmalarında kullanılan ve istatistiksel analizlerde sağkalım üzerinde fark yaratan değer olan, tümör hücrelerinde %5 ve fazlasının boyanması PD-L1 ekspresyonu olarak kabul edilmiştir.

Litaretürdeki mevcut çalışmalar daha çok Asya popülasyonundaki hasta grubunda yapılmıştır (55, 56, 61-63, 65, 66, 69, 70). Batı popülasyonundaki çalışmalar daha az sayıdadır (53, 57, 67, 68, 71).

Çalışmalarda PD-L1'in immünohistokimyasal değerlendirilmesinde farklı antikorların kullanılması (rekombinant/poliklonal antikorlar) da antikorun değerliliği açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir. Farklı klon anti-PD-L1 antikorları aynı tümörde aynı sonucu vermeyebilir (68). Wiliam Sterlacci ve ark.nın doku mikrodizin yöntemi ile KHDAK alt tiplerinde PD-L1 ekspresyonunu değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, E1L3N (Cell Signaling, Danvens, Mass USA) ile SP142 (Roche/Ventana, Rotkreuz, Switzerland) antikor klonlarının reaktif lenf nodu, tonsil dokusu ve klasik Hodgkin lenfoma dokusundaki ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Daha az zemin boyanması ve daha iyi sinyal gösterdiği için çalışmalarında E1L3N klonunu tercih etmişlerdir (67). Velcheti ve ark., 4 ayrı anti-PD-L1 antikorunu (Abcam cat # ab58810, Ebioscience klon M1H1, Biolegend klon 29E.2A3 ve ticari olmayan Dr. Lieping Chen laboratuvarında yapılmış klon 5H1) kullanarak yaptıkları bir çalışmada,

yalnızca 5H1 klonunun kantitatif immünfloresan ve in-situ mRNA hibridizasyon yöntemleri ile standartları karşıladığını bulmuşlardır (58).

Dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta da PD-L1 antikorunun intra-tümöral ve inter-tümöral olarak gösterdiği heterojenite (68) ve PD-L1 ekspresyonunun kanser tedavilerinden ve genetik mutasyonlardan etkilenebileceğidir (45, 73). D’Incecco ve ark. yaptığı bir çalışmada PD-L1 ekspresyonu ile EGFR mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (57). Bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta grubu daha önceden kemoterapi almamış KHDAK vakalarından oluşmaktadır. Neoadjuvan tedavi almamış vakalarda yapılan diğer çalışmalarda tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu sırasıyla %74, %39, %26,9 bulunmuştur (63, 66, 70). Bu çalışmalardaki anti-PD-L1 antikorı bizim çalışmamızda kullandığımız klondan (SP142) farklıdır.

Scott N. Gottinger ve ark.nın SP142 antikor klonu ile yaptığı çalışmada, tümör hücresindeki boyanmanın %5 ve üzeri +2 ve %50’den fazla boyanma +3 olarak değerlendirildiğinde toplam %24 oranında pozitif boyanma bildirmişlerdir. Bu oran bizim çalışmamızla benzerdir (74) . Yoon Jin Cha ve ark.nın çalışmasında SP142 klonu ile adenokarsinomlarda %18,6 oranında pozitiflik izlenmiştir.

Tablo 22 :KHDAK’da PD-L1 ekspresyonunu gösteren çalışmalar

	Olgu sayısı	Tümör tipi	Klinik evre	Kullanılan yöntem	Pozitif boyanma (%)	Preparat tipi
D’Incecco	125	KHDAK	IV	IHK anti-PD-L1/Abcam, Cambridge, UK	55,3	Tam doku
Ching-Yao Yang ve ark	163	Adenokarsinom	I	IHK anti-PD-L1/Proteintech Group Chicago	39,9	Tam doku
Velchetti	204 (Amerikan)	KHDAK	I-IV	QIF/5H1	36,1	TMA
	340 (Yunan)	KHDAK	I-IV	QIF/5H1	24,8	TMA
	173 (Amerikan)	KHDAK	I-IV	mRNA	50,8	TMA
	314 (Yunan)	KHDAK	I-IV	mRNA	53,2	TMA
Chen ve ark	208	KHDAK	I-IV	IHK anti-PD-L1	65,3	
Velchetti	445	KHDAK	I-IV	QIF/5H1	27,4	TMA
	13	Sarkomatoid karsinom	I-IV	QIF/5H1	69,2	TMA
Chen	120	KHDAK	I-III	IHK anti-PDL1/236A/E7	57,5	Tam doku
Boland	214	Skuamöz hücreli karsinom	I-IV	IHK anti PD-L1/5H1	19,6	Tam doku
Mu ve ark	109	KHDAK	I-III	IHK anti-PD-L1/belirtilmemiş	53,2	Bilinmiyor
Schmidt	321	KHDAK	I-III	IHK anti-PD-L1 Cell Signalling E1L3N	24	TMA
McLaughlin	49	KHDAK	I-IV	IHK anti-PD-L1 E1L3N	Hem biyopsi materyalinde hem tam doku materyalinde çalışılmış,ve aralarındaki uyum zayıf derecede bulunmuş	
				IHK anti-PD-L1 SP142		
Ching-Yao Yang ve ark	105	Skuamöz hücreli karsinom	I	IHK anti-PD-L1/Proteintech Group Chicago,	56,2	Tam doku
Cheng-Lin ve ark	56	Adenokarsinom	İleri evre	IHK anti-PD-L1/ Ab58810 Abcam, Cambridge, MA	53,6	Rezeksiyon ve biyopsi materyalleri
Wendy A. Cooper	678	KHDAK	I-III	IHK Merck; klon22C3	7,4	TMA
Wiliam Sterlacci	293	KHDAK	I-IV	IHK anti-PD-L1 E1L3N	≈23*	TMA
Jun Konishi	52	KHDAK	I-IV	İHK (bilinmiyor)	27,2±4.7 median 11.2	Tam doku
Takaaki Tokito	74	KHDAK	III	IHK anti-PD-L1/ CloneEPR1161Abcam, Cambridge, UK	74	Tam doku
Yang Zhang	143	Adenokarsinom	I-III	IHK anti-PD-L1/ SAB2900365; Sigma-Aldrich	48,9	Tam doku

Çalışmamızda tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun genç yaşta daha sık görüldüğü bulunmuştur. Literatürde de benzer bulgular mevcuttur (71, 75). Bunun sebebi genç hasta popülasyonundaki konak immünitesinin daha güçlü olması ile ilişkili olabilir. Yaş ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmayan çalışmalar da mevcuttur (55, 56, 64).

Çalışmamızda tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile tümör histolojik tipi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Literatürde PD-L1'in skuamöz hücreli karsinomda daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (53, 61, 64, 76). Diğer çalışmalarda ise PD-L1 ekspresyonunun adenokarsinomlu hastalarda daha fazla olduğu bulunmuştur (61). Wendy A. Cooper ve ark., erken evre KHDAK'larda PD-L1 ekspresyonunun pozitif kesme değeri olarak %50'den fazla boyanmasını kabul ederek yaptıkları çalışmada, adenokarsinomlarda PD-L1 ekspresyonunun (%5.1), skuamöz hücreli karsinom (%8.1) ve büyük hücreli karsinomdan (%12,1) daha az olduğunu göstermişlerdir. H-score kesme değeri olarak kullanıldığında, PD-L1 ekspresyonunun kadınlarda ve adenokarsinom olgularında daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca tümör diferansiyasyon derecesi kötüleştikçe PD-L1 ekspresyonunun arttığını ortaya koyan araştırmalar da mevcuttur (55, 65, 77).

Sigara ile tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Literatürde de benzer bulgular mevcuttur (77).

Tümör hücrelerindeki PD-L1 ligandının konak immünitesini kırarak daha ileri evre kanserlerde ekspresyonunun artması beklenen durum (3, 55, 56, 61) iken çalışmamızda tümörün PD-L1 ekspresyonu ile klinik evre arasında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Literatürde PD-L1 ekspresyonu ile evre arasında ilişki bulunmayan çalışmalar mevcuttur (55, 56, 59, 61, 63, 76, 77). Adenokarsinom olgularında medyan boyanma skoru kesme değeri olarak kullanılan bir çalışmada, PD-L1 ekspresyonu ile pT evresi, lenf nodu metastazı ve T evresi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. PD-L1 ekspresyonunun daha ileri evre vakalarda görüldüğü ve bu nedenle kötü prognostik faktör olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (62). Ancak bu çalışmada kullanılan anti-PD-L1 antikoru klonu ve pozitif boyanma için belirledikleri kesme değeri bizim çalışmamızdan farklıdır.

Çalışmamızda literatüre benzer şekilde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile tümör çapı, lenf nodu metastazı varlığı, visseral plevral invazyon varlığı, pT evresi ve hasta cinsiyeti ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (53, 59, 66, 75, 77). Ching-Yao Yang ve ark.nın çalışmasında vasküler invazyonu olan hastalarda daha yüksek oranda PD-L1 ekspresyonunun olduğu bulunmuştur. Diğer bir çalışmada ise adenokarsinomlarda PD-L1 ekspresyonunun erkek cinsiyet, büyük tümör çapı, daha ileri evre ve solid patern baskın histolojik alt tipte daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır (78).

Literatürde tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonu ile hastaların klinikopatolojik özellikleri ve prognostik önemini aydınlatacak az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonunun tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile korele olduğunu gözlenmiştir (79). Bizim çalışmamızda tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunun bazı tümörlerde

yalnızca tümör hücreleri içindeki inflamatuvar hücrelerde, bazı olgularda ise tümör stromasında ve tümör ile stroma kesişiminde bulunduğu görülmüştür. Tümör hücreleri arasındaki PD-L1 pozitif inflamatuvar hücrelerin antijen sunan dendritik hücreler veya CD8⁺ T hücreler olduğu, tümör stroması ve tümöre komşu stromadaki PD-L1 pozitif inflamatuvar hücrelerin ise daha çok CD4⁺ T hücreler olduğu düşünülmektedir (73). Merkel hücreli karsinom hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada tümör mikro çevresindeki inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonları değerlendirilmiştir. Bu hücre gruplarını spesifiye ettiklerinde PD-L1 eksprese eden CD4⁺ T hücrelerinin tümöre komşu stromada, PD-L1 eksprese eden CD8⁺ T hücrelerinin ise tümör içinde bulunduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada tümör hücrelerindeki PD-L1 artışının tümör içindeki inflamatuvar hücre grupları ile orantılı olduğu bulunmuştur. Bu bulgularla tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun tümör mikro çevresindeki intra-tümöral lenfositler tarafından tetiklendiği sonucuna varılmıştır (80). Yoon Jin Cha ve ark. adenokarsinom tanılı vakalardan yaptıkları çalışmasında tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonu %23,5 bulunmuştur. İmmün hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunun solid tümörlerde, büyük tümör çapı (>3 cm) ve erkek cinsiyette daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu olan olguların %60'ında eş zamanlı tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında da pozitiflik saptanmıştır. Evre I skuamöz hücreli karsinomlarda yapılan bir çalışmada tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulunmuştur. Tümör stromasındaki inflamatuvar hücre komponentinde

azalmış PD-L1 ekspresyonu ile tümördeki PD-L1 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (63). Bizim çalışmamızda inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonu ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. İnflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik ve prognostik önemini daha iyi anlayabilmek için immün komponentin nelerden oluştuğunu daha iyi aydınlatan ve topografik olarak yansımaları ile karşılaştıran daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

PD-L1 ekspresyonu ile yapılan tek değişkenli analizlerde tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarındaki PD-L1 ekspresyonunun herhangi birinin pozitif (+2 veya +3) olması ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu konuda literatürde ise tümör hücrelerinde yüksek oranda PD-L1 ekspresyonu olan ve immün hücrelerde düşük PD-L1 ekspresyonu olan hasta gruplarının kötü prognoz gösterdikleri saptanmıştır (81).

Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun ile genel sağkalımı arasında ise istatistiksel olarak farklılık yaratmamakla birlikte PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hücrelerde genel sağkalım oranları daha iyi bulunmuştur ($p=0,074$). Literatürde ise tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ve genel sağkalım arasında farklı sonuçlar mevcuttur. Wendy A. Cooper ve ark., erken evre KHDAK'da yaptıkları çalışmada yüksek PD-L1 ekspresyonu olan hasta gruplarının daha uzun süre sağkalıma sahip olduğu bulunmuştur. Velcheti ve ark., ise PD-L1 ekspresyonunu histolojiden bağımsız olarak daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Takaaki ve ark. ise PD-L1 ekspresyonu yüksek olanların genel sağkalımlarının

daha kötü prognoz eğilimi olduğunu bulmuşlardır (66). Diğer çalışmalarda ise tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu olan hastaların hastalıksız sağkalımlarının daha uzun olduğu bulunmuştur (63, 75). PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunmayan çalışmalar da mevcuttur (53, 62, 65, 70). Yoon Jin Cha ve ark.nın yaptığı çalışmada tümör hücrelerindeki pozitif PD-L1 ekspresyonunun sağkalımı olumsuz etkilediği bulunmuştur. Bu çalışmada tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Amerantunga ve ark.nın çalışmasında ise tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonuna tüm hasta gruplarında bakıldığında genel sağkalımda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak çok değişkenli cox analizlerinde PD-L1 ekspresyonu yüksek olan N2 evresindeki hastalarda daha iyi genel sağkalım ilişkisi bulunmuştur (Tablo 23).

Literatürde akciğer kanseri prognozuna etkili faktörler ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalara bakıldığında prognostik faktörlerin en önemlilerinin başında, klinik evre, yani tümör çapı, lenf nodu tutulumu ve metastaz olup olmadığı gelmektedir.

Çalışmamızda yaptığımız tek değişkenli analizler ile hastanın yaşı, visseral plevral invazyon varlığı, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı, patolojik evre (pT1/pT2-4) ve klinik evrenin (evreI/II/III,IV) kötü prognostik faktörler olduğu bulunmuştur. Visseral plevral invazyon ve klinik evrenin ise bağımsız prognostik faktörler olduğu bulunmuştur.

Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Akılda tutulması gereken bir başka nokta da kematöropatik ajanların immün sistemi baskılayabileceğidir. PD-L1'in bu dinamik yapısından dolayı hastanın sağkalıma etkisi daha homojen gruplarda araştırılması gerekmektedir.



Tablo 23 : Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında PD-L1 ekspresyonun sağ kalım ilişkisini gösteren bazı çalışmalar

	Hasta Sayısı	Hasta populasyonu	PD-L1 antikoru	Boyanma yüzdesi	Cut-off değeri	Bulgular
Wenndy A. cooper	678	I-III KHDAA	Merck 22C3	7.4	%50	PD-L1 (+) SHK Artmış genel sağkalım
Velcheti	544 (2 kohort grubu)	I-IV KHDAA	İHK/5H1	36.1 24,8		TİL ile PD-L1 ekspresyonunda artış Bağımsız faktör olarak daha iyi sağkalım
Takaaki Tokito	74	III KHDAA (+KT)	EPR1161Abcam, Cambridge, UK	74	%5	Sağ kalım ile korelasyon yok
Schmidt	321	I-III KHDAA	Cell Signalling E1L3N	24	%5	Artmış sağ kalım (skumöz hücreli karsinom hastalarında adjuvan tedavi almış, T2-T4, N1-N3 olan grupta)
K. Azuma	164	I-III EGFR Mut+ KHDAA	Lifespan Biosciences		Medyan H-skor	Genel sağ kalımı azaltıyor, Bağımsız kötü prognostik faktör Yüksek PD-L1; EGFR mutasyonu ile ilişkili
Yang Zhang	143	I-III ADK	SAB2900365; Sigma-Aldrich	48,9	Semikantitatif quikskor	Daha ileri T,N ve pT ile ilişkili
Konishi	52	I-III KHDAA	M1H1		Medyan	İlişki bulmamışlardır
Ching-Yao Yang ve ark	163	I ADK	Proteintech Group Chicago, IL	39,9	%5	Hastalıklı sağ kalımda artış Genel sağ kalıma etkisi yok
Ching-Yao Yang ve ark	105	I SHK	Proteintech Group Chicago, IL	53,6	%5	Genel sağ kalımda bağımsız iyi faktör
Moon-Young Kim	331	I-III SHK	Cell Signalling E1L3N	27	%10	Genel sağ kalım ile ilişki yok

Tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonunun tümör içerisinde oldukça heterojen bir dağılım gösterdiği izlenmiştir. Tam doku kesitinde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile modifiye doku mikrodizindeki ekspresyon karşılaştırıldığında orta derecede uyum bulunmuştur. Tam doku kesitlerinde %22,8 olgu pozitif iken modifiye doku mikrodizini yöntemi ile hazırlanan kesitlerde bu oran %12,3'tür. Modifiye doku mikrodizin yöntemi ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmelerde yanlış negatiflikler olabilmektedir. PD-L1 ekspresyonu değerlendirilmesi tam doku kesitlerinde daha yüksek oranda sonuç vermektedir. SP142 klonu ile yapılan bir çalışmada biyopsi materyalleri ile rezeksiyon materyallerindeki PD-L1 ekspresyonu karşılaştırılmış kötü derecede bir uyum bulunmuştur. Bu çalışmada en büyük uyumsuzluğu yaratan grubun tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücreler olduğu gösterilmiştir (73). Satoru Kitazono ve ark.nın hem biyopsi materyali hem rezeksiyon materyali bulunan 79 hasta üzerinden yaptıkları çalışmada her iki gruptaki tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonları karşılaştırılmış ve aralarındaki uyumun iyi olduğunu bulunmuştur. Çalışmada kullanılan anti-PD-L1 antikorunun poliklonal özellikli olup, pozitif boyanma olarak hibrid skor sistemi kullanılmış, %1 ve üzeri boyanma pozitif kabul edilmiştir. Tam doku örneklerinden yapılan bir çok çalışmada PD-L1 ekspresyonunun intratümöral heterojenite gösterdiği izlenmiştir. Bu nedenle, PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesinde biyopsi materyallerinden elde edilen sonuçlarda düşük düzeyde uyum izlenmektedir.

PD-1 ve onun ligandı PD-L1'i hedefleyen immün kontrol noktalarının inhibitör tedavisi ile ileri evre KHDAK'larında oldukça başarılı sonuçlar gösterilmiştir. Özellikle PD-L1 ekspresyonu immünhistokimyasal olarak değerlendirildiğinde PD-L1 ekspresyonu olan ve bu tedaviyi alan hastaların sağkalımı daha iyi olmaktadır. Bu nedenle bu tedaviden yarar sağlayacak hastaların seçiminde PD-L1 ekspresyonunun optimal şekilde gösterilmesi önem kazanmaktadır.

6 SONUÇLAR

1- Çalışmamıza dahil edilen olgu sayısı 300'dür. Bu olguların hiç biri önceden neoadjuvan tedavi almamıştır. Çalışmamızda sağkalım analizi yaptığımız vaka sayısı 268'dir.

2- Histolojik tiplere bakıldığında olguların %47'si adenokarsinom, % 43,7'si skuamöz hücreli karsinom, %5,3'ü pleomorfik karsinom, %1,7'si adenoskuamöz karsinom, %2,3'ü büyük hücreli karsinom'dur.

3- Tam doku kesitlerinde tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonunun herhangi birinin pozitif (+2 veya +3) veya her ikisinin de negatif (0 veya +1) olması durumunda PD-L1 ekspresyonu % 47 olguda pozitif, %53 olguda negatiftir.

4- Tam doku kesitlerinden yaptığımız immünhistokimyasal çalışmada tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu %14 vakada (+3), %9 vakada (+2), %6,7 vakada (+1), %70,3 vakada (0)'dır.

5- Tam doku kesitlerinden yaptığımız immünhistokimyasal çalışmada tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu %19 olguda (+3), %21 olguda (+2), %22,3 olguda (+1), %37,7 olguda (0)'dır.

6- Modifiye doku mikrodizini yöntemi ile hazırlanan biyopsi materyallerindeki immünhistokimyasal çalışmada tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu %6,3 olguda (+3), %6 olguda (+2), %4,5 olguda (+1), %83,2 olguda (0)'dır.

7- Modifiye doku mikrodizini yöntemi ile hazırlanan biyopsi materyallerinde

immünohistokimyasal çalışmada tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu %12,7 olguda (+3), %10,4 olguda (+2), %8,6 olguda (+1), %68,3 olguda (0)'dır.

8- Tam doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu ile hastanın yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p=0,019$). Yaş ortalaması azaldıkça PD-L1 ekspresyonu artmaktadır.

9- Tam doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu ile hastanın cinsiyeti, sigara içiciliği durumu, tümörün histolojik alt tipi, visseral plevral invazyon varlığı, tümörün çapı, lenf nodu metastazı varlığı, uzak organ metastazı varlığı, patolojik ve klinik evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

10- Sağkalım analizine alınan 268 olgunun medyan takip süresi 45 ay'dır (%95 CI 42,1-47,9).

11- Hastanın yaşı, visseral plevral invazyon varlığı, lenf nodu metastazı durumu, uzak organ metastazı, patolojik evre ve klinik evrenin akciğer karsinomlarında kötü prognostik faktörler olduğu bulunmuştur (sırasıyla $p=0, <0,001$; $p=0,02$; $p=0,001$; $p=0,001$). Visseral plevral invazyonun ve hastanın klinik evresinin bağımsız risk faktörü olduğu bulunmuştur.

12- Tam doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte PD-L1 ekspresyonu artıkça daha iyi sağkalım olma eğilimi vardır ($p=0,074$).

13. Tam doku kesitlerinde yapılan immünhistokimyasal çalışmalarda tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile hastaların yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Yaş ortalaması küçüldükçe PD-L1 ekspresyonu artmaktadır ($p=0,034$).

14. Tam doku kesitlerinde yapılan immünhistokimyasal çalışmalarda tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile hastanın cinsiyeti, sigara içiciliği durumu, tümörün histolojik alt tipi, visseral plevral invazyonu, tümör çapı, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı, patolojik ve klinik evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

15. Tam doku kesitlerinde yapılan immünhistokimyasal çalışmalarda tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

16. Tümör hücrelerinde ve tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonunun herhangi birinin pozitif (+2 veya +3) veya her ikisinin de negatif (0 veya +1) olması durumunda PD-L1 ekspresyonunun ile hasta yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p=0,04$). Yaş ortalaması küçüldükçe PD-L1 ekspresyonu artmaktadır.

17. Tümör hücrelerinde ve tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonunun herhangi birinin pozitif (+2 veya +3) veya her ikisinin de negatif (0 veya +1) olması durumunda PD-L1 ekspresyonu ile hasta cinsiyeti, sigara içiciliği durumu, tümörün histolojik alt tipi, visseral plevral invazyonu, tümör çapı, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı, patolojik ve klinik evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

18. Tümör hücrelerinde ve tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücre gruplarında PD-L1 ekspresyonunun herhangi birinin pozitif (+2 veya +3) veya her ikisinin de negatif (0 veya +1) olması durumunda PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

19. Hazırlanan doku mikrodizini yöntemleri ile tam doku kesitlerinde yaptığımız immünhistokimyasal çalışmada her iki grup arasındaki uyuma bakıldığında tümör hücrelerindeki boyanmalar arasında istatistiksel olarak orta derecede uyum bulunmuştur. Tümörü infiltrate eden inflamatuvar hücrelerde boyanmanın değerlendirmesinde ise zayıf derecede uyum bulunmuştur.

7 ÖZET:

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KARSİNOMLARINDA PD-L1 EKSPRESYONUNUN KLİNİKOPATOLOJİK VE PROGNOSTİK ÖZELLİKLER İLE İLİŞKİSİ

Akciğer kanseri tedavisinde immün kontrol noktalarını hedef alan, bu tedavi yöntemine daha iyi cevap verebilecek, ilaç toksitesinden daha az etkilenecek hasta popülasyonunu belirlemede kullanılabilecek yeni belirteçler aranmaktadır.

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tanı almış 300 olguda immün sistem kontrolünde görev alan PD-L1 ekspresyonu, hem tümör hücrelerinde, hem de tümörü infiltre eden inflamatuvar hücre gruplarında değerlendirildi. PD-L1 ekspresyonu daha erken yaştaki hastalarda daha yüksek oranda gözlemlendi ($p=0,034$). Tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile cinsiyet, sigara, lenf nodu metastazı, visseral plevral metastaz, tümör çapı, tümörün klinik ve patolojik evresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu olan hastalarda sağkalım daha iyi olma eğilimi göstermekteydi ($p=0,074$) Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile sağkalım arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Modifiye doku mikrodizini kesitleri ve tam doku kesitlerinde PD-L1 ekspresyonu karşılaştırıldığında tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu arasında

orta derecede farklılık bulundu. Tümöre infiltre inflamatuvar hücrelerde PD-L1 ekspresyonunda ise zayıf derecede farklılık gözlendi.

Yüksek düzeyde PD-L1 ekspresyonuna sahip KHDAK hastalar PD-L1 inhibitör tedavisinden daha fazla yarar görmektedir. Ancak PD-L1 ekspresyonunun prognostik ve prediktif değeri hakkında halen çelişkiler mevcuttur.

Anahtar kelime: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, PD-L1 ekspresyonu, immünohistokimya

8 SUMMARY

CLINICOPATHOLOGICAL AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND-1 (PD-L1) EXPRESSION IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Immune checkpoint targets in the treatment of lung cancer, that can be used to determine the patient population, which may respond better to this treatment and will be affected less toxicity of the drug is required.

In our study, we evaluated the PD-L1 expression both in tumor cells and in the tumor infiltrating cells which has a role in immune system control in 300 cases. PD-L1 expression was significantly associated with younger age group ($p=0,034$). There was no association between PD-L1 expression in tumor and tumor infiltrating cells between sex, smoking status, lymph node metastasis, visceral pleural metastasis, tumor dimension, tumor clinical and pathologic stage.

The patients with PD-L1 expression had the trend for better outcome ($p=0,074$). There was no association between outcome and PD-L1 expression in tumor infiltrating cells.

There was moderate agreement for PD-L1 expression between modified tissue microarray and whole tissue sections. There was also poor agreement for PD-L1 expression between modified tissue microarray and whole tissue sections.

The patients with NSCLC who had significant PD-L1 expression have better response to PD-L1 pathway inhibitors. There are still concerns about the prognostic and predictive significance of PD-L1 expression.

Keywords: Non-small cell lung cancer, PD-L1 expression, immunohistochemistry



9 KAYNAKLAR

1. Doç. Dr. Murat Gültekin Uz. Dr. Güledal Boztaş Uz. Dr. Ezgi Şimşek Utku Tek. Aysun Kavak Ergün Ebe Arzu Sevinç Tek. Semra Tütüncü Uz. Yrd. Selin Dünder T.Sek. Elif Seymen. TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2016.
2. Air pollution and cancer: risk assessment methodology and epidemiological evidence. Report of a task group. Environ Health Perspect. 1978;22:1-12.
3. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(7):2151-7.
4. Drieser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. Eur J Cancer. 2013;49(9):2233-42.
5. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. Acta Histochem. 2006;108(1):19-24.
6. Karim R, Jordanova ES, Piersma SJ, Kenter GG, Chen L, Boer JM, et al. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. Clin Cancer Res. 2009;15(20):6341-7.
7. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T

lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3360-5.

8. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:385.

9. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(14):1194-210.

10. Morabia A, Wynder EL. Cigarette smoking and lung cancer cell types. *Cancer*. 1991;68(9):2074-8.

11. Li D, Zhang L, Zhou J, Chen H. Cigarette smoke extract exposure induces EGFR-TKI resistance in EGFR-mutated NSCLC via mediating Src activation and EMT. *Lung Cancer*. 2016;93:35-42.

12. Raaschou-Nielsen O, Beelen R, Wang M, Hoek G, Andersen ZJ, Hoffmann B, et al. Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environ Int*. 2016;87:66-73.

13. Garshick E, Schenker MB, Munoz A, Segal M, Smith TJ, Woskie SR, et al. A retrospective cohort study of lung cancer and diesel exhaust exposure in railroad workers. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(4):820-5.

14. Gamble JF, Nicolich MJ, Boffetta P. Lung cancer and diesel exhaust: an updated critical review of the occupational epidemiology literature. *Crit Rev Toxicol*. 2012;42(7):549-98.

15. Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O'Hagan JA, Hamra GB, et al. Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation:

retrospective cohort study of workers in France, the United Kingdom, and the United States (INWORKS). *BMJ*. 2015;351:h5359.

16. Land CE, Shimosato Y, Saccomanno G, Tokuoka S, Auerbach O, Tateishi R, et al. Radiation-associated lung cancer: a comparison of the histology of lung cancers in uranium miners and survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki. *Radiat Res*. 1993;134(2):234-43.

17. Neugut AI, Murray T, Santos J, Amols H, Hayes MK, Flannery JT, et al. Increased risk of lung cancer after breast cancer radiation therapy in cigarette smokers. *Cancer*. 1994;73(6):1615-20.

18. Van der Bij S, Vermeulen RC, Portengen L, Moons KG, Koffijberg H. Expected number of asbestos-related lung cancers in the Netherlands in the next two decades: a comparison of methods. *Occup Environ Med*. 2016.

19. Whitwell F, Newhouse ML, Bennett DR. A study of the histological cell types of lung cancer in workers suffering from asbestosis in the United Kingdom. *Br J Ind Med*. 1974;31(4):298-303.

20. Mizushima Y, Kobayashi M. Clinical characteristics of synchronous multiple lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis. A review of Japanese cases. *Chest*. 1995;108(5):1272-7.

21. Bouros D, Hatzakis K, Labrakis H, Zeibecoglou K. Association of malignancy with diseases causing interstitial pulmonary changes. *Chest*. 2002;121(4):1278-89.

22. Bakris GL, Mulopulos GP, Korchik R, Ezdinli EZ, Ro J, Yoon BH. Pulmonary scar carcinoma. A clinicopathologic analysis. *Cancer*. 1983;52(3):493-7.
23. Zhai K, Ding J, Shi HZ. HPV and lung cancer risk: a meta-analysis. *J Clin Virol*. 2015;63:84-90.
24. Chan JK, Hui PK, Tsang WY, Law CK, Ma CC, Yip TT, et al. Primary lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. A clinicopathologic study of 11 cases. *Cancer*. 1995;76(3):413-22.
25. Burnet M. *Cancer: a biological approach*. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J*. 1957;1(5023):841-7.
26. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
27. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
28. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med*. 2001;7(1):94-100.
29. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121(1):1-14.

30. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
31. Algarra I, Cabrera T, Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol*. 2000;61(1):65-73.
32. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*. 2000;21(9):455-64.
33. Karanikas V, Zamanakou M, Kerenidi T, Dahabreh J, Hevas A, Nakou M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in lung cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(8):1258-62.
34. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419(6908):734-8.
35. Viard-Leveugle I, Veyrenc S, French LE, Brambilla C, Brambilla E. Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma. *J Pathol*. 2003;201(2):268-77.
36. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7556-61.
37. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1974-82.

38. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.
39. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
40. Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(10):1935-40.
41. Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 2):709s-15s.
42. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresponse in glioma. *Nat Med*. 2007;13(1):84-8.
43. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127ra37.
44. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-71.

45. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov.* 2013;3(12):1355-63.
46. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12293-7.
47. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2455-65.
48. Kim MJ, Shin HC, Shin KC, Ro JY. Best immunohistochemical panel in distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of lung: tissue microarray assay in resected lung cancer specimens. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17(1):85-90.
49. Nonaka D. A study of DeltaNp63 expression in lung non-small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(6):895-9.
50. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol.* 2011;24(10):1348-59.
51. Herbst RS, de Marinis F, Jassem J, Spigel DR, Shankar G, Mocchi S, et al. Phase III clinical trials of atezolizumab compared with standard chemotherapy in

PD-L1-selected chemotherapy-naïve patients with advanced NSCLC. *Annals of Oncology*. 2015;26:105-6.

52. Zakowski MF, Hussain S, Pao W, Ladanyi M, Ginsberg MS, Heelan R, et al. Morphologic features of adenocarcinoma of the lung predictive of response to the epidermal growth factor receptor kinase inhibitors erlotinib and gefitinib. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(3):470-7.

53. Schmidt LH, Kummel A, Gorlich D, Mohr M, Brockling S, Mikesch JH, et al. PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136023.

54. Boland JM, Kwon ED, Harrington SM, Wampfler JA, Tang H, Yang P, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Clinical Lung Cancer*. 2013;14(2):157-63.

55. Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori*. 2012;98(6):751-5.

56. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-h1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(15):5094-100.

57. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Brit J Cancer*. 2015;112(1):95-102.

58. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest.* 2014;94(1):107-16.
59. Velcheti V, Rimm DL, Schalper KA. Sarcomatoid Lung Carcinomas Show High Levels of Programmed Death Ligand-1 (PD-L1). *Journal of Thoracic Oncology.* 2013;8(6):803-5.
60. Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori.* 2012;98(6):751-5.
61. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol.* 2011;28(3):682-8.
62. Zhang Y, Wang L, Li Y, Pan Y, Wang R, Hu H, et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther.* 2014;7:567-73.
63. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *European Journal of Cancer.* 2014;50(7):1361-9.

64. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2014;94(1):107-16.
65. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage I pulmonary squamous cell carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2016;57:91-103.
66. Tokito T, Azuma K, Kawahara A, Ishii H, Yamada K, Matsuo N, et al. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8⁺ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur J Cancer*. 2016;55:7-14.
67. Sterlacci W, Fiegl M, Droeser RA, Tzankov A. Expression of PD-L1 Identifies a Subgroup of More Aggressive Non-Small Cell Carcinomas of the Lung. *Pathobiology*. 2016;83(5):267-75.
68. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J, et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(1):46-54.
69. Lin C, Chen X, Li M, Liu J, Qi X, Yang W, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression Predicts Tyrosine Kinase Inhibitor Response and Better Prognosis in a Cohort of Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(5):e25-35.
70. Kim MY, Koh J, Kim S, Go H, Jeon YK, Chung DH. Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma:

Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers.

Lung Cancer. 2015;88(1):24-33.

71. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Selinger CI, Kohonen-Corish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. Lung Cancer. 2015;89(2):181-8.

72. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015;373(2):123-35.

73. Ilie M, Hofman V, Dietel M, Soria JC, Hofman P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. Virchows Arch. 2016;468(5):511-25.

74. Gettinger SN, Kowanetz M, Koeppen H, Wistuba II, Kockx M, Kadel EE, et al. Molecular, immune and histopathological characterization of NSCLC based on PDL1 expression on tumor and immune cells and association with response to the anti-PDL1 antibody MPDL3280A. Journal of Clinical Oncology. 2015;33(15).

75. Ameratunga M, Asadi K, Lin X, Walkiewicz M, Murone C, Knight S, et al. PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Resected NSCLC. PLoS One. 2016;11(4):e0153954.

76. Azuma K, Ota K, Kawaharara A, Hattori S, Iwama E, Harada T. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non-small cell lung cancer. 2014.

77. Wendy A. Cooper TT, Ricardo E Vilian, Jason Madore, Christina I. Selinger, Maija Kohonen-Corish, Poyee Yip, Bing Yu, Sandra A. O'Toole, Brain

C.McCaughan, Jennifer H. Yearley, Lisa G. Horvath, Steveb Kao, Michael Boyer, Richard A. Scolyer. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. Lung Cancer.

78. Cha YJ, Kim HR, Lee CY, Cho BC, Shim HS. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand-1 expression in lung adenocarcinoma and its relationship with p53 status. Lung Cancer. 2016;97:73-80.

79. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 2014;515(7528):563-7.

80. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubner BS, Wang H, et al. PD-L1 Expression in the Merkel Cell Carcinoma Microenvironment: Association with Inflammation, Merkel Cell Polyomavirus, and Overall Survival. Cancer Immunology Research. 2013;1(1):54-63.

81. Edwin R. Parra CB, Jaime Rodriguez-Canales, Heather Lin, Barbara Mino, Jorge Blando, Yanyan Lou, Don L. Gibbons, John V. Heymach, Stephen G. Swisher, Annikka Weissferdt, Neda Kahlor, Julie Izzo, J. Jack Lee, Humam Kadara, Cesar Moran, Ignacio Wistuba. High programmed cell death ligand 1 expression and low immune infiltrate score correlate with worse outcome in patients with lung adenocarcinoma. 2015.