



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

**AKCİĞER ADENOKARSİNOMLARINDA ROS1
GEN YENİDEN DÜZENLENMESİNİN
FLORESAN İNSİTU HİBRİDİZASYON (FİSH)
VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Erdem AYIK

Antalya, 2017



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

**AKCİĞER ADENOKARSİNOMLARINDA ROS1
GEN YENİDEN DÜZENLENMESİNİN
FLORESAN İNSİTU HİBRİDİZASYON (FISH)
VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Erdem AYIK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İrem Hicran ÖZBUDAK

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TTU-2016-1546 Proje No ile desteklenmiştir.**

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2017

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epidemiyoloji	4
2.2. Akciğer Adenokarsinomu Etiyolojisi	5
2.2.1. Sigara	5
2.2.2. Diğer Faktörler	7
2.3. Klinik	7
2.4. Evreleme	9
2.5. Sınıflama	10
2.6. Adenokarsinom	12
2.7.1. Lepidik Adenokarsinom	12
2.7.2. Asiner Adenokarsinom	12
2.7.3. Papiller Adenokarsinom	13
2.7.4. Mikropapiller Adenokarsinom	13
2.7.5. Solid Adenokarsinom	13
2.7.6. İnvaziv Müsinöz Adenokarsinom	13
2.7.7. Kolloidal Adenokarsinom	14
2.7.8. Fetal Adenokarsinom	14
2.7.9. Enterik Adenokarsinom	14
2.7.10. Minimal İnvaziv Adenokarsinom	14
2.8. Genetik	15
2.8.1. ROS1	17
2.9. Prognostik Faktörler	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Etik Kurul	18
3.2. Hasta Seçimi ve Hazırlık	18

3.3. ROS1 Geni FİSH İncelenmesi	20
3.3.1. ZytoLight® SPEC ROS1 Break Apart Probe Özellikleri	22
3.4. İHK Prosedürü ve Değerlendirilmesi	22
3.4.1. ROS1 İHKsal Spesifik Antikor Özellikleri	23
3.5. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA	42
5.1. ROS1	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. ÖZET	59
8. ABSTRACT	60
9. KAYNAKLAR	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAK	Akciğer adenokarsinomu
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
BRAF	B-Form rapidly accelerated fibrosarcoma
BBA	Büyük büyütme alanı
CD74	Cluster of differentiation 74
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EZR	Ezrin
FİSH	Floresans insitu hibridiasyon
GLOBOCAN	Global burden of cancer study
HE	Hematoksilen&Eozin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
İHK	İmmünohistokimya
KHAK	Küçük hücreli akciğer karsinomu
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu
KRAS	Kirsten's rat sarcoma
KT	Kemoterapi
LRIG3	Leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 3
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
NOS	Not otherwise spesified
NRTK1	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1
NUT	Nuclear protein in testis
Ör.	Örnek
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase catalytic subunit alpha
RET	Ret proto-oncogene
ROS1	ROS proto-oncogene 1
SDC4	Syndecan 4
SLC34A2	Solute carrier family 34 member 2

SSC	Saline sodium citrate
TKİ	Tirozin kinaz inhibitörü
TNM	Tümör, lenf nodu, metastaz
TPM3	Tropomyosin 3



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Akciğer tümör makroskopik örneği	8
Şekil 3.1. Dokuların yeniden bloklanıp kesilmesi	19
Şekil 3.2. Çalışmamıza alınan vakaların seçimi	20
Şekil 4.1. Lepidik patern	25
Şekil 4.2. Asiner patern	26
Şekil 4.3. Papiller patern	26
Şekil 4.4. Mikropapiller patern	27
Şekil 4.5. Solid patern	27
Şekil 4.6. Berrak hücre değişikliği	28
Şekil 4.7. Müsinöz adenokarsinom	28
Şekil 4.8. Psammom cisimcikleri	29
Şekil 4.9. ROS1 FISH pozitifliği	39
Şekil 4.10. ROS1 FISH negatifliği	39
Şekil 4.11. İHKsal ROS1 (+1) pozitifliği	40
Şekil 4.12. İHKsal ROS1 pozitifliği gösteren tümör dışı alanlar	40
Şekil 5.1. Kanserin özellikleri; karakteristik özelliklerini meydana getiren ve sonradan ortaya çıkan özellikleri	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Erkeklerde sigaraya bağlı mortalite(Thun'dan, 22)	6
Çizelge 2.2. Kadınlarda sigaraya bağlı mortalite(Thun'dan, 22)	6
Çizelge 2.3. Akciğer karsinomlarının TNM sınıflaması 30-31)	9
Çizelge 2.4. Akciğer karsinomlarında evreleme (30-31)	10
Çizelge 2.5. Akciğer tümörlerinin DSÖ sınıflandırması (Travis'den, 4)	11
Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyete göre dağılımı	24
Çizelge 4.2. Çalışmaya alınan materyallerin dağılımı	24
Çizelge 4.3.Hastaların predominant paterne ve tümör tiplerine göre dağılımı	29
Çizelge 4.4. Hastaların tanı anındaki evrelerine göre dağılımı	30
Çizelge 4.5. Hastaların sigara kullanma durumuna göre dağılımı	31
Çizelge 4.6 Hastaların sigara kullanma öyküsüne göre özellikleri	31
Çizelge 4.11. Hastaların cinsiyete göre medyan sağ kalım değerleri	32
Çizelge 4.12 Hastaların sağ kalım grafiği	32
Çizelge 4.7. EGFR mutasyon durumuna göre hastaların özellikleri	34
Çizelge 4.8. ALK yeniden düzenlenme durumuna göre hastaların özellikleri	36
Çizelge 4.9. FİSH ROS1 durumuna göre hastaların özellikleri	37
Çizelge 4.10.ROS1 içinFİSH ve İHK sonuçlarının karşılaştırılması	41
Çizelge 5.1. AAK tanıli hastaların yıllara göre sigara içme oranları	43

1. GİRİŞ

Dünyada kansere bağlı ölümlerin 1,59 milyonundan akciğer kanserleri sorumlu olup 2012 yılında 1,82 milyon hasta akciğer kanseri tanısı almıştır (1). Son dekata kadar akciğer karsinomlarını küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) olarak sınıflamak hastaların tedavi planlarının oluşturulması için yeterliydi. KHDAK hastaları platinyum temelli tek bir kemoterapi (KT) rejimiyle tedavi ediliyordu. Bir çalışmada KT'ye cevap oranı %20 ve bu hastaların medyan yaşam süresi 8 ay olarak bildirilmiştir (2). Sonraki yıllarda histolojik özelliklerin ve morfolojik sınıflandırmanın KT seçiminde önemli olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Scagliotti ve ark'nın (2) çalışması sisplatin/pemetreksed kombinasyonunun adenokarsinomlarda sisplatin/gemistabine tedavisine göre daha etkin olduğuna dikkat çekmiştir. Böylece bazı antikanser ilaçların spesifik alt tiplerde tedavi üstünlüğünün bulunması ve bazı antikanser ilaçların bazı alt tiplerde kontrendike olması KHDAK tanımlamasının yetersiz kalmasına neden olmuştur (3). Moleküler patogenezin de zaman içerisinde daha iyi anlaşılması, özellikle tümör gelişiminde rol oynayan başlıca mutasyonların rolü ve bunların bir kısmının tedavi açısından hedeflenebilir olması akciğer tümörlerinin sınıflandırılmasına bir dinamizm getirmiş ve bugün 2015 yılında yayınlanan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'neait yeni sınıflama sistemi rutin hasta takibinde kullanılmaya başlanmıştır(4).

Akciğer adenokarsinomundaki (AAK) genetik değişiklikler incelendiğinde öne çıkan mutasyonlar arasında Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Kirsten's rat sarcoma (KRAS), B-Form rapidly accelerated fibrosarcoma (BRAF), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA) ve Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) gen mutasyonları yer almaktadır. Ayrıca AAK vakalarında onkojenik kinaz protein genlerinde, Anaplastik lenfoma kinaz (ALK), ROS proto-oncogene 1 (ROS1), Ret proto-oncogene (RET) gibi genlerde yeniden düzenlenmeler izlenebilmektedir (5-6). Bu genetik değişikliklerden bazılarında sahip olan olgularda hedefe yönelik ilaçlar kullanılabilir. EGFR mutasyonuna sahip adenokarsinomlarda platinyum

temelli KT yerine gefitinib ve erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılmasının yanıt hızı ve progresyonsuz sağkalım açısından daha etkili, daha az toksik ve daha tolere edilebilir olduğu gösterilmiş, böylece günlük pratikte bu ilaçlar kullanıma girmiştir (3). ALK pozitif adenokarsinom olgularında ise Crizotinib olarak bilinen küçük ALK inhibitör molekülünün kullanılması rutin hasta tedavisinde yer almaktadır (7). AAK olgularının yaklaşık %24'ünde ise tanımlanmış bir onkogen bulunmamakta, dolayısıyla bu hasta grubu da hedefe yönelik tedavilere aday olamamaktadır (8). Sonuçta geriye kalan hastalarda gösterilebilecek mutasyonlar ve bunlardan hedeflenebilir olanlar önem arz etmektedir (9). Bu grup içinde yer alan güncel mutasyonlardan biri ROS1 gen yeniden düzenlenmesidir.

ROS1 ilk olarak beyin tümörlerinden glioblastoma multiformede (10), sonrasında 2007'de Rikova ve ark. (11) tarafından fosfoproteomik inceleme ile KHDAK'da gösterilmiştir. Ayrıca kolanjiokarsinom (12), düşük malignite potansiyelli over tümörleri gibi pek çok tümörde de izlenebildiği bildirilmiştir (13).

AAK'larında tespit edilen ROS1 gen yeniden düzenlenmelerinde ROS1 geni ile füzyon oluşturan genler arasında Cluster of Differentiation 74 (CD74), Solute carrier family 34 member 2 (SLC34A2), Ezrin (EZR), Leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 3 (LRIG3), Syndecan 4 (SDC4), Tropomyosin 3 (TPM3) genleri yer almaktadır. Bu füzyonlardan herhangi biri gerçekleştiğinde ROS1 geninin yeniden düzenlenmesi ile ürün olarak şimerik bir onkoprotein meydana gelir. Bu şimerik protein hücre içi sinyal iletiminde rol alan kinazların fosforilasyonuna yol açarak intraselüler yolların aktivasyonunu sağlar ve böylece onkogeneizde rol alır (14). Günümüzde bu mutasyona sahip hastalarda küçük ALK inhibitör molekülü olan crizotinib hedefe yönelik tedavi seçeneği olarak kullanılmaya başlanmıştır (15). ROS1 geninin yeniden düzenlenmesi tüm KHDAK'lu hastalar içinde %2,4 (%1,0-8,1) oranında bildirilmektedir (16).

Bu oranlara göre yılda potansiyel olarak 14500 yeni ROS1 pozitif AAK vakasının tespit edilebileceği ve bunların hedefe yönelik tedaviye aday olabileceği göz önüne alındığında bu grup içinde yer alan hastaları belirlemek önem kazanmaktadır. Dolayısıyla bu hasta grubunun en doğru şekilde, kısa zamanda ve

düşük maliyetle belirlenmesi araştırma konusu olmuştur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada floresans insitu hibridizasyon (FISH)'un altın standart olduğu sonucuna ulaşılmıştır (14). Ancak FISH zaman alan, pahalı ve özel donanım gerektiren bir testtir. Bu nedenle son yıllarda, patoloji laboratuvarlarında daha yaygın kullanılan immünohistokimya (İHK) yöntemiyle bu hastaların belirlenmesi ve bu şekilde FISH ihtiyacını azaltacak algoritmaların geliştirilmesi araştırma konusu olmuştur.

Bu çalışmadaki amacımız kendi toplumumuzda ROS1 gen yeniden düzenlenmesi olan tümör alt grubunu belirlemek, bu hasta grubunun özelliklerini tespit etmek yanısıra ROS1 gen yeniden düzenlenmesi varlığını değerlendirmede İHK ve FISH teknikleri arasındaki uyum oranını araştırmak ve rutin değerlendirmede kullanılacak algoritmaları belirleyerek literatüre katkı sağlamaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Tüm dünyada en sık görülen kanser tipi akciğer kanseri olup insidansı 1,8 milyondur. Dünyada 2020 yılında 2,3 milyon, 2030 yılında da 3 milyon yeni akciğer kanseri hastası olacağı tahmin edilmektedir. Erkeklerde yaşa göre standartize edilmiş hızı 100 binde 34,2, kadınlarda ise 100 binde 13,6'dır. Tüm kansere bağlı ölümlerin %19,4'ünü akciğer kanserine bağlı ölümler oluşturmaktadır. Günümüz verilerine göre akciğer kanseri nedeniyle yılda ölen hasta sayısı 1,6 milyondur; 2020 yılında 2 milyon, 2030 yılında da ise 2,6 milyon olacağı tahmin edilmektedir (1).

Türkiye'de ise her yıl yaklaşık olarak 25 bin yeni akciğer kanseri vakası görülmektedir. Yaşa göre standartize edilmiş insidans hızı erkekler için 100 binde 59,3 iken kadınlarda bu oran 100 binde 10'dur. Türkiye'de 2012 yılında izlenen tüm ölümlerin %5,1'ini akciğer kanserlerine bağlı ölümler oluşturmaktadır ve 21.700 kişi hayatını kaybetmiştir (1,17-18). Daha güncel olan 2015 yılına ait verilere göre "Gırtlak ve soluk borusu / bronş / akciğerin kötü huylu tümörü" başlığı altında sınıflandırılmış 24011 kişi bu kanser grubu sebebiyle hayatını kaybetmiştir (19).

Antalya'da akciğer kanserinin yaşa göre standartize edilmiş insidansı erkeklerde 100 binde 48,8, kadınlarda ise 100 binde 6,6'dır. Bu oran 2003-2007 yılı için hesaplanmış bir hız olup en güncel 2015 yılına ait Antalya nüfusu sayımına göre hesaplandığında [2,2 milyon (20)], Antalya'da her yıl yaklaşık olarak yeni 640 akciğer kanseri vakası (564 erkek, 75 kadın hasta) görülebileceği tahmin edilmektedir (21).

Dünyada akciğer kanserinin histolojik alttiplerinin oranları yıllar içinde değişiklik göstermektedir. Karsinomlar genelinde bakıldığında en sık izlenen alt tiplerin son yıllardaki oranları yassı hücreli karsinom için %20, adenokarsinom için %40, KHK için %13, büyük hücreli karsinom için %2 olarak belirtilmiştir. Adenokarsinom oranı daha önceleri tüm akciğer kanserleri içinde %30'un altında izlenirken son yıllarda bu oran %40'ların üstüne çıkmıştır. Bu artışın nedeni olarak da daha spesifik İHKsal belirteçlerin geliştirilmesi ve buna paralel olarak tümör

alt tipini belirlemenin nispeten kolaylaşmış olması gösterilmektedir (4). Türkiye'de ise akciğer kanserlerinin dağılımı Türkiye Birleşik Veri Tabanı kayıtlarına göre yassı hücreli karsinom için %31,3, adenokarsinom için %33,7, KHK için %16,2, büyük hücreli karsinomi için %1,6 olarak belirtilmiş olup son yıllarda teknolojik alt yapıların desteğiyle Türkiye'deki kanser kayıtçılığı sisteminin gelişim göstermesi bu oranların ve istatistiklerin daha güvenilir olmasını sağlamıştır (17).

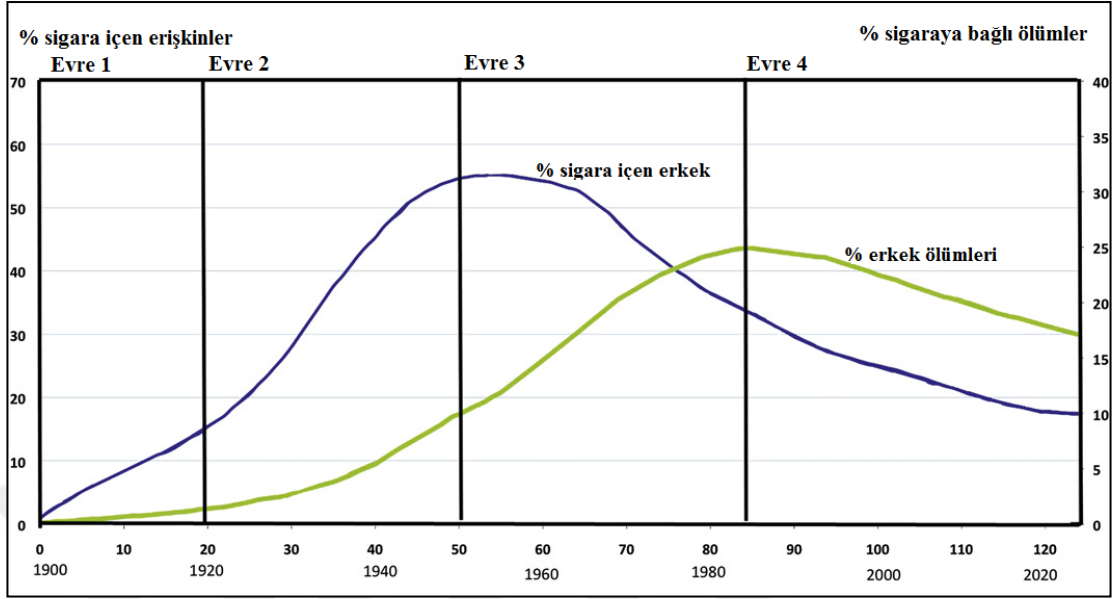
2.2. Akciğer Adenokarsinomu Etyolojisi

2.2.1. Sigara

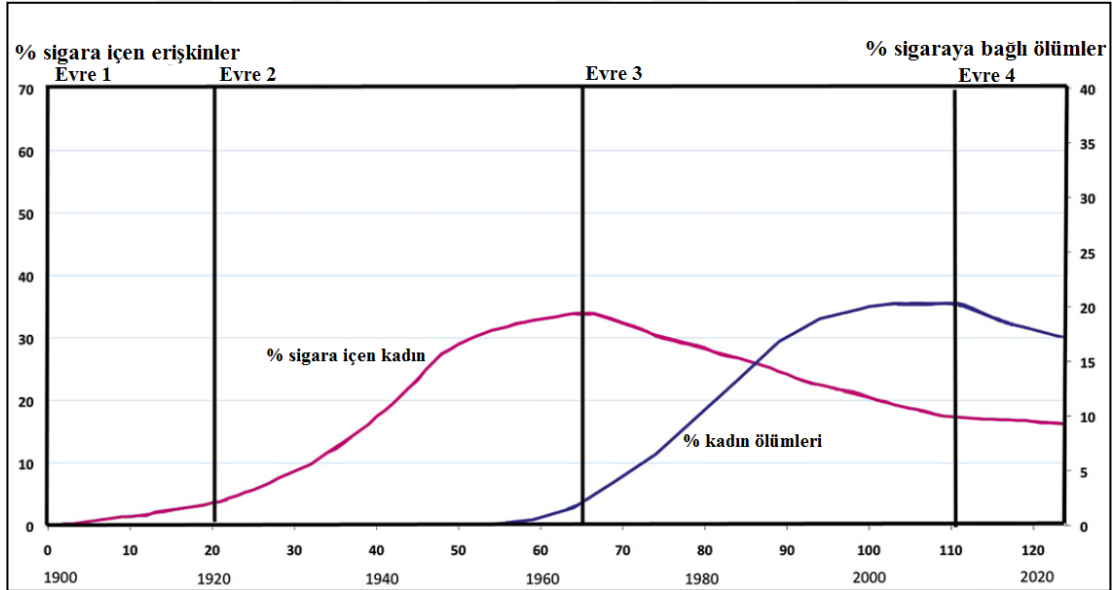
Akciğer kanseri insidans hızı 1977-1981 yıllarında artmış, 1987-1991 yılları arasında pik yapmış ve 2006-2010 yılları arasında da iniş trendine geçmiştir (4). Kadınların akciğer kanseri "eğilimi" erkeklerinkiyle kıyaslandığında biraz daha düşüktür. Bu durum genel olarak kadınların sigara içmeye erkeklere göre daha sonra başlamış olmaları ile açıklanmaktadır (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2).

Gelişmiş ülkelerde erkeklerin sigara kullanma prevalansı ve 35-69 yaş arası sigara ilişkili ölüm oranları genel olarak plato çizme veya azalma eğilimindedir. Kadınlarda sigara kullanma prevalansı erkeklere oranla daha az olup son yıllarda düşme eğilimindedir (22). Kadınların sigara ilişkili mortalite oranı artış göstermektedir (23). Kadınlar arasında sigara tüketiminin erken yaygınlaştığı İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya gibi ülkelerde kadınlarda izlenen akciğer kanseri mortalitesi pik yapmış olup kadınların daha sonraki dönemlerde aktif içici olmaya başladığı diğer ülkelerde mortalitenin hala tırmanışta olduğu görülmüştür (24).

Çizelge 2.1. Erkeklerde sigaraya bağlı mortalite (Thun'dan, 22)



Çizelge 2.2. Kadınlarda sigaraya bağlı mortalite(Thun'dan, 22)



Sigara kullanımı akciğer kanserinin en önemli sebeplerindendir. 2015 yılında tüm dünyada akciğer kanserine bağlı ölen 1,6 milyon hastanın 1,2 milyonunun ölüm sebebinin sigara kullanımı olduğu tahmin edilmektedir (23). Türkiye'de de erkeklerde tütün ve tütün ürünlerine bağlı kanserler arasında bu sebeple ortaya çıkan vaka sayısı 30.779 olarak tahmin edilmektedir (17).

Akciğer kanserinin histolojik tiplerinin farklı zamanlarda pik yapmasının nedeni olarak sigara üretimindeki ve tütün içeriğindeki değişimler gösterilmektedir. Adenokarsinom insidansı son yıllarda özellikle kadınlarda artma eğiliminde olup erkek kadın oranı 1,9'dan 1,1'e düşmüştür (4,25).

Sigara içenlerde akciğer kanseri riski hiç sigara içmemişlere göre 20-30 kat fazladır. Akciğer kanserine yakalanma riski sigara kullanım süresi ve günlük sigara sayısı ile pozitif orantılıdır ve sigaranın bırakılmasıyla risk progresif olarak düşmektedir. Ancak bu oran hiç bir zaman hiç sigara içmemişlerin oranını yakalayamamaktadır. Sigara özellikle yassı hücreli karsinom ve KHK ile ilişkili olsa da AAK riskini de artırır. Hiç sigara içmemiş bireylerde en sık görülen akciğer kanseri histolojik tipi adenokarsinomdur (4). Akciğer kanserli hastalardan sigara içmişler ve içmemişler arasında mutasyon tipleri ve tümör paternleri bakımından da fark izlenmiştir (26-27).

2.2.2. Diğer Faktörler

Sigara kullanmayan 100 bin kişiden her yıl 5-10'unda akciğer kanseri gelişebilmektedir. Bu hastalarda Radon, iyonize radyasyon, asbest maruziyeti, kapalı alan hava kirliliği, pasif içicilik ve altta yatan kronik akciğer hastalığı (Ör. Kronik obstruktif akciğer hastalığı, alfa-1 antitripsin eksikliği, tüberküloz) akciğer karsinomu için risk faktörlerinden sayılmaktadır. Aile öyküsü ile ilişkilendirilmiş nadir akciğer karsinomu vakası da mevcuttur (4).

2.3. Klinik

AAK hastalarında çok çeşitli semptomlar görülebilmekle beraber hiç semptom izlenmeyen hastalarda vardır. En sık görülen semptomlar progressif nefes darlığı, öksürük, göğüs ağrısı, ses kısıklığı ve hemoptizidir. Akciğer kanserlerinde paraneoplastik sendromlar da siktir. Ancak AAK'nda diğer histolojik tiplere göre daha az sıklıkta görülmektedir (4).

İlk tanı koyma aşamasında görüntüleme ve cerrahi girişimler kullanılmaktadır. Görüntülemede sıklıkla nodüler lezyonu olarak karşımıza çıkar. Akciğerin hemen her yerinde görülebilmekle birlikte en sık periferde ve üst loblar

izlenmektedir. Görüntülemeye solid, miks solid ya da non-solid olarak görülebilir (4). Erken evre akciğer kanserinde lepidik büyüme paterni non-solid olarak görüntülemeye karşımıza çıkarken, invazyonu temsil eden solid alanlar izleniyorsa prognoz özellikle solid komponentin boyutuyla ilişkili olarak daha kötüdür (28).

Tanı anında akciğer karsinomlu hastalara bakıldığında, hastaların %16'sında tümör primer alanında sınırlı, %23'ünde bölgesel lenf nodlarına metastaz yapmış, %61'inde ise uzak metastaz yapmış olarak bulunmaktadır (4). Bu nedenle hastaların büyük kısmı ileri evrede teşhis edilmektedir (17). "National Lung Cancer Screening" çalışmasına göre görüntüleme ile tespit edilen kanserlerin ancak %50'si evre I'de yakalanabilmektedir (29).



Şekil 2.1. Akciğer tümör makroskopik örneği

Multiple primer akciğer kanserleri de görülebilmekte ve çok nadir olmayan oranlarda karşımıza çıkmaktadır. Yayılımları lenfatik veya hematojen yolla olabilir. Lenfatik yolla ipsilateral ve kontralateral hilar ve mediastinal lenf

nodlarına yayılırken hematogen metastazlar daha sık olarak karaciğer, kemik, beyin, adrenal bezler ve akciğerlere olmaktadır (4).

2.4. Evreleme

AAK Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4'deki 7. TNM sınıflamasına göre evrelendirilir (30-31). TNM sınıflaması 8. versiyonu çıkmış olmakla birlikte henüz aktif kullanıma girmemiştir.

Çizelge 2.3. Akciğer karsinomlarının TNM sınıflaması (30-31)

T-Primer Tümör	
TX	Balgam ya da bronkoalveloler lavaj sitolojisinde malign hücreler tespit ediliyor fakat görüntüleme yöntemleri ya da bronkoskopide tümör gösterilemiyor
T0	Primer tümör kanıtı yok.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör en büyük çapı ≤ 3 cm, akciğer ya da visseral plevra ile çevrili, lobar bronşun daha proksimaline invazyon bulgusu yok (Bronşun yüzeyel duvarıyla sınırlı süperfisyal tümörler ana bronla ulaşsa bile T1 olarak değerlendirilir) T1a: Tümör en büyük çapı ≤ 2 cm T1b: $2 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 3 \text{ cm}$
T2	$3 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 7 \text{ cm}$, karinaya 2 cm ve daha fazla uzaklıkta ana bronş tutulumu, visseral plevra invazyonu, hilusa uzanan fakat tüm akciğeri kapsamayan obstrüktif atelektazi ya da pnömoni T2a: $3 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 5 \text{ cm}$ T2b: $5 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 7 \text{ cm}$
T3	Tümör en büyük çapı $< 7 \text{ cm}$, göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikard invazyonu, ana bronşun karinaya 2 cm den daha az yakınlıkta invazyonu (karina tutulumu yok), tüm akciğeri kapsayan total atelektazi ya da obstrüktif pnömoni, aynı lobta tümörden anatomik olarak ayrı tümör nodülleri varlığı
T4	Her hangi bir boyuttaki tümörde Mediasten, kalp, büyük damar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra korpusu, karina, aynı taraf farklı lobta tümör nodül ya da nodülleri varlığı.
N-Bölgesel Lenf Nodları	
Nx	Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi
N0	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
N1	Aynı taraf hiler, peribronşial, interlober, lobar, segmental, subsegmental lenf nodu tutulumu
N2	Subkarinal ve ipsilateral mediastinal lenf nodu
N3	Kontralateral mediastinal, ipsilateral ya da kontralateral skalen ve supraklaviküler lenf nodu
M-Uzak Metastaz	
M0	Metastaz kanıtı yok
M1	Uzak metastaz
M1a	Malign plevral efüzyon, malign perikardiyal efüzyon, malign plevral yayılım, kontralateral akciğerde metastaz
M1b	Uzak organ metastazı

Çizelge 2.4. Akciğer karsinomlarında evreleme (30-31)

Okült Karsinom	Tx	N0	M0				
Evre 0	Tis	N0	M0				
Evre IA	T1a	N0	M0	Evre IIIA	T1	N2	M0
	T1b	N0	M0		T2	N2	M0
Evre IB	T2a	N0	M0		T3	N1	M0
	T1a	N1	M0		T3	N2	M0
EvreIIA	T1b	N1	M0		T4	N0	M0
	T2a	N1	M0	T4	N1	M0	
	T2b	N0	M0				
Evre IIB	T2b	N1	M0	Evre IIIB	T4	N2	M0
	T3	N0	M0	Herhangi T	N3	M0	
				Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1a
					Herhangi T	Herhangi N	M1b

2.5. Sınıflama

2004 DSÖ sınıflamasına göre adenokarsinom veya yassı hücreli karsinom gibi histolojik tiplerin tedavi açısından farklılıkları yoktu. Hatta alt tiplere yapılmaksızın küçük hücreli dışı karsinom tanısı verilebiliyordu. Ancak akciğer kanseri alanındaki terapötik yenilikler patolojik tanının ve moleküler testlerin önemini arttırmıştır. Son dönemlerde klinik olarak bu alt tiplerin ayrılması ihtiyacı Permetreksed tedavisi alan adenokarsinom hastalarında yassı hücreli karsinoma göre daha iyi tedavi sonuçlarının çıkması (2) ve Bevacizumab verilen yassı hücreli karsinomlarda daha fazla ölümcül hemoraji riski olduğunun gösterilmesi ile daha da önem kazanmıştır (32). Ayrıca AAK'larında EGFR gen mutasyonu olması ve bunun varlığında hedeflenmiş tedaviye belirgin yanıt görülmesi de bu teste gidecek hastaların belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (33-34). İleri evre AAK hastalarında EGFR mutasyonu tespit edildiğinde ilk basamak tedavi seçeneği olarak EGFR tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Yine başka bir mutasyon olarak ALK gen yeniden düzenlenmesi tespit edilen ileri evre AAK hastaları diğer bir hedefe yönelik tedavi seçeneği olan ALK inhibitörü Crizotinib

ile tedavi edilmektedir (35-36). Bu nedenle son veriler ışığında hastalardan alınan doku örnekleri sadece tanı amaçlı kullanılmamakta aynı zamanda İHK ve hedefe yönelik tedavi adaylarını belirlemek için moleküler testlere de tabi tutulmaktadır.

Akciğer adenokarsinomları için 2011 yılında IASLC, American Thoracic Society (ATS) ve European Respiratory Society (ERS) tarafında 5 histolojik tipin varlığı ve oranına göre yeni bir sınıflama sistemi önerilmiştir (37). Bu önerilere göre düzenlenen akciğer tümörleri en son DSÖ sınıflaması Çizelge 2.5'deki gibidir.

Çizelge 2.5. Akciğer tümörlerinin DSÖ sınıflandırması (Travis'den, 4)

<p>Epitelyal Tümörler</p> <p>Adenokarsinom</p> <p>Lepidik adenokarsinom</p> <p>Asiner adenokarsinom</p> <p>Papiller adenokarsinom</p> <p>Mikropapiller adenokarsinom</p> <p>Solid adenokarsinom</p> <p>İnvaziv müsinöz adenokarsinom</p> <p>Miks invaziv müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinom</p> <p>Kolloidal adenokarsinom</p> <p>Fetal adenokarsinom</p> <p>Minimal invaziv adenokarsinom</p> <p>Non-müsinöz</p> <p>Müsinöz</p> <p>Preinvaziv lezyonlar</p> <p>Atipik adenomatöz hiperplazi</p> <p>Adenokarsinoma insitu</p> <p>Non-müsinöz</p> <p>Müsinöz</p> <p>Yassı hücreli karsinom</p> <p>Keratinize yassı hücreli karsinom</p> <p>Non-keratinize yassı hücreli karsinom</p> <p>Bazaloid yassı hücreli karsinom</p> <p>Preinvaziv lezyon</p> <p>Yassı hücreli karsinoma insitu</p>	<p>Nöroendokrin tümörler</p> <p>Küçük hücreli karsinom</p> <p>Kombine küçük hücreli karsinom</p> <p>Büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p> <p>Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p> <p>Karsinoid tümörler</p> <p>Tipik karsinoid</p> <p>Atipik karsinom</p> <p>Preinvaziv lezyon</p> <p>Diffüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi</p> <p>Büyük hücreli karsinom</p> <p>Adenoskuamöz karsinom</p> <p>Pleomorfik karsinom</p> <p>İgisi hücreli karsinom</p> <p>Dev hücreli karsinom</p> <p>Karsinosarkom</p> <p>Pulmoner blastom</p> <p>Diğer ve sınıflandırılmayan karsinomlar</p> <p>Lenfoepitelyoma benzeri karsinom</p> <p>NUT karsinomu</p> <p>Tükürük bezi tipi tümörler</p> <p>Mukoepidermoid karsinom</p> <p>Adenoid kistik karsinom</p> <p>Epitelyal-myoepitelyal karsinom</p> <p>Pleomorfik adenom</p> <p>Papillomlar</p> <p>Adenomlar</p>	<p>Mezenkimal tümörler</p> <p>Pulmoner Hamartom</p> <p>Kondrom</p> <p>PEComatöz tümörler</p> <p>Konjenital peribronşial myofibroblastik tümör</p> <p>Diffüz pulmoner lenfanjiomatozis</p> <p>İnflamatuvar myofibroblastik tümör</p> <p>Epiteloid hemanjiyotelyoma</p> <p>Plöropulmoner blastom</p> <p>Sinovyal sarkom</p> <p>Pulmoner arter intimal sarkomu</p> <p>Pulmoner miksoid sarkom, EWSR1-CREB1 translokasyonlu</p> <p>Myoepitelyal tümörler</p> <p>Lenfhistiositik tümörler</p> <p>MALT lenfoma</p> <p>Diffüz büyük B hücreli lenfoma</p> <p>Lenfomatoid granülomatozis</p> <p>İntravasküler büyük B hücreli lenfoma</p> <p>Pulmoner Langerhans hücreli histiositozis</p> <p>Erdeim-Chester hastalığı</p> <p>Ektopik orijinli tümörler</p> <p>Germ hücreli tümörler</p> <p>İntrapulmoner timoma</p> <p>Melonom</p> <p>Menenjiom, NOS</p> <p>Metastatik tümörler</p>
--	--	--

Yeni DSÖ sınıflaması ile beraber bronkioloalveolar karsinom terminolojisi bırakılmıştır. Berrak hücreli ve taşlı yüzük hücreli karsinom bir adenokarsinom alttipi olmaktan çıkarılıp tümör hücre özelliği olarak tanımlanmıştır. Bu hücre değişiklikleri sıklıkla solid adenokarsinomlarda görülmekle birlikte tüm adenokarsinom alt tiplerinde de izlenebilir (4).

2.6. Adenokarsinom

İnvaziv adenokarsinomlar çoğunlukla histolojik alttiplerin kompleks heterojen karışımından oluşur. Morfolojik paternleri ayırmak zor olabilmektedir. Ancak son sınıflandırma ile raporlamaya dahil edilen predominant paternin prognostik belirteç olarak yararı gösterilmiştir (38-40). Predominant terminolojisi invaziv non-müsinöz adenokarsinomların tümüne uygulanmış böylece miks tip adenokarsinom terminolojisi terkedilmiştir (4). Predominant alttipler için yapısal bir derecelendirme (gradeleme) üzerinde henüz bir fikir birliğine varılmamıştır.

2.7.1. Lepidik Adenokarsinom

Bu varyant alveol yüzeyi boyunca büyüyen atipik pnömositik hücrelerden oluşmakta olup bu tanıyı verebilmek için invaziv adenokarsinom komponentinin 5mm'den büyük olması gerekmektedir. Bu kriteri karşılamayan tümörlerde ise ek tanı kriterleri olarak lepidik patern dışındaki histolojik alttiplerin (Ör. asiner, papiller, mikropapiller, solid) varlığı ve/veya miyofibroblastik stroma/vasküler/plevral invazyonun varlığı ve/veya hava yolu ile çevre akciğer parankimine yayılım gereklidir (4).

2.7.2. Asiner Adenokarsinom

Bu varyantta major komponent olarak tümör hücrelerinin döşediği ortasında santral luminal boşluk bulunan yuvarlak-oval şekilli bez benzeri yapılar görülmektedir. Tümör hücreleri içinde veya bezlerin içindeki boşluklarda müsin bulunabilir. Asiner yapılarıdaki tümör hücrelerinde periferik polarizasyon ve lümen olmaksızın santral sitoplazma bulunabilir. Lepidik büyüme alanları

kollabe olduğunda asiner paternden ayrımı zor olabilir, fakat alveoler yapının kaybı ve myofibroblastik stromanın bulunması invaziv asiner adenokarsinom lehinedir. Kribriform yapılanma asiner adonokarsinomun bir paterni olarak kabul edilir ve kötü prognozla ilişkilidir (4).

2.7.3. Papiller Adenokarsinom

Bu varyantta major komponent olarak santral fibrovasküler korlar etrafında büyüyen papillalar oluşturan glandüler hücreler görülür. Myofibroblastik stroma görülmesi şart değildir (4).

2.7.4. Mikropapiller Adenokarsinom

Bu varyantta major komponent olarak fibrovasküler kor olmaksızın çiçek şekline benzer öbekler oluşturan tümör hücreleri görülür. Bu öbekler alveol duvarına bağlı ya da duvardan ayrı boşluklar içinde olabilir. Tümör hücreleri genellikle küçük, kuboidal olup değişken derecede atipi gösterirler. Psammom cisimcikleri görülebilir (4).

2.7.5. Solid Adenokarsinom

Bu varyanttaki major komponent diğer paternler olmaksızın poligonal şekilli tümör hücrelerinin tabakalar oluşturması şeklinde belirtilmiştir. Eğer tümör %100 solid ise solid adenokarsinom olduğunun kanıtı için her iki büyük büyüme alanında (BBA), ≥ 5 tümör hücresinde intrasellüler müsin varlığı gösterilmelidir (4).

2.7.6. İnvaziv Müsinöz Adenokarsinom

Tümör hücreleri tipik olarak goblet veya kolumnar hücre morfolojisine sahip görünümündedir. İntrasitoplazmik bol miktarda müsin ve bazale yerleşmiş nükleuslar bulunur. Çevredeki alveolar boşluklarda da sıklıkla müsin gölcükleri izlenir. Lepidik, asiner, papiller ve mikropapiller paternler ayrı ayrı görülebildiği gibi heterojen karışık formda da karşımıza çıkabilir. İnvaziv müsinöz

adenokarsinomun solid alt tipi yoktur. Ayrıca rezeksiyon materyallerinde invaziv müsinöz adenokarsinomun beraberinde nonmüsinöz komponent izleniyorsa ve her bir komponentin oranı $\geq\%10$ ise bu tümörler "Miks invaziv müsinöz ve nonmüsinöz adenokarsinom" olarak isimlendirilir (4).

2.7.7. Kolloidal Adenokarsinom

Hava yollarında bol miktarda müsin gölcükleri oluşturan, buna bağlı havayollarının genişlemesine ve destrüksiyonuna neden olan bir adenokarsinom tipidir. Müsin alveolleri şişirir ve duvarın yırtılmasına sebep olur, akciğer parankimini böylece diseke eder. Genellikle goblet benzeri uzun kolumnar şekilli tümör hücreleri lepidik paternde büyümektedir. İnvaziv müsinöz adenokarsinomdan en büyük ayırım noktası alveoler yapıların müsin gölcükleri ile yer değiştirmiş olmasıdır (4).

2.7.8. Fetal Adenokarsinom

Fetal akciğerin psödoglandüler fazındaki epitel hücreleri gibi glikojenden zengin silyasız hücrelerden oluşan bez benzeri yapılar ile karakterize bir tümördür (4).

2.7.9. Enterik Adenokarsinom

Asiner, kribriform veya papillotübüler yapıların görüldüğü kolorektal adenokarsinom benzeri bir tümördür. Adenokarsinomlarda alt tipleri oluşturan komponentler heterojen bir karışım şeklinde izlenebildiğinden enterik adenokarsinom tanısı verebilmek için $\geq\%50$ 'den fazla oranda enterik paternin görülmesi gerekmektedir (4).

2.7.10. Minimal İnvaziv Adenokarsinom

En büyük boyutu maksimum 3 cm olan, lepidik paternin baskın komponent olduğu invazyon alanınının 5 mm'yi aşmadığı, lenfatik, damar, hava

yolu veya plevra invazyonunun olmadığı veya tümör nekrozunun izlenmediği adenokarsinom tipidir (4).

2.9. Prognostik Faktörler

AAK hastalarında tümörün evresi ve performans durumu survival için en kuvvetli bir prediktif faktörlerdir. Hiç sigara içmemiş olmak ve kadın cinsiyet evreden bağımsız iyi prognostik faktörlerdendir. Predominant büyüme paterni genel sağ kalım, hastalık spesifik sağkalım ve hastalısız sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (39). Tümör boyutunun $\geq 2,5$ cm olması, solid veya mikropapiller alttiplerin varlığı hastalısız sağkalım için kötü prediktif belirteçlerdendir. Mikropapiller alttip genel sağ kalım için de kötü bir prognostik faktördür. Evre I lepidik predominant adenokarsinomun prognozu mükemmeldir. Bu tanıya sahip hastalarda izlenen rekürrenslerin çoğu rezeksiyon cerrahi sınırına çok yakın tümör varlığı, mikropapiller komponente sahip olma durumu, kan damarı veya plevra invazyonunun varlığı ile açıklanmaktadır. Yine çevre akciğer parankiminde tespit edilen hava yolu ile yayılım şeklinde karşımıza çıkan invazyon paterni kötü prognoz ile ilişkilidir (38-40,80-83).

2.8. Genetik

Tümör hücreleri birçok genetik anormalliğe sahip olabilir ancak tümör hücresinin sağ kalımı-devamlılığı için sürücü (driver) mutasyonların olması gerekmektedir. Onkogen bağımlılığı da denilen bu durumda mutasyonun inhibe edilmesi tümör hücresinin ölümüne sebep olmaktadır (41). EGFR, KRAS, ALK mutasyonları akciğer kanserindeki prototip sürücü mutasyonlardan bazılarıdır (4).

Akciğer kanserlerinde spesifik histolojiye karşılık gelen spesifik bir moleküler patoloji yani spesifik histolojik-moleküler korelasyon henüz tanımlanmamıştır. En yüksek korelasyon oranlarının gösterildiği akciğer kanseri tipi-mutasyon birlikteliği invaziv müsinoz adenokarsinom ve KRAS mutasyonu olup korelasyon %90 civarındadır. EGFR mutasyonu ise sıklıkla lepidik predominant veya papiller predominant adenokarsinom olgularında, ALK gen

yeniden düzenlemesi asiner predominant veya taşlı yüzük hücre özelliği gösteren adenokarsinomlarda görülebilmektedir (4,42-45).

Akciğer karsinomlarında son dönemlerde tanımlanan çeşitli aktive edici mutasyonların (Ör. EGFR, KRAS, BRAF, HER2), translokasyonların (Ör. ALK, ROS1, RET) ve amplifikasyonların [Ör. MET, Fibroblast growth faktor receptor 1 (FGFR1)] hedef alındığı tedavi yaklaşımlarının ve spesifik mutasyonların varlığında etkinlik gösteren hedefe yönelik ilaçların geliştirilmesinin sonucunda bu tedavilere yanıt verebilecek moleküler profile sahip tümör grupları tanımlanmıştır (46-48). Dolayısıyla bu genetik değişiklikler tedavi yanıtı için de prediktif değer taşımaktadır. Ör. KRAS mutasyonu genellikle EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine direnç ile ilişkilidir (49).

AAK'nda EGFR ve ALK mutasyonları, bu mutasyona sahip tümörler için hedefe yönelik ilaçlar mevcut olduğundan klinik olarak en önemli mutasyonlardandır. Bu nedenle DSÖ yeni sınıflamasında ileri evre akciğer karsinomlu hastalarda EGFR ve ALK mutasyonlarının varlığının araştırılmasında moleküler testler için doku ayrılması önerilmektedir. EGFR pozitif hastaları için günümüzde Gefitinib, Erlotinib, Afatinib gibi hedefe yönelik tedavi ajanları bulunmaktadır (50-53).

EGFR mutasyonları geniş bir aralığa sahip olup AAK'larının %10-50'sinde görülebildiği rapor edilmiştir. Bu geniş oran aralığı ile sigara kullanımı arasında ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Buna göre sigara kullanma oranı yüksek olan bölgelerde EGFR mutasyon oranı düşük, KRAS mutasyon oranı yüksektir (54-57).

KRAS özellikle bazı bölgelerde AAK'ların tirozin kinaz/RAS/RAF yolağında en sık görülen sürücü mutasyonlardan birisidir (5).

Aktive edici ALK yeniden düzenlenmesi AAK'ların %3-7'sinde görülür (11,36). Bu mutasyona sahip hastalar Crizotinib gibi ALK/MET/ROS1 inhibitörü ilaçlara iyi yanıt verir (35,58-59).

RET füzyonu da AAK'ların %1'inde görülen diğer bir sürücü mutasyondur. Hemen her zaman hiç sigara kullanmamışlarda görülür (60-63). Cabozantinib gibi hedefe yönelik tedavi ajanlarına cevap ile ilişkilidir (64).

HER2 mutasyonları AAK'ların %1-5'inde, BRAF mutasyonları ise %2-10'unda görülebilmektedir (5,65-69).

2.8.1. ROS1

ROS1, insülin reseptör alt ailesinden bir transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlayan avian sarkom RNA tümör virüsünün onkogen ürünüdür (70-72) ve ALK'nın hücre içi kinaz alanı ve ATP bağlanma bölgesi ile yüksek benzerlik gösterir. ROS1 füzyon kinazı yapısal olarak aktive olunca hücre proliferasyonunu, hayatta kalmayı ve hücre döngüsünü kontrol eden ve sonuçta hücre dönüşümü ile sonuçlanan onkojenik yollarının aktivasyonuna yol açar (73-74). ROS1'in aktive edilmesi, phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3Kinase) / v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (Akt), mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) (MTOR) ve RAS type GTPase family (RAS)-mitogen-activated protein kinase (MAPK) / extracellular signal-regulated kinase (ERK) yollarını harekete geçirir (138-140). ROS1 füzyon proteinleri KHDAK hücre serilerinin ve tümörlerinin fosfotirozin sinyalizasyonunun araştırmasıyla 2007'de KHDAK'umda tespit edilmiştir (11,36). Ek olarak, glioblastomalar, (10) kolanjiyokarsinoma, (12,75-76) over kanseri, (13) gastrik kanser, (77) kolorektal kanser (78) gibi diğer malignitelerde ROS1 gen düzenlenmesi saptanmıştır. Bugüne kadar hiç insan ROS1 ligandı bulunmamıştır ve bu reseptörünün fizyolojik fonksiyonu halen belirsizdir.

ROS1'in CD74 ve SLC34A2 gibi genlerle füzyonu sonucu ortaya çıkan aktive edici mutasyonun AAK'lu hastaların %2,98'inde görülebildiği raporlanmıştır (16). ALK mutasyonu pozitif olan hastalarda olduğu gibi ROS1 mutasyonu pozitif hastalarda da bir ALK inhibitörü olan Crizotinibe cevap izlenmektedir (79). Genellikle hiç sigara içmemiş kadın hastalarda tespit edilmektedir (4).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul

Bu çalışmanın yapılmasına, bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına 06.01.2016 tarih ve 6 nolu karar ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nca karar verilmiştir.

3.2. Hasta Seçimi ve Hazırlık

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi hasta kayıt yazılımı olan MIAMED (2014 yılı temmuz ayından günümüze) ve MEDİ-PİS (2014 yılı temmuz ayı öncesi) programları üzerinden 01 Ocak 2011 ile 01 Ocak 2016 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında AAK olarak tanı almış veya yorumlanmış frozena gönderilen örnekler, akciğer dışı metastaz biopsileri, AAK tanılı konsültasyona gelen örnekler dahil biyopsi veya rezeksiyon materyalleri olan toplam 260 hasta çalışmaya alınmıştır. Tüm hastaların 2015 yılı DSÖ sınıflamasına göre histolojik alt tipleri ve 7. AJCC TNM sistemine göre evreleriyeniden belirlenmiştir. Hastaların yaş, cinsiyet, sigara kullanım durumu, tanı anındaki tümör evreleri, klinikçe son görülme tarihleri, ölmüşse ölüm tarihi gibi ilgileri hem hastane arşiv yazılımları (MIAMED ve MEDİ-PİS), Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı arşivindeki hasta dosyaları hem de "Ölüm Bildirim Sistemi" yazılımı taranarak elde edilmiştir. Ayrıca patoloji arşivimizden seçilen bu hastaların mevcutta EGFR mutasyon ve ALK yeniden düzenlenme araştırmaları varsa bu testlerin sonuçları da veri olarak kayda alındı.

Rutin pratikte ROS1 FISH incelemesi yapılmış ve sonuç verilmiş 107 hasta (aynı prosedür ve laboratuvar malzemelerinin kullanılmış olması şartıyla) tekrar FISH incelemesine alınmamış; arşivlenmiş preparatları ve bunlara ait dijital görüntüleri kullanılarak yeniden değerlendirilmiştir. Bu aşamada blokları kendilerine teslim edildiği için bulunamayan hastalar ve arşiv taraması ile ulaşılan hastalardan bloklarında yeterli tümör hücresi izlenmeyenler (<100 tümör hücresi) çalışma dışı bırakılmıştır. Diğer hastaların tümör preparatları nekroz içermeyen,

daha geniş tümör alanına sahip bloklardan seçilerek cama yazar suya dayanıklı koyu renkli kalemle işaretlenmiştir.

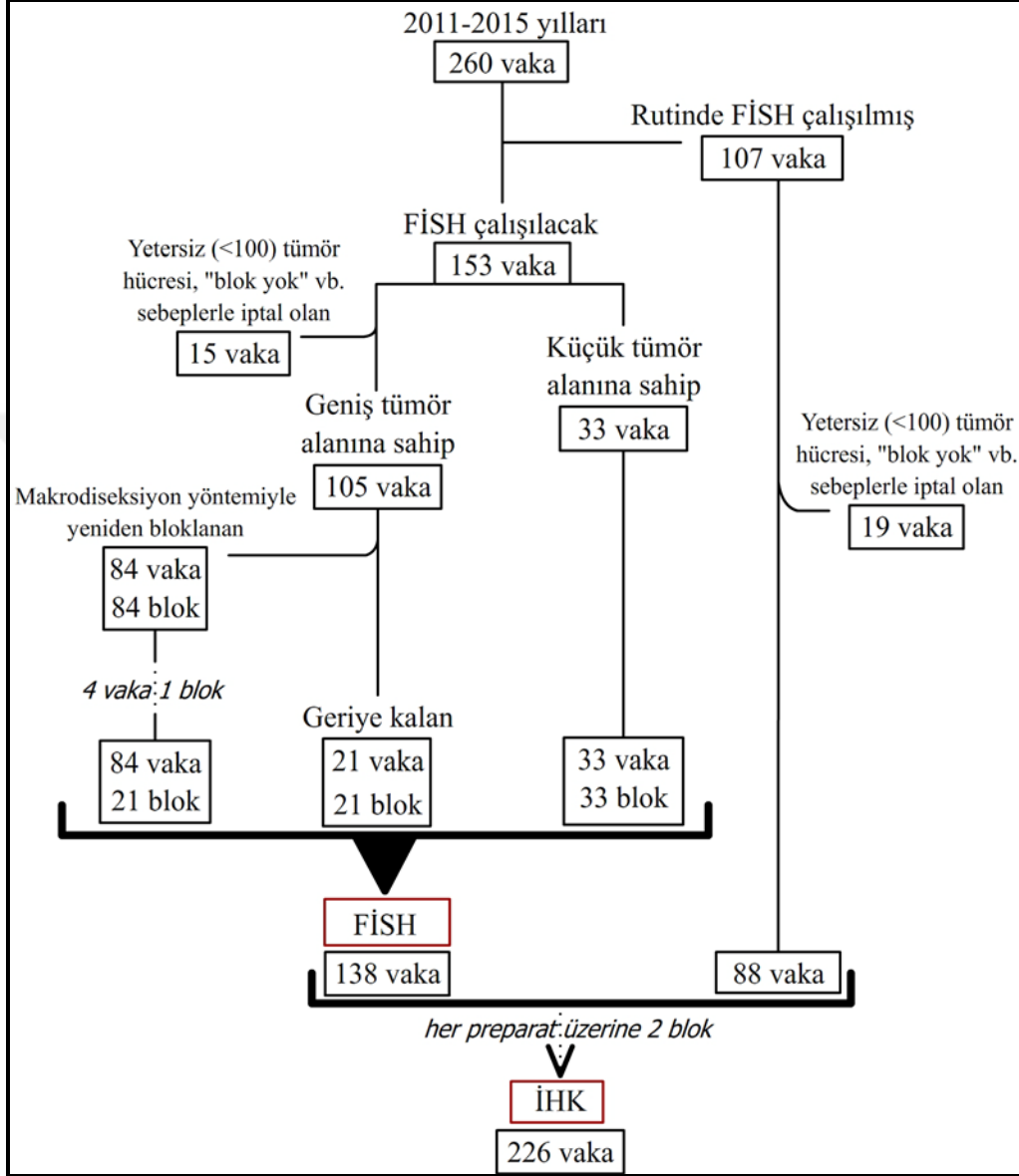
Rezeksiyon materyallerinden elde edilen geniş tümör alanlarına sahip 84 hastanın tümör bloklarından çalışmamız kapsamında alınan malzemelerin daha ekonomik kullanılabilmesi, daha fazla hastanın çalışmaya dahil edilebilmesi için yeni tümör parafin blokları hazırlanmıştır. Bu yeni blokların oluşturulması sürecinde hastaya ait arşivden çıkarılan parafin bloklardan hazırlanan Hemotoksilen&Eozin (HE) kesitleri değerlendirilerek artefakt taşımayan, nekroz içermeyen, tümör hücrelerinin daha yoğun olduğu alan tespit edilerek preparatlar üzerinde işaretlenmiş ve buna uyan tümör alanı parafin bloktan makrodiseksiyon yapılarak ayrılmıştır. Bu parçalar ortalama 15 mm²'lik doku alanları şeklinde kesilmiş olup her yeni hazırlanan parafin blokta 4 hastaya ait doku örneği olacak şekilde haritalanarak yeniden bloklanmıştır. Şekil 3.1'de FİSH testi için pozitif şarjlı lama bir bloğun kesiti, İHK testi için de iki bloğun kesitleri yine haritalama yapılarak alınmıştır.



Şekil 3.1. Dokuların yeniden bloklanıp kesilmesi

Yukarıda tariflenen işlemlere uygun olan tümör parafin bloklarından yeni blokların oluşturulması sayesinde çalışmamız dahilindeki 260 hastadan 128'i FİSH testine, 226'sı ise İHK testine alınabilmiştir. 15 hastaya FİSH ve İHK, 19

hastaya ise sadece İHK testi uygulanamamıştır (Şekil 3.2). FİSH testi, İHK testi ve HE boyama için 4'er mikron kalınlığında kesitler alınmıştır.



Şekil 3.2. Çalışmamıza alınan vakaların seçimi

3.3. ROS1 Geni FİSH İncelenmesi

- FİSH çalışılacak olan 75 parafin bloğun her birinden 4 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lama alındı. Kesitler 70 °C de ayarlı etüvde 20 dakika bekletildi.

- Deparafinizasyon aşaması: Ksilolde 10 dakika bekletildi. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandı. %100, %85, %70 lik alkol serilerinde 5 dakika bekletildi.
- Distile suda 5 dakika bekletildi.
- Daha sonra preparatlar, 90 °C ye ısıtılmış Pretreatment solüsyonda 20 dakika bekletildi.
- Süre sonunda 5 dakika distile suda yıkandı.
- Pepsin solüsyonunda 37 °C de 20 dakika bekletildi.
- 5 dakika 1x Salin SodyumSitratta (SSC) bekletildi. Süre sonunda 5 dakika distile su ile yıkandı.
- %100, %85, %70 lik alkol serilerinde 5 dakika bekletildi.
- Lam üzerine 10 mikrolitre ROS1 genine spesifik prob (ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe) damlatılarak 22x22 lamel ile kapatıldı. Ruber cement ile yapıştırıldı.
- Hibridize eden cihazda, 75 °C de 10 dakika denatürasyon yapıldı.
- 37 °C de ayarlı etüvde karanlık ortamda gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- Gece boyu inkübasyondan sonra ertesi gün, üç seri yıkama solüsyonu hazırlandı.
- Su banyosunda 37 °C ye ısıtıldı.
- 5 dakika üç seri yıkama solüsyonunda bekletilerek yıkama yapıldı.
- %100, %85, %70 lik alkol serilerinde 5 dakika bekletildi.
- Havada kurutulduktan sonra 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solüsyonu damlatılarak lamelle kapatıldı.
- Floresan mikroskopta analiz yapıldı.

FISH testinde en az 100 tümör hücresi incelendi. Kullanılan FISH probu break-apart (ayrılma) probu olup FISH analizinde pozitif olarak değerlendirilen sinyal paternleri gen lokusunun 3' ile 5' alanlarını belirleyen kırmızı ve yeşil sinyaller arasındaki mesafenin ≥ 1 sinyalden daha uzak olması ya da delesyonu gösteren 1 füzyon ve bir 3' sinyalin varlığıdır. Yeniden düzenlenme pozitif kabul edilen hücrelerin oranı en az %15 ise vaka ROS1 mutasyonuna sahip kabul edildi.

3.3.1. ZytoLight® SPEC ROS1 Break Apart Probe Özellikleri

- 6q22.1 kromozom bölgesindeki translokasyonları tespit amaçlıdır.
- 6q22.1 bölgesinde yaklaşık 750 kb S.yeşil ve yaklaşık 450 kb uzunluğunda S.kırmızı işaretli iki parçadan oluşan break apart formatındadır.
- Gen Bölgesi ROS1:6q22.1 (D6S326E-D6S1954)'dir.
- Normal hücre paterninde 2 kırmızı 2 yeşil sinyal, translokasyonda ise 1 yeşil, 1 kırmızı ve 1 kırmızı 1 yeşil füzyon sinyali gözlenir.
- Ürünün miadı en az bir yıldır.
- Saklama koşulu + 2-8°C olup transferi sırasında bu koşula uyulmuştur.

3.4. İHK Prosedürü ve Değerlendirilmesi

- İHK çalışılacak olan blokların her birinden 4 mikronluk kesitler her bir pozitif şarjlı lama alındı.
- Deparafinizasyon, diğer aşamalarda gerekli ısıtma ve yıkama işlemleri, antijen retrieval işlemi, endojen peroksit blokajı, dilue edilmiş primer antikorun [ROS1 (D4D6®) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology] uygulanması ve inkübasyon, sekonder antikor [Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) ultraView Universal DAB Detection Kit] uygulaması, Streptavidin Peroksidaz ve Diamino Benzidine Solüsyonu uygulaması,
- Hematoksilen ile zıt boyama cihaz protokolü ile yapıldı.
- Tüm işlemler kapalı sistem BenchMarkXT Ventana cihazında yapıldı.
- Kesitler entellan ile kapatılıp ışık mikroskopunda analiz edildi.

Her bir vaka için antikorun skorlanması yapıldı. Ekspresyon yokluğu ya da sadece nükleer ekspresyon olması “negatif” kabul edildi. Zemin boyanması ile kıyaslandığında zemin boyanmasından zorlukla ayırtebilebilen soluk sitoplazmik boyanma “+1 pozitif”; Tümör hücrelerinin %0-50’sinde, zemin boyanması ile kıyaslandığında belirgin olan sitoplazmik boyanma “+2 pozitif”; Tümör hücrelerinin %50’sinden fazlasında, zemin boyanması ile kıyaslandığında belirgin olan sitoplazmik boyanma “+3 pozitif” kabul edildi.İnternal pozitif kontrol olarak alveolar makrofajlar kullanılmıştır.

3.4.1. ROS1 İHKsal Spesifik Antikor Özellikleri

- İnsan ROS1 proteinine spesifiktir.
- Monoklonaldır.
- Formalinle fikse olmuş parafine gömülü dokularda immünohistokimya yöntemine uygundur.
- Klonu D4D6'dır.
- Ürünün miadı en az bir yıldır.

3.5. İstatistiksel Analiz

Değerlendirmede kullanılan FISH yöntemi “altın standart” kabul edilerek, İHK yönteminin özgüllüğü (specificity) ve duyarlılığı (sensitivity) hesaplandı.

Veriler değerlendirilirken, ROS-1 incelemesinde kullanılan FISH testi için; “ROS-1 mutasyon var”, “ROS-1 mutasyon yok” şeklinde sınıflandırıldı. Bu sınıflama sonucunda hastaların sosyodemografik özellikleri ile tedavi protokolleri ki-kare testi ile değerlendirildi. İHKsal değerlendirmede veriler “negatif”, “+1 pozitif”, “+2 pozitif” ve “+3 pozitif” şeklinde gruplandırıldı. Sonuçta verilerin değerlendirilmesi için yine ki-kare testi kullanıldı. ROS1 FISH ve İHKsal bulguların bağımsız değişkenlerle ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilirken, yaş gibi sürekli değişkenler için varyans analizi kullanıldı. Sağ kalım analizleri için Life Table ve Cox regresyon analizleri yapıldı.

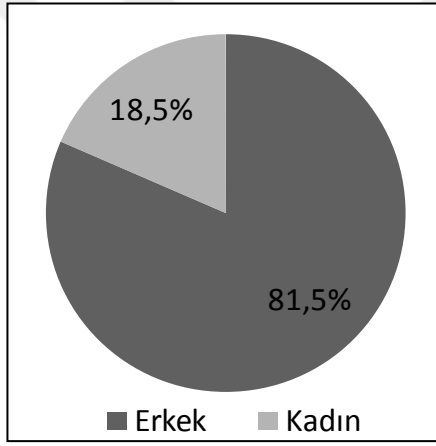
Cox regresyon analizinde ROS+, ALK+, EGFR+, sigara kullanma durumu, cinsiyet, evre ve alt tipler modele alındı.

Çalışmada p değeri 0,05 olarak kabul edildi ve test sonuçları %95 güven aralığında değerlendirilerek tablolara eklendi.

4. BULGULAR

Çalışmamız kapsamında 260 AAK tanılı hasta değerlendirilmiştir. Hastaların 211'i (%81,5) erkek, 48'i (%18,5) kadındır (Çizelge 4.1). Özbekistan uyruklu 1 hastanın cinsiyeti belirlenememiştir. Hastaların yaş aralığı 29-89 olup ortalama yaş 61,4'tür (standart sapma 9,587). Dokularının %62,7'si rezeksiyon materyali, %25,4'ü biyopsi materyali, %11,9'u konsültasyona gelen biopsi ve rezeksiyon materyallerine ait bloklardır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyete göre dağılımı

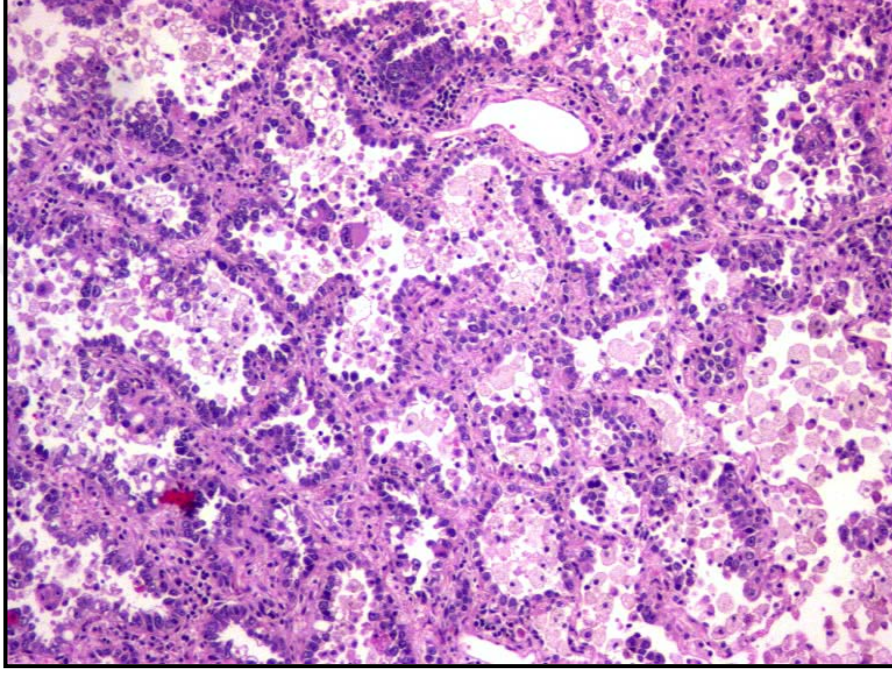


Çizelge 4.2. Çalışmaya alınan materyallerin dağılımı

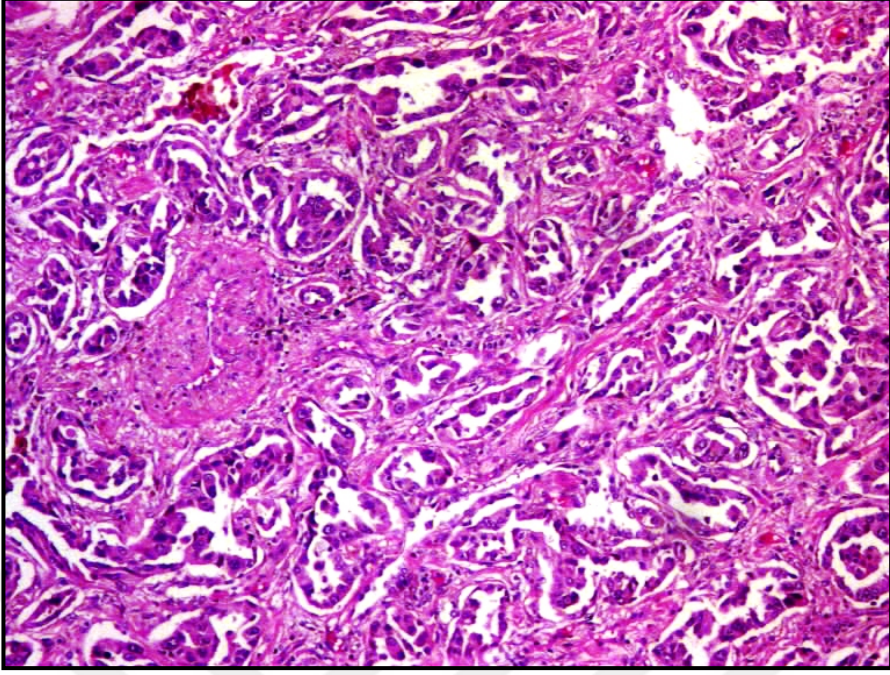
Materyalin Türü	Sayı	Yüzde
Rezeksiyon	163	62,7%
Biyopsi	66	25,4%
Konsültasyon	31	11,9%
Toplam	260	100,0%

İnvaziv non-müsinöz adenokarsinom tanılı hastaların predominant paternleri ve genel hasta sayısı içindeki oranları şöyledir; 66 (%39,8) asiner, 58 (%34,9) solid, 8 (%4,8) papiller, 10 (%6) lepidik, 4 (%2,4) mikropapiller. Minimal invaziv non-müsinöz adenokarsinomu olan 1 (%0,6) hasta tespit

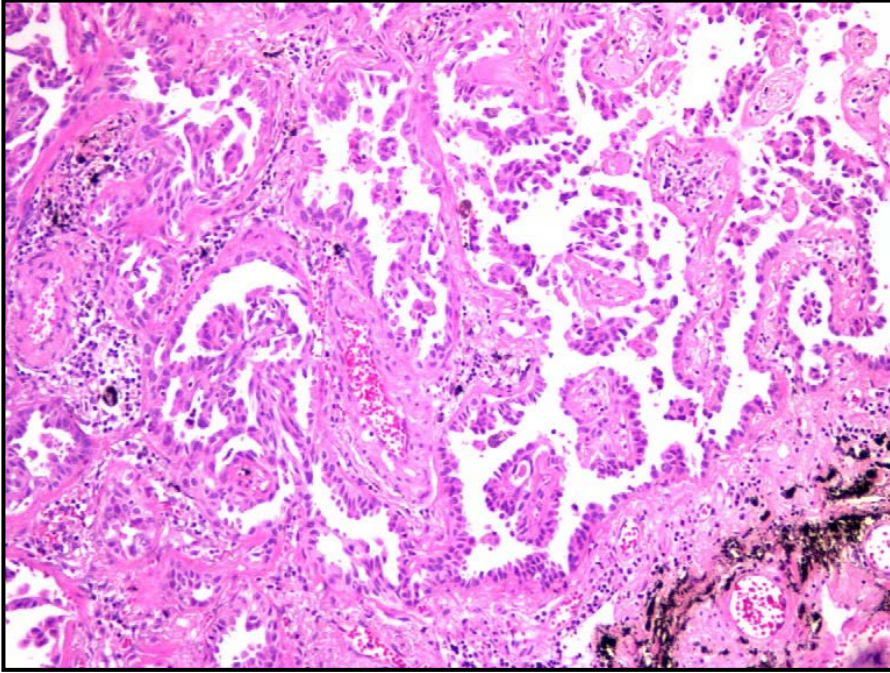
edilmiştir. İnvaziv müsinöz adenokarsinom tanılı 19 (%11,4) hasta vardır (Çizelge 4.3). 94 hastanın alt tipi rezeksiyon materyallerinin olmaması veya rezeksiyon materyalinden hazırlanan tüm tümör bloklarının değerlendirilememesi nedeniyle saptanamamıştır. Hastaların yaşları veya cinsiyetleri ile tümör alt tipi arasında anlamlı bir ilişki yoktur.



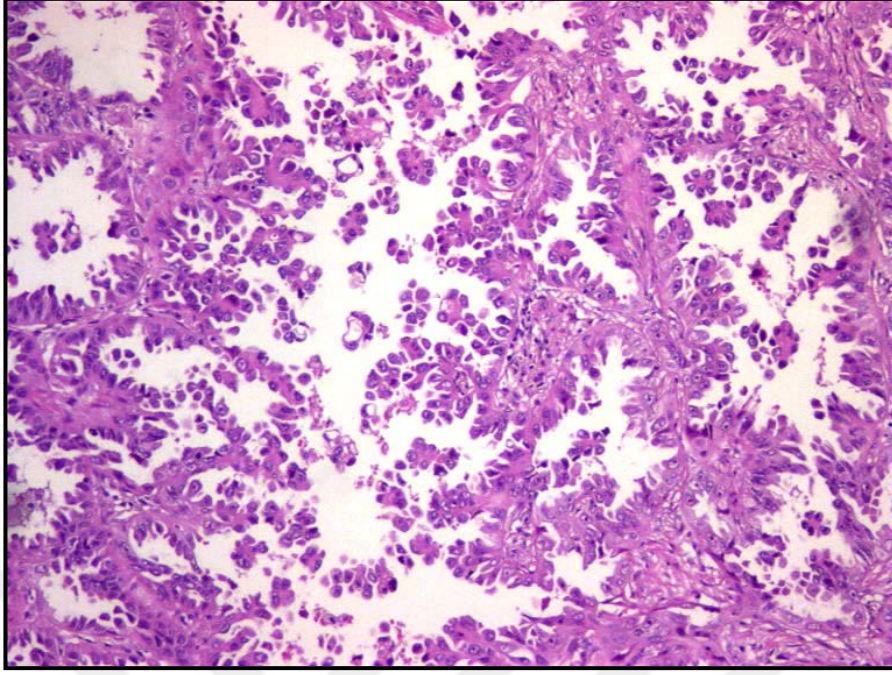
Şekil 4.1. Lepidik patern



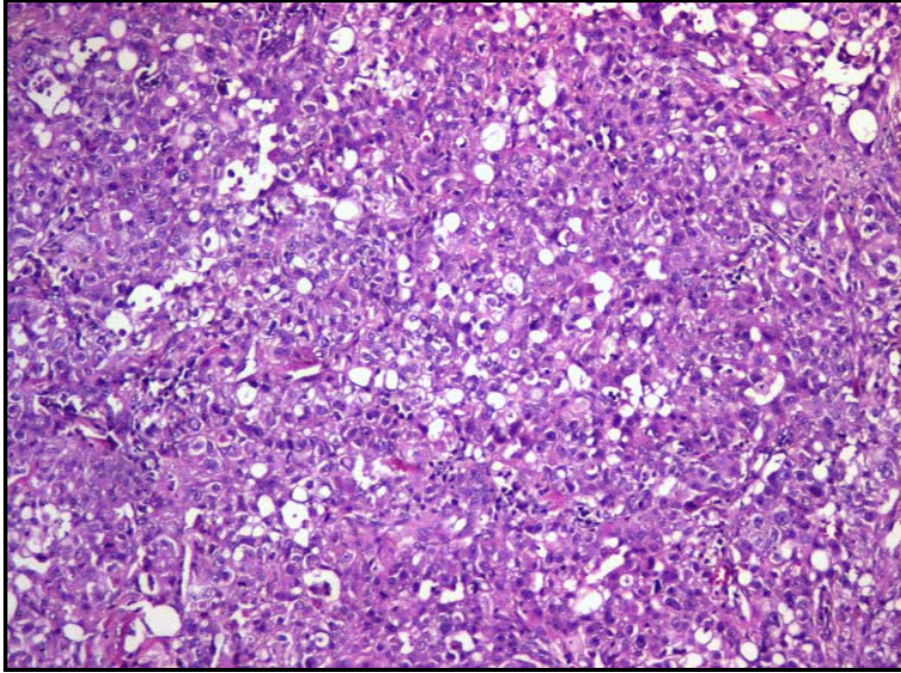
Şekil 4.2. Asiner patern



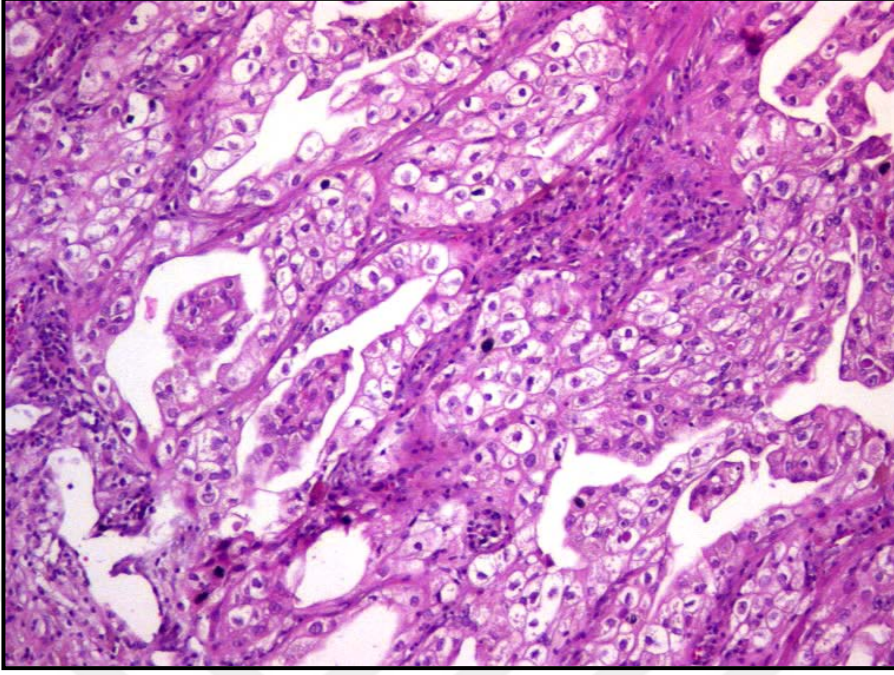
Şekil 4.3. Papiller patern



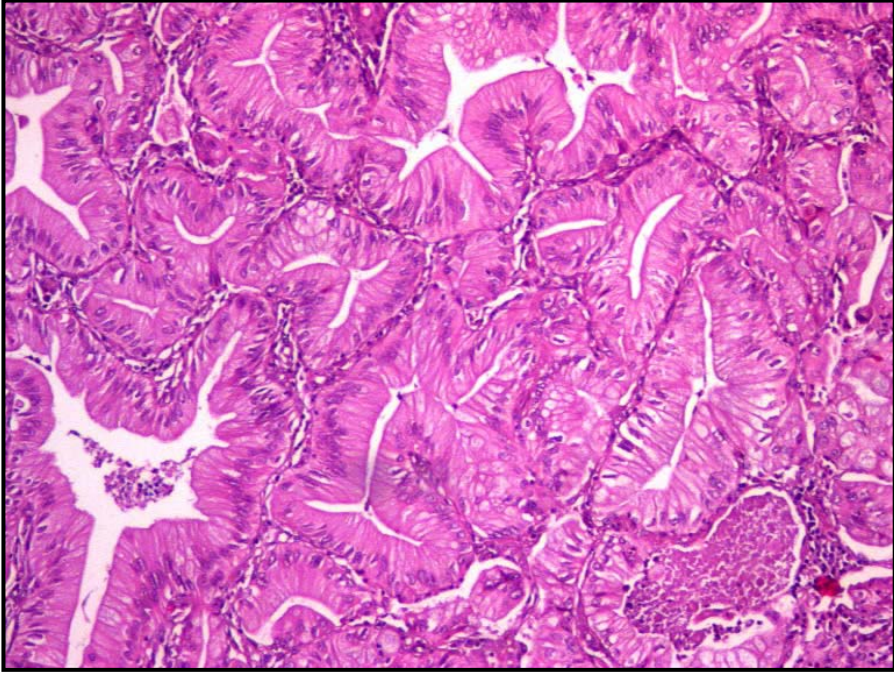
Şekil 4.4. Mikropapiller patern



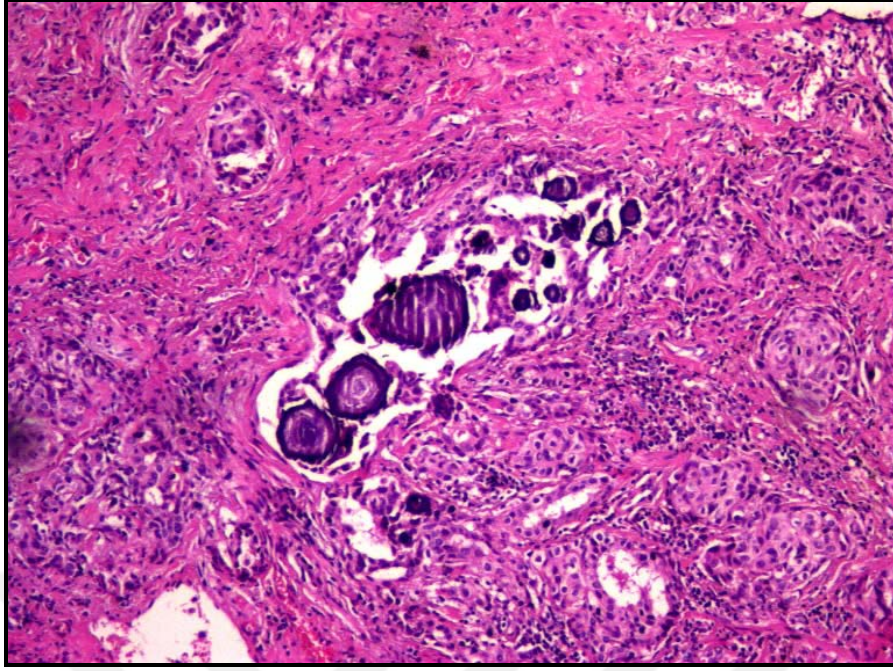
Şekil 4.5. Solid patern



Şekil 4.6. Berrak hücre değişikliği

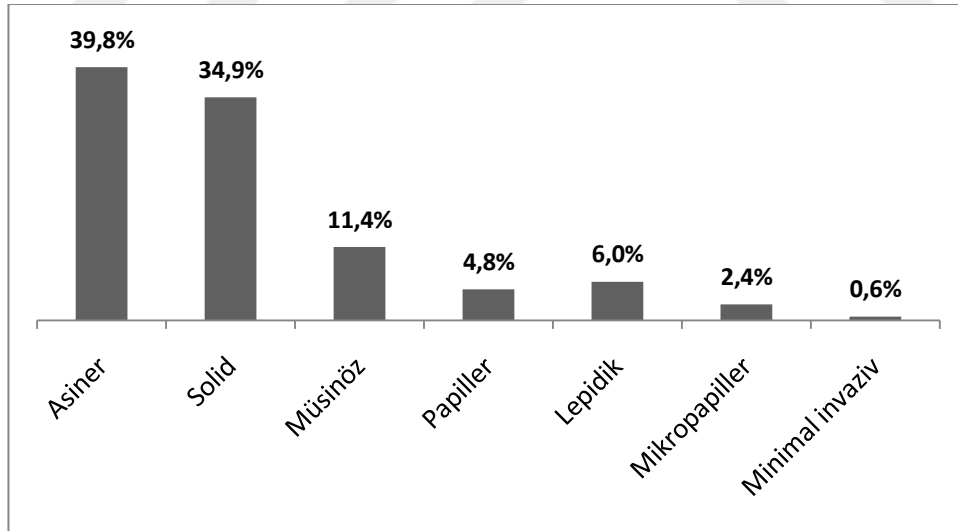


Şekil 4.7. Müsinöz adenokarsinom



Şekil 4.8. Psammom cisimcikleri

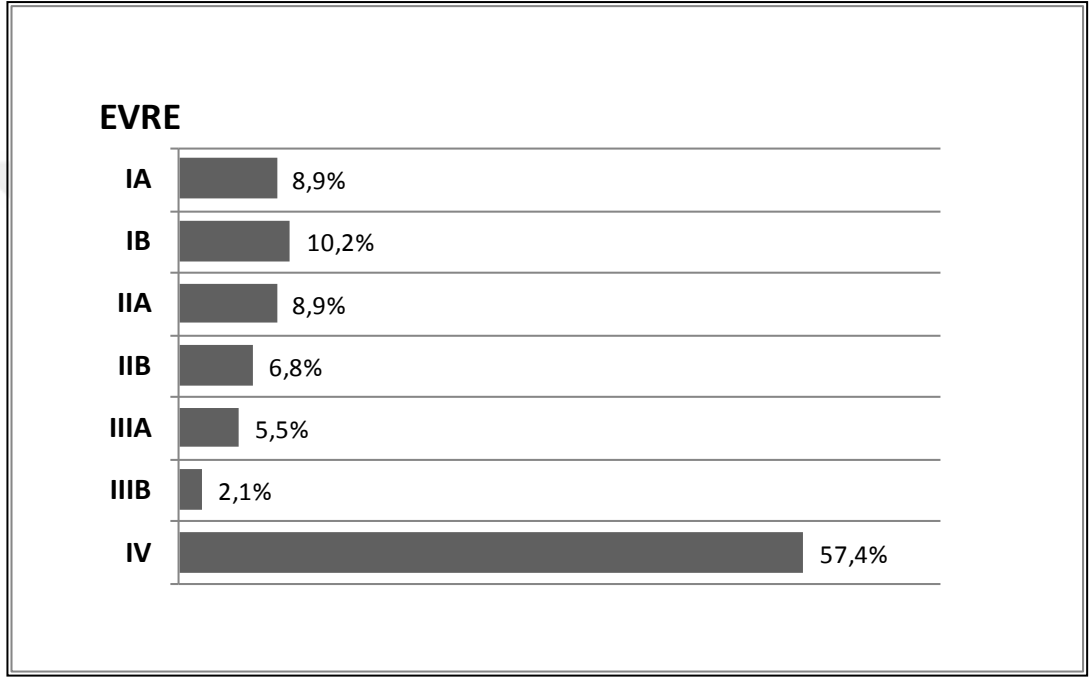
Çizelge 4.3.Hastaların predominant paterne ve tümör tiplerine göre dağılımı



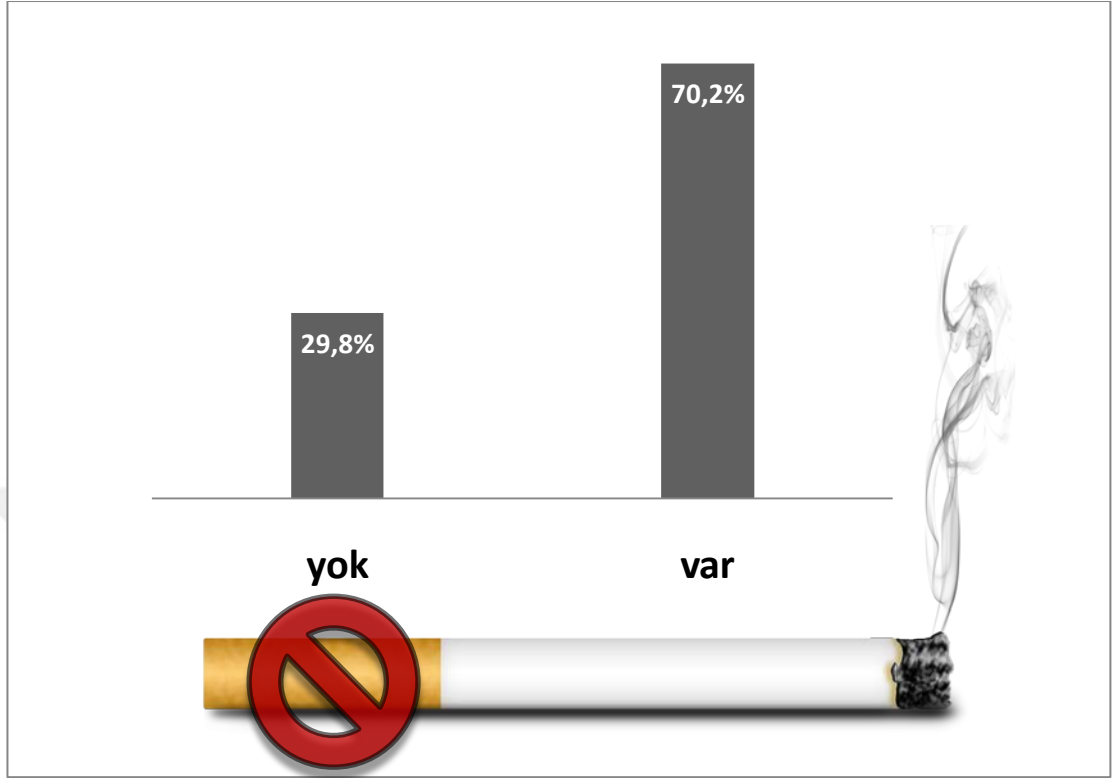
Vakaların %19,1'i evre 1, % 15,7'si evre 2, %7,6'sı evre 3, %57,4'ü evre 4'te tanı almıştır (Çizelge 4.4). 25 hastanın tanı anındaki evre verisine ulaşamamıştır. 136 hastanın sigara kullanma bilgisine ulaşamamış olup kalan hastaların 37'si hiç sigara içmemiş, 87'si ise sigara kullanmıştır. Hastaların sigara kullanma durumu Çizelge 4.5'de verilmiştir. Paket yılı verisi bulunan 65 hastanın

ortalama paket yılı 47'dir. Adenokarsinom tanısı konulan hastalar arasından sigara öyküsü bilinenler değerlendirilmiş ve cinsiyete göre sigara içme oranları çıkarılmıştır. Buna göre erkeklerde %90 (54/60), kadınlarda %15,8 (3/19) sigara içme oranı saptanmıştır. Sigara kullanmamak ile müsinöz adenokarsinom arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0,05$) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.4. Hastaların tanı anındaki evrelerine göre dağılımı



Çizelge 4.5. Hastaların sigara kullanma durumuna göre dağılımı



Çizelge 4.6 Hastaların sigara kullanma öyküsüne göre özellikleri

Vakaların Özellikleri		Sigara Kullanma Öyküsü				toplam
		yok 37	var 87	bilinmiyor 136		
Cinsiyet*	Erkek	8 21,6%	82 94,3%	121 89,0%		211
	Kadın	29 78,4%	5 5,7%	14 10,3%		48
Alt tip	Asiner	10 27,0%	17 24,6%	39 25,3%		66
	Solid	6 16,2%	17 24,6%	35 22,7%		58
	Müsinöz	5 13,5%	4 5,8%	10 6,5%		19
	Papiller	3 8,1%	2 2,9%	3 1,9%		8
	Lepidik	1 2,7%	1 1,4%	8 5,2%		10
	Mikropapiller	1 2,7%	1 1,4%	2 1,3%		4
	Minimal invaziv	1 2,7%	0 0,0%	0 0,0%		1
	Bilinmiyor	10 27,0%	27 39,1%	57 37,0%		94

*Cinsiyeti bilinmeyen bir vaka hariçtir

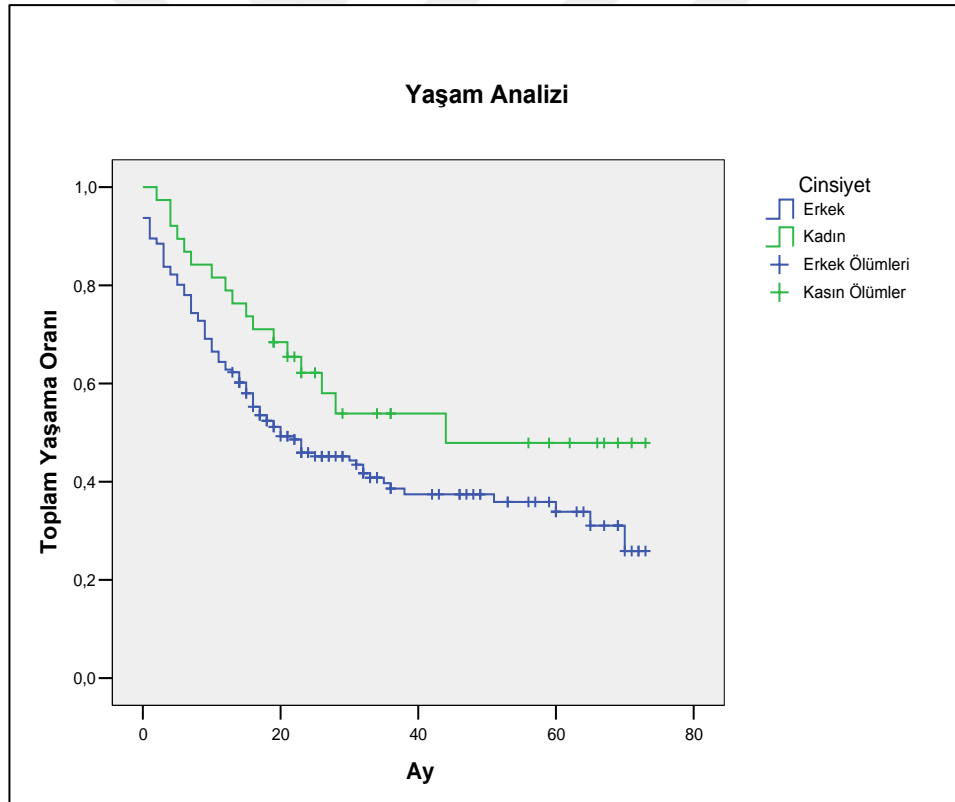
Tüm hastaların genel olarak medyan sağ kalım süresi 22,8 aydır (Çizelge 4.10). Tanı konulduktan sonra tüm hastaların ilk 3 ay içinde hayatta kalma oranı

%90, 15 ay içinde hayatta kalma oranı %60 olarak hesaplanmıştır. Bu oran ilk 15 ayda erkekler için %58, kadınlar için ise %73'tür. Kadın ile erkek sağ kalım açısından farkların anlamı istatistiksel olarak sınırdadır. Hastaların yaşam analiz grafiği Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Hastaların cinsiyete göre medyan sağ kalım değerleri

Cinsiyet	Median (Ay)	Standart Sapma	%95 güven aralığı	
			alt sınır	üst sınır
erkek	20,35	4,724	10,742	29,258
kadın	43,82	.	.	.
Genel	22,80	4,069	15,024	30,976

Çizelge 4.8 Hastaların sağ kalım grafiği



Evre ile sağ kalım arasında anlamlı ilişki bulunmuş olup evre 3A hastalıkta ölüm oranı 5 kat, evre 4 hastalıkta ise 19 kat daha fazladır. Asiner predominant paternin en iyi prognozlu olduğu bulunmuştur (koruyuculuk oranı

%63). Mikropapiller predominant paternin ölüm oranı üzerine 5 kat, müsinöz adenokarsinomun ise 1,3 kat etkili olduğu hesaplanmıştır.

Çalışmamızda yer alan 260 hastadan 106'sının EGFR mutasyon durumu bilinmemektedir. Geriye kalan 154 hastadan 19'unda (%12,3) EGFR mutasyonu pozitif, 135'inde (%87,7) negatiftir. EGFR mutasyonu saptanan 19 hastanın 13'ü erkek, 6'sı kadındır. Mutasyon izlenmeyen 135 hastanın da 113'ü erkek, 21'i kadındır. EGFR mutasyonları pozitif hastaların ortalama yaşı 62,68(\pm 12,29), negatif hastaların ortalama yaşı 60,83(\pm 9,51) olarak bulunmuştur. EGFR mutasyon durumu ile yaş arasında ilişki saptanmamıştır. EGFR mutasyonu olan hastalardan 5'i (%26,3) asiner predominant, 2'si (%10,5) papiller alt tiptedir. 8 hastanın alt tipi saptanamamıştır. EGFR mutasyonu pozitif hastaların %31,6'sının sigara kullanma öyküsü yoktu; %31,6'sının sigara kullanma öyküsü vardı; %36,8'inin ise sigara kullanım durumuna ulaşılammıştır. EGFR mutasyonu olan 19 hastadan 14'ü (%73,3) tanı anında evre IV'tür. Evre IIA EGFR pozitif bir hastanın ayrıca B hücreli lenfoma, evre IV bir hastanın ise meme karsinomu tanıları mevcuttur. EGFR mutasyonu pozitif hiç bir vakada ALK geni yeniden düzenlenmesi saptanmamıştır. EGFR mutasyon durumuna göre hastaların özellikleri Çizelge 4.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. EGFR mutasyon durumuna göre hastaların özellikleri

Hastaların Özellikleri		EGFR Mutasyonu			
		negatif 135	pozitif 19	bilinmiyor 106	toplam 260
Yaş		60,83±9,51 31-88	62,68±12,29 29-83	61,91±9,18 39-89	61,40±9,58 29-89
Cinsiyet*	Erkek	113 84,3%	13 68,4%	85 80,2%	211
	Kadın	21 15,7%	6 31,6%	21 19,8%	48
Alt tip	Asiner	25 18,5%	5 26,3%	36 34,0%	66
	Solid	31 23,0%	1 5,3%	26 24,5%	58
	Müsinöz	10 7,4%	1 5,3%	8 7,5%	19
	Papiller	4 3,0%	1 5,3%	3 2,8%	8
	Lepidik	1 0,7%	1 5,3%	8 7,5%	10
	Mikropapiller	0 0,0%	2 10,5%	2 1,9%	4
	Minimalinvaziv	1 0,7%	0 0,0%	0 0,0%	1
	Bilinmiyor	63 46,7%	8 42,1%	23 21,7%	94
Sigara öyküsü	Yok	18 13,3%	6 31,6%	13 12,3%	37
	Var	53 39,3%	6 31,6%	28 26,4%	87
	Bilinmiyor	64 47,4%	7 36,8%	65 61,3%	136
ALK	negatif	88 65,2%	7 36,8%	6 5,7%	101
	pozitif	4 3,0%	0 0,0%	0 0,0%	4
	bilinmiyor	43 31,9%	12 63,2%	100 94,3%	155
ROS1 FISH	negatif	112 83,0%	16 84,2%	95 89,6%	223
	pozitif	1 0,7%	0 0,0%	0 0,0%	1
	bilinmiyor	22 16,3%	3 15,8%	11 10,4%	36
Evre	IA	2 1,5%	1 5,3%	18 17,0%	21
	IB	3 2,2%	0 0,0%	21 19,8%	24
	IIA	9 6,7%	2 10,5%	10 9,4%	21
	IIB	5 3,7%	0 0,0%	11 10,4%	16
	IIIA	8 5,9%	0 0,0%	5 4,7%	13
	IIIB	2 1,5%	0 0,0%	3 2,8%	5
	IV	94 69,6%	14 73,7%	27 25,5%	135
	bilinmiyor	12 8,9%	2 10,5%	11 10,4%	25

*Cinsiyeti belirlenemeyen bir hasta hariçtir

Çalışmamıza alınan 260 hastanın 155'inde ALK yeniden düzenlenme durumu araştırılmamıştır. Geriye kalan 105 hastadan ALK yeniden düzenlenmesi pozitif olan 4 (%3,81) hasta, negatif olan 101 (%91,19) hasta tespit edilmiştir. ALK yeniden düzenlenmesi pozitif olan hastalardan 3'ü (%75) erkek, 1'i (%25) kadındır ve ortalama yaşı 55,75(±10,34)'dir. ALK yeniden düzenlenmesi negatif olan hastalardan 82'si erkek, 18'i kadındır ve yaş ortalaması 59,59(±10,14)'dur. ALK mutasyonu olan hastaların yaşları ALK mutasyonu olmayan hasta grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır(p=0.018). Buna göre

ALK mutasyonu daha genç hasta grubunda saptanmaktadır. ALK yeniden düzenlenmesi pozitif hastaların 2'sinde sigara kullanma öyküsü yoktur. Bir hasta sigara kullanmaktadır. Bir hastanın ise sigara kullanma öyküsü bilinmemektedir. Tümör alt tipleri açısından bakıldığında ise pozitif hastalardan 3'ü (%75) solid alttıpteyken birinin alt tipi belirlenememiştir. ALK mutasyonu olan hastaların 2'si tanı anında evre IV, 1'i evre IIIA'dır. Bir hastanın ise evresi bilinmemektedir.

ALK pozitif tüm hastalar EGFR negatifti. EGFR mutasyonu pozitif olan hiç bir hastada ALK mutasyonu yoktu; ALK mutasyonu olan hiç bir hastada da EGFR mutasyonu yoktu ($p=0,0$). ALK yeniden düzenlenme durumuna göre vakaların özellikleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

EGFR veya ALK durumu ile sağ kalım arasında ilişki saptanmamıştır.

Çizelge 4.10. ALK yeniden düzenlenme durumuna göre hastaların özellikleri

Vakaların Özellikleri		ALK Yeniden Düzenlenmesi			
		negatif 101	pozitif 4	bilinmiyor 155	toplam 260
Yaş		59,59±10,14 29-88	55,75±10,34 43-66	62,73±8,99 39-89	61,40±9,58 29-89
Cinsiyet*	Erkek	82 82,0%	3 75,0%	126 81,3%	211
	Kadın	18 18,0%	1 25,0%	29 18,7%	48
Alt tip	Asiner	23 22,8%	0 0,0%	43 27,7%	66
	Solid	17 16,8%	3 75,0%	38 24,5%	58
	Müsinöz	6 5,9%	0 0,0%	13 8,4%	19
	Papiller	3 3,0%	0 0,0%	5 3,2%	8
	Lepidik	0 0,0%	0 0,0%	10 6,5%	10
	Mikropapiller	0 0,0%	0 0,0%	4 2,6%	4
	Minimalinvaziv	1 1,0%	0 0,0%	0 0,0%	1
	Bilinmiyor	51 50,5%	1 25,0%	42 27,1%	94
Sigara öyküsü	Yok	13 12,9%	2 50,0%	22 14,2%	37
	Var	34 33,7%	2 50,0%	51 32,9%	69
	Bilinmiyor	54 53,5%	0 0,0%	82 52,9%	154
EGFR	negatif	88 87,1%	4 100,0%	43 27,7%	135
	pozitif	7 6,9%	0 0,0%	12 7,7%	19
	bilinmiyor	6 5,9%	0 0,0%	100 64,5%	106
ROS1 FISH	negatif	92 91,1%	3 75,0%	128 82,6%	223
	pozitif	0 0,0%	1 25,0%	0 0,0%	1
	bilinmiyor	9 8,9%	0 0,0%	27 17,4%	36
Evre	IA	1 1,0%	0 0,0%	20 12,9%	21
	IB	2 2,0%	0 0,0%	22 14,2%	24
	IIA	6 5,9%	0 0,0%	15 9,7%	21
	IIB	3 3,0%	0 0,0%	13 8,4%	16
	IIIA	4 4,0%	1 25,0%	8 5,2%	13
	IIIB	2 2,0%	0 0,0%	3 1,9%	5
	IV	71 70,3%	2 50,0%	62 40,0%	135
	bilinmiyor	12 11,9%	1 25,0%	12 7,7%	25

*Cinsiyeti belirlenemeyen bir hasta hariçtir

Çalışmamıza alınan, FISH ile ROS1 gen yeniden düzenlenmesi araştırılan 260 hastanın 19'unda tümör hücre sayısının yetersiz olması, 17'sinde ise muhtemel doku tespit ve takip problemleri nedeniyle teknik olarak FISH testinin uygulanamaması sebebiyle 36 hasta değerlendirilememiştir. Geriye kalan 224 hastada FISH ROS1 pozitif 1 (%0,45) hasta, negatif 223 (%99,55) hasta tespit edilmiştir.

ROS1 gen yeniden düzenlenmesi pozitif olan hasta erkek ve 62 yaşındadır. Hastaya ait örnek lenf nodu biyopsisidir. Solid patern izlenmiş olup hastanın 40 paket yılı sigara kullanma öyküsü mevcuttur. Hastada EGFR mutasyonu yoktur

ancak ALK yeniden düzenlenmesi tespit edilmiştir (p=0.01). İHKsal olarak ROS1 antikoru ile pozitif immünreaksiyon saptanmamıştır. Hastanın tanı anındaki uzak metastaz varlığı bilinmemektedir. Ancak hastada 2, 8 ve 10 nolu lenf düğümlerine metastaz mevcuttur. ROS1 pozitif hastanın genel sağ kalım süresi 3,5 aydır. Hastanın sağ kalım analizi ROS1 pozitifliği ölüm riskini 1,73 kat arttırıyor gibi görünse de tek hasta olduğu için anlamlı kabul edilmemiştir. Yine aynı sebepten yaş, cinsiyet, evre, tümör alt tipi gibi ilişkinin araştırıldığı diğer klinik parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşamamıştır (Çizelge 4.9).

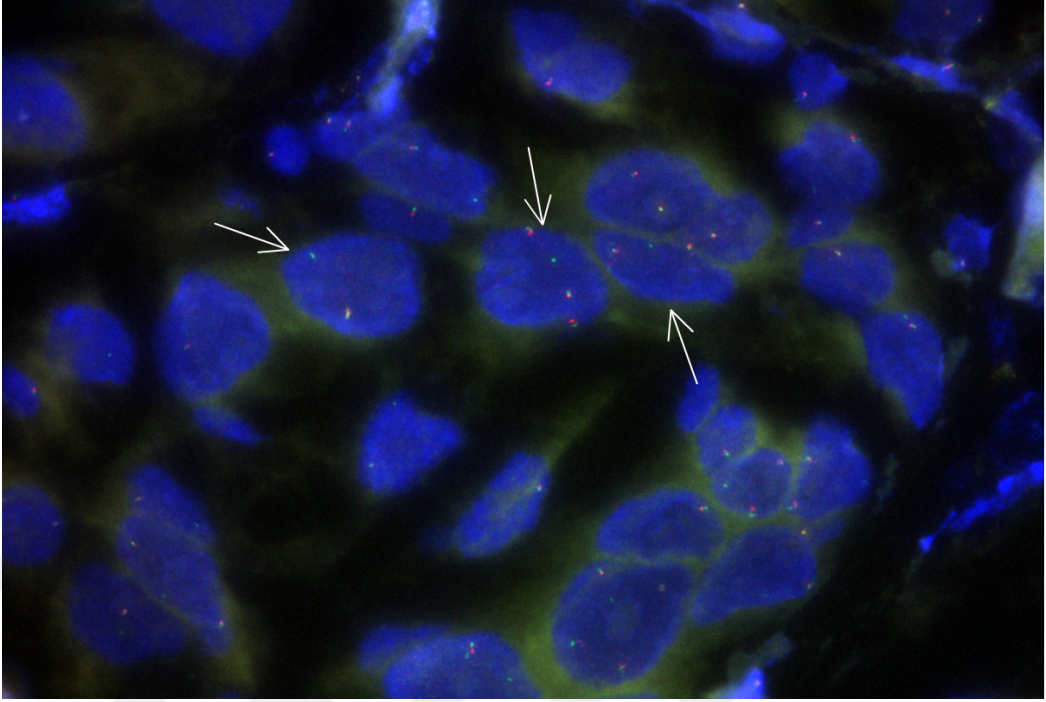


Çizelge 4.11. FİSH ROS1 durumuna göre hastaların özellikleri

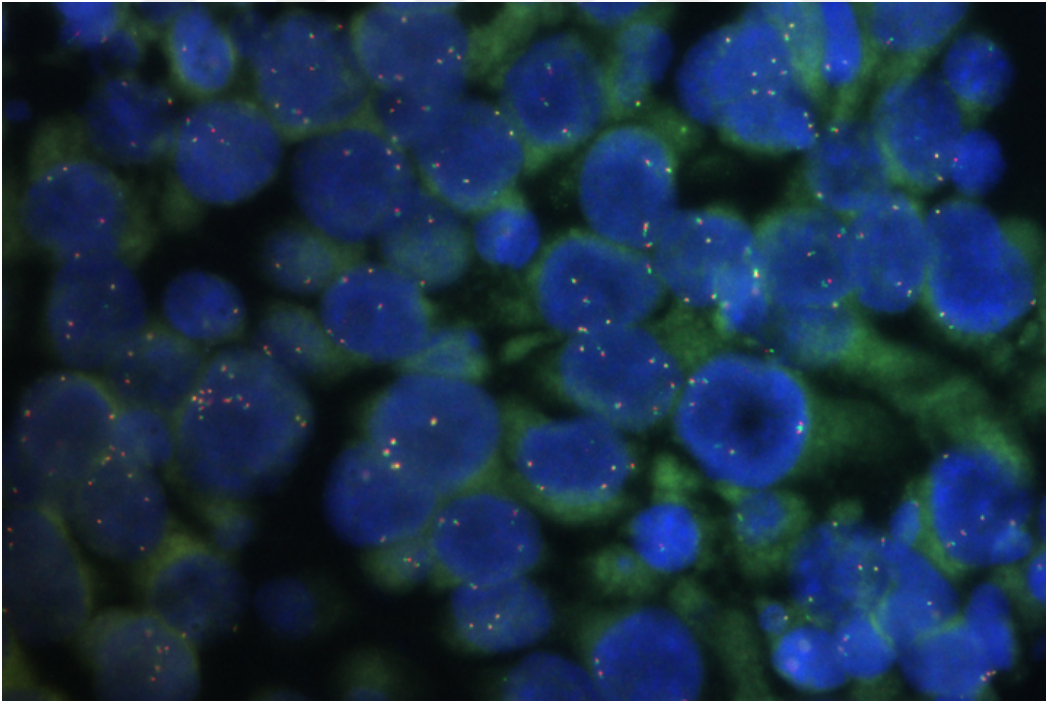
Vakaların Özellikleri		ROS1						
		negatif 223	pozitif 1	bilinmiyor 36	toplam 260			
Yaş		61,43±9,75 29-89		62	61,25±8,79 41-83	61,40±9,58 29-89		
Cinsiyet*	Erkek	183	82,4%	1	100,0%	27	75,0%	211
	Kadın	39	17,6%	0	0,0%	9	25,0%	48
Alt tip	Asiner	62	27,8%	0	0,0%	4	11,1%	66
	Solid	53	23,8%	1	100,0%	4	11,1%	58
	Müsinöz	18	8,1%	0	0,0%	1	2,8%	19
	Papiller	8	3,6%	0	0,0%	0	0,0%	8
	Lepidik	9	4,0%	0	0,0%	1	2,8%	10
	Mikropapiller	4	1,8%	0	0,0%	0	0,0%	4
	Minimal invaziv	1	0,4%	0	0,0%	0	0,0%	1
	Bilinmiyor	68	30,5%	0	0,0%	26	72,2%	94
Sigara öyküsü	Yok	30	13,5%	0	0,0%	7	19,4%	37
	Var	75	33,6%	1	100,0%	11	30,6%	69
	Bilinmiyor	118	52,9%	0	0,0%	18	50,0%	154
EGFR	negatif	112	50,2%	1	100,0%	22	61,1%	135
	pozitif	16	7,2%	0	0,0%	3	8,3%	19
	bilinmiyor	95	42,6%	0	0,0%	11	30,6%	106
ALK	negatif	92	41,3%	0	0,0%	9	25,0%	101
	pozitif	3	1,3%	1	100,0%	0	0,0%	4
	bilinmiyor	128	57,4%	0	0,0%	27	75,0%	155
ROS1 İHK	negatif	204	91,5%	1	100,0%	16	44,4%	221
	pozitif (+1)	2	0,9%	0	0,0%	0	0,0%	2
	bilinmiyor	17	7,6%	0	0,0%	20	55,6%	37
Evre	IA	19	8,5%	0	0,0%	2	5,6%	21
	IB	23	10,3%	0	0,0%	1	2,8%	24
	IIA	18	8,1%	0	0,0%	3	8,3%	21
	IIB	15	6,7%	0	0,0%	1	2,8%	16
	IIIA	13	5,8%	0	0,0%	0	0,0%	13
	IIIB	3	1,3%	0	0,0%	2	5,6%	5
	IV	113	50,7%	0	0,0%	22	61,1%	135
	bilinmiyor	19	8,5%	1	100,0%	5	13,9%	25

*Cinsiyeti belirlenemeyen bir hasta hariçtir

ROS1 pozitif tek hastanın FİSH testinde 100 tümör hücresinin 18'inde 1 füzyon ve 1 yeşil sinyal (delesyon) izlenmiştir (Şekil 4.9). 223 ROS1 FİSH negatif hastada her hücrede ikişer füzyon sinyali izlenmiştir (Şekil 4.10).

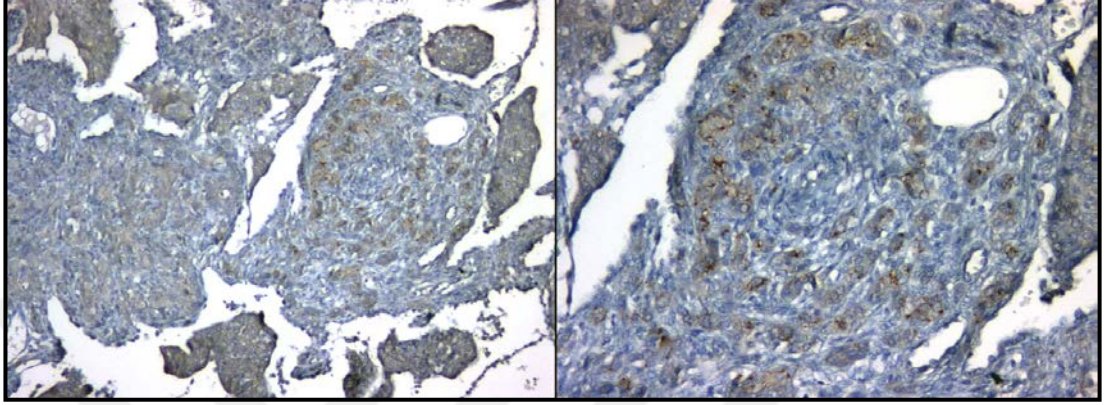


Şekil 4.9. ROS1 FİSH pozitifliği

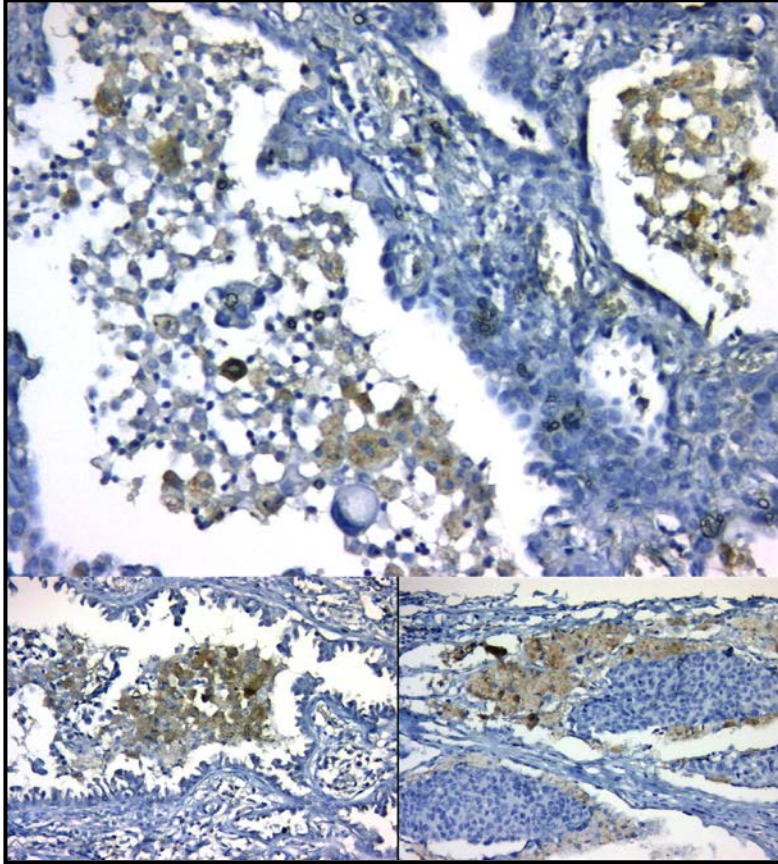


Şekil 4.10. ROS1 FİSH negatifliği

İki hastada zeminden zorlukla ayırt edilen soluk boyanma (+1) izlendi (Şekil 4.11). Ayrıca bazı vakalarda alveolar makrofajlarda ve subplevral alanda soluk pozitif boyanma da görülmüş olup internal kontrol olarak kabul edilmişlerdir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. İHKsal ROS1 (+1) pozitifliği



Şekil 4.12. İHKsal ROS1 pozitifliği gösteren tümör dışı alanlar

İHKsal ROS1'in tanı koyma gücü yani özgüllüğü zayıf bulunmuştur. İHKsal ROS1'in ROS1 yeniden düzenlenmesi negatif olan hastaları bulma gücü ise yani duyarlılığı %99'dur (Çizelge4.9).

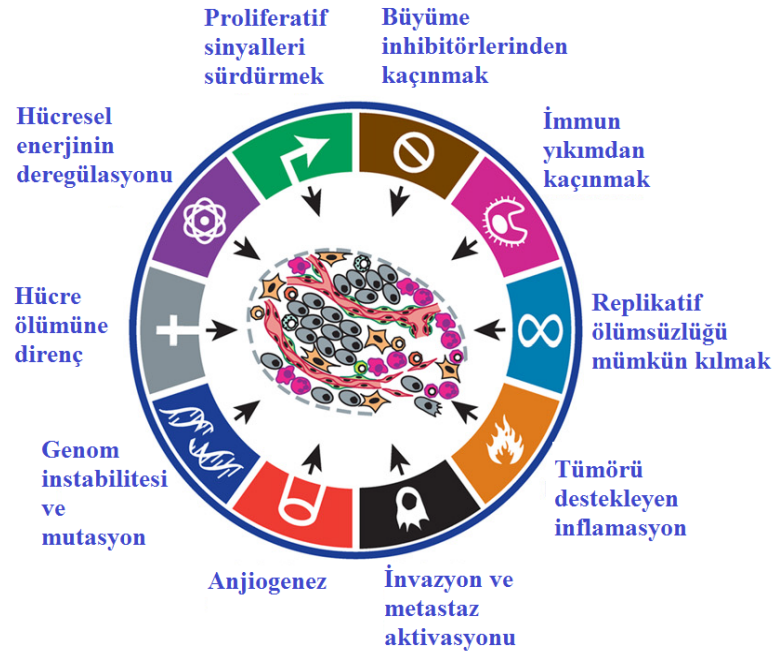
Çizelge 4.12. ROS1 için FISH ve İHK sonuçlarının karşılaştırılması

		ROS1 FISH		Toplam
		negatif	pozitif	
ROS1	negatif	204	1	205
İHK	pozitif	2	0	2
Toplam		206	1	207

5. TARTIŞMA

Neoplastik hastalıkların ortaya çıkma ve devam etme sürecinde bu hücrelerin geçirdiği önemli değişiklikleri özetleyen 6 madde tanımlanmıştır. Bunlar: proliferatif sinyalleri sürdürmek, büyüme inhibitörlerinden kaçınmak, hücre ölümüne direnç geliştirmek, replikatif ölümsüzlüğü mümkün kılmak, anjiogenez, invazyon aktivasyonu ve metastaz (84). Sonrasında bunlara iki ilave özelliklenmiştir. Birincisi, neoplastik çoğalmayı en etkili şekilde desteklemek için hücre metabolizmayı değiştirme veya yeniden programlama kabiliyetidir (hücre enerjisinin deregülasyonu). İkincisi, kanser hücrelerinin, özellikle T ve B lenfositleri, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler tarafından sağlanan immünolojik yıkımdan kaçma kabiliyetidir (immün yıkımdan kaçınmak).

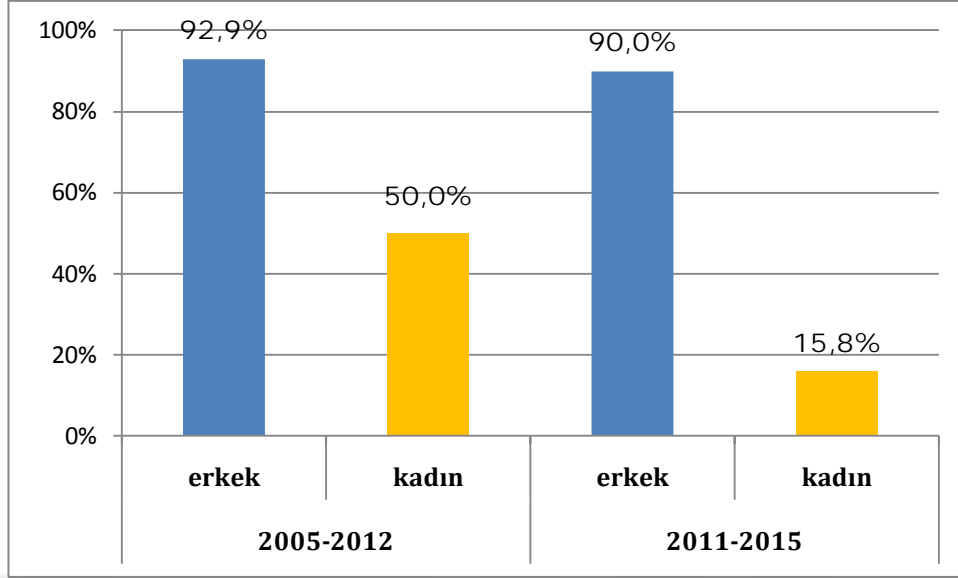
Tüm bu özellikleri mümkün kılan, altta yatan faktörlerden en belirgin olanı kanser hücrelerinde kromozomal yeniden düzenlemeler de dahil olmak üzere rastgele mutasyonlar üreten genetik istikrarsızlığın gelişmesidir (genom instabilitesi ve mutasyon). İkinci bir faktör de bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından yönlendirilen tümör ilerlemesidir (tümörü destekleyen inflamasyon). Kanser hücrelerinin özelliklerine ek olarak, normal destek hücreleri, "tümör mikroçevre"si yaratarak tüm neoplazi sürecine katkıda bulunur (Şekil 5.1) (85).



Şekil 5.1.Kanserin özellikleri; karakteristik özelliklerini meydana getiren ve sonradan ortaya çıkan özellikleri

Neoplazi sürecine dünya çapında en çok katkıyı sağlayan önlenebilir faktör sigaradır (23). Sigaranın çeşidine göre ortaya çıkarabileceği kanser türü de çeşitlilik gösterebilmektedir. Filtreli hafif sigaralardan alınan duman daha derin solunabilir, bu da kanserojen birikiminin daha periferik bir şekilde ortaya çıkmasına ve adenokarsinomlara neden olabilmektedir. Nikotin içeriğinin azaltılmasıyla sigara kullananlar bu açığı telafi etmeye çalıştıkça daha derin nefesler almakta ve bu yüzden akciğerin periferine solunan maddeler daha fazla ulaşmaktadır (86). Ayrıca son yıllarda sigara içeriğinde skuamöz hücreli karsinomların indükleyicisi olan kanserojenik polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAHs) oranı düşürülürken, adenokarsinomların indükleyicisi kanserojen, tütüne özgü N-nitrosaminlerin (TSNA'lar) oranı arttırılmıştır (87). Bu faktörler, eski sigara içicilere göre daha fazla adenokarsinom riski ortaya çıkarmış olup akciğer kanseri oranlarında adenokarsinomun oranının artmasını sağlamıştır. Adeokarsinomun alttipleri içinde desolid, papiller, mikropapiller, kribriform baskın histoloji sigara ile ilişkili bulunmuş olup müsinoz tipsigara içmeyenler ve kadın cinsiyetle ilişkili bulunmuştur (88). Bir başka çalışmada hiç sigara içmeyen hastalarda lepidik paternin daha yüksek oranda görüldüğü de bildirilmiştir (89). Çalışmamızdasigara kullanımöyküsü ve baskın alt tip arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve sigara içenlerde müsinoz adenokarsinom oranının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Bölümümüzde yapılan Uzun'un (90) tez çalışmasında, 2005-2012 yılları arasındaki rezeksiyon materyallerinden adenokarsinom tanısı konulan hastalar arasından sigara öyküsü bilinenler değerlendirilmiş ve cinsiyete göre sigara içme oranları çıkarılmıştır. Buna göre erkeklerde %92,9 (13/14), kadınlarda %50 (3/6) sigara içme oranı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise bu oran erkeklerde %90 (54/60), kadınlarda %15,8'dir (3/19) (Çizelge 5.1.)

Çizelge 5.1. AAK tanılı hastaların yıllara göre sigara içme oranları



AAK'larında predominant patern adjuvant kemoterapiveradyoterapiden bağımsız olarak sağkalım prediktörü olarak bulunmuştur. Tedaviye yanıtta da patern bağımlı farklılık olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (39). Lepidik predominant adenokarsinomlarda platinyum bazlı KT'ye yanıt iyi değildir. Hatta verilen bu tedavinin sağkalımı azalttığını bulan çalışmalar da vardır (39,91-92). Bizim çalışmamızda asiner predominant paternin en iyi prognozlu olduğu görülmüştür (koruyuculuk oranı %63). Mikropapiller predominant paternin ölüm oranı üzerine 5 kat, müsinöz adenokarsinomun ise 1,3 kat etkili olduğu hesaplanmıştır. Bizim çalışmamıza dahil olan hastaların hangi tedaviyi ne kadar aldıkları konusunda bir çok veriye ulaşamamıştır. Bu durum hastane veri kayıt sistemlerinin uygun kullanılmamasından kaynaklanmaktadır.

Hedeflenebilir sürücü mutasyonlardan EGFR, ALK, RET, ROS1 gibi mutasyonların varlığı ile tümör tipi ve birçok parametrenin ilişkisi sorgulandığında hastaların çoğunlukla adenokarsinom tanısı aldıkları, hiç sigara içmemiş ya da az içmiş oldukları tespit edilmiştir. Diğer sürücü mutasyonlardan KRAS, BRAF gibi mutasyonlar ise daha çok sigara içmiş AAK hastalarında izlenmektedir (606, 892, 2626). Etnik köken ve cinsiyet de tüm KHDAK'larda EGFR mutasyonlarının varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Birden fazla araştırmada, EGFR mutasyonlarının, kadınlarda, hiç sigara içmemişlerde ve Doğu Asyalılarda daha sık görüldüğünü gösterilmiştir (51-52,57,93-95). Bizim çalışmamıza dahil olan hastalardan EGFR mutasyon durumu bilinenlerin cinsiyet ve yaş ile EGFR mutasyon varlığı arasında

ilişki olup olmadığı araştırılmış ve anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır. Bu durum EGFR mutasyonu olan hasta sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir.

EGFR mutasyonlu akciğer kanserinden farklı olarak, ALK gen füzyonları, cinsiyete ve etnik kökenlere göre belirgin farklılıklar göstermemektedir, ancak hiç sigara içmemişlerde ve genç yaştaki hastalarda daha sık görülmektedir (59,96-98).Bizim çalışmamıza alınan hastalar içinde ALK mutasyonu daha genç hasta grubunda saptanmaktadır. ALK yeniden düzenlenmesi ile cinsiyet ve sigara kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. Bu klinik özellikler popülasyon çalışmaları için değerli olabilmesine rağmen, hedeflenen bir inhibitörle tedavi için hastaları seçmek için yeteri kadar spesifik değildirler. Sadece bu özelliklere (yaş, cinsiyet, etnik köken, sigara öyküsü gibi) göre seçim yapmak, EGFR veya ALK hedefli terapiden fayda sağlayabilecek önemli sayıda hastayı dışlayabileceğinden, tüm adenokarsinom tanılı hastalar EGFR mutasyonu ve/veya ALK yeniden düzenlenmesi için test edilmelidir.

Pür skuamöz hücreli karsinomlar, pür küçük hücreli karsinomlar veya herhangi bir adenokarsinom bileşeni bulunmayan akciğer kanserlerinde EGFR ve ALK testi önerilmez. EGFR mutasyonları çeşitli histolojik akciğer kanseri tiplerinde saptanmıştır. EGFR mutasyonları çoğunlukla adenokarsinomlarda veya adenoskuamöz karsinom da dahil olmak üzere miks de olsa adenokarsinom komponenti olan karsinomlarda tespit edilmiştir. EGFR mutasyonlarının, lepidik, papiller veya asiner histolojiye sahip düşük dereceli adenokarsinomalarda kötü diferansiye, müsinöz veya solid adenokarsinomalara göre daha sık olduğunu gösteren bazı kanıtlar bulunmakla birlikte, EGFR mutasyonları, tüm adenokarsinomlarda önemli bir sıklıkta karşımıza çıkmaktadır(45,99-100). Bizim hastalarımız içinde EGFR mutasyonu taşıyan hastaların tümör alttiplerine bakıldığında baskın olarak asiner alt tip görülmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki adenokarsinom alt tipi, örneklerin EGFR için test edilmesi veya edilmemesini belirleyen bir belirteç olarak kullanılmamalıdır(101). Adenokarsinom bileşeni olasılığının ekarte edilemediği, eksik örneklemler dokularda da test yapılabilir. Bu bağlamda, genç yaş, sigara içmemiş olmak gibi klinik ölçütler, test için hastaları seçmek için kullanılabilir. Primer tümörler veya metastatik lezyonlar test için eşit derecede uygundur(101).

İleri evre hastalığı olanlarda, tedavi yokluğunda 4-5 aylık bir yaşam süresi gibi kısa bir ömür beklentisi vardır. Hastalar birinci basamak kemoterapi ile birlikte ikinci basamak ajan olarak tirozin kinaz inhibitörlerinden (TKI) bir miktar fayda sağlamış olsalar da, EGFR mutasyonları veya ALK yeniden düzenlenmeleri olan hastalar, TKİ tedavileri birinci basamak ajanlar olarak uygulandığında daha iyi sonuçlara sahiptir (102). Klinik yanıt tipik olarak hızlı şekilde görülür ve ilaçların platin bazlı kemoterapiyle karşılaştırıldığında nispeten ılımlı yan etkileri vardır (103). Ancak mutasyonunun kanıtı olmaksızın birinci basamak tedavi olarak uygulanmaması önerilmektedir (101).Bizim çalışmamızda verilerine ulaşılabilir hastalar arasında TKİ kullanım durumları bilinmemektedir. Çalışmamıza dahil olan hastalardan EGFR ve ALK testi uygulananlar genel olarak klinik tarafından seçilen ileri evre hastalığa sahip oldukları için EGFR ve ALK mutasyonu ile sağ kalım arasında ilişki saptanmadığı yorumuna gidilmiştir.

Uzun'un tez çalışmasında (90) çalışmaya dahil olan tüm adenokarsinom tanılı hastalarda %24.1 EGFR mutasyonu saptanırken bizim çalışmamızda bu oran %12,3'tür. Uzun'un tez çalışmasındaki tüm AAK tanılı hastalarda EGFR çalışılmıştır, bizim çalışmamızdaki vakalar ise genel olarak klinik tarafından seçilen ileri evre hastalığa sahip hastalardır ve bu da aynı merkezli iki çalışma arasındaki sıklık farkını açıklamaktadır.

Lokalize hastalığı olan hastalar cerrahi tedavi için bir potansiyele sahiptir ve belki de hiçbir zaman hedefe yönelik terapiye ihtiyaç duyulmayabilir. Ancak rezeksiyon anında ilk cerrahi numunenin test edilmesi, erken evre hastalığı olan hastaları test etmemek ve progresyona kadar beklemek sonrasında muhtemel daha küçük ve kalitesiz bir biyopsi örneğinde çalışmayı ya da hastaların invaziv prosedürlere tabi tutulmasını ya da uzun süredir arşivde beklemiş olan parafin bloklardan çalışmayı ya da başka bir kurumda testin yapılması için parafin dokunun nakli için zaman harcamayı gerektirebilir(101). Dahası, EGFR testi, hedeflenen inhibitörlere yanıtın bir prediktörü olarak kullanılmasının ötesinde, olumlu bir prognostik faktör olarak da kullanılabilir (102,104). Neticede erken evrede yakalanan hastaların test edilip edilmeyeceği sorusuna her bir kurumun onkoloji ekibi birlikte karar vermeli görüşü hakimdir(101).Nitekim yeni yayınlanan bir derlemeye göre ileri evre olamayan akciğer kanserlerinde adjuvan

EGFR-TKI eklenmesinin anlamlı bir fayda sağlamadığına da değinilmiştir(105).EGFR mutasyonları olasılığı çok düşük (örneğin <% 1) hastaları tanımlamak için bu değişkenlerin birçoğunu birleştiren öngörme modelleri geliştirilmiştir, ancak daha ileri değerlendirmelere ihtiyaç duyulmaktadır(26,106).EGFR mutasyonu ile birbirlerini dışladıkları için EGFR testi öncesi akciğer adenokarsinomalarında en sık mutasyona uğrayan (~% 30) KRAS geninin durumuna da bakılabilir.

Akciğer adenokarsinomasında ALK'nın genetik değişikliği kromozomal yeniden düzenlemeden kaynaklanmaktadır. Bu düzenlenmelerden en yaygın olanı, EML4'ün (2p21) amino terminal bölümünü ile ALK'nın hücre içi bölgesini (2p23) kodlayan kısım arasında gerçekleşir.Kromozomunun kısa kolunda perisentrik bir inversiyon, inv (2) (p21p23) ile füzyon geni meydana gelir(11,36). En sık EML4-ALK füzyonu görülmekle birlikte, diğer kromozomlarla translokasyonlar (KIF5B-ALK, TFG-ALK) da bildirilmiştir (11,107). FISH testi, ALK TKI olan krizotinib tedavisinden fayda sağlayabilecek aday hastaları seçmede için kullanılan ve halen 'altın standart' olarak kabul edilen bir testtir(101).

EGFR, ALK ve KRAS mutasyonları birbirini dışlayan mutasyonlardır; yine de çok nadir istisnaları mevcuttur (108-110). Bizim çalışmamızda hiç bir hastada kombine EGFR ve ALK mutasyonu birlikteliği saptanmamıştır. Yayınlanan kılavuza göre ileri evre AAK hastasında en basit algoritim öncelikle EGFR mutasyon durumunu test etmek ve eğer wild tip ise sonrasında ALK FİSH uygulanması şeklinde önerilmektedir(101).

5.1. ROS1

ROS1 füzyon geninin sıklığı adenokarsinomalarda %2.98, adenokarsinom dışı tümörlerde ise %0,22'dir(16). Kadınlarda%2,42 oranında izlenirken erkeklerde% 1,57 oranında görülmektedir (16).

Bizim çalışmamızda sadece bir ROS1 FİSH pozitif hasta tespit edilmiştir. Hastamız erkek ve 62 yaşındadır. ROS1 negatif hastaların ortalama yaşından (61,4 yaş ortalaması) farklı bulunmamış olup aynı şekilde Yoshida ve Kim'in çalışmalarıyla uyumludur (14,111). Ancak başka bir seride ROS1 pozitif hastalar

ROS1 negatif hastalardan 12 yaş daha genç bulunmuştur (79). Cinsiyetle ilişkisine bakıldığında KHDAK tanılı hastalarda ROS1 füzyon geni sıklığında artış ile kadın cinsiyet arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.

Metaanalizde sigara kullanan ve kullanmayan hastalarda sırasıyla % 0.90 (35 / 3.882) ve %3.65 (122 / 3.340) oranında ROS1 füzyonu saptanmıştır. Asya popülasyonunda, sigara kullanmayan KHDAK hastalarında artmış ROS1 mutasyon oranı yönünde bir eğilim tespit edilmiştir. Beyaz ırk popülasyonunda ise sigara kullanmayan KHDAK hastalarında ROS1 füzyon geninde anlamlı derecede yüksek bir oran gösterilmiştir (16). Bizim çalışmamızda bu literatür bilgilerinin aksine ROS1 mutasyon tespit edilen hastamızın sigara içme öyküsü pozitif olup 40 paket/yıl sigara kullanımı vardır.

ROS1 füzyon geni ileri evre (III-IV) hastalıkta anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ortaya koyulmuştur(16). Bizim çalışmamızda ROS1 pozitif vakanın tanı anındaki evresi bilinmemekle beraber hedefe yönelik tedavi seçiminde kullanılacak KRAS, EGFR, ALK, MET, ROS1 gibi genlerdeki mutasyon durumlarının değerlendirilmesi için moleküler testlere yönlendirilen hasta grubu büyük çoğunlukla ileri evre hastalardır. Yine özellikle 3.basamak hizmetlerin verildiği merkezlerde bazı hastalar diğer merkezlerden yalnızca moleküler testler yapılmak üzere yönlendirilmektedir. Bu nedenle tespit edilen ROS1 mutasyonlarının daha çok ileri evre hastalarda karşımıza çıkması beklenen bir durumdur.

Metaanalize göre adenokarsinom histolojisi olan, sigara öyküsü olmayan, genç, kadın ve ileri evre hastalarda ROS1 mutasyon olasılığı daha fazladır (16). Ancak bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz ROS1 mutasyonu olan tek hasta bu profile genel olarak uymamaktadır. Literatürle çelişen bu durumu bir ROS1 pozitif hasta üzerinden tartışmak doğru olmayacaktır ancak bizim toplumumuzda özellikle Akdeniz bölgesine ait spesifik bir veri olmaması yine toplumlar veya etnik gruplar arası farktan kaynaklanıyor mu sorusunu akla getirmektedir. Bunun açıklığa kavuşabilmesi için daha geniş hasta serilerine ihtiyaç vardır.

ROS1 mutasyonuna sahip adenokarsinomların morfolojik özelliklerine bakacak olursak bir çalışmada % 75 hastada (12/16) en sık solid patern, % 25 hastada ise (4/16)asiner patern izlemiştir. 16 olgunun hiçbirinde lepidik, papiller

veya mikropapiller gelişim paterni izlenmemiştir. Solid paterndeki vakaların bir kısmı eozinofilik sitoplazma, yuvarlak çekirdekler ve belirgin nükleolü olan hepatoid morfoloji (8/12) göstermiştir. Asiner büyüme paternine sahip% 75 olguda kribriform yapılanma (3/4) görülmüştür. Tümörlerin % 18.8 'inde bol miktarda hücre dışı müsin veya taşlı yüzük hücre değişiklikleri izlenmiştir(3/16). Solid büyüme paternine sahip tek bir hastadapsammomatöz kalsifikasyonlar da göstermiştir (112). Bir başka çalışmada ise ROS1 mutasyonu pozitif 1 olguda lepidik patern, 1 olguda mikropapiller ve papiller paternler,1 olguda ise solid, asiner, mikropapiller ve lepidik (senkron lenf nodu metastazında sadece mikropapiler patern)paternlerizlenmiştir. Bir olguda invaziv müsinöz adenokarsinom görülmüştür. Taşlı yüzük hücre değişiklikleri 4 olguda dikkati çekmiştir (113). Bizim ROS1 pozitif hastamızın test uygulanan materyali lenf nodu metastazına ait doku örneği olup metastazın solid paternde olduğu izlenmiştir.

Bir çalışmada ROS1 mutasyonu olmayan hastaların ROS1 mutasyonu pozitif hastalara göre anlamlı derecede daha uzun genel sağ kalıma sahip oldukları bulunmuştur. ROS1 mutasyonu olmayan hastaların genel sağ kalımı 40 ay iken ROS1 mutasyonu pozitif hastaların genel sağ kalımı 18 aydır (p = 0.022) (114). Benzer sonuçlar başka bir çalışmada da gösterilmiştir (115). Bizim ROS1 pozitif hastamızın genel sağ kalımı 4,5 aydı. Hastanın sağ kalım analizi (ROS1 pozitifliği ölüm riskini 1,73 kat arttırıyor) anlamlı çıkmış olmakla beraber tek vaka üzerinden bu sonucu elde ettiğimiz için daha geniş olgu serilerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. ROS1 yeniden düzenlenmesi sonucunda ortaya çıkan füzyonun tespitinde FISH en güçlü yaklaşım 'Altın standart' olarak kabul edilmektedir. Bazı ROS1 füzyon ortakları, kromozom 6'nın uzun (q) kolunda intrakromozomal olmasına rağmen, füzyon ortakların çoğu diğer kromozomlarda görülmektedir (165). Farklı füzyon ortakları içeren toplam 12 ROS1 füzyon varyantı tanımlanmıştır. Bu füzyon ortakları Solute carrier family 34 member 2 (SLC34-A2), CD74 molecule (CD74), tropomyosin 3 (TPM3), syndecan 4 (SDC4), ezrin (EZR), leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 3 (LRIG3), golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing (GOPC), KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2 (KDELR2) and coiled-coil

domain containing 6 (CCDC6)'dır (11,63,116). Bilinen tüm füzyon partneri genler ile meydana gelen ROS1 geni füzyonları sırasında ROS1 kinaz domainin kodlayan alanın tamamı korunur ve haberci RNA (mRNA) meydana gelirken ROS1'in diğer füzyon gen ile bağlantı noktası ekzon 32, 34, 35 veya 36'nın 5' ucunda meydana gelir. ROS1 kinaz alanı bu füzyonlar sırasında korunmasından ve füzyon proteininde eksprese edilmesinden dolayı onkogeniktir (117). Break apart FISH probu muhtemel kırılma noktalarını içerecek şekilde dizayn edilmiştir ancak diğer kromozomlarda yer alan füzyon partneri genlerle olan tüm yeniden düzenlenmeleri algılayabilmesine rağmen, aynı kromozomda (intra-kromozomal) meydana gelen yeniden düzenlemeleri içeren ROS1 mutasyonlarını bölünmüş sinyallerin yakın konumu nedeniyle gösteremeyebilir. Örneğin Ezrin (EZR)-ROS1 (118) genleri arasındaki yeniden düzenlenmeyi break-apart FISH analizleri gösteremeyebilir (13,79). Çalışmalarda ROS1 FISH pozitif vakalar için bölünmüş sinyal paternleri yanı sıra tekli 3 'sinyal (yeşil) varlığı da gösterilmiştir (114,119). Bizim ROS1 pozitif vakamızın FISH incelemesinde değerlendirilen 100 tümör hücresinin 18'inde bir kırmızı/yeşil füzyon sinyali(normal) ve bir de tek yeşil sinyal paterni izlenmiştir.

FISH sonuçları dokunun preanalitik durumu ile de değişkenlik gösterebilmektedir. 6 aydan önce alınmış hazır kesitlerin kullanımı zayıf hibridizasyona neden olabilmektedir(117). Bu nedenle bu tür retrospektif analizlerde elde edilen ROS1 pozitiflik oranları gösterebildiğimiz çok daha üstünde olabilmektedir. Bu durumu aydınlatılmak ve muhtemel şüpheleri ortadan kaldırabilmek adına prospektif çalışmadizaynlarına ihtiyaç vardır.

FISH tekniği IHC ile karşılaştırıldığında daha zahmetli, zaman alan ve daha pahalı bir uygulamadır. Bu nedenle FISH analizine gönderilecek ROS1 mutasyon varlığının değerlendirilmesi gereken KHDAK hastalarını tarayacak IHC gibi daha ucuz, hızlı ve pekçok laboratuvarında uygulanabilecek tekniklerin denenmesi ve algoritmalar geliştirilmesi güncel araştırma konularındandır. Birkaç çalışmada IHC'nin ROS1 mutasyon durumunun belirlenmesinde hassas ve spesifik bir test olduğu vurgulanmıştır. ROS1 IHC'sinin ROS1 FISH testine karşılık uygulanabilir bir alternatif olduğunu belirtilmiştir(113,116,120-121). Ancak IHC

sonuçlarının yorumlanması daha semikantitatif nitelikte olup buna kıyasla FISH analizidaha objektif görünmektedir(114).

Şu anda, IHK sonuçlarını nasıl değerlendirip yorumlayacağımıza dairevrensel olarak kabul edilmiş bir sistem yoktur. Kullanılan değerlendirme modelleri arasında, arka plan (background) boyanmasının baz alındığı derecelendirme sistemi (+1, +2, +3) bulunmaktadır. Başka bir seçenek ise boyanan hücrelerin boyanma derecesiyle (+1, +2, +3) boyanan alan yüzdesinin çarpımı sonucu elde edilen H skoruna göre ROS1 füzyon proteini varlığını değerlendirmektir(120,122). Bildirilen skorlama yöntemlerinden hiçbirinin diğerlerinden açıkça üstün olduğu gösterilmemiştir, çünkü hepsi FISH sonuçlarıyla çok iyi korelasyon göstermiştir. Bu skorlama yöntemlerinin bir yetersizliği taşlı yüzük hücre değişikliği bulunan adenokarsinomlarda, sitoplazmanın büyük oranda reaktif olmayan münin ile dolu olması nedeniyle ROS1 mutasyon pozitif hastalarda füzyon protein varlığını göstermede yetersiz kalabilme ihtimalidir (121).

IHK çalışmalarında ROS1 yeniden düzenlemesine sahip bilinen tümör örnekleri veya SLC34A2-ROS1 füzyon genini barındıran HCC78 hücre dizisine ait bir hücre bloğu pozitif kontrol olarak kullanılabilir(116). Apendiksin ganglion hücrelerinin ALK IHK için uygun bir kontrol olmasının aksine şu anda ROS1 için tanımlanmış iyi bir dış doku kontrolü mevcut değildir. Zayıf ROS1 ekspresyonu akciğer doku örneklerinde zaman zaman nonneoplastik hiperplastik tip II pnömositlerde, alveolar makrofajlarda veya subplevral bölgede saptanabilmektedir. Genellikle bu hücrelerdeki boyanma zayıf veya orta derecededir (1 + / 2 + yoğunlukta) ve protein stabilitesinin preanalitik değişkenlerden (ör. fiksasyon süresi) etkilenip etkilenmediği belirsizdir (120). Kemik metastazlarında, osteoklast tipi dev hücrelerin güçlü granüler sitoplazmik boyanması da yine bir iç kontrol olarak dikkat çekmektedir(117). Bizim çalışmamızda da alveolar makrofajlar ve subplevral bölgede pozitif boyanma saptanmıştır ve bu boyanma pozitif internal kontrol olarak yorumlanmıştır.

ROS IHKsını ≥ 20 tümör hücresi içeren tümör örneklerindedegerlendirmek önerilmiş olsa da birkaç hücrede tespit edilebilen net bir boyanmanın anlamlı kabul edilebileceğini belirten yayınlar da bulunmaktadır(123). Bu durum daha

önce belirttiğimiz zaman zaman nonneoplastik hiperplastik tip II pnömositlerde ve subplevral bölgede saptanabilen iç kontrolü düşündüğümüzde bu konuda akciğer dokusuna spesifik çalışmayan patologlar arasında uyum oranını düşürebilecektir.

Pozitif ROS1 İHK'sı tipik olarak ince granüler sitoplazmik boyanma şeklinde izlenmektedir. Bununla birlikte, boyama paterni, gen füzyon ortağının fonksiyonuna ve subselüler konumuna bağlı olabilir (121,124).CD74-ROS1 füzyonu taşıyan tümör örneklerinde globüler boyanma tanımlanırken,EZR-ROS1 füzyonu taşıyan tümörlerde membranöz boyanma gözlemlenmiştir (121,123).FIG-ROS1 füzyonu sonucu meydana gelen füzyon proteininebağlı olarak perinükleer güçlü noktasal boyanma da bildirilmiştir(113). Bizim çalışma hastalarımızdan 2'sinde pozitif immünreaksiyon tespit edilmiş olup bu hastalarda izlenen boyanma paternleri soluk ince granüler boyanma ve noktasal boyanma şeklindedir. Farklı boyanma paternlerinin varlığı tümör hücreleri arasındaki ROS1 protein ekspresyonu dinamiği farklılığı ile de açıklanabilir. ROS1 mutasyonu pozitif akciğer kanserlerinde ve bu mutasyonu taşıyan hücre serilerinde ROS1 ekspresyon seviyelerinin hücreden hücreye değişebildiği gösterilmiştir(117).Gerek ROS1 mutasyonu pozitif akciğer kanserlerinde gereksebu mutasyonu taşıyan hücre serilerindeROS1 gen yeniden düzenlenmesinin homojen varlığına rağmen İHK sonuçlarında ve boyanma paternlerinde farklılıkların olması İHKya dayalı algoritmalara şüphe ile yaklaşılmasına da neden olmaktadır.

ROS1 yeniden düzenlenmesi olan bazı hastalarda zayıf ROS1 immünreaktivitesi veya tamamen negatifliği de gösterilmiştir. Ancak orta veya güçlü yoğunlukta diffüz pozitif ROS1 İHK boyanması ROS1 yeniden düzenlenmesiyle daha sıkı ilişki içindedir (121,125-126).Ayrıca, literatürde güçlü pozitif ROS1 immünreaksiyonuna sahip hastaların bazen ROS1 FISH testi sonucunun negatif olmasına da rastlanabilmektedir(113,120-121,126-127).

Bir çalışmaya göre İHKsal+2 ve +3boyananlaryöntemle pozitif olarak kabul edilirse, ROS1 İHK'nın duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %97.78'dir(114). Sholl ve arkadaşları 53 akciğer adenokarsinomu olgusunda ROS1 break-apart FISHprobu ile elde ettikleri sonuçları ROS1 İHK(D4D6) sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Buna göre ROS1 FISH sonuçları kesin mutasyon

sonucu olarak kabul edildiğinde ROS1 İHK'nin % 100 duyarlı olduğunu ve % 92 spesifik olduğunu tespit etmişlerdir(120). Rogers ve arkadaşları ise 304 akciğer kanserini hastasında yaptıkları çalışmada ROS1FİSHve İHK(D4D6antikoru) sonucunu karşılaştırmışlar ve İHK'nin duyarlılığını% 33,3, özgüllüğünü% 99,7 olarak bulmuşlardır (125).

Hem retrospektif hem de prospektif kohort analiz eden bir çalışmadaROS1 IHC'nin retrospektif kohorttaki duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 76; Pozitif prediktif değer % 1 ve negatif prediktif değer % 100 idi. Sadece 3+ İHK boyaması pozitif olarak sınıflandırılırsa, retrospektif kohorttaki ROS1 IHC'nin duyarlılığı ve özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer de% 100 idi. Prospektif kohorttaki 104 vaka -ki onlar EGFR ve ALK negatif hastalar- alındığında, ROS1 yeniden düzenlenmesinin oranı (% 12) daha yüksekti (128).

Pozitiflik eşiğine bağlı olarak, çoğu çalışmada % 100 duyarlılıkla ve % 92 ile % 100 arasında değişen bir özgüllükte olan İHK, ROS1 pozitif KHDAK'ı tespit etmek için etkili bir tarama testi olarak karşımıza çıkmaktadır(113-114,116,120-121,123,125). Ancak bizim çalışmamızda ve Rogers ve ark.'nın yaptığı çalışmada ROS1 İHK'nin duyarlılığı zayıf bulunmuştur(125). Bu durum İHK'nin semikantitatif değerlendirme prensibi ile ilişkili olabilir. Bir araştırmacı grubunun +1 pozitiflik kabul ettiği boyanma derecesini başka bir araştırma grubu negatif veya +2 pozitiflik olarak kabul edebilir. Ancak literatürdeki sonuçlar ve bizim çalışmamızın verileri birlikte değerlendirildiğinde ROS1 yeniden düzenlenmesinin varlığını araştırmak için ROS1 İHK'siyüksek negatif prediktif değere sahiptir. Bu nedenle kısmen spesifik bir yöntem olarak önerilebilir. Tanı algoritması bağlamında bakıldığında literatürdeki yayınlarda da İHK taraması ve ardından FİSH onayı önerilmektedir (128). Yine aynı yayında FİSH testinde yalnızca diffüz ve güçlü yoğunlukta İHK boyanması yani tümör hücrelerinde en az % 90'ında +3 boyanma ve dolayısıyla H skoru ≥ 270 olursa bu hastalarda kesin ROS1 mutasyonu vardır şeklinde yorumlanabileceğine vurgu yapılmıştır. Ancak yoğunluğun değerlendirilmesi, pozitif hücrelerin tümör geneline oranı yine subjektif olup tartışmaya açık bir konudur (128). Nitekim literatürdeki diğer çalışmalarda, FİSH testi ile ROS1 mutasyonu gösterilen olguların bir kısmının böyle bir yaklaşımla atlanabileceği gösterilmiştir (121,125).

Literatürde yer alan çalışmalarda tersi durumlarla da karşılaşmıştır. Yani İHKsalolarak ROS1 ekspresyonunun olduğu hastalarda ROS1 FİSH ile pozitiflik izlenmemiştir. Bu durum ALK ve HER2 yeniden düzenlenmelerinin olduğu vakalarda görülmüş olup İHKsal ROS1 antikorunun özgüllü ile ilişkilendirilmiştir. D4D6 ROS1 antikor klonunun hücre içi sinyal yollarındaki birden çok epitopu tanıdığı düşünmektedir. Bu nedenle ROS1 mutasyonu olmayan ancak İHKsal olarak pozitifliğin saptandığı hastalarda ALK, HER2 mutasyonları açısından da araştırılması önerilmektedir (113). Başka bir çalışmada FIG-ROS1 füzyonu gibi FİSH testi ile gösterilemeyen intrakromozomal gen yeniden düzenlenmesi sonucu ortaya çıkmayan füzyon proteininin bu vakaların bir kısmından sorumlu olabileceği belirtilmiştir (128). Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve sekanslama gibi alternatif yöntemlerle benzer vakalarda ROS1 gen yeniden düzenlenmelerini ortaya konulmuştur (125,129-131). RT-PCR testi, füzyon varyantlarının ayırımını yapmak için çoklu spesifik primer setlere ihtiyaç duyar (163). RT-PCR, % 100 duyarlılık ve % 85-100 özgüllük ile pozitif vakaları tanımlamaktadır (145, 158). Buna ek olarak, ROS1 füzyon ortaklarının listesi oldukça büyük ve halen büyümekte olduğundan, RT-PCR nadir görülen varyantları kaçırabilir. Bu nedenlerle tekniğin klinik uygulamada kullanımı sınırlı kalmıştır. Yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojisinin geliştirilmesiyle birlikte FİSH, RT-PCR ve İHK'ye ek olarak, akciğer kanseri ile ilişkili genlerdeki birden fazla değişikliği aynı anda saptamak mümkün olmuştur (132-134). Bu teknolojiyi kullanan ticari platformlar şu anda ROS1 de dahil olmak üzere bir dizi füzyon genini kapsayan test kitleri ile birlikte mevcuttur.

Moleküler onkogen aktivasyonuna yol açan DNA değişiklikleri arasında epigenetik mekanizmalar da yer almaktadır. Lee ve arkadaşları, ROS1 genini etkileyen bir hipometilasyonun, ROS1'i aktive edebildiğini göstermişlerdir. Bu durumun kliniğe yansması ROS1 ekspresyon artışı şeklinde olmaktadır. Yine ROS1 kopya sayısı kazanımı gen dozajını artırarak, ROS1 ekspresyon artışına neden olabilmektedir. Lee ve arkadaşları bir hastanın primer tümörünün ve bu tümörün metastazının ROS1 gen durumunu değerlendirmişler ve ROS1 kopya sayısı kazanımı ile ROS1 ekspresyonu arasında güçlü bir ilişki olduğunu

göstermişlerdir(135).Bunun nedenle FISH testinde pozitiflik saptanmayan ancak İHKsal olarak pozitif olan olgular, yani aberanROS1 protein ekspresyonunun saptandığı olgular,ROS1 geni yeniden düzenlenmesi olmamasına karşın epigenetik mekanizmalar ve gen dozajı artışına neden olan mekanizmalar ile açıklanabilir (114). Buna karşın Jin ve ark.'nın yaptığı çalışmada KHDAK'da ROS1 kopya sayısı kazanımı ile protein aşırı ifadesi (overekspresyonu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını göstermişlerdir(136). Dolayısıyla FISH testinde pozitiflik saptanmayan ancak İHKsal olarak pozitif olan az sayıda hasta için hala tatmin edici bir açıklama yapılamamaktadır. Bu hasta gruplarında hücre içi sinyallerin ve gen ekspresyonunu değiştiren çok sayıda mekanizmanın aydınlatılması araştırılmaya açık güncel bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

ROS1 pozitif AAK tedavisinde krizotinib kullanımı ile birlikte, ROS1 testinin refleks test olarak yapılması önerisi artacaktır (15) Doku ve zamandan tasarruf etmek için, dokudan ilk kesitler alınırken bu testler içinde fazladan kesit alınması faydalı olacaktır(137). Şu an ROS1 FISH testi sigara kullanmamış, EGFR mutasyonu ve ALK yeniden düzenlenmesi negatif, ileri evre (Evre 3B ve 4) KHDAK hastalarında tüm histolojik alt tiplere, sigara kullanmış olan KHD ve skuamoz hücreli dışı karsinomalt tiplerine önerilmektedir (138).

ROS1 füzyon geni bulunan KHDAK hastalarının ALK yeniden düzenlenmesi bulunan KHDAK hastalarla birçok klinik patolojik özelliği paylaşması dikkat çekicidir (100,139). ALK ve ROS1'in kinaz alanları % 77 sekans homolojisine sahiptir (140-141).Bu nedenle ROS1 sinyalizasyonu, ALK inhibitörü olan Krizotinib tarafından ROS1 füzyon proteinlerini eksprese eden hücre hatlarında büyük ölçüde engellenmektedir (79,142). Ön çalışmalar, krizotinib ile tedavi edilen ROS1 yeniden düzenlenmiş hastaların ALK ile yeniden düzenlenmiş hastalarla karşılaştırıldığında daha uzun bir medyan yanıt süresine sahip olabileceklerini öne sürmektedir (15).ROS1 mutasyonuna sahip KHDAK hastalarında yapılan iki bağımsız çalışmada, krizotinibin umut verici antitümör aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Yanıt oranları sırasıyla % 72, % 80 ve medyan progresyonsuz sağkalımları (PFS) 9 ila 19 ay olarak raporlanmıştır (15,141).

ROS1 füzyon partneri ve krizotinib tedavisi süresi arasında herhangi bir ilişki gösterilmemiştir(143). Awad ve ark.'nın çalışmasında(144), CD74-ROS1 füzyonu olan bir hastanın, ROS1-kinaz alanındaki G2032R mutasyonundan dolayı krizotinibe karşı direnç kazanmış olduğunu bildirmiştir. Bu gibi hastalarda kullanılmak üzere in vitro ve in vivo güçlü bir ROS1 inhibitörü ve MEF / VEGFR2 için etkili multikinaz bir inhibitör olan Foretinib (GSK1363089) önerilmektedir (145). Diğer üzerinde çalışılmaya devam edilen ajanlarda bulunmaktadır .

Bir oral ALK / EGFR inhibitörü olan AP26113, in vitro olarak ROS1 füzyon aktivitesini inhibe edebilir ve bu araştırma için devam eden Faz I / II (NCT01449461)çalışmasına ROS1 pozitif KHDAK hastalartoplanmaktadır(146). Bir ALK / ROS1 inhibitörü olan PF-06463922'nin ise fare modellerinde krizotinibe dirençli tümörlerde etkinlik gösterdiği bulunmuştur (Faz I / II çalışması(NCT01970865)). HSP90 inhibitörü AT13387'yi krizotinib ile kombine eden bir Faz I / II çalışması (NCT01712217) özellikle crizotinib sırasında progrese olan ALK-pozitif ve ROS1-pozitif KHDAK hastalarını çalışmaya dahil etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer adenokarsinomu mortalitesi yüksek olan bir kanserdir. Çağımızın tütün epidemisi ve son gelişmelerden dolayı patoloğun tanı koymanın yanında tanı koyarken gerekli ileri tetkikleri yaparken moleküler test için gerekli yeterli tümör hücre sayısını gözetmesi ve bu testlere kaliteli örnek sağlaması önemlidir. Dolayısıyla biyopsi materyallerinde gereksiz İHK tetkiklerinden kaçınılmalı, hastanın evresine bağlı olarak doku örneği reflex test olarak direk moleküler teste gönderilmelidir (4)

Kanserden ölümlerin başında gelen akciğer kanseriyle savaşta spesifik hedefler ve bu hedeflere yönelik tedavi yöntemleri bulmamız önem taşımaktadır. Bu bağlamda "next generation sekanslama" adı verilen teknoloji yüksek verimli moleküler analiz imkanı sağlar. Ancak yaygınlaşması, alt yapının sağlanması için zamana ve yüksek maliyeti nedeniyle de finansa ihtiyaç vardır. Bu süreçte AAK hastaları için tedavi hedeflerinin daha kolay ve ucuz belirleyebilecek olan alternatif tekniklere, bu tekniklerin güvenilirliğinin kanıtlanmasına, tetkiklerin standart protokollere bağlanmasına, kapsamlı ve ekonomik değerlendirme sistemleri oluşturulmasına ihtiyaç vardır.

Potansiyel olarak hedeflenebilir ROS1 gen yeniden düzenlenmesi, akciğer adenokarsinomlarının çok küçük bir yüzdesinde gerçekleşir ve EGFR mutasyonları ve ALK gen yeniden düzenlemeleri ile karşılıklı olarak birbirini dışlar. İHK ile tarama literatürde mevcut yayınlara göre hassas olmakla beraber, spesifik değildir ve FISH ile ROS1 gen anormalliklerinin analiz edilmesi gereken hasta sayısını azaltmak için uygun bir yöntem olabilir (128). ROS1 mutasyon pozitiflik potansiyeli olan hastaların seçiminde EGFR-pozitif ve ALK-pozitif vakaların hariç tutulması ve ROS1 İHK pozitif hastaların seçilmesi, ROS1 yeniden düzenlenmiş akciğer kanseri tespit etme ihtimalini arttıracak ve uygulanması pahalı ve zaman alıcı FISH testinin her vakada uygulanması gerekliliğini önleyebilecektir (128).

FISH öncesi tarama testi olarak İHK'nın kullanımı konusunda her ne kadar çalışmaların çoğu İHK'nın oldukça hassas ve özgül olduğunu göstermiş olsa da her laboratuvarın kendini test etmesi ve önerilen algoritmayı karşılayacak

prosedürü uygulaması gereklidir. Nitekim bizim çalışmamızda ROS1 İHK literatürden farklı olarak beklenen duyarlılık ve özgüllükte değildir.

Çalışmamız kapsamında belirlenen bütçenin doğrultusunda maksimum hasta sayısını çalışabilmek adına ve akciğer tümörlerinin büyük çoğunluğunun ileri evrelerde tespit edilmesi, bu hastaların rezeksiyona gidememesi, daha küçük biopsi doku örneklerinden tanı almaları nedeniyle mevcut rezeksiyon materyallerine ait bloklardan makrodiseksiyon yöntemi ile yeni bloklar hazırlanmıştır (Bkz. Şekil 3.1). Ancak tümör heterojenitesi düşünüldüğünde makrodiseksiyon ile çıkartılan tümör alanları dışındaki tümör hücrelerindeki pozitiflik gözden kaçırılacaktır. Benzer durumla küçük doku örnekleri, sitoloji materyallerinden hazırlanan hücre blokları gibi rutinde de karşılaşıldığından yeniden makrodiseksiyonla oluşturulan bloklar kabul edilebilir risk sınırları içindedir.

ROS1 nadir görülen ancak hedeflenebilir tedavisi olan bir mutasyondur. EGFR ve ALK mutasyonu olmayan AAK'larda varlığının araştırılması önemlidir. Bu çalışmada altın standart FISH'dir. Öncesinde tarama testi olarak standartları belirlenmiş, güvenilirliği laboratuvara özgü şartlar altında test edilmiş İHK kullanılması daha ekonomik ve pratik olacaktır.

7. ÖZET

Akciğer adenokarsinomu tanısı alan hastaların yaklaşık %2'si ROS1 gen yeniden düzenlenmesine sahip olup hedefe yönelik tedaviye adaydır. Amacımız kendi toplumumuzda ROS1 mutasyonu olan tümör alt grubunu belirlemek, bu hasta grubunun özelliklerini tespit etmek yanısıra ROS1 gen yeniden düzenlenmesi varlığını değerlendirmede immunohistokimya (İHK) ve Floresans insitu hibridizasyon (FISH) teknikleri arasındaki uyum oranını araştırmak ve rutin değerlendirmede kullanılacak algoritmaları belirleyerek literatüre katkı sağlamaktır.

Çalışmamıza 260 akciğer adenokarsinomu hastası alınmıştır. Hastaların demografik bilgileri, tanı anındaki tümör evreleri, son görülme tarihleri, ölmüşse ölüm tarihi gibi bilgileri, Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) mutasyon durumları dosyalarından kaydedilmiştir. Yeterli tümör hücresi olan 226 hasta değerlendirmeye alınmış ve bütün hastalara FISH ROS1 ve İHKsal ROS1 uygulanmıştır. Bu testlerin öncesinde bazı tümör dokuları makrodiseksiyon yapılarak yeniden bloklanmıştır.

Hastaların %81,5'i erkek, %18,5'i kadındır. Hastaların yaş aralığı 29-89 olup ortalama yaş 61,4'tür. En sık izlenen alt tipler asiner (%39,8) ve solid (%34,9) paternlerdir. Vakaların %57,4'ü tanı anında evre IV'tür. Genel olarak hastaların medyan sağ kalım süresi 22,8 aydır. EGFR mutasyon oranı %12,3, ALK mutasyon oranı %3,81'dir. ROS1 gen yeniden düzenlenmesi FISH ile pozitif tek hasta lenf düğümü metastazından tespit edilmiş olup erkek ve 62 yaşındadır. Hastanın 40 paket yıl sigara kullanma öyküsü mevcuttur. Solid patern izlenmiştir. Hastanın genel sağ kalımı 3,5 aydır. Ayrıca iki hastada ROS1 İHK ile (+1) boyanma izlenmiştir. İHKsal ROS1'in tanı koyma gücü zayıf bulunmuş ancak ROS1 gen yeniden düzenlenmesi negatif olan hastaları bulma gücü %99'dur.

ROS1'in EGFR ve ALK mutasyonu olmayan akciğer adenokarsinomlu hastalarda varlığının araştırılması önemlidir. Tarama testi olarak standartları belirlenmiş, güvenilirliği laboratuvara özgü şartlar altında test edilmiş İHK kullanılması daha ekonomik ve pratik olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Akciğer adenokarsinomu, ROS1 mutasyonu, hedefe yönelik tedavi, floresan insitu hibridizasyon, immünohistokimya

8. ABSTRACT

Approximately 2% of the lung adenocarcinoma patients have ROS1 gene rearrangement and they are candidates of targeted therapy. Our aim is to determine the tumor subgroup having ROS1 gene rearrangement in our population and their characteristics, to investigate the correlation between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques for ROS1 gene rearrangement and to contribute to the literature by determining the algorithms that can be used for routine evaluation.

The account of patients with lung adenocarcinoma included to our study was 260. Demographic findings, tumor stages at the time of diagnosis, last seen date, date of death, Epidermal growth factor receptor (EGFR) and Anaplastic lymphoma kinase (ALK) mutations were recorded from patient charts. Totally, 226 patients with adequate tumor cells were evaluated for FISH ROS1 and IHC ROS1. Before these tests, some tumor tissue samples were reprocessed by macrodissection.

Male patients account for 81.5% and females were 18.5%. The age range of the patients was 29-89 and the mean age was 61.4. The most common seen subtypes were aciner pattern (39.8%) and solid pattern (34.9%). At the time of diagnosis, 57.4% of the cases were stage IV. Median survival time of the patients was 22.8 months. The EGFR mutation rate was 12.3% and the ALK mutation rate was 3.81%. ROS1 gene rearrangement was detected at a 62 year-old male patient from the metastatic lymph node biopsy. He had 40 pack-year smoking history. A solid pattern was seen. The patient's overall survival was 3.5 months. Additionally in two patients, (+1) staining was observed with ROS1 IHC. The diagnostic power of ROS1 was found weak. However, patients without ROS1 rearrangement was determined reliably in 99% by ROS1 IHC.

It is important to investigate the presence of ROS1 in lung adenocarcinoma patients without EGFR and ALK mutations. It would be more economical and practical to use IHC which has been tested for reliability under laboratory-specific conditions and established as a screening test.

Key Words: lung adenocarcinoma, ROS1 mutation, targeted therapy, fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry

9. KAYNAKLAR

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on: 27/01/2017.
- 2 Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(21):3543-51.
- 3 Rossi G, Graziano P, Leone A, Migaldi M, Califano R. The role of molecular analyses in the diagnosis and treatment of non-small-cell lung carcinomas. *Semin Diagn Pathol* 2013;30(4):298-312.
- 4 Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, editors. WHO Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th Edition. Lyon: IARC; 2015.p.10-50.
- 5 Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* 2012;150(6):1107-20.
- 6 Oxnard GR, Binder A, Janne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(8):1097-104.
- 7 Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371(23):2167-77.
- 8 Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543-50.

- 9 Korpany GJ, Graham DM, Vincent MD, Leighl NB. Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. *Front Oncol* 2014;4:204.
- 10 Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9270-4.
- 11 Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131(6):1190-203.
- 12 Gu TL, Deng X, Huang F, Tucker M, Crosby K, Rimkunas V, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One* 2011;6(1):e15640.
- 13 Birch AH, Arcand SL, Oros KK, Rahimi K, Watters AK, Provencher D, et al. Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low malignant potential and low grade ovarian serous tumours. *PLoS One* 2011;6(12):e28250.
- 14 Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol* 2013;37(4):554-62.
- 15 Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371(21):1963-71.
- 16 Zhu Q, Zhan P, Zhang X, Lv T, Song Y. Clinicopathologic characteristics of patients with ROS1 fusion gene in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res* 2015;4(3):300-9.
- 17 <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1793-2013-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html>. T.C. Saglik Bakanligi Turkiye Halk Sagligi Kurumu Kanser Daire Baskanligi. Cancer statistics. 27/01/2017.
- 18 <http://www.who.int/research-observatory/en/>. Global Health Observatory; Access Date: 27/01/2017.

- 19 <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21526>. Türkiye İstatistik Kurumu; Access Date: 27/01/2017.
- 20 <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=95&locale=tr>. Merkezi Dağıtım Sistemi, Türkiye İstatistik Kurumu; Access Date: 27/01/2017.
- 21 Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, et al., editors. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. XLYon: International Agency for Research on Cancer; 2014.p.638-45.
- 22 Thun M, Peto R, Boreham J, Lopez AD. Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. *Tob Control* 2012;21(2):96-101.
- 23 <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/> [ONLINE]. Institute for Health Metrics and Evaluation; Access Date: 27/01/2017.
- 24 Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. International variation in lung cancer mortality rates and trends among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(6):1025-36.
- 25 Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 2005;117(2):294-9.
- 26 Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res* 2012;18(22):6169-77.
- 27 Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543-50.
- 28 Nakamura S, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ishiguro F, et al. Prognostic impact of tumor size eliminating the ground glass opacity component: modified clinical T descriptors of the tumor, node, metastasis classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2013;8(12):1551-7.
- 29 Church TR, Black WC, Aberle DR, Berg CD, Clingan KL, Duan F, et al. Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368(21):1980-91.

- 30 Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology* 2010;17(6):1471-74.
- 31 Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumors*. Hoboken: NJ: Wiley-Blackwell, 2009.
- 32 Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(11):2184-91.
- 33 Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005;23(25):5900-9.
- 34 Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol* 2005;23(31):8081-92.
- 35 Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363(18):1693-703.
- 36 Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448(7153):561-6.
- 37 Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8(5):381-5.

- 38 Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* 2011;24(5):653-64.
- 39 Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol* 2012;30(13):1438-46.
- 40 Tsuta K, Kawago M, Inoue E, Yoshida A, Takahashi F, Sakurai H, et al. The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cancer* 2013;81(3):371-6.
- 41 Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3(8):448-57.
- 42 McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, Salameire D, Lefebvre C, Ceccaldi F, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* 2012;7(2):348-54.
- 43 Motoi N, Szoke J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW, et al. Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 2008;32(6):810-27.
- 44 Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29(5):633-9.
- 45 Yoshida A, Tsuta K, Watanabe S, Sekine I, Fukayama M, Tsuda H, et al. Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung

- adenocarcinoma with signet-ring cell component. *Lung Cancer* 2011;72(3):309-15.
- 46 Shaw AT, Hsu PP, Awad MM, Engelman JA. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. *Nat Rev Cancer* 2013;13(11):772-87.
- 47 Shames DS, Wistuba, II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol* 2014;232(2):121-33.
- 48 Li T, Kung HJ, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J Clin Oncol* 2013;31(8):1039-49.
- 49 Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(15):4273-81.
- 50 Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362(25):2380-8.
- 51 Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11(2):121-8.
- 52 Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361(10):947-57.
- 53 Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(3):239-46.

- 54 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;350(21):2129-39.
- 55 Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304(5676):1497-500.
- 56 Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(36):13306-11.
- 57 Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba, II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(5):339-46.
- 58 Shaw AT, Solomon B, Kenudson MM. Crizotinib and testing for ALK. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9(12):1335-41.
- 59 Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011;12(11):1004-12.
- 60 Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee S, Bleazard T, Won JK, et al. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res* 2012;22(3):436-45.
- 61 Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012;18(3):375-7.
- 62 Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 2012;18(3):382-4.

- 63 Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012;18(3):378-81.
- 64 Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 2013;3(6):630-5.
- 65 Greulich H, Kaplan B, Mertins P, Chen TH, Tanaka KE, Yun CH, et al. Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(36):14476-81.
- 66 Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.
- 67 Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62(23):6997-7000.
- 68 Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002;62(23):7001-3.
- 69 Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011;29(15):2046-51.
- 70 Shibuya M, Hanafusa H, Balduzzi PC. Cellular sequences related to three new oncogenes of avian sarcoma virus (fps, yes, and ros) and their expression in normal and transformed cells. *J Virol* 1982;42(1):143-52.
- 71 Wang LH, Hanafusa H, Notter MF, Balduzzi PC. Genetic structure and transforming sequence of avian sarcoma virus UR2. *J Virol* 1982;41(3):833-41.
- 72 Balduzzi PC, Notter MF, Morgan HR, Shibuya M. Some biological properties of two new avian sarcoma viruses. *J Virol* 1981;40(1):268-75.
- 73 Chin LP, Soo RA, Soong R, Ou SH. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly

- defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7(11):1625-30.
- 74 Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(15):4040-5.
- 75 Liu P, Wu Y, Sun L, Zuo Q, Shi M. ROS kinase fusions are not common in Chinese patients with cholangiocarcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2013;33(4):474-8.
- 76 Peraldo Neia C, Cavalloni G, Balsamo A, Venesio T, Napoli F, Sassi F, et al. Screening for the FIG-ROS1 fusion in biliary tract carcinomas by nested PCR. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53(12):1033-40.
- 77 Lee J, Lee SE, Kang SY, Do IG, Lee S, Ha SY, et al. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. *Cancer* 2013;119(9):1627-35.
- 78 Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, Le AT, Haney J, Schulte N, et al. ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res* 2014;12(1):111-8.
- 79 Bergethon K, Shaw AT, Ignatius Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012.
- 80 Cha MJ, Lee HY, Lee KS, Jeong JY, Han J, Shim YM, et al. Micropapillary and solid subtypes of invasive lung adenocarcinoma: clinical predictors of histopathology and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;147(3):921-28 e2.
- 81 Kadota K, Villena-Vargas J, Yoshizawa A, Motoi N, Sima CS, Riely GJ, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol* 2014;38(4):448-60.
- 82 Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the

- Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol* 2011;6(9):1496-504.
- 83 Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, et al. Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol* 2013;8(1):52-61.
- 84 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
- 85 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
- 86 Djordjevic MV, Hoffmann D, Hoffmann I. Nicotine regulates smoking patterns. *Preventive medicine* 1997;26(4):435-40.
- 87 Hoffmann D, Djordjevic MV, Hoffmann I. The changing cigarette. *Preventive medicine* 1997;26(4):427-34.
- 88 Makinen JM, Laitakari K, Johnson S, Makitaro R, Bloigu R, Lappi-Blanco E, et al. Nonpredominant lepidic pattern correlates with better outcome in invasive lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2015;90(3):568-74.
- 89 Mazières J, Rouquette I, Lepage B, Milia J, Brouchet L, Guibert N, et al. Specificities of lung adenocarcinoma in women who have never smoked. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8(7):923-29.
- 90 Uzun C. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlu olgularda tümör doku örneklerinde EGFR, KRAS ve BRAF gen mutasyonlarının biofilm çipe dayalı mikroarray yöntemi ile belirlenmesi. Uzmanlık tezi, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Antalya, 2013
- 91 Miller VA, Hirsch FR, Johnson DH. Systemic therapy of advanced bronchioloalveolar cell carcinoma: challenges and opportunities. *J Clin Oncol* 2005;23(14):3288-93.

- 92 Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346(2):92-8.
- 93 Douillard JY, Shepherd FA, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomized phase III INTEREST trial. *J Clin Oncol* 2010;28(5):744-52.
- 94 Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361(10):958-67.
- 95 Morinaga R, Okamoto I, Fujita Y, Arai T, Sekijima M, Nishio K, et al. Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations with EGFR amplification in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2008;99(12):2455-60.
- 96 Sun Y, Ren Y, Fang Z, Li C, Fang R, Gao B, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol* 2010;28(30):4616-20.
- 97 Zhang X, Zhang S, Yang X, Yang J, Zhou Q, Yin L, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer* 2010;9:188.
- 98 Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 2009;22(4):508-15.
- 99 Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A, Menju T, Nakayama E, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol* 2010;17(3):889-97.
- 100 Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-

- cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009;27(26):4247-53.
- 101 Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013;8(7):823-59.
- 102 Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, Beasley MB, Johnson DH, McShane LM, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol* 2011;29(15):2121-7.
- 103 Mitsudomi T. Erlotinib, gefitinib, or chemotherapy for EGFR mutation-positive lung cancer? *Lancet Oncol* 2011;12(8):710-1.
- 104 Marks JL, Broderick S, Zhou Q, Chitale D, Li AR, Zakowski MF, et al. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2008;3(2):111-6.
- 105 Marquez-Medina D, Popat S. Eventual role of EGFR-tyrosine kinase inhibitors in early-stage non-small-cell lung cancer. *Future Oncology* 2016;12(6):815-25.
- 106 Girard N, Sima CS, Jackman DM, Sequist LV, Chen H, Yang JC, et al. Nomogram to predict the presence of EGFR activating mutation in lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 2012;39(2):366-72.
- 107 Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(9):3143-9.
- 108 Tiseo M, Gelsomino F, Boggiani D, Bortesi B, Bartolotti M, Bozzetti C, et al. EGFR and EML4-ALK gene mutations in NSCLC: a case report of

- erlotinib-resistant patient with both concomitant mutations. *Lung Cancer* 2011;71(2):241-3.
- 109 Kuo YW, Wu SG, Ho CC, Shih JY. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma harboring coexisting EML4-ALK fusion gene and EGFR mutation. *J Thorac Oncol* 2010;5(12):2039-40.
- 110 Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 2010;16(22):5581-90.
- 111 Kim HR, Lim SM, Kim HJ, Hwang SK, Park JK, Shin E, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2013;24(9):2364-70.
- 112 Zhao J, Zheng J, Kong M, Zhou J, Ding W. Advanced lung adenocarcinomas with ROS1-rearrangement frequently show hepatoid cell. *Oncotarget* 2016;7(45):74162-70.
- 113 Mescam-Mancini L, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, Rouquette I, Souquet PJ, Audigier-Valette C, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2014;83(2):168-73.
- 114 Cao B, Wei P, Liu Z, Bi R, Lu Y, Zhang L, et al. Detection of lung adenocarcinoma with ROS1 rearrangement by IHC, FISH, and RT-PCR and analysis of its clinicopathologic features. *Onco Targets Ther* 2016;9:131-8.
- 115 Cai W, Li X, Su C, Fan L, Zheng L, Fei K, et al. ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2013;24(7):1822-7.
- 116 Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, Hu Y, Kelly ME, Gu TL, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res* 2012;18(16):4449-57.

- 117 Bubendorf L, Buttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2016;469(5):489-503.
- 118 Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18(17):4570-9.
- 119 Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Archiv* 2016;469(5):489-503.
- 120 Sholl LM, Sun H, Butaney M, Zhang C, Lee C, Janne PA, et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2013;37(9):1441-9.
- 121 Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, Shibata T, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol* 2014;27(5):711-20.
- 122 Savic S, Bubendorf L. Common Fluorescence In Situ Hybridization Applications in Cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(12):1323-30.
- 123 Boyle TA, Masago K, Ellison KE, Yatabe Y, Hirsch FR. ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015;16(2):106-11.
- 124 Bruce B, Khanna G, Ren L, Landberg G, Jirström K, Powell C, et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clinical & experimental metastasis* 2007;24(2):69-78.
- 125 Shan L, Lian F, Guo L, Qiu T, Ling Y, Ying J, et al. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR. *PLoS One* 2015;10(3):e0120422.
- 126 Warth A, Muley T, Dienemann H, Goeppert B, Stenzinger A, Schnabel PA, et al. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology* 2014;65(2):187-94.

- 127 Cha YJ, Lee JS, Kim HR, Lim SM, Cho BC, Lee CY, et al. Screening of ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry and comparison with ALK rearrangements. *PLoS One* 2014;9(7):e103333.
- 128 Selinger CI, Li BT, Pavlakis N, Links M, Gill AJ, Lee A, et al. Screening for ROS1 gene rearrangements in non-small-cell lung cancers using immunohistochemistry with FISH confirmation is an effective method to identify this rare target. *Histopathology* 2017;70(3):402-11.
- 129 Lee SE, Lee B, Hong M, Song JY, Jung K, Lira ME, et al. Comprehensive analysis of RET and ROS1 rearrangement in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2015;28(4):468-79.
- 130 Lira ME, Choi YL, Lim SM, Deng S, Huang D, Ozeck M, et al. A single-tube multiplexed assay for detecting ALK, ROS1, and RET fusions in lung cancer. *J Mol Diagn* 2014;16(2):229-43.
- 131 Suehara Y, Arcila M, Wang L, Hasanovic A, Ang D, Ito T, et al. Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 fusions in lung adenocarcinomas through a comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions. *Clin Cancer Res* 2012;18(24):6599-608.
- 132 Takeda M, Sakai K, Terashima M, Kaneda H, Hayashi H, Tanaka K, et al. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann Oncol* 2015;26(12):2477-82.
- 133 Drilon A, Wang L, Arcila ME, Balasubramanian S, Greenbowe JR, Ross JS, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res* 2015;21(16):3631-9.
- 134 Scheffler M, Schultheis A, Teixido C, Michels S, Morales-Espinosa D, Viteri S, et al. ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma: prognostic impact, therapeutic options and genetic variability. *Oncotarget* 2015;6(12):10577-85.

- 135 Lee HJ, Seol HS, Kim JY, Chun SM, Suh YA, Park YS, et al. ROS1 receptor tyrosine kinase, a druggable target, is frequently overexpressed in non-small cell lung carcinomas via genetic and epigenetic mechanisms. *Ann Surg Oncol* 2013;20(1):200-8.
- 136 Jin Y, Sun PL, Kim H, Park E, Shim HS, Jheon S, et al. ROS1 gene rearrangement and copy number gain in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch* 2015;466(1):45-52.
- 137 Felip E, Concha Á, De Castro J, Gómez-Román J, Garrido P, Ramírez J, et al. Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clinical and Translational Oncology* 2015;17(2):103-12.
- 138 Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology* 2014;25(9):1681-90.
- 139 Solomon B. Validating ROS1 rearrangements as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(9):972-4.
- 140 Huber KV, Salah E, Radic B, Gridling M, Elkins JM, Stukalov A, et al. Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature* 2014;508(7495):222-7.
- 141 Mazieres J, Zalcman G, Crino L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol* 2015;33(9):992-9.
- 142 McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, Shioda T, Classon M, Maheswaran S, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res* 2008;68(9):3389-95.

- 143 Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2014;371(21):1963-71.
- 144 Awad MM, Engelman JA, Shaw AT. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med* 2013;369(12):1173.
- 145 Davare MA, Saborowski A, Eide CA, Tognon C, Smith RL, Elferich J, et al. Foretinib is a potent inhibitor of oncogenic ROS1 fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(48):19519-24.
- 146 Squillace RM, Anjum R, Miller D, Vodala S, Moran L, Wang F, et al. AP26113 possesses pan-inhibitory activity versus crizotinib-resistant ALK mutants and oncogenic ROS1 fusions: AACR, 2013.