



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI



Başkan: Prof. Dr. BÜGE ÖZ

AKCİĞERİN SARKOMATOİD KARSİNOMLARINDA
MET GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİ ANALİZİNDE
TANISAL YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

TIBBİ PATOLOJİ UZMANLIK TEZİ
Dr. Cansu YOL

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Şebnem BATUR
İSTANBUL – 2020

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Başkan: Prof. Dr. Büge ÖZ

AKCİĞERİN SARKOMATOİD KARSİNOMLARINDA
MET GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİ ANALİZİNDE
TANISAL YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

TIBBİ PATOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Cansu YOL

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Şebnem BATUR
İSTANBUL – 2020

ÖNSÖZ

Patoloji uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve emeklerini esirgemeyen, her konuda desteğini hissettiğim, başta Anabilim Başkanımız Sayın Prof.Dr. Büge Öz olmak üzere tüm Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Anabilim Dalı üyelerine;

Eğitimime, hayatıma sonsuz katkılarda bulunan, bilgisiyle, tecrübesiyle, duruşuyla hepimize örnek olan, sadece tez aşamasında değil her zaman yanına çekinmeden gidebildiğim, danışabildiğim, yardımını esirgemeyen çok sevgili tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şebnem Batur' a ve sabrına;

Vakaalarını bizimle paylaşan Doç. Dr. Nur Büyükpınarbaşılı' ya;

Asistanlık süresince, zorlukları, sevinci, heyecanı, üzüntüyü birlikte paylaştığımız başta Gamze ve Kerem' e, sevgili eşkıdemlim Cansu' ya, asistanlık son yıllarımı güzelleştiren Zehra, Zeynep, Deniz ve Nil' e, şimdilerde uzman olan sevgili Özden' e, birlikte çalışma olanağı bulduğum Ayşe, Şirin, Merve' ye ve tüm çalışma arkadaşlarıma;

Sitopatolojinin yandal asistan ve uzmanları sevgili Deniz abi ve Şenay' a;

Her zaman gülüyüzle yardıma koşan bölüm sekreterlerimiz İlker ve Can' a;

Tez hazırlık aşamalarında yardımını esirgemeyen Bülent ve Banu Tata çifti başta olmak üzere Onur' a, Sermin ablaya ve Özge' ye, Canan ve Barış' a ve tüm diğer teknisyen arkadaşlarıma;

Cerrahpaşa patoloji ailesi üyesi tüm çalışan sekreter, personellerimize;

Tezimin istatistiği konusunda yardımlarını esirgemeyen Said abime;

Her zaman desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen canım annem, babam, kardeşlerim ve sevgili yeğenlerime;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Cansu YOL

İÇİNDEKİLER TABLOSU

SİMGE VE KISALTMALAR.....	I
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLolar DİZİNİ.....	IV
RESİMLER DİZİNİ.....	V
GRAFİKLER DİZİNİ.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	IX
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
3. GENEL BİLGİLER.....	4
3.1. <i>Akciğer Karsinomları.....</i>	4
3.1.1. Epidemiyoloji ve Etyoloji.....	4
3.1.2. Klinik Bulgular.....	5
3.1.3. Evreleme.....	6
3.1.4. Prognoz.....	10
3.1.5. Histolojik Sınıflama.....	11
3.1.5.1. Adenokarsinom.....	13
3.1.5.1.1. Preinvaziv Lezyonlar.....	13
3.1.5.1.1.1. Atipik Adenomatöz Hiperplazi.....	13
3.1.5.1.1.2. Adenokarsinoma İn Situ (AİS).....	13
3.1.5.1.2. Minimal İnvaziv Adenokarsinom.....	13
3.1.5.1.3. Adenokarsinom.....	13
3.1.5.1.3.1. Lepidik adenokarsinom.....	14
3.1.5.1.3.2. Asiner adenokarsinom.....	14
3.1.5.1.3.3. Papiller adenokarsinom.....	14
3.1.5.1.3.4. Mikropapiller adenokarsinom.....	14
3.1.5.1.3.5. Solid adenokarsinom.....	14

3.1.5.1.3.6. Varyantlar	15
3.1.5.1.3.6.1. İnvaziv Müsinöz Adenokarsinom	15
3.1.5.1.3.6.2. Kolloid Adenokarsinom	15
3.1.5.1.3.6.3. Fetal Adenokarsinom	15
3.1.5.1.3.6.4. Enterik Adenokarsinom.....	15
3.1.5.2. Skuamöz Hücreli Karsinom	16
3.1.5.2.1. Keratinize Skuamöz Hücreli Karsinom.....	16
3.1.5.2.2. Non Keratinize Skuamöz Hücreli Karsinom.....	16
3.1.5.2.3. Bazaloid Skuamöz Hücreli Karsinom	16
3.1.5.2.4. İn Situ Skuamöz Hücreli Karsinom.....	16
3.1.5.3. Nöroendokrin Tümörler	16
3.1.5.3.1. Küçük Hücreli Karsinom.....	17
3.1.5.3.2. Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom	17
3.1.5.3.3. Karsinoid Tümörler	17
3.1.5.3.3.1. Tipik Karsinoid	17
3.1.5.3.3.2. Atipik Karsinoid.....	18
3.1.5.3.4. Difüz İdiopatik Pulmoner Nöroendokrin Hücre Hiperplazisi (DIPNEHH)	18
3.1.5.4. Büyük Hücreli Karsinom	18
3.1.5.5. Adenoskuamöz Karsinom	18
3.1.5.6. Sarkomatoid Karsinom	18
3.1.5.6.1. Pleomorfik Karsinom	19
3.1.5.6.2. İğsi Hücreli Karsinom	20
3.1.5.6.3. Dev Hücreli Karsinom.....	20
3.1.5.6.4. Karsinosarkom.....	20
3.1.5.6.5. Pulmoner Blastom	20
3.1.5.7. Diğer Sınıflandırılmayan Karsinomlar	20
3.1.5.7.1. Lenfoepitelyoma Benzeri Karsinom.....	20
3.1.5.7.2. NUT Karsinom	20
3.1.5.8. Tükruk Bezi Tipi Karsinom	21
3.1.6. Tedavi.....	21
3.1.7. Akciğer Kanserinde Moleküler Patoloji ve Hedefe Yönelik Tedaviler .	21
3.2. <i>HGF ve MET</i>	22

3.2.1. HGF ve MET Yolağı.....	22
3.2.1.1. HGF Yapısı	22
3.2.1.2. MET Yapısı.....	23
3.2.1.3. Hücresel Yanıtlar	23
3.2.2. MET ve Onkogenez	24
3.2.2.1. MET Sinyal Yolağı	24
3.2.2.2. Düzensiz MET Sinyal Yolağı ve Karsinogenez.....	26
3.2.2.3. Kanserde HGF ve MET genetik değişiklikleri.....	27
3.2.3. MET ve Akciğer Kanseri	29
3.2.4. MET ve Sarkomatoid Karsinom	31
3.2.5. Anti-MET Tedaviler	32
3.2.6. MET Genetik Değişikliklerinde Kullanılan Tanısal Yöntemler	34
3.2.6.1. İmmünohistokimya	34
3.2.6.2. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)	35
3.2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	39
3.2.6.4. Yöntemlerin Karşılaştırılması	41
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
4.1. Olguların Seçilmesi.....	44
4.2. İmmunhistokimyasal Yöntem.....	44
4.3. İmmünohistokimyasal Boyanmanın Değerlendirmesi	45
4.4. FISH Yöntemi.....	45
4.5. FISH Değerlendirmesi	47
4.6. PCR Yöntemi	47
4.6.1. RNA izolasyonu:.....	48
4.6.2. Örneklerin PCR Hazırlığı:	49
4.6.3. Veri Analizi.....	50
4.7. Biyoistatistiksel Analiz	52
5. BULGULAR.....	53
5.1. Olguların Demografik Özellikleri.....	53
5.2. Olguların Klinik Takip Bulguları.....	55

5.3.	<i>Olguların İmmünohistokimyasal Bulguları</i>	55
5.4.	<i>İHK Pozitif ile İHK Negatif Olgular Arasında Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar</i>	57
5.5.	<i>Olguların Floresan İn Situ Hibridizasyon Bulguları</i>	58
5.6.	<i>FISH Pozitif ile FISH Negatif Olgular Arasındaki Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar</i>	62
5.7.	<i>MET Amplifikasyonu Pozitif ile FISH Negatif Olgular Arasında Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar</i>	63
5.8.	<i>İHK ile FISH Karşılaştırılması</i>	68
5.9.	<i>Floresan İn Situ Hibridizasyon Bulguları Heterojenitesi</i>	69
5.10.	<i>Olguların Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları</i>	72
5.11.	<i>MET Ekzon 14 Atlama Mutasyonu Pozitif ile MET Ekzon 14 Atlama Mutasyonu Negatif Olgular Arasında Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar</i>	77
5.12.	<i>Hastaların Sağkalım Özellikleri</i>	79
6.	TARTIŞMA	82
7.	SONUÇLAR	102
8.	KAYNAKLAR	104

SİMGE VE KISALTMALAR

ADH	: Anti diüretik hormon
AJCC	: American Joint Committee on Cancer (Amerikan Ortak Kanser Komitesi)
AK	: Adenokarsinom
ASK	: Adenoskuamöz karsinom
ATS	: American Thoracic Society (Amerikan Toraks Derneği)
BHK	: Büyük hücreli karsinom
Bp	: Baz çifti (base pair)
BSA	: Sığır serum albumini
BT	: Bilgisayarlı tomografi
Cbl	: Casitase B lineage Lenfoma
CEP7	: Kromozom 7' nin sentromerik kısmı
DIPNEHH	: Difüz idiopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi
DMF	: Dimetil formamid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
dsDNA	: Çift sarmallı DNA
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
emPCR	: Emülsiyon PCR
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
ERS	: European Respiratory Society (Avrupa Respiratuar Hastalıkları Derneği)
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
Gab 1	: GRB ilişkili bağlayıcı protein 1
Grb 2	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
IASCL	: International Association for the Study of Lung Cancer (Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Grubu Birliği)
ICGC	: International Cancer Genome Consortium (Uluslararası Kanser Genomu Konsorsiyumu)
İHK	: İmmünohistokimya
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu

KHK	: Küçük hücreli karsinom
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
MET	: Mezenkimal epitelyal transizyon
MR	: Manyetik rezonans görüntüleme
p-MET	: Fosforile MET
PAK 1	: p21 aktive kinaz
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PI3K	: Fosfatidinilinozitol-3-kinaz
PLC	: Fosfolipaz C
PRCC	: Papiller böbrek hücreli kanser
PSK	: Sarkomatoid karsinom
RISH	: RNA in situ hibridizasyon
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SHIP-1	: SH2 alanı içeren inozitol 5-fosfataz 1
SHK	: Skuamöz hücreli karsinom
Shp 2	: Src homolojisi 2 alanı içeren protein tirozin fosfataz-2
SISH	: Silver (gümüş) in situ hibridizasyon
SPH	: Serin proteinaz homoloğu alanı
SRC	: Sarkom reseptörü olmayan tirozin kinaz
ssDNA	: Tek sarmallı DNA
STAT	: Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü
TCGA	: The Cancer Genome Atlas (Kanser Genom Atlası)
TK	: Tirozin kinaz
Tm	: Erime sıcaklığı
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
UCCC	: University of Colorado Cancer Center (Colorado Üniversitesi Kanser Merkezi)
UICC	: Union Internationale Contre le Cancer (Uluslararası Kanser Savaş Örgütü)
uPA	: Ürokinaz plazminojen aktivatörü
VATS	: Video-ilişkili torakoskopik cerrahi
YND	: Yeni nesil dizileme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışması Derneği lenf düğümü haritası	7
Şekil 2. Viserai plevra invazyonu.	7
Şekil 3. Hepatosit büyüme faktörü (HGF)' nün yapısı	22
Şekil 4. MET Reseptör Tirozin Kinaz yapısı	23
Şekil 5. HGF/MET yolunun sinyal ve fonksiyonları	24
Şekil 6. MET' in iç kinaz aktivasyonunda fosforilasyon bölgeleri ve ilişkili sinyal iletim yolları	25
Şekil 7. HGF/MET sinyalleşmesinde diğer yollarla fonksiyonel çapraz konuşma ...	27
Şekil 8. Anormal ekleme ile MET ekzon 14 atlaması ve sonuçları	30
Şekil 9. Anti-MET Tedaviler	33
Şekil 10. PCR sıcaklığı değişim profili.....	40
Şekil 11. PCR analiz prosedürü	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. TNM 8. edisyon akciğer tümör 'T, N, M' sınıflamaları	8
Tablo 2. Akciğer tümörü 8.TNM evrelemesi	10
Tablo 3. DSÖ (2015) Akciğer Tümörleri Sınıflaması	12
Tablo 4. Cerrahi rezeke edilen KHDAK olgularında İHK değerlendirmeleri ve sonuçları.	34
Tablo 5. Cappuzzo FISH değerlendirme kriterleri.....	37
Tablo 6. UCCC FISH değerlendirme kriterleri.....	38
Tablo 7. Cerrahi rezeke edilen KHDAK olgularında FISH değerlendirmeleri ve Sonuçları	39
Tablo 8. MET Amplifikasyonu gösteren olguların özellikleri.....	63
Tablo 9. MET/İHK uyum oranları	68
Tablo 10. İHK'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri	69
Tablo 11. RT-PCR sonucunda MET ekzon 14 atlama mutasyon için gecikmiş siklusta düşük seviyede ışına gösteren olguların özellikleri.	75
Tablo 12. İHK, FISH ve RT-PCR uygulanan hastaların özellikleri	78

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. İHK çalışmasındaki boyanma değerlendirilmesi	56
Resim 2. Cappuzzo kriterlerine göre FISH değerlendirme	58
Resim 3. 28 nolu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri	59
Resim 4. 36 nolu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri	60
Resim 5. 47 nolu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri	61
Resim 6. 10 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri.....	64
Resim 7. 30 no'lu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri.....	64
Resim 8. 35 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri.....	65
Resim 9. 37 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri.....	65
Resim 10. 55 nolu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri	66
Resim 11. Negatif kontrol RT-PCR sonucu.....	72
Resim 12. Pozitif kontrol RT-PCR sonucu	73
Resim 13. 41 no'lu olguda RT-PCR sonucu.....	74
Resim 14. 53 no'lu olguda RT-PCR sonucu.....	74
Resim 15. 41 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri.....	76
Resim 16. 53 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri.....	76

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Hastaların tanı anındaki yaşlara göre dağılımı	53
Grafik 2. Hastaların tanı anındaki evrelerine göre dağılımı.....	53
Grafik 3. Hastaların tümör yerleşim bölgeleri	54
Grafik 4. İHK METMab skorlarına göre FISH' de saptanan ortalama MET gen kopya sayıları dağılımı.....	71
Grafik 5. Hastaların 1 ve 5 yıllık genel sağkalımı	79
Grafik 6. İHK pozitifliği ile 1 ve 5 yıllık genel sağkalım ilişkisi	80
Grafik 7. FISH pozitifliği ile 1 ve 5 yıllık genel sağkalım ilişkisi.....	80
Grafik 8. MET amplifikasyon pozitifliği ile 1 ve 5 yıllık genel sağkalım ilişkisi	81

ÖZET

AKCİĞERİN SARKOMATOİD KARSİNOMLARINDA MET GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİ ANALİZİNDE TANISAL YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Amaç:

Sarkomatoid karsinom genel bir terim olup, pleomorfik karsinom, iğsi hücreli karsinom, dev hücreli karsinom, karsinosarkom ve pulmoner blastom bu grupta yer alan akciğer tümör tipleridir. Tüm akciğer tümörlerinin %0,3-1,3' ü, tüm malign akciğer tümörlerinin %3' ünden azını oluşturur. Diğer histolojik alt tiplerle karşılaştırıldığında daha kötü prognozludur ve konvansiyonel sitotoksik kemoterapilere yanıtları kötüdür. Bu nedenle yeni tedavi seçenekleri aranmaktadır. Son yıllarda, bazı çalışmalarda, sarkomatoid karsinomlarda MET ekzon 14 atlama mutasyonları ve MET amplifikasyonlarının yüksek oranda pozitif olduğu saptanmıştır. Literatürde bu vaka grubunda anti-MET tedavilere dramatik yanıtlar bildirilmiştir.

Çalışmamızda, sarkomatoid karsinom olgularında, İHK, FISH ve RT-PCR yöntemleri ile MET genetik değişikliklerini analiz etmek ve bu yöntemleri birbirleriyle karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Materyal Metot:

2000-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında tanı alan 31 sarkomatoid akciğer karsinomu olgusu ve 2011- 2018 yılları arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında sarkomatoid akciğer karsinomu tanısı almış 24 olgu çalışmaya dahil edildi. Bu vakalarda İHK ile MET overekspresyonu, FISH ile MET gen kopya sayısı değişiklikleri ve RT-PCR ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu analizi yapıldı. Sonuçların birbiriyle ve klinikopatolojik özellikler ile ilişkisi değerlendirildi. MET genetik değişikliklerinin prognostik özelliklerine bakıldı. İstatistiksel analiz SPSS 21.0 programı kullanılarak yapıldı.

Bulgular:

Olguların İHK değerlendirmesi, pür sarkomatoid morfoloji alanlarında yapıldığında METMab skorlamasına göre 55 olgunun 13'ü (%23,6); H-skorlamasına göre 12'si (%21,8) İHK pozitif bulundu. Eşlik eden diferansiye küçük hücre dışı akciğer karsinomu (KHDAK) komponenti olan olgularda, bu alanlar da

değerlendirmeye dahil edildiğinde METMAb skorlamasına göre 55 olgunun 15'i (%27,2); H-skorlamasına göre 14'ü (%25,5) İHK pozitif bulundu. İHK pozitif ve İHK negatif grup arasında yaş, cinsiyet, sigara içimi, evre, histolojik tip yönünden farklılık görülmedi ($p>0.05$). Tümörde, eşlik eden diferansiye KHDAK komponentinin AK olması ile İHK pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0,013$).

55 olgudan 8'inde sinyal elde edilemedi. Olguların 47'si FISH ile değerlendirildi. 47 olgunun 10' unda (%21,3) FISH (+) bulundu. Pozitif olguların 3'ünde (%6,4) amplifikasyon saptandı. Ortalama MET gen kopya sayısı $3,5\pm 3,45$ idi. İHK sonuçları heterojenite göstermekteydi. FISH çalışması İHK ile boyanma gösteren alanlarda tekrarlandığında 15 olguda (%31,8) FISH (+) bulundu. Pozitif olguların 5'inde (%10,6) amplifikasyon saptandı. Ortalama MET gen kopya sayısı $4,09\pm 3,7$ idi. İHK boyanması gösteren alanlarda tekrar edilen FISH değerlendirilmesinde gen kopya sayılarında anlamlı artış görüldü ($p=0,027$).

FISH pozitif veya MET amplifikasyonu gösteren olgularla FISH negatif olgular arasında, yaş, cinsiyet, sigara kullanımı- süresi, evre açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). MET İHK ve FISH sonuçları 47 olgunun 33'ünde (%70,2) uyumlu sonuç gösterdi. Amplifikasyon gösteren olgular için, İHK duyarlılığı %60, özgüllüğü %73,8, pozitif prediktif değeri %21,4 ve negatif prediktif değeri %93,9 bulundu. MET İHK pozitifliği ile FISH pozitifliği arasında zayıf korelasyon görüldü ($Rho=0,253$)

FISH bakılan 47 olgudan 40'ında MET ekzon 14 atlama mutasyonu analizi yapıldı. Formalinle fikse parafine gömülü dokudan izole edilen RNA konsantrasyonları minimum 113 ng/dl, maksimum 1143 ng/dl olup ortalama $457,23 \pm 306,69$ idi. Tüm olgular için RT-PCR sonucu MET ekzon 14 atlama mutasyonu için negatif (wild tip). Değerlendirilebilen 36 olgunun yalnızca 2'inde (%5,5) pozitiflik kriterini karşılamayan gecikmiş siklusta düşük seviyede floresan ışığa saptandı.

Sonuç:

İHK'nın düşük duyarlılığı nedeniyle FISH pozitif veya amplifikasyon pozitifliği için tarama testi olarak kullanılamayacağı düşünüldü. Ancak FISH değerlendirmesinin, İHK ile eş zamanlı uygulanıp, olgu total skorda İHK pozitif gruba dahil edilmese de, İHK'da kuvvetli pozitiflik gösteren sarkomatoid morfolojideki alanlarda yapılmasının yararlı olacağını düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: MET; İmmünohistokimya; Amplifikasyon; Ekzon 14 atlama mutasyonu

ABSTRACT

COMPARISON OF DIAGNOSTIC METHODS IN THE ANALYSIS OF MET GENETIC ALTERATIONS IN PULMONARY SARCOMATOID CARCINOMAS

Aim:

Sarcomatoid carcinoma is a general term; pleomorphic carcinoma, spindle cell carcinoma, giant cell carcinoma, carcinosarcoma, and pulmonary blastoma are the types of lung tumors in this group. It constitutes 0.3-1.3% of all lung tumors and less than 3% of all malignant lung tumors. Compared to other histological subtypes, it has a worse prognosis and has poor response to conventional cytotoxic chemotherapy. Therefore, new treatment options are sought. In recent years, it was found that MET exon 14 skip mutations and MET amplifications are highly positive in sarcomatoid carcinomas in some studies. Dramatic responses to anti-MET treatments have been reported in this case group in the literature.

In our study, we aimed to analyze MET genetic changes with immunohistochemistry (IHC), fluorescence in situ hybridization (FISH) and Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods and compare these methods in sarcomatoid carcinoma cases.

Material and Method:

31 cases of pulmonary sarcomatoid carcinoma diagnosed at Istanbul University – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Medical Faculty, Pathology Department between the years 2000-2018 and 24 cases of pulmonary sarcomatoid carcinoma diagnosed at Bezmialem Vakıf University Medical Faculty, Pathology Department between the years 2011-2018 were included in the study. In these cases, MET overexpression with IHC, MET gene copy number alterations with FISH, and MET exon 14 skip mutation analysis with RT-PCR were performed. The relationship between the results and clinicopathological characteristics was evaluated. Prognostic characteristics of MET genetic alterations were analyzed with the tests selected from SPSS 21.0 statistical program.

Results:

When the IHC assessment was performed in the areas of pure sarcomatoid morphology, IHC was positive in 13 (23.6%) cases according to METMab scoring, and 12 (21.8%) according to H-scoring. When differentiated non small cell lung carcinoma (NSCLC) component, were included in the evaluation, IHC was positive in 15 (27.2%) cases for METMab scoring, and 14 (25.5%) for H-scoring. There were no differences in age, sex, smoking, stage, histological type between IHC positive and IHC negative groups ($p > 0.05$). When the accompanying differentiated NSCLC component was adenocarcinoma, a significant correlation was found comparing with IHC positivity in the tumor ($p = 0.013$).

No signal was obtained in 8 (%14,5) out of 55 cases. 47 of the cases were evaluated by FISH. FISH positivity was found in 10 of 47 cases (21.3%). Amplification was detected in 3 (6.4%) of these cases. The average number of MET gene copies was 3.5 ± 3.45 . IHC results showed heterogeneity. When the FISH study was repeated in areas showing IHC positive staining, FISH positivity was found in 15 cases (31.8%). Amplification was detected in 5 (10.6%) of these cases. The average number of MET gene copies was 4.09 ± 3.7 . Repeated FISH evaluation in areas showing IHC positive staining showed a significant increase in gene copy numbers ($p = 0.027$).

There was no statistically significant difference between FISH positive or MET amplified cases and FISH negative cases in terms of age, gender, smoking-duration, and stage ($p > 0.05$). MET IHC and FISH results showed coherent results in 33 of 47 cases (70.2%). For cases showing MET amplification, IHC sensitivity was 60%, specificity was 73.8%, positive predictive value was 21.4%, and negative predictive value was 93.9%. Weak correlation was observed between MET IHC positivity and FISH positivity ($R = 0,253$)

40 of 47 cases in which FISH was examined, MET exon 14 skip mutation analysis was evaluated. RNA concentrations isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were minimum 113 ng / dl, maximum 1143 ng / dl with an average of 457.23 ± 306.69 . The RT-PCR result for all cases was negative for the MET exon 14 skip mutation (wild type). Only in 2 (5.5%) of the 36 cases that could be evaluated, a low level of fluorescence in the delayed cycle which did not meet the positivity criteria was obtained.

Conclusion:

Due to the low sensitivity of the IHC, it was thought that it can not be used as a screening test for FISH positivity or amplification positivity. However, it was thought that it would be beneficial to perform FISH assessment in the areas of sarcomatoid morphology, which is applied simultaneously with IHC and shows strong positivity in IHC.

Keywords: MET; Immunohistochemistry; Amplification; Exon 14 skip mutation



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri Türkiye’de ve dünyada en sık görülen kanserdir. 2018 verilerine göre tüm yaş ve cinsiyetler beraber değerlendirildiğinde, dünyada görülme sıklığı %11,6 ile 1. sıradadır (1). Türkiye kanser istatistikleri 2014 verilerine göre, görülme sıklığı erkeklerde %21,1 ile 1. sırada, kadınlarda %5 ile 5. sırada yer alır. Akciğer kanserinde hastaların %52,7’si ileri evrede teşhis edilmektedir ve beklenen sağkalım oranları düşüktür (2). Dünyada kansere bağlı ölümlerin %18,4’ü akciğer kanserine bağlı ölümlerdir (1).

Akciğer tümörlerinin yarısından fazlasını karsinomlar oluşturur. Histolojik alt tip dağılımlarına bakıldığında %79,2’si küçük hücreli dışı akciğer karsinomları (KHDAK), %16,6’sı küçük hücreli karsinomlar (KHK)’dir. KHDAK’lerin %43,8’i adenokarsinom (AK), %37,5’i skuamöz hücreli karsinom (SHK), %1,8’i büyük hücreli karsinom (BHK)’dur (2). Sarkomatoid karsinom (PSK)’lar, KHDAK’lerin az diferansiye bir alt tipi olup tüm akciğer kanserlerinin %0,3-1,3’ünü oluşturur (3,4).

MET (mezenkimal-epitelyal transizyon) geni ilk olarak 1980’lerin ortasında tanımlanmıştır. 1990’lı yıllarda akciğer kanserinde disregüle olduğu bulunmuştur (5). MET geni 7. Kromozomun uzun kolunda (7q21-q31) yer alır ve 21 ekzon ile yaklaşık 125 kilobaz uzunluğundadır (6). MET/RON ailesine ait bir reseptör tirozin kinazı (RTK) kodlar (7). MET reseptörü, kısa ekstraselüler bir alfa zincirinden ve uzun transmembran beta zincirinden oluşan disülfid bağlı heterodimer proteindir. Beta zincirin ekstraselüler, transmembran ve sitoplazmik kısmı vardır. Beta-zincirin sitoplazmik kısmı, RTK’nin kinaz bölgesi ve ayrıca hücre içi sinyalleşme için gerekli olan çok fonksiyonlu bir yerleştirme bölgesi ile birlikte karboksi-terminal uç içerir (8).

Hepatosit büyüme faktörü (HGF), MET reseptörü için ligand olarak tanımlanmıştır. HGF, büyük bir alfa zinciri ve disülfid köprüleri ile bağlanmış küçük bir beta zincirinden oluşan heterodimerdir. Ligand HGF dimer, MET’in N-terminal kısmına bağlanır ve MET reseptörlerinin dimerizasyonuna neden olur (9). HGF ve MET arasındaki reseptör-ligand etkileşimi ve sonuçta meydana gelen dimerizasyon, MET’in karboksi terminal ucundaki tirozin kalıntılarını fosforiller ve kinaz aktivasyonuna yol açar. Fosforillenmiş MET (p-MET), biyolojik yanıtlara aracılık etmek için Gab1 (Grb2 ilişkili bağlayıcı protein 1), Grb2 (Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2), SRC (Sarkom reseptör olmayan tirozin kinaz), SHIP-1 (SH2 alanı içeren inositol 5-fosfataz 1) ve Shp2 (Src homolojisi 2-alanı- içeren protein tirozin

fosfat-2) gibi adaptör moleküller ile iletişim ağı içindedir. Bu efektör moleküller daha sonra, ERK/MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) yolu PI3K / AKT (fosfatidilinositol 3-kinaz) yolları ile gen ekspresyonunu düzenleyerek onkogenik sinyal aktive eder. Gen ekspresyonunu düzenlemeye ek olarak, bu efektör moleküller PAK1 (p21 aktive kinaz)' in aktivasyonu ile aktin, katenin, integrinleri ve kaderinleri modüle ederek hücre iskeleti yapısını ve hücre adezyonunu değiştirebilir (10).

HGF/MET yolağının embriyogenez, karaciğer rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde önemli rolü vardır (11–13). Anormal HGF/MET sinyal aktivasyonu hücrelerin hayatta kalması, proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu, diferansiyasyonunu uyarır ve tümör gelişimi ve progresyonu ile sonuçlanabilir (14–19). Germline veya somatik mutasyonlara bağlı olarak HGF/MET yolağındaki anormallikler, çeşitli tümör tiplerinde gösterilmiştir ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (20–24). Son yıllarda, HGF/MET'in karsinogenezdeki ana rolü, kanser tedavisi için bu yolağın kullanımının terapötik potansiyeli nedeniyle çok sayıda çalışma yapılmıştır (25,26).

Akciğerde HGF ve MET ekspresyonu görülebilir. Normal dokuda tek zincirli aktif olmayan bir öncü olarak bulunurken, karsinomlarda, sürekli olarak biyolojik aktif heterodimerik formda olup ekspresyonları artar (27). MET, fosforile edilmiş MET ve HGF, hem KHDAK' de hem de KHK' de yüksek oranda eksprese edilir ve daha kötü sağ kalım ile ilişkilidir (28). MET ve p-MET aşırı ekspresyonu, KHK' lerin %54 ve %43' ünde görülür ve kötü prognostik faktördür (29). KHDAK vakalarında MET protein ekspresyonu, yüksek patolojik tümör evresi ve daha kötü prognoz ile ilişkilidir.

PSK genel bir terim olup, pleomorfik karsinom, iğsi hücreli karsinom, dev hücreli karsinom, karsinosarkom ve pulmoner blastomu bu grupta yer alan akciğer tümör tipleridir. Pleomorfik karsinom, sarkomatoid bileşeni (iğsi ve/veya dev hücreler) %10 ve/veya daha fazla olan az diferansiye KHDAK tipidir. Sarkomatöz bileşenin hemen tamamı iğsi hücrelerden oluştuğunda iğsi hücreli karsinom, hemen tamamı dev hücrelerden oluştuğunda dev hücreli karsinom isimlerini alır. Karsinomatöz bileşen AK, SHK, BHK ya da andiferansiye KHDAK şeklinde olabilir. Karsinosarkom, KHDAK (tipik olarak SHK veya AK) ve sarkomatöz heterolog elemanların karışımından oluşan PSK alt tipidir. Pulmoner blastom, fetal adenokarsinom (tipik düşük dereceli) ve primitif mezenkimal stroma içeren bifazik tümördür (3,30).

PSK'ler, diğer histolojik alt tiplerle karşılaştırıldığında daha ktu prognozladur. Median genel sağkalım 5-8 aydır. Konvansiyonel sitotoksik kemoterapilere yanıtları kötüdür (%15-17) (31–33). Kemoterapiye dirençli olduklarından terapötik hedefler açısından çeşitli araştırmalar yapılmıştır (34). Son yıllarda çalışmalarda PSK'lerde MET ekzon 14 atlama mutasyonları ve MET amplifikasyonlarının yüksek oranda pozitif olduğu saptanmış ve anti-MET tedavilere dramatik yanıtları bildirilmiştir (35,36).

Rutin uygulamada, MET amplifikasyonu ve ekzon 14 atlama mutasyonu saptanması için kullanılan testlere erişim kolay değildir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. Yeni nesil dizileme (YND) ise yeterli tümör dokusu ve yüksek kaliteli tümör DNA'sı ya da RNA'sı gerektirir. Literatürde, MET genetik değişiklikleri analizinde, immünhistokimyasal (İHK) yöntemler, FISH, SISH, RISH, PCR ve YND gibi yöntemlerle karşılaştırılmıştır (37–40). FISH, MET amplifikasyonu tespitinde altın standart olarak kabul edildiğinde, İHK duyarlılığı %50, özgüllüğü %83, pozitif prediktif değer %21,4 ve negatif prediktif değer %94,7 bulunmuştur. MET ekzon 14 atlama mutasyonları için İHK duyarlılığı %20, özgüllüğü %83, pozitif prediktif değer %7 ve negatif prediktif değer %94 olarak bulunmuştur (37). İHK ve MET moleküler değişiklikleri arasındaki korelasyon ile ilgili güncel veriler uyumsuzdur (38–41). Yine son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda MET ekzon 14 atlama mutasyonunu saptamak için kombine yöntemler (High Resolution Melting (HRM) + MassARRAY) kullanılmış ve YND yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. YND yöntemlerinin HRM + MassARRAY ile teşhis edilemeyen ekzon 14 atlama mutasyonlarını saptadığı bulunmuştur (37).

Çalışmamızda PSK tanısı almış olgularda İHK, FISH ve RT-PCR yöntemleri ile MET genetik değişikliklerini analiz etmek ve bu yöntemleri birbirleriyle karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Karsinomları

2.1.1. Epidemiyoloji ve Etyoloji

Kansere bağlı ölümler dünya genelindeki ölümlerin büyük çoğunluğunu oluşturur. Akciğer kanseri en sık görülen kanserdir. 2018 dünya verilerine göre 2093876 yeni tanıyla tüm kanser tanılarının %11,6' sını oluşturur. İnsidansı erkeklerde 1980'li yıllardan, kadınlarda ise 2000'li yılların ortalarından bu yana azalmaktadır.

1991 yılında 100000 kişi içinde 215,1 kişilik pik ölüm oranından sonra, kansere bağlı ölüm oranları yılda %1,5' lik azalmayla 2016 yılında 100000' de 156' ya gerilemiştir. Akciğer kanseri kadın ve erkeklerde mortalitesi en yüksek olan kanserdir. 2018 yılında tüm kanser sebepli ölümlerin %18,4' ünü oluşturacağı tahmin edilmektedir (1). Akciğer kanserlerinin %15'i erken evrede tanı alır ve 5 yıllık genel sağkalım oranları %54' dür. Olguların %57' si ileri evrede tanı almakta olup bu dönemdeki 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %26 ve %4' dür (42).

Ülkemizdeki veriler dünya geneliyle benzerlik göstermektedir. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı 2014 yılı verilerine göre akciğer kanseri insidansı erkeklerde 52,5/100 000, kadınlarda 8,7/100 000'dir. Erkeklerde %21,1 ile en sık görülen kanser olup, kadınlarda %5 görülme sıklığı ile 5.sırada yer alır. Ülkemizde tanı anında olguların sadece %18,1' i lokalize olup %29,2' sinde bölgesel yayılım, %52,7' sinde uzak metastaz mevcuttur (2).

Akciğer kanseri gelişiminde tütün ve tütün ürünleri kullanımı önemli bir risk faktörüdür. Etyolojide erkeklerde %80, kadınlarda %50 oranında sigara suçlanmaktadır (43). Özellikle kullanılan tütün cinsi ve maruziyet süresinin kanser gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (44). Bilinen diğer etiyolojik etkenler arasında asbest, arsenik, radon, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, Human papilloma virus, berilyum ve daha birçok mesleki ve çevresel karsinojenlere maruz kalma sayılabilir. Erkek kadın oranı zamanla 2,8'den 1,3'e düşmüştür. Bunun sigara içiminin kadınlarda yaygınlaşmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (45).

Akciğer tümörlerinin büyük çoğunluğunu karsinomlar oluşturur. Adenokarsinom (AK), skuamöz hücreli karsinom (SHK), küçük hücreli karsinom (KHK) ve büyük hücreli karsinom (BHK) en sık görülen alt tiplerdir. Sarkomatoid karsinom (PSK)' lar, küçük hücre dışı akciğer karsinom (KHDAK)' lerin az diferansiye bir alt tipi olup tüm akciğer tümörlerinin %0,3-1,3' ünü oluşturur (3).

Ülkemizdeki akciğer karsinom dağılımı; KHDAK' ler %79,2 (SHK %37,5, AK %43,8, BHK %1,8), KHK' ler %16,6' dir (2).

AK sigara içmeyenlerde, SHK ve KHK sigara içenlerde daha sık görülür (46). Dünya genelinde, akciğer kanseri tanılı hastaların %25' i sigara kullanmamaktadır (1). Sigara içmeyenlerde kadın cinsiyet baskınlığı, genç yaş, AK histolojisi ve daha iyi prognoz bildirilmektedir (47).

2.1.2. Klinik Bulgular

Akciğer ve bronş sistemi, ağrı duyusunu içermediğinden hastaların çoğu asemptomatiktir. En sık görülen semptom öksürüktür ancak sigara içenler tarafından önemsenmediğinden hastaların çoğu ileri evrede tanı alır. Kliniğe başvuru semptomları primer tümörün lokal, bölgesel, metastatik ve sistemik etkileri nedeniyle gelişir. Primer tümörün lokal büyümesine bağlı olarak öksürük, hemoptizi, stridor, ronküs, atelektazi, pnömoniler gelişebilirken; toraks içine tümör yayılımı sonucu rekürren laringeal sinir felci, frenik sinir felci, Pancoast tümörü, Horner sendromu gelişebilir. Göğüs ağrısı göğüs duvarı ve plevra tutulumu olan hastalarda sık görülür (48,49).

Akciğer kanserli hastaların yarısından fazlası, tanı anında metastatiktir. Uzak metastazın en sık olduğu bölgeler; kemik, karaciğer, santral sinir sistemi, adrenal bez, kalp, böbrektir. Kemik metastazlarına bağlı ağrı, karaciğer metazlarına bağlı halsizlik, intrakranial metastazlara bağlı baş ağrısı, bulantı, kusma, nöbet geçirme vb. semptomlar görülebilir. Bunun dışında tümörün kendisi tarafından ya da tümöre yanıt olarak salgılanan biyolojik aktif maddeler nedeniyle uygunsuz ADH sendromu, hiperkalsemi, Cushing sendromu, hipertiroidi gibi paraneoplastik sendromlar gelişebilir ve hastaların ilk başvuru şikayetleri bunlara bağlı olabilir (50).

Tanıda anamnez, fizik muayene, laboratuvar testleri ile akciğer grafisi, bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MR) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi invaziv olmayan yöntemlerden yararlanılmaktadır. Hasta yönetiminde doku tanısının ve tümör alt tipinin büyük önemi vardır. Bu nedenle plevral efüzyon, transtorasik ince iğne aspirasyonları, balgam, bronkoalveoler lavaj, bronkoskopik fırçalama ve yıkama gibi sitolojik yöntemler yanı sıra bronkoskopik biyopsi, transtorasik trucut biyopsi, kama biyopsi, torakoskopik biyopsi ve rezeksiyonlardan yararlanılmaktadır. Metastatik hasta grubunda ilgili bölgelerden (karaciğer, lenf düğümü, kemik vb.) de biyopsi alınabilir. Mediastinoskopi ve video-

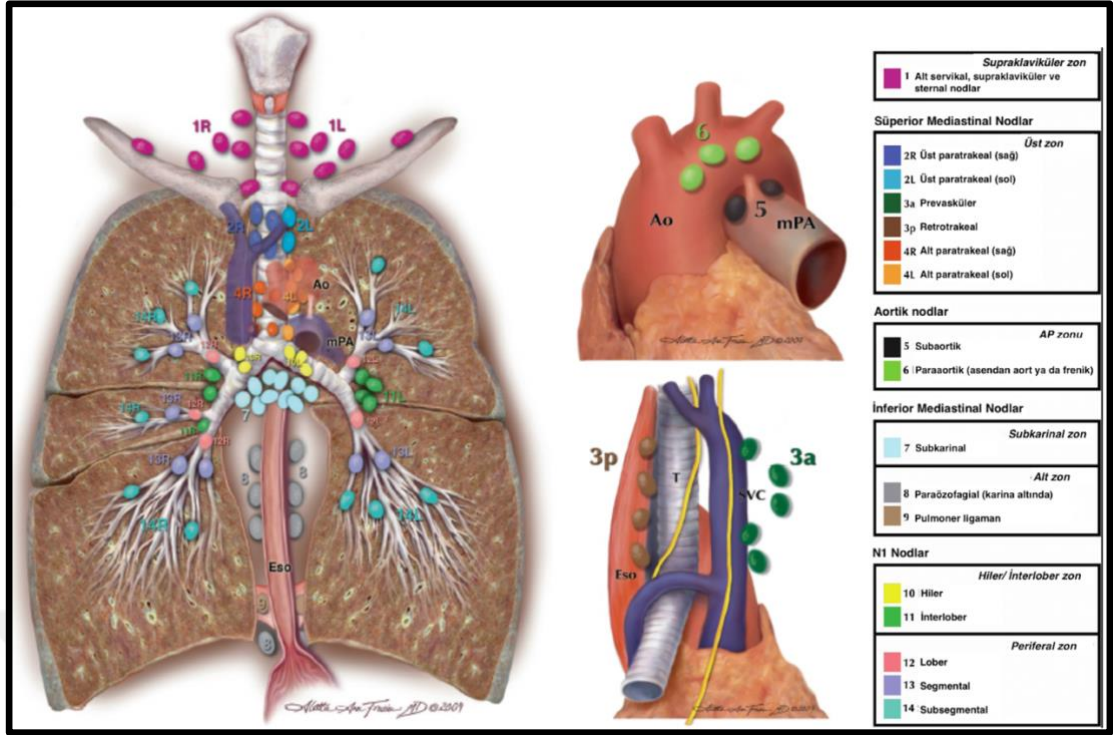
ilişkili torakoskopik cerrahi (VATS) tanıda sık kullanılan diğer yöntemler arasındadır (51).

2.1.3. Evreleme

Akciğer tümörleri klinik ve patolojik (cerrahi) olarak TNM sınıflamasına göre evrelenir. Tümörler bu sınıflamada, primer tümör (T), lenf düğümleri (N), metastaz (M) komponentlerinin durumuna göre alt gruplara ayrılır ve bu sınıflamaya KHK' ler ve KHDAK' ler dahil edilir. Pierre Denoix tarafından 1943-1952 yılları arasında ortaya çıkarılan TNM evreleme sistemi, akciğer tümörlerinde 1974 yılında uygulanmaya başlanmıştır. 2009 yılında 7. edisyonu, 2017'de 8. güncel edisyonu yayınlanmıştır (52). TNM 8. evreleme UICC (The union Internationale Contre le Cancer) ve AJCC (American Joint Committee on Cancer) ve IASCL (International Association for the Study of Lung Cancer) 'in ortak çalışması sonucu ortaya çıkmıştır (53).

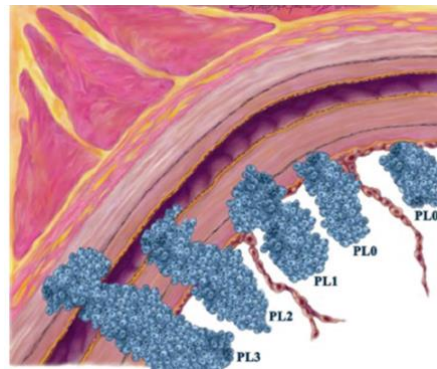
Evrelemede, hastalığın değerlendirildiği döneme göre de TNM sınıflaması yapılmaktadır. C (klinik evre) herhangi bir tedavi uygulanmadan önce eldeki radyolojik vb. evrelemeyi ilgilendiren bilgileri kullanarak yapılırken; P (patolojik) evreleme cerrahi rezeksiyon sonucu nihai histopatolojik değerlendirmeye yapılır. Y (yeniden) evreleme tedavinin planlanan bir kısmı verildikten sonra yapılırken; R (rekürrens) nüks görüldüğü durumda yapılan evrelemedir. Bunlar dışında ayrıca A (otopsi) hasta ölümü sonrası yapılan otopsi ile evrelemedir (54-56).

Primer tümörün patolojik değerlendirmesinde (pT), en yüksek T kategorisini değerlendirmek için tümörün rezeksiyonu gereklidir. Bölgesel lenf nodlarının patolojik değerlendirmesi (pN) için ise yeterli lenf düğümünün çıkarılması gereklidir (52). Evrelemenin tamamlanması için öneriler 3 adet N1, 3 adet N2 istasyondan toplam 6 adet lenf nodunun çıkarılmasıdır (57). Primer tümörün konumuna göre biyopsi yapılması veya çıkarılması gereken mediastinal nodal istasyonları: sağ üst ve orta loblar için 7, 2R ve 4R; sağ alt lob için 7, 4R ve 8 veya 9; sol üst lob için 7, 5 ve 6; sol alt lob için 7, 8 ve 9' dur (52) (Şekil 1).



Şekil 1. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışması Derneği lenf düğümü haritası (Rusch ve ark.15 Copyright © 2008 Aletta Ann Frazier, MD)

Tümör plevra ilişkisi tümörün T evresini belirlerken kritik önem taşır. Elastik tabakayı geçmeyen bir tümör PL0 iken elastik tabaka invazyonu gösteriyorsa PL1 olur. Plevral yüzeyde tutulum PL2 olarak değerlendirilir. Tümör plevra durumu PL1 veya PL2 olduğunda T2 olarak sınıflandırılır. Tümörün parietal plevraya veya göğüs duvarına yayılması PL3 olarak tanımlanır ve primer tümörü T3 olarak sınıflandırır (Şekil 2). Komşu bir ipsilateral lob içerisine doğrudan tümör invazyonu (yani fissür boyunca invazyon), tümör boyutu daha yüksek bir T kategorisi ile uyumlu olmadığı sürece T2a olarak sınıflandırılır.



Şekil 2. Viseral plevra invazyonu. (Travis ve ark.'dan Telif Hakkı © 2008 Aletta Ann Frazier, MD)

Tablo 1. TNM 8. edisyon akciğer tümör ‘T, N, M’ sınıflamaları

T evresi	
Tx	Primer tümörün belirlenememesi veya balgam ya da bronş lavajında malign hücrelerin tespit edilip görüntüleme teknikleri ya da bronkoskopi ile tümörün gösterilememesi
T0	Primer tümör kanıtı yoktur.
Tis	Karsinoma in situ. Skvamöz hücreli karsinoma in situ Adenokarsinoma in situ : En geniş çapı ≤ 3 cm olan pür lepidik paternde adenokarsinom
T1	En geniş çapı ≤ 3 cm olan , akciğer veya visseral plevra ile çevrili, lobar bronştan daha proksimale ulaşmış (Ana bronş tutulumu yok)
T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom: Lepidik paterni baskın (tümörün en geniş çapı ≤ 3 cm) ve invazyonun en geniş olduğu alan ≤ 5 mm
T1a	Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm. İnvaziv komponent bronş duvarı ile sınırlıdır (yüzeyel olarak tümör herhangi bir boyutta yayılabilir). Ana bronş proksimaline dahi yayılım T1a kabul edilir.
T1b	Tümörün en geniş çapı >1 cm ancak ≤ 2 cm dir.
T1c	Tümörün en geniş çapı >2 cm ancak ≤ 3 cm dir.
T2	Tümörün en geniş çapı > 3 cm fakat ≤ 5 cm’ dir veya aşağıdaki özelliklerden herhangi birine sahiptir: <ul style="list-style-type: none">• Ana bronşu, karina tutulumu olmadan invaze etmesi• Viseral plevra invazyonu (PL1 veya PL2)• Akciğerin bir kısmını veya tamamını içeren hiler bölgeye yayılan atelektazi veya obstrüktif pnömoni olması Bu özelliklere sahip T2 tümörleri; <ul style="list-style-type: none">• ≤ 4 cm ise veya boyut belirlenemiyorsa T2a• > 4 cm ancak ≤ 5 cm ise T2b olarak sınıflandırılır.
T2a	Tümörün en geniş çapı >3 cm ancak ≤ 4 cm dir.
T2b	Tümörün en geniş çapı >4 cm ancak ≤ 5 cm dir.
T3	Tümörün en geniş çapı >5 cm ancak ≤ 7 cm dir veya direk aşağıdakilerden birini invaze eder: <ul style="list-style-type: none">• parietal plevra (PL3)• göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil)• frenik sinir• parietal perikart veya primer tümör ile aynı lobda tümör nodül/leri vardır

T4	Tümörün en geniş çapı > 7 cm'dir veya Herhangi bir boyuttaki tümör aşağıdakilerden birini invaze eder: <ul style="list-style-type: none"> • diyafram • mediasten • kalp • büyük damarlar • trakea • rekürren laringeal sinir • özofagus • vertebral gövde • karina Ya da ipsilateral lobda primer tümörden ayrı bir ya da birden fazla nodül vardır
Lenf nodu evresi	
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf düğümleri tutulumu yok
N1	İpsilateral peribronşiyal ve / veya ipsilateral hiler lenf düğümlerinde ve intrapulmoner lenf düğümlerinde direkt invazyon dahil olmak üzere metastaz
N2	İpsilateral mediastinal ve / veya subkarinal lenf düğüm(lerinde) metastaz
N3	<ul style="list-style-type: none"> • Kontralateral mediastinal • kontralateral hiler • ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf düğümünde metastaz
Uzak metastaz (M)	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
M1a	Malign plevral ya da perikardiyal efüzyon ya da kontralateral akciğerde tümör nodül veya nodülleri *Akciğer kanserinde görülen efüzyonlar (plevral ya da perikardiyal) genellikle tümör sonucunda gelişir. Ancak alınan örneğin mikroskopik incelemesinde hemorajik ve eksüdatif vasıfta değilse, tümör hücresi görülüyorsa, klinik de tümörle ilişkisiz olduğunu düşündüğü takdirde efüzyon, evreleme tamamlayıcısı olmaktan çıkarılmalıdır.
M1b	Tek organda tek ekstratorasik metastazın olması (bölgesel olmayan lenf düğümü tutulumu dahil)
M1c	Tek ya da multipl organda multipl ekstratorasik metastazın olması

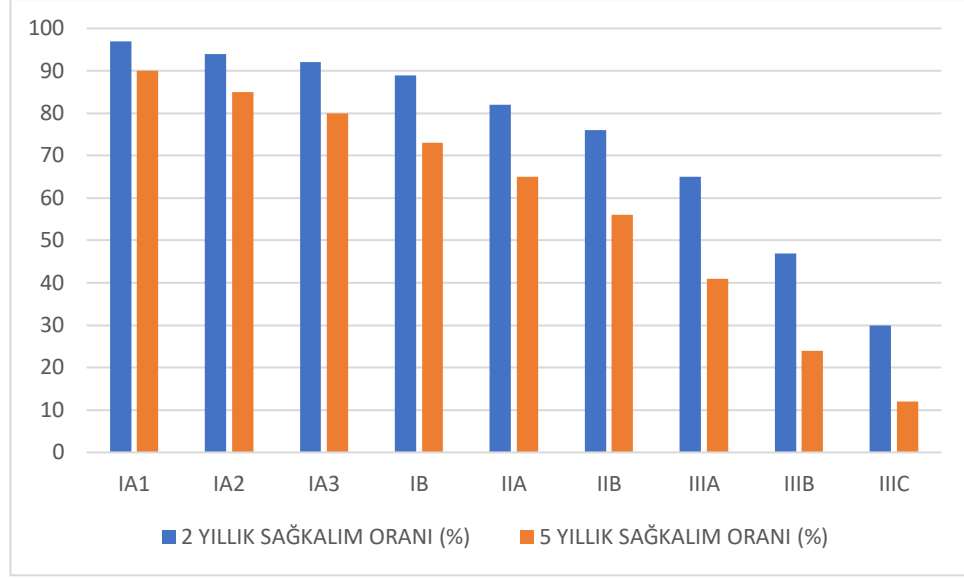
Tablo 2. Akciğer tümörü 8.TNM evrelemesi (52).

Evre	Tümör	Lenf Nodu	Metastaz
Okült karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA1	T1mi, T1a	N0	M0
Evre IA2	T1b	N0	M0
Evre IA3	T1c	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T2b	N0	M0
Evre IIB	T1a, T1b, T1c, T2a, T2b T3	N1 N0	M0 M0
Evre IIIA	T1a, T1b, T1c, T2a, T2b T3 T4	N2 N1 N0, N1	M0 M0 M0
Evre IIIB	T1a, T1b, T1c, T2a, T2b T3, T4	N3 N2	M0 M0
Evre IIIC	T3, T4	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Tüm N	M1
Evre IVA	Herhangi T	Tüm N	M1a, M1b
Evre IVB	Herhangi T	Tüm N	M1c

2.1.4. Prognoz

Evrelemede T, N veya M kategorilerini belirlerken kullanılan faktörlerin dışında ek prognostik faktörlere ihtiyaç yoktur. Çalışmalarda hastanın performans durumu, yaş ve cinsiyeti gibi faktörlerin de prognozu etkilediği gösterilmiştir. Ancak hastaların prognozunu büyük ölçüde etkileyen tümörün histolojik tipi ve evresidir.

Akciğer kanserlerinde evreye göre değişmekle birlikte 5 yıllık sağkalım oranları düşüktür (52). (Grafik 1).



Grafik 1. TNM 8. Edisyon patolojik evrelerine göre 2 ve 5 yıllık genel sağkalım oranları grafiği (52)

2.1.5. Histolojik Sınıflama

Akciğer tümörlerinin sınıflandırılması; hastaların uygun tedavi modalitelerine yönlendirilmesi açısından büyük önem taşır. DSÖ ilk olarak 1981 yılında akciğer tümörlerini sınıflandırmıştır. Yıllar içerisinde tanı yöntemlerinin ve kriterlerinin değişmesi üzerine sınıflama 2011 yılında Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Grubu Birliği (IASLC), Amerikan Toraks Derneği (ATS), Avrupa Respiratuar Hastalıklar Derneği (ERS) iş birliği ile patoloğların önderliğinde multidisipliner bir çalışma ile yeniden düzenlenmiş ve yayınlanmıştır (45,58). DSÖ 2004 akciğer karsinomları sınıflaması tümörün patolojik ve biyolojik özelliklerini yansıtmıyor olup sadece rezeksiyon materyallerinde saptanan tümörlerde ideale yakın uygulanabilmekteydi. 2011 yılında yayınlanan çalışma baz alınarak 2015 yılında, DSÖ akciğer tümör sınıflaması güncellenmiştir (Tablo 3) (43).

Tablo 3. DSÖ (2015) Akciğer Tümörleri Sınıflaması

<input type="checkbox"/> EPİTELYAL TÜMÖRLER	
ADENOKARSİNOM * Preinvaziv lezyonlar <ul style="list-style-type: none">– Atipik adenomatöz hiperplazi– Adenokarsinoma in situ (\leq 3cm)<ul style="list-style-type: none">○ Non müsinöz○ Müsinöz○ Mikst müsinöz/non-müsinöz * Minimal invaziv adenokarsinom (\leq 3cm lepidik paternli tümör, invazyonu \leq 5 mm tümör) <ul style="list-style-type: none">– Non müsinöz– Müsinöz– Mikst müsinöz/non müsinöz * Adenokarsinom <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Lepidik adenokarsinom<input type="checkbox"/> Asiner adenokarsinom<input type="checkbox"/> Papiller adenokarsinom<input type="checkbox"/> Mikropapiller adenokarsinom<input type="checkbox"/> Solid adenokarsinom<input type="checkbox"/> İnvaziv müsinöz adenokarsinom<ul style="list-style-type: none">Mikst invaziv müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinom<input type="checkbox"/> Kolloid adenokarsinom<input type="checkbox"/> Fetal adenokarsinom<input type="checkbox"/> Enterik adenokarsinom	NÖROENDOKRİN TÜMÖRLER <ul style="list-style-type: none">• Küçük hücreli karsinom– Kombine küçük hücreli karsinom• Büyük hücreli nöroendokrin karsinom– Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom• Karsinoid tümörler<ul style="list-style-type: none">○ Tipik karsinoid○ Atipik karsinoid * Preinvaziv lezyon <ul style="list-style-type: none">– Difüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi
	BÜYÜK HÜCRELİ KARSİNOM
	ADENOSKUAMÖZ KARSİNOM
	SARKOMATOİD KARSİNOMLAR <ul style="list-style-type: none">• Pleomorfik, iğsi hücreli, dev hücreli karsinom• Karsinosarkom• Pulmoner blastom
	DİĞER VE SINIFLANDIRILAMAYAN KARSİNOMLAR <ul style="list-style-type: none">• Lenfoepiteloma benzeri karsinom• NUT karsinom
SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM <ul style="list-style-type: none">• Keratinize skuamöz hücreli karsinom• Non keratinize skuamöz hücreli karsinom• Bazaloid skuamöz hücreli karsinom * Preinvaziv lezyon <ul style="list-style-type: none">– İn situ skuamöz hücreli karsinom	TÜKRÜK BEZİ TİPİ TÜMÖRLER <ul style="list-style-type: none">• Mukoepidermoid karsinom• Adenoid kistik karsinom• Epitelyal-myoepitelyal karsinom• Pleomorfik adenom
	Papillomlar
	Adenomlar
<input type="checkbox"/> MEZENKİMAL TÜMÖRLER	
<input type="checkbox"/> LENFOHİSTİYOSİTİK TÜMÖRLER	
<input type="checkbox"/> EKTOPIK ORJİNLİ TÜMÖRLER	
<input type="checkbox"/> METASTATİK TÜMÖRLER	

2.1.5.1. Adenokarsinom

2.1.5.1.1. Preinvaziv Lezyonlar

2.1.5.1.1.1. Atipik Adenomatöz Hiperplazi

Boyutu $\leq 0,5$ cm olan, kolumnar veya kuboidal morfolojide, alveol duvarları veya bazen respiratuar bronşlioller boyunca uzanan hafif-orta derecede sitolojik atipi gösteren, tip 2 pnömosit ve/veya Clara hücre proliferasyonudur. Histolojik ve sitolojik olarak atipik adenomatöz hiperplazi ve adenokarsinoma in situyu birbirinden ayırt etmek zordur. Akciğer karsinomlarına eşlik edebileceği gibi insidental olarak da saptanabilir (45).

2.1.5.1.1.2. Adenokarsinoma İn Situ (AİS)

DSÖ 2004 sınıflamasında bronkoalveoler karsinom olarak bilinen antite 2015 sınıflamasında AİS olarak revize edilmiştir. Boyutu ≤ 3 cm olan, alveoller boyunca pür lepidik paternde yayılan adenokarsinomdur. İnvaziv paternler (asiner, papiller, mikropapiller, solid) ve alveoller içinde yayılım yoktur. Benzer şekilde stromal, plevral ve lenfovasküler invazyon da görülmemelidir (45).

2.1.5.1.2. Minimal İnvaziv Adenokarsinom

Boyutu ≤ 3 cm, lepidik patern baskın olan ve ≤ 5 mm invazyon odağı (asiner, papiller, mikropapiller, solid gibi) içeren adenokarsinomdur. Non müsinöz ve müsinöz tipleri vardır.

Tümörde nekroz, plevral invazyon, lenfovasküler invazyon ve alveoller içinde yayılım varsa bu tanı kullanılmamalıdır (45).

2.1.5.1.3. Adenokarsinom

Glandüler diferansiyasyon, müsin üretimi ya da pnömosit marker ekspresyonu gösteren malign epitelyal tümörlerdir. Genellikle periferik yerleşimlidir. Asiner, papiller, mikropapiller, lepidik ve solid gibi farklı büyüme paternleri gösterebilir. Paternlerin, farklı prognozlarla ilişkili olduğu gösterildiğinden, DSÖ 2015 sınıflaması ile birlikte baskın olan paterne göre sınıflama yapılmaktadır. Alt tiplerin tanımlaması yapılırken %5-10 eşik değeri kullanılmaktadır. Lepidik patern iyi diferansiye (grade 1), asiner ve papiller patern orta derecede diferansiye (grade 2), solid ve mikropapiller patern kötü diferansiye (grade 3) tümörlerdir (45,59,60). Solid ve mikropapiller paternler daha kötü prognozla ilişkilendirildiğinden eşik değerinin altında kalmaları durumunda bile raporda belirtilmesi önerilir (45).

2.1.5.1.3.1. Lepidik adenokarsinom

Minimal invaziv adenokarsinom ve in situ adenokarsinom ile aynı morfolojidedir. Ancak farklı olarak >5 mm invazyon odağı (asiner, papiller, solid ya da mikropapiller) mevcuttur. Aynı zamanda invazyon odağının boyutuna bakılmaksızın nekroz, plevra invazyonu, lenfovasküler invazyon ve alveoller içinde yayılım varlığında tanı minimal invaziv adenokarsinom yerine lepidik patern baskın adenokarsinom olur (45).

2.1.5.1.3.2. Asiner adenokarsinom

Tümörün baskın komponentini glandların oluşturduğu varyanttır. Neoplastik hücrelerde veya gland boşluklarında müsün izlenebilir. Akciğer kollabe olduğunda lepidik paternden ayrımı zor olabilir. Bu durumda alveolar yapının bozulması ve myofibroblastik stroma asiner patern lehinedir. Kribriform patern de asiner adenokarsinoma dahil edilmektedir. Ancak daha kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (61).

2.1.5.1.3.3. Papiller adenokarsinom

Santral fibrovasküler kor boyunca glandüler tümör hücrelerinin büyümesi görülür. Tanjansiyel kesitlerde lepidik adenokarsinomla ayrımı güçleşir. Eğer tümör asinusu ya da alveol boşlukları papiller ya da mikropapiller yapılar ile dolu görünüyorsa tümör paterni sırasıyla papiller ya da mikropapiller adenokarsinom olmalıdır (45).

2.1.5.1.3.4. Mikropapiller adenokarsinom

Fibrovasküler koru olmayan çiçek benzeri papiller çıkıntılar şeklinde tümöral büyüme gösterir. Bunlar alveolar duvarlarından kopmuş ve / veya bağlı görünebilir. Tümör hücreleri genellikle küçük ve küboidal olup nükleer atipisi değişkenlik gösterebilir. Stromal ve vasküler invazyon yaygındır. Psammom cisimleri görülebilir. Kötü prognozludur (45).

2.1.5.1.3.5. Solid adenokarsinom

Tabakalar şeklinde büyüyen, poligonal şekilli tümör hücreleri görülür. Skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdan ayrımı önemlidir. Eğer %100 solid patern gösteren bir tümörde 2 büyük büyütme alanında ≥ 5 intrasellüler müsün sekresyonu gösteren hücre varsa tanı solid paternde adenokarsinomdur. Müsün olmasa bile, pnömosit marker ekspresyonuna (yani TTF1 ve / veya NapsinA) sahip tümörler solid adenokarsinom olarak değerlendirilmelidir. (45).

2.1.5.1.3.6. Varyantlar

2.1.5.1.3.6.1. İnvaziv Müsinöz Adenokarsinom

Goblet veya kolumnar hücre morfolojisinde yoğun intrasitoplazmik müsin içeren adenokarsinomdur. En sık lepidik olmak üzere asiner, papiller ve mikropapiller paternler görülebilir. Bu tümör grubu diğer adenokarsinomlardan farklı olarak CK7 ve CK20 pozitif iken TTF-1 ile NapsinA genellikle negatiftir ve metastatik karsinomlarla ayırıcı tanı yapmayı gerektirir (45).

Müsinöz ve non müsinöz tümörler birlikte görülebilir. Eğer komponentlerden biri \geq % 10 ise “mikst müsinöz ve non müsinöz adenokarsinom” terminolojisi kullanılır (45).

2.1.5.1.3.6.2. Kolloid Adenokarsinom

Alveol boşluklarının yerini alan, yoğun ekstraselüler müsin ile karakterize adenokarsinomdur. Tümör glandları mukoid materyale yüzebilir. Tümör müsinöz hücreleri tipik olarak alveolleri tamamen döşemez ve çok iyi diferansiye olabilir. Bu durum, çok küçük bir biyopsi veya intraoperatif değerlendirmede tanı zorluğuna neden olur. İmmünohistokimyasal olarak intestinal markerlar (CDX2, MUC2 ve CD20) ile ekspresyon ederken TTF-1 ve CK7 ile zayıf veya fokal olarak pozitiflik gösterebilir (45).

2.1.5.1.3.6.3. Fetal Adenokarsinom

Morfolojik olarak fetal akciğerin psödoglandüler evresindeki epitele benzeyen adenokarsinomdur. Glikojenden zengin, subnükleer vakoul içeren, silyasız hücrelerden oluşur. Tümör glandüler ve tübüler paternindedir. Skuamotoid morüller eşlik edebilir. Düşük gradeli ve yüksek gradeli olanları vardır (45).

2.1.5.1.3.6.4. Enterik Adenokarsinom

İlk olarak Tsao ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (62). Kolorektal adenokarsinoma benzer. Yüksek kolumnar, nükleer psödostratifikasyon gösteren, lümeninde nekroz izlenebilen, asiner ve/veya kribriform paternindedir. Bu tanı, enterik patern tümörün \geq % 50' sinde görüldüğünde kullanılır. Tümörlerin bir kısmında enterik diferansiyasyon (immünohistokimyasal olarak CDX2 ve/veya CK20, CK7 pozitifliği) görülürken bir kısmında bu görülmez ve sadece enterik morfoloji izlenebilir. TTF-1 negatif olgularda metastatik kolorektal karsinomdan ayırım zor olabilir (45).

2.1.5.2.Skuamöz Hücreli Karsinom

KHDAK içinde sigara kullanımıyla ilişki olguların %90'ından fazlasını skuamöz hücreli karsinomlar oluşturur. Erkeklerde sıktır. Genellikle santral yerleşimlidir ve sıklıkla nekroz eşlik eder.

Histolojik olarak keratin formasyonu ve/veya iyi gelişmiş intersellüler bağlantılarla karakterli ya da az diferansiye morfolojide olup immunhistokimyasal olarak skuamöz hücre diferansiyasyonu gösteren tümörlerdir. İyi diferansiye olanlar nükleolusu seçilemeyen, geniş, soluk veya belirgin eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşurken; az diferansiye olanlarda nükleolus belirginleşir ve bol mitoz dikkat çekicidir (45).

2.1.5.2.1. Keratinize Skuamöz Hücreli Karsinom

Keratinizasyon, keratin inci formasyonu içeren tümörlerdir. Tümörün diferansiyasyon derecesini keratinizasyonun varlığı belirler (45).

2.1.5.2.2. Non Keratinize Skuamöz Hücreli Karsinom

Morfolojik olarak keratinizasyon görülmezken immunhistokimyasal olarak skuamöz belirteçlerin (p40, p63, CK5/6) pozitif olması büyük hücreli karsinomdan ayırırda kullanılır (45).

2.1.5.2.3. Bazaloid Skuamöz Hücreli Karsinom

Periferde palizatlanma ve lobuler yapılanma gösteren az diferansiye malign epitelyal tümördür. İmmünhistokimyasal olarak skuamöz belirteçler (p40, p63, CK5/6) pozitifdir. Bazaloid komponent, keratinize ya da non keratinize skuamöz hücreli karsinom komponentine eşlik edebilir. Eğer bu komponent rezeksiyon materyalinde \geq %50 ise bazaloid skuamöz hücreli karsinom olarak değerlendirilmelidir (45).

2.1.5.2.4. İn Situ Skuamöz Hücreli Karsinom

Skuamöz hücreli karsinom preinvaziv lezyonları, değişik derecelerdeki displaziler (hafif, orta, ağır) ve in situ karsinomdur. Bunlar hücrenin boyutu, matürasyonu, nükleus değişiklikleri, hücre oryantasyonu ve epitel kalınlığı ile birbirinden ayrılır (45).

2.1.5.3.Nöroendokrin Tümörler

Sitomorfolojik ve prognostik özellikleriyle düşük dereceli (tipik karsinoid), intermediate dereceli (atipik karsinoid), yüksek dereceli (küçük hücreli karsinom ve

büyük hücreli karsinom) olarak sınıflandırılır. Boyutu <0,5 cm olan nodüler nöroendokrin proliferasyonlar tümörlet olarak isimlendirilir.

Tanı için nöroendokrin morfoloji yanı sıra immünohistokşmyasal olarak nöroendokrin belirteçler (Sinaptofizin, Kromogranin, CD56 vb.) ile pozitif boyanmanın da gösterilmesi gerekir.

2.1.5.3.1. Küçük Hücreli Karsinom

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %13'ünü oluşturur ve hastaların hemen tamamı sigara kullanıcısıdır. Genellikle santral yerleşimlidir. Dar sitoplazmalı, küçük (3 matür lenfositin daha küçük), nükleer kromatini ince granüler özellikle (tipik tuz biber görünümü), yuvarlak, oval, iğsi şekilli hücrelerden oluşur. Nükleuslar birbiri üzerine oturur (molding) görünümündedir ve mitotik aktivite artışı (≥ 10 mitoz/2 mm²), yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi (%50-100) ile belirgin nekroz mevcuttur. Hücrelerin nükleolusu yok ya da belirsizdir. Tümöral hücreler genellikle tabaka benzeri difuz büyüme paterni gösterir.

KHK' ye KHDAK' nin bir alt tipi (AK, SHK, BHK, pleomorfik karsinom vb.) eşlik ettiğinde kombine KHK tanımı kullanılır. KHK ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom birbirinin morfolojik spektrumları olabileceğinden kombine demek için büyük hücreli nöroendokrin karsinom komponentin $>10\%$ olması gibi bir koşul bildirilirken diğer tümör alt tipleri için herhangi bir oran zorunluluğu yoktur (45).

2.1.5.3.2. Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom

Rozet, yuvalanma, trabeküler ve periferik palizatlanma gibi nöroendokrin patern gösterir. Hücreler orta genişlikte sitoplazmalı büyük hücrelerdir ve belirgin nükleolusları vardır. Artmış mitoz (≥ 10 mitoz/2 mm²) ve yüksek Ki67 proliferasyon indeksi (%40-80) mevcuttur.

Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom ise beraberinde herhangi bir oranda KHDAK' lerin (AK, SHK, PSK vb.) bulunması şeklinde tanımlanır (45).

2.1.5.3.3. Karsinoid Tümörler

2.1.5.3.3.1. Tipik Karsinoid

Ana bronş ve ilk dallarında, normal mukoza ile kaplı polipoid kitleler biçimindedir. Nöroendokrin Kulschitsky hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir.

Trabeküler ve organoid başta olmak üzere rozet formasyonu, psödoglandüler ve foliküler patern veya kordon benzeri dizilim gösterebilirler. Hücreler genellikle poligonal, bazen iğsi morfolojide olup ince granüler kromatinli, belirsiz nükleoluslu

uniform görünümündedir. Nekroz yoktur. Mitoz $<2/2$ mm²'dir ve Ki67 $<5\%$ 'dir. Periferik olanlar multipl tümörlet ile ilişkili olabilir. Bunlara bazen difüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi (DIPNEHH) de eşlik edebilir.

2.1.5.3.3.2. Atipik Karsinoid

Tipik karsinoid ile benzer özelliktedir. Farklı olarak mitoz sayısı 2-10/ 2 mm² ve Ki67 $<20\%$ 'dir. Ayrıca fokal noktasal nekroz odakları görülebilir (45).

2.1.5.3.4. Difüz İdiyopatik Pulmoner Nöroendokrin Hücre Hiperplazisi (DIPNEHH)

Hava yolları mukozasında tek ya da gruplar halinde yaygın nöroendokrin hücre hiperplazisiyle karakterizedir. Tümörlet oluşturmak üzere lokal invazyon gösterebilir ve tipik karsinoid tümör öncül lezyonu olarak kabul edilmektedir. Özellikle konstrüktif bronşiolit gibi hafif, kronik lenfositik inflamasyon ile karakterize solunum yollarının fibrozisi ile birlikte görülür (45).

2.1.5.4. Büyük Hücreli Karsinom

Sitolojik, yapısal ve immünohistokimyasal olarak skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom özellikleri göstermeyen andiferansiye küçük hücre dışı karsinom alt grubudur. Tümör hücreleri tabaka ya da yuvalanma paterni gösteren büyük poligonal şekilli, veziküler çekirdeklidir ve belirgin nükleolus içerir. Tanı yalnızca rezeksiyon materyalinde, tümörün tamamı incelendikten sonra diğer KHDAK' ler morfolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle dışlandığında verilebilir (45).

2.1.5.5. Adenoskuamöz Karsinom

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %0,4-4'ünü oluşturur. SHK ve AK komponentlerinden birisinin en az % 10 oranında görüldüğü, iki komponenti birlikte içeren tümörlerdir. Prognoz skuamöz hücreli karsinoma göre daha kötüdür (45).

2.1.5.6. Sarkomatoid Karsinom

Sarkomatoid karsinom (PSK) genel bir terimdir. Epitelyal ve sarkomatoid bileşenler içeren tümörlerdir. Pleomorfik karsinom, iğsi hücreli karsinom, dev hücreli karsinom, karsinosarkom ve pulmoner blastom bu grupta yer alan akciğer tümörü tipleridir.

PSK' ler, oldukça nadir olup tüm akciğer tümörlerinin % 0.3-1.3'ünü, tüm malign akciğer tümörlerinin % 3' ünden azını oluşturur (3,30). Olguların tanı anındaki yaş ortalaması 60-70'tir. Erkeklerde daha sık görülmektedir ve hastaların çoğunluğu sigara içicisidir. Bazı olgularda asbest maruziyetiyle ilişki bildirilmiştir. Genellikle

periferik yerleşimli büyük (ortalama 7 cm), nekrotik alanlar içeren, genellikle üst lobda görülen, solid tümörlerdir. Vakaların yarısından fazlasında (%51.8) plevral invazyon görülmektedir.

Epitelyal bileşen keratinle, sarkomatoid bileşen vimentinle boyanırlar. Sarkomatoid bileşende de bazen keratin ile immünreaktivite izlenebilir.

PSK' da en sık rastlanan moleküler değişiklikler, sigara ilişkili akciğer adenokarsinomlarıyla benzer şekilde, p53 ve KRAS'tır. ALK gen rearranjmanı yaklaşık %3,5 oranında saptanmaktadır. EGFR mutasyonu görülme oranı Amerika'da %2-%8,8 iken, Asya kaynaklı çalışmalarda bu oran %20 olarak bildirilmektedir. BRAF mutasyonu %7,7 olarak saptanmaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada genetik olarak incelenen PSK olgularının %22'sinde MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptanmış, hatta bu olgulardan birinde tirozin kinaz inhibitörü Crizotinibe dramatik bir yanıt alınmıştır. Bir başka çalışmada bu oran %20,8 olarak bulunmuştur. 2018 yılında yapılan bir meta analizde bu oran %13 olarak saptanmış, böylece KHDAK' leri içinde MET ekzon 14 atlama mutasyonunun en sık PSK' da görüldüğü ortaya konmuştur(63–68).

PSK' ler, diğer histolojik alt tiplerle karşılaştırıldığında daha kötü prognozludur. Agresif cerrahi tedavi ve postoperatif kemoterapi verildiğinde bile diğer KHDAK' de 5 yıllık sağkalım oranı %45 iken bu oran PSK için %25'tir. Sürveyans, epidemiyoloji veritabanı analizi sonuçlarına göre PSK olguları diğer KHDAK' lerine göre daha kısa genel sağkalım göstermektedir. PSK' da kemoterapinin etkisi yetersizdir. Hastaların sadece %31 inde hastalık kontrolü, %16,5' inde parsiyel yanıt, %14,5' inde stabil hastalık izlenmiştir. Hastaların %69' u ortalama 3 siklus kemoterapi sonrasında progresyon göstermiştir. Progresyonsuz sağkalım ortalama 2 ay olup platin bazlı kemoterapiyle tedavi edildiğinde median genel sağkalım 7 aydır. Diğer KHDAK' lere kıyasla konvansiyonel kemoterapilere yüksek oranda direnç göstermeleri nedeniyle PSK' da farkı tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Bu amaçla PSK' lerin moleküler analizi ve mutasyon sıklıkları değerlendirilerek hedefe yönelik tedaviler geliştirilmiştir (3,69,70).

2.1.5.6.1. Pleomorfik Karsinom

Sarkomatoid bileşeni (iğsi ve/veya dev hücreler) %10 ve/veya daha fazla olan az diferansiye akciğer karsinomlarıdır. Karsinomatöz bileşen AK, SHK, BHK ya da andiferansiye KHDAK şeklinde olabilir (45).

Günümüzde özellikle hedefe yönelik tedavilere doğru yönlendirme açısından bu tümörlerin içerdiği karsinomatöz bileşenin mutlaka belirtilmesi ve tanımlanması önerilmektedir

2.1.5.6.2. İğsi Hücreli Karsinom

Neredeyse tamamı iğsi hücrelerden oluşan, sarkom benzeri büyüme paterni gösteren akciğer karsinomlarıdır. Saf iğsi hücreli formu çok daha nadir olup bazen dev hücreler ile birliktelik gösterebilir. Diferansiye karsinomatöz eleman içermez. Epitelyal orijinin kanıtlanması gerekir (45).

2.1.5.6.3. Dev Hücreli Karsinom

Neredeyse tamamı dev hücrelerden oluşan akciğer karsinomlarıdır. Çok nadir tümörlerdir. Diferansiye karsinomatöz eleman içermez. Epitelyal orijinin kanıtlanması gerekir (45).

2.1.5.6.4. Karsinosarkom

Karsinom ile heterolog sarkomatoid bileşenlerin birlikteliği söz konusudur. Karsinom bileşenini KHDAK; SHK, AK, ASK ve/veya BHK oluşturmaktadır. Heterolog sarkomatoid bileşen ise malign özellikte kıkırdak, kemik ve/veya çizgili kaptır (45).

2.1.5.6.5. Pulmoner Blastom

Fetal adenokarsinom ve primitif mezenkimal stroma içeren bifazik tümördür. Mezenkimal komponenti oluşturan hücreler miksoid, fibröz bir zeminde, yüksek nükleer/sitoplazmik orana sahip, daha çok matür fibroblast benzeri hücrelere diferansiye olma eğilimindedir. Olguların %25' inde stromada nadiren osteosarkom, kondrosarkom ya da rabdomyosarkom gibi heterolog elemanlar eşlik edebilir (45).

2.1.5.7. Diğer Sınıflandırılmayan Karsinomlar

2.1.5.7.1. Lenfoepitelyoma Benzeri Karsinom

Nadir görülür. Belirgin lenfositik infiltrasyon ile karışık, sinsisyal büyüme paterni gösteren, kötü diferansiye, geniş veziküler nükleus ve belirgin eozinofilik nükleolusları olan neoplastik hücrelerle karakterizedir. Tümör hücreleri EBV pozitifdir (45).

2.1.5.7.2. NUT Karsinom

15q14' de NUT gen rearanjmanı ile tanımlanmış kötü diferansiye nadir bir tümördür. Prognozu kötüdür. Küçük-orta boyuttaki tümör hücreleri monomorfik tabakalanmalar veya yuvalanmalar yapar. Hücrelerin nükleusları düzensiz konturlu ve

kaba kromatinlidir. Karakteristik olarak yaygın keratinizasyon odakları görülebilir (45).

2.1.5.8. Tükürük Bezi Tipi Karsinom

Büyük hava yollarındaki glandlardan kaynaklanırlar ve tükürük bezi tümörlerine diferansiye olurlar. Genellikle lokal agresif seyirlidir. Çok nadir görülür. En sık görülenleri; mukoeypidermoid karsinom (MEK) ve adenoid kistik karsinomdur(45).

2.1.6. Tedavi

Akciğer kanserli hastaların tedavi seçimi, tümörün hücre tipi (KHDAK ya da KHAK), moleküler özellikleri, tümör evresi ve hastanın performans durumu dikkate alınarak yapılır. Erken evre KHDAK' li hastalara genellikle cerrahi veya radyoterapi uygulanır. İleri evre KHDAK' li veya tedaviden sonra nüks gelişen hastalarda ise kemoterapi, radyoterapi, moleküler durumuna göre hedefe yönelik tedaviler tek tek ya da kombine şekilde kullanılır (71).

2.1.7. Akciğer Kanserinde Moleküler Patoloji ve Hedefe Yönelik Tedaviler

Kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayıran genetik farklılıkların saptanmasıyla (mutasyonlar) birlikte ilgili mutant yolaklarda bir hedef belirlenmesi sonucu hedefe yönelik tedaviler gelişmeye başlamıştır. Moleküler hedeflerin saptanması ve bunlara yönelik ilaçların geliştirmesi kişiselleştirilmiş tedavinin temelini oluşturmaktadır. 1978 yılında Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) tanımlanmış olup 2004 yılında aktive edici mutasyonların saptanması ve bu molekülü hedefleyen antikorlardan klinik yarar izlenmesiyle hedefe yönelik tedaviler hız kazanmıştır (72,73).

Günümüzde, 2018 moleküler kılavuzunda, akciğer kanserinde tedaviye yönelik ön plandaki hedef moleküller EGFR, ALK ve ROS-1' dir. Bunlar dışında bakılması önerilen diğer mutasyonlar ise BRAF, MET, RET, ERBB2 (HER2) ve KRAS' tır (74).

2.2.HGF ve MET

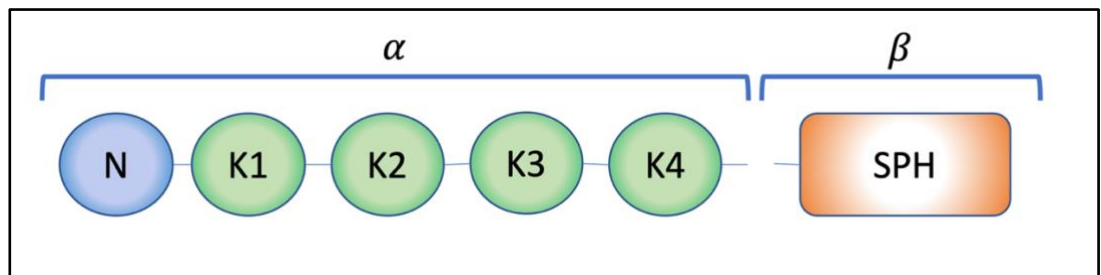
2.2.1. HGF ve MET Yolağı

Hepatosit büyüme faktörü (HGF), saçılma faktörü olarak da bilinir. İlk kez 1984 yılında Nakamura ve arkadaşları tarafından, parsiyel hepatektomili farelerin serumunda mitojen potansiyeli olan bir sitokin olarak gösterilmiştir (75). MET ise ilk olarak insan osteosarkom hücre dizisinde TRP-MET füzyon geni olarak tanımlanmıştır (76). HGF, MET' in doğal ligandır.

HGF/MET yolağının embriyogenez, karaciğer rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde önemli rolü vardır (11–13). Anormal HGF/MET sinyal aktivasyonu hücrelerin hayatta kalmasını, proliferasyonunu, migrasyonunu, invazyonunu, diferansiyasyonunu uyarır ve tümör gelişimi ve progresyonu ile sonuçlanabilir (14,16,19,77–79).

2.2.1.1. HGF Yapısı

HGF, plazminojen ilişkili büyüme faktörleri ailesinin üyesidir. Aynı zamanda PRGF-1 olarak da adlandırılmaktadır. Disülfid bağlı büyük bir sitokindir. 7. Kromozomda (7q21.1) yerleşmiş 70 kb büyüklüğünde bir gen tarafından kodlanır (80). Aktif formu büyük, multipl alana sahip bir proteindir. 6 alandan oluşur: bir amino-terminal alan (N), dört kringle alanı (K1-K4) ve bir serin proteinaz homoloğu alanı (SPH). Amino-terminal ve K1 alanlarının içeren bölüm NK1 olarak bilinir ve HGF' nin ligand-reseptör bağlanmasına aracılık eder (8). (Şekil 3)



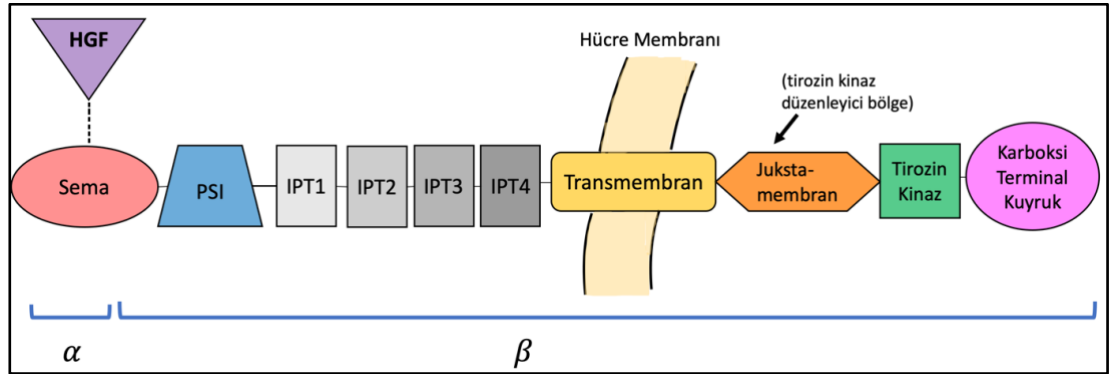
Şekil 3. Hepatosit büyüme faktörü (HGF)' nün yapısı

HGF, plazminojen gibi tek zincirli 728 aminoasidlik prekürsör bir polipeptid (pro HGF) olarak sentezlenir. Plazminojen aktivatörleri (ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) ve doku plazminojen aktivatörü (tPA)), pıhtılaşma faktörleri ve serin proteazlar tarafından proteolitik olarak aktif forma dönüştürülür. Bölünme K4' ten sonraki tripsin

benzeri bir bölgede meydana gelir. Sonuçta disülfid bağlı 69 kd büyüklüğünde α ve 34 kd büyüklüğünde β zincirlerinden oluşan heterodimer protein üretilir (8).

2.2.1.2.MET Yapısı

MET geni 7. kromozomda (7q21-q23) bulunur ve 20 intron 21 ekzon içerir. Reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesi üyesidir. MET gen transkripsiyonu sonucu önce 150 kDa bir prekürsör protein üretilir. Sonra bu glikozillenir, bölünür. Disülfid bağlı 50 kDa ekstraselüler bir α zincir ve 140 kDa transmembran β zincirden oluşan heterodimerik yapıya sahip protein oluşur. β zincir ekstraselüler, transmembran ve sitoplazmik kısımlara sahiptir ve diğer hücre sinyal proteinleri ile fonksiyonel önemi olan yedi alana ayrılır. Semaforin (veya Sema) alanı, HGF bağlanma bölgesidir ve pleksin reseptörü ile de ilişkilidir. PSI alanı, pleksinler, semaforinler ve integrinlerde bulunduğu için bu şekilde adlandırılır. Dört IPT tekrar alanı ise immünglobulinler, pleksinler ve transkripsiyon faktörlerinde bulduklarından bu şekilde adlandırılır. Sitoplazmik kısım; juxtamembran ve kinaz alanlarını ve karboksi terminal kuyruğu içerir. Karboksi terminal kuyruk, substrat yerleştirme ve aşağı yönlü sinyal iletimi için gereklidir. Jukstamembran alanı, tirozin kinaz aktivitesinde düzenleyici görev yapar (25,81). (Şekil 4)

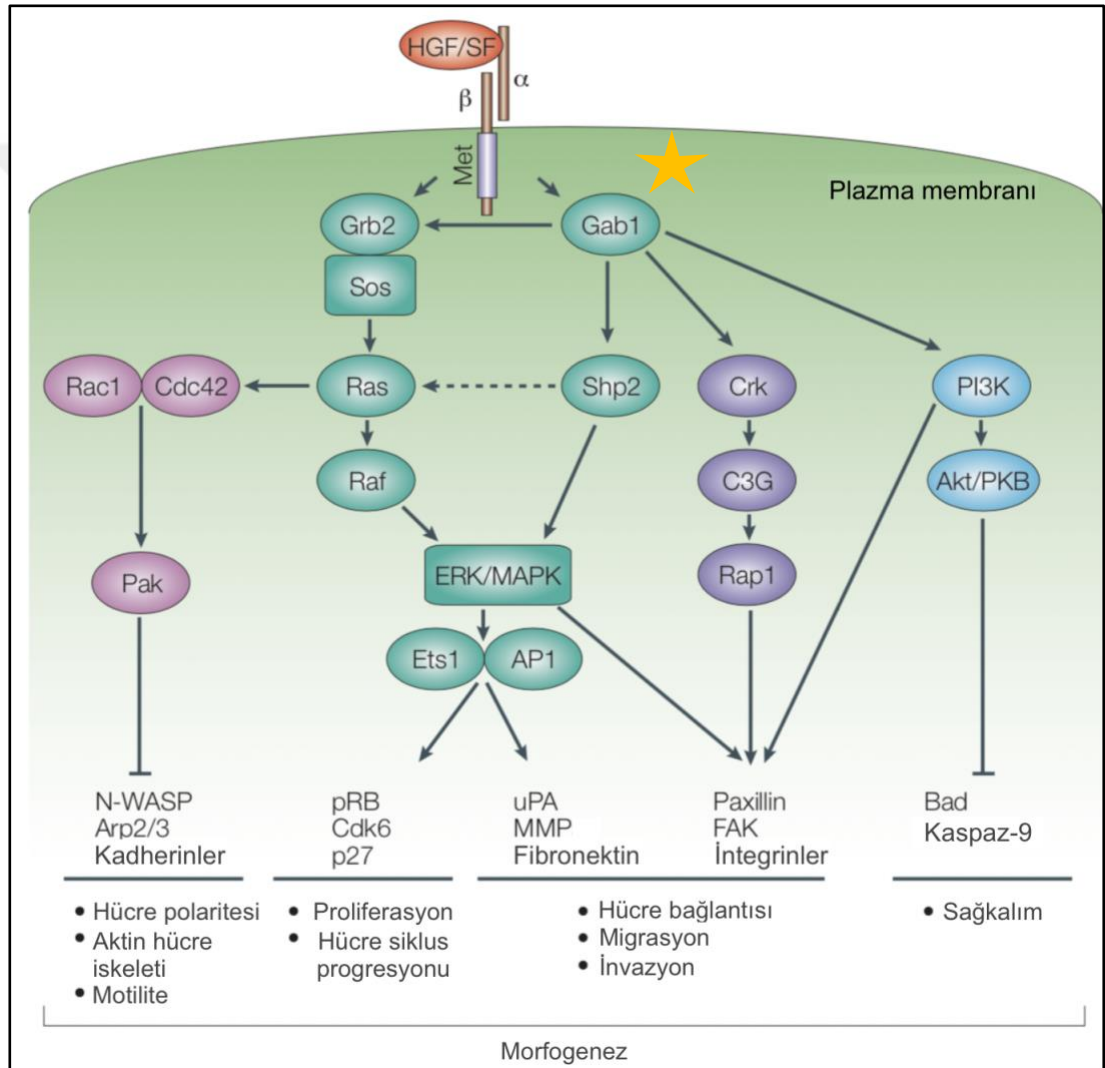


Şekil 4. MET Reseptör Tirozin Kinaz yapısı

2.2.1.3. Hücresel Yanıtlar

MET' in aktifleştirilmesi, Gab-1, Grb2, Shc ve c-Cbl gibi adaptör proteinlerinin bağlanmasına ve fosforilasyonuna neden olur. Ardından fosfatidilinositol-3'kinaz (PI3K), PLC- γ , STAT, ERK 1/2 ve FAK gibi sinyal transdüsörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır (8).

MET ile Gab-1 etkileşimi, diğer anahtar adaptör ve sinyal proteinleri aracılığıyla yolak aktivasyonunda kritik bir rol oynar. Bu bağlantı, EGFR benzeri diğer RTK'lerden ziyade MET' e özgüdür. Gab-1 bağlantısı sonrası sinyal iletiminde MET ilişkili hücre motilitesi, ayrışması, adezyonu ve invazyonunu düzenlenmesi ERK ve PI3K yollarına bağlıdır. PI3K, AKT/PKB yoluyla hücre sağkalımını, ERK üzerinden ise mitogenezi kontrol eder. Ayrıca hücre göçü ve invazyonunun Ras (Cdc42, Rac1 ve Pak yoluyla), Crk ailesi proteinleri ve c-src / fokal adezyon kinaz ile tanımlanmış farklı yollara ihtiyaç duyar (82). (Şekil 5)



Şekil 5. HGF/MET yolunun sinyal ve fonksiyonları

2.2.2. MET ve Onkogenezi

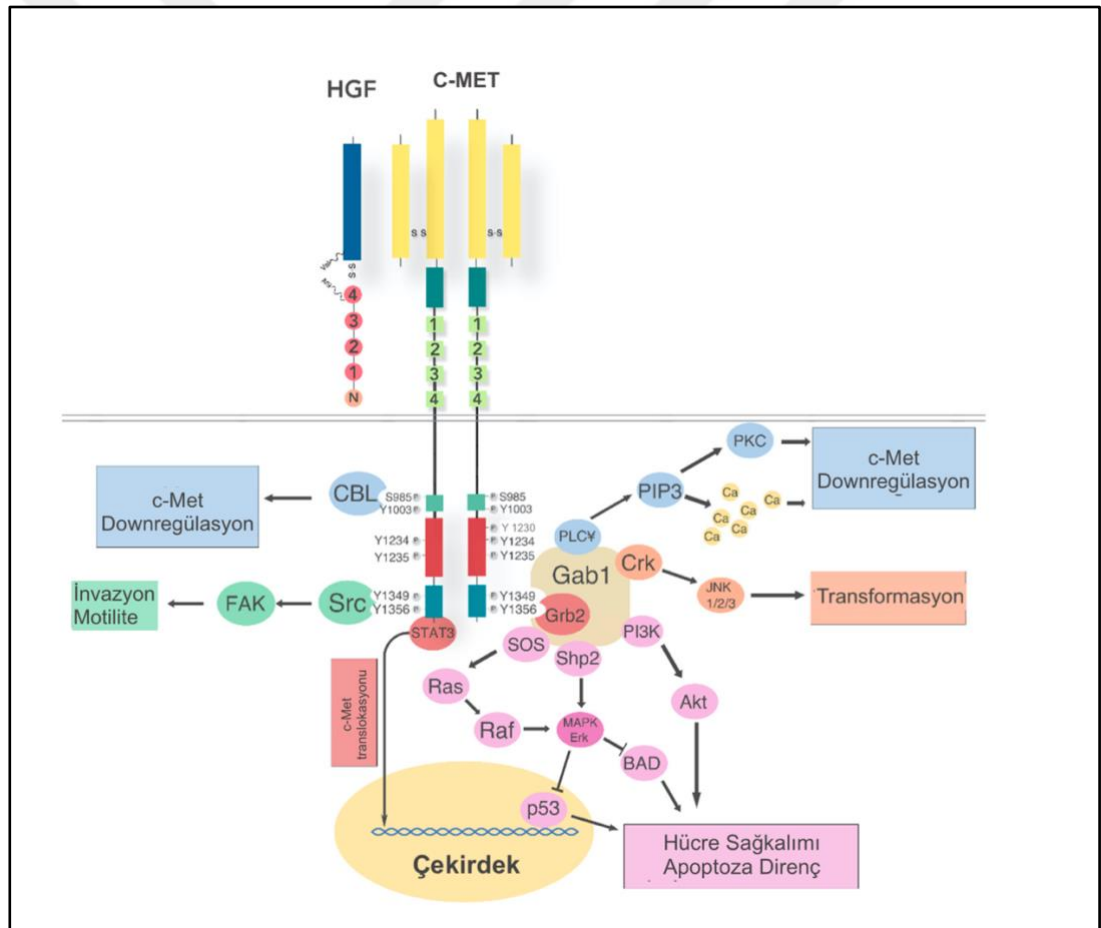
2.2.2.1. MET Sinyal Yolağı

HGF, reseptörüne bağlandığında, MET tirozin kinaz bölgesinin aktive edici halkası içinde bulunan Y1230 / 1234 / 1235 'i tirozin kalıntıları otofosforilasyonuna

neden olur. Bunun sonucunda MET' in iç kinaz aktivasyonu, aşağı yönlü sinyal iletimi molekülleri fosforile edilir.

Farklı fosforilasyon bölgeleri de tanımlanmıştır. Y1313 fosforile edildiğinde, hücre canlılığı ve hareketliliğini arttıran fosfatidilinositol-3'kinaz (PI3K)' ya bağlanır ve onu aktive eder. Juxtamembran alanında bulunan Y1003 bölgesi, c-CBL ile hareket eden MET sinyali için negatif bir düzenleme bölgesidir. Ek olarak, Y1365 fosforile edildiğinde hücre morfogenezini düzenler.

Y1349 ve Y1356 bölgeleri karboksi terminali kuyruğu içine yerleştirilmiştir ve fosforile edildiğinde çok yönlü bir sinyal-dönüştürücü bölge haline gelirler. SH2 (Src homolojisi-2), Src, Src kinaz, SHP2 fosfataz, SHC, Gab 1, Grb2, Crk / CRKL, STAT3 (sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü-3) ve PLC- γ (fosfolipaz C- γ) gibi birçok sinyal ve adaptör proteini burada toplanır ve fosforile edilir (81). (Şekil 6)



Şekil 6. MET' in iç kinaz aktivasyonunda fosforilasyon bölgeleri ve ilişkili sinyal iletim yolları

2.2.2.2. Düzensiz MET Sinyal Yolağı ve Karsinogenez

Artan HGF/MET aktivitesi, farklı sinyal kaskadlarını tetikleyerek tümör hücreleri üzerinde çeşitli etkilere neden olur. HGF/MET aktivasyonuna en yaygın hücrel yanıt proliferasyon, hayatta kalma, saçılma, migrasyon ve invazyondaki artıştır (25). Bu nedenle motojen, mitojen ve morfogjen olarak adlandırılmıştır (80).

HGF' nin kanser hücreleri üzerindeki en derin biyolojik etkilerinden biri motilite indüksiyonudur. HGF ile indüklenen hücre motilitesi ve migrasyonunda; rho/rac sinyal ileti yolağı, PI3K yolağı, FAK-paksillin yolağı, Ezrin/radiksin/moesin (ERM) ailesinin üyeleri, RanBPM gibi pek çok sinyal ileti yolağının ve molekülünün ilişkisi gösterilmiştir (80).

HGF'nin hücre büyümesi ve proliferasyonu etkisine aracılık eden moleküller ve yolaklar; GATA-4, MEK/ERK yolağı, PI3 kinaz yolağı, STAT-3 olarak bildirilmektedir. HGF'nin indüklediği morfogenezde Pax3, STAT-3 ve PLC γ 'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir (80).

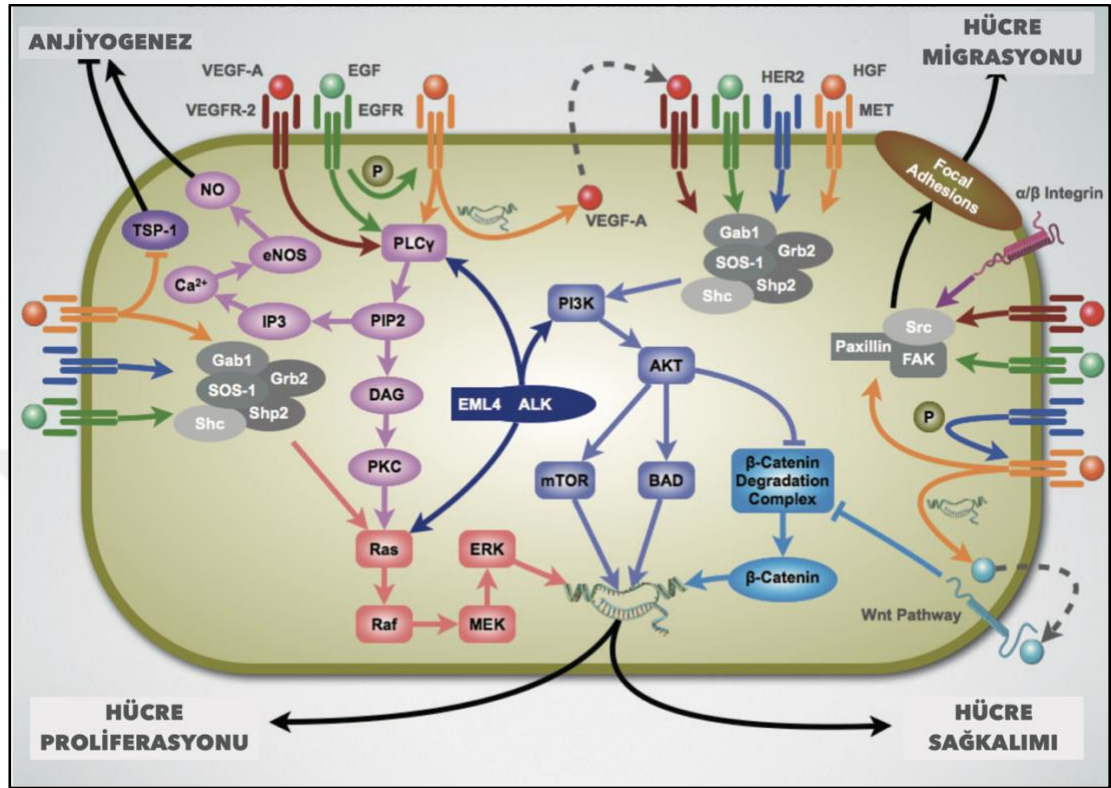
HGF/MET aktivasyonu, hücreleri düzenleyen apoptozdan koruyan PI3K-AKT sinyalini düzenleyerek sağkalım sinyallerini kanser hücrelerine iletir. HGF' nin aktivatör protein-1 (AP-1)'e bağımlı COX-2 'yi aktive ederek de apoptozisi inhibe ettiği bilinmektedir.

Yüksek HGF/MET sinyali, bir dizi kanser hücresinde güçlü hücre göçünü ve invazyon yeteneğini indükler ve in vivo olarak metastaza teşvik eder (80).

HGF, tümör ve vasküler düz kas hücrelerinde IL-8, VEGF ve uPA gibi pro-anjiyogenez faktörlerinin ve endotel hücrelerinde VEGFR2'nin ekspresyonunu uyarabilir. Böylece, HGF/MET sinyalleri, tümörde artmış anjiyojenik cevabı düzenleyebilir (25). HGF aynı zamanda negatif bir anjiyogenez düzenleyicisi olan Trombospondin 1'i inhibe eder. MET ve VEGFR yolakları fiziksel olarak birbirlerini etkilemezler (birleşmez veya fosforile etmez), ancak ERK-MAPK, AKT ve fokal adezyon kinazı (FAK) gibi ortak sinyal ara maddelerini sinerjistik olarak aktive ederler. Hipoksi, transkripsiyon faktörü HIF1a' nın ekspresyonunu indükler ve HIF1a da bağımsız MET ekspresyonuna neden olur (84).

MET sinyallerinin ayrıca hücrelerin etrafındaki matriksi bozduğu veya yeniden şekillendirdiği bilinmektedir. Ayrıca ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA), plazminojen aktivatörü inhibitörü-1 (PAI-1) ve matriks metalloproteinazlarını (MMP' ler) kullanarak doku sınırlarından geçer ve invazyona yol açar. Uzak metastaz, MET tarafından Grb2, PI3K veya Shc yollarının aktivasyonu ile desteklenir(81).

Tüm bu bulgularla, yüksek HGF/MET sinyalleri, tümör oluşumunun sadece ilk basamağında değil, aynı zamanda hastalığın yayılmasının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar. (Şekil 7)



Şekil 7. HGF/MET sinyallemesinde diğer yollarla fonksiyonel çapraz konuşma

2.2.2.3. Kanserde HGF ve MET genetik değişiklikleri

MET, yaygın olarak fibroblastlar ve endotelial hücreler de dahil olmak üzere çevre stromada HGF' nin regüle edilmiş ekspresyonu ve hücre dışı proteazların proteolitik aktivasyonu ile, HGF tarafından parakrin bir şekilde aktive edilebilir.

Ligand bağımlı mekanizmalara ek olarak, MET aktivasyonu, aşağıdakileri içeren alternatif mekanizmalarla da gerçekleşebilir:

- (1) Selektif MET mutasyonları,
- (2) Overekspresyon ilişkili ligand yokluğunda dimerizasyon,
- (3) MET' in kısılması,
- (4) Gen translokasyonu / yeniden düzenlenmesi,
- (5) Hipoksik koşullar altında yolak aktivasyonu,
- (6) EGFR ve RON dahil diğer reseptörler tarafından transaktivasyon,
- (7) Renal karsinomlarda VHL gibi negatif regülatörlerin kaybı.

Bu mekanizmalar, aktivasyon için MET' in HGF' ye bağımlılığını kısmen veya tamamen ortadan kaldırabilir (82).

HGF/MET yolu, insan kanserlerinde en sık disregüle olan yollardan biridir. Aberran HGF/MET sinyalleri, mesane, meme, servikal, kolorektal, endometrial, özofageal, gastrik, baş ve boyun, böbrek, karaciğer, akciğer, nazofarengeal, over, pankreas, prostat ve tiroid kanserlerinin yanı sıra, kolanjiyokarsinom, osteosarkom, rabdomyosarkom, sinovyal sarkom, Kaposi sarkomu, leiomyosarkom ve MFH / fibrosarkom dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde bildirilmiştir. Ayrıca miyeloid lösemi, erişkin T hücreli lösemi, kronik miyeloid lösemi, lenfomalar ve multipl myelom gibi hematolojik malignitelerde ve Wilms tümörü, glioblastom ve astrositomlar gibi diğer tümörlerde de anormal HGF ve / veya MET ekspresyonu bildirilmiştir. Yüksek HGF seviyeleri ve MET' in aşırı ekspresyonu, genellikle daha agresif hastalıklar, artmış tümör metastaz riski ve kısalmış hasta sağkalımı gibi kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir. Ayrıca, tümörlerde yüksek HGF ve / veya MET protein seviyeleri kemoterapi ve radyoterapiye dirence neden olur (25).

Anormal HGF ve MET ekspresyonuna ek olarak, MET sinyal yolağı, MET mutasyonları (germ-line ve somatik), gen amplifikasyonu ve gen yeniden düzenlemesi gibi genetik değişikliklerde de aktive edilebilir. Mutasyonların bazıları, artan kinaz aktivitesinden dolayı onkojenik potansiyele sahiptir. MET mutasyonları, kalıtsal papiller renal hücreli karsinoma (PRCC) sahip olan tüm bireylerde ve sporadik PRCC' lerin bir kısmında (%13) bulunur. Ayrıca gastrik, baş ve boyun, karaciğer, over, küçük hücreli dışı akciğer ve tiroid kanserleri dahil olmak üzere diğer insan kanserlerinde ve bu kanserlerin bazılarının metastazlarında somatik MET mutasyonları tespit edilmiştir. Mutasyonlar PRCC olgularında tipik olarak kinaz bölgesi ile sınırlı iken diğer malignitelerde sıklıkla reseptörün diğer bölgelerinde, örneğin juxtamembran bölgesinde bulunur. Juxtamembran bölgesi ligand bağımlı MET bağlanmasını düzenler: Y1003, HGF bağlanmasına cevap olarak fosforile edilir ve c-Cbl' yi kuvvetlendirir, MET ubiquitinizasyonu ve degradasyonuna yol açar. Ekzon 14 kaybına neden olan MET juxtamembran bölgesi mutasyonlarında, Y1003' ün kaybı hücre yüzeyinde MET birikimine ve onkojenik potansiyelin ortaya çıkmasına neden olan kalıcı HGF uyarı sinyalleriyle sonuçlanır (85). Mutasyona ek olarak, MET geni bazı beyin, kolorektal, gastrik, akciğer ve mide kanserli hastalarda amplifiye olur ve genellikle progresyonla ilişkilidir (25).

2.2.3. MET ve Akciğer Kanseri

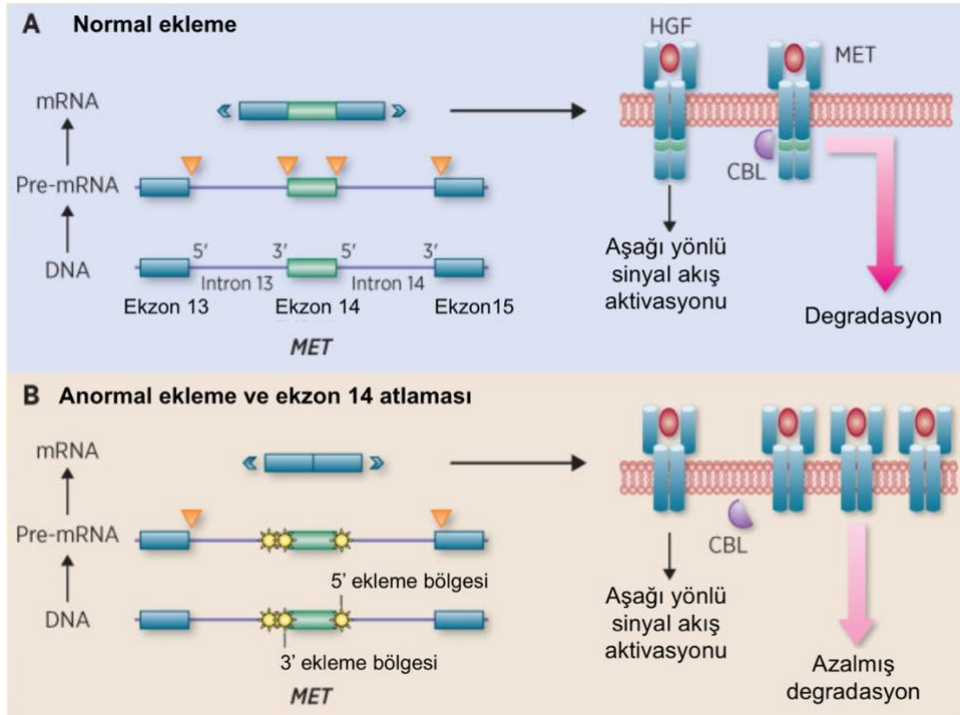
Akciğer kanserlerinde MET yolundaki düzensizlikler çeşitli yollarla gerçekleşir: gen mutasyonu, amplifikasyon, yeniden düzenlenme ve aşırı protein ekspresyonu (86).

HGF ve MET normal akciğerde eksprese edilmelerine rağmen, tümör dokusunda ekspresyonları artar. MET, fosforile edilmiş MET ve HGF, KHDAK' de hem de KHK' de yüksek oranda eksprese edilir. MET ve p-MET aşırı ekspresyonu, sırasıyla KHK' lerin %54 ve %43' ünde görülür ve kötü prognostik faktördür (84).

KHDAK olgularında genomik amplifikasyon MET reseptör bozulmasına neden olarak ligand bağımsız MET aktivasyonuna neden olur (87). Yüksek MET gen kopya sayısı ve amplifikasyonu KHDAK olgularında sırasıyla %10,6- 20,8 ve %2,1- 4,4 oranında bildirilmekte ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (39,88–91). De nova MET amplifikasyonu, diğer onkojenik mutasyonların yokluğunda akciğer adenokarsinomlarında %1 gibi düşük oranda saptanmaktadır ve bu popülasyonda Crizotinib ile parsiyel yanıtlar bildirilmiştir. MET amplifikasyonu aynı zamanda EGFR mutant akciğer kanserlerinde %20 oranında EGFR inhibitörlerine dirençten sorumlu tutulmaktadır (87).

İlk kez 1994'te, MET reseptörünün 47 amino asit jukstamembran bölgesinin silinmesi ile alternatif olarak eklenmiş bir MET RTK bildirilmiştir ve bunu takiben, bu jukstamembran bölgesinde 1001 konumunda bir tirozin kalıntısının mutasyonunun kısmi bir fonksiyon kazanımına yol açtığı gösterilmiştir (92,93). 2001 yılında, Peschard ve ark., E3 ubiquitin-protein ligaz, c-CBL'nin bağlanma alanındaki tirozin kalıntısının 1003 mutasyonunun, c-CBL'nin MET' e bağlanmasını ortadan kaldırarak c-CBL aracılı bozulmaya yol açtığını ve MET onkojenik aktivitesine sebep olduğunu bildirilmişlerdir (94). Daha sonra, MET ekzon 14 ek bölgelerindeki mutasyonlar Ma ve ark. tarafından 2003'te KHK ve 2005' te KHDAK' de rapor edilmiştir (95,96). Kong-Beltran ve ark. tarafından 2006 yılında MET ekzon 14 etrafındaki 5 ve 3 nolu ek yerlerinde hem tek nükleotid substitüsyonlarını hem de küçük delesyonları belirlenmiş ve bu mutasyonların, MET ekzon 14' de atlamalarla (atlama mutasyon) sonuçlandığı gösterilmiştir. Ekzon 14-eklenmiş protein, c-CBL E3 ligaz bağlanmasını ortadan kaldırarak, ubiquitinasyonun azalmasına neden olur ve MET protein seviyelerinde nispi bir artışa yol açar. Ek olarak, MET Y1003 mutasyonunun azalmış ubiquitinasyon ve MET proteininin stabilitesinin artmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir.

Normalde HGF varlığında, multipl intraselüler tirozin rezidülerinin MET dimerizasyonu RAS / MAPK ve PI3K-AKT gibi birçok yolağın aktivasyonunu tetikler. MET' e ligand bağlanması endozomlarda reseptör internalizasyonuna neden olur ve hücre içi MET sinyali oluşur. Endositozdan sonra MET reseptörleri lizozomlar içinde degrade olur ve hücre yüzeyine geri dönüştürülür. MET, EGFR ve HER2 gibi diğer tirozin kinaz reseptörleri E3 ubiquitin ligaz, c-Cbl ile parçalanma için işaretlenmiştir. Kısmen MET ekzon 14 tarafından kodlanan MET juxtamembrane alanının tirozin 1003 (Y1003) rezidüsünde c-Cbl için doğrudan bir bağlanma bölgesi mevcuttur. Bu rezidüde fenilalanin mutasyonu (Y1003F) MET in ubiquitinizasyonunu bozar, MET protein stabilitesini artırır, in vitro ligand bağımsız MET aktivasyonuna yol açar ve in vivo olarak tümörojendir. KHDAK' de, MET ekzon 14 etrafında farklı nokta mutasyonları, delesyonları tanımlanmış olup bunlar işlev kazanımı (gain-of-function) fenotipinde onkojenik mutasyonlardır. Bu mutasyonların çoğu, MET intron 13' ün birleştirme alıcısı bölgesi veya intron 14' ün bir ekleme bölgesi ile örtüşürken, diğerleri ekzon 14 kodlama dizisinin kendisinde veya tamamen intronik diziler içinde meydana gelir. Bugüne kadar tarif edilen MET ekzon 14 atlama mutasyonlarının neredeyse tamamı, mRNA öncesi ekleme sırasında MET ekzon 14' ün atlanmasına neden olur ve MET jukstamembran alanının 47-amino asiti silinmesiyle Y1003 C-Cbl bağlama alanı kaybolur (87). (Şekil 8)



Şekil 8. Anormal ekleme ile MET ekzon 14 atlaması ve sonuçları (Copyright © American Association for Cancer Research)

Vaka serileri KHDAK' de MET ekzon 14 değişikliklerinin görölme sıklığını % 2-4 civarında bildirmiştir (98–100). 2015' in sonlarından bu yana, MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan KHDAK hastalarını karakterize eden raporlar literatürde hızla art arda yayınlanmıştır (101).

MET ekzon 14 değişiklikleri, MET amplifikasyon ve MET nokta mutasyonları arasındaki örtüşme ile ilgili mevcut veriler çok olmamakla birlikte, MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan KHDAK olgularının %15-21' inde eşzamanlı MET amplifikasyon bildirilmiştir ve MET Y1003X mutasyonları, KHDAK' deki MET ekzon 14 değişikliklerinin yaklaşık %2' sini oluşturmaktadır (101).

Vuong ve ark., 2018 yılında KHDAK' de MET ekzon 14 değişikliklerinin klinikopatolojik özelliklerle ilişkisini inceledikleri meta analizlerine 11 adet çalışmadan toplam 18.464 hastayı dahil etmişlerdir (35,40,63,102–111). Histolojiden bağımsız MET ekzon 14 atlama mutasyon oranı %3 olarak değerlendirilmiştir. Batı toplumlarında görölme oranı Asyalılara göre daha yüksektir. İleri yaşta (65-76 yaş) MET ekzon 14 atlama mutasyon sıklığı yüksek bulunmuştur. Histolojik alt tipler göz önüne alındığında MET ekzon 14 atlama mutasyon oranları AK' da %2, SHK' da %1, ASK' da %6 ve PSK' da %13 bulunmuştur (63).

2.2.4. MET ve Sarkomatoid Karsinom

Fallet V. ve ark. ile Lococo ve ark. PSK olgularında, 26 adet KHDAK ilişkili geni YND yöntemini kullanarak analiz etmiştir. PSK olgularının %69-80' inde en az 1 mutasyon saptanmış ve diğer KHDAK' lere göre daha yüksek mutasyon oranları olduğu gösterilmiştir. Lococo ve ark., PSK' da TP53 gen mutasyonunu %55 oranında saptamışlardır. Ancak bu mutasyonun PSK için driver mutasyon olmadığını düşünmüşlerdir (65,66).

Literatürde ilk kez, Tong ve ark. tarafından, MET genetik değişikliklerinin KHDAK' nin değişik alt tipleri arasındaki farklılıklarını araştırılmış MET ekzon 14 atlama mutasyonunun PSK' da daha sık (%31,8) olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda PSK' da %13,6 gibi bir oranda yüksek MET amplifikasyonu olduğu bulunmuştur (40). Literatürde PSK' da % 3- 31.8 arasında değişen yüksek oranlarda MET ekzon 14 atlama mutasyonu bildirilmiştir (67,103).

Liu ve ark. 2015 de 36 vakanın 8' inde (%22) MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptamıştır. Bu tip MET mutasyonun PSK' da driver mutasyon olabileceği ve hedefe yönelik tedavide potansiyelinin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca cohortlarında 74

yaşındaki evre IV PSK tanıli kadın hastada MET ekzon 14 atlama mutasyonu olduğu saptanmıştır. Bu nedenle hastaya günde 2 kez oral 250 mg Crizotinib verilmiştir. Hızlı ve anlamlı dramatik bir klinik gidiş gözlenmiş ve bu sonrasında tomografiyle radyolojik olarak da parsiyel yanıt şeklinde doğrulanmıştır (36).

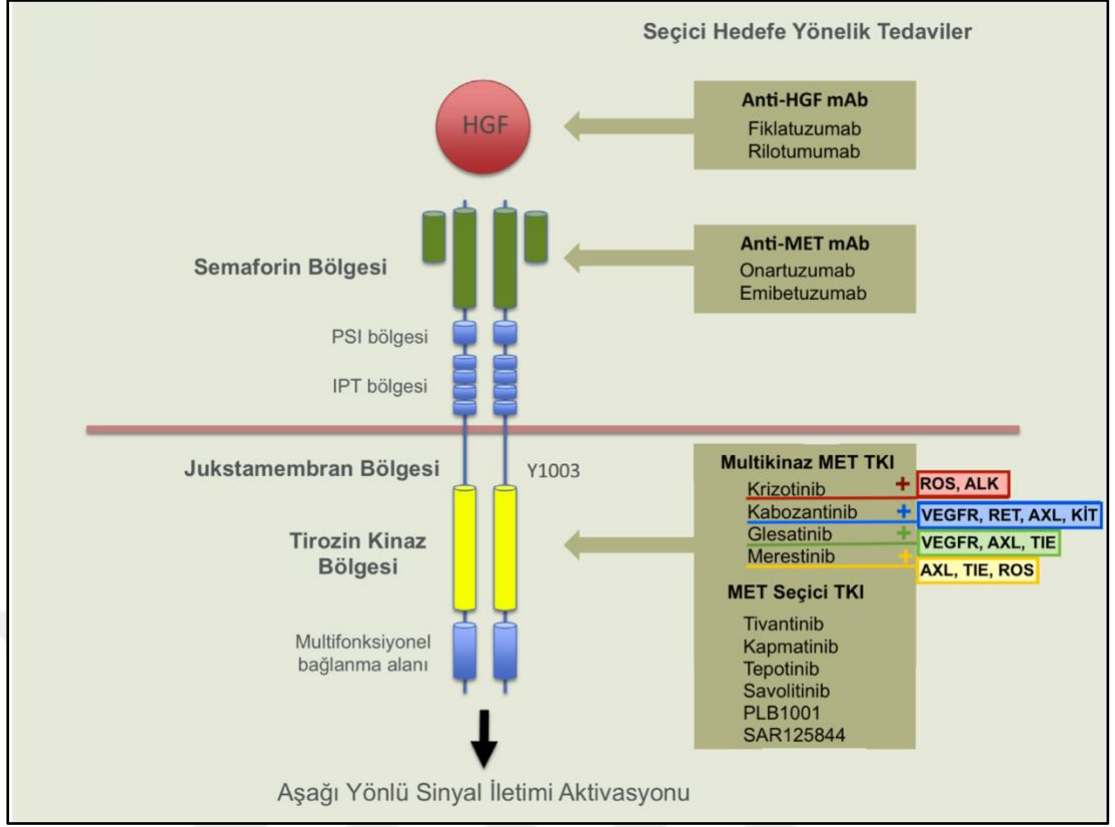
Literatürde PSK' ler için bildirilen MET ekzon 14 atlama mutasyonu ve MET amplifikasyonu oranları sırasıyla %3- 31,8 ve %8,4- 13,6 arasında değişmektedir. (40,103,108,112)

2.2.5. Anti-MET Tedaviler

Akciğer kanseri ve diğer kanserlerde düzensiz HGF/MET sinyalini ortadan kaldırmak için geliştirilmiş 3 terapötik strateji vardır:

1. Anti- HGF monoklonal antikolarlar
2. Anti-MET monoklonal antikolarlar
3. Anti -MET Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ)

TKİ' ler ayrıca multikinaz ve seçici MET inhibitörlerine ayrılır. Multikinaz MET-inhibitörlerinin örnekleri arasında Krizotinib, Kabozantinib, MGCD265, AMG208, Altiratinib ve Golvatinib bulunur. Seçici MET inhibitörleri arasında ATP-rekabetçi ajanlar; Kapmatinib ve Tepotinib (MSC2156119J) ve ATP-rekabetçi olmayan ajan Tivantinib bulunur. Monoklonal antikor tedavisinde ise, anti-MET antikoları (örn. Onartuzumab ve Emibetuzumab [LY2875358]) ve anti-HGF antikoları (örn. Fiklatuzumab [AV-299] ve Rilotumumab [AMG 102]) mevcuttur (86,113). (Şekil 9)



Şekil 9. Anti-MET Tedaviler

Akciğer kanseri ile ilgili olarak, klinik öncesi veriler akciğer adenokarsinom hücre dizilerinde EGFR ve MET aktivasyonu arasında geniş bir örtüşme olduğu gösterilmiştir (114). Bu korelasyon göz önüne alındığında, EGFR aktivasyon mutasyonları olmayan bir KHDAK popülasyonu için EGFR ve MET' i aynı anda bloke eden kombine yaklaşımların geliştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmüştür. Faz II klinik çalışması, yüksek MET ekspresyonu olan ileri evre KHDAK' li hastalarda tek kollu anti-MET monoklonal antikor Onartuzumab' ın aktivitesini göstermiştir (115). KHDAK' li hastalarda MET inhibitörlerinin etkisini araştıran ilk faz III klinik çalışmalar hayal kırıklığı yaratmıştır (116–119). Bununla birlikte, bu çalışmalar MET overekspresyonu ve/veya amplifikasyonu sergileyen hastaları hedeflerken, MET ekzon 14 atlama mutasyonları olan hastalar dahil edildiğinde Crizotinib' in genel olarak tolere edilebilir ve yönetilebilir bir toksisite profili ile ilişkili klinik olarak anlamlı bir antitümör aktivitesi olduğu görülmüştür (120,121).

MET ekzon 14 atlama mutasyonu varlığında, hastaların MET inhibitör tedavisine yanıtta prediktif değerinin yüksek olduğu düşünülmektedir (106). Bu bağlamda, MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan hastaların, Crizotinib gibi MET inhibitörlerine duyarlı olduğu, ancak MET proteininin overekspresyonu veya gen

amplifikasyonu gösteren hastaların hedeflenen tedaviye kalıcı bir yanıt vermediği sonucuna varılmıştır. Bununla MET inhibitörleri ile yapılan çalışmalardaki hayal kırıklıkları açıklanmaya çalışılmıştır (101,122). MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan hastaların MET inhibitörlerine duyarlılığı, literatürde dramatik yanıtlar veren çeşitli vaka raporlarıyla sonuçlanmıştır (123,124). Bu konuda klinik çalışmalar halen devam etmektedir (101,116).

2.2.6. MET Genetik Değişikliklerinde Kullanılan Tanısal Yöntemler

2.2.6.1. İmmünohistokimya

İmmünohistokimya (IHK), biyolojik dokulardaki antijenlere özel olarak bağlanan antikörlerin prensibini kullanarak bir doku kesitindeki hücrelerdeki antijenleri veya haptenleri tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Antikor-antijen bağlanması farklı şekillerde görselleştirilebilir. Horseradish peroksidaz (HRP) veya alkalın fosfataz (AP) gibi enzimler, renk üreten bir reaksiyonu katalize etmek için yaygın olarak kullanılır.

Literatürde MET overekspresyonunu değerlendirmek için kullanılan, farklı klonlarda immünohistokimya antikörleri vardır ve değerlendirmede farklı skorlama sistemlerinden yararlanılmıştır (Tablo 4). Son yıllardaki çalışmalarda sıklıkla kullanılan, anti-total MET antikoru ve SP44 klonudur (125).

Tablo 4. Cerrahi rezeke edilen KHDAK olgularında İHK değerlendirmeleri ve sonuçları.

Çalışma	Histoloji	İHK + Cut-off Değeri	MET İHK hasta N, (%)
Sun (127)	KHDAK	MetMab Skorlama	36 (59.0)
Dziadziuszko (91)	KHDAK	>60 (ortanca, 0-400 arasında)	83 (44.0)
		METMab skorlama	44 (25.0)
Tsuta (128)	KHDAK	≥%10 boyanmış hücre	196 (22.2)
Park (129)	KHDAK	≥4 (0-12 aralığı)	52 (13.7)

Skorlama sistemlerinden en sık kullanılanlar; MetMab Skoru ve H-Skorlama yöntemleridir.

MetMAb Skorlamada MET ekspresyonu boyanma yoğunluğu ve boyanan hücre oranına göre skorlanır:

- 3+: Tümör hücrelerinin $\geq 50\%$ ' sinde kuvvetli pozitiflik
- 2+: Tümör hücrelerinin $\geq 50\%$ ' sinde orta derecede ya da daha fazla derecede pozitiflik ancak $< 50\%$ ' sinde kuvvetli pozitiflik
- 1+: Tümör hücrelerinin $\geq 50\%$ ' sinde zayıf ya da daha fazla derecede pozitiflik ancak $< 50\%$ ' sinde orta derecede ya da kuvvetli pozitiflik
- 0: Boyanma yok ya da tümör hücrelerinin $< 50\%$ ' sinde herhangi bir yoğunlukta boyanma

Orta yoğunlukta veya kuvvetli MET protein ekspresyonu gösteren tümörler (Skor 2+ veya skor 3+) İHK + olarak değerlendirilir. Skor 1+ veya skor 0 olgular İHK – kabul edilir (40,91).

H-Skorlamasında MET ekspresyonu, membranöz ve / veya sitoplazmik boyamaya dayalı olarak değerlendirilir. 0 (boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta) veya 3 (kuvvetli) yoğunluk puanları ile birlikte boyanma oranı verilir. H skorları, aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$(1 \times \text{zayıf boyalı hücrelerin yüzdesi}) + (2 \times \text{orta derecede boyalı hücrelerin yüzdesi}) + (3 \times \text{kuvvetli boyalı hücrelerin yüzdesi})$.

Tümör hücrelerinin yüzdelerine (%0-100) ve boyanma yoğunluklarına (0-3) göre 0-300 arasındaki değer alan olgularda 150 ve üstündeki değerler pozitif kabul edilir (126).

2.2.6.2. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) belli DNA veya RNA alanlarının, üzerilerine bağlanabilen, floresan (ışık) gösterebilen probalar aracılığı ile görünebilir hale getirilmesi yöntemidir. Fikse edilmemiş taze örnekler kullanılabilir gibi, formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş örneklerde de çalışılabilir. Metafaz ya da interfaz evresindeki hücreler, uygun probalarla işaretlenerek değerlendirilir. Probların ışınması floresan mikroskopunda incelenir. Yüksek özgünlüğe sahip FISH problemleri kromozom üzerinde sentromerlere (sentromer sayım probu [centromere enumeration probe – CEP]), kromozomun bütününe ya da ilgilenilen gen bölgesine (lokusa özgü belirteç [locus specific identifier – LSI]) bağlanabilecek şekilde üretilebilir. Elde

edilen ışımının yeri ve sinyal sayısı ile translokasyon, amplifikasyon, delesyon durumları gözlemlenebilir.

FISH tekniğinin öne çıkan avantajı morfolojik değerlendirmeye de izin veriyor oluşudur. Karşıt boya olarak kullanılan DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) görüntüsü, incelenen materyalin morfolojik özelliklerinin seçilebilmesine olanak tanır. İncelenecek hücrelerde deterjan etkili Tween 20 ve NP-40 gibi solüsyonlar ve proteinaz K gibi proteazlar ile permeabilite sağlanır. DNA denatürasyonu için formamid ya da benzeri solüsyonlar kullanılır. Sonrasında uygulanan prob, DNA'da hedef bölgeye bağlanır. Çift iplikli ise, probun da denatürasyonu gereklidir. Prob uygulandıktan sonra yüksek sıcaklık ile hem DNA'daki hedef bölgenin hem de probun birlikte denatürasyonu sağlanır ve hibridizasyon olur. Problar kendilerine has belirlenen dalga boylarında ışımaya yaparlar ve bu ışımaya uygun filtreler altında değerlendirilir (130).

Değerlendirilecek hücre sayısı, vakaya göre değişmektedir. Sadece tümör dokusundan oluşan örneklerde, 40 hücre yeterli olabilirken, zeminde benign hücrelerin baskın olduğu, az sayıda tümör hücresi içeren örneklerde en az 500 hücrenin değerlendirilmesi gerekmektedir (130).

Delesyon ve amplifikasyon değerlendirmeleri için hedef gen alanı sayısı, aynı kromozomun sentromer bölgesi ile veya diğer kolda farklı bir gen bölgesi ile sayısal olarak kıyaslanır. Amplifikasyon ve delesyon değerlendirmelerinde laboratuvarların kendi çalışma koşullarına göre eşik değerler belirlemeleri önerilmektedir (130).

MET kopya sayısının artması iki farklı yolla olur: polizomi ve amplifikasyon. Tümör hücrelerinde, kromozomal duplikasyon gibi faktörlere sekonder artmış kromozom 7 kopyaları olduğunda yüksek polizomi ortaya çıkar. Gerçek amplifikasyon, kırılma-füzyon-köprü gibi mekanizmaları yoluyla fokal veya bölgesel gen çoğalması şeklinde gerçekleşir. MET aktivasyonunda polizomiden ziyade amplifikasyonun gerçek bir driver onkojen olduğu düşünülmektedir. Floresan in situ hibridizasyonun (FISH) kullanılmasıyla, MET' in, kromozom 7' nin sentromerik kısmına (CEP7) oranı, polizomi ile gerçek amplifikasyon arasında ayırım yapmak için kullanılabilir. Polizomide, MET' in her kopyasına karşılık gelen bir sentromer vardır ve kopya numarası arttıkça MET/CEP7 oranını korur. Gerçek MET

amplifikasyonunda, kopya numarası CEP7' de bir artış olmadan artar ve MET/CEP7 oranı artar. Gen kopya sayısına göre MET pozitifliğinin tanımlanması konusunda henüz bir fikir birliğine varılamamıştır. Kullanılan birçok skorlama sistemi vardır. Bunlardan bazıları PathVysion, Cappuzzo ve Colorado Üniversitesi Kanser Merkezi (UCCC)' dir. (131) (Tablo 5 ve Tablo 6)

Tablo 5. Cappuzzo FISH değerlendirme kriterleri

Cappuzzo skorlama sisteminde MET gen kopya sayısı (GKS) ve MET/CEP7 oranına göre olgular 6 kategoriye ayrılır:	
1-Dizomi: Hücrelerin >%90'ında ≤ 2 kopya	4- Düşük Polizomi: Hücrelerin%10-40'ında ≥ 4 kopya
2-Düşük Trizomi: * hücrelerin ≥ 40 'ında ≤ 2 kopya * hücrelerin %10-40'ında 3 kopya * hücrelerin <%10'unda ≥ 4 kopya	5-Yüksek polizomi: Hücrelerin ≥ 40 'ında ≥ 4 kopya
3-Yüksek trizomi: * hücrelerin ≥ 40 'ında ≤ 2 kopya * hücrelerin ≥ 40 'ında 3 kopya * hücrelerin <%10'unda ≥ 4 kopya	6-Gen Amplifikasyonu: * Sıkı MET gen kümelerinin varlığı * MET/CEP7 oranının ≥ 2 olması * Analiz edilen hücrelerin% ≥ 10 ' unda ≥ 15 kopya
Bu skorlama sisteminde dizomi, düşük trizomi, yüksek trizomi ve düşük polizomi FISH negatif; yüksek polizomi ve gen amplifikasyonu FISH pozitif kabul edilir	

Tablo 6. UCCC FISH değerlendirme kriterleri

FISH Pozitif olgular:	UCCC kriterleri MET gen kopya sayısı (GKS) ≥ 4 iken MET/CEP7 oranına göre amplifikasyon derecesi aynı zamanda şu şekilde de kategorize edilir:
1- Amplifikasyon: * MET/CEP7 oranı ≥ 2 * Tümörün $>10\%$ 'unda küçük gen kümesi (4-10 kopya) veya sayısız sıkı gen kümelenmesi * MET/CEP7 oranından bağımsız olarak tümörün $>10\%$ 'unda CEP7 den büyük MET sinyali (stroma ve reaktif hücrelerde MET sinyali CEP sinyalinden küçük olmalı) * MET/CEP7 oranından bağımsız olarak tümörün $>10\%$ 'unda >15 kopya sayısı	1-Negatif: MET/CEP7 < 1.8 2-Düşük amplifikasyon: $1.8 \leq \text{MET/CEP7} \leq 2.2$ 3-Orta derecede amplifikasyon: $2.2 < \text{MET/CEP7} < 5$ 4-Yüksek amplifikasyon: MET/CEP7 ≥ 5
2- Tümörün $>40\%$ 'ında ≥ 4 kopya sayısı	
FISH Negatif olgular:	
MET amplifikasyonu olmayan ve $<40\%$ 'ında ≥ 4 kopya sayısı	

Literatürde MET amplifikasyonu değerlendirirken farklı eşik değerleri kullanılmıştır. (Tablo 7). Örneğin Capuzzo skorlama sisteminde her tümör hücresinde ≥ 5 MET sinyali olan olguların FISH pozitif kabul edilirken, PathYsion ile MET/CEP7 oranı ≥ 2 olan olgular, UCCC kriterlerine göre MET gen kopya sayısı (GKS) ≥ 4 iken FISH pozitif kabul edilir (40,88,132,133). UCCC kriterleri MET gen kopya sayısı (GKS) ≥ 4 iken MET/CEP7 oranına göre amplifikasyon derecesi aynı zamanda şu şekilde de kategorize edilir:

- 1- Negatif: MET/CEP7 < 1.8
- 2- Düşük amplifikasyon: $1.8 \leq \text{MET/CEP7} \leq 2.2$
- 3- Orta derecede amplifikasyon: $2.2 < \text{MET/CEP7} < 5$
- 4- Yüksek amplifikasyon: MET/CEP7 ≥ 5 (89,110,134).

Tablo 7. Cerrahi rezeke edilen KHDAK olgularında FISH değerlendirmeleri ve Sonuçları

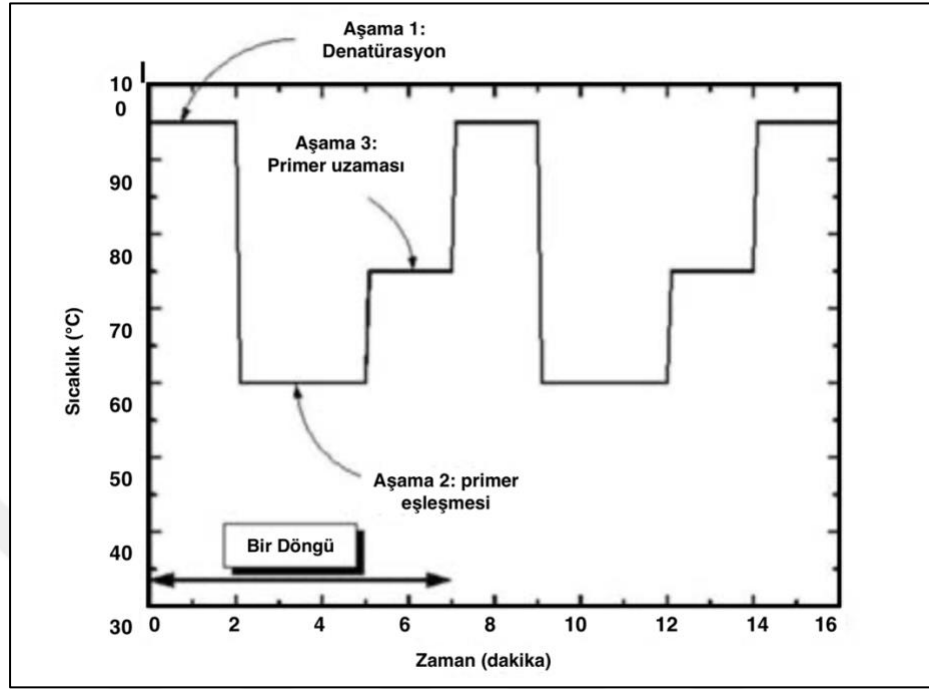
Çalışma	Histoloji	Teknik	Test Pozitiflik Kriteri	MET GKS+, N(%)
Schildhaus (135)	KHDAK	FISH	Yüksek, orta derecede, düşük seviye amplifikasyon	Toplam: 227 (33.0) Yüksek: 22 (3.2) Orta derecede: 43 (6.2) Düşük: 162 (23.4)
Kowalczyk (136)	KHDAK	RT-PCR	MET GKS \geq 3	28 (18.5)
Sun (127)	KHDAK	RT-PCR	MET GKS $>$ 3	11 (18.0)
Dziadziuszko (91)	KHDAK	SISH	MET GKS \geq 5	14 (10.0)
Park (129)	KHDAK	FISH	MET GKS \geq 5 UCCC kriterleri	42 (11.1) 27 (7.1)
Tanaka (132)	AK	FISH	MET GKS \geq 5 MET/CEP7 \geq 2	21 (15.0) 6 (4.0)
Tsuta (128)	KHDAK	BISH	UCCC Kriterleri	92 (10.9)
Chen (137)	KHDAK	FISH	MET GKS \geq 3	22 (10.6)
Go (89)	KHDAK	FISH	MET GKS \geq 5 UCCC Kriterleri	12 (6.7) 30 (16.7)
Onitsuka (138)	AK	RT-PCR	MET GKS $>$ 1.31	8 (4.4)
Cappuzzo (88)	KHDAK	FISH	MET GKS \geq 5	Total: 48 (11.1) Yüksek: 18 (4.1)
Okuda (90)	KHDAK	RT-PCR	MET GKS $>$ 3	12 (5.6)

2.2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir (139).

Metot basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR; 94 °C-98 °C

aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37 °C-65 °C aralığında gerçekleştirilen primer eşleşmesi, 72 °C’de gerçekleştirilen primer uzama aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. (Şekil 10) (140).



Şekil 10. PCR sıcaklığı değişim profili

PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkıyı Amerika Yellowstone Doğal Parkında yaklaşık 85°C sıcaklıktaki kaynak sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen Taq Polimeraz enziminin bulunması yapmıştır. Çünkü bu enzim yüksek sıcaklıklarda dahi dayanabilen tek enzimdir. Dr.Kary B. Mullis 1980’li yıllarda yaptığı PCR çalışmaları ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel Ödülü almıştır (141,142).

Gen çoğaltılması dahil PCR’nin birçok uygulaması için kalıp DNA’yı tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır.

PCR, yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında, kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocyclers) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, gerçek zamanlı(real-time) PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. “Real-time” PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır (140,143).

DNA dizilemesi, bir DNA molekülündeki nükleotit bazlarının (adenin, guanin, sitozin ve timin) sırasının belirlenmesidir. İlk DNA dizileri 1970'lerin başlarında Walter Gilbert ve Frederick Sanger tarafından iki-boyutlu kromatografiye dayanan zahmetli yöntemlerle elde edilmiştir ve 1980 yılında Kimya alanında Nobel ödülünü almışlardır (143–145). Otomatik analizle çalışan boya-tabanlı dizileme yöntemlerinin gelişimiyle DNA dizilemesi çok daha kolaylaşmıştır.

“Pyrosekans”, sentezleme ile dizileme ilkesine dayanan bir DNA dizileme metodudur (DNA'da nükleotidlerin sırasını belirleme). Sanger dizilemeden farklıdır, çünkü dideoksinükleotitlerle zincir sonlandırması yerine, nükleotid birleşmesinde pirofosfat salınımının saptanmasına dayanır. Bir defada tamamlayıcı şeridi, bir defada bir baz çifti sentezleyerek ve her adımda hangi tablonun eklendiğini tespit ederek tek bir DNA zincirinin dizilenmesine izin verir. Şablon DNA hareketsizdir ve A, C, G ve T nükleotidlerinin çözeltileri sırayla eklenir ve reaksiyondan çıkarılır. Işık, yalnızca nükleotid çözümü şablonun eşlenmemiş ilk tabanını tamamladığında üretilir (140,143).

Yeni nesil dizileme (YND) tekniği son zamanlarda gündeme gelmiş, DNA dizi analizinde daha hızlı, verimli ve güvenilir bir tekniktir. Yeni nesil dizilemeler ile birinci nesil Sanger dizilemeler arasındaki temel fark her reaksiyon için kapiller başına bir amplifiye DNA segmentinden sinyal üretmek yerine, klonlamayla elde edilen amplifiye DNA dizilerini aynı anda milyonlarcasını paralel olarak okumaya olanak sağlayabilmesidir. İlk insan referans genomunun floresan Sanger dizileme kullanılarak toplanması, yaklaşık 13 yıl sürmüş ve yaklaşık 3 milyar ABD dolara mal olmuştur (146). Bugün, YND teknolojilerini kullanarak, aynı veriler çok daha az maliyetle 2 haftadan daha kısa bir sürede saptanabilmektedir. Genom araştırmasında YND çoğunlukla konvansiyonel Sanger diziliminin ve Real-time dizi analizinin yerini almasına rağmen, henüz rutin klinik uygulamaya dönüştürülmemiştir (140,143).

2.2.6.4. Yöntemlerin Karşılaştırılması

Klinik araştırmalarda hedefe yönelik tedavi seçiminde hangi vaka grubunun aday olduğunu belirlemek için çeşitli yöntemlerle MET genetik değişiklikleri değerlendirilmiştir. MET amplifikasyonu, MET overekspresyonuna kıyasla daha güvenilir bir biyobelirteç olarak görülmektedir. Amplifikasyonu saptamak için FISH ve SISH yöntemleri kullanılmaktadır. MET ekzon 14 atlama mutasyonları son yıllarda gündeme gelmiştir ve sağlam bir terapötik etkiye sahip güçlü bir onkojenik uyaran

olarak görülmektedir. Ekzon 14 atlama mutasyonunu saptamak için Sanger dizileme, Pyrosekanslama, PCR, RNA in situ hibridizasyon (RISH) ve YND gibi yöntemler kullanılmaktadır.

İmmünohistokimyasal yöntem daha kolay ulaşılabilir ve daha düşük maliyetli bir yöntemdir. MET amplifikasyonu ve ekzon 14 atlama mutasyonu saptanmasında kullanılan diğer prediktif ve prognostik testler kolay erişilebilir değildir. FISH pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. YND, yeterli tümör dokusu ve yüksek kaliteli tümör DNA'sı veya RNA'sı gerektirir. Günümüzde MET ekzon 14 atlama mutasyonunu saptamada altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir.

MET overekspresyonunun güvenilir bir biyobelirteç olarak kullanılması halen tartışmalıdır. MET ekzon 14 atlama mutasyonlarının tespitinde immünohistokimyanın yararı şimdiye kadar kanıtlanmamıştır. MET antikorları MET ekzon 14 atlama mutasyonu için spesifik değildir; MET overekspresyonunu tespit ederler. Bunun artmış gen kopya sayısı, gen amplifikasyonu, MET ekzon 14 atlama mutasyonu gibi çok sayıda nedeni olabilir. Ek olarak, immünohistokimya lamalarının skorlanmasında gözlemciler arasında uyumsuzluklar bildirilmiştir (122). Bu konuda MET amplifikasyon ve ekzon 14 atlama mutasyonu ile korelasyonunu araştıran çalışmalar mevcuttur (147).

Literatürde MET genetik değişiklikleri analizinde immünohistokimyasal yöntemler, SISH, FISH, RISH, PCR ve YNS gibi yöntemler karşılaştırılmıştır (37–40).

FISH MET amplifikasyonu tespitinde altın standart olarak kabul edildiğinde, İHK duyarlılığı %50, özgüllüğü %83, pozitif prediktif değeri %21.4 ve negatif prediktif değeri %94.7 bulunmuştur. MET ekzon 14 atlama mutasyonları için İHK duyarlılığı %20, özgüllüğü %83, pozitif prediktif değeri %7 ve negatif prediktif değeri %94 olarak bulunmuştur (37). İHK ve MET moleküler değişiklikleri arasındaki korelasyon ile ilgili güncel veriler uyumsuzdur. Watermann ve ark. 214 KHDAK örneğinde MET İHK ve FISH arasında zayıf bir korelasyon saptamıştır (41). Casadevall ve ark. SHK olmayan KHDAK vakalarından oluşan kohortunda İHK ve FISH arasında bir ilişki gösterememiştir (38). Bu çalışmaların aksine, Park ve ark. 316 AK olgusundan oluşan büyük bir seride Literatürde ilk kez MET gen kopya sayısı ile İHK skoru arasında güçlü korelasyon bildirilmiştir. (39). Tong ve ark. ise, 687 adet KHDAK olgusunda, MET İHK'nın yüksek amplifikasyon ve polizomi saptamada sensitivitesi %100, negatif prediktif değeri %100 bulunmuştur (40). Yine son yıllarda

yapılan bazı çalışmalarda MET ekzon 14 atlama mutasyonunu saptamak için kombine yöntemler (High Resolution Melting (HRM) + MassARRAY) kullanılmış ve YND ile karşılaştırılmıştır. YND yöntemlerinin HRM + MassARRAY ile teşhis edilemeyen ekzon 14 atlama mutasyonlarını saptadığı bulunmuştur (37).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Olguların Seçilmesi

1 Ocak 2000 ve 31 Aralık 2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve 2011- 2018 yılları arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı bilgisayar ortamı arşiv kayıtlarında yer alan PSK olguları gözden geçirildi. Aralarından 30' u Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi bölümünde opere edilen, 1' i bronkoskopik girişim uygulanan, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı' nda tanı alan 31 PSK olgusu ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında tanı alan opere edilmiş 24 PSK olgusu yeterli tümör örneği içermesine ve arşivden blokların ulaşılabilirliğine bakılarak çalışmaya dahil edildi.

Etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu' nca verilmiştir.

Çalışma hastalarına ait arşiv lamaları tekrar gözden geçirilerek patoloji raporunda yazılı olan histolojik tip, lenfovasküler invazyon, tümör çevresi gibi parametreler ışık mikroskopik inceleme ile tekrar değerlendirildi.

İstanbul Üniversitesi Hastaneleri Otomasyon Projesi (İSHOP) Hastane Bilgi Yönetim Sistemi ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi elektronik arşivleri üzerinden rezeksiyon tipi, makroskopik tümör boyutu, nekroz varlığı, kan damarı invazyonu, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, plevra invazyonu, stromal yanıt gibi bilgilere ulaşıldı.

İmmunhistokimyasal çalışma için uygun bloklar belirlendi. İmmunhistokimyasal incelemelerin başlangıcında kullanılacak antikora uygun kontrol için kuvvetli pozitif boyanma gösteren akciğer AK olgusu seçildi. Her immünhistokimyasal çalışma pozitif kontrol bloğu ile beraber uygulandı.

3.2.İmmunhistokimyasal Yöntem

%10'luk formalinle fikse edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan yapılan 3 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma aşamaları da dahil olmak üzere tüm İHK boyama işlemleri otomatik İHK boyama makinesinde (Ventana Benchmark XT, Ventana Medical Systems,

Tuscon, AZ) gerçekleştirildi. İşlem için cihaza uygun biyotinsiz HRP multimer bazlı hidrojen peroksit ve 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (Ventana) kullanıldı. Anti-Total c-MET (16 dakika inkübasyon, SP44 klonu Ventana Medical Systems (Ventana)) antikorları lamlara uygulandı. Karşıt boyama, boyama cihazında Hematoksilen solüsyon ile yapıp, dehidratasyon ve ksilen aşamalarından sonra işlem tamamlandı. Lamlar entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda değerlendirilmeye hazır hale getirildi.

3.3.İmmünohistokimyasal Boyanmanın Değerlendirmesi

Her olgu için MetMab ve H Skorlama sistemine göre immünohistokimyasal değerlendirilme yapıldı.

MetMab skorlamasında tümör hücrelerinin $\geq 50\%$ sinde orta derecede ve kuvvetli pozitif boyanma gösteren (Skor 2+ ve Skor 3+) olgular MET İHK pozitif kabul edildi.

H-Skorlamasında MET ekspresyonu, membranöz ve / veya sitoplazmik boyamaya dayalı olarak değerlendirildi. 0 (boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta) veya 3 (kuvvetli) yoğunluk puanları ile birlikte boyanma oranının verildi. H skorları, (1 x zayıf boyalı hücrelerin yüzdesi) + (2 x orta boyalı hücrelerin yüzdesi) + (3 x güçlü boyalı hücrelerin yüzdesi) formülüne göre hesaplandı. Tümör hücrelerinin yüzdelere (%0-100) ve boyanma yoğunluklarına (0-3) göre 0-300 arasındaki değer alan olgularda 150 üstündekiler MET İHK pozitif kabul edildi.

3.4.FISH Yöntemi

Çalışmamızda ticari proplar (Cytotest, RO, ABD) kullanılarak MET amplifikasyonu değerlendirilmiştir.

3-4 mikron kalınlığındaki kesitlerin 56°C'de 1 gece boyunca etüvde bekletilmesinin ardından;

Deparafinizasyon adımları:

- Ksilende 3 kere 10 dakika, absolü alkolde 2 kere 5 dakika; deparafinizasyon ön yıkama solüsyonu'nda 80°C'de 30 dakika bekletildi. Bu işlem esnasında Coplin şale kullanıldı. Deparafinizasyon ön yıkama solüsyonu toz halinde

paketlenmiş olup, ilk kullanımda 240 ml distile suda çözülüp, sonraki kullanımlar için oda ısısında saklandı.

Hibridizasyon öncesi adımlar:

- Distile suda 10-15 sn çalkalandı.
- Önceden hazırlanmış ve 37°C'de beklemekte olan 15 cc distile su, 150µl 1M HCl'ye, 150µl distile su ile sulandırılan 'enzim reaktifi' eklendi (SigmaLife Science, USA). Enzim reaktifi toz halinde paketlenmiş olup, kullanımın hemen öncesinde hazırlanır. Lamlar bu solüsyonda 15 dakika bekletildi.
- Distile suda 10-15 saniye çalkalandı.
- 2 kez 2XSSC'de 3 dakika bekletildi.
- Sırasıyla %70, %85, %100'lük alkolde 3 dakika bekletildi.
- Kesitler havada kurutuldu.

Hibridizasyon işlemi:

- Problar çıkarılıp kısa süreli vortekslenip santrifüjlendikten sonra kuruyan lamaların üzerine hedef bölgeye uygulanıp lamel kapatıldı.
- Plastik çimento (Fixogum®, Almanya) uygulandı.
- Lamlar denatürasyon ve hibridizasyon işleminin gerçekleştirileceği cihaza (Hybridizer, Dako) konuldu.
- Hybridizer'da 73°C'de 5 dakika, 37 °C'de 16 saat işlem geçirdi.

Hibridizasyon sonrası:

- 73°C'de ve oda ısısında 2 şalede 50 ml 2XSSC/%0.3NP40 hazırlandı.
- Plastik çimento nazikçe ayrıldı.
- Lamel elle ayrıldı. Elle ayrılmakta güçlük yaşananlar oda ısısındaki 2XSSC/%0.3NP40'ta bekletildi.
- 73°C'deki 2XSSC/%0.3NP40'ta bir şalede 1-3 sn çalkalanarak 2 dakika tutuldu.
- Oda ısısındaki 2XSSC/%0.3NP40'ta çalkalandı.
- Açıkta ve karanlıkta kurutuldu.
- DAPI II 5-10µl uygulandı

- Değerlendirme öncesi 20-30 dakika (-)20°C'de bekletildi.

FISH uygulaması yapılan lamalar, bilgisayar bağlantılı floresan mikroskopunda (Olympus BX61; Olympus Optical, Japonya) değerlendirilmiştir. Bilgisayar ortamında görüntüleme dijital kamera (XLMM, Dage-MTI, IN, ABD) ve uyumlu yazılım (Duet®, Bioview Ltd., İsrail) kullanılmıştır.

FISH tekniğinde MET/CCP7 probu kromozom 7q31.2 bölgesi için ayrı ayrı çift renkli prob içeren (yeşil ve turuncu) yaklaşımla çalışıldı (Cytotest, RO, USA). LSP MET FISH Probu (turuncu renk), tüm MET genini içeren bir kromozomal bölgeyi kapsar. Kromozom 7'ye özgü alfa uydu DNA'sından türetilen CCP7 FISH Probu (yeşil), hücre başına kromozom 7 kopya sayısını belirlemek için bir kontrol görevi görecektir.

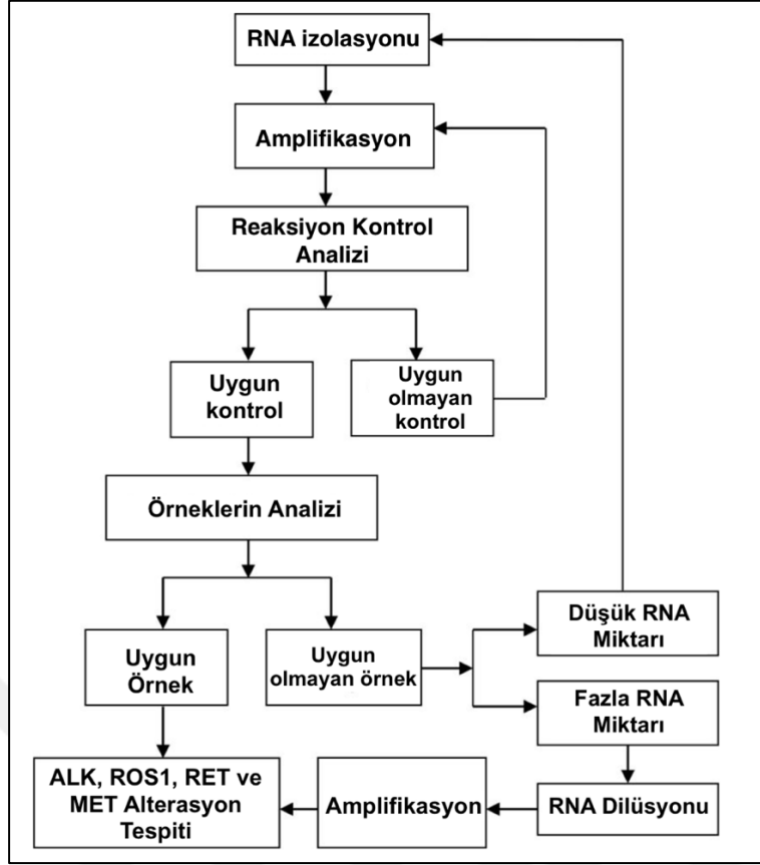
3.5.FISH Değerlendirmesi

MET amplifikasyon değerlendirme, birbiri üzerine binmeyen, ayrı ayrı seçilebilen 100 hücre üzerinden yapıldı. FISH ile her vaka için MET gen kopya sayısı ve MET/CEP7 oranı hesaplandı. Her kopya sayısı değişkeninin değerlendirilen alanlardaki yüzdesi ve miktarı hesaplandı. MET FISH değerlendirmesinde UCCC ve Capuzzo kriterleri kullanıldı.

İmmünohistokimyasal çalışma sonucunda boyanma gösteren alanlarda FISH tekrarlandı ve sonuçlar karşılaştırıldı.

3.6.PCR Yöntemi

RT-PCR analizi, sırasıyla RNA izolasyonu, amplifikasyon ve analiz aşamalarından oluşmaktadır. Uygulanan prosedür Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. PCR analiz prosedürü

3.6.1. RNA izolasyonu:

- Parafin bloklardan 2-20 µm kalınlığında kesitler alındı.
- 500 µl deparafinizasyon solüsyonu eklendi ve 10 saniye kuvvetli vortekslendi. Ardından kısa bir süre santrifüj edildi.
- 56 ° C' de 3 dakika inkübe edildi, ardından oda sıcaklığında (15-25 ° C) soğumaya bırakıldı.
- 240 µl PKD tamponu eklendi ve vorteksleyerek karıştırıldı.
- 1 dakika boyunca 11,000 x g (10,000 rpm)' de santrifüjlendi.
- Alt, berrak bölüme 10 µl proteinaz K eklendi. Yukarı ve aşağı pipetlenerek yavaşça karıştırıldı.
- 56 ° C'de 15 dakika, sonra 80 ° C'de 15 dakika inkübe edildi.
- Alt, renksiz bölüm yeni bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- 3 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra, 20,000 x g (13.500 rpm)' de 15 dakika santrifüjlendi

- Süpernatant, peleti (çapraz bağlanmış DNA dahil çözünmeyen doku kalıntıları içerir) rahatsız etmemeye dikkat ederek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Toplam numune hacminin onda biri kadar DNase Booster Tamponu ve 10 µl DNaz I stok çözeltisi eklendi. Tüp ters çevirerek karıştırıldı. Tüpün yanlarından kalan sıvıyı toplamak için kısa süre santrifüjlendi.
- Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Bağlama koşullarını ayarlamak için 500 µl Tampon RBC eklendi ve lizat iyice karıştırıldı.
- Numuneye 1200 µl etanol (%100) eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. Santrifüj edilmedi.
- Oluşmuş olabilecek herhangi bir çökelti de dahil olmak üzere 700 µl örneği, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve bir RNeasy MinElute spin kolonuna aktarıldı. Kapağı yavaşça kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10.000 \text{ rpm}$)' de 15 saniye santrifüjlendi.
- RNeasy MinElute dönüş kolonuna 500 µl Tampon RPE eklendi. Kapağı yavaşça kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10.000 \text{ rpm}$)' de 15 saniye boyunca santrifüjlendi.
- RNeasy MinElute spin kolonuna 500 µl Tampon RPE eklendi. Kapağı yavaşça kapatıldı ve spin kolon membranını yıkamak için $\text{min} 8000 \times g$ (10.000 rpm)' de 2 dakika santrifüjlendi. Akış borusu ile toplama borusunu atıldı.
- RNeasy MinElute spin kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi. Spin sütununun kapağını açıldı ve 5 dakika boyunca tam hızda santrifüjlendi. Akış borusu ile toplama borusunu atıldı.
- RNeasy MinElute spin kolonu yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildi. Doğrudan spin kolon membranına 14-30 ul RNaz içermeyen su eklendi. Yavaşça kapağı kapatıldı ve RNA elute etmek için tam hızda 1 dakika santrifüjlendi.

3.6.2. Örneklerin PCR Hazırlığı:

- Parafine gömülü numuneler için, her reaksiyon tüpündeki RNA miktarı 25-1500 ng idi.

- Çalışmaya başlamadan önce pipetler, banklar ve kullanılacak diğer malzemeler UV ışığı ile en az 30 dakika dekontamine edildi.
- Gerekli sayıda EasyPGX ALK / ROS1 / RET / MET şeridini 10 saniye santrifüjlendi.
- Pozitif kontrolü 10 saniye santrifüj edildi ve 800 µl verilen SU ekleyerek tekrar süspansiyon haline getirildi. 10 saniye dikkatlice vortekslendi ve daha sonra 10 saniye santrifüj edildi.
- Kit içeriği, her çalışmada 10 klinik örneği ve 2 kontrolü (EasyPGX akciğer füzyon pozitif kontrol ve SU) analiz etmek için optimize edilmiştir.
- Her numune, bir EasyPGX ALK / ROS1 / RET / MET şeridinde bulunan 8 farklı kuru karışımın tümü ile amplifiye edildi: ALK 5P (1. konum), ALK 3P (2.konum), ROS1 ekzon 32 (3. konum), ROS1 ekzon 34 (4. konum), ROS1 ekzon 35-36 (5.konum), RET ekzon 12 (6.konum), RET ekzon 8-11 (7. konum), MET ekzon 14 (8. konum).
- Kantitatif olarak yeterliliği karşılayan numunelere sırayla Real-time RT-PCR ile aşağıdakiler uygulandı:
 - 50°C 10 dakika Reverz Transkriptaz (RT) (1 siklus)
 - 95°C 5 dakika Hot start (1 siklüs)
 - 95°C 5 dakika, 56°C 15 dakika ve 60 °C 20 dakika amplifikasyon (40 siklus)

3.6.3. Veri Analizi

- Veri analizi, EasyPGX® analiz yazılımı sürüm 3.0.0 veya üstü kullanılarak (kod RT800-SW, Diatech Farmakogenetik) otomatik olarak yapıldı.
- Önce negatif kontrol SU ve pozitif kontrol analiz edildi. Beklenen değerler aralığındaysa, numunelerin analizine devam edildi, aksi takdirde oturma geçersiz sayıldı ve numunelerin sonuçları reddedildi.
- Elde edilen Cq değerlerinin normalleştirilmiş floresan grafiklerini kontrol ederek bir artefaktan (lineer floresan eğrisi) değil, gerçek bir amplifikasyon reaksiyonundan (sigmoidal floresan eğrisi) üretildiği doğrulandı.
- FAM kanalı için 50 ve HEX kanalı için 50 eşik değerleri kullanıldı.
- Her iki kanalda da ilgili Cq (ΔR) ve ΔR son değerleri ile sonuç alındı.
- Reaksiyon kontrolü analizi yapıldı. Pozitif kontrolünün ΔCq değerleri bildirilen değerlerle karşılaştırıldı. $\Delta Cq \geq 4.5$ ise numunelerin analizine devam edildi.

- RNA kalitesinin / miktarının uygunluğunun analizi yapıldı.
- RNA örneklerinin Cq HEX değerlerinin ≥ 21 ve ≤ 33 , ΔR son HEX değerinin ≥ 200 olması durumunda örneklerin analizine geçildi.
- Tüm numunelerin ilgili mutasyonlar için ΔCq HEX değerleri kontrol edildi. $\Delta Cq \pm 3$ olan olgular için analize devam edildi.
- Genetik değişikliklerin varlığı için analiz yapıldı. Hem ΔCq hem de ΔR son değerleri hesaplandı. $\Delta Cq \text{ ALK} = Cq \text{ FAM (ALK 5P)} - Cq \text{ FAM (ALK 3P)}$ hesaplandı. Pozitif kontrol için $\Delta Cq \text{ ALK} \geq 4,5$ ise çalışmada değerlendirmeye devam edildi.
- Cq (FAM) değeri ALK 3P için ≤ 31 , ROS1 ekzon 32 için ≤ 33 , ROS1 ekzon 34 için ≤ 33 , ROS1 ekzon 35-36 için ≤ 32 , RET ekzon 8-11 için ≤ 32 , MET ekzon 14 için ≤ 32 değerleri pozitif kabul edildi. İlgili Cq değerlerinde beklenen ΔR son (FAM) sonuçları ALK 3P için ≥ 150 , ROS1 ekzon 32 ve ekzon 34 için ≥ 100 , ROS1 ekzon 35-36 için ≥ 250 , RET ekzon 12 için ≥ 200 , RET ekzon 8-11 için ≥ 300 , MET ekzon 14 için ≥ 450 idi. ALK füzyonu için ayrıca $\Delta Cq \text{ ALK}$ değerlendirildi. $\Delta Cq \text{ ALK} \geq 4,5$ olan olgular füzyon pozitif kabul edildi. Bu değerlerle uyumsuz sonuçlar wild-tip olarak değerlendirildi.

3.7.Biyostatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 21.0 İstatistik paket programı kullanıldı.

Tanımlayıcı istatistiklerinde sürekli değişkenler için ortalama değer, minimum ve maksimum değerler; kesikli değişkenler için ise sayı ve yüzde değerleri hesaplandı.

Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson'un ki-kare testi ve Fisher' in kesin Ki-kare testi uygulandı. Sürekli değişkenler t test ile karşılaştırıldı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

FISH tekrar edilen olgularda ortalama MET gen kopya sayıları t-test ile karşılaştırıldı. P değeri 0.05' ten küçük durumlar anlamlı fark kabul edildi.

İHK' nın MET FISH ve MET ekzon 14 atlama mutasyonunu saptamadaki duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplandı ve Spearman' ın korelasyon testi ile sonuçların uyumları araştırıldı. İHK değerlendirme sonucunun FISH sonucu üzerindeki etkisini göstermek için ikili lojistik regresyon analizi yapıldı.

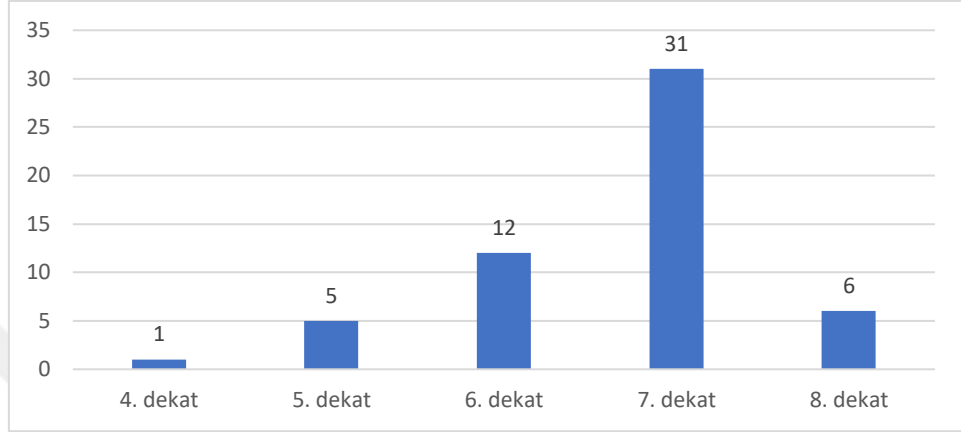
Sağkalım analizleri için Kaplan-Meier sağkalım testi kullanıldı. MET İHK, FISH ve amplifikasyonu değerlendirmelerinin her biri için pozitif ve negatif gruplar arası sağkalım eğrilerini karşılaştırmada Log rank analizi (Mantel Cox) yapıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilerek $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık olarak tanımlandı.

4. BULGULAR

4.1.Olguların Demografik Özellikleri

55 hastanın 45' i (%81,8) erkek, 10' u (% 18,2) kadındı.

Tanı anındaki yaşları esas alınarak hastaların yaşlara göre dağılımı belirlendi. Hastalarımızın tanı anındaki yaşları 38 ile 80 arasındaydı. (Grafik 2) Yaş için ortalama $62,14 \pm 8,92$ yıl bulundu.

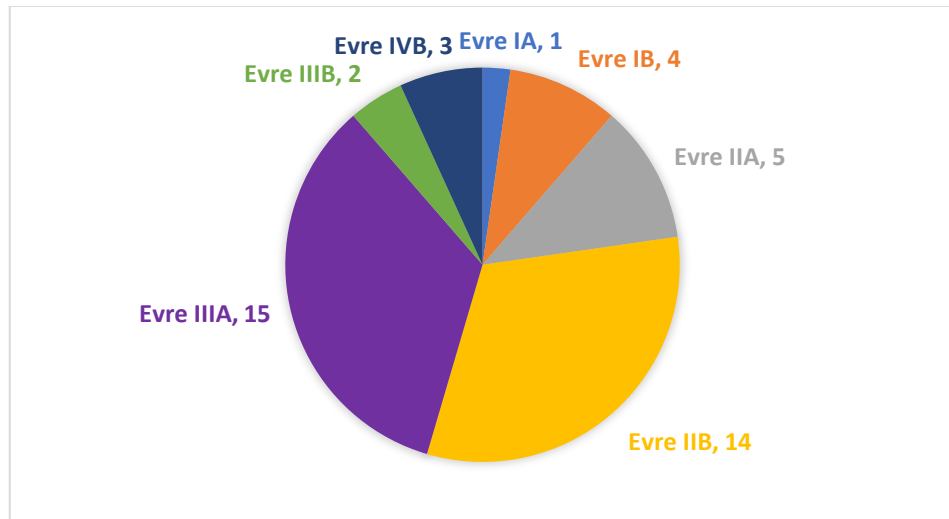


Grafik 2. Hastaların tanı anındaki yaşlara göre dağılımı

Bilgisine ulaşılan 33 olgunun 28' i (%84,8) sigara içicisiydi. Sigara içen 28 olguda sigara kullanım süresi 3- 100 paket/yıl arasında olup ortalama $44,14 \pm 18,61$ paket/yıl idi.

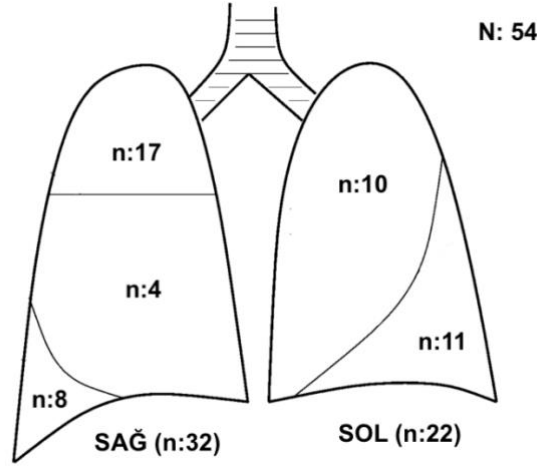
Bilgisine ulaşılan 44 olgunun tanı anında TNM 8. Edisyona göre 1' i (%2) evre IA, 4' ü (%9) evre IB, 5' i (%11) evre IIA, 14' ü (%32) evre IIB, 15' i (%34) evre IIIA, 2' si (%5) evre IIIB, 3' ü (%7) evre IVB idi. (Grafik 3)

Bilgisine ulaşılan 41 olgunun hiçbiri neoadjuvan tedavi almamıştı.



Grafik 3. Hastaların tanı anındaki evrelerine göre dağılımı

Tümör lokalizasyonu 32'sinde sağ akciğer, 22' sinde sol akciğerdi. 1 olgunun lokalizasyon bilgisine ulaşılamadı. Sağ akciğerdeki tümörlerin 17' si (%58,6) üst lob, 4' ü (%13,8) orta lob, 8' i (%27,6) alt lob yerleşimli; sol akciğerdeki tümörlerin 10' u (%47,6) üst lob, 11' i (%52,4) alt lob yerleşimliydi. (Grafik 4)



Grafik 4. Hastaların tümör yerleşim bölgeleri

Olguların 41' ine (%74,5) lobektomi, 5' ine (%9) pnömonektomi, 7' sine (%12,7) eksizyonel, 1' ine (%1,9) bronkoskopik biyopsi, 1' ine (%1,9) segmentektomi uygulanmıştı.

PSK tanıli hastalarının DSÖ 2015 sınıflamasına göre alt tip dağılımına bakıldı. Toplam 55 vakanın 41' i (%74,6) pleomorfik karsinom, 8' i (%14,5) karsinosarkom, 5'i (%9,1) dev hücreli karsinom, 1'i (%1,8) iğsi hücreli karsinom idi.

Olguların seçilen bloklarındaki histopatolojik özellikleri irdelendi. 55 olgunun 20' sinde (%36,3) seçilen blokta eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti mevcuttu. Bunların içine, 41 pleomorfik karsinom tanıli olguların 18' i (%43,9) ve 8 karsinosarkom tanıli olguların 2' i (%25) dahildi. Eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti, 18 pleomorfik karsinom olgusunun 12' sinde (%66,7) AK, 6' sında (%33,3) SHK iken; 2 karsinosarkom olgusunun 1' inde (%50) AK, 1' inde (%50) SHK idi. Seçilen bloklardaki eşlik eden diferansiye KHDAK' lerin toplamda 13' ü (%65) AK, 7' si (%35) SHK idi.

Olgulardan 1' i insizyonel biyopsi olduğu için tümör çapı bilgisi yoktu. 54 olgunun tümör çapları 18 mm ile 190 mm arasında değişmekteydi. Ortalama çap 60,83 ± 35,35 mm idi.

51 olgunun 1' i (%2) hariç 50' sinde (%98) nekroz mevcuttu. Bilgisine ulaşılan 43 olguda nekroz oranı %10 ile %90 arasında değişmekteydi. Ortalama oran %38,14 ± 20,50 bulundu. Kan damarı invazyonu 51 olgunun 39' unda (%76,5) mevcuttu. Lenfatik invazyon 51 olgunun 44' ünde (%86,3) mevcuttu. Perinöral invazyon 50 olgunun 25' inde (%50) mevcuttu. Plevra invazyonu ise 52 olgunun 31'inde (59,6) mevcuttu. 4 (%7,2) olgunun kan damarı invazyonu ve lenfatik invazyon, 5 (%9) olgunun perinöral invazyonu bilgisine ulaşılamadı. Tümöre eşlik eden iltihabi stromal yanıt 48 olgunun 20' sinde (%41,7) hafif, 15' inde (31,3) orta derecede, 13' ünde (%27) yoğundu. 7 (%12,7) olgunun stromal yanıt bilgisine ulaşılamadı.

4.2.Olguların Klinik Takip Bulguları

Olguların 30' unun (%54,5) postop KT bilgisine ulaşıldı. Bunların 16' sı (%53,3) postop adjuvan KT almış, 14' ü (%46,7) almamıştı. Olguların 22' sinin (%40) post op RT bilgisine ulaşıldı. Bunların 8' i (%36,3) postop adjuvan RT almış, 14' ü (%63,7) almamıştı.

Olguların 34' ünün (%61,8) nüks bilgisine ulaşıldı. Bunların 15' inin (%44,1) nüks ettiği biliniyordu. Nüks eden olguların 13' ünün (%86,7) nüks tarihine erişildi. Klinik takip bilgisine ulaşılan 13 olgunun nüks zamanı 3,56 -100,66 ay arasında değişmekte olup ortalama 24,23 ± 27,94 ay idi.

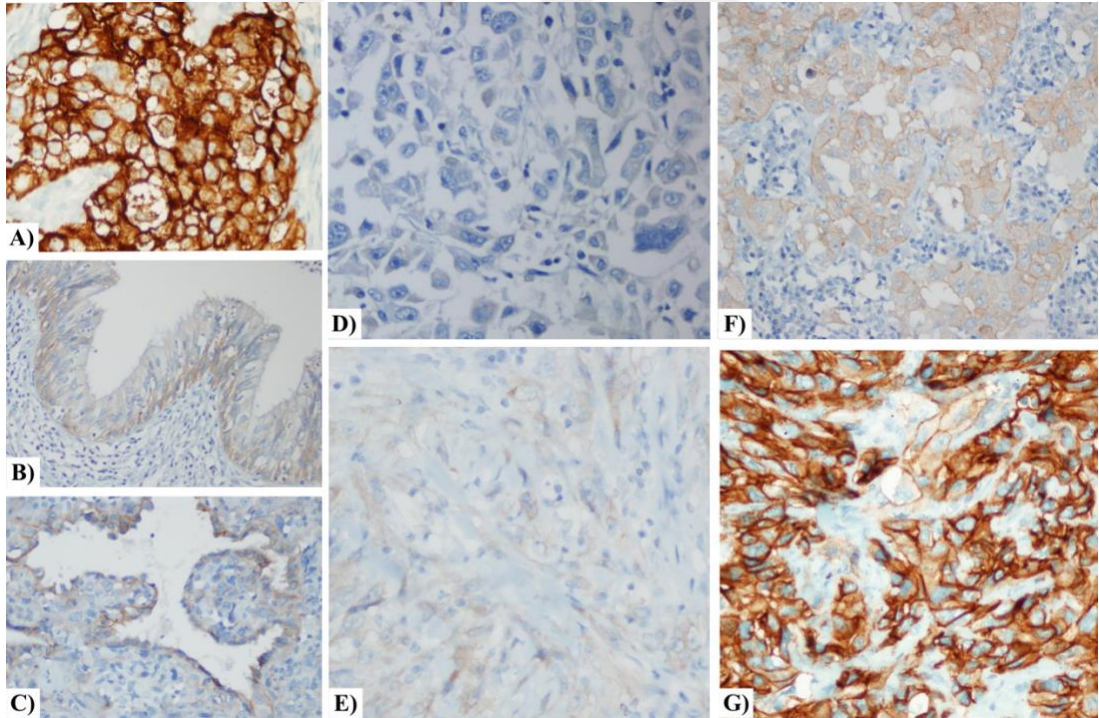
Çalışmaya dahil edilen hastaların 55 hastanın 37' sinin (%67,2) eks olduğu, 10' unun (%18,1) yaşadığı biliniyordu. Eks olan 37 hastanın 28' inin (%75,6) eks tarihine ulaşılabildi. Klinik takip bilgisine ulaşılan 38 olgunun genel sağ kalımı 0,1 ay ile 138,64 ay arasında değişmekte olup ortalama 35,79 ± 32,63 ay idi.

4.3.Olguların İmmünohistokimyasal Bulguları

Olguların tamamına immünohistokimyasal Anti-Total c-MET (SP44) uygulandı. İHK, tümörün pür sarkomatoid (iğsi veya dev hücreli) komponentinde değerlendirildi. Seçilen bloklarında diferansiye KHDAK komponenti bulunan olgularda, ayrıca bu alanları dahil ederek de skorlama tekrarlandı.

Pür sarkomatoid komponentte değerlendirme yapıldığında METMab skorlamasına göre 55 olgunun 34' ü (%61,8) skor 0, 8' i (%14,6) skor 1+, 6' sı (%10,9) skor 2+, 7' si (%12,7) skor 3+ olarak değerlendirildi. Bu skorlamaya göre olguların 13'ü (%23,6) İHK pozitif olarak değerlendirildi. H-skorlaması yapıldığında olguların aldığı skorlar minimum 0, maksimum 295 idi. Ortalama $79,36 \pm 86,65$ idi. H-skorlamasına göre olguların 12'si (%21,8) İHK pozitif olarak değerlendirildi.

İHK değerlendirmesine, eşlik eden diferansiye KHDAK komponent de dahil edildiğinde METMab skorlamasına göre 55 olgunun 32' si (%58,2) skor 0, 8' i (%14,6) skor 1+, 6' sı (%10,9) skor 2+, 9' u (%16,3) skor 3+ olarak değerlendirildi. Bu skorlamaya göre olguların 15' i (%27,2) İHK pozitif olarak değerlendirildi. H-skorlaması yapıldığında olguların aldığı skorlar minimum 0, maksimum 295 idi. Ortanca değer $66,09 \pm 88,90$ idi. H-skorlamasına göre olguların 14' ü (%25,5) İHK pozitif olarak değerlendirildi.



Resim 1. İHK çalışmasındaki boyanma değerlendirilmesi A) Pozitif kontroldeki skor 3+ boyanma, B) 4 nolu olguda çevre bronş epiteldeki skor 2+ boyanma, C) 24 nolu olguda çevre akciğerde reaktif pnömositlerdeki skor 2+ boyanma, D) 12 nolu olguda skor 0 boyanma, E) 42 nolu olguda skor 1+ boyanma, F) 21 nolu olguda skor 2+ boyanma, G) 53 nolu olguda skor 3+ boyanma (x400)

Olguların pür sarkomatoid morfolojideki alanlarında değerlendirme yapıldığında elde edilen H-skor değerleri ile eşlik eden diferansiye KHDAK komponent de dahil edildiğinde elde edilen H-skor değerleri arasında çok yüksek korelasyon mevcuttu ($Rho= 0,910$). Olguların pür sarkomatoid morfolojide

değerlendirme yapıldığında elde edilen METMab skor ile eşlik eden diferansiye KHDAK komponent de dahil edildiğinde elde edilen METMab skor arasında çok yüksek korelasyon mevcuttu (Rho= 0,934).

4.4.İHK Pozitif ile İHK Negatif Olgular Arasında Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar

İHK pozitifliği gösteren 15 hastanın 12' si (%80) erkek, 3' ü (%20) kadındı. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, cinsiyet dağılımında anlamlı farklılık saptanmadı (p=1). İHK pozitif olgularda yaş ortalaması 61,4 ± 9,23 olup hastalar ortalama 40,43 ± 12,96 paket-yıl sigara kullanıyordu. İHK negatif olgularda yaş ortalaması 62,5 ± 9,07 olup hastalar ortalama 45,38 ± 20,26 paket-yıl sigara kullanıyordu. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, yaş, sigara kullanım öyküsü açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,692 ve 0,552).

Hastaların ortalama tümör çapı İHK pozitiflerde 52,36 ± 40,79 mm; İHK negatiflerde 63,8 ± 33,31 mm idi. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, tümör çapı açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,302). Tanı anında evresi bilinen İHK pozitif 12 olgunun 8' i (%66,7) evre II, 3' ü (%25) evre III, 1' i (%8,3) evre IV iken; İHK negatif 32 olgunun 5' i (%15,6) evre I, 11' si (%34,4) evre II, 14' ü (%43,7) evre III, 2 si (%6,3) evre IV idi. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, evre açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,185). İHK pozitif olan 13 olgunun 9' unda (%69,2), İHK negatif olan 39 olgunun 22' sinde (%56,4) plevral invazyon mevcuttu. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, plevra invazyonu açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,523)

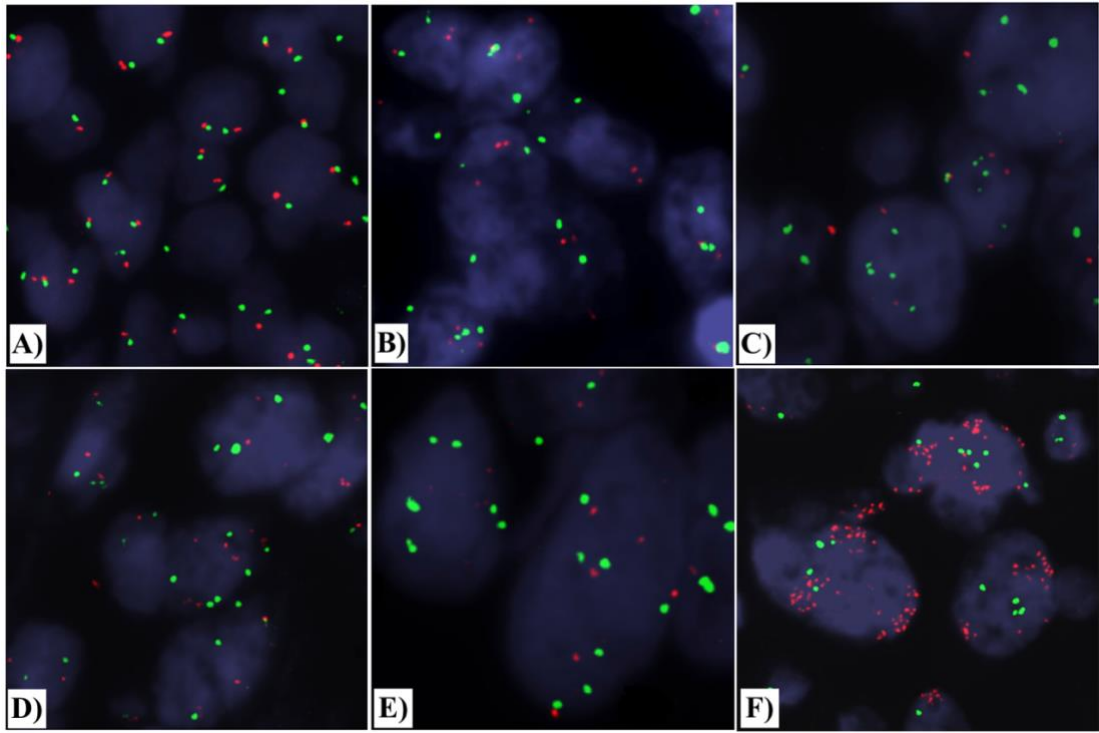
İHK pozitif olguların 12' si (%80) pleomorfik karsinom, 2' si (%14,3) dev hücreli karsinom, 1'i (%6,7) karsinosarkomdu. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, histolojik alt tipler arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,627). İHK pozitif olguların 8' inde (%53,3) seçilen tümör bloğunda eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti vardı. Bu olgulardaki epitelyal komponentin tamamı AK idi. İHK negatif olguların 12' sinde (%30) seçilen tümör bloğunda eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti vardı. Bu olgulardaki epitelyal komponentin 7' si (%58,3) SHK, 5' i (%41,7) AK idi. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, tümöre eşlik eden diferansiye KHDAK komponentinin alt tipi açısından anlamlı fark saptandı. (p=0,013).

İHK pozitif olan 13 hastanın 12' sinde (%92,3) kan damarı invazyonu, 13 hastanın 12' sinde (%92,3) lenfatik invazyon, 12 hastanın 3' ünde (%25) perinöral invazyon vardı. İHK negatif olan 38 hastanın 27' sinde (%71,1) kan damarı invazyonu,

32' sinde (%84,2) lenfatik invazyon, 22' sinde (%57,9) perinöral invazyon vardı. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, kan damarı, lenfatik, perinöral invazyon ile İHK pozitifliği arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,151; p=0,662; p=0,095).

4.5.Olguların Floresan İn Situ Hibridizasyon Bulguları

Olguların tamamında pür sarkomatoid komponentte FISH uygulandı. 55 olgunun 47' sinde (%85,5) değerlendirilebilir sinyal elde edildi. Cappuzzo skorlama sistemi kullanıldığında olguların 25' i (%53,2) dizomi, 7' si (%14,9) düşük trizomi, 1' i (%2,1) yüksek trizomi, 4' ü (%8,5) düşük polizomi, 7' si (%14,9) yüksek polizomi, 3' ü (%6,4) amplifikasyon olarak değerlendirildi. Capuzzo skorlamasına göre olguların 10' u (%21,3) FISH (+) olarak değerlendirildi. UCCC kriterleri uygulandığında FISH (+) olgu sayısı değişmedi.



Resim 2. Cappuzzo kriterlerine göre FISH değerlendirme A) Dizomi (46 nolu olgu), B) Düşük trizomi (10 nolu olgu), C) Yüksek trizomi (36 nolu olgu), D) Düşük polizomi (28 nolu olgu), E) Yüksek polizomi (36 nolu olgu) F) Amplifikasyon (30 nolu olgu)

İmmünohistokimyasal çalışma sonucunda herhangi bir yoğunlukta boyanma saptanan 22 (%46,8) olguda FISH tekrarlandı. İmmünohistokimyasal çalışmada 18' inde (%82) kuvvetli, 3'ünde (%13,5) orta derecede, 1'inde (%4,5) zayıf boyanma gösteren alanlarda tekrarlama yapıldı.

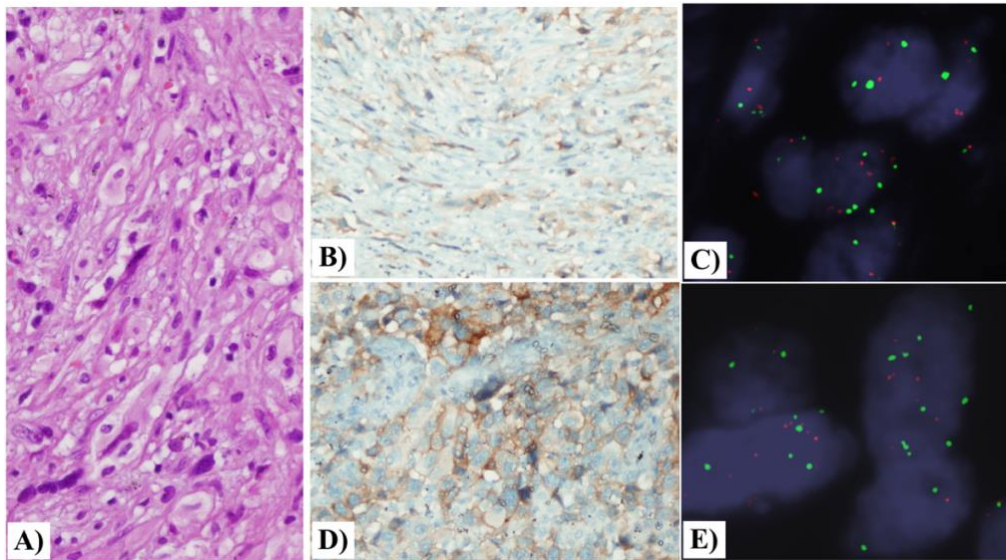
Tekrar çalışılan alanlarda Cappuzzo skorlama sistemi kullanıldığında olguların 7' si (%31,8) dizomi, 2' si (%9,1) düşük trizomi, 4' ü (%18,2) düşük polizomi, 5' i (%22,7) yüksek polizomi, 4' ü (18,2) amplifikasyon olarak değerlendirildi.

İHK' da boyanma gösteren alanlarda FISH tekrarlanan 22 olgunun 5' inde (%22,7) önceki çalışmada FISH (-) iken tekrar sonrası FISH (+) bulundu. Bu 22 olgunun 7' sinde (%31,8) ilk çalışmaya göre sonuçlar değişkenlik gösterdi. Bunlar şöyleydi:

- 10 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Cappuzzo sınıflamasına göre düşük trizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada sarkomatoid komponentte kuvvetli pozitiflik gösteren alanda FISH tekrarlandığında amplifikasyon görüldü ve FISH (+) olarak değerlendirildi.

- 17 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Cappuzzo sınıflamasına göre dizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada kuvvetli pozitiflik gösteren AK komponentinde FISH tekrarlandığında düşük polizomi görüldü ve FISH (-) olarak değerlendirildi.

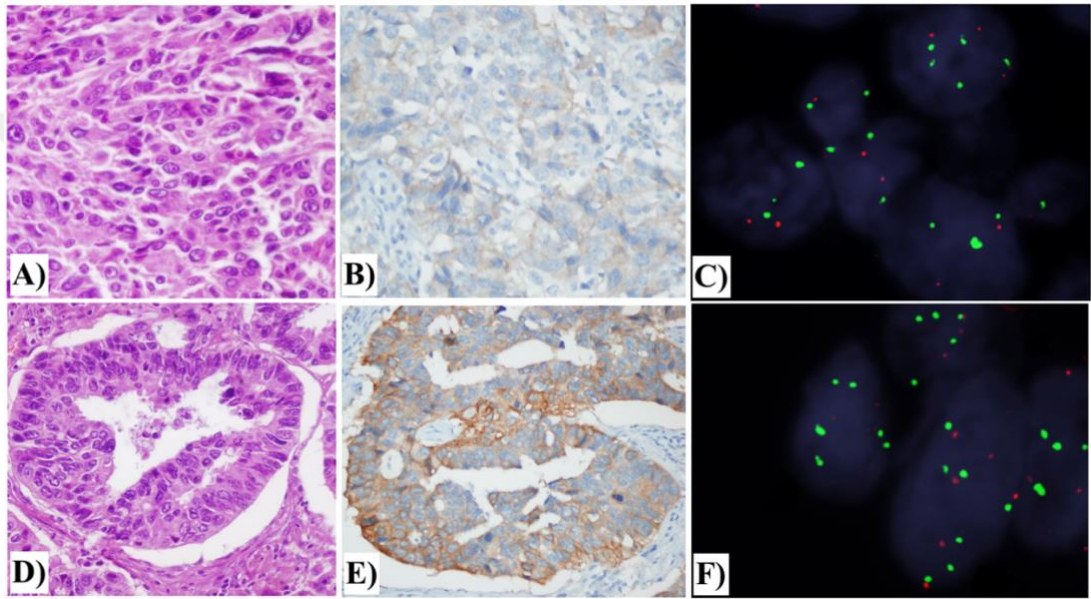
- 28 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Cappuzzo sınıflamasına göre düşük polizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada sarkomatoid komponentte kuvvetli pozitiflik gösteren alanda FISH tekrarlandığında yüksek polizomi görüldü ve FISH (+) olarak değerlendirildi (Resim 3).



Resim 3. 28 nolu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponent (H&E x400) B) Zayıf (skor 1+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) C) İHK skor 1+ boyanan alandaki düşük polizomi (x600) D) Kuvvetli (skor 3+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) E) İHK skor 3+ boyanan alandaki yüksek polizomi (x600)

- 34 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Cappuzzo sınıflamasına göre düşük trizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada kuvvetli pozitiflik gösteren AK komponentinde FISH tekrarlandığında düşük polizomi görüldü ve FISH (-) olarak değerlendirildi.

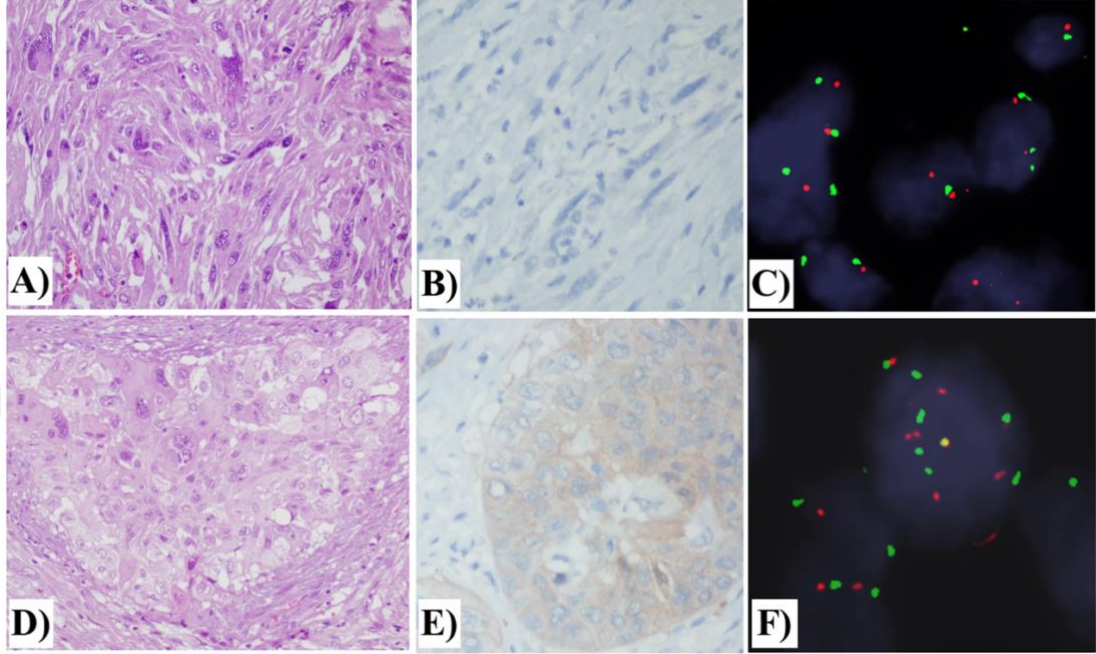
- 36 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Cappuzzo sınıflamasına göre düşük trizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada kuvvetli pozitiflik gösteren AK komponentinde FISH tekrarlandığında yüksek polizomi görüldü ve FISH (+) olarak değerlendirildi (Resim 4).



Resim 4. 36 nolu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid morfoloji (H&E x400) B) Sarkomatoid komponentte zayıf (skor 1+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) C) İHK skor 1+ boyanan alandaki düşük trizomi (x600) D) AK komponenti (H&E x400) E) AK komponentinde kuvvetli (skor 3+) İHK boyanma (anti c-MET (SP44)x400) F) İHK skor 3+ boyanan alandaki yüksek polizomi (x600)

- 43 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Cappuzzo sınıflamasına göre düşük trizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada sarkomatoid komponentte kuvvetli pozitiflik gösteren alanda FISH tekrarlandığında yüksek polizomi görüldü ve FISH (+) olarak değerlendirildi.

- 47 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Cappuzzo sınıflamasına göre dizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada zayıf pozitiflik gösteren SHK komponentinde FISH tekrarlandığında düşük polizomi görüldü ve FISH (-) olarak değerlendirildi (Resim 5).



Resim 5. 47 nolu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponent (H&E x400) B) Sarkomatoid komponentteki negatif (skor 0) İHK (anti c-MET (SP44)x400) C) İHK skor 0 alandaki dizomi (x600) D) SHK komponenti (H&E x400) E) SHK komponentinde zayıf (skor 1+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) F) İHK skor 1+ boyanan alanında düşük polizomi (x600)

-55 numaralı olguda ilk çalışılan alanda FISH değerlendirme Capuzzo sınıflamasına göre dizomi ve FISH (-) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışmada sarkomatoid komponentte kuvvetli pozitiflik gösteren alanda FISH tekrarlandığında amplifikasyon görüldü ve FISH (+) olarak değerlendirildi.

FISH tekrarlananların İHK boyanma gösteren alalarda tekrarlanan sonuçları kabul edildiğinde, Cappuzzo skorlama sistemine göre olguların 22' si (%46,8) dizomi, 3' ü (%6,4) düşük trizomi, 1' i (%2,1) yüksek trizomi, 6' s ı (%12,8) düşük polizomi, 10' u (%21,3) yüksek polizomi, 5' i (%10,6) amplifikasyon olarak değerlendirildi. Capuzzo skorlamasına göre olguların 15' i (%31,9) FISH (+) idi. UCCC kriterleri uygulandığında FISH (+) olgu sayısı değişmedi.

4.6.FISH Pozitif ile FISH Negatif Olgular Arasındaki Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar

MET FISH pozitif bulunan 15 olgunun 11' i (%73,3) erkek, 4' ü (%57,1) kadındı. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, cinsiyette anlamlı fark saptanmadı ($p=0.188$). FISH pozitif olguların yaş ortalaması $60,46 \pm 10,05$ (38-75) iken FISH negatif olguların $61,56 \pm 9$ idi. FISH pozitif olguların paket-yıl sigara kullanım öyküsü ortalama $42,50 \pm 17,08$ iken FISH negatif olguların $42,80 \pm 13,15$ idi. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, yaş, sigara kullanım miktarında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,609$ ve $0,558$).

FISH pozitif olan hastaların ortalama tümör çapı $64,6 \pm 39,2$ mm idi. FISH negatif olguların ise $63,1 \pm 35,41$ mm idi. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, ortalama tümör çapında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,897$). Tanı anında evresi bilinen FISH pozitif 11 olgunun 4' ü (%36,4) evre II, 6' sı (%54,5) evre III, 1' i (%9,1) evre IV idi. FISH negatif olguların ise 26' sının 5' i (%19,2) evre I, 11' i (%42,3) evre II, 8' i (%30,8) evre III ve 2' si (%7,7) evre IV idi. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, hastaların evreleri arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,340$). Plevral invazyon FISH pozitif olan 14 olgunun 8' inde (%57,1); FISH negatif 30 olgunun 18' inde (%60) mevcuttu. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, plevral invazyon açısından anlamlı fark saptanmadı($p=1$)

FISH pozitif olguların 12' si (%80) pleomorfik karsinom, 3' ü (%20) dev hücreli karsinomdu. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, histolojik alt tipler arasında anlamlı fark saptandı. ($p=0,035$).

FISH pozitif olan 14 hastanın 11' inde (%78,6) kan damarı invazyonu, 14 hastanın 12' sinde (%85,7) lenfatik invazyon, 13 hastanın 9' unda (%69,2) perinöral invazyon vardı. FISH negatif olan 29 hastanın 22' sinde (%75,8) kan damarı, 25' inde (%86,2) lenfatik, 11' i (%37,9) perinöral invazyon vardı. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, kan damarı, lenfatik veya perinöral invazyon açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,584$, $p=0,649$ ve $p=0,096$).

FISH pozitif hastaların immünohistokimyasal çalışmalarında METMab skorlaması ile 4' ü (%26,7) skor 3+, 3' ü (%20) skor 2+, 2' si (%13,3) skor 1+, 6' sı (%40) skor 0 bulunarak toplam 7 olgu (%46,7) İHK pozitif kabul edildi. H-skorlaması yapıldığında FISH (+) olgularda H-skor ortalaması $118,33 \pm 101,34$ olup olguların 7' si (%46,7) İHK pozitif bulundu. FISH negatif hastaların immünohistokimyasal çalışmalarında METMab skorlaması ile 5' i (%15,6) skor 3+, 2' si (%6,2) skor 2+, 4'

ü (%12,5) skor 1+, 21' i (%65,7) skor 0 bulunarak toplam 7 olgu (%46,7) İHK pozitif kabul edildi. H-skorlaması yapıldığında FISH negatif olgularda H-skor ortalaması 72,81±85,57 olup olguların 7' si (%46,7) İHK pozitif bulundu. FISH pozitif olan ve olmayan olgular arasında, İHK sonuçlarında anlamlı fark görülmedi (p>0,05).

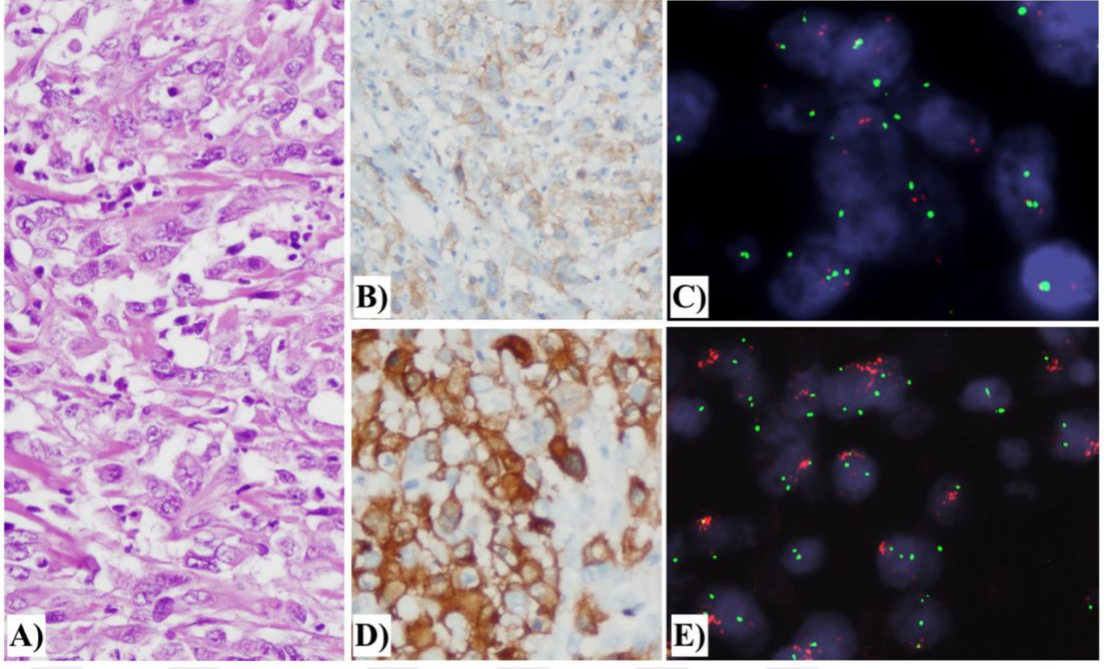
4.7.MET Amplifikasyonu Pozitif ile FISH Negatif Olgular Arasında Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar

FISH tekrarlananların immünohistokimyasal pozitif alanlardaki sonuçları kabul edilerek tüm olgular değerlendirildiğinde 47 olgunun 5' inde (%10,6) Cappuzzo skorlama sistemi ve UCCC kriterlerini karşılayan amplifikasyon saptandı. Olguların klinik, histopatolojik ve immünohistokimyasal özellikleri aşağıda Tablo 8' de verilmiştir. Aynı zamanda ilgili olgulara ait H&E, İHK ve FISH bulguları Resim 6-10' de gösterilmiştir.

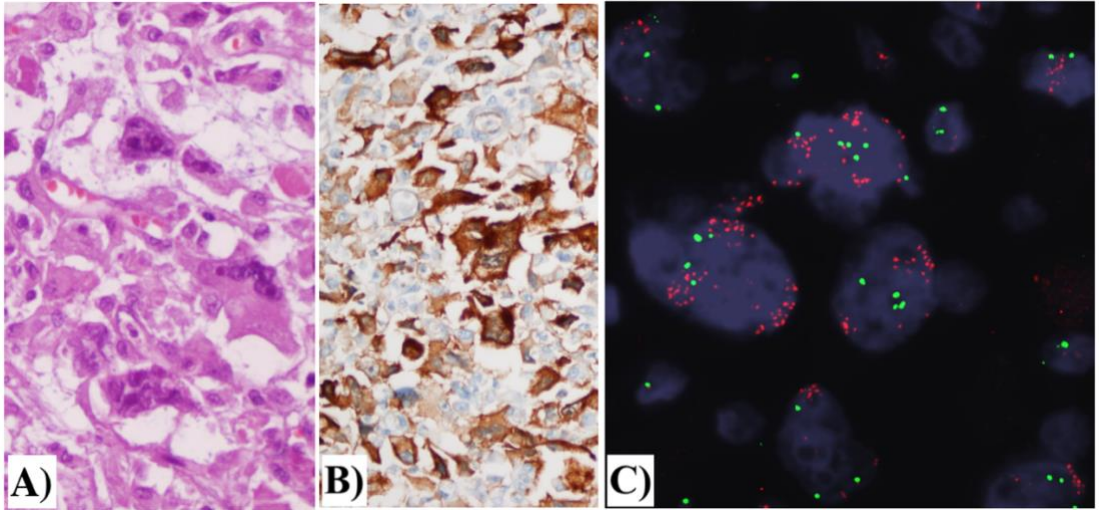
Tablo 8. MET Amplifikasyonu gösteren olguların özellikleri.

VAKA	10	30	35	37	55
Cinsiyet	E	E	E	E	K
Yaş	53	43	62	64	61
Sigara (Paket/yıl)	+ (40)	+ (60)	*	*	*
Evre	IIIB	IIIA	IIIA	IIIA	IIB
Lokalizasyon	Sağ-üst	Sağ	Sol-üst	Sol-üst	Sol-alt
Çap (mm)	55	190	90	80	31
Alt tip	PK	DHK	PK	PK	PK
Diferansiye KHDAK Komponenti	+ (AK)	-	+	+ (AK)	+ (AK)
Nekroz (%)	30	*	60	40	*
Stromal iltihabi yanıt	Hafif	*	Hafif	Hafif	Orta
Kan damarı invazyonu	-	+	+	+	+
Lenfatik invazyon	+	+	+	+	+
Perinöral invazyon	-	*	+	-	-
Plevra invazyonu	+	+	+	+	-
İHK MetMab Skoru	+ (Skor 2)	+ (Skor 3)	- (Skor 0)	- (Skor 0)	+ (Skor 3)
İHK H-Skoru	+ (160)	+ (270)	- (0)	- (130)	+ (210)
MET Ekzon 14 atlama mutasyon	Wild tip	Wild tip	Wild tip	Wild tip	Wild tip

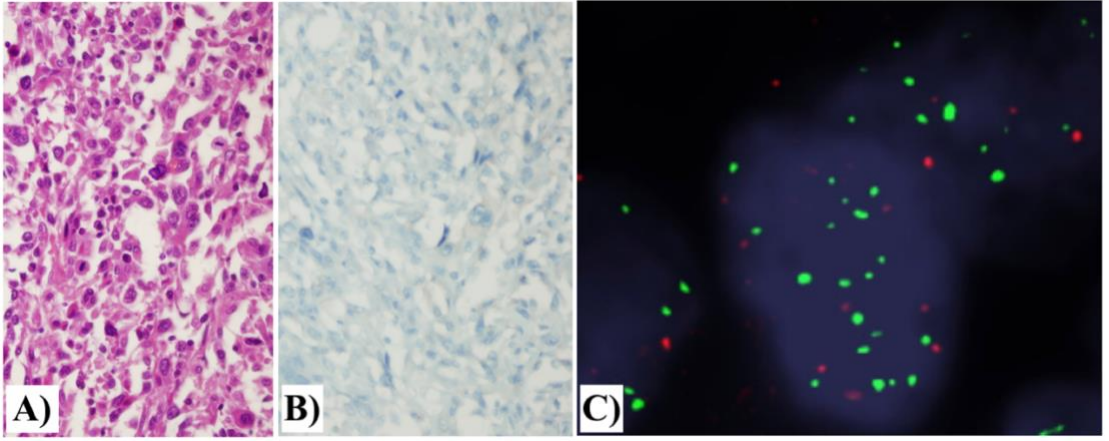
*: Bilinmiyor ; AK: Adenokarsinom ; PK: Pleomorfik karsinom ; DHK: Dev hücreli karsinom



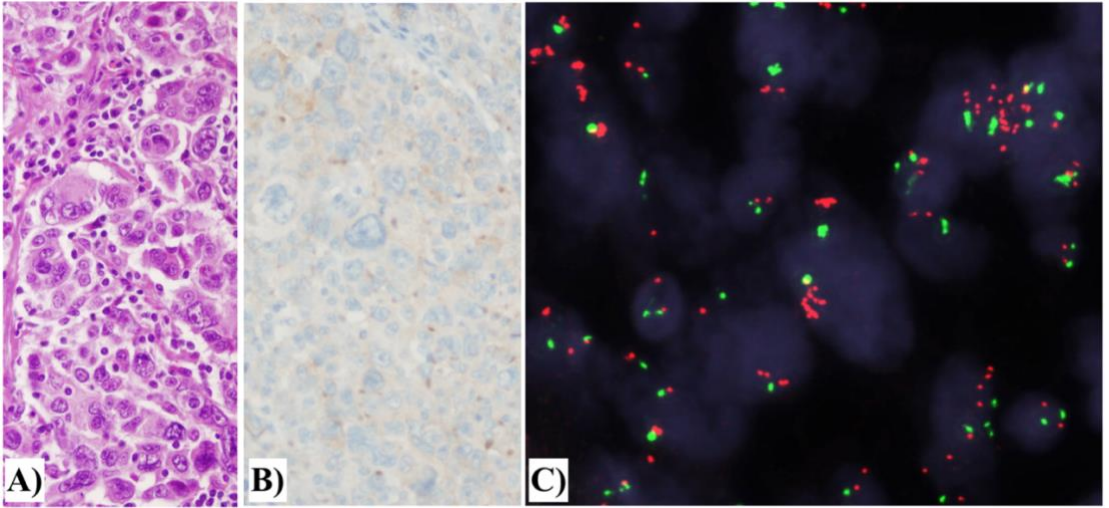
Resim 6. 10 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponent (H&E x400) B) Zayıf (skor 1+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) C) İHK skor 1+ boyanan alandaki düşük trizomi(x600) D) Kuvvetli (skor 3+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) E) İHK skor 3+ boyanan alandaki amplifikasyon (Cappuzzo: Tümörün >%10'unda sıkı gen kümeleri) (x600)



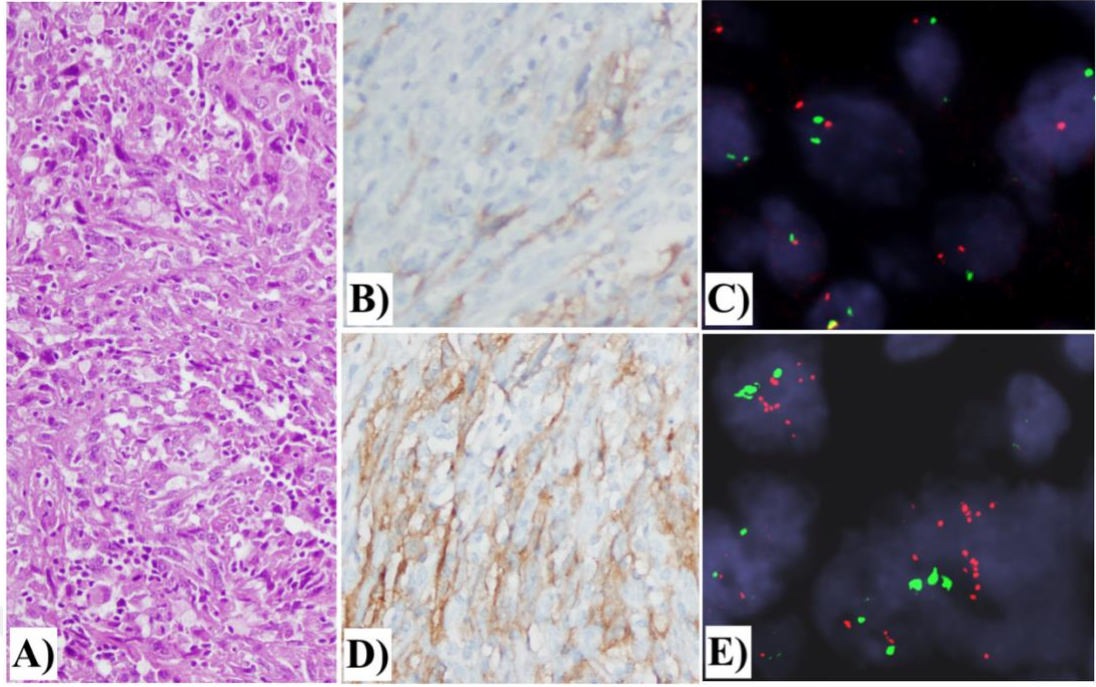
Resim 7. 30 no'lu olgu H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponent (H&E x400) B) Kuvvetli (skor 3+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) C) Amplifikasyon (Cappuzzo: MET/CEP7 >2)(x600)



Resim 8. 35 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponent (H&E x400) B) Negatif (skor 0) İHK (anti c-MET (SP44)x400) C) Amplifikasyon (Capuzzo: hücrelerin% ≥ 10 ' unda ≥ 15 kopya)(x600)



Resim 9. 37 no'lu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponent (H&E x400) B) Sitoplazmik noktasal granüler İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) C) Amplifikasyon (Cappuzzo: Tümörün >10 ' unda sıkı gen kümeleri) (x600)



Resim 10. 55 nolu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponent (H&E x400) B) Zayıf (skor 1+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) C) İHK skor 1+ boyanan alandaki dizomi (x600) D) Kuvvetli (skor 3+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) E) İHK skor 3+ boyanan alandaki amplifikasyon (Capuzzo: MET/CEP7 >2) (x600)

MET amplifikasyonu saptanan toplam 5 olgu vardı. Bu olguların 4' ü (%80) erkek, 1' i (%20) kadındı. MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, cinsiyet açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,456$). MET amplifikasyonu olan olguların yaş ortalaması $55\pm 8,4$ (43-64) idi. Ortalama $50\pm 14,14$ 8 paket/yıl sigara kullanım öyküsü mevcuttu. MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, yaş ve sigara kullanım öyküsü açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,126$ ve $0,807$).

MET amplifikasyonu pozitif saptanan olgulardaki ortalama tümör çapı $89,2\pm 60,83$ mm idi. MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, tümör çapı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,177$). Tanı anında 5 olgunun 1' i (%20) evre II, 4' ü (%80) evre III idi. MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, evre açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,211$). Olguların 4' ünde (%80) plevral invazyon mevcuttu. MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, plevra invazyonu açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,630$).

MET amplifikasyonu pozitif saptanan olguların 4' ü (%80) pleomorfik karsinom iken 1' i (%20) dev hücreli karsinom idi. MET amplifikasyonu pozitif olan

olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, histolojik alt tipler açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,184$).

MET amplifikasyonu pozitif saptanan 5 hastanın 4'ünde (%80) kan damarı invazyonu, tümünde lenfatik invazyon vardı. 4 hastanın 1'inde (%25) perinöral invazyon vardı. MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, kan damarı, lenfatik veya perinöral invazyon açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=1$).

MET amplifikasyonu pozitif saptanan hastaların İHK değerlendirmesine, eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti dahil edildiğinde, METMab skorlaması ile 2'si (%40) skor 3+, 1'i (%20) skor 2+, 1'i (%20) skor 1 ve 1'i (%20) skor 0 boyanma gösteriyor olup toplam 3 olgu (%60) İHK pozitif idi. Bu olgularda H-skor ortalaması $154\pm 101,14$ olup olguların 3'ü (%60) İHK pozitif idi. Eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti İHK değerlendirmesine dahil edildiğinde, MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, H-skor ve METMab skorları açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,062$ ve $p=0,255$).

MET amplifikasyonu pozitif saptanan hastalarda İHK pür sarkomatoid komponentte değerlendirildiğinde, METMab skorlaması ile 2'si (%40) skor 3+, 1'i (%20) skor 2+, 1'i (%20) skor 1 ve 1'i (%20) skor 0 boyanma gösteriyor olup toplam 3 olgu (%60) İHK pozitif idi. Bu olgularda H-skor ortalaması $154\pm 101,14$ olup olguların 3'ü (%60) İHK pozitif idi. FISH negatif hastalarda, İHK pür sarkomatoid komponentte değerlendirildiğinde, METMab skorlaması ile 4'ü (%12,5) skor 3+, 2'si (%6,2) skor 2+, 4'ü (%12,5) skor 1 ve 22'si (%68,8) skor 0 boyanma gösteriyor olup toplam 6 olgu (%18,7) İHK pozitif idi. Bu olgularda pür sarkomatoid komponentte H-skor ortalaması $62,73\pm 85,4$ olup olguların 9'u (%28,1) İHK pozitif idi. İHK pür sarkomatoid komponentte değerlendirildiğinde, MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, METMab skorları açısından anlamlı fark yokken; H-skorları arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,182$ ve $p=0,026$).

4.8.İHK ile FISH Karşılaştırılması

MET İHK ve FISH sonuçları 47 olgunun 33' ünde (%70,2) uyumlu sonuç gösterdi. Sonuçlar tek tek irdelendiğinde Tablo 9' daki gibidir:

Tablo 9. MET/İHK uyum oranları

FISH Değerlendirilen olgular; (N/%)	
İHK (-) / FISH (-)	26 (%55,3)
İHK (+) / FISH (+)	7 (%14,9)
İHK (-) / FISH (+)	7 (%14,9)
İHK (+) / FISH (-)	7 (%14,9)

MET İHK pozitifliği ile FISH pozitifliği arasında zayıf korelasyon görüldü ($R=0,253$). İHK ile amplifikasyon arasında ters ilişki olduğu görüldü ($R=-0,228$).

İHK sonucunun FISH sonucuna etkisini göstermek için ikili lojistik regresyon analizi yapıldı. İHK pozitif olan olguların İHK negatif olgulara göre daha fazla FISH pozitif olma olasılığı vardı. ($OR=3,125$). İHK pozitif olan olguların İHK negatif olgulara göre MET amplifikasyonu pozitif olma olasılığı vardı ($OR=0,237$).

MET gen kopya sayısı değişikliklerini saptamada FISH altın standart kabul edildiğinde İHK' nın duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri hem amplifikasyon pozitifliği hem de FISH pozitifliği için ayrı ayrı hesaplandı. Değerlendirme alanına tümörün eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti dahil edilmediğinde (pür sarkomatoid komponent) saptanan FISH sonuçları ile İHK boyanması gösteren alanlarda (pür sarkomatoid ya da diferansiye KHDAK komponent) saptanan FISH sonuçları için ayrı ayrı hesaplamalar yapıldı. (Tablo 10)

Tablo 10. İHK'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

FISH POZİTİFLİĞİ İÇİN;			
Pür Sarkomatoid komponent		Pür sarkomatoid ve/veya diferansiye KHDAK komponent (İHK Boyanması gösteren Alan)	
Duyarlılık (Sensitivite)	% 42,9	Duyarlılık (Sensitivite)	% 50
Özgüllük (Spesifisite)	% 81,9	Özgüllük (Spesifisite)	% 78,8
Pozitif prediktif değer	% 50	Pozitif prediktif değer	% 50
Negatif prediktif değer	% 77,1	Negatif prediktif değer	% 78,8
AMPLİFİKASYON POZİTİFLİĞİ İÇİN;			
Pür Sarkomatoid komponent		Pür sarkomatoid ve/veya diferansiye KHDAK komponent (İHK Boyanması gösteren Alan)	
Duyarlılık (Sensitivite)	% 60	Duyarlılık (Sensitivite)	% 60
Özgüllük (Spesifisite)	% 78,6	Özgüllük (Spesifisite)	% 73,8
Pozitif prediktif değer	% 25	Pozitif prediktif değer	% 21,4
Negatif prediktif değer	% 94,3	Negatif prediktif değer	% 93,9

4.9.Floresan İn Situ Hibridizasyon Bulguları Heterojenitesi

Değerlendirilebilen 47 olgunun FISH sonucunda ortalama MET gen kopya sayısı $4,1 \pm 3,7$ bulundu ve olguların 15' i (%31,9) FISH (+), 5'i (%10,6) MET amplifikasyonu pozitif olarak değerlendirildi. Bu olguların immunhistokimyasal çalışmasında MetMab skorlamasına göre 9' u (%19,1) skor 3+, 5' i (%10,6) skor 2+, 6' sı (%12,8) skor 1+, 27' si (%57,5) skor 0 boyanma gösterdi ve 14' ü (%29,7) İHK pozitif kabul edildi. H- skorlamasına göre ise skorlar 0-295 arasında değişmekte olup ortalama $72,44 \pm 90,55$ idi ve 14' ü (%29,7) İHK pozitif bulundu.

İmmünohistokimyasal çalışmada bazı olgularda heterojen boyanmalar mevcuttu. 47 olgunun 22' sinde (%46,8) İHK pozitif alanlarda FISH çalışması tekrarlandı. Bu olguların tümöre eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti dahil edilmediğinde (pür sarkomatoid komponent) yapılan ilk FISH değerlendirilmesinde ortalama MET gen kopya sayısı $3,52 \pm 4,19$ bulundu ve 6' sı (%27,3) FISH (+), 2'si (%9) amplifikasyon olarak değerlendirildi. Bu olgularda tümörün eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti dahil edilmediğinde (pür sarkomatoid komponent) değerlendirilen immunhistokimyasal çalışmasında, METMab skorlamasına göre 7' si (%31,8) skor 3+, 3' ü (%13,7) skor 2+, 5' i (%22,7) skor 1+, 7' si (%31,8) skor 0 boyanma gösterdi ve 10' u (%45,5) İHK pozitif kabul edildi. H- skorlamasına göre ise

skorlar 0-295 arasında değişmekte olup ortalama $126,59 \pm 98,2$ idi. Olguların 10' u (%45,5) İHK pozitif bulundu. FISH değerlendirmesi İHK ile herhangi bir boyanma gösteren alanlarda tekrarlandığında ortalama MET gen kopya sayısı $4,77 \pm 4,53$ bulundu. Ancak bu grup içindeki komponent (pür sarkomatoid ve/veya diferansiye KHDAK) ve İHK boyanma kuvveti farklılık göstermekteydi.

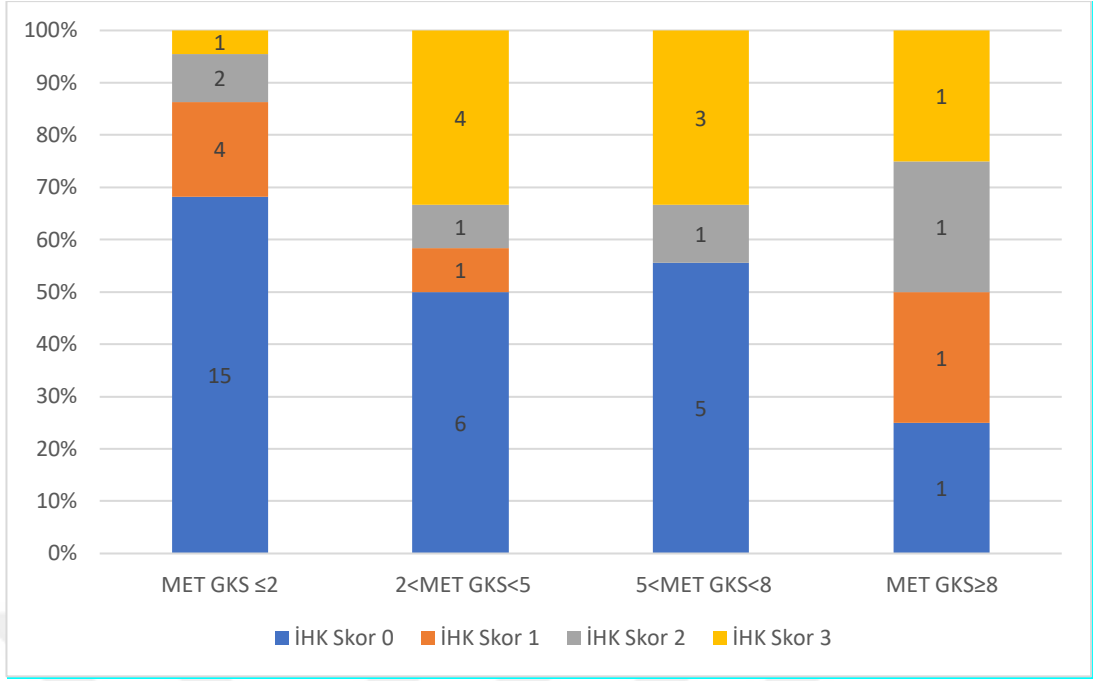
Tekrarlanan olgular içinde İHK boyanan alanın da pür sarkomatoid komponent olduğu 13 olguda ilk değerlendirmedeki MET gen kopya sayısı $4,42 \pm 5,33$ iken; tekrar değerlendirmede MET gen kopya sayısı ortalama $6,18 \pm 5,46$ bulundu. Bu olgulardan 10' u skor 3+, 3'ü skor 2+ boyanma göstermekteydi.

Tekrarlanan olgular içinde İHK boyanan alanın diferansiye KHDAK komponenti olduğu 9 olguda, ilk değerlendirmedeki MET gen kopya sayısı $2,23 \pm 0,63$ iken; tekrar değerlendirmede MET gen kopya sayısı ortalama $2,73 \pm 1,08$ bulundu. Bu olgulardaki diferansiye KHDAK komponenti 6' sında (%66,7) AK, 3' ünde (%33,3) SHK idi. Bu olgulardan 8' i skor 3+, 1'i skor 1+ boyanma göstermekteydi.

Tekrarlanan olgular içinde İHK boyanan alanın skor 3+ olduğu 18 olguda, ilk değerlendirmedeki MET gen kopya sayısı $3,79 \pm 4,6$ iken; tekrar değerlendirmede MET gen kopya sayısı ortalama $5,27 \pm 4,88$ bulundu. Tekrar değerlendirme bu olgulardan 10' unda pür sarkomatoid, 8' inde diferansiye KHDAK komponentinde yapılmıştı. Diferansiye KHDAK komponentlerin 6' sı (%75) AK, 2' si (%25) SHK idi.

FISH tekrar edilen 22 olguda, yapılan ilk (pür sarkomatoid komponentte) değerlendirmedeki MET gen kopya sayısı ile İHK boyanması gösteren alanlarda tekrarlanan değerlendirmedeki MET gen kopya sayısı t-testi ile karşılaştırıldı. İHK boyanması gösteren alanlarda tekrar edilen FISH değerlendirilmesinde gen kopya sayılarında anlamlı artış görüldü ($p=0,027$).

İHK sonucu pozitif olan olgularda MET gen kopya sayısı ortalama $5,50 \pm 5,25$ iken İHK sonucu negatif olan olgularda MET gen kopya sayısı ortalama $3,49 \pm 2,70$ idi. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, MET gen kopya sayısı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,194$). Olguların İHK skorlarına göre ortalama gen kopya sayıları dağılımı Grafik 5' de gösterilmiştir.

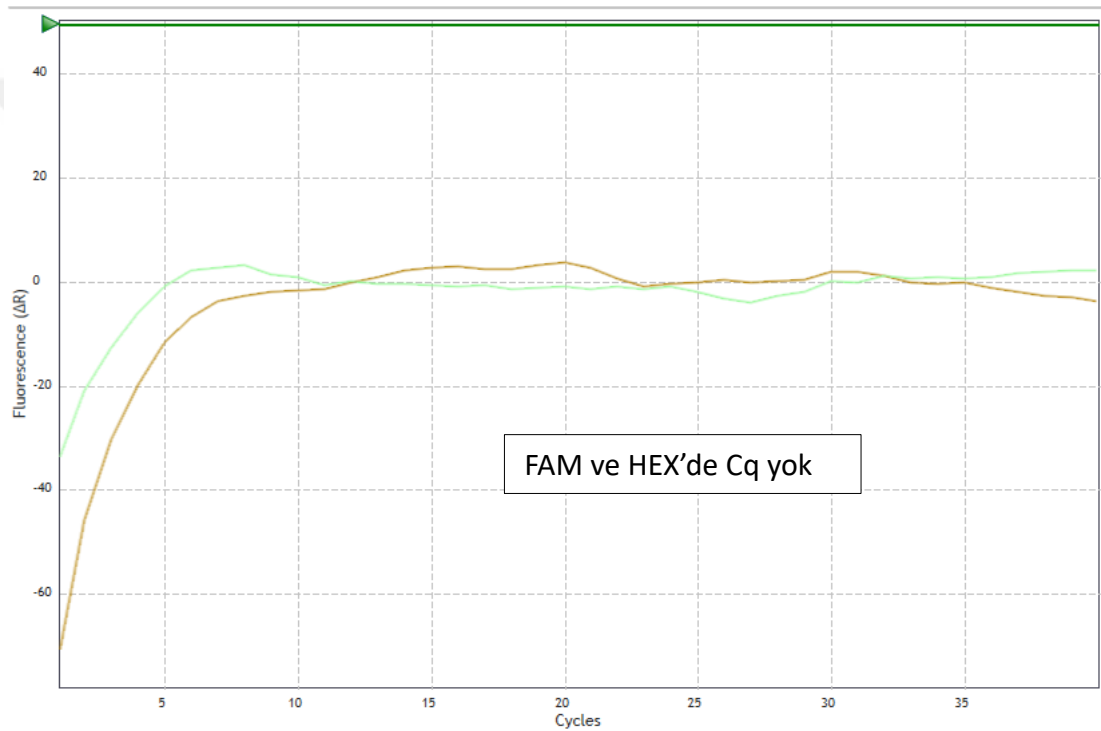


Grafik 5. İHK METMab skorlarına göre FISH' de saptanan ortalama MET gen kopya sayıları dağılımı

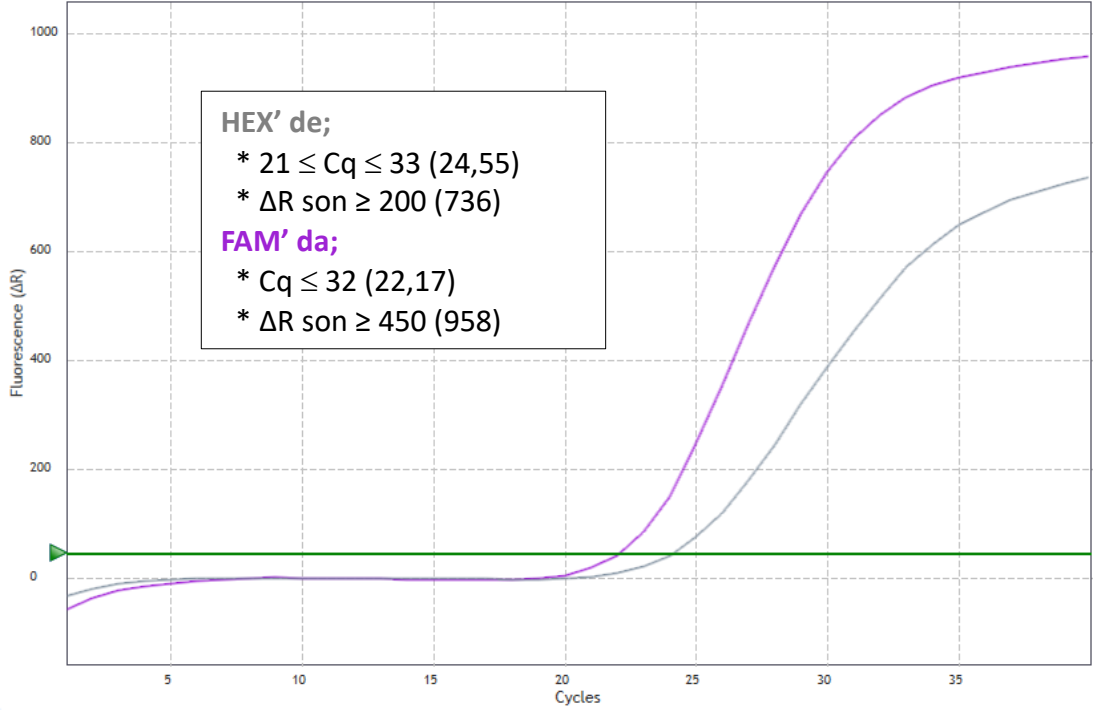
4.10. Olguların Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

FISH uygulanan 47 olgunun 40' ına (%85,1) RT-PCR uygulandı. 7 olgu spesimenlerin 10 yıldan eski olmaları ve RNA kalitelerinin bozuk olması ihtimali nedeniyle PCR uygulamasına dahil edilmedi.

Çalışmaya dahil edilen 40 olgunun formalinle fikse parafine gömülü dokudan izole edilen RNA konsantrasyonları minimum 113 ng/dl, maksimum 1143 ng/dl olup ortalama $457,23 \pm 306,69$ idi. Pozitif ve negatif kontrol sonuçları aşağıda gösterildiği gibidir. (Resim 11 ve 12).



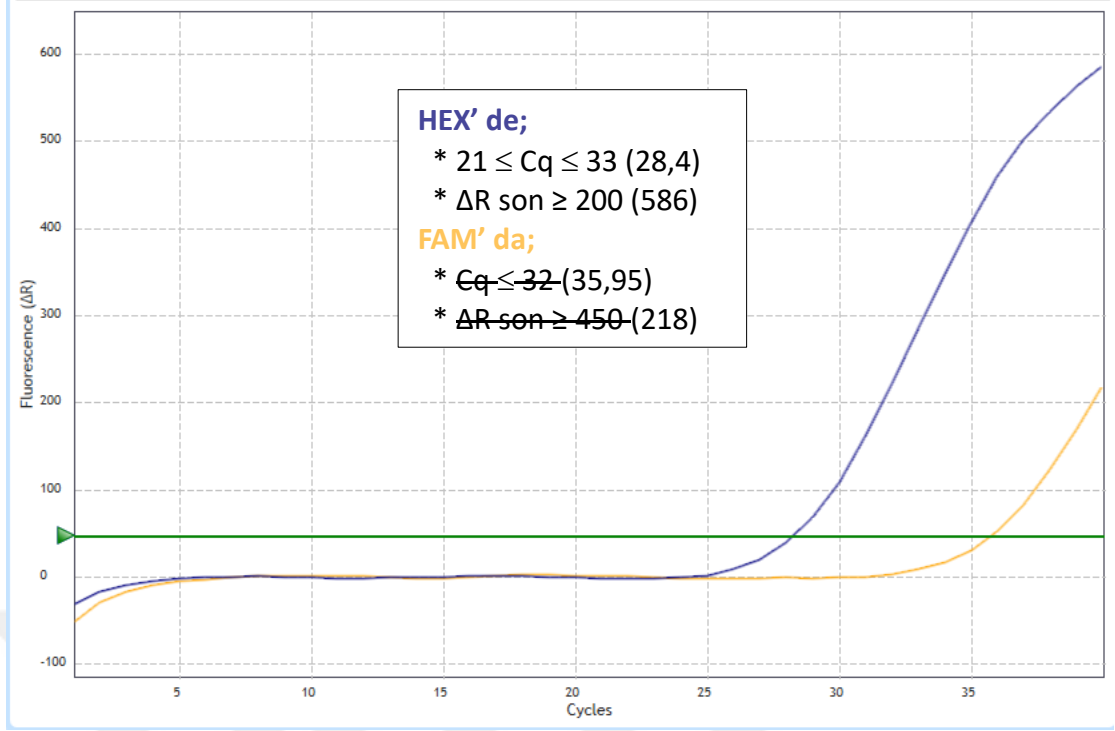
Resim 11. Negatif kontrol RT-PCR sonucu : HEX ve FAM' da Cq görülmedi



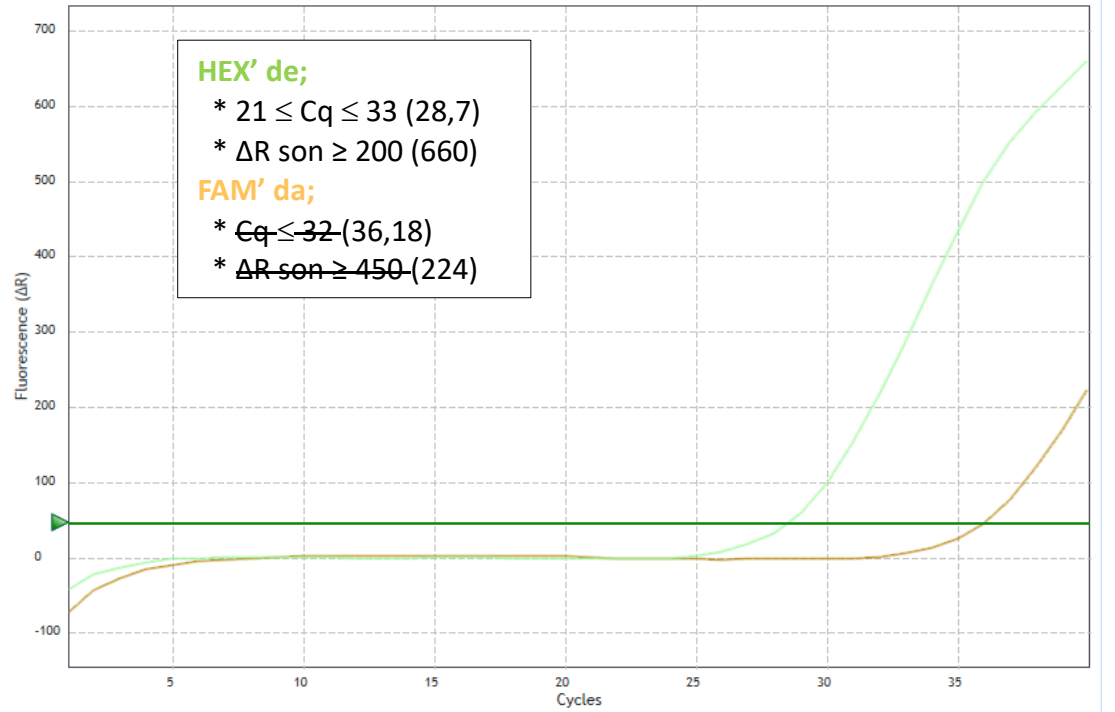
Resim 12. Pozitif kontrol RT-PCR sonucu: HEX ve FAM' daki Cq ve ΔR son değerleri pozitiflik kriterlerini karşılıadı

Çalışma sonucunda 40 olgunun 8' i (%20) invalid olarak değerlendirildi. İnvaid olgular için RNA izolasyonu sonrası çalışma tekrarlandı. Tekrar çalışması sonrası 4 (%10) olgu invalid olarak değerlendirildi. Tüm olgular için RT-PCR sonucu MET ekzon 14 atlama mutasyonu için negatif (wild tip). Değerlendirilebilen 36 olgunun 2' sinde (%5,5) pozitiflik kriterini karşılamayan düşük ışımaya saptandı. İlgili hastaların özellikleri tablo11'de ve RT-PCR sonuçları Resim 13 ve 14' da gösterildi. Bu iki vakadan tekrar RNA izolasyonu yapıldı ve RT-PCR çalışması tekrarlandı ancak sonuç değişmedi.

Kullanılan RT-PCR kit içeriğinde MET ekzon 14 atlama mutasyonu yanı sıra ALK füzyon, ROS1 füzyon (ekzon 32 breakpoint, ekzon 34 breakpoint ve ekzon 35-36 breakpoint) ve RET füzyon (ekzon 12 breakpoint ve ekzon 8-11 breakpoint) da değerlendirildi. Değerlendirilebilen 36 olgu her füzyon için negatif (wild tip) olarak saptandı.



Resim 13. 41 no'lu olguda RT-PCR sonucu: FAM' daki Cq ve ΔR son deęerleri pozitiflik kriterlerini karřılamadı. Ancak biraz gecikmiř bir siklus seviyesinde daha dūřuk seviyede ıřıma gōrōldū.

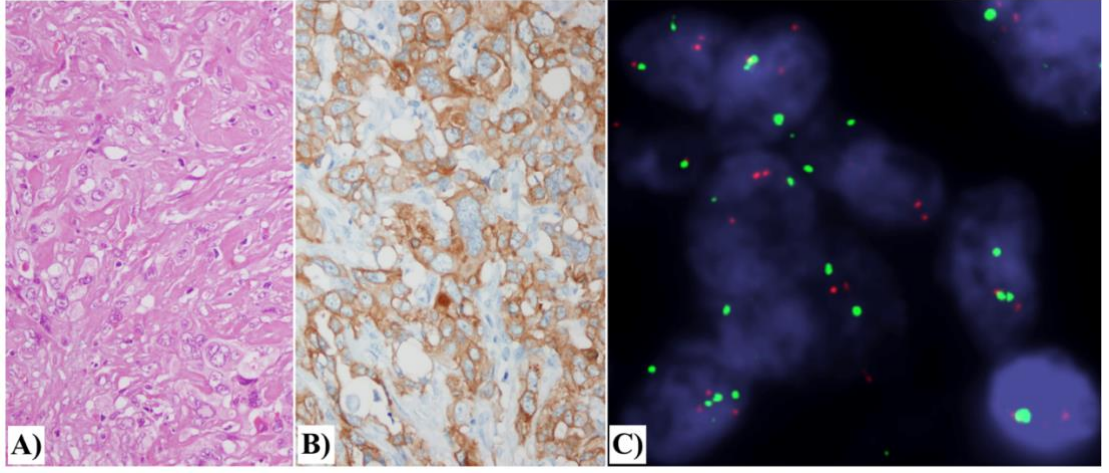


Resim 14. 53 no'lu olguda RT-PCR sonucu: FAM' daki Cq ve ΔR son deęerleri pozitiflik kriterlerini karřılamadı. Ancak biraz gecikmiř bir siklus seviyesinde daha dūřuk seviyede ıřıma gōrōldū.

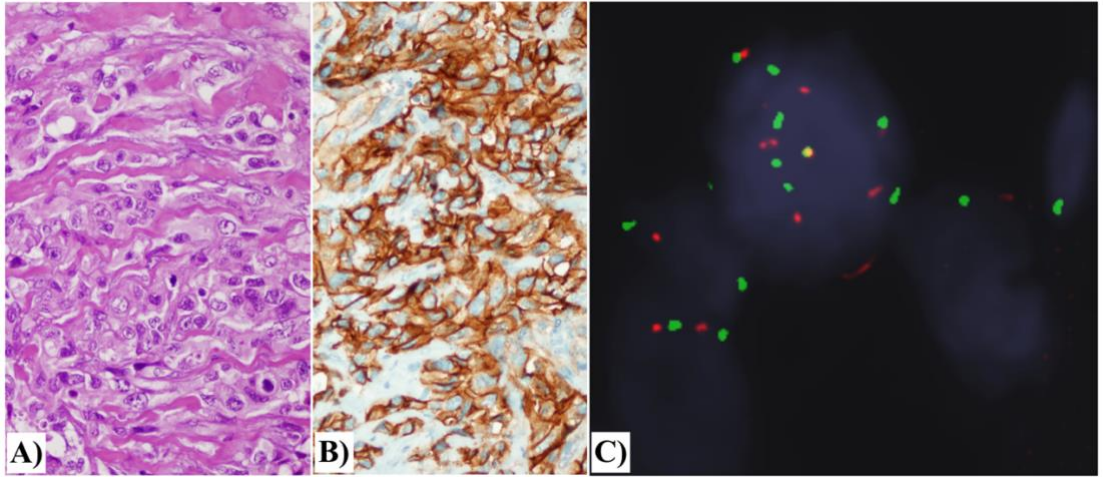
Tablo 11. RT-PCR sonucunda MET ekzon 14 atlama mutasyon için gecikmiş siklusta düşük seviyede ışma gösteren olguların özellikleri.

VAKA	41	53
Cinsiyet	E	K
Yaş	70	75
Sigara	*	20
Evre	IIB	IVB
Neoadjuvan tedavi	-	-
Alt tip	Pleomorfik karsinom	Pleomorfik karsinom
Epitelyal komponent	+ (AK)	+ (AK)
Çap (mm)	25	50
Nekroz (%)	10	30
Kan damarı invazyonu	+	+
Lenfatik invazyon	+	-
Perinöral invazyon	-	-
Plevral invazyon	+	+
İHK (MetMAb Skor)	+ (Skor 3)	+ (Skor 3)
İHK (H-skor)	+ (250)	+ (295)
FISH sonucu (Cappuzzo)	Düşük trizomi	Yüksek polizomi
Tanı Tarihi	26.2.2014	3.4.2017
İzole edilen RNA Konsantrasyonu	700	342
İzole edilen RNA Konsantrasyonu (tekrarda)	597	392

* : Bilinmiyor ; -: Yok ; +: Var



Resim 15. 41 nolu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponentte (H&E x400) B) Kuvvetli (skor 3+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44)x400) C) FISH' de düşük trizomi (x600)



Resim 16. 53 nolu olgunun H&E, İHK ve FISH özellikleri A) Sarkomatoid komponentte (H&E x400) B) Kuvvetli (skor 3+) İHK boyanması (anti c-MET (SP44) x400) C) FISH' de yüksek polizomi (x600)

4.11. MET Ekzon 14 Atlama Mutasyonu Pozitif ile MET Ekzon 14 Atlama Mutasyonu Negatif Olgular Arasında Klinik ve Histopatolojik Farklılıklar

RT-PCR sonucunda geç siklusta düşük floresan ışımaya görülen 2 olgunun özelliklerine baktığımızda özellikleri şöyleydi: Olgulardan 1' i erkek, diğeri kadındı. Erkek hasta 70 yaşında, evre IIB, AK komponenti içeren pleomorfik karsinom olgusuydu. İHK ile METMab skor 3+, H-skor 250 boyanma göstermekteydi. FISH sonucu Cappuzzo kriterlerine göre düşük trizomi ile uyumluydu. Kadın hasta ise 75 yaşında, 20 paket yıl sigara kullanımı öyküsü olan, evre IVB, AK komponenti içeren pleomorfik karsinom olgusuydu. İHK ile METMab skor 3+, H-skor 295 boyanma göstermekteydi. FISH sonucu Cappuzzo kriterlerine göre yüksek polizomi ile uyumluydu.

Bu iki olgu MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif kabul edildiğinde İHK ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasındaki zayıf korelasyon bulundu ($Rho=0,323$).

Bu iki olgu MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif kabul edildiğinde, MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan ve olmayan gruplar arasında klinikopatolojik parametrelerde (cinsiyet, yaş, sigara kullanım miktarı, tümör boyutu, evre, histolojik alt tip, kan damarı, lenfatik veya perinöral invazyon vb.) istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$). MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında, pür sarkomatoid komponentte değerlendirilen İHK H-skor ve METMab skorlarında anlamlı fark mevcuttu. MET ekzon 14 mutasyonu olan olgularda İHK skorları daha yüksekti ($p=0,002$ ve $p=0,014$).

MET ekzon 14 atlama mutasyonu gösteren olguların ortalama MET gen kopya sayısı $4,8 \pm 3,39$ idi. Olguların 1' i FISH (+) (yüksek polizomi) bulundu. MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında, ortalama MET gen kopya sayısı veya FISH sonucu ile anlamlı fark görülmedi ($p=0,942$ ve $p=1$).

Çalışmamızda İHK, FISH ve RT-PCR olguların, klinik, histomorfolojik ve moleküler özellikleri Tablo 12' de özetlenmiştir.

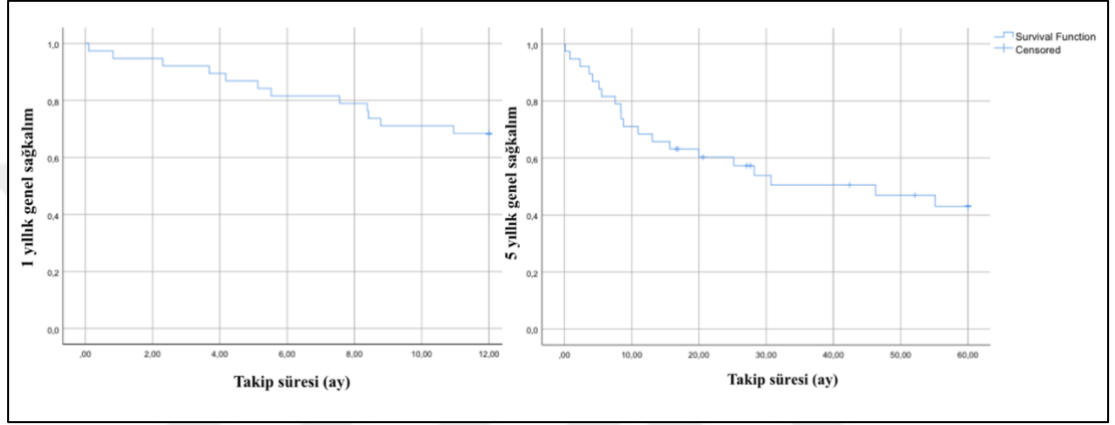
Tablo 12. İHK, FISH ve RT-PCR uygulanan hastaların özellikleri

Olgu No	Yaş	Cins.	Sigara	Alt tip	Evre	Çap (mm)	Ex	İHK	Capp.	FISH	Ort. GKS	RT-PCR
1	59	E	*	KS	*	190	*	N	D	N	2,0	WT
7	64	E	*	PK	*	45	*	N	D	N	2,0	WT
8	69	E	0	PK	IIIA	80	*	N	D	N	2,0	WT
10	53	E	40	PK	IIB	55	E	P	A	P	12,0	WT
15	63	E	45	PK	IA3	25	E	N	D	N	2,0	WT
17	63	E	40	PK	IIB	55	E	P	DP	N	2,6	WT
22	75	K	3	DHK	IIIA	85	H	N	YP	P	7,4	WT
25	38	E	20	DHK	IIA	50	H	N	YP	P	7,7	WT
27	67	E	40	KS	IIIA	100	H	N	DT	N	2,2	WT
28	64	E	50	PK	*	38	E	P	YP	P	3,5	WT
29	65	E	*	DHK	*		E	P	DT	N	2,1	WT
30	43	E	60	DHK	IIIA	190	E	P	A	P	20,6	WT
31	77	E	*	PK	*	40	E	N	D	N	2,0	WT
32	56	E	*	PK	*	65	E	N	YP	P	7,4	WT
33	51	E	0	PK	IIB	40	E	P	D	N	2,0	WT
34	48	K	30	KS	IIA	45	E	P	DP	N	2,3	WT
35	62	E	*	PK	IIIA	90	E	N	A	P	12,4	WT
36	62	E	*	PK	*	55	E	P	YP	P	5,1	WT
37	64	E	*	PK	IIIA	80	E	N	A	P	10,0	WT
38	67	E	40	KS	IIB	95	H	N	DP	N	3,3	WT
40	78	E	*	PK	IIB	105	E	N	D	N	2,0	WT
41	70	E	*	PK	IIB	25	E	P	DT	N	2,4	#
42	59	E	*	PK	IIB	65	E	N	D	N	2,0	WT
43	62	E	*	PK	IIB	40	E	P	YP	P	5,6	WT
44	61	E	*	PK	IIIA	60	E	N	YP	P	6,5	WT
45	67	E	*	PK	IIB	45	E	P	D	N	2,0	WT
46	62	K	60	PK	IB	22	E	N	D	N	2,0	WT
47	53	E	40	PK	IVB	80	E	N	DP	N	2,7	WT
48	70	E	70	KS	IIB	90	E	N	D	N	2,0	WT
49	49	E	40	PK	IIIA	75	E	N	YT	N	2,8	WT
50	67	E	*	PK	IVB	50	E	N	D	N	2,0	WT
51	68	K	*	PK	IB	32	E	N	D	N	2,0	WT
52	65	E	100	KS	IB	75	E	N	D	N	2,0	WT
53	75	K	20	PK	IVB	50	E	P	YP	P	7,2	#
54	62	E	70	PK	IIB	30	H	N	YP	P	3,9	WT
55	61	K	*	PK	IIB	31	E	P	A	P	7,6	WT

P: Pozitif ; N: Negatif ; *: Bilinmiyor ; #: RT-PCR'da gecikmiş siklusta düşük seviyede ışına ; PK: Pleomorfik Karsinom ; KS: Karsinosarkom ; DHK: Dev hücreli karsinom ; GKS: Gen kopya sayısı ; D: Dizomi ; DT: düşük Trizomi ; YT: Yüksek trizomi ; DP: Düşük polizomi ; YP: Yüksek polizomi ; A: Amplifikasyon ; Capp. : Cappuzzo

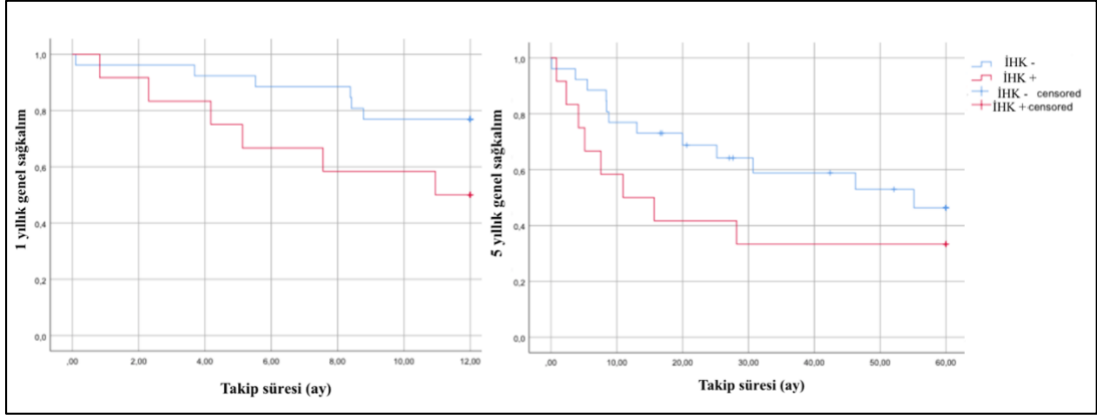
4.12. Hastaların Sağkalım Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen hastaların 55 hastanın 37' sinin (%67,2) eks olduğu, 10' unun (%18,1) yaşadığı biliniyordu. Eks olan 37 hastanın 28' inin (%75,6) eks tarihine ulaşılabilirdi. Bilgisine ulaşılabilen 38 (%69) hastaların 1 yıllık sağkalım oranı %69,4 iken 5 yıllık sağkalım oranı %47,4 bulundu. (Grafik 6)



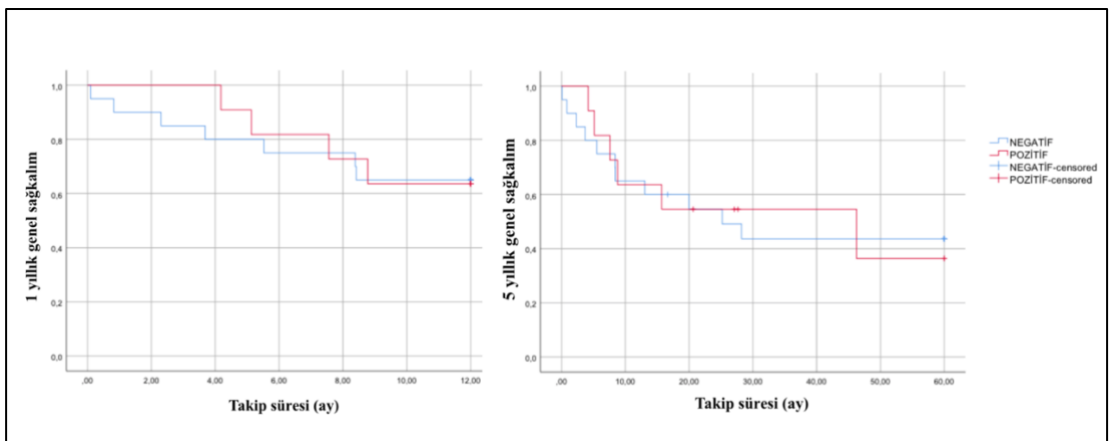
Grafik 6. Hastaların 1 ve 5 yıllık genel sağkalımı

MET İHK pozitif olan 15 olgunun tamamı eks olmuştu. Bunların 12' sinin (%80) eks tarihine ulaşılabilirdi. MET İHK negatif olan 40 olgunun 10' u (%25) yaşadığı, 22' sinin (%55) eks olduğu biliniyordu. 8 (%20) hastanın bilgisine ulaşılamadı. İHK negatif olup eks olduğu bilinen hastaların 16' sının (%72,7) eks tarihi bilgisine ulaşılabilirdi. Sağkalım değerlendirmesi, bilgisine ulaşılabilen MET İHK pozitif hastaların 12' si (%80) ve MET İHK negatif hastaların 26' sı (%65) üzerinden yapıldı. MET İHK pozitif olanlar için 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %76,9 ve %33,3 bulundu. İHK negatif grupta ise 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %50 ve %53,8 idi. İHK pozitif ve İHK negatif olguların 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalımlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Log Rank $p=0,079$ ve $p=0,190$). (Grafik 7)



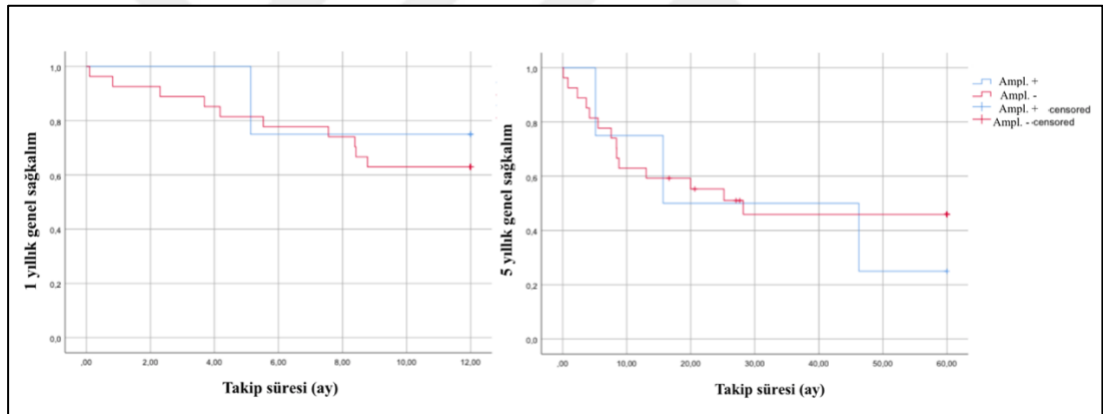
Grafik 7. İHK pozitifliği ile 1 ve 5 yıllık genel sağkalım ilişkisi

FISH uygulanan 47 hastada FISH pozitif olan 15 olgunun 11' inin (%73,3) eks olduğu, 3' ünün (%20) yaşadığı biliniyordu. 1 (%6,6) hastanın bilgisine ulaşılamadı. FISH pozitif olup eks olduğu bilinen 11 olgunun 8' inin (%72,7) eks tarihi bilgisine ulaşıldı. FISH negatif olan 32 olgunun 23' ünün (%71,9) eks olduğu, 3' ünün (%9,4) yaşadığı biliniyordu. 6 (%18,7) hastanın bilgisine ulaşılamadı. FISH negatif olup eks olduğu bilinen 23 olgunun 16' sının (%69,5) eks tarihi bilgisine ulaşıldı. Sağkalım değerlendirmesi, bilgisine ulaşılabilen MET FISH pozitif hastaların 11' i (%73,3) ve MET FISH negatif hastaların 26' sı (%81,2) üzerinden yapıldı. MET FISH pozitif olanlar için 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %63,6 ve %45,5 bulundu. FISH negatif grupta ise 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %65 ve %45 idi. FISH pozitif ve negatif olguların 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalımlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Log Rank $p=0,944$ ve $p=0,984$). (Grafik 8)



Grafik 8. FISH pozitifliği ile 1 ve 5 yıllık genel sağkalım ilişkisi

FISH uygulanan 47 hastada MET amplifikasyonu pozitif olan 5 olgunun tamamı eks olmuştu. MET amplifikasyonu pozitif olup eks olduğu bilinen 5 olgunun 4' inin (%80) eks tarihi bilgisine ulaşıldı. MET amplifikasyonu negatif olan 42 olgunun 29' unun (%70) eks olduğu, 6' sının (%14,3) yaşadığı biliniyordu. 7 (%16,7) hastanın bilgisine ulaşılamadı. MET amplifikasyonu negatif olup eks olduğu bilinen 29 olgunun 20' sinin (%69) eks tarihi bilgisine ulaşıldı. Sağkalım değerlendirmesi, bilgisine ulaşılabilen MET amplifikasyonu pozitif hastaların 4' ü (%80) ve MET amplifikasyonu negatif hastaların 26' sı (%61,9) üzerinden yapıldı. MET amplifikasyonu pozitif olanlar için 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %75 ve %25 bulundu. MET amplifikasyonu negatif grupta ise 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %63 ve %48,1 idi. MET amplifikasyonu pozitif ve negatif olguların 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalımlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Log Rank p=0,660 ve p=0,680).(Grafik 9)



Grafik 9. MET amplifikasyon pozitifliği ile 1 ve 5 yıllık genel sağkalım ilişkisi

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri Türkiye’de ve dünyada en sık görülen kanserdir. 2018 verilerine göre tüm yaş ve cinsiyetler beraber değerlendirildiğinde dünyada görülme sıklığı %11,6 ile 1. sıradadır (1). Türkiye kanser istatistikleri 2014 verilerine göre görülme sıklığı erkeklerde %21,1 ile 1. sırada, kadınlarda %5 ile 5. sırada yer alır. Akciğer kanserinde hastaların %52,7’ si ileri evrede teşhis edilmektedir ve beklenen sağkalım oranları düşüktür (2). Dünyada kansere bağlı ölümlerin %18,4’ ü akciğer kanserine bağlı ölümlerdir (1).

Akciğer tümörlerinin yarısından fazlasını karsinomlar oluşturur. Bunların %79,2’ si KHDAK, %16,6’ sı KHK’ dir. KHDAK’ lerin %43,8’ i AK, %37,5’ i SHK, %1,8’ i BHK’ dir (2). PSK’ ler ise KHDAK’ lerin az diferansiye bir alt tipi olup tüm akciğer kanserlerinin %0,3-1,3’ ünü oluşturur (3,4).

Kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayıran genetik farklılıkların saptanmasıyla (mutasyonlar) birlikte hedefe yönelik tedaviler gelişmeye başlamıştır. 2004 yılında aktive edici mutasyonların saptanması ve bu molekülü hedefleyen antikorlardan klinik yarar izlenmesiyle hedefe yönelik tedaviler hız kazanmıştır (72,73). 2018 moleküler kılavuzunda akciğer kanserinde tedaviye yönelik ön plandaki hedef moleküller EGFR, ALK ve ROS-1’ dir. Bunlar dışında bakılması önerilen diğer mutasyonlar ise BRAF, MET, RET, ERBB2 (HER2) ve KRAS’ tır (74).

PSK genel bir terimdir. Epitelyal ve sarkomatoid bileşenler içeren tümörlerdir. Pleomorfik karsinom, iğsi hücreli karsinom, dev hücreli karsinom, karsinosarkom ve pulmoner blastom bu grupta yer alan akciğer tümörü tipleridir(45).

PSK’ ler, oldukça nadirdir(3,30). Olguların tanı anındaki yaş ortalaması 60-70’ tir. Erkeklerde daha sık görülmektedir ve hastaların çoğunluğu sigara içicisidir. Genellikle periferik yerleşimli büyük (ortalama 4-5 cm), nekrotik alanlar içeren solid tümörlerdir. Vakaların yarısından fazlasında (%51,8) plevral invazyon görülmektedir. Diğer histolojik alt tiplerle karşılaştırıldığında daha kötü prognozlidir. Agresif cerrahi tedavi ve postoperatif kemoterapi verildiğinde bile 5 yıllık sağkalım oranı %25’ tir. Konvansiyonel kemoterapilere diğer KHDAK’ lere göre yüksek oranda direnç göstermeleri nedeniyle PSK’ lerin moleküler analizi ve mutasyon sıklıkları değerlendirilerek hedefe yönelik tedaviler geliştirilmiştir (3,69,70).

MET ilk olarak 1980’ li yıllarda insan osteosarkom hücre dizisinde TRP-MET füzyon geni olarak tanımlanmıştır (76). HGF, MET’ in doğal ligandıdır. HGF/MET

yolağının embriyogenez, karaciğer rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde önemli rolü vardır (11–13). Anormal HGF/MET sinyal aktivasyonu hücrelerin hayatta kalması, proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu, diferansiyasyonunu uyararak tümör gelişimi ve progresyonu ile sonuçlanabilir (14,16,19,77–79).

MET yolundaki düzensizlikler çeşitli yollarla gerçekleşir: gen mutasyonu, amplifikasyon, yeniden düzenlenme ve aşırı protein ekspresyonu (86). Düzensiz HGF/MET sinyalini ortadan kaldırmak için geliştirilmiş 3 terapötik strateji vardır: Anti- HGF monoklonal antikorlar, anti-MET monoklonal antikorlar ve anti -MET TKİ' ler (86). Faz II klinik çalışması, yüksek MET ekspresyonu olan ileri evre KHDAK' li hastalarda tek kollu anti-MET monoklonal antikor Onartuzumab' ın aktivitesini göstermiştir (115). KHDAK' li hastalarda MET inhibitörlerinin etkisini araştıran ilk faz III klinik çalışmaların sonuçları hayal kırıklığı yaratmıştır (116–119). Ancak bu çalışmalarda MET overekspresyonu ve/veya amplifikasyonu sergileyen hastalar hedeflenmiştir. MET ekzon 14 atlama mutasyonları olan hastalar dahil edildiğinde Krizotinib' in genel olarak tolere edilebilir ve yönetilebilir bir toksisite profili ile ilişkili, klinik olarak anlamlı bir antitümör aktivitesi olduğu görülmüştür (120,121).

Akciğer kanserinde HGF ve MET overekspresyonu 1990' lı yıllarda gösterilmiştir. KHDAK için bildirilen MET overekspresyon oranları %20-70 arasında değişmektedir (128,138,148,149). 2005 yılında MET amplifikasyonu EGFR mutant akciğer karsinomu vakalarında TKİ' lere dirençten sorumlu bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. Ancak ilerleyen yıllarda KHDAK olgularında MET amplifikasyonu de novo olarak da gösterilmiştir. EGFR TKİ kullanmamış KHDAK hastalarında bildirilen MET amplifikasyon oranları %3-4 iken EGFR mutant AK' larda EGFR direnciyle ilişkili olarak %20 oranında MET amplifikasyonu bildirilmektedir (125). Bir başka çalışmada gerçek de novo MET amplifikasyon insidansı % 0.8 ve EGFR TKİ' lere direnç mekanizması olarak MET amplifikasyon insidansı % 5 olarak bildirilmiştir (150). 1994 yılında MET reseptörünün jukstamembran bölgesini etkileyen bir mutasyon tanımlanmıştır (93). 2001 yılında bu mutasyonun MET' in c-Cbl ubiquitin ilişkili degradasyonunu bozarak onkojenik aktiviteye neden olduğu gösterilmiştir (94). Buna neden olan MET ekzon 14 atlama mutasyonları Ma ve ark. tarafından 2003' de KHK ve 2005' de KHDAK' de gösterilmiştir (95,151). KHDAK için MET ekzon 14 atlama mutasyon oranı Vuong ve ark. 'nın yaptığı 11 çalışmanın dahil edildiği bir metaanalizde %3 bulunmuştur (63).

Tong ve ark. tarafından 2016 yılında literatürde ilk kez MET genetik değişikliklerinin KHDAK' nin değişik alt tipleri arasındaki farklılıkları araştırılmıştır. Neoadjuvan tedavi almamış 687 KHDAK tanılı hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Diğer tiplerle karşılaştırıldığında PSK' lerde daha sık MET amplifikasyonu (%13,6) ve MET ekzon 14 atlama mutasyonu (%31,8) olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada KHDAK ve AK için amplifikasyon oranları sırasıyla %0,7 ve %1 iken MET ekzon 14 atlama mutasyonu oranları %2,6 bulunmuştur. MET İHK pozitiflik oranı PSK' ler için %40,9 iken bu oran KHDAK ve AK için sırasıyla %33,5 ve %49,7 olarak bildirilmiştir (40).

Vuong ve ark. 2018 yılında KHDAK' de MET ekzon 14 atlama mutasyonunun klinikopatolojik özelliklerle ilişkilisini inceledikleri meta analizlerine 11 adet çalışmadan toplam 18.464 hastayı dahil etmiştir. Histolojiden bağımsız MET ekzon 14 atlama mutasyon oranı %3 olarak değerlendirilmiştir. Histolojik alt tipler göz önüne alındığında MET ekzon 14 atlama mutasyon oranlarını AK' da %2, SHK' da %1, ASK' da %6 ve PSK' da %13 bulunmuştur (35,40,63,102–111).

Awad ve ark. 2016 yılında içerisinde 1141 akciğer kanseri olgusu bulunan 6376 tümörde YND ile 282 kanser ilişkili gen tetkik etmiştir. 933 SHK dışı KHDAK olgusunun 28' inde (%3) MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptanmıştır. Bu olgu grubu içinde PSK' lerdeki MET ekzon 14 atlama mutasyon oranı daha yüksek (4/15, %26,7) bulunmuştur (107).

Schrock ve ark. tarafından 2016 yılında 11205 akciğer kanseri hastasının genomik profillemesi yapılmıştır. Olguların 298' inde (%2,7) MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptanmıştır. Histolojik alt tiplerdeki oranlara bakıldığında ASK, PSK, AK, SHK, BHK için MET ekzon 14 atlama mutasyon oranları sırayla %8,2, %7,7, %2,9, %2,1 ve %0,8 idi. Diğer histolojik tiplerle karşılaştırıldığında MET ekzon 14 atlama mutasyonu, PSK' lerde daha fazla görülmüştür (35).

Saffroy ve ark. 2017 yılında 81 PSK tanılı ve 150 AK tanılı hastada MET ekzon 14 atlama mutasyonu varlığını araştırmıştır. PSK olgularının 81' inin 4' ünde (%4,9), AK olgularının 150' sinin 8' inde (%5,3) MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülmüştür. PSK tanılı 71 olguya ayrıca FISH ile MET gen kopya sayısı değişiklikleri değerlendirilmiştir. Olguların 14' ü (%19,7) FISH (+), 6' sı (%8,4) gerçek amplifikasyon olarak değerlendirilmiştir (103).

Mignard ve ark. 2018 yılında cerrahi uygulanmış 81 PSK olgusunda MET genetik değişikliklerini değerlendirmiştir. MET İHK pozitifliği, FISH pozitifliği, MET

amplifikasyonu ve MET ekzon 14 atlama mutasyonu sırasıyla olguların %17, %19,7, %8,5 ve %6' sında görülmüştür (112).

Literatürde PSK' lerde %17-41 arasında değişen oranda MET overekspresyonu, % 3-31,8 arasında değişen oranda MET ekzon 14 atlama mutasyonu ve %3-21 arasında değişen oranda MET amplifikasyonu bildirilmiştir (67,103).

Çalışmamıza 30' una cerrahi, 1' ine bronkoskopi uygulanmış İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı' nda tanı alan 31 PSK olgusu ve 2011- 2018 yılları arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi' nde opere edilmiş Patoloji Anabilim Dalı' nda tanı almış 24 PSK olgusu dahil edildi. Olgularda MET İHK ile overekspresyon, FISH ile amplifikasyon ve RT-PCR ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu araştırılmıştır. MET İHK pozitif ve negatif, FISH pozitif ve negatif, MET amplifikasyon pozitif ve FISH negatif, MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif ve negatif olgu grupları arasında, yaş, cinsiyet, sigara kullanım öyküsü, evre gibi klinik; histolojik alt tip, çap, kan damarı, lenfatik, perinöral invazyon gibi histopatolojik bulgular açısından anlamlı fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi. MET amplifikasyonu ve MET ekzon 14 atlama mutasyonunun her biri için İHK' nin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif ve negatif prediktif değeri hesaplandı. İHK pozitifliği ile MET FISH pozitifliği veya MET amplifikasyon pozitifliği arasındaki korelasyon istatistiksel olarak değerlendirildi. MET amplifikasyonu ve MET ekzon 14 atlama mutasyonu için vakaların sağkalım özellikleri gözden geçirildi.

MET genetik değişikliklerinin daha sık görülmesi nedeniyle çalışmamızda daha fazla pozitif olgu saptamak için sadece PSK olguları değerlendirildi. PSK olguları nadir görülen tümörlerdir. Olgu sayısını arttırmak için çalışmamıza iki merkeze ait toplam 55 olgu dahil edildi. Benzer literatürlerdeki PSK olgu sayılarına baktığımızda Saffroy ve ark.(103) 81 olgu , Schrock ve ark. (152) 104 olgu, Tong ve ark. (40) 22 olgu, Awad ve ark. (107) 15 olgu, Liu ve ark. (36) 36 olgu, Vieira ve ark. (153) 77 olgu, Kim ve ark. (154) 21 olgu, Kwon ve ark. (126) 45 olgu, Mignard ve ark. (112) 81 olgu, O'Brien ve ark. (116) 20 olgu, Yu ve ark. (155) 46 olgu üzerinden çalışmalarını sonuçlandırmıştır. Bu çalışmalarda da görüldüğü üzere PSK olgu sayıları 20 ile 104 arasında (ortalama: 50 olgu) değişmektedir. Çalışmamızdaki olgu sayısı bu aralıktadır. Bu nedenle çalışmamızın sonuçlarının değerlendirilebilir olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızda yeterli olgu sayısını elde edebilmek amacıyla 2000 yılı dahil geniş bir tarih aralığındaki olgular dahil edildi. Arşivde bekleme süresi 10 yılı aşan olgularda FISH ve RT-PCR çalışmalarının başarısız olacağını öngörüldü. Tekrarlanan FISH çalışmalarına rağmen, 55 olgunun 8'inde (%14,5) sinyal elde edilemedi. Bu olguların 1'i 2005, 1'i 2008, 2'si 2013, 1'i 2014, 1'i 2015, 1'i 2016 ve 1'i 2018 yılında tanı almıştı. Daha yakın tarihte tanı almış olgular için, sinyal elde edilememesinin nedeninin, dokunun tespit sorunu olduğu düşünüldü.

Literatürde MET İHK için bildirilen pozitiflik oranları %20-70 arasında değişkenlik göstermektedir. Bunun nedenlerinden biri kullanılan antikör klonlarının ya da skorlama sisteminin farklı oluşudur. Bir diğer neden de değerlendirme alanına eşlik eden diferansiye KHDAK komponentinin dahil edilip edilmemesi tercihidir. Tong ve ark. (40) KHDAK olgularında SP44 klonu ve METMab skorlamasını kullanarak olguların %33,5'inde MET İHK pozitifliği saptamıştır. Sterlacci ve ark. (156) KHDAK olgularında SP44 klonu ve MetMab skorlamasını kullanarak olguların %17'inde MET İHK pozitifliği saptamıştır. Dziadziusku ve ark. (91) KHDAK olgularında SP44 klonu ve MetMab skorlamasını kullanarak olguların %25'inde MET İHK pozitifliği saptamıştır. Watermann ve ark. (41) KHDAK olgularında SP44 klonu ve MetMab skorlamasını kullanarak olguların %22'inde MET İHK pozitifliği saptamıştır. Mignard ve ark. (112) PSK'lerde SP44 klonu ve hem MetMab hem H-skorlaması kullanarak olguların sırayla %18,5 ve %17'inde MET İHK pozitifliği bildirmiştir. Yeung ve ark. (157) akciğer AK'larında SP44 klonu ve MetMab skorlamasını kullanarak olguların %65,1'inde MET İHK pozitifliği saptamıştır.

Çalışmamızda son yıllarda literatürde en çok kullanılan Anti-Total c-MET SP44 klonunu ile hem METMab hem de H-skorlama sistemi kullanarak İHK değerlendirmesi yaptık. İHK, seçilen bloklardaki pür sarkomatoid komponentte ve eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti de dahil edilerek iki kez değerlendirildi. Pür sarkomatoid komponentte değerlendirilen İHK pozitif olgu sayısı, MetMab için 13 (%23,6); H-skor için 12 (%21,8) idi. İlgili vakalarda değerlendirmeye eşlik eden diferansiye KHDAK komponent de dahil edildiğinde bu sayı METMab için 15 (%27,3), H-skor için 14 (%25,5) oldu. İHK pozitif olan 15 olgunun 8'inde (%53,3) kullanılan tümör bloğunda eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti mevcuttu ve tümü adenokarsinomdu. İHK pozitiflik oranımız (%23,6- 27,3) literatürdekilerle uyumluydu.

Tong ve ark. (40) KHDAK olgularında İHK pozitifliğini alt tip ayrımı gözetmeksizin %33,5; histolojik alt tipler tek tek irdelendiğinde AK, ASK, PSK, BHK ve SHK' da sırasıyla %49,7, %42,9, %40,9, %15,6 ve %5,6 olarak bulmuştur. Sterlacci ve ark. (156) ise KHDAK olgularında İHK pozitifliğini alt tip ayrımı gözetmeksizin %17; histolojik alt tipler tek tek irdelendiğinde AK, SHK ve BHK' da sırasıyla %27,7, %6,2 ve %12,5 olarak bulmuştur.

Çalışmamızda değerlendirme alanına eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti dahil edildiğinde pozitiflik oranında biraz artış gözlemlendi. Ancak bulunan METMab ve H-skorları birbiriyle istatistiksel olarak çok yüksek oranda koreleydi (Rho=0,934 ve Rho=0,910). Bu artışın literatürde AK' da daha yüksek oranda bildirilen MET İHK pozitifliğine bağlı olduğu düşünüldü. İstatistiksel analizde de tümördeki eşlik eden diferansiye KHDAK komponentinin AK olması ile İHK pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptandı (p=0.013).

İHK pozitif vakaların bildirilen demografik özelliklerine baktığımızda çalışma sonuçları şu şekildedir: Sterlacci ve ark. (156)' nın çalışmasında KHDAK olguları içinde, MET ekspresyonu olan hastaların, yaş ortalaması 66,9 (44-84), %60' ı erkek, %89' u sigara kullanıcısı, %16,5' i evre IA, %57, 4' ü evre IB, %10, 4' ü evre IIA, %6,1' i evre IIB, %6,1' i evre IIIA ve %3,5' i evre IIIB olgularından oluşmaktadır. Kadın cinsiyet ve AK histolojisiyle MET pozitifliği arasında korelasyon saptanmıştır. Tong ve ark. (40) çalışmasında KHDAK olgularında, MET ekspresyonu olan hastalar, yaş ortalaması 63,4, %58,7' si erkek, %52,6' sı sigara kullanıcısı, %82,7' si evre IA- IIIA, %17,3' ü evre IIIB-IV, tümör ortalama çapı 35 mm, %84,8' i AK, %4,3' ü SHK, %3' ü BHK, %3,9' u ASK, %3,9' u PSK olan olgulardan oluşmaktadır. Kadın cinsiyet ve sigara kullanmama ile MET İHK pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

Çalışmamızda İHK pozitif ve negatif olgular arasında, yaş, cinsiyet, sigara kullanım miktarı, evre açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p>0,05). Çalışma kapsamına, içinde PSK' nın da bulunduğu KHDAK olgularını alan ya da sadece PSK olgularını dahil eden literatürlerde, İHK pozitifliği gösteren PSK olgularının klinik ve demografik özelliklerle ilişkisiyle ilgili yeterli bilgi yoktu. Örneklemimiz içine sadece PSK' lerin dahil edilmiş olması, olguların opere edilmiş erken evre olmaları ve vaka sayımızın az olması nedeniyle literatürde tanımlanan ilişkilerin istatistiksel olarak gösterilemediği düşünüldü.

Casadevall ve ark. (38), Tretiakova ve ark. (158), Park ve ark. (129), Yeung ve ark. (157), Kim ve ark. (159) MET İHK pozitifliğinin kötü prognoz göstergesi olduğu

ve kısalmış genel sağkalım ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Tam tersi olarak Tran ve ark. (160) MET İHK pozitifliğinin uzun genel sağkalım ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Tsuta ve ark. (128) KHDAK olgularının tamamında ya da histolojik alt tipler ayrı ayrı gruplandırarak baktıklarında MET İHK ekspresyonunun survival üzerinde bir etkisi olmadığını bildirmişler. Guo ve ark. (161) 13 çalışmayı dahil ettikleri metaanalizinde MET İHK pozitifliğinin kötü prognozla ilişkili olduğunu ve genel sağkalım için bağımsız prognostik faktör olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda MET İHK pozitif olgular için 1 yıllık genel sağkalım %76,9 iken 5 yıllık sağ kalım %33,3 oranında bulundu. İHK negatif olgularda ise 1 yıllık genel sağkalım %50, 5 yıllık genel sağkalım oranı %53,8 idi. İHK sonucu, olgular, pozitif ve negatif olarak karşılaştırıldığında 1 yıllık ve 5 yıllık genel sağkalımlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Log Rank $p=0,079$ ve $p=0,190$). Ancak hastaların bir kısmının öldüğü bilinmekle birlikte klinik takip bilgilerine ulaşamadık. Bu olguların dahil edilemeyişinin istatistiksel analizin gücünü azalttığı düşünüldü.

Literatürde MET amplifikasyon için bildirilen pozitiflik oranları değişkenlik göstermektedir. Bunun nedenlerinden biri kullanılan yöntemlerin farklı oluşudur. Bir diğer neden de FISH kullanan yayınlardaki değerlendirme kriterlerinin değişkenliğidir. Saffroy ve ark. (103)' nın Fransa kohortunda 81 PSK olgusunu FISH ile değerlendirmiştir. Her hücrede ≥ 5 gen kopya sayısı varlığında olgular FISH (+), MET/CEP7 oranı >2 ise gerçek amplifikasyon olarak değerlendirilmiş olguların %19,7' sinde FISH pozitifliği, %8,4' ünde amplifikasyon saptanmıştır. Tong ve ark. (40) 687 KHDAK olgusunu FISH ile değerlendirmiştir. Capuzzo (her hücrede ≥ 5 gen kopya sayısı), PathVysion (MET/CEP7 oranı ≥ 2) kriterlerinden herhangi birini karşılayan olgular FISH (+) olarak değerlendirilirken MET/CEP7 oranı ≥ 5 olan ya da MET sinyal kümeleri bulunan olgular yüksek amplifikasyon olarak değerlendirilmiştir. Olguların %4,2' si FISH (+), %1,1' i yüksek amplifikasyon olarak bulunmuştur. Mignard ve ark. (112) 81 PSK olgusunda FISH uygulamış ve ≥ 5 MET gen kopya sayısı varlığında ve MET/CEP7 oranı >2 olduğunda amplifikasyon olarak değerlendirmiştir. Olguların 5' inde (%6) gerçek amplifikasyon saptanmıştır. Park ve ark. (39) 316 AK' da FISH uygulamış ve UCCC kriterlerine göre olguları değerlendirmiştir. Olgularda ortalama MET gen kopya sayısı 3,6; ortalama MET/CEP7 oranı 1,1 iken 123' ünde (%38,9) FISH (+), 26' sında (%8,2) gen amplifikasyonu bildirilmiştir. Kim ve ark. (154) 338 KHDAK olgusunda SISH

uygulamış ve 13' ünde (%3,8) pozitif sonuç elde etmiştir. Okuda ve ark. (90) 213 KHDAK olgusuna real-time PCR uygulamıştır. MET amplifikasyonu gösteren olgular için ≥ 3 gen kopya sayısı kriteri kullanılmıştır. Olguların %5,6' sında MET amplifikasyonu görülmüştür.

Çalışmamızda değerlendirme literatürde sık kullanılan Cappuzzo ve UCCC kriterlerine göre yapıldı. Değerlendirilebilen 47 olgunun 15' inde (%31,8) FISH (+) iken 5' inde (%10,6) amplifikasyon saptandı. FISH pozitif ve amplifikasyon pozitif oranlarımız PSK olgularında bildirilen oranlarla uyumluydu.

Literatürde FISH pozitif vakaların bildirilen demografik özelliklerine baktığımızda sonuçlar şöyledir: Tong ve ark. (40) MET amplifikasyonlarının sigara içenlerde daha sık görüldüğünü bildirmiştir. Park ve ark. (39) FISH pozitif olan grupta yaş genellikle 65' ten küçük olarak saptanmıştır ve nodal tutulum FISH (-) gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermektedir. Kim ve ark. (154) MET SISH pozitifliğini ileri evre ile ilişkili bulmuştur. Okuda ve ark. (90) artmış gen kopya sayısının sigara kullanımı ve erkek cinsiyetle istatistiksel anlamlı ilişkisi saptanmıştır. Diğer çalışma sonuçları da benzer şekilde amplifikasyon gösteren olguların sigara kullanan, ileri evre, erkek hastalarda daha sık görüldüğü yönündedir.

Çalışmamızda FISH pozitif olguların 11' i erkek olup yaş ortalaması $60,02 \pm 10,04$ idi. Bu grubun tamamı sigara kullanıyordu. Olguların 1' i evre IV diğerleri evre II ve III' dü. Ancak MET FISH pozitif ve negatif veya MET amplifikasyonu pozitif ve FISH negatif olgular arasında, yaş, cinsiyet, sigara kullanım süresi, evre açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Ancak olgularımızın büyük çoğunluğu opere edilebilmiş erken evre olgulardı. Çalışmanın içinde 3 olgu (%6,7) evre IV idi. Bu nedenle istatistiksel anlamlı sonuç elde edilemediği düşünüldü.

Literatürde İHK ile MET arasındaki ilişki ve korelasyonla ilgili çalışma sonuçları şöyledir: Tong ve ark. (40) MET FISH ile İHK arasında iyi bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. Olguların %69,7' sinde uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Mignard ve ark. (112) İHK H-skor ve FISH arasında zayıf korelasyon bildirmiştir. Watermann ve ark. (41) da İHK ile FISH arasında zayıf korelasyon bildirmiştir. Casadevall ve ark. (38) İHK ile FISH arasında korelasyon olmadığını bildirmiştir. Park ve ark. (39) İHK ve MET amplifikasyonu arasında anlamlı ilişki bildirilmiştir. MET gen kopya sayısı ≥ 5 olan hastaların %50' si İHK skor 3+, %23,7' si skor 2+, %11,3' ü skor 1+ ve %14,9' u skor 0 boyanma göstermiştir. İHK' nin MET FISH (+) veya

amplifikasyon gösteren olguları yakalamada yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Dziadziuszko ve ark. (91) İHK H-skor ile MET gen kopya sayısı arasında anlamlı ilişki saptamıştır. Okuda ve ark. (90) MET İHK ile MET gen kopya sayısı arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmuştur.

MET İHK ve FISH sonuçları 47 olgunun 33'ünde (%70,2) uyumlu sonuç gösterdi. Ancak İHK ile FISH sonucu arasında zayıf korelasyon görüldü ($Rho=0,253$). İHK sonucunun FISH sonucuna etkisini göstermek için yapılan ikili lojistik regresyon analizinde İHK pozitif olan olguların İHK negatif olgulara göre daha fazla FISH pozitif olma olasılığı vardı. ($OR=3,125$). Bulgularımız literatürle uyumluydu.

Olguların 22'inde İHK boyanması gösteren alanlarda tekrar edilen FISH değerlendirilmesinde gen kopya sayılarında anlamlı artış görüldü ($p=0,027$). Sonuçlar literatürle benzerdi. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, MET gen kopya sayısı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,194$). Ancak bu değerlendirmede, İHK pozitif ve negatif gruplar tümör totalindeki boyanma oranına göre belirlenmişti. İHK tümörlerde heterojen boyanma göstermekteydi. İHK negatif gruba dahil olmuş bazı olguların kuvvetli pozitif boyanan alanları mevcuttu. İHK pozitif ve negatif gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark çıkamama sebebinin buna bağlı olduğu düşünüldü.

Çalışmamızda FISH pozitif ve FISH negatif olgular arasında ve MET amplifikasyonu pozitif ve FISH negatif olgular arasında, İHK sonuçlarında istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$). Pür sarkomatoid komponentte değerlendirilen H-skor MET amplifikasyonu pozitif olgularda $154\pm 101,14$ iken FISH negatif olgularda $62,73\pm 85,4$ idi. Sadece İHK, pür sarkomatoid komponentte değerlendirildiğinde, MET amplifikasyonu pozitif olan olgular ile FISH negatif olan olgular arasında, H-skorları arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,026$). PSK olgularında İHK ile kuvvetli boyanma gösteren pür sarkomatoid alanlarda FISH çalışılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

İHK boyanmalarının heterojen olması ve literatürde FISH (+) olguların çoğunlukla skor 2+ ve skor 3+ boyanma gösterdiğinin bildirilmesi üzerine FISH için de intratümöral heterojenite var mı sorusuna cevap arayan yayınlar mevcuttur. Kwon ve ark. (126) 102 EGFR (-), ALK(-), KRAS(-) (triple negatif) AK ve 45 PSK' da İHK pozitifliği, FISH ile gen kopya sayısı değişiklikleri ve RT-PCR ile MET ekzon 14 atlama mutasyon analizi yapmıştır. İHKsal olarak heterojenite gösteren olgularda İHK (+) alanlarda FISH tekrarlanmıştır. Tümörde İHK Skor 2+ ve 3+ boyanma gösteren alanlarda skor 1+ ve skor 0 boyanma gösteren alanlara göre istatistiksel anlamlı kopya

sayısı artışı ve artmış amplifikasyon oranı bulunmuştur. Sterlacci ve ark. (156) 735 KHDAAK olgusuna ait doku mikroarray kullanarak İHK ve FISH değerlendirmiştir. 328 olguda 3' ü tümör santralinden 1' i periferinden olacak şekilde 4 kor değerlendirildi. İHK ve FISH uygulamasına aynı tümöre ait korlar arasında (intratümöral) heterojenite olmadığını söylemiştir. Castiglione ve ark. (147) 86 KHDAAK olgusunda İHK ile MET protein ekspresyonu, FISH ile MET amplifikasyonu ve YND ile MET ekzon 14 atlama mutasyonunu değerlendirmiştir. Çalışmada 3 olgunun hem primer hem de metastatik rezeksiyonları değerlendirilmiştir. Metastatik tümörlerinde yüksek seviyede amplifikasyon saptanan 3' ünün de primer rezeksiyondaki tümörlerinde amplifikasyon görülmemiştir. Tüm bu çalışmalar sonucunda MET amplifikasyonunun, intratümöral ve primer ile metastatik tümöral klonlar arasındaki heterojenitesi nedeniyle karsinogenezde son dönem bir değişiklik olabileceği düşünölmüştür.

Çalışmamızda İHK çalışmasında heterojen boyanma gösteren olguların 22' sinde İHK boyanan alanda FISH tekrarlanmıştır. FISH tekrarlanan 22 olgunun ilk değerlendirilmesinde ortalama MET gen kopya sayısı $3,52 \pm 4,19$ iken tekrar sonrası $4,77 \pm 4,53$ bulundu. İHK boyanması gösteren alanlarda tekrar edilen FISH değerlendirilmesinde gen kopya sayılarında anlamlı artış göröldü ($p=0,027$). Tekrarlanan olguların ilk değerlendirmesinde 4' ü FISH pozitif, bunların 2' si amplifikasyon olarak değerlendirilirken; tekrar sonrası 9' u FISH pozitif, bunların 4' ü amplifikasyon olarak değerlendirildi. Bulgularımız literatürle benzer şekilde intratümöral FISH heterojenitesini destekler niteliktedir. İnatümöral heterojenitenin olmadığı bildirilen çalışmalarda değerlendirme doku mikroarrayler üzerinden yapılmıştır. Bunun ilgili çalışmalardaki uyumsuz sonuçları açıklayabileceği düşünöldü.

Literatürde MET FISH (+) veya amplifikasyon için tarama testi olarak İHK duyarlılık, özgülük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değeriyle ilgili çalışmalar az sayıda olup sonuçları şöyledir: Tong ve ark. (40) İHK' nin yüksek MET amplifikasyonu ve polizomi için duyarlılığı ve negatif prediktif değerinin %100 olduğunu bildirmiştir. Mignard ve ark. (112) İHK' nin MET amplifikasyonu için duyarlılığını %50 bulmuştur. Castiglione ve ark. (147) MET amplifikasyonunu saptamada İHK' nin yüksek duyarlılığa sahip olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda FISH (+) olgular için İHK duyarlılığı %50, özgülüğü %78,8, pozitif prediktif değeri %50 ve negatif prediktif değeri %78,8 bulundu. Amplifikasyon

gösteren olgular için ise İHK duyarlılığı %60, özgüllüğü %73,8, pozitif prediktif değeri %21,4 ve negatif prediktif değeri %93,9 bulundu. Bulunan düşük oranların pozitif hasta sayısının az olmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Literatürdeki sonuçlar çelişkilidir. Çalışmamızdakine benzerlik gösterenler vardı. İHK' nın düşük duyarlılığı nedeniyle FISH (+) veya amplifikasyon gösteren olgular için tarama testi olarak kullanılamayacağı düşünüldü.

Literatürde MET amplifikasyonu olan hastaların prognozuyla ilgili bilgiler şöyledir: Tong ve ark. (40) yüksek MET amplifikasyonunu kısalmış genel sağkalım ile ilişkili bulmuş ve bağımsız kötü prognostik faktör olarak saptamıştır. Park ve ark. (39) FISH (+) ve FISH(-) grup arasında prognozda anlamlı bir fark bulmamıştır. Kim ve ark. (154) MET amplifikasyonu olanlarda kısalmış genel sağkalım tanımlamıştır. Okuda ve ark. (90) artmış MET gen kopya sayısına sahip evre II-IV olguların kötü prognozla ilişkili oldukları gösterilmiştir.

Çalışmamızda, FISH sonucu olgular pozitif ve negatif olarak karşılaştırıldığında 1 yıllık ve 5 yıllık genel sağkalımlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Log Rank $p=0,944$ ve $p=0,984$). FISH sonucu olgular amplifikasyon pozitif ve amplifikasyon negatif olarak karşılaştırıldığında 1 yıllık ve 5 yıllık genel sağkalımlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Log Rank $p=0,660$ ve $p=0,680$). Ancak hastaların bir kısmının öldüğü bilinmekle birlikte klinik takip bilgilerine ulaşamadı. Bu olguların dahil edilemeyişinin istatistiksel analizin gücünü azalttığı düşünüldü.

Literatürde MET ekzon 14 atlama mutasyonu için bildirilen pozitiflik oranları değişkenlik göstermektedir. Bunun nedenlerinden biri çalışmaya dahil edilen vaka gruplarının özellikleridir. Irk, cinsiyet, yaş, sigara kullanım öyküsü, evre, histolojik alt tip dağılımı, eşlik eden epitelyal komponent, eşlik eden başka driver mutasyon varlığı gibi değişkenlerin mutasyon oranlarındaki farklılığı açıklayabileceği yönünde yorumlar mevcuttur. Bir diğer neden de kullanılan tanı yöntemlerinin farklı oluşudur.

Saffroy ve ark. (103)' nın Fransa kohortunda 81 PSK olgusunda HRM+MassArray yöntemi ile formalin fikse parafine gömülü dokularda tüm ekzon 14 ve intonik bölgeleri de içerecek şekilde mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışmaya yaş ortalaması 61 (47-79), çoğunluğu erkek (%74), %80' i Kafkas, sigara kullanım oranı %92 olan, %18,5' i evre I, %29' u evre II, %43,2' si evre III, %8,6' sı evre IV neoadjuvan tedavi almayan, %77' si pleomorfik karsinom olan, %22,2' sinde eşlik eden EGFR, %27' sinde eşlik eden KRAS, %4,9' unda eşlik eden PIC3CA, %2,5' inde

eşlik eden BRAF mutasyonu bulunan olgular dahil edilmiştir. 81 olgunun 4' ünde (%4,9) MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülmüştür. MET ekzon mutasyonu gösteren olguların ortalama yaşı 67 (65-75), 3' ü kadın (K:E 3:1), 3' ü Kafkas, 1' i Arap, 3' ü sigara kullanıcısı, 2' si dev hücreli karsinom, 1' i iğsi ve dev hücreli karsinom, 1' i pleomorfik karsinom iken 1' inde eşlik eden KRAS G12V, 1' inde eşlik eden EGFR G719A mutasyonu bildirilmiştir.

Liu ve ark. (67)' nin çalışmasında 36 PSK olgusunda tüm ekzom dizileme, hedefe yönelik ekzom dizileme ve sanger dizileme yöntemi ile hem formalinle fikse parafine gömülü dokuda hem de taze dondurulmuş dokuda tüm ekzon 14 ve intonik bölgeleri de içerecek şekilde mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışmaya yaş ortalaması 69,3 (38-87), çoğunluğu kadın (%51,2), aktif sigara kullanan %28, eski sigara kullanıcısı olan %64, %14,5' i evre Ia, %14,5' i evre Ib, %20' si evre IIa, %22' si evre IIb, %24' ü evre IIIa, %5' i evre IV, neoadjuvan tedavi almayan, %93' ü pleomorfik karsinom olan olgular dahil edilmiştir. 36 olgunun 8' inde (%22) MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülmüştür. MET ekzon mutasyonu gösteren olgularının tamamı pleomorfik karsinom ve bunların 7' sinde eşlik eden AK komponentinin mevcut olduğu bildirilmiştir. Eşlik eden AK komponent varlığının MET ekzon 14 atlama mutasyonu oranında istatistiksel anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir.

Vieira ve ark. (153)' nin çalışmasında 77 PSK olgusunda PCR ile formalin fikse parafine gömülü dokuda sadece MET ekzon 14' ün 3' ekleme bölgesindeki delesyonları gösterecek şekilde analiz yapılmıştır. Çalışmaya yaş ortalaması 61 (53-69), çoğunluğu erkek (%77), %96' sı sigara kullanıcısı olan, %21' i evre I, %43' ü evre II, %30' u evre III, %6' sı evre IV, %26' sı neoadjuvan tedavi almış, %78' i pleomorfik karsinom ve %31' inde eşlik eden KRAS, %8' inde eşlik eden PI3CA, %3' ünde eşlik eden EGFR mutasyonu olan olgular dahil edilmiştir. 77 olgunun 2' sinde (%3) MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptanmıştır.

Mignard ve ark. (112)' nin çalışmasında 81 PSK olgusunda HRM+MassArray yöntemi ile formalinle fikse parafine gömülü dokuda hem de taze dondurulmuş dokuda tüm ekzon 14 ve intonik bölgeleri de içerecek şekilde mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışmaya yaş ortalaması 62 (44-81), çoğunluğu erkek (%74), %80' ı beyaz, %12' si kuzey afrikalı, %1,5' i sahra altı afrikalı, %94' ü sigara kullanıcısı, %46' sı evre I-II, %52' si evre III-IV, %77,5' i pleomorfik karsinom ve %13' ünde eşlik eden EGFR, %26' sinda eşlik eden KRAS, %2,5' inde eşlik eden BRAF, %5' inde eşlik eden PI3CA mutasyonu olan olgular dahil edilmiştir. 81 olgunun 5' inde (%6) MET ekzon

14 atlama mutasyonu görülmüştür. MET ekzon 14 atlama mutasyonunun kadın cinsiyette daha fazla olmasını istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Yu ve ark. (155)' nın çalışmasında 46 PSK olgusunda RT-PCR ve YND ile formalinle fikse parafinize dokuda mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışmaya yaş ortalaması 46 (45-80), %80' i erkek, %57' si sigara kullanıcısı olmayan, tamamı Çinli olgular dahil edilmiştir. 46 olgunun 4' ünde (%9) MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülmüştür.

O'Brien ve ark. (116)' nın çalışmasında 20 PSK olgusunda öncelikle RT-PCR, RNA bazlı YND ve RISH yöntemleri ile formalinle fikse parafine gömülü dokuda hem de taze dondurulmuş dokuda mutasyon analizi yapılmıştır. 20 olgunun 2' sinde (%10) MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülmüştür.

Çalışmamızda 40 PSK olgusunda Real time RT-PCR yöntemi ile formalin fikse parafine gömülü dokuda MET ekzon 14 atlama mutasyonu analizi yapılmıştır. Değerlendirilen olguların yaş ortalaması 61 (38-78), çoğunluğu erkek ve sigara içicisiydi. Olguların %86,1' i evre I-II, %13,9' u evre III-IV idi. Tekrar edilmesine rağmen değerlendirilebilen 36 olgunun hiçbirinde MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülmedi.

O'Brien ve ark. (116) 20 PSK olgusunda formalin fikse parafine gömülü dokudan RT-PCR ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu değerlendirmiştir. PCR reaksiyonu için MET ekzon 14 atlama mutasyonuna uyan küçük (94 baz uzunluğunda) bir primer kullanılmıştır. Reaksiyon sonrası wild tip olarak değerlendirilen olgularda çalışma farklı boyutta (165 baz) bir başka primer (18SrRNA) kullanılarak tekrarlanmıştır. 18SrRNA ile yapılan PCR sonucunda tüm vakalarda amplifikasyon görülmüş ancak bunun uniform olmadığı gözlenmiştir. Bu farklılığın RNA degradasyonuna bağlı olduğu kanısına varılmıştır. RNA bozulması, formalin fiksasyonu ve parafinizasyon sürecinin bir sonucu olarak ilgili örneklerde daha büyük PCR ürünlerini tespit etme yeteneğini etkilemektedir. Bu nedenle daha küçük bir amplikon büyüklüğüne sahip primerler tercih edilebilir. Aynı zamanda wild tip MET' i tekrar değerlendirmek ve RNA degradasyonunu dışlamak amacıyla, ekzon 13 ve 14 veya 14 ve 15' i amplifiye etmek üzere tasarlanmış ikinci bir primer seti kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda değerlendirilebilen 36 olgudan izolasyon sonrası elde edilen RNA ortalama $457,23 \pm 306,69$ (113- 1143) konsantrasyona sahipti. Nicelik olarak değerlendirmeye uygun kriterleri sağladı. Ancak PCR değerlendirme Real-time olarak

yapıldığından dağılım heterojenitesi değerlendirilemedi. O'Brien ve ark.(116)'nın çalışmasındakine benzer ikincil başka bir primerle reaksiyon tekrarlanmadığından wild tip olarak yorumlanan sonuçların fiksasyon ve takip nedeniyle mi oluştu yoksa gerçek negatiflik mi olduğu konusunda kesin değerlendirme yapılamadı. Ancak pozitif vaka bulunamamasının bundan kaynaklı olabileceği düşünüldü.

Kullanılan doku örneği, tanı yöntemi ve hedeflenen ekzon ve intron bölgesine göre literatürde bildirilen pozitif vaka sayıları değişkenlik göstermektedir. Saffroy ve ark. (103) tüm MET ekzon ve ilgili intron bölgelerini hedefleyerek HRM+MassArray yöntemiyle formalinle fikse parafinize dokuda %4,9, Mignard ve ark. (112) tüm MET ekzon ve ilgili intron bölgelerini hedefleyerek HRM+MassArray yöntemiyle formalinle fikse parafinize dokuda %6, Liu ve ark. (67) tüm MET ekzon 14 ve ilgili intron bölgelerini hedefleyerek Tüm ekzom, hedefe yönelik ekzom ve Sanger dizileme ile taze donmuş ve formalinle fikse parafinize dokuda %22, Vieira ve ark. (153) MET ekzon 14'ün sadece 3' ekleme bölgesini hedefleyerek formalinle fikse parafinize dokuda %3 oranında MET ekzon 14 atlama mutasyonu bildirmiştir. Kim ve ark. (154) aynı hasta grubunda MET ekzon 14 atlama mutasyon analizinde RT-PCR, YND ve Sanger dizileme yöntemleri kullanılmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. YND altın standart test olarak kabul edildiğinde RT-PCR'ın duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,4 iken Sanger dizilemenin duyarlılığı %61,5, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Davies ve ark. (162) ise aynı hasta grubunda DNA ve RNA bazlı YND ile MET ekzon 14 atlama mutasyon analizi yapmış ve sonuçları karşılaştırmıştır. RNA tabanlı testlerin, DNA tabanlı testlerden daha yüksek oranda MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptadığı bulunmuştur.

Çalışmamızda, MET ekzon 14 atlama mutasyonunu saptamak için, Real time RT-PCR kullanılmıştır. Literatürde duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olarak bildirilen bir yöntem kullanmamıza rağmen MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptamak için kullanılan primer bilgisine sahip değildik. Primerin hedeflediği bölge (sadece ekzon 14 ya da beraberinde ilgili intronları) hakkında net bilgiye ulaşılamadı. Pozitif olgu yakalanamama nedenlerinden bir diğerinin kullanılan PCR primerinin hedeflediği alanın tüm intonik bölgeleri hedeflememesi olabileceği düşünüldü.

PSK'lerde KRAS mutasyonunu Saffroy ve ark. (103) %27, Mignard ve ark. (112) %26, Liu ve ark. (36) %15, Awad ve ark. (107) %20, Tong ve ark. (40) %13,6 Vieira ve ark. (153) %31, Qiu ve ark. (109) %11,5 oranında ;EGFR mutasyonunu Saffroy ve ark. (103) %22,2, Mignard ve ark. (112) %13,5, Tong ve ark. (40) %4,5,

Vieira ve ark. (153) %3, Qiu ve ark. (109)%1,8 oranında; BRAF mutasyonunu Saffroy ve ark. (103) %2,5, Liu ve ark. (36) %3, Mignard ve ark. (112) %2,5 oranında; PIC3CA mutasyonunu Saffroy ve ark. (103) %4,9, Vieira ve ark. (153) %8, Mignard ve ark. (112) %5 oranında bildirmektedir. Literatürde MET ekzon 14 atlama mutasyonu için henüz dışlayıcı herhangi bir driver mutasyon tanımlanmamıştır. Ancak diğer driver mutasyonların dışlanarak hasta popülasyonunun oluşturulduğu çalışmalarda daha yüksek oranda MET ekzon 14 atlama mutasyon oranları bulunmuştur. Vuong ve ark. (63) KHDAK metaanalizinde MET ekzon 14 atlama mutasyon oranını %3 olarak bildirirken bu oran Kwon ve ark. (126)'nın EGFR(-), ALK(-), KRAS(-) olan KHDAK olgularında yaptıkları değerlendirmede %8,8 olarak bulunmuştur. Heist ve ark. (163) diğer driver mutasyonların negatif olduğu grupta yüksek oranda (%19) MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptamıştır. Lambros ve ark. (164) KHDAK olgularında Met ekzon 14 atlama mutasyonunu hangi hastalarda taramalıyız sorusuna cevap aramıştır. Diğer driver mutasyonların (EGFR, ALK, KRAS, BRAF) varlığı veya yokluğu bilgisi ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu analizi için hastaların ön seçiminde anlamlı bir yönlendirme yapılamayacağı sonucuna varmıştır.

Çalışmamızda hastaların diğer driver mutasyonları hakkında bilgi sahibi değildik. MET ekzon 14 atlama mutasyon analizi için kullandığımız RT-PCR kitinde ALK, ROS1 ve RET füzyonları da eş zamanlı değerlendirildi. Ancak hiçbir mutasyon saptanmadı. Füzyon değişikliklerinin tespitinde RT-PCR yönteminin yeterli özgüllüğe sahip olmayışı ve RNA degradasyonu ihtimali nedeniyle hiçbir driver mutasyonun dışlanmamış olduğunu düşündük. MET ekzon 14 atlama mutasyonu oranının olası diğer driver mutasyonları varlığına bağlı düşebileceği ve örneklem sayımızın bu oranı göstermekte yetersiz kaldığından pozitif vaka bulamamış olabileceğimizi düşündük.

Bazı genetik değişikliklerin sıklığının etnik farklılıklar gösterebildiği bildirilmektedir. Örneğin EGFR mutasyonları Asyalılarda daha sık görülür. Ancak MET ekzon 14 atlama mutasyon ile etnik farklılıklar arasındaki ilişki halen bazı belirsizlikler içermektedir. Literatürde bu etnik farklılıklarla ilgili değerlendirme yapan çalışma sonuçları şöyledir: Krishnaswamy ve ark. (165) doğu Asya, Afrikan-Amerikan ve Kafkas kökenli KHDAK olgularında MET semaforin, jukstamembran ve tirozin kinaz bölgelerini ilgilendiren mutasyonları analiz etmiştir. Doğu Asya kökenli hastalarda daha sık MET mutasyonu bulunmuştur. Saffroy ve ark. (103) çalışmalarında Asya serisinden daha fazla MET ekzon 14 atlama mutasyon oranı

bildirmiştir ve olguların tümünün Kafkas kökenli olduğu görülmüştür. MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan olguların hiçbirinin Asya kökenli olmadığı görülmüştür. Awad ve ark. (107) çalışmalarında beyaz İspanyol dışı, Asya, siyah, beyaz İspanyol kökenli hasta grubu içinde MET ekzon 14 atlama mutasyonunu sadece beyaz İspanyol dışı kökenli hastalarda saptamıştır. Her ne kadar Asya kökeninde sık görüldüğü bildirilse de bunun, çalışmaların birçoğunun hasta grubunda Asyalıların olmasının ve literatürdeki çoğu çalışmanın Asya menşeli yayınlar olmasının bir sonucu olabileceği düşünüldü. Farklı etnik gruplar arasındaki mutasyon sıklığı farkının netleştirilmesi için daha geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda hiçbir olguda MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülmedi. Bunun etnik farklılıklara bağlı ülkemizde daha düşük oranda MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülme olasılığının ve bunu göstermek için örneklem sayımızın yetersiz kalmasının bir sonucu olabileceği düşünüldü.

Literatürde MET ekzon 14 atlama mutasyonu gösteren olguların özelliklerine bakıldığında Vuong ve ark. (63) 2018 yılında KHDAK olgularını dahil ederek yaptıkları meta analize toplam 11 çalışmayı (35,40,63,102–111) dahil ederek 18464 olguyu değerlendirmiştir. Bu meta analiz sonucunda KHDAK olguları için MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitifliği ileri yaş, kadın cinsiyet ile ilişki bulunurken sigara içiciliği ve ileri evre hastalık ile ilişkili bulunmamıştır. Tong ve ark. (40) 28 MET ekzon 14 atlama mutasyonu gösteren KHDAK olgusunun ileri yaşta (ortalama 72,5) olduğunu ve %64' ünün sigara kullandığını bildirmiştir. Zheng ve ark. (104) 1770 KHDAK içinde MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülen 23 olgunun benzer özelliklere sahip olduğunu saptamıştır. Bunlar kadın, sigara kullanmayan, ileri yaşta ve erken evrede hastalar olarak tanımlanmıştır. PSK' ler için yayınlanmış bir metaanaliz ya da demografik özelliklerin toplandığı geniş bir seri çalışması yoktur. Kwon ve ark. (126) tarafından MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan olgularda E:K oranını 8, sigara kullanan/kullanmayan oranını 7 olarak bildirilmiştir. Saffroy ve ark.'nın (103) çalışmasında MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan olgularda ortalama yaş 67, kadın cinsiyet baskınlığı (K:E 3:1), daha sık sigara kullananıjm öyküsü bildirmiştir. Schrock ve ark. (152)' nin çalışmasında MET ekzon 14 atlama mutasyonu görülen grupta yaş ortalaması 75 ve çoğunluğu ileri evreydi. Mignard ve ark. (112) ise MET ekzon 14 atlama mutasyonunun istatistiksel olarak kadınlarda anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmiştir. Kim ve ark. (154) MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan olguların sigara kullanmayan, erken evre olduklarını görmüştür.

Çalışmamızda 2 olguda (%5,5) pozitiflik kriterlerini karşılamayan gecikmiş bir siklusta daha düşük ışımaya görüldü. Gecikmiş siklusta düşük ışımaya gösteren 2 olgu pozitif kabul edildiğinde değerlendirilebilen 36 vakanın için MET ekzon 14 atlama mutasyon oranı %5,5 olarak bulundu. Olgulardan 1' i erkek, diğeri kadındı. Erkek hasta 70 yaşında, evre IIB ; kadın hasta ise 75 yaşında, 20 paket yıl sigara kullanımı öyküsü olan, evre IVB olguydu. Her iki olgu diferansiye KHDAK komponenti AK niteliğinde pleomorfik karsinom olgusuydu. Bu iki olgu MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif kabul edildiğinde, Mutasyon pozitif ve wild tip olan gruplar arasında klinikopatolojik parametrelerde istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Literatürde MET İHK ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasındaki ilişkiyi veya korelasyonu değerlendiren çalışma sonuçları çelişkili olup şu şekildedir: Schrock ve ark. (152), Tong ve ark. (40), Awad ve ark. (107), Lee ve ark. (111), Kwon ve ark. (126) anlamlı korelasyon olduğunu; Mignard ve ark. (112), Liu ve ark. (108) İHK ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasında istatistiksel anlamlı korelasyon olmadığını bildirirken; Park ve ark. (39) korelasyon olabileceği yönünde yorum yapmıştır.

Çalışmamızda ilgili 2 vaka MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif kabul edildiğinde; olgulardan biri İHK ile METMab skor 3+, H-skor 250 boyanma göstermekteydi. Diğeri ise İHK ile METMab skor 3+, H-skor 295 boyanma göstermekteydi. MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında, pür sarkomatoid komponentte değerlendirilen İHK H-skor ve METMab skorlarında anlamlı fark mevcuttu. MET ekzon 14 mutasyonu olan olgularda İHK skorları daha yüksekti ($p=0,002$ ve $p=0,014$). MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif kabul edildiğinde İHK ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasındaki zayıf korelasyon bulundu ($Rho=0,323$). Bulgular literatürle uyumluydu.

Mignard ve ark. (112) MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptamada İHK duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerini sırasıyla %20, %83, %7 ve %94 olarak bulmuştur. Lee ve ark. (111) ise duyarlılığı %100, özgüllüğü %70,4 olarak bildirmiştir. Castiglione ve ark. (147) MET ekzon 14 atlama mutasyonu için İHK' yı tarama testi olarak önermemektedir.

Çalışmamızda 2 vaka pozitif kabul edilirse duyarlılık %100, özgüllük %55,9, pozitif prediktif değer %11,8, negatif prediktif değer %100 olarak bulundu. Sonuçlar literatürle uyumluydu. Değerlerdeki düşük oranların, MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif vaka sayılarının az olmasına bağlı olduğu düşünüldü.

MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan grupla wild tip grup arasında prognozun karşılaştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Tong ve ark. (40) ve Ludovini ve ark. (102) KHDAK olgularında MET ekzon 14 atlama mutasyonunun kötü prognoz göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve ark. (154) MET ekzon 14 atlama mutant grubun daha iyi genel ve hastalısız sağkalım göstermeye eğilimli olduğunu bildirmiştir. Ancak çalışma kapsamına alınanların büyük çoğunluğu evre I olgulardır. Vuong ve ark. (63) KHDAK olguları için yaptıkları metaanalizde MET ekzon 14 atlama mutasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda MET ekzon 14 atlama mutasyonu pozitif olgu yoktu. Geç siklusta düşük floresan ışımaya gösteren iki olgunun da takip bilgilerine ulaşamadığı için sağkalım analizi yapılamadı.

MET FISH pozitifliği ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasındaki ilişki için çalışma sonuçları şöyledir: Liu ve ark. (108) MET overekspresyonu, amplifikasyonu ve MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ancak anlamlı bir korelasyon bulunmadığını bildirmiştir. Kim ve ark. (154) MET SISH sonucu ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasında korelasyon olmadığını bildirmiştir. Schrock ve ark. (152) MET ekzon 14 atlama mutasyonu gösteren KHDAK olgularında %14,8 oranında eşlik eden MET amplifikasyonu bildirmiştir. Aynı seride MET ekzon 14 atlama mutasyonu wild tip grupta MET amplifikasyon oranı %2,5' tir. Eşlik eden MET amplifikasyonu olan ya da olmayan MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan olgular arasında ortalama yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, evre açısından anlamlı fark görülmemiştir. Tong ve ark. (40) MET gen kopya sayısı değişiklikleri ile MET ekzon 14 atlama mutasyonu arasında anlamlı ilişki bildirmiştir. Awad ve ark. (107) MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan 28 SHK dışı KHDAK olgusunun 6' sında (%21) yüksek MET gen kopya sayısı, 8' inde (%29) düşük MET gen kopya sayısı saptamıştır. Bu olgular içinde ortalama MET/CEP7 oranları evre IV MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan, evre I-III MET ekzon 14 atlama mutant ve evre IV MET ekzon 14 wild tip için sırayla 4,3; 1,4 ve 1,2 olarak bulunmuştur. Mignard ve ark. (112) 81 PSK olgusunu değerlendirdikleri çalışmada MET ekzon 14 atlama mutasyonu ve MET amplifikasyonunu birbiriyle ilişkili bulmamıştır.

Çalışmamızda 2 vakanın pozitif kabul edilmesi durumunda dahi MET ekzon 14 atlama mutasyonu ve MET amplifikasyon birlikteliği bulunmadı. Olguların 1' i FISH (+) (polizomi) idi. MET ekzon 14 atlama mutasyonu ile ortalama MET gen kopya

sayısı veya FISH pozitifliği ile istatistiksel anlamlı ilişkisi görülmedi ($p=0,942$ ve $p=1$). Ancak pozitif vaka sayısının yetersizliği nedeniyle bu değerlendirmenin anlamlı olmadığı düşünüldü.

Castiglione ve ark. (147) MET FISH pozitif ve MET ekzon 14 atlama mutant hasta gruplarının özelliklerini karşılaştırmıştır. Yüksek seviye MET amplifikasyonu gösteren olgular genellikle daha genç (ortalama 66), erkek, sigara kullanıcısı olmaya eğilimli iken; MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan olgular ileri yaş (ortalama 76), kadın, sigara içicisi olmayan özelliklere sahiptir. Bu iki grup arasında yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Aynı zamanda tanıdan 1 yıl sonra MET ekzon 14 atlama mutant olguların MET amplifiye olgulara göre daha iyi genel sağkalım gösterdikleri görülmüştür.

Çalışmamızda MET ekzon 14 atlama mutasyonu gösteren olgumuz olmadığı ve şüpheli iki olgumuzun sağkalım bilgilerine ulaşamadığımızdan MET amplifikasyon gösteren grupla karşılaştırma yapılamadı.

Çalışmamızda olgulardan birinde İHK ile sitoplazmik noktasal boyanma görüldü. Literatürde benzer boyanmanın tarif edildiği çalışma bulunamadı. Qiu ve ark. (109) 461 KHDAK olgusunda MET ekzon 14 atlama mutasyonu ve İHK ile MET overekspresyonunu değerlendirmiştir. MET ekzon 14 atlama mutasyonlarında indel (delesyon, insersiyon) ve nokta mutasyonu gösterenlerde, tümördeki MET protein lokalizasyonlarının farklı olduklarını saptamışlardır. Çalışmalarında 3 nokta mutasyonu gösteren olguda membranöz İHK pozitifliği görülürken, 4 delesyon ve 1 insersiyon mutasyonunda sitoplazmik boyanma görülmüştür. İHK boyanma farklılıklarının MET ekzon 14 atlama mutasyon tipiyle ilişkili olabileceği söylenmiştir. Çalışmamızda sitoplazmik noktasal boyanma gösteren olgumuzda MET ekzon 14 atlama mutasyonu wild-tip bulunmuştur. Ancak vakada FISH ile MET amplifikasyonu saptanmıştır. Literatürde bununla ilgili bir bilgiye rastlanmadı. Ancak bu olguda amplifikasyon pozitifliğinin anlamlı olabileceği düşünüldü.

Anti-MET monoklonal antikor Onartuzumab' ın Faz II klinik çalışması, İHK ile yüksek MET ekspresyonu olan ileri evre KHDAK' li hastalarda aktivitesini göstermiştir (115). KHDAK' li hastalarda MET inhibitörlerinin etkisini araştıran ilk faz III klinik çalışmalar hayal kırıklığı yaratmıştır. Ancak bu çalışmalarda MET overekspresyonu (İHK pozitifliği) ve/veya amplifikasyonu sergileyen hastalar hedeflenmiştir. (116–119).

MET ekzon 14 atlama mutasyonu varlığının, hastaların MET inhibitör tedavisine yanıtında prediktif değerinin yüksek olduğu düşünülmektedir (106). Bu bağlamda, MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan hastaların, Krizotinib gibi MET inhibitörlerine duyarlı olduğu, ancak MET proteininin overekspresyonu veya gen amplifikasyonu gösteren hastaların hedeflenen tedaviye kalıcı bir yanıt vermediği sonucuna varılmıştır (101,122). Yapılan çalışmalarda yüksek amplifikasyon gösteren (MET/CEP7 \geq 5) olguların anti-MET tedaviye daha iyi yanıt verdiği gözlenmiştir (121,166). MET ekzon 14 atlama mutasyonu olan hastaların MET inhibitörlerine duyarlılığı, literatürde dramatik yanıtlar veren çeşitli vaka raporlarıyla sonuçlanmıştır (123,124). Bu konuda klinik çalışmalar halen devam etmektedir (101,116).

Anti-MET tedavilere yanıtta İHK' nin prediktif değerinin düşük olduğu düşünülmektedir. Bunun nedenlerinden biri intratümöral heterojenite göstermesidir. Bir başka nedenin de MET amplifikasyonu ile arasındaki korelasyonun zayıflığı olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde günümüzde prediktif önemi ön plana çıkan MET ekzon 14 atlama mutasyonu ile de korelasyonunun zayıf olduğu düşünülmektedir. MET amplifikasyon veya MET ekzon 14 atlama mutasyonu gösteren olguların büyük çoğunluğu MET İHK ile overekspresyon gösteriyor olsa da kullanılan İHK antikoru MET ekzon 14 atlama mutasyonları varyantlarına spesifik değildir. Bazı olgularda yalnızca MET overekspresyonu görülmektedir. Bu olgularda İHK overekspresyonunun MET amplifikasyonu veya ekzon 14 atlama mutasyonundan bağımsız hipoksi vb. diğer sekonder nedenlere bağlı gelişmiş olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

- İHK değerlendirmesi sonucu tümörün pür sarkomatoid komponenti ve eşlik eden KHDAK komponentiyle birlikte değerlendirdiğinde elde edilen MET overekspresyon oranları %23,6- 27,3 arasında değişmekteydi. Eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti değerlendirmeye dahil edildiğinde oranlarda hafif artış görüldü. Ancak bulunan METMab ve H-skorları birbiriyle istatistiksel olarak çok yüksek oranda koreleydi.

- İHK sonuçları intratümöral heterojenite göstermektedir. İHK pozitif ve negatif olgular arasında, tümöre eşlik eden diferansiye KHDAK komponentinin alt tipi açısından anlamlı fark izlendi. Sarkomatoid karsinomlarda eşlik eden diferansiye KHDAK komponenti varsa ve bu alan AK niteliğindeyse, İHK' nın değerlendirmeye dahil edilmesinin İHK skorlarını arttıracakını düşünmekteyiz.

- FISH sonuçları intratümöral heterojenite göstermekteydi. İHK ile kuvvetli boyanan alanlarda tekrarlandığında, FISH ile saptanan ortalama gen kopya sayıları anlamlı artış gösterdi.

- İHK pozitif ve negatif olgu grupları arasında ortalama MET gen kopya sayısında anlamlı artış görülmedi. Ancak bu değerlendirmede, İHK pozitif ve negatif gruplar tümör totalindeki boyanma oranına göre belirlenmişti. İHK tümörlerde heterojen boyanma göstermekteydi. İHK negatif gruba dahil olmuş bazı olguların kuvvetli pozitif boyanan alanları mevcuttu. İHK pozitif ve negatif gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark çıkmama sebebinin buna bağlı olduğu düşünmekteyiz.

- MET amplifikasyonu pozitif ve FISH negatif olgu gruplar arasında, diğer İHK değerlendirmeleri arasında fark bulunmazken, değerlendirme pür sarkomatoid komponentte yapıldığında, H-skorları arasında anlamlı fark saptandı. Sarkomatoid karsinomlarda FISH değerlendirmesinin, olgu total skorda İHK pozitif gruba dahil edilmese de, İHK' da kuvvetli pozitiflik gösteren sarkomatoid morfolojideki alanlarda yapılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

- MET İHK ve FISH sonuçları 47 olgunun 33' ünde (%70,2) uyumlu sonuç gösterdi. Ancak İHK ile FISH sonucu arasında zayıf korelasyon görüldü ($Rho=0,253$). İHK sonucunun FISH sonucuna etkisini göstermek için yapılan ikili lojistik regresyon analizinde İHK pozitif olan olguların İHK negatif olgulara göre daha fazla FISH pozitif olma olasılığı saptandı. ($OR=3,125$). İHK' nın düşük

duyarlılığı nedeniyle FISH (+) veya amplifikasyon gösteren olgular için tarama testi olarak kullanılmayacağını düşünmekteyiz.

- Bir olgumuzda ilginç olarak sitoplazmik noktasal pozitif boyanma görüldü. Bu olgunun FISH değerlendirmesinde MET amplifikasyonu saptandı. Literatürde bu boyanma paterniyle ilgili bilgiye rastalanmadı. Bu boyanmanın amplifikasyonla ilişkili olabileceği düşünüldü.

- FISH pozitif ve negatif olgu grupları karşılaştırıldığında, histolojik alt tipler açısından anlamlı fark saptandı. Dev hücreli karsinomlarda istatistiksel olarak anlamlı, artmış oranda MET FISH pozitifliği görüldü.

- Değerlendirilebilen olguların hiçbirinde RT-PCR sonucu MET ekzon 14 atlama mutasyonu saptanmadı. 2 olguda (%5,5) pozitiflik kriterini karşılamayan gecikmiş siklusta düşük floresan ışımaya saptandı. Bu sonucun fiksasyon ve parafinizasyona bağlı RNA kalitesinin bozulmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

- İHK ile, FISH pozitif, MET amplifikasyonu pozitif olguların çoğunda ve MET ekzon 14 mutasyon şüpheli 2 olguda İHK ile MET overekspresyonu görülmüştür. Ancak İHK pozitif olguda MET FISH pozitifliği, MET amplifikasyon pozitifliği veya MET ekzon 14 mutasyonu pozitifliği görülmemiştir. Bu olgularda İHK overekspresyonunun MET amplifikasyonu veya ekzon 14 atlama mutasyonundan bağımsız hipoksi vb. diğer sekonder nedenlere bağlı gelişmiş olabileceği düşünülmektedir.

- Çalışmamızda vaka sayısı bu tümörlerin nadir görülmesi nedeniyle kısıtlıdır. Ancak, sarkomatoid karsinom olgularındaki MET genetik değişiklikleri (MET overekspresyonu, MET gen kopya sayısı değişiklikleri, MET amplifikasyonu, MET ekzon 14 atlama mutasyonu) ve bunların saptanmasında kullanılan testlerin karşılaştırılması konusunda bilgi birikiminde artışa yol gösterecek olan çalışmalara yön vermesi açısından önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;
2. Hacıkamiloğlu E, Gültekin M, Boztaş G, Dündar S, Utku EŞ, Kavak Ergün A, et al. Türkiye Kanser İstatistikleri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2017;
3. Yendamuri S, Caty L, Pine M, Adem S, Bogner P, Miller A, et al. Outcomes of sarcomatoid carcinoma of the lung: A Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis. *Surg (United States).* 2012;
4. Ung M, Rouquette I, Filleron T, Taillandy K, Brouchet L, Bennouna J, et al. Characteristics and Clinical Outcomes of Sarcomatoid Carcinoma of the Lung. *Clin Lung Cancer.* 2016;
5. Siegfried JM, Weissfeld LA, Luketich JD, Weyant RJ, Gubish CT, Landreneau RJ. The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1998;
6. Liu Y. The human hepatocyte growth factor receptor gene: Complete structural organization and promoter characterization. *Gene.* 1998;
7. Dean M, Park M, Le Beau MM, Robins TS, Diaz MO, Rowley JD, et al. The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature.* 1985;
8. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2003.
9. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AML, Kmieciak TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science (80-).* 1991;
10. Singh Raghav KGonzalez-Angulo ABlumenschein G. Role of HGF/MET axis in resistance of lung cancer to contemporary management. 2012;
11. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol.* 2007;
12. Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;
13. Nejak-Bowen K, Orr A, Bowen WC, Michalopoulos GK. Conditional Genetic

- Elimination of Hepatocyte Growth Factor in Mice Compromises Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *PLoS One*. 2013;
14. Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM BW. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells.
 15. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol*. 1992;
 16. Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W. Scatter factor: Molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J Cell Biol*. 1990;
 17. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*. 1987;
 18. Boromand N, Hasanzadeh M, ShahidSales S, Farazestanian M, Gharib M, Fiuji H, et al. Clinical and prognostic value of the C-Met/HGF signaling pathway in cervical cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2018.
 19. Cheng Y, Song Y, Qu J, Che X, Song N, Fan Y, et al. The Chemokine Receptor CXCR4 and c-MET Cooperatively Promote Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer Cells. *Transl Oncol*. 2018;
 20. Marshall DD, Kornberg LJ. Overexpression of scatter factor and its receptor (c-met) in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 1998;
 21. Raghav KP, Wang W, Liu S, Chavez-MacGregor M, Meng X, Hortobagyi GN, et al. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes. *Clin Cancer Res*. 2012;
 22. Fujita S, Sugano K. Expression of c-met Proto-oncogene in Primary Colorectal Cancer and Liver Metastases. *Jpn J Clin Oncol*. 1997;
 23. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Coccia E, Capogreco M, Colella G, et al. Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol*. 2006;
 24. De Oliveira ATT, Matos D, Logullo AF, Da Silva SRM, Neto RA, Filho AL, et al. MET is highly expressed in advanced stages of colorectal cancer and indicates worse prognosis and mortality. *Anticancer Res*. 2009;
 25. Liu X, Yao W, Newton RC, Scherle PA. Targeting the c-MET signaling pathway for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2008.

26. Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006.
27. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, Prat M, Maggi G, Arena N, Natali PG, Comoglio PM DRM. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas.
28. Tsao MS, Liu N, Chen JR, Pappas J, Ho J, To C, Viallet J, Park M ZH. Differential expression of Met/hepatocyte growth factor receptor in subtypes of non-small cell lung cancers.
29. Arriola E, Cãadas I, Arumí-Uría M, Dómine M, Lopez-Vilarño JA, Arpí O, et al. MET phosphorylation predicts poor outcome in small cell lung carcinoma and its inhibition blocks HGF-induced effects in MET mutant cell lines. *Br J Cancer*. 2011;
30. Pelosi G, Sonzogni A, De Pas T, Galetta D, Veronesi G, Spaggiari L, et al. Pulmonary sarcomatoid carcinomas: A practical overview. *International Journal of Surgical Pathology*. 2010.
31. Hong JY, Choi MK, Uhm JE, Park MJ, Lee J, Park YH, et al. The role of palliative chemotherapy for advanced pulmonary pleomorphic carcinoma. *Med Oncol*. 2009;
32. Vieira T, Girard N, Ung M, Monnet I, Cazes A, Bonnette P, et al. Efficacy of first-line chemotherapy in patients with advanced lung sarcomatoid carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2013;
33. Bae HM, Min HS, Lee SH, Kim DW, Chung DH, Lee JS, et al. Palliative chemotherapy for pulmonary pleomorphic carcinoma. *Lung Cancer*. 2007;
34. Ouziane I, Boutayeb S, Mrabti H, Lalya I, Rimani M, Errihani H. Sarcomatoid carcinoma of the lung: A model of resistance of chemotherapy. *N Am J Med Sci*. 2014;
35. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, Chalmers ZR, Rosenzweig M, Erlich RL, et al. Characterization of 298 patients with lung cancer harboring MET Exon 14 skipping alterations. *J Thorac Oncol*. 2016;
36. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, Shen Y, Cheng H, Chen J, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol*. 2016;
37. Mignard X, Ruppert AM, Antoine M, Vasseur J, Girard N, Mazières J, et al.

- c-MET Overexpression as a Poor Predictor of MET Amplifications or Exon 14 Mutations in Lung Sarcomatoid Carcinomas. *J Thorac Oncol.* 2018;
38. Casadevall D, Gimeno J, Clavé S, Taus Álvarez, Pijuan L, Arumí M, et al. MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget.* 2015;
 39. Park S, Koh J, Kim DW, Kim M, Keam B, Kim TM, et al. MET amplification, protein expression, and mutations in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2015;
 40. Tong JH, Yeung SF, Chan AWH, Chung LY, Chau SL, Lung RWM, et al. MET amplification and exon 14 splice site mutation define unique molecular subgroups of non-small cell lung carcinoma with poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2016;
 41. Watermann I, Schmitt B, Stellmacher F, Müller J, Gaber R, Kugler C, et al. Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: Expression, amplification and activation? *Diagn Pathol.* 2015;
 42. American Cancer Society. *Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures 2016-2017.* Am Cancer Soc. 2016;
 43. Ezzati M, Henley SJ, Lopez AD, Thun MJ. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: Current patterns and data needs. *Int J Cancer.* 2005;
 44. Simonato L, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, et al. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: An update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer.* 2001;
 45. Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., Nicholson G. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart: International Agency for Research on Cancer; 2015. 2015.
 46. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: A meta-analysis. *Lung Cancer.* 2001;
 47. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Gender, histology, and time of diagnosis are important factors for prognosis: Analysis of 1499 never-smokers with advanced non-small cell lung cancer in Japan. *J Thorac Oncol.* 2010;
 48. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: Symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic

- syndromes. *Chest*. 2003.
49. Ost DE, Jim Yeung S-C, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and Organizational Factors in the Initial Evaluation of Patients With Lung Cancer. *Chest*. 2013;
 50. Johnson DH. Management of small cell lung cancer: Current state of the art. *Chest*. 1999;
 51. Edwards SL, Roberts C, McKean ME, Cockburn JS, Jeffrey RR, Kerr KM. Preoperative histological classification of primary lung cancer: Accuracy of diagnosis and use of the non-small cell category. *J Clin Pathol*. 2000;
 52. AJCC Cancer Staging Manual. *AJCC Cancer Staging Manual*. 2017.
 53. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*. 2017.
 54. Hattori A, Takamochi K, Oh S, Suzuki K. New revisions and current issues in the eighth edition of the TNM classification for non-small cell lung cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2019.
 55. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;
 56. Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, et al. The IASLC lung cancer staging project: The new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014;
 57. Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: Review of the changes and clinical implications. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2018.
 58. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;
 59. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, et al. A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *Am J Surg Pathol*. 2010;
 60. Gao S, Stein S, Petre EN, Shady W, Durack JC, Ridge C, et al. Micropapillary and/or Solid Histologic Subtype Based on Pre-Treatment Biopsy Predicts Local Recurrence After Thermal Ablation of Lung Adenocarcinoma.

- Cardiovasc Intervent Radiol. 2018;
61. Kadota K, Yeh YC, Sima CS, Rusch VW, Moreira AL, Adusumilli PS, et al. The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: A conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Mod Pathol*. 2014;
 62. Tsao M -S, Fraser RS. Primary pulmonary adenocarcinoma with enteric differentiation. *Cancer*. 1991;
 63. Vuong HG, Ho ATN, Altibi AMA, Nakazawa T, Katoh R, Kondo T. Clinicopathological implications of MET exon 14 mutations in non-small cell lung cancer – A systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer* [Internet]. 2018;123(July):76–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.006>
 64. Tong JH, Yeung SF, Chan AWH, Chung LY, Chau SL, Lung RWM, et al. MET amplification and exon 14 splice site mutation define unique molecular subgroups of non-small cell lung carcinoma with poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):3048–56.
 65. Fallet V, Saffroy R, Girard N, Mazieres J, Lantuejoul S, Vieira T, et al. High-throughput somatic mutation profiling in pulmonary sarcomatoid carcinomas using the LungCarta™ Panel: Exploring therapeutic targets. *Ann Oncol*. 2015;
 66. Lococo F, Gandolfi G, Rossi G, Pinto C, Rapicetta C, Cavazza A, et al. Deep sequencing analysis reveals that KRAS mutation is a marker of poor prognosis in patients with pulmonary sarcomatoid carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2016;
 67. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, Shen Y, Cheng H, Chen J, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol*. 2016;34(8):794–802.
 68. Lin L, Huang F, Chen F, He Y, Hu J, Cao X. Anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged pulmonary pleomorphic carcinoma successfully treated with crizotinib. *J Int Med Res*. 2018;46(8):3491–7.
 69. Vieira T, Girard N, Ung M, Monnet I, Cazes A, Bonnette P, et al. Efficacy of first-line chemotherapy in patients with advanced lung sarcomatoid carcinoma. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2013;8(12):1574–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/01.JTO.0000437008.00554.90>
 70. Li X, Wang D, Zhao Q, Ren D, Ren F, Chen G, et al. Clinical Significance

- and Next-Generation Sequencing of Chinese Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–10.
71. Başak H, Anadolu Ç, Merkezi S, Onkolojisi R. Derleme|Review Yazışma Adresi / Address for Correspondence T1-3 N2 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde (KHDAK) Cerrahi Dışı Tedavi Yaklaşımları Non-Surgical Treatments in NSCLC with T1-3 N2 Stage. *Güncel Göğüs Hast Serisi.* 2018;
 72. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;
 73. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung, cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (80-).* 2004;
 74. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors guideline from the college of American pathologists, the international association for the study of lung cancer, and the a. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 2018.
 75. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;
 76. Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature.* 1984;
 77. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992;119(3):629–41.
 78. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature.* 1987;327(6119):239–42.
 79. Boromand N, Hasanzadeh M, ShahidSales S, Farazestanian M, Gharib M, Fiuji H, et al. Clinical and prognostic value of the C-Met/HGF signaling pathway in cervical cancer. *J Cell Physiol.* 2018;233(6):4490–6.
 80. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T.

- Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;53(1):35–69.
81. Lawrence RE, Salgia R. MET molecular mechanisms and therapies in lung cancer. *Cell Adhes Migr*. 2010;4(1):146–52.
 82. Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett*. 2005;225(1):1–26.
 83. Arnold L, Enders J, Thomas SM. Activated HGF-c-met axis in head and neck cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(12):1–22.
 84. Singh Raghav KP, Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR. Role of HGF/MET axis in resistance of lung cancer to contemporary management. Vol. 1, *Translational Lung Cancer Research*. AME Publishing Company; 2012. p. 179–93.
 85. Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2012.
 86. Drilon A, Cappuzzo F, Ou SHI, Camidge DR. Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017;12(1):15–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.014>
 87. Awad MM. Impaired c-met receptor degradation mediated by MET exon 14 mutations in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2016.
 88. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2009;
 89. Go H, Jeon YK, Park HJ, Sung SW, Seo JW, Chung DH. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;
 90. Okuda K, Sasaki H, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2008;99(11):2280–5.
 91. Dziadziuszko R, Wynes MW, Singh S, Asuncion BR, Ranger-Moore J, Konopa K, et al. Correlation between MET gene copy number by silver in situ hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2012;

92. Lee C-C, Yamadas KM. Identification of a Novel Type of Alternative Splicing of a Tyrosine Kinase Receptor. *J Biowgical Chem* [Internet]. 1994;269(30):19457–61. Available from: <http://www.jbc.org/content/269/30/19457.full.pdf>
93. Weidner KM, Sachs M, Riethmacher D, Birchmeier W. Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of- function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;
94. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, et al. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell*. 2001;
95. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: Novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res*. 2003;
96. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2005;65(4):1479–88.
97. Drilon A. MET exon 14 alterations in lung cancer: Exon skipping extends half-life. *Clin Cancer Res*. 2016;
98. Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2009;4(1):5–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181913e0e>
99. Seo JS, Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee JK, Bleazard T, et al. The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res*. 2012;
100. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*. 2014;
101. Reungwetwattana T, Liang Y, Zhu V, Ou SHI. The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: The Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. *Lung Cancer* [Internet]. 2017;103:27–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.11.011>

102. Ludovini V, Bianconi F, Pistola L, Minotti V, Chiari R, Colella R, et al. Optimization of patient selection for EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer by combined analysis of KRAS, PIK3CA, MET, and non-sensitizing EGFR mutations. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;
103. Saffroy R, Fallet V, Girard N, Mazieres J, Sibilot DM, Lantuejoul S, et al. MET exon 14 mutations as targets in routine molecular analysis of primary sarcomatoid carcinoma of the lung. *Oncotarget*. 2017;
104. Zheng D, Wang R, Ye T, Yu S, Hu H, Shen X, et al. MET exon 14 skipping defines a unique molecular class of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;
105. Gow CH, Hsieh MS, Wu SG, Shih JY. A comprehensive analysis of clinical outcomes in lung cancer patients harboring a MET exon 14 skipping mutation compared to other driver mutations in an East Asian population. *Lung Cancer* [Internet]. 2017;103(7):82–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.12.001>
106. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov*. 2015;5(8):850–60.
107. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P, et al. MET exon 14 mutations in Non-small-cell lung cancer are associated with advanced age and stage-dependent MET genomic amplification and c-Met overexpression. *J Clin Oncol*. 2016;34(7):721–30.
108. Liu SY, Gou LY, Li AN, Lou NN, Gao HF, Su J, et al. The unique characteristics of MET exon 14 mutation in Chinese patients with NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2016;11(9):1503–10.
109. Qiu T, Li W, Zhang T, Xing P, Huang W, Wang B, et al. Distinct MET Protein Localization Associated With MET Exon 14 Mutation Types in Patients With Non–small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2018;19(4):e391–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.12.006>
110. Jeon YK, Kim TM, Kim DW, Jeon YK, Chung DH. MET exon 14 skipping mutation in triple-negative pulmonary adenocarcinomas and pleomorphic carcinomas: An analysis of intratumoral MET status heterogeneity and clinicopathological characteristics. *Lung Cancer* [Internet]. 2017;106:131–7.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.02.008>

111. Lee GD, Lee SE, Oh DY, Yu D bi, Jeong HM, Kim J, et al. MET Exon 14 Skipping Mutations in Lung Adenocarcinoma: Clinicopathologic Implications and Prognostic Values. *J Thorac Oncol*. 2017;
112. Mignard X, Ruppert AM, Antoine M, Vasseur J, Girard N, Mazières J, et al. c-MET Overexpression as a Poor Predictor of MET Amplifications or Exon 14 Mutations in Lung Sarcomatoid Carcinomas. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2018;13(12):1962–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.008>
113. Pilotto S, Carbognin L, Karachaliou N, Ma PC, Rosell R, Tortora G, et al. Tracking MET de-addiction in lung cancer: A road towards the oncogenic target. *Cancer Treat Rev*. 2017;60:1–11.
114. Matsubara D, Ishikawa S, Sachiko O, Aburatani H, Fukayama M, Niki T. Co-activation of epidermal growth factor receptor and c-MET defines a distinct subset of lung adenocarcinomas. *Am J Pathol*. 2010;
115. Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Blumenschein GR, et al. Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;
116. O'Brien O, Wright MC, O'Brien C, Geoghegan O, Leonard N, Nicholson S, et al. Cost-efficient and easy to perform PCR-based assay to identify MET exon 14 skipping in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) non-small cell lung cancer (NSCLC) samples. *Diagnostics*. 2019;
117. Scagliotti G, Von Pawel J, Novello S, Ramlau R, Favaretto A, Barlesi F, et al. Phase III multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled study of tivantinib (ARQ 197) plus erlotinib versus erlotinib alone in previously treated patients with locally advanced or metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2015;
118. Yoshioka H, Azuma K, Yamamoto N, Takahashi T, Nishio M, Katakami N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of erlotinib with or without a c-Met inhibitor tivantinib (ARQ 197) in Asian patients with previously treated stage IIIB/IV nonsquamous nonsmall-cell lung cancer harboring wild-type epidermal. *Ann Oncol*. 2015;
119. Spigel DR, Edelman MJ, O'Byrne K, Paz-Ares L, Mocci S, Phan S, et al.

- Results From the Phase III Randomized Trial of Onartuzumab Plus Erlotinib Versus Erlotinib in Previously Treated Stage IIIB or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: METLung. *J Clin Oncol*. 2017;
120. Camidge DR, Ou S-HI, Shapiro G, Otterson GA, Villaruz LC, Villalona-Calero MA, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET -amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). . *J Clin Oncol*. 2014;
 121. Ou SHI, Kwak EL, Siwak-Tapp C, Dy J, Bergethon K, Clark JW, et al. Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J Thorac Oncol*. 2011;
 122. Bubendorf L, Dafni U, Schöbel M, Finn SP, Tischler V, Sejda A, et al. Prevalence and clinical association of MET gene overexpression and amplification in patients with NSCLC: Results from the European Thoracic Oncology Platform (ETOP) Lungscape project. *Lung Cancer*. 2017;
 123. Kauffmann-Guerrero D, Kahnert K, Kumbrink J, Syunyaeva Z, Tufman A, Huber RM. Successful Treatment of a Patient With NSCLC Harboring an EGFR Mutation and a Concomitant Met Exon 14 Skipping Mutation Combining Afatinib and Crizotinib. *Clin Lung Cancer*. 2019;
 124. Ricciuti B, Marcomigni L, Metro G, Bellezza G, Caselli E, Baglivo S, et al. Identification of EML4-ALK Rearrangement and MET Exon 14 R988C Mutation in a Patient with High-Grade Neuroendocrine Lung Carcinoma Who Experienced a Lazarus Response to Crizotinib. *Journal of Thoracic Oncology*. 2018.
 125. Finocchiaro G, Toschi L, Gianoncelli L, Baretta M, Santoro A. Prognostic and predictive value of MET deregulation in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med*. 2015;3(6):1–12.
 126. Jeon YK, Kim TM, Kim DW, Jeon YK, Chung DH. MET exon 14 skipping mutation in triple-negative pulmonary adenocarcinomas and pleomorphic carcinomas: An analysis of intratumoral MET status heterogeneity and clinicopathological characteristics. *Lung Cancer*. 2017;
 127. Sun W, Song L, Ai T, Zhang Y, Gao Y, Cui J. Prognostic value of MET, cyclin D1 and MET gene copy number in non-small cell lung cancer. *J Biomed Res*. 2013;
 128. Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, et al. C-

- MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol.* 2012;
129. Park S, Choi Y La, Sung CO, An J, Seo J, Ahn MJ, et al. High MET copy number and MET overexpression: Poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol.* 2012;
 130. Tubbs RR, Stoler MH. Preface. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology.* 2009.
 131. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(9):643–55.
 132. Tanaka A, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Takeda Y, Mitsuoka M, Yamasaki F, et al. Co-existence of positive MET FISH status with EGFR mutations signifies poor prognosis in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer.* 2012;
 133. Jurmeister P, Lenze D, Berg E, Mende S, Schäper F, Kellner U, et al. Parallel screening for ALK, MET and ROS1 alterations in non-small cell lung cancer with implications for daily routine testing. *Lung Cancer.* 2015;
 134. Varella-Garcia M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: The EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol.* 2006;
 135. Schildhaus HU, Schultheis AM, Rüschoff J, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J, et al. Met amplification status in therapy-naïve adeno- And squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res.* 2015;
 136. Kowalczyk O, Kozłowski M, Niklinska W, Kisluk J, Niklinska BJ, Niklinski J. Increased met gene copy number but not mrna level predicts postoperative recurrence in patients with non–small cell lung cancer. *Transl Oncol.* 2014;
 137. Chen YT, Chang JWC, Liu HP, Yu TF, Chiu YT, Hsieh JJ, et al. Clinical implications of high MET gene dosage in non-small cell lung cancer patients without previous tyrosine kinase inhibitor treatment. *J Thorac Oncol.* 2011;
 138. Onitsuka T, Uramoto H, Ono K, Takenoyama M, Hanagiri T, Oyama T, et al. Comprehensive molecular analyses of lung adenocarcinoma with regard to the epidermal growth factor Receptor, K-ras, MET, and hepatocyte growth factor status. *J Thorac Oncol.* 2010;
 139. Somma M, Querci M. G 1 da Örneklerinde Geneti ğ i De ğ i ş tirilmi ş

Organizma Analizleri Bölüm 6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).

140. Olsvik O, Wahlberg J, Petterson B, Uhlen M, Popovic T, Wachsmuth IK, et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J Clin Microbiol*. 1993;
141. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. 1990;
142. Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol*. 1987;
143. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;
144. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;
145. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;
146. Depristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella K V., Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;
147. Castiglione R, Alidousty C, Holz B, Wagener S, Baar T, Heydt C, et al. Comparison of the genomic background of MET-altered carcinomas of the lung: biological differences and analogies. *Mod Pathol* [Internet]. 2019;32(5):627–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0182-8>
148. Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, et al. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosom Cancer*. 2008;
149. Tsao MS, Yang Y, Marcus A, Liu N, Mou L. Hepatocyte growth factor is predominantly expressed by the carcinoma cells in non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2001;
150. Garber K. MET inhibitors start on road to recovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014.
151. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung

- cancer. *Cancer Res.* 2005;
152. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, Chalmers ZR, Rosenzweig M, Erlich RL, et al. Characterization of 298 patients with lung cancer harboring MET Exon 14 skipping alterations. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016;11(9):1493–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.004>
 153. Vieira T, Antoine M, Ruppert AM, Fallet V, Duruisseaux M, Giroux Leprieur E, et al. Blood vessel invasion is a major feature and a factor of poor prognosis in sarcomatoid carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2014;
 154. Kim EK, Kim KA, Lee CY, Kim S, Chang S, Cho BC, et al. Molecular Diagnostic Assays and Clinicopathologic Implications of MET Exon 14 Skipping Mutation in Non–small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2019;20(1):e123–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.10.004>
 155. Yu Y, Zhang Q, Zhang J, Lu S. Prevalence of MET exon 14 skipping mutation in pulmonary sarcomatoid carcinoma patients without common targetable mutations: A single-institute study. *J Cancer Res Ther.* 2019;
 156. Sterlacci W, Fiegl M, Gugger M, Bubendorf L, Savic S, Tzankov A. MET overexpression and gene amplification: prevalence, clinico-pathological characteristics and prognostic significance in a large cohort of patients with surgically resected NSCLC. *Virchows Arch.* 2017;471(1):49–55.
 157. Yeung SF, Tong JHM, Law PPW, Chung LY, Lung RWM, Tong CYK, et al. Profiling of Oncogenic Driver Events in Lung Adenocarcinoma Revealed MET Mutation as Independent Prognostic Factor. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015;10(9):1292–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000620>
 158. Tretiakova M, Salama AKS, Karrison T, Ferguson MK, Husain AN, Vokes EE, et al. MET and phosphorylated MET as potential biomarkers in lung cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2011;
 159. Kim IH, Lee IH, Lee JE, Hong SH, Kim TJ, Lee KY, et al. Prognostic Impact of Multiple Clinicopathologic Risk Factors and c-MET Overexpression in Patients Who Have Undergone Resection of Stage IB Non–Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2016;
 160. Tran TN, Selinger CI, Kohonen-Corish MRJ, McCaughan B, Kennedy C, O’Toole SA, et al. Alterations of MET Gene Copy Number and Protein

- Expression in Primary Non-Small-Cell Lung Cancer and Corresponding Nodal Metastases. *Clin Lung Cancer*. 2016;
161. Guo B, Cen H, Tan X, Liu W, Ke Q. Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: A meta-analysis of published. *PLoS One*. 2014;
 162. Davies KD, Lomboy A, Lawrence CA, Yourshaw M, Bocsi GT, Camidge DR, et al. DNA-Based versus RNA-Based Detection of MET Exon 14 Skipping Events in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2019;14(4):737–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.020>
 163. Heist RS, Shim HS, Gingipally S, Mino-Kenudson M, Le L, Gainor JF, et al. MET Exon 14 Skipping in Non-Small Cell Lung Cancer . *Oncologist*. 2016;21(4):481–6.
 164. Lambros L, Uguen A. MET Immunohistochemistry Should Be Avoided in Selecting Non–small-cell Lung Cancers Requiring MET Exon 14 Skipping Mutation Analysis. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2019;20(3):e418–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.12.002>
 165. Krishnaswamy S, Kanteti R, Duke-Cohan JS, Loganathan S, Liu W, Ma PC, et al. Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;
 166. Schwab R, Petak I, Kollar M, Pinter F, Varkondi E KA. Major partial response to crizotinib, a dual MET/ALK inhibitor, in a squamous cell lung (SCC) carcinoma patient with de novo c-MET amplification in the absence of ALK rearrangement.