

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri İçin Moleküler Testler Tanı Rehberi 2021



AstraZeneca



Koşulsuz katkılarıyla

Hazırlayanlar

Pulmoner Patoloji ve Moleküler Patoloji Çalışma Grupları Adına;

Dr. Nalan Akyürek, Dr. Deniz Nart, Dr. Büge Öz, Dr. Serpil Dizbay Sak

Katkıları için;

Dr. İrem Hicran Özbudak, Dr. Hilal Özakıncı ve Dr. Ebru Taştekin'e
teşekkür ederiz.

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tanı Rehberi 2021

Giriş ve Kapsam	3
Akciğer Kanserinin Türkiye’de Güncel Verileri.....	3
Akciğer Kanserinde Multidisipliner Yaklaşımın Önemi.....	4
Örneklem Sırasında Yeterli Doku Eldesi ile İlgili Yaklaşımlar	5
Taniya Etki Eden Faktörler	5
Materyalin Kalitesi ve Miktarı.....	5
Doku ve Sitolojik Örneklerin Patoloji Laboratuvarına İletilmesi ve Dikkat Edilmesi	
Gereken Unsurlar	7
KHDAK’de Histopatolojik Değerlendirme	8
Moleküler Testlerin Yapılacağı Örneklerin Seçimi.....	9
Moleküler Testler İçin Materyallerin Başka Laboratuvara Sevk Edilmesi	9
Sitoloji Materyalinde Moleküler Testlerin Uygulanması.....	10
Sitoloji Teknikleri (Yayma Preparat, Sıvı Bazlı Sitoloji, Hücre Bloğu)	10
Sitolojik Materyalde İmmünohistokimya (İSK)	12
Sitolojik Materyalde FISH ve PCR.....	12
Sitolojik Materyaller İçin FISH ve PCR Uygulama Protokolü	13
FISH.....	13
PCR.....	14
Sitolojik Materyalde Moleküler Test Yapılabilmesi İçin Ne Kadar Hücre Olmalı?	14
Hücre Bloğu Oluşturma.....	15
Hücre Bloğu Oluşturma Yöntemleri.....	15
Geleneksel Hücre Bloğu Yapımı (Santrifüj Yöntemi).....	15
Plazma-Trombin Yöntemi (Pıhtı Dokusu Oluşturma)	15
Agar Yöntemi.....	16
Sitosantrifüj Yöntemi	16
Otomatik Hücre Bloğu Yöntemi (Cellient™ Sistem)	16
KHDAK için Güncel Moleküler Testler	17
Kime, Ne zaman, Nasıl?	19
Test Yapılacak Tümör Tipleri	20
Test Yapılması Önerilmeyen Tümör Tipleri.....	20
Refleks Test	20
İsmlama Test	20
Kullanılacak Moleküler Yöntemin Seçimi	21
Total Sonuçlanma ve Raporlama Süresi	21
EGFR Mutasyon Analizleri	22
EGFR TKİ Direnç Mekanizmaları	23

EGFR Mutasyonu Test Yöntemleri	24
ALK Testi	24
ALK Testinin Yapıldığı Yöntemler	24
İmmünohistokimyasal ALK Testi	24
Skorlama Sistemleri.....	25
ALK Rearanjmanını Saptamada Kullanılan Test Metodları İle İlişkili Dikkat Edilmesi	
Gereken Bazı Noktalar	26
ALK FISH Testi.....	26
ALK Direnci	27
ROS1 Testi	28
ROS1 Testinin Yapıldığı Yöntemler	28
ROS1 İHK	28
ROS1 FISH Testi.....	29
ROS1 Direnci.....	30
ALK ve ROS1 Moleküler Tanısında Diğer Teknikler	31
BRAF Mutasyonu	32
Gelişmekte Olan Yeni Biyobelirteçler	32
MET Amplifikasyonu ve MET Ekzon 14 Atlama Mutasyonu	32
HER2/ERBB2 Mutasyonu	32
RET Füzyonu.....	33
KRAS Mutasyonu	33
NRG1 (Nörogulin 1).....	34
TMB (Tümör Mutasyon Yüğü).....	35
NTRK Füzyonları.....	35
Yeni Nesil Dizileme	37
Likit Biyopsi-ctDNA Analizi	37
Akciğer Kanseri Likit Biyopsi için Önerilen Uygulama Esasları	41
PD-L1 Testi	42
PD-L1 Değerlendirmesinde Patoloğun Bilmesi Gerekenler.....	45
Preanalitik Dönemde Dikkat Edilmesi Gerekenler.....	46
PD-L1 İHK Çalışmasını Değerlendirirken Dikkat Edilmesi Gerekenler.....	47
PD-L1 İHK ile Tümör Hücre Proporsiyon Skorlaması (TPS)	48
PD-L1 Test Sonucunu Rapor Etmek.....	50
KHDAK'da Moleküler Test Patoloji Raporu İçeriği	51
Moleküler Testlerde Raporda Yer Alması Gereken Ortak Parametreler	51
EGFR/BRAF/KRAS Gibi Genlerde Nokta Mutasyonu/Küçük İnseriyon-Delesyonlara	
Yönelik Mutasyon Testi Raporunda Yer Alması Gerekenler	51
ALK ve ROS1 Rearanjmanı Analiz Raporu Raporunda Yer Alması Gerekenler	52
Kaynaklar	53
Kısaltmalar	62

Giriş ve Kapsam

Metastatik KHDAK tedavisi, son yıllarda, tümör hücrelerinin moleküler profili ve histolojisi tarafından yönlendirilen tedavi stratejilerine odaklanılarak büyük ölçüde değişmiştir (1). Akciğer kanser hücreleri nokta mutasyonu, amplifikasyon, insersiyon, delesyon ve translokasyon gibi birçok genetik değişiklikler içerir. Tümör büyümesini teşvik eden bu genlerdeki amplifikasyonlar, nokta mutasyonları ya da yeniden yapısal düzenlenme sonucu oluşan füzyon proteinleri, onkogenik sinyal yollarında kontrolsüz iletme yol açmaktadır (2). Hücrenin yaşaması aberran sinyal aktivasyonunun devam etmesine bağlı olduğunda, onkogen bağımlılığı ortaya çıkmaktadır. Onkogen bağımlılığına yol açan mutasyonlar sürücü (driver) mutasyonlardır. Sürücü mutasyonlara/genetik değişikliklere sahip tümörler, oluşan gen ürünlerini hedefleyen tedavilere karşı oldukça hassastır (2-4).

2021 Akciğer Kanseri Ulusal Test Rehberi'nde uluslararası kılavuzların tavsiyeleri ve mevcut bilimsel veriler ışığında mutabık kalınan moleküler testlerin Türkiye'deki uygulamaları belirtilmektedir. Bu öneriler, test yapılacak uygun hastalara ve örneklerle bu testlerin ne zaman ve nasıl yapılması gerektiğine yöneliktir. KHDAK'da moleküler test algoritmaları, birinci basamakta ve daha sonraki basamaklarda hastalığın progresyonu üzerine geliştirilmiştir.

Akciğer Kanserinin Türkiye'de Güncel Verileri

Akciğer kanseri, dünya çapında en yaygın kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin ilk sıradaki nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2018 yılı kanser istatistiklerine göre 2 milyona yakın kişi (tüm kanserlerin %11,6'sı) akciğer kanseri tanısı almıştır. Erkeklerde %14,5 ile birinci, kadınlarda ise %8,4 ile meme kanseri ve kolorektal kanserden sonra 3. sırada yer almaktadır. Kansere bağlı ölüm nedenleri içinde de tüm dünya nüfusuna bakıldığında ilk sıradadır (1,8 milyon kişi, %18,4). Erkeklerde %22 ile birinci, kadınlarda %12,8 ile meme kanserinden sonra ikinci en sık kansere bağlı ölüm nedenidir (5). Ülkemizde ise DSÖ 2018 raporuna göre yılda 34.703 (%16,5) yeni akciğer kanseri tanısı konmuştur. Görülme sıklığı erkeklerde 29.405 (%24,7) yeni olgu ile 1., kadınlarda ise 5.298 (%5,8) yeni olgu ile 5. sıradadır. Türkiye'de tanı alma medyan yaşı 64 olarak görülmekte, 40 yaşın altındaki bireylerde bu kansere daha nadir rastlanılmaktadır. Ülkemizde akciğer kanserlerinde %80 oranında küçük hücreli dışı kanser histolojisinde bulunmaktadır. Bunların %38'i skuamöz hücreli karsinom, %47'si adenokarsinomdur. Hastalık genellikle ileri evrelerde teşhis konulmakta, ülkemizde görülen vakaların da %15'ini lokalize, %27'sini bölgesel, %58'sini ise uzak yayılım grubu oluşturmaktadır (6).

Akciğer Kanseri Multidisipliner Yaklaşımın Önemi

Klinisyen ve patoloğ arasındaki iyi iletişim ile;

- Moleküler çalışmanın öncelikle yapılması gerektiğinde, patoloğun bilgilendirilmesi,
- Materyalin öncelikli olarak korunması için özel işlemlerin gerektiğine dair bildirimin yapılması,
- Formaline maruz kalma süresinin uzamaması için örneklerin cuma günü veya tatil günlerinden önceki gün alınmamasının sağlanması,
- İşlemi gerçekleştiren doktorun moleküler çalışma için kazanılmış direnç kuşkusunda, özellikle büyüyen lezyonlardan biyopsi alınmasının önemli olduğunu bilmesi,
- İşlem amacının hangi spesifik moleküler veya yardımcı testler için olduğunu bilmesi sağlanır (7).

Akciğer kanseri moleküler tümör kurulu, akciğer kanseri olan bir hasta için en iyi tedaviyi belirlemekten sorumlu multidisipliner bir uzmanlar grubudur. Ancak lokal ileri veya metastatik evrede olan hastaların daha sonra moleküler tümör kurulunda sunulması; histolojik tanı, tümörün moleküler özellikleri ve PD-L1 ekspresyonu gibi verilerin daha iyi analiz edilerek, daha hassas bir tedavi kararının verilmesinde daha etkin olur;

- Yeni tanı alan metastatik hastalar için moleküler tümör kurulunda, moleküler testler için yeterli materyal olup olmadığı ve tüm moleküler ve/veya immünohistokimyasal (IHK) testlerin yapılıp yapılmayacağı belirlenir.
- Bilinen bir moleküler belirteci olan progresif hastalarda likit biyopsi ve/veya yeni biyopsi sonuçları analiz edilebilir.
- İmmünoterapiden sonra olası hastalık progresyonu, psödoprogresyon veya hiperprogresyon olan hastalar tartışılabilir.
- Moleküler sonuçları dışarıdan alınan hastaların sonuçları değerlendirilebilir. Saptanan mutasyon veya translokasyonu yeniden doğrulamak için kurulda sunulabilir veya kurula danışılabilir.
- Kesin evreleme gerektiren multipl adenokarsinomu olan hastalarda cerrahi materyallerde multipl senkron tümörlerin moleküler ayrıntılarını bilmek için sunulabilir.
- Hastalığın ilerlemesi nedeniyle, hasta bir klinik araştırmaya girebilir veya farklı bir tedavi seçeneğine sahip olabilir. Bu nedenle hastaya ait önceki materyallerin yeni teşhis çalışmaları/teknikleri için kullanmak gerekebilir (8).

Örneklem Sırasında Yeterli Doku Eldesi ile İlgili Yaklaşımlar

Tanıya Etki Eden Faktörler

Dokunun moleküler testler için korunması ana hedeftir. Tedavi seçiminde immünohistokimyasal çalışmalar moleküler testlerden daha az öneme sahiptir. Sınırlı tanısal İHK paneli uygulanmalı ve moleküler testler için materyalin yeterliliği sağlanmalıdır (9).

- Moleküler ve immünohistokimyasal testleri yaparken tümör yüzdesi, tümör hücre miktarı ve ayrıca preanalitik değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır (10).
Elde edilen örneklerin çoğu küçük biyopsi ve/veya sitolojik örnekler (örneğin hücre blokları, yaymalar ve sıvı bazlı sitoloji) olup, İHK ve moleküler çalışmalar için uygundur. Bu materyallerin kullanımı her laboratuvarın deneyimine, kapasitesine ve hastanın diğer örneklerindeki hücresellliğe bağlı olacaktır (11). Selüler bir ince iğne aspirasyonu, nekrotik bir rezeksiyondan daha iyidir.
- Hastaya ait birden fazla örneklem varsa en güncel ve yeterli olan tercih edilmelidir (DNA ve RNA daha iyi korunmuş olacaktır).
- Tümör hücrelerinin en çok olduğu blok seçilmeli ve alan işaretlenip sadece o alan çalışmalıdır.
- İnflamasyon ve nekrotik alanları bulunmayan yada mümkün olduğunca az bulunan bloklar seçilmelidir.

Materyalin Kalitesi ve Miktarı

Biyobelirteçler için yeterli ve optimum kalitede numune elde etmek için ilgili profesyonellerin yeterli bilgiye sahip olması ve sorumluluk alması önemlidir

- En az 5 endobronşiyal/transbronşiyal forseps biyopsi ve maksimum tümör volümü için 5 forseps biyopsi veya 2 kriyo biyopsi daha alınmalıdır.
- En az 4 EBUS/EUS aspirasyonu yapılarak mümkün olan her lezyona girilmelidir.
- En az 2 perkütan kor biyopsi (18- 20 G iğne ile) ve maksimum tümör volümü için 3-6 kor biyopsi daha alınmalıdır.
- Maksimum şekilde örneklerin kullanılması için uygulanacak stratejiler:

1. Teknik olarak her bir kor biyopsi, ayrı ayrı gömülür (blok başına 1 kor). Eğer kor biyopsisi uzunsa (Örn., 2 cm), 2 blok içine yerleştirilmek üzere ikiye bölünebilir. Forseps biyopsi işlemlerinden elde edilen daha küçük doku parçaları boyutuna bağlı olarak blok başına 1-3 parça ile gömülür.
2. Doku parçalarının tek tek bloklara ayrılması ve sığ yüzeyli olması çok sayıda avantaj sağlar. Her bir doku parçasının ayrı olarak incelenmesini ve belirli moleküler ya da yardımcı testler için dokunun en iyi şekilde kullanımını sağlar.

3. Parafin bloktaki dokunun büyüklüğüne dikkat ederek ilk tanı için minimal invaziv kesit alınmalı ve birden fazla (yaklaşık 10-15) boyasız kesit alınarak inceleme yapılması önerilmektedir. Ancak testlerin refleks test olmadığı ve moleküler testlerin eş zamanlı yapılmasının mümkün olmadığı geri ödeme sistemlerinde buna her zaman gerek olmayabilir.
 - Bu kesitlerin diğer testler istenene kadar saklanması sağlanmalıdır.
 - Çok ince kesitler (yaklaşık 3 µm) rutin boyama ve İHK için uygundur.
 - Tanısal İHK ile ALK ve ROS1 testi (IHK/FISH) için en az 4-6 adet 4 µm kesit alınmalıdır.
 - EGFR mutasyon testi için en az 2-3 adet 10 µm kesit alınmalıdır.
4. Blokların yeniden kesme sıklığı en aza indirilmelidir. İdeal olarak, tüm ek testler için kesitler aynı oturumda alınmalıdır (7).
5. EBUS/EUS veya İİAB işlemi sırasında hasta başı hızlı sitolojik değerlendirme yapılabilir. Bu işlem sırasında tanı ve moleküler testler için materyalin yeterli olup olmadığı değerlendirilir.

Materyal yeterli değilse işlem tekrarlanabilir. Moleküler testler için, İİA materyali ve iğnenin formalinde durulanması suretiyle elde edilen hücre bloğu, havada kurutulmuş veya alkolle sabitlenmiş yaymalar kullanılmaktadır.
6. Özellikle lezyondan yapılan biyopsinin tümör hücrelerinden oluşmayabileceği ve örneklerdeki lezyon alanına bağlı olarak değişkenlik gösterebilen yaygın inflamatuvar, reaktif ve stromal komponentler içerebileceği de dikkate alınmalıdır. Doku biyopsilerinin yeterli hücre içermediği veya aselüler olduğu durumlarda yayma preparatlardan yapılan moleküler testler ek başarılar sağlamaktadır (13).

Doku ve Sitolojik Örneklerin Patoloji Laboratuvarına İletilmesi ve Dikkat Edilmesi Gereken Unsurlar

Akciğer kanserinde moleküler testler için tüm doku (bronş biyopsisi, forseps, kriyo, endobronşiyal, transbronşiyal ve transtorasik biyopsi, rezeksiyon örnekleri, lenf nodu, plevra, metastatik lezyon) ve sitolojik örnekler (aspirasyonlar, hücre blokları, direk yaymalar, fırçalama biyopsileri, dokundurma preparatlar) uygundur.

- Biyopsi ve sitoloji örnekleri 30 dakikadan daha kısa bir zamanda uygun fiksatife konulmalı ve fiksatife konulduğu süre istem kağıdında ve raporda belirtilmelidir. Yapılacak analizler üzerinde etkisi bulunabileceğinden iskemi zamanını kaydetmek değerli olabilir.
- Doku örnekleri için uygun fiksatif %10 nötral tamponlu formalindir. Sitolojik materyal, %70 etanolde fikse edilmelidir.
- Parafine gömülmeden önce geçen fiksasyon süresi materyalin hacmine bağlı olarak değişir, fiksatif miktarı materyalin en az 5 katı olmalıdır. Küçük biyopsi örnekleri (bronkoskopik, iğne veya kor biyopsi) için fiksasyon en az 6 saat olmalı ve 18 saati geçmemelidir. Büyük doku örneklerinde (tümör rezeksiyonu, lenf nodu eksizyonu, vb.) en az 12 saat fiksasyon olmalı ve bu süre 48 saati geçmemelidir.
- Moleküler testlerin uygulanacağı örneklerde, dokulara uygulanacak diğer işlemlerin kullanımından kaçınılmalıdır (Ör; asidik veya ağır metal içeren fiksatifler veya asit dekalsifiye edici solüsyonlar).
- Kemikteki metastatik tümörlerde mutasyon analizi asit dekalsifikasyonu nedeniyle problem oluşturmaktadır. Mutlaka kemik dekalsifikasyon işlemi uygulanacak ise EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu ile işlem yapılabilir.

Moleküler öncelikli biyopsi olarak veya metastaz düşünülerek rutin patoloji için gönderilen kemik biyopsisinde moleküler testler gerekebileceğinden, alınan kemik materyalinin yumuşak kısımları (muhtemel tümör de içeren kısımlar) dekalsifikasyon işlemi yapılmadan ayrı bloklanarak parafin takibine alınabilir.

Materyal taze iken ve henüz fiksatife konulmadan pozitif şarjlı lamalar ile dokundurma preparatlar hazırlanmalı, yeterli tümör hücresi içerdikleri boyanıp incelenerek anlaşıldıktan sonra bunlara moleküler testler uygulanmalıdır (7, 15).

KHDAK'da Histopatolojik Değerlendirme

Histolojik incelemede kesin morfolojik adenokarsinom (asiner, papiller, lepidik, mikropapiller) veya skuamöz hücreli karsinom (keratinizasyon ve intraselüler köprüler) paternleri mevcut ise tümörler sırasıyla, adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom olarak belirlenmelidir.

- Bu durumda sadece primer-metastatik adenokarsinom ayırımında Keratin 7 ve/veya TTF-1 (Thyroid transcription factor-1) immünhistokimya boyamaları uygulanabilir.
- Bununla birlikte, rutin mikroskopide KHDAK'ların alt-tiplerinin belirlenmesinde, moleküler testler için mümkün olduğunca fazla dokuyu korumak için sınırlı İHK önerilmektedir. Çoğu tümör, tek bir adenokarsinom belirtici (Örn., TTF-1 ve çok gerekliyse Napsin A) ve tek bir skuamöz hücreli karsinom belirtici (p40 veya p63) kullanılarak sınıflandırılabilir.

Adenokarsinom tanısına ulaşmak için müsin boyası eklenebilir (16). Tümörlerin alt-tiplendirilmesi için Şekil 1'deki algoritma kullanılmaktadır (17).

Aynı anda gelen küçük biyopsi ve sitolojik materyaller beraber değerlendirilerek, en spesifik ve uyumlu tanı konabilir (18).

KHDAK'da İHK yorumu Tablo (1)'de yer almaktadır (19).

Tablo 1: KHDAK'da Küçük Biyopsi ve Sitoloji Örneklerinde İmmünhistokimyasal Tanısal Panel

İmmünhistokimyasal ekspresyon	Tanı ve yorum
TTF1 + / p40 veya p63 + (aynı hücrelerde herhangi bir boyanma derecesi)	KHDAK, öncelikle Adenokarsinom lehine
TTF1- / p40 veya p63 + (>%50'nin üzerinde boyanma)	KHDAK, öncelikle Skuamöz Hücreli Karsinom lehine
TTF1- / p40 veya p63 + (%10-50 oranında boyanma)	KHDAK-NOS
TTF1 + / p40 veya p63 + (farklı hücre popülasyonunda)	KHDAK-NOS, olasılıkla Adenoskuamöz Karsinom
TTF1- / p40 veya p63- / Müsin -	KHDAK-NOS

TTF1: Tiroid Transkripsiyon Faktörü 1, **KHDAK:** Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, **NOS:** Not Otherwise Specified-Spesifik Tanı Konulamayan

Not: %10'un altında oranda p40 pozitifliği skuamöz hücreli karsinom tanısı için güvenilir değildir.

Moleküler Testlerin Yapılacağı Örneklerin Seçimi

Tüm tümör moleküler testlerin analizinin patoloğ tarafından yapılması gereklidir. Moleküler testler için kullanılacak kesitlerin seçiminde tümörün yapısı, sitolojisi ve örnek kalitesi değerlendirilmelidir. Patoloğlar, mevcut örneklerin akciğer kanseri biyobelirteçlerine ait moleküler testler için yeterli olup olmadığını belirlemek amacıyla bu örneklerin içerdikleri kanser hücresi miktarını, doku korunma düzeyini ve nükleik asit kalite ve kantitesini değerlendirmelidir.

Her örnek tümör içeriği yönünden değerlendirilmeli ve gerektiğinde tümör hücrelerinin zenginleştirilmesi mikrodiseksiyon/makrodiseksiyon işlemi yapılmalıdır (7).

Raporlama sırasında minimal tümör hücresi içeren örneklerden moleküler testlerin yapılması ile ilgili kısıtlamaların ve uyarıların belirtilmesi gerekir. Pozitif sonuçlar her zaman değerli olmakla birlikte, negatif sonuçlar dikkatli bir şekilde yorumlanarak, gerekirse test sonucunun geçersiz olabileceği akılda tutulmalıdır.

- Test için tümör miktarı/tümör hücre sayısı her laboratuvar ve kullanılan yöntem için teyit edilmelidir. FISH testi için 50-100 canlı hücre gereklidir. Kullanılan platforma göre değişebilmekle birlikte mutasyon analizi için, YND de %10 ila %20 ve Sanger dizileme için %30 ila %40 arasında değişen minimum bir tümör hücresi oranı gereklidir (21).

Moleküler testler için yeterli tümör hücresi yoksa, hasta için zaman kaybı oluşmasını engellemek için, bu bilgi onkoloji ve göğüs hastalıkları uzmanlarıyla hemen paylaşılmalıdır.

Moleküler Testler için Materyallerin Başka Laboratuvara Sevk Edilmesi

Moleküler testlerin yapılması için örneğin başka bir laboratuvara sevk edildiği durumlarda az miktarda tümör hücresi içeren örnekler nedeniyle belirli zorluklarla karşılaşılabilir. Kısıtlı sayıda kesit gönderilmesi ise; istenen tüm çalışmalar için yeterli materyalin olmaması, yanlış kesit kalınlığı veya test için gereken kesitin pozitif şarjlı lam üzerinde olmaması gibi güçlüklerle neden olabilir.

Laboratuvarlar, parafin blokları ile birlikte önceden kesilmiş slaytları da yollayarak, dokuların tükenmiş olması durumunda mevcut diğer materyale dayalı moleküler testlerin zamanında tamamlanmasına olanak sağlayabilir.

Tanısal ve PD-L1 (programmed death-ligand 1) immünohistokimyasal çalışma için ihtiyaç duyulan kesitlere ek olarak ALK ve ROS1 testi (IHK/FISH) için en az 4-6 adet 4 µm kesit, EGFR mutasyon testi için 2-3 adet 10 µm kesit gereklidir (22).

Daha önce immünohistokimyasal boyanmış kesitlerin de moleküler testlerin yapılacağı laboratuvara gönderilmesi, tanıya çok yardımcı olacaktır. Dokunun yeterli olmadığı durumlarda boyalı kesitler üzerindeki doku kazınarak veya soldurularak moleküler testler için çalışma denenebilir (23, 24).

Sitoloji Materyalinde Moleküler Testlerin Uygulanması

Moleküler patoloji, pek çok tümörün tanısının moleküler bulgulara dayanması nedeniyle, patolojinin önemli ve vazgeçilmez bir alt disiplini haline gelmiştir. Bu kişiselleştirilmiş tedavi çağında, rutin uygulamada, yeni ilaçlarla ilgili sayısız moleküler hedef ve biyobelirteçlerin, sistematik testler ile bakılması zorunludur. Bu gelişmeler ışığında, KHDAK'da moleküler testlerin yapılmasının gerekliliği nedeniyle, histolojik materyal kadar artık sitoloji de önem kazanmıştır. Prediktif biyobelirteç testlerindeki ilerlemelerin çoğu, histolojik örneklerle yapılan çalışma ve klinik araştırmalara dayanmaktadır. Değerlendirme için teknik protokoller ve algoritmalar histolojik örnekler için oluşturulmuştur. Bu da, sitoloji örneklerinin moleküler testler için uygun olmadığı yönünde yanlış bir izlenim uyandırmıştır. Tüm ileri evre KHDAK'ların %40'ında biyopsi materyali olmaksızın tek başına sitoloji ile tanı konulmaktadır. Sitoloji, sadece KHDAK alt tiplmesi için histolojiye eşdeğer olmakla kalmaz, aynı zamanda nüks veya metastatik hastalıkta tekrarlayan biyobelirteç analizi için tümör dokusu elde etmede oldukça etkin ve minimal invaziv bir yöntem olarak kullanılmaktadır (25). Bu nedenle, sitolojik materyalde moleküler testlerin yapılıp yapılamayacağı konusunda artık bir kuşku yoktur (26).

- Sitolojik örnekler, yeterli hücre içeriyor ve düzgün korunmuş hücrelere sahip ise biyobelirteç analizleri (immunsitokimya, PCR, FISH, YND) için uygundur.
- Biyobelirteç analizinde, en uygun örnekleri seçmek için histolojik ve sitolojik örnekler birlikte gözden geçirilmeli ve en uygunu seçilmelidir (26).
- Yasal yükümlülük nedeniyle, moleküler test için sitoloji preparatlarının kullanılması sonucunda geride materyal kalmıyorsa, test öncesi tümör hücrelerinin dijital olarak taranarak saklanması gereklidir. (27).

Sitoloji Teknikleri (Yayma Preparat, Sıvı Bazlı Sitoloji, Hücre Bloğu)

Endobronşiyal Ultrasonografi (EBUS) eşliğinde transbronşiyal ince iğne aspirasyonu (İİA), transtorasik İİA, bronş aspirasyon ve fırçalama, bronkoalveoler lavaj, plevral efüzyon ve metastatik bölgeden alınan İİA materyalleri hem tanı hem de biyobelirteç analizi için kullanılabilir (25).

- Hasta başı hızlı sitolojik değerlendirme, İİA materyalinin yeterliliğine ve ek inceleme için materyalin öncelikli preparasyonuna karar verdiren en ideal yöntemdir. Eğer moleküler çalışma yapılacaksa yayma preparat minimal yapılıp hücre bloğuna materyal saklanır (28).
- İİA materyallerinde, direkt veya sitosantrifüj sonrası yayma yapılan preparatlar havada kurutulup Giemsa ile ya da alkol bazlı solüsyonlarda fiks edilerek Papanicolaou (PAP) veya Diff-Quik ile boyanır. Papanicolaou veya Diff-Quik ile boyanmış tümör hücresi içeren direkt yaymalar moleküler ve immunsitokimyasal analiz için efektif ve güvenilir olarak kullanılabilir (29, 30).

- Sıvı bazlı sitoloji (SBS), sitolojik materyalin alkol bazlı fiksatif içine konulduğu, yarı veya tam otomatik sistemde sedimentasyon veya filtreleme tekniği ile tek tabakalı slayt hazırlandığı alternatif bir yöntemdir.
- İİA veya SBS materyalinden kalan doku ile çeşitli farklı teknikler kullanılarak formalin fikse parafine gömülü (FFPE) hücre bloğu oluşturulabilir.
- Hücre blokları protein veya DNA kalitesinin uzun süreli korunma avantajına sahiptir. Ancak hücre blokları her zaman avantajlı olmayabilir. Selülarite, moleküler tanı için yeterli olmayabilir. Tanısal morfolojik detaylar yayma/sitospin/SBS'den daha düşük olabilir ya da alkol fikse yayma/sitospin/SBS örneklerinin aksine, hücre bloğu örneklerinde DNA kalitesi formalin ile bozulup nükleotidlerin çapraz bağlanmasına ve kimyasal modifikasyonuna yol açabilir (31).

Tablo 2: Sitolojik Materyalin Moleküler Testler için Avantaj ve Dezavantajları

	AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
HÜCRE BLOĞU	Kolay elde edilir Kolay valide edilir Seri kesitler alınabilir	Hızlı inceleme yapılmaz. Düşük selülarite olabilir Nükleik asid degradasyonu (formalin fiksasyonu nedeniyle) Standart kesitlerde nükleusların tam olmaması
DİREKT YAYMA	Tümör yeterliliğinin hızla değerlendirilmesi Nükleik asitte yüksek kalite Hücre ve nükleuslar tam	Valide edilmesi zor Yaymaların hazırlanması için teknik destek ve yetenek gerekli İleri incelemede kullanılacak tek materyal (medikolegal)
SIVI BAZLI SİTOLOJİ	Optimal fiksatif ile standart proses Kolay kullanılabilir Hücre ve nükleuslar tam	Hızlı inceleme yapılamaz Test edilen örnekteki tümörün kalite/varlığı belirlenemez Farklı fiksatifler (valide edilmeli)

Sitolojik Materyalde İmmünsitokimya (İSK)

İHK, moleküler bir yöntem olmamakla birlikte, tanısal ve prediktif moleküler ve genetik değişikliklerle doğrudan ilişkili olması nedeniyle dikkate alınmalıdır (32).

- Örneğin, ALK ve ROS1 İHK, küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde (KHDAK) ilgili gen yeniden düzenlemeleri için biyopsi ve sitoloji örneklerinin ön taramasında standart uygulama haline gelmiştir. Benzer şekilde, İHK olarak V600E mutant BRAF'ı saptayan spesifik antikor vardır. Ayrıca, cMET İHK, MET amplifikasyonu veya MET ekzon 14 mutasyonunu gösteren moleküler MET testi ön tarama için yararlı olabilir (33).
- Tipik olarak prediktif biyobelirteç testi için sağlam ve valide bir metodoloji önerilmektedir, ancak bu belirli bir teknik veya histoloji ile sınırlandırılmamalıdır. Daha fazla veriye ihtiyaç duyulmasına rağmen, öngörücü İSK'nin yaymalar/ sitospinler /SBS'ler veya hücre bloklarına güvenilir şekilde uygulanabileceğine dair biriken kanıtlar vardır (34–38).
- İSK, henüz bu konuda teknik platform veya protokolda belirli bir konsensüs olmamakla birlikte, PAP boyalı sitolojik yaymalara uygulanabilir. Ancak sonuçlar her zaman doku ile uyumlu olmayabilir. Sitolojideki performans kullanılan antikorun klonuna, boyama sistemine ve skorumaya sistemine bağlıdır (35).
- İSK, PAP boyalı yayma preparatlarda lamel çıkartıldıktan sonra, otomatik boyama cihazında, kullanım kılavuzuna uygun şekilde, dokudan farklı olarak deparafinizasyon basamağı atlanarak uygulanır. Hücre bloklarında, diğer parafine gömülü dokularda olduğu gibi, 4 µm kalınlığındaki kesitlere deparafinizasyon basamağı da uygulanarak, otomatik cihazda boyama gerçekleştirilir (36).
- Yayma/sitospin/SBS ve hücre bloklarında, İmmünsitokimyasal olarak ALK boyanması, giderek güncel hale gelmektedir (34). Sitolojide ROS1 uygulamasına ait datalar da bildirilmektedir (40) (Detay için Bkz ALK-ROS1 Moleküler Testler başlığı).
- PD-L1 testi ile değerlendirme, farklı antikor ve skorumaya sistemlerinin bulunması nedeniyle sitolojide biraz kafa karıştırıcı olabilmektedir. Bu durumlarda pozitif boyanan tümör hücre yüzdesi sitolojik materyalde de değerlendirilerek bulunabilir. Sitolojik materyal ve hücre bloklarında PD-L1 boyanmasının histolojik dokulardakine benzer güvenilirlikte olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Yayma ve SBS'de membranöz boyanma, hücre bloklarına göre daha belirsizdir (40).

Sitolojik Materyalde FISH ve PCR

- Moleküler analiz için herhangi bir sitolojik materyal (TBİA, efüzyon, bronkoskopik aspirasyon, fırçalama, sıvı bazlı sitoloji, hücre bloğu) kullanılabilir. Yaymalar havada kurumuş veya alkol fikse olabilir. PAP veya giemsa boyalı preparatlar kullanılabilir. İmmünsitokimya boyalı preparatlar da, eğer başka yeterli tümör dokusu içeren materyal yok ise, analiz için kullanılabilir.

- Konvansiyonel sitolojide kullanılan alkol fiksasyonu, DNA kalitesini, formalin fiksasyonuna göre daha iyi korur. Formalin çapraz bağlanmaya ve kimyasal modifikasyona neden olur ve bu nedenle yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (41, 42). Dolayısıyla sitolojide, daha iyi FISH sonuçlarının alınması söz konusu olabilir.
- Uygun protokollerin kullanılması şartıyla, sitolojide FISH, histolojik örneklerle göre daha az otofloresan arka plan ile daha parlak sonuçlar sağlar. DNA'nın sağlamlığı nedeniyle, FISH, fiksasyon ve boya tipine bakılmaksızın tanısal sitolojik örneklerle uygulanabilir. Eğer preparatta üç boyutlu tümör hücre plakaları var ise, periferdeki tek hücrelerde değerlendirme yapılmalıdır.
- Sitolojik materyalde, histolojik preparatlarda olduğu gibi kesit yapılmaması nedeniyle psödodelesyon görülmemektedir.
- Pozitif yüklü lamaların kullanılması tümör hücrelerinin camdan dökülmesini önler. Preparat pozitif yüklü lamalara yayılmamış ise FISH veya İSK uygulanmasından kaçınılmalıdır.

Sitolojik Materyaller İçin FISH ve PCR Uygulama Protokolü

FISH

1. Gün

1. 2xSSC (salin sodyum sitrat) konulan şale 37°C etüvde tutulur.
2. Enzim için solüsyon hazırlanır: Her bir lam için 2ml distile su, 20 mikrolitre 1 molar HCl, 30 mikrolitre %1 pepsin. Distile su ve HCl karışımı 37°C etüve konur.
3. Yayma preparatında tümörlü alan elmas uçlu kalemle işaretlenerek lamelin ayrılması için sıcak ksilolde bir süre bekletilir. Lameli ayrılan preparat asit alkolde dekolorize edilir. Distile su ile yıkanır.
4. 37°C ye gelen distile su ve 1M HCl solüsyonu içerisine %1'lik pepsin eklenir. Etüve yerleştirilen preparatların üzerine bu solüsyon damlatılarak 30 dk bekletilir.
5. Süre sonunda distile su ile yıkanır.
6. İki kez 3'er dakika 2xSSC ile yıkanır.
7. 3 dk %70 alkol, 3 dk %85 alkol ve 3 dk %100 alkol serisinden geçirilir.
8. Kurutulur.
9. Prob hazırlanır. Preparat üzerine damlatılır. Uygun lamel ile kapatılır. Lamellerin kenarı rubber cement ile kapatılır.
10. Thermobrite'ta 73°C de 5 dk, 37°C de 1 gece preparatlar bekletilir.

2. Gün

1. 90 ml distile su + 10 ml 20SSC+ 300 mikrolitre NP40 karışımı ikiye bölünür. Birisi dışarıda diğeri 73°C ye ayarlanmış su banyosuna konur. İçerisindeki sıvı sıcaklığı 73°C olmalıdır.
2. Yıkama solüsyonunun sıcaklığı 73°C ye ulaştığında lamalar thermobrideden çıkarılır, üzerindeki lameller kaldırılır, fazlalık cement temizlenir ve ısınmış yıkama solüsyonunda 5 dk bekletilir.
3. Preparatlar süre sonunda oda ısısındaki yıkama solüsyonunda tek tek çalkanır. Oda ısısında kurumaya bırakılır.
4. Kuruyan lamaların üzerine uygun miktarda dapi damlatılır.
5. Üzeri lamelle kapatılan preparatlar -20°C de en az 20 dk bekletilir (43).

PCR

Sitolojik materyalde PCR uygulaması;

1. Yayma lamaları ksilolde lamelleri açılıncaya kadar bekletilir.
2. Alkolde 2 dk bekletilir.
3. Havada kurumaya bırakılır.
4. Kuruyan preparatlar üzerine apirojen distile su damlatılır, lam bistüri ucuyla kazınarak ependorf tüpe alınır.

Diğer basamaklar FFPE dokularla aynı protokole göre yapılır.

Sitolojik Materyalde Moleküler Test Yapılabilmesi İçin Ne Kadar Hücre Olmalı?

- Bir hücre yaklaşık 6–7 pg DNA içerir.
- Moleküler inceleme için 1 ng DNA gereklidir. Bu da yaklaşık 143–166 hücreye eşdeğerdir.
 - 5ng tümör DNA; $\approx$ 200 tümör hücresi (etanol) ve 10–20ng RNA: $\approx$ 500–1000 tümör hücresi
 - En az 300–500 tümör hücresi içeren histolojik örneklerin talebine kıyasla, etanolle tespitli sitolojik slaytlardan mutasyon testinin hem geleneksel Sanger sekanslama (50–100 hücre) hem de YND (200 hücre) ile daha düşük minimum sayıda tümör hücresi gerekir (Formalin tespiti olmadığı için). Aslında, güvenilir sonuç elde etmek için DNA kalitesi ve bütünlüğü, DNA miktarından daha önemlidir (41).
- Kullanılan platforma göre değişebilmekle birlikte mutasyon analizi için, YND de %10 ila %20 ve Sanger dizileme için %30 ila %40 arasında değişen minimum bir tümör hücresi oranı gereklidir.

- Bu gereklilikler karşılandığında, DNA ekstraksiyonu için bir sitoloji preparatından tüm hücrelerin kazınması, parafin bloktan elde edilen kesitlerden bir doku bölümünü kazımak kadar basittir.
 - Daha düşük tümör hücresi oranı durumunda, benign hücrelerdeki DNA ile dilüsyon nedeniyle heterozigot mutasyonları kaçırmak mümkündür. Yüksek tümör hücresi oranına sahip alanların makro diseksiyonu bazı durumlarda bir seçenektir, ancak baskın iyi huylu hücrelerle rastgele karışmış tümör hücreleri varsa bu mümkün değildir.

Hücre Bloğu Oluşturma

Hücre bloğu, emek isteyen, zaman alan ve laboratuvar yoğunluğunu arttıran bir metod olmakla birlikte son yıllarda akciğer kanseri tanı ve tedavisindeki yenilikler ve gelişmeler nedeniyle artık bir zorunluluk haline gelmiştir (44).

Hücre Bloğu Oluşturma Yöntemleri

1. Geleneksel Hücre bloğu yapımı (%10 formaldehit ya da %10 formaldehit + %96 alkol (eşit oranda)
2. Trombin-Plazma metod
3. Agar Yöntemi
4. Sitosantrifüj Yöntemi
5. Otomatik hücre bloğu yöntemi (Cellient™)

Geleneksel Hücre Bloğu Yapımı (Santrifüj Yöntemi): Sitolojik materyalin dip kısmından falkon tüpüne 10ml kadar pipetle alınır (sıvı az ise tamamı alınır) %96'lık alkol ve %10 formaldehitden eşit oranda oluşturulmuş solüsyondan üzerine 25-30 ml eklendikten sonra 1660 devirde 10 dk santrifüj yapılır.

Santrifüj sonrası çökelti üzerindeki sıvı dökülür. Daha sonra üzerine yeniden alkol-formaldehit karışımından eklenir ve birkaç saat beklenir (çökelti alkol-formol solüsyonunda bekleyerek biraz daha sertleşir). Böylece çökelti doku kasetine rahatlıkla alınır.

Özellikle hemorajik ve partiküllü sıvılardan bu yöntemle hücre bloğu oluşturulur. Hemorajik olmayan berrak görünümlü örneklerden hücre bloğu elde edilemez. %10'luk formalin içine eşit oranda eklenen alkol proteinleri çökeltiye daha kolay hücre bloğu oluşmasını sağlar.

Plazma-Trombin Yöntemi (Pıhtı Dokusu Oluşturma): Berrak görünümlü ya da hemorajik olmayan az miktardaki sıvı örneklerinden ve SBS den hücre bloğu oluşturmada oldukça etkili bir yöntemdir. Plazma ve tromboplastin buzdolabında

bekletilmelidir. SBS yapıldıktan sonra falkon tüpe konur. Plazma ve tromboplastin 8 damla damlatılır. 1660 devirde 10 dk santrifüj edilerek oluşan çökelti doku takibine alınır.

Agar Yöntemi: Gıda sanayisinde kıvamlaştırıcı ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriler için kültür ortamı sağlar. Agar Agar (E 406): 30-40°C jel kıvamında, 80°C üstünde erir. Hafif partiküllü ve hemorajik olmayan sıvılardan rahatlıkla hücre bloğu oluşturulabilir. 1 çay kaşığı agar (3gr) 100 ml distile su ile karıştırılıp ısıtıcıya 80-90 dereceye konur. SBS kalanı falkon tüpe 1660 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı dökülür, çökelti üzerine 2-3 damla agar konarak çalkalanır. 20-30 dk buzdolabında bekletildikten sonra kasete alıp doku takibi yapılır.

Sitosantrifüj Yöntemi: %10'luk formol içinde gönderilen sıvılardan yayma hazırlandıktan sonra üzerine %95'lik alkol 1.5 ml eklenir. 2000 devir 5 dk santrifüj edildikten sonra üst kısım dökülür. Çökelti üzerine 2-4 damla reagent 2 damlatılır. Sitoblok kasetinin orta çukuruna 2-3 damla reagent 1 damlatılır. Sitoblok kaseti sitoklibe yerleştirilir. Üzerine filtre ve sitofunnel konulup klip kapatılır. Sitolojik örnekten 1-2 ml sitofunnel içine yerleştirilir. 1500 devirde 5 dk sitosantrifüj edilir. Sitosantrifüj bittikten sonra sitofunnel ve kağıt filtre ayrılır, eğer ilk santrifüjden çökelti var ise eklenir. Sitoblok üzerine 1 damla reagent 1 damlatılır. Sitoblok kapatılıp doku takibi yapılır.

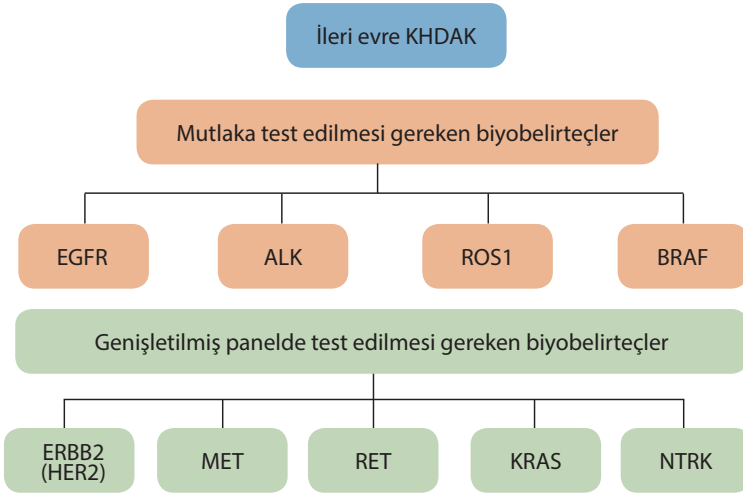
Otomatik Hücre Bloğu Yöntemi (Cellient™ Sistem): Tam otomatik sistemdir. Vakum destekli filtrasyon yardımıyla hücreleri blok içinde toplar. Hücreselliliği az sıvı örneklerinden hücre bloğu oluşturur. Formalinle karşılaştırıldığında alkolün, hücre DNA ve RNA yapısını daha iyi koruduğu bildirilmiştir. Methanol ile tespit edilmiş sıvı örneklerinden elde edilmesi moleküler testler açısından avantajdır. Kısa sürede hazırlanması (45 dk.) avantaj, maliyetinin yüksek olması dezavantajdır.

KHDAK İçin Güncel Moleküler Testler

Uluslararası rehberlerde adenokarsinom ve adenokarsinom komponentinin dışlanamadığı küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında (KHDAK) aşağıdaki genlerin incelenmesi önerilmektedir (45-48):

- İlk basamakta; EGFR, ALK ve ROS1 genlerine yönelik moleküler testler eř zamanlı olarak yapılmalıdır.
- EGFR, ALK ve ROS1 genlerinde mutasyon saptanamadığı durumda, ikinci basamakta BRAF, MET, ERBB2/HER2, RET, KRAS genlerine yönelik moleküler test yapılması önerilmektedir. Ancak ESMO (European Society for Medical Oncology), KHDAK tanılı hastalarda ilk basamak moleküler testler arasında BRAF mutasyon analizinin de yer almasını önermiştir (48).

şekil 1: İleri Evre KHDAK'da Test Algoritması



Tablo 3: Mutasyonlar ve testler* (172-175)

Hedef	Test Metodu	Sıklık
EGFR mutasyonları	Real-time PCR, Sanger Sekanslama, YND	%10-15
BRAF mutasyonları	Real-time PCR, Sanger Sekanslama, YND	%2
KRAS mutasyonları	Real-time PCR, Sanger Sekanslama, YND	%25
ALK rearanjmanları	FISH, Reverse transkriptaz PCR, YND , İHK (tarama ve tanı)	%3-5
ROS1 rearanjmanları	FISH, Reverse transkriptaz PCR, YND , İHK (tarama)	%1-2
RET rearanjmanları	FISH, Reverse transkriptaz PCR, YND	%1-2
METex14 skipping mutasyonları	YND	%3
NTRK rearanjmanları	FISH, Reverse transkriptaz PCR, YND, İHK	<%0,5
MET amplifikasyonları	FISH, YND	%3
HER2 mutasyonları	Real-time PCR, YND	%2
Tümör mutasyon yükü	YND	

***YND:** Yeni Nesil Dizileme, **PCR:** Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)
İHK: İmmünohistokimya, **FISH:** Floresan İn Situ Hibridizasyon

Kime, Ne zaman, Nasıl?

- İleri evre ve metastatik (evre IIIB ve IV) tüm non-skuamöz KHDAA hastalarında tanı kesinleştii anda EGFR, ALK ve ROS1 genlerine yönelik molekül testlerin yapılması önerilmektedir (refleks test). Her bir biyolojik belirtecın eş zamanlı olarak test edilmesi, molekül testlerin etkinliğini artırır ve doku örneklerinin korunmasını sağlar.
- Daha önce molekül test yapılmamış erken evre hastalarda da nüks veya progresyon geliştiğinde molekül testler yapılmalı ve mümkünse yeni biyopsi tercih edilmelidir.
- Erken evre tümörlerde de tanı anında molekül testlerin yapılması desteklenmektedir. Ancak bu konudaki nihai karar multidisipliner onkoloji konseyinde her merkeze özel olarak alınmalıdır.
- Daha önce molekül test yapılmış olan hastalarda, lokal progresyon ve metastaz gelişimi durumunda tümörlerin kazanabileceii yeni özellikler (histolojik transformasyon, yeni mutasyonlar) nedeniyle, progresyonun her evresinde ve tedavi direncinde yeni örnekler ile molekül test yapılması önerilmektedir.
- TKİ alan hastalarda tedaviden sonra metastaz çıkmışsa, metastaz da test edilebilir.
- Bariz olarak birbirinden bağımsız ve birden fazla primer akciğer adenokarsinomu olan hastalarda, her tümör için test uygulanabilir, ancak tek bir tümör için birden fazla farklı alanın test edilmesi gerekli değildir (46, 48, 50).

Test Yapılacak Tümör Tipleri:

- Adenokarsinom
- Adenoskuamöz karsinom
- Büyük hücreli karsinom
- KHDAK-NOS

Test Yapılması Önerilmeyen Tümör Tipleri:

- Pür nöroendokrin karsinom
- Pür küçük hücreli karsinom
- Pür skuamöz hücreli karsinom (klinik olarak sürücü mutasyon taşıma ihtimali olan hastalar hariç)

Yüksek Klinik Şüphe Durumunda;

Genç (<50 yaş), hiç sigara içmemiş, az içmiş (<15 pk/yıl) veya uzun süre önce (>10 yıl) bırakmış hastalarda adenokarsinom dışındaki tümörlerde de moleküler testler uygulanabilir (48).

Refleks Test

İdeal olanı, test edilmesi gereken hastalarda, tanı belirlendiği anda patolojinin testleri klinik istem olmadan yapılabilmesidir. Bu nedenle mümkünse patoloji istem kağıtlarında evre ve hasta özelliklerinin belirtilmesi tavsiye edilir. Bu yaklaşım testlerin daha kısa sürede sonuçlanması ve hastaların doğru zamanda doğru kişiselleştirilmiş tedaviyi almasını sağlamaktadır (46, 48, 50).

İsmarlama Test

Moleküler testlerin klinik istek üzerine sonradan yapılmasıdır. Bu testlerin ileri bir zamanda yapılması gerekebileceğinden dokunun uygun koşullarda saklanması gerekmektedir.

Refleks ve ismarlama testlerin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. İsmarlama test, gerektiğinde yapılacağından refleks teste göre maliyeti daha az olacaktır, ancak sonuçlanması zaman alacağından tedavinin gecikmesine neden olabilir (46, 48, 50).

Kullanılacak Moleküler Yöntemin Seçimi

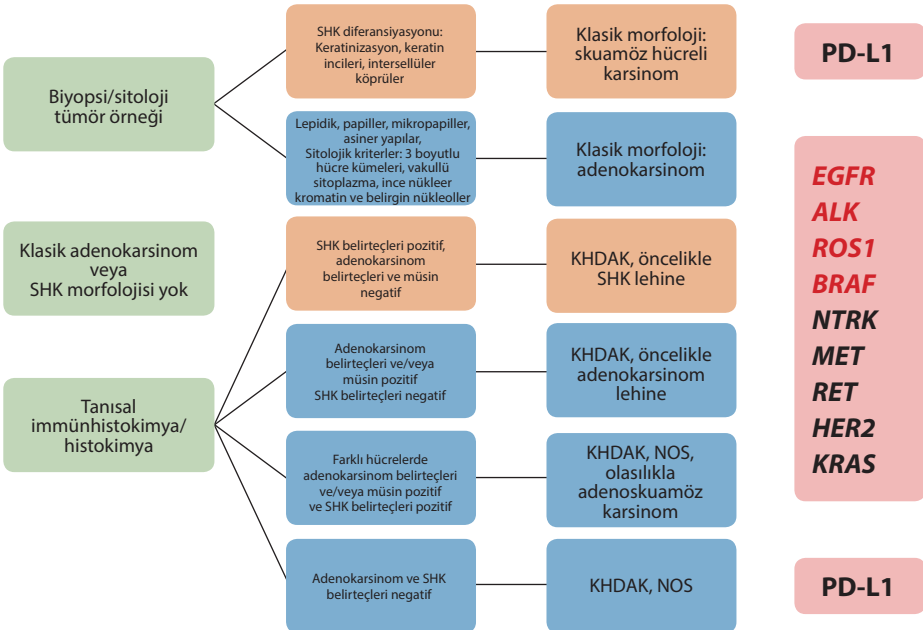
Moleküler yöntemlerden hangisinin kullanılacağı değerlendirilirken ne tür bir mutasyonun (nokta mutasyonu, rearanjman/füzyon, amplifikasyon vb.) arandığı, seçilen yöntemin aranan mutasyonu saptamada ne kadar güvenilir olduğu ve limitasyonları iyi bilinmelidir.

Total Sonuçlanma ve Raporlama Süresi:

Tüm testler için raporlama süresi 10 iş günü (2 hafta) olarak önerilmektedir (1). Örnekler dış moleküler laboratuvara 3 iş günü içinde, dahili moleküler laboratuvara 24 saat içinde ulaştırılmalıdır.

Laboratuvarların profesyonel dernekler tarafından sunulan programlara katılarak dış kalite güvencesi sağlaması teşvik edilmelidir.

Şekil 2: Akciğer Kanserinde biyopsilerde ve sitolojik örneklerde Tanısal alt tipler ve Moleküler testleri (172, 173)



EGFR Mutasyon Analizleri

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) geni; PI3K-AKT-mTOR ve RAS-RAF-MEK- ERK yollarında rol alan, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen reseptör tirozin kinaz proteinini kodlar (52). EGFR mutasyon sıklığı toplumdan topluma değişmekte, adenokarsinomlarda beyaz ırkta %10-15 oranında, Asya ırkında %50 oranında görülmektedir. Genellikle kadınlar, genç hastalar, hiç sigara içmemiş ya da az içmiş hastalar, Asya kökenliler ve lepidik, papiller, mikropapiller patern gösteren adenokarsinomlarda EGFR mutasyonu daha sıktır (53, 54).

EGFR mutasyon testi ilaç tedavisi yanıtını tahmin etmek için kullanılır. EGFR mutasyonu olan metastatik hastalarda çeşitli EGFR TKİ'leri (erlotinib, afatinib, osimertinib, dacomitinib, gefitinib) ilk basamak tedavide kullanılmaktadır.

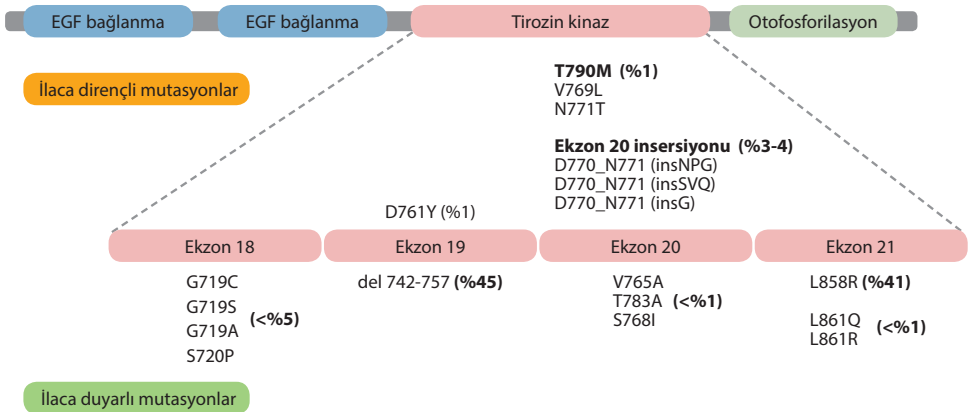
EGFR mutasyon test yöntemlerinin analitik duyarlılık oranları değişkenlik göstermektedir (55).

EGFR mutasyonları çoğunlukla EGFR geninin tirozin kinaz bölgesinde (ekzon 18-21) lokalizedir. EGFR mutasyonlarının %90'ını 19. ekzon delesyonları ve 21. ekzondaki L858R nokta mutasyonu oluşturmakta, materyal sınırlı olduğunda minimum bu bölgelerin; materyal yeterli olduğunda ise 18-21. ekzonların test edilmesi önerilmektedir (56, 57).

Nadir görülen EGFR mutasyonu (örneğin ekzon 18 veya ekzon 20 insersiyonu) olan tümörlerin TKİ ile tedavi etkinliği daha az tanımlanmıştır (58, 59). Bu genetik değişikliklerin bazılarında (özellikle ekzon 18) TKİ'ler ile yanıt alınmaktadır. Yakın zamanda ekzon 20 insersiyonu olan tümörlerde yeni tedavi seçenekleri de yer alacaktır (60).

Modifiye şemada (Şekil 3) EGFR TKİ duyarlı ve dirençli mutasyonlar belirtilmiştir.

Şekil 3: EGFR TKİ Duyarlı ve Dirençli Mutasyonlar (176)



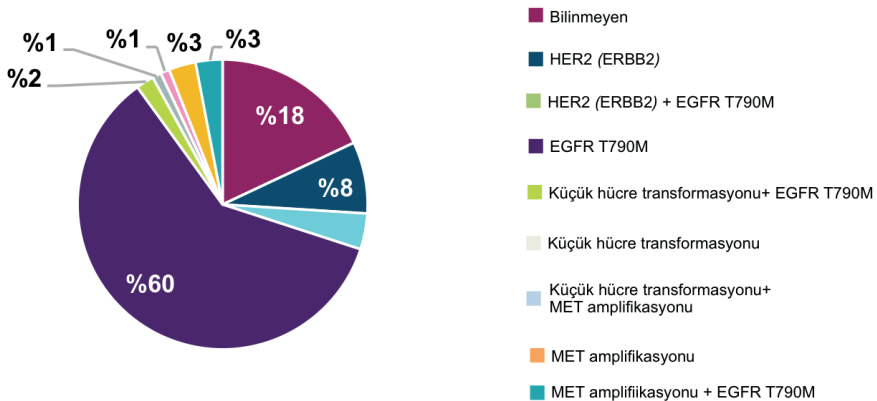
EGFR TKİ Direnç Mekanizmaları

Birinci basamak TKİ tedavisi alan hastalarda ilaç direncine sebep olan mutasyonlar, ya hastalığın başından beri sürücü mutasyonla birlikte bulunan eşlikçi ya da tedavi sırasında gelişen ikincil mutasyonlardır. Önceden EGFR mutasyonu saptanarak birinci basamak TKİ tedavisi almış ve tedavi altında progresyon gösteren hastalarda, direnç mekanizmalarını anlamak ve ikinci basamak tedavi seçeneklerini belirlemek için yeni bir örnek elde etmek gerekmektedir. Genellikle en kolay erişilebilir lezyondan biyopsi yapılır. Ancak tümör heterojenitesi nedeniyle, tek bir örnek mevcut tüm direnç mekanizmalarını doğru olarak temsil etmekte yetersiz kalabilir (46).

EGFR-TKİ'ye karşı direnç sıklıkla EGFR'de izlenen ikincil mutasyonlar sonucu gelişmektedir (63, 64). Birinci veya ikinci nesil TKİ'ye karşı dirençten sorumlu en sık (%50-60) mutasyon EGFR geni 20. ekzondaki T790M mutasyonudur. T790M nadiren (<%5) hastalığın başından beri eşlikçi mutasyon şeklinde bulunur veya germline mutasyon olarak görülebilir (46) (65). MET, HER2(ERBB2), FGFR1 amplifikasyonları; PIK3CA, KRAS, PTEN nokta mutasyonları gibi birçok gende izlenen moleküler değişiklikler de TKİ direncine yol açabilmektedir (66) (67). T790M mutasyonu bulunduran hastaların 3. nesil TKİ ile tedavisinden sonra tersiyer EGFR direnç mutasyonlarının (Örn. C797S) da gelişebileceği bildirilmektedir (68).

Direnç mutasyonu araştırılan hastalarda, saptanan tüm mutasyonların literatürdeki klinik anlamları güncel olarak takip edilmeli ve anlamı patoloji raporunda belirtilmelidir (69). Ekzon 20 T790M mutasyonu için güçlü bir ilaç olan osimertinibin mevcut olması TKİ tedavisine direnç gelişen hastalarda T790M için test yapılması zorunluluğunu getirmektedir. T790M mutasyon testi ile ilgili likit biyopsi bölümünde açıklayıcı bilgiler mevcuttur.

Şekil 4: 1. ve 2. Nesil EGFR-TKİ'ye Karşı Gelişen Edinilmiş Direnç Mekanizmaları Belirtilmiştir (70)



EGFR Mutasyonu Test Yöntemleri

EGFR testi yapılacak akciğer kanserli hastaların seçimi için güncel olan moleküler test kılavuzlarında yer alan öneriler aşağıda özetlenmiştir (63):

- Test, EGFR mutasyonlu akciğer adenokarsinomlarında en az %1 oranında görüldüğü bildirilen mutasyonların tamamını saptayabilmelidir.
- Test %20'ye kadar düşük oranda kanser hücresi içeren örneklerde de moleküler değişiklikleri saptayabilecek hassasiyete sahip olmalıdır (65).
- Tedaviye ikincil TKİ direnci gelişmiş olan hastalarda EGFR T790M mutasyonunu test eden laboratuvarlar EGFR allellerinin %5'i kadar küçük bir oranda bulunan T790M mutasyonunu tespit edebilecek bir test ile çalışmalıdırlar.
- Mevcut dokunun moleküler testler için sınırlı ve/veya yetersiz olduğu ve biyopsi yapmanın mümkün olmadığı klinik durumlarda, EGFR mutasyon testi için sıvı biyopsi örneğinden kanda serbest dolaşan 'cell free DNA' (cfDNA) izole edilerek mutasyon analizi yapılabilir.

ALK Testi

İkinci kromozomun kısa kolu üzerinde gerçekleşen inversiyon veya translokasyonlar sonucunda EML4-ALK füzyon geni oluşur (71). Bu gen sürekli kinaz aktivitesi gösteren EML4-ALK proteinini kodlar. KHDAK'ların %3-5'inde mevcut olan ALK translokasyonu, nispeten genç yaştaki hastalarda, hiç sigara içmeyenler veya az sigara içmişlerde daha sık görülür ve cinsiyet farkı yoktur. Solid tip, taşlı yüzük ve müsinöz kribriform paternli adenokarsinomlarda daha yüksek olasılıkla bulunmaktadır (72). ALK testleri klinik özelliklerden bağımsız olarak adenokarsinom dışlanamadığında da yapılmalıdır. ALK rearanjmanının az oranda skuamöz hücreli kanserde bulunduğunu gösteren vakalar mevcuttur. Bu nedenle kılavuzlarda ALK testinin hiç sigara içmemiş veya küçük biyopsi veya sitoloji ile tanı konmuş skuamöz hücreli karsinom histolojisindeki hastalara da yapılması önerilmektedir (46)

ALK Testinin Yapıldığı Yöntemler

İmmünohistokimyasal ALK testi

ALK testlerinde FISH yöntemine eşdeğer bir alternatif olan İHK yöntemi de kullanılabilir. İHK, ALK rearanjmanlarını tarama testi olarak da düşünülebilir.

ALK FISH testinin yorumlanmasında hem morfoloji hem de FISH'de deneyimli olmak gerekir (74).

FISH problemleri pahalı olup, değerlendirme için floresan mikroskop ve özel filtrelere ihtiyaç vardır. Cut-off değer olan <%15 oranından düşük skorlarda veya atipik sinyal paternlerinde "borderline" vakalar ile karşı karşıya kalınabilir. Ayrıca uygun olmayan fiksasyon, iyi korunmamış hücreler ve yetersiz tümör hücreliliği nedeniyle %6-10 oranında başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Buna karşılık İHK hızlı ve göreceli olarak

daha ucuzdur ve ışık mikroskopunda değerlendirme yapılır. Daha az hücre yeterli olabilmektedir. İHK nadiren ALK break-apart FISH probu ile saptanamayan ALK inhibitörlerine duyarlı nadir rearanjmanları saptayabilir (75).

Güncellenen CAP/IASLC/AMP klavuzunda ALK testinin hiç sigara içmemiş, küçük biyopsi veya sitoloji ile tanı konmuş skuamöz hücreli karsinom histolojisindeki hastalara da yapılması önerilmektedir. Ancak bu hasta grubunda adenokarsinoma göre daha nadir görülen ALK rearanjmanlarının ALK İHK testi ile taranması daha ekonomik olacaktır (46).

FISH ve İHK yöntemi ile yapılan ALK testleri için bulunan çok sayıda çalışmada mükemmel uyum gözlenmiştir. Antikor klonu olarak yeterli sensitivite ve spesifiteye sahip D5F3 (Ventana/Cell Signaling Technology) veya 5A4 (Novocastra) kullanılmalıdır. Anaplastik lenfoma için geliştirilen ALK1 antikoruna yeterli sensitiviteye sahip değildir.

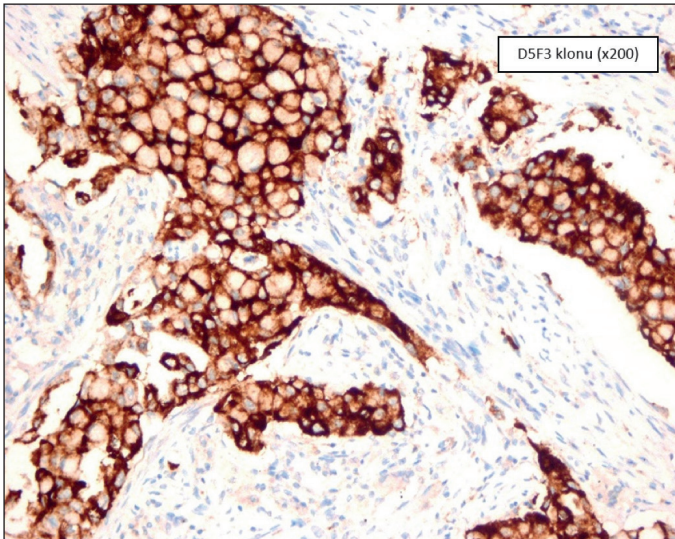
ALK İHK boyanma sitoplazmik ve granüler olup, membranda boyanma gösterebilmektedir. Müsin üreten tümör hücrelerinde membranöz boyanma yanlış negatif olarak yorumlanabilir (76).

Skorlama sistemleri:

- 4 katmanlı sistem: 0,1+ (%70 tümör hücresi zayıf) 2+ (%100 orta), 3+ (%100 güçlü koyu kahverengi) (74).
- H-Skoru (boyanmış tümör hücrelerinin yüzdesi 0, 1, 2, 3 yoğunluğuyla çarpılır), mümkün olan en yüksek değer 300.

Yanlış pozitiflik olarak normal pnömositlerde membranöz boyama görülebilir. Nöroendokrin hücreler, ekstraselüler müsin ve makrofajlar pozitif olabilir (73).

Şekil 5: ALK immünohistokimyasal pozitif akciğer adenokarsinomu



ALK Rearranjmanını Saptamada Kullanılan Test Metodları ile İlişkili Dikkat Edilmesi Gereken Bazı Noktalar

FISH ve İHK arasında uyumsuzluk her iki yöntemle de olabilir. Düşük bir oranda da olsa ALK test edilen olgular arasında İHK pozitif, FISH negatif veya FISH pozitif, İHK negatif sonuçlar literatürde mevcuttur.

Bu durumdaki hastalar için ALK'nın İHK ile pozitif saptanması ALK inhibitörlerine iyi yanıt demek iken, FISH-pozitif, İHK-negatif hastalarda tedavi yanıtının daha tartışmalı olduğu belirtilmektedir (77).

ALK'in füzyon partnerleri ile primer ve metastatik lezyonlar arasında minimal uyumsuzluk bulunmaktadır.

EGFR ve ALK mutasyonlarının birbirlerini dışlayan mutasyonlar olarak kabul edilirken az oranda tümörde hem ALK hem de EGFR pozitif klonların bulunabileceği bildirilmiştir (78).

ALK FISH Testi

ALK gen rearranjmanı geniş kromozomal inversiyon ve translokasyonları içerdiğinden ALK breakapart FISH testi, füzyon partnerine bakılmaksızın tama yakın ALK rearranjmanları saptayabilir. ALK füzyonu tipik olarak ALK (2p23.2) ve buna çok yakın yerleşen EML4 (2p21) arasında intrakromozomal inversiyonlar ile, çok nadiren de ALK füzyonu diğer genler ile interkromozomal translokasyonlar ile ortaya çıkar. FISH testinde DNA'nın bozulmasına neden olabilen fiksasyon zamanı, fiksasyon süresi, fiksatifin tipi gibi birçok faktörden etkilenir. Yöntemin başarısını etkileyen diğer bir faktör de kesitlerin saklama süreleri ve saklandığı ortamdır. Uzun süre oda sıcaklığında bekleyen arşivdeki kesitler ile yapılan standart FISH testi başarılı olmayabilir ve farklı bir protokol gerekebilir. Az differansiye tümörler prehibridizasyon işlemlerine daha hassas iken, münöz tümörler, fibrozis ve antrakozis içeren tümörler ve karaciğer metastazları daha dirençlidir.

Pst-hibridizasyon yıkamalar sinyal yoğunluğunu azaltmadan bağlanmamış probu yeterli derecede uzaklaştırmaya olanak tanımalıdır.

Pozitif şarjlı lama yayılmış sitolojik preparatlarda da uygun protokollerle FISH testi uygulanabilmektedir.

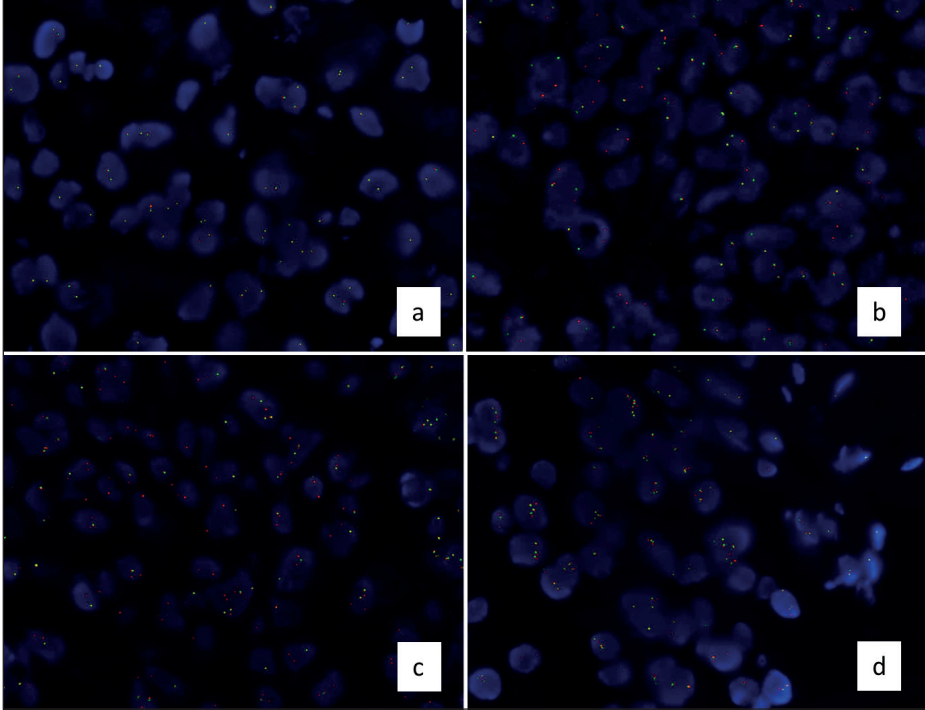
ALK FISH testi için doku kesitleri 4-5 mikron kalınlıkta olmalıdır. Daha önceden alınan kesitler 4-6 hafta süresince saklanabilir ve bunlara FISH testi uygulanabilir (79). ALK FISH testi için 50-100 tümör hücresine ihtiyaç vardır.

Çok küçük dokularda çift kesit bir hibridizasyon alanına sığdırılarak daha fazla hücre elde edilebilir (80).

FISH testinin yorumlanmasında bir patoloji uzmanı mutlaka yer almalıdır. Patolog, analizi bizzat gerçekleştirmeli ya da "solid tümör FISH analizi" konusunda özel eğitim almış sitogenetik uzmanlar veya teknisyenler tarafından gerçekleştirilecek analizleri gözden geçirmelidir.

FISH testinin değerlendirilmesinde en az 50 FISH sinyali izlenen tümör hücresi bulunmalıdır. Tümör hücrelerinin ≥ 15 'inde rearanjman bulunması durumunda ALK mutasyonu pozitif kabul edilmektedir (Şekil 6) (71).

Şekil 6: Akciğer adenokarsinom örneklerinde ALK FISH paternleri



a) Normal (negatif) ALK paterni: iki füzyon veya birbirine yakın yeşil ve kırmızı sinyal izlenmektedir. b) Tipik ALK split patern: Füzyon ve yeşil ve kırmızı sinyaller arasında birden fazla sinyal boyutunda ayrılma bulunmaktadır. c) İzole 3' uçlu ALK paterni: Bir veya daha fazla izole kırmızı sinyal ve intakt füzyon sinyali göstermektedir. FISH: floresan in situ hibridizasyon. d) ALK gen kopya sayısı kazanımı. Negatif ALK paterni

ALK Direnci

ALK TKI tedavisi sonrası kazanılmış direnç ile çeşitli direnç mekanizmaları bildirilmiştir. ALK genindeki sekonder mutasyonlar, ALK kopya sayısı kazanımı, diğer genlerdeki sekonder sürücü mutasyonlar ve ALK füzyon negatif klonların ortaya çıkışı ile ALK inhibitörü tedavisine direnç gelişmektedir (81, 82).

Direnç geliştikten sonra ALK geninin analizi gerçekleştirilerek öncelikle onkojenik füzyon kanıtlanmalıdır. Bu füzyon proteinlerinin bazılarına karşı farklı ALK inhibitörleri değişik

terapötik aktivite gösterir. Ayrıca farklı ALK TKI'lerin beyin metastazı için farklı aktiviteleri mevcuttur. Bu yüzden mutasyon testi başka bir TKI tedavisi veya kemoterapi şeklinde tedavi seçimini etkileyebilmektedir.

ROS1 Testi

ROS1, insülin reseptör ailesinin tirozin kinaz reseptörüdür. ROS1 geni kromozom 6'da (6q22) bulunur ve benzersiz özelliklere sahip bir transmembran reseptör proteini kodlar. Şimdiye kadar insan ROS1 ligandı bulunamamıştır ve bu reseptörünün fizyolojik fonksiyonu hala belirsizdir. ALK'dan farklı olarak, ROS1 füzyon proteinlerinin yapısal olarak aktif hale geldiği mekanizma tam olarak bilinmemektedir (83).

Sigara içmemiş genç hastalarda sıktır. ROS1 pozitif hastalar ALK pozitif morfolojiye ek olarak hepatoid morfolojide de bildirilmektedir. Görülme sıklığı %1-2'dir (84, 85).

ROS1 Testinin Yapıldığı Yöntemler

ROS1 İHK

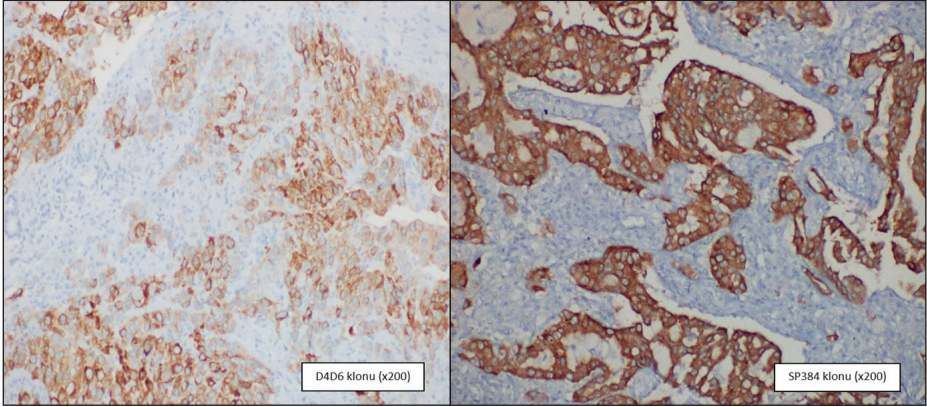
ROS1 immünohistokimya yöntemini bir tarama testi olarak kullanabilir. Ancak, ROS1 İHK testi henüz ALK'da olduğu gibi valide edilmediğinden İHK ile pozitif olsa bile elde edilen pozitif sonuçlar moleküler/genetik yöntemlerle doğrulanmalıdır (85-88). ROS1 immünohistokimyasal çalışmada D4D6 veya SP384 klonlarının kullanımı önerilmektedir. Füzyon partnerine göre boyanma paternleri: granüler sitoplazmik veya fokal veya yaygın yoğun şekilde boyanmış agregatlar; belirgin membranöz ve zayıf sitoplazmik boyanma, solid sitoplazmik boyanma şeklindedir. Pnömositler, makrofajlar ve dev hücrelerdeki ROS1 ekspresyonu nedeniyle yanlış pozitifliğe neden olabilir (87-89).

Skorlama sistemleri:

- Modifiye H-Skoru (7): yoğunluk: 3+ (güçlü: x2 veya x4'lük objektifte açıkça izlenen), 2+ (orta: x10 veya x20 objektif), 1+ (zayıf: x40 objektif), 0 (boyanma yok). Boyanan tümör hücrelerinin yüzdesi herbir boyanma yoğunluğuyla çarpılır 0, 1, 2, 3 yoğunluğuyla çarpılır).
- Eşik değerler: H-skor ≥ 100 pozitif, H- skor cutoff ≥ 150 .
- Pozitif durum: Total tümör hücrelerinin %30'unda $\geq 2+$ yoğunluk.

Her pozitif boyanma FISH veya YND gibi yöntemlerle doğrulanmalıdır (90).

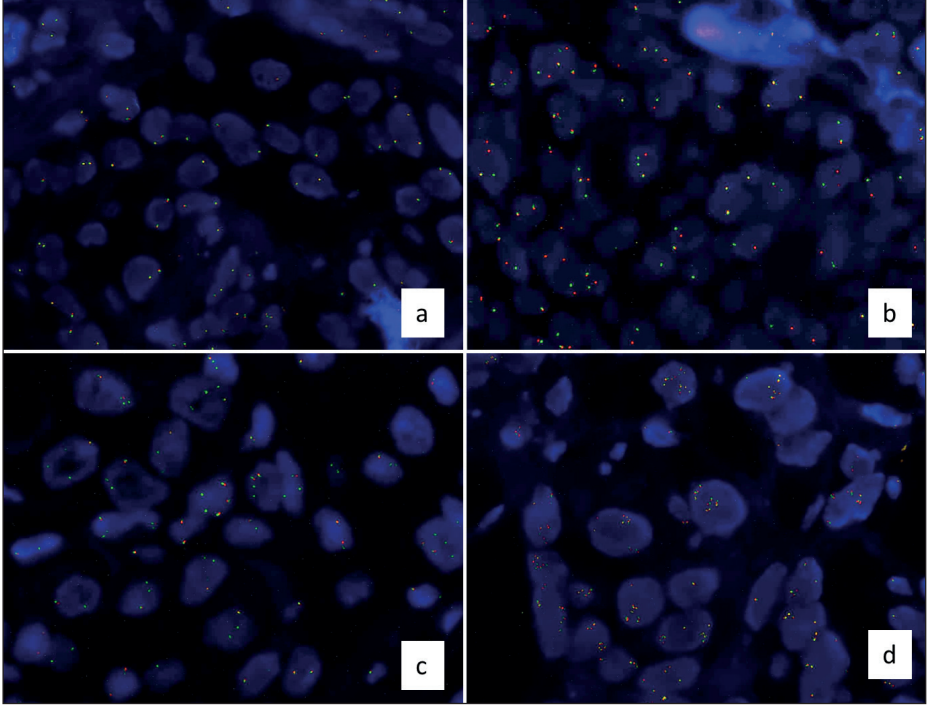
Şekil 7: ROS1 immünohistokimyasal pozitif akciğer adenokarsinom örnekleri



ROS1 FISH Testi

ROS1 break-apart problemleri ile FISH testi uygulanmalıdır. ROS1 FISH testinde ALK'ya benzeri değerlendirme yapılır. ALK FISH testinde yer alan parametreler ROS1 FISH testi için de geçerlidir. En az 50 skorlanabilir tümör hücresi bulunmalıdır. Tümör hücrelerinin ≥ 15 'inde ROS1 rearanjmanı bulunması durumunda ROS1 pozitif kabul edilmektedir (Şekil 8) (91).

Şekil 8: Akciğer adenokarsinom örneklerinde ROS1 FISH paternleri



a) Normal (negatif) ROS1 paterni: iki füzyon veya birbirine yakın yeşil ve kırmızı sinyal izlenmektedir. b) Tipik ROS1 split patern: Füzyon ve yeşil ve kırmızı sinyaller arasında birden fazla sinyal boyutunda ayrılma bulunmaktadır. c) İzole 3' uçlu ROS1 paterni: Bir veya daha fazla izole yeşil sinyal ve intakt füzyon sinyali göstermektedir. FISH: floresan in situ hibridizasyon. d) ROS1 gen kopya sayısı kazanımı: Negatif ROS1 paterni

ROS1 Direnci

ROS1 direnci mekanizmaları TKI tedavisinden sonra farklı kazanılmış direnç mekanizmaları bildirilmiştir (92, 93). Bu vakaların %50-60'ında, G2032R en sık görülen direnç olmak üzere sekonder ROS1 mutasyonları çok önemli bir etkindir. Mevcut ROS1-TKI'lerinin çoğu G2032R-mutant varyantına karşı hiç etkili olmamaları veya yalnızca orta düzeyde etkinlik göstermelerinden dolayı, bu mutasyonun saptanması tedavi kararları etkileyecektir.

Şekil 9: ALK ve ROS1 FISH Testinde Değerlendirme

Negatif	Pozitif	Şüpheli
<5 pozitif hücre / 50 tümör hücresi ya da <%10 pozitif hücre	>25 pozitif hücre / 50 tümör hücresi ya da >%50 pozitif hücre	50 hücrede 5-25 pozitif hücre varsa (pozitif hücre oranı %10-50 ise) 50 hücre daha <%15 (<15/100) NEGATİF ≥%15 / (≥15/100) POZİTİF

ALK ve ROS1 Moleküler Tanısında Diğer Teknikler

ALK'nın kırılma noktaları ekzon 19 ve 20'de bulunur ve en sık ALK füzyon partnerleri EML4, NPM1, CLTC, TPM3, RANBP2, STRN, ATIC, KIF5B, TPM4, TFG ve HIP1'dir. ROS1'in kırılma noktaları 32, 34, 35 ve 36 ekzonlarında bulunur ve en sık partnerler SLC34A2, CD74, TPM3, SDC4, EZR, LRIG3, FIG veya GOPC, MSN, KDELR2 ve CCDC6'dir (177).

FISH ve İHK gibi in situ doku tayinlerine ek olarak, ALK ve ROS1 gen yeniden düzenlemelerinin tespiti için RT-PCR'ye veya YND'ye dayalı yöntemler de kullanılmaktadır. RT-PCR ALK gen yeniden düzenlemelerini saptamak için basit ve nispeten ucuz bir yöntemdir, ancak formalin fikse formaline gömülü doku örneklerinden RNA ekstraksiyonu zor olabilir. Bu prosedürde, RNA ters transkriptaz ile tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. Daha sonra belirli füzyon varyantlarını saptamak için füzyona spesifik primerler ile PCR ile amplifiye edilir. Bu nedenle, daha önce tanımlanan varyantları ayırt etmek için çoklu testler gereklidir (65). Ek olarak, multipleks RT-PCR içeren protokoller ile çok hassas PCR tabanlı yöntemler akciğer kanserinde ifade edilen ALK füzyon transkriptlerinin aşırı ekspresyonunu saptamaktadır (178).

Ancak normal ve hiperplastik akciğer dokusunda da ROS1 geni ifade edildiğinden bu yöntem ROS1'e kolayca uygulanamaz. Bu sınırlamalara ek olarak yeni ALK ve ROS1 füzyon partnerleri de keşfedildiğinden dolayı RT-PCR'ın nadir varyantları kaçırma olasılığı bulunmaktadır. Bu nedenler klinik uygulama bu tekniğin kullanımını sınırlamıştır.

Yeni nesil dizileme yöntemi ile ALK ve ROS1 gen füzyonlarının saptanmasında sadece nanogramlar düzeyinde RNA gerekmesi, parafine gömülü dokularda nispeten düşük başarısızlık oranları göstermesi ve füzyon partnerinden bağımsız olarak spesifik değişikliğin tespitine ek olarak birden fazla genin aynı anda test edilmesine de olanak sağlamaktadır (150, 151, 179).

BRAF Mutasyonu

BRAF geni RAF ailesine ait bir serin/ treonin kinaz proteinini kodlar ve etkilerini ağırlıklı olarak MEK'in fosforilasyon aracılı aktivasyonu yoluyla gösterir. KHDAK hastalarının %2-4'ünde BRAF mutasyonları bildirilmektedir. EGFR mutasyonlarından ve ALK veya ROS1 yeniden düzenlenmelerinden farklı olarak, BRAF mutasyonlarının eski/halen sigara içenlerde bulunma olasılığı daha yüksektir. Adenokarsinom, papiller ve mikropapiller morfolojide siktir (94).

Mutasyonların çoğu nokta mutasyonu şeklindedir, 15. ekzonda 600. kodonda meydana gelir ve bunların çoğu V600E nokta mutasyonudur. V600E mutasyonuna sahip BRAF proteini yapısal aktivasyon gösterir, herhangi bir sinyale ihtiyaç duymaksızın MAPK yolağını sürekli aktive eder ve tümör oluşumunu uyarır. BRAF V600 mutasyonu bulunduran non-skuamöz KHDAK'da BRAF/MEK inhibitörlerinin (Dabrafenib + Trametinib) kullanımının onay almasından sonra, bazı rehberlerde BRAF mutasyon analizlerinin birinci basamak testler arasında yer alması önerilmektedir. Şu anda non-V600E KHDAK'larının tedavi yönetimi için net bir fikir birliği bulunmamaktadır (95).

Akciğer kanserlerinde MAPK yolağında yer alan proteinleri kodlayan genlerde (KRAS, NRAS, MAP2K1, GNAS, GNA11) izlenen mutasyonlar BRAF inhibitörü tedavisi alan hastalarda tedavi direnci gelişiminde sorumludur (96).

Gelişmekte Olan Yeni Biyobelirteçler

MET Amplifikasyonu ve MET Ekzon 14 Atlama Mutasyonu

MET (Met proto-onkogen) geni, MET (mezenkimal epiteliyal transisyon faktör, hepatosit büyüme faktörü reseptörü) reseptör tirozin kinaz proteinini kodlar. MET geninde amplifikasyonlar, ekzon 14 atlama mutasyonları ve ekzon 14 delesyonları sonucu PI3K- AKT-mTOR, STAT ve MAPK yolları aktive olur (97). MET mutasyonları; KHDAK vakalarının %1-5'inde bulunur, yaşı, sigara kullanan hastalarda, sarkomatoid karsinomlarda daha siktir ve kötü prognoz ile ilişkilidir (98, 99). MET nokta mutasyonlarını saptamada YND, amplifikasyonları saptamada FISH yöntemleri kullanılmaktadır. MET: CEP7 oranı ≥ 5.0 olarak tanımlanan yüksek seviyeli amplifikasyona sahip hastalar MET inhibitörlerine yanıt verebilir (100). MET mutasyonu ve yüksek seviyede MET amplifikasyonu bulunduran KHDAK vakalarında TKİ (capmatinib, crizotinib) kullanılabilir (101).

HER2/ERBB2 Mutasyonu

HER2 (insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, erbB-2 reseptör tirozin kinaz 2) geni, ErbB ailesi reseptörlerinden biri olan membrana bağlı bir reseptör tirozin kinazı kodlar (102).

KHDAK'da HER2'nin en yaygın mutasyonu ekzon 20 çerçeve içi insersiyonudur (A775_G776insYVMA) ve KHDAK vakalarının %1-3'ünde bildirilmiştir. Yaşlı, sigara içmemiş ve

kadın hastalarda daha sıktır (103). HER2 mutasyonları, diğer tanımlanmış onkojenik değişikliklerle birbirini dışlayan bir şekilde meydana gelir, ancak bazen diğer genlerdeki değişikliklerle birlikte başka mutasyonlar ve amplifikasyonlar da gözlenmiştir. Diğer genlerde olduğu gibi, direnç mekanizmaları tanımlanmıştır ve HER2 amplifikasyonunun kendisi, TKI tedavisi ile tedavi edilen EGFR mutasyona uğramış KHDAK'da bildirilen bir direnç mekanizmasıdır (102).

HER2 mutasyonu bulunduran KHDAK vakalarının anti-HER2 (Ado-Trastuzumab Emtansine, Trastuzumab Deruxtecan) tedavisine yanıt verebildiği bildirilmektedir (104, 152).

RET Füzyonu

RET (Ret proto-onkogen) geni, tirozin protein kinaz ailesinden bir proteini kodlar. RET aktivasyonu, RAS-MAPK ve PI3K-AKT dahil olmak üzere multipl aşağı akış sinyal yollarının stimülasyonu ile sonuçlanır.

ALK ve ROS1 translokasyonlarına benzer olarak genç, sigara içmeyenlerde ve kadınlarda daha sıktır (105).

Bu yeniden düzenlemeler KHDAK'da EGFR, KRAS, ERBB2 ve BRAF mutasyonları ve ALK ve ROS1 füzyonları dahil olmak üzere diğer onkojenik değişikliklerle görülmez, RET füzyonlarının akciğer kanserinde bağımsız onkojenik sürücüler olduğunu gösterir. RET füzyonunu saptamada optimal bir yöntem halen bulunmamakta, FISH ve YND yöntemleri en sık kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. FISH taraması yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir, çünkü tüm RET lokusundaki yeniden düzenlemeler, fonksiyonel onkojenik füzyon ile sonuçlanmaz. Bu durumda, RNA sekanslama önemi bilinmeyen bu yapısal varyantları netleştirmeye yardımcı olabilir. Mevcut yönergelerde RET füzyonlarının varlığı için ileri KHDAK'lı hastalarda tek gen testi tek başına tavsiye edilmemektedir. RET analizi, herhangi bir büyük çoklu gen panel testinin parçasını oluşturmaktadır (106).

Şu anda yeni, daha seçici RET hedefli tedaviler ile (örn. selpercatinib ve pralsetinib) daha etkili klinik etkinlik görülmektedir. Özellikle selpercatinib'in FDA onayı ile RET füzyonları için testlerin artık ileri evre KHDAK'lı tüm hastalarda uygulanması önerilmektedir (107).

KRAS Mutasyonu

KRAS (Kirsten ras onkogen) geni küçük GTPaz ailesinden bir proteini kodlar. KRAS proteinindeki aşırı aktivasyonun nedeni sıklıkla 12., 13. ve 61. kodonlarda meydana gelen tek bir amino asit değişikliğidir. KRAS aktivasyonunu RAF, MEK ve ERK proteinlerinin aktivasyonları takip eder (108). KHDAK'da sürücü mutasyonlardan biri olan KRAS mutasyonu akciğer adenokarsinom %25-30'unda görülür. Sigara içenlerde, erkeklerde, müsinöz adeno karsinom ve mikropapiller adeno karsinomda daha sıktır (109, 110).

KRAS mutant KHDAK hastalarında TKİ ve kemoterapiye iyi cevap alınamamakta, bu hastaların prognozlarının KRAS mutasyonu bulundurmeyen hastalara oranla daha kötü olduğu bildirilmektedir (109).

Akciğer kanserinde KRAS mutasyonu, kolorektal kanserdeki sıklıkla G'den A'ya geçişin aksine, sıklıkla G'den T'ye dönüşüm ile karakterizedir. Sigara dumanındaki aromatik hidrokarbon sık G>T dönüşümüne neden olur. Kodon 12'de KRAS mutasyonunda en az 6 amino asit yer değiştirmesi vardır. KHDAK'nın %13'ünde KRAS G12C mutasyonu bulunmaktadır. Mutant KRAS genel olarak daha zayıf GTPaz aktivitesine sahipken, KRAS G12C mutasyonu GAP aracılı hidrolizinin azalmasına rağmen neredeyse doğal tipte GTPaz aktivitesine sahiptir. Son zamanlarda sotorasib gibi KRAS G12C inhibitörlerinin klinik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (108-110).

EGFR, ALK, ROS1, BRAF, RET ve KRAS mutasyonu genellikle birbirini dışlayan mutasyonlardır. EGFR/ALK/ROS1 mutasyonu saptanmayan hastalarda tek başına KRAS mutasyonu bakılabilir. KRAS mutasyonu saptanır ise bu hastalarda başka bir sürücü mutasyon bulunma ihtimali çok düşük olduğundan ek moleküler testlere (BRAF, RET vb.) gerek olmamaktadır. Çoklu gen panelleri uygulayan merkezlerde panellere KRAS geninin de eklenmesi önerilmektedir (111).

NRG1 (Nörogulin 1)

NRG1 geni; hücreler arası sinyal iletiminde görev alan membran proteinini kodlar. NRG1 geninde izlenen füzyonlar sonucu PI3K-AKT yolağı aktive olur ve hücre proliferasyonu uyarılır (112). KHDAK vakalarının %1'inden azında NRG1 füzyonları görülmekte; kadınlarda, sigara içmeyenlerde ve invaziv müsinöz adeno karsinomlarda NRG1 füzyon sıklığı artmaktadır. NRG1 füzyonları saptamada RNA bazlı YND yöntemlerinin kullanımı önerilmektedir (113). NRG1 füzyonu bulunduran KHDAK vakalarının afatinib tedavisine iyi yanıt verdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (114).

Tablo 4: KHDAK’da Tedavi Hedefi Olan Genler, Tedaviye Yanıt ve Tedavi Direnci İle İlişkili Mutasyonlar* (153, 154)

Gen	En sık mutasyon	İlaç	Direnç mekanizması
Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)	-EGFR 21. ekzon L858R mutasyonu -EGFR 19. ekzon delesyonları	Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, Dacomitinib, Osimertinib	-EGFR T790M, C797S mutasyonları, 20 . ekzon insersiyonları -Diğer genlerde mutasyonlar (TP53, PIK3CA, KRAS, MET vb.) -Küçük hücre transformasyonu
Anaplastik lenfoma kinaz (ALK)	-ALK füzyonları	Crizotinib, Brigatinib, Certinib, Alectinib, Lorlatinib	-ALK nokta mutasyonları (özellikle 1123.-1269. kodonlar arası) -ALK kopya sayısı değişimleri -Diğer genlerde mutasyonlar (EGFR, MET, SRC vb.) -Küçük hücre transformasyonu
ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz (ROS1)	-ROS1 füzyonları	Crizotinib, Ceritinib, Entrectinib	-ROS1 G2032R, D2033N, L2026M, S1986F/Y mutasyonları -Diğer gen mutasyonları (TP53 vb.)
B-Raf proto-onkogen, serin/ treonin Kinaz (BRAF)	-BRAF V600 mutasyonları	Dabrafenib+ trametinib	-MAPK sinyal yolağı aktivasyonları
Human epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2, ERBB2)	-HER2 20. ekzon insersiyonları -HER2 duplikasyonları	Ado-trastuzumab emtansin, Fam-trastuzumab deruxetecan-nxki	-HER2 C805S mutasyonu -PIK3CA mutasyonları -HER2 kopya sayısı değişimleri
RET proto-onkogen (RET)	-RET füzyonları	Selpercatinib, Cabozantinib Alektinib, Apatinib, Vandetanib, Pralsetinib	-RET V804L, G810A mutasyonları
MET proto-onkogen, reseptör tirozin kinaz (MET)	-MET 14. ekzon atlama mutasyonları -MET amplifikasyonu	Crizotinib, Cabozantinib, Capmatinib, Tepotinib	-MET Y1230C, D1228N mutasyonları -Diğer gen mutasyonları
Nörotropik reseptör tirozin kinaz (NTRK)	-NTRK 1,2,3 füzyonları	Larotrectinib, Entrectinib	-NTRK nokta mutasyonları (NTRK1 G595R, F589L, G667S) (NTRK3 G623R, G696A) -IGFIR yolağı aktivasyonu
KRAS proto-onkogen, GTPaz (KRAS)	G12C	Adagrasib, Sotorasib	-İkinci KRAS mutasyonları

*NCCN, ESMO rehberleri ve Suster DI, Mino-Kenudson M. Molecular Pathology of Primary Non- small Cell Lung Cancer. Arch Med Res. 2020 Aug 29:S0188-4409(20)31460-0 referans alınarak hazırlanmıştır.

TMB (Tümör Mutasyon Yüğü)

TMB; milyon baz başına düşen nonsinonim mutasyon sayısıdır. TMB yüksek tüm solid tümörlerde immünoterapi ilacı olan pembrolizumab onay almıştır. TMB hesaplamak için en ideal yöntem tüm ekzon sekanslamadır (115). Yayınlarda yüksek-TMB için farklı ‘cut-off’ değerleri kullanılmakta, bu değerler 10-20 arasında değişmektedir (116, 117).

Ekzon sekanslama dışında, çok sayıda (yüzlerce) gen içeren YND panelleri ile de TMB hesaplanabilmektedir.

NTRK Füzyonları

Nörotrofik tirozin reseptör kinaz genlerini (NTRK1-3) içeren somatik füzyonlar, KHDAK dahil çeşitli tümörlerde düşük prevalansta (<%) ortaya çıkan nadir onkogenik etkenlerdir. NTRK genlerinde nokta mutasyonları tedavi için uygun genetik mutasyonlar değildir (168).

NTRK füzyonları KHDAK’ları arasında diğer sürücü mutasyonlar gibi özellikle adenokarsinomda görülse de skuamöz hücreli ve diğer akciğer karsinomlarında da saptanabilir, bu nedenle histolojik tip genetik araştırma için dışlayıcı değildir. NTRK füzyonları özellikle sigara içmemiş hastalarda mevcuttur (169, 170).

NTRK1-3 gen füzyonları, larotrectinib (LOXO-101) ve entrectinib (RXDX-101) ilaçlarının etkin olduğu hedeflenebilen onkojenik TRKA-C füzyon proteinlerini kodlar.

NTRK füzyonları bu proteinlerin sürekli yapımına neden olarak tirozin kinaz aktivitesini oluşturur ve tümörde sürücü mutasyon olarak işlev görür (39, 51, 171).

NTRK füzyonları KHDAK'da son derece nadirdir (%0.1-%1). Bilinen diğer sürücü mutasyon olmayan hastalarda %3 bulunmuştur. KHDAK için güncel önerilerden biri önceden beri bilinen ve daha sık görülen sürücü mutasyonların taranması ve bu sırada Pan-TRK immunhistokimyası ile ön tarama yapılması, eğer sık görülen mutasyonlar negatif ise FISH / ya da YND ile NTRK testi yapılmasıdır (Şekil 7) (12).

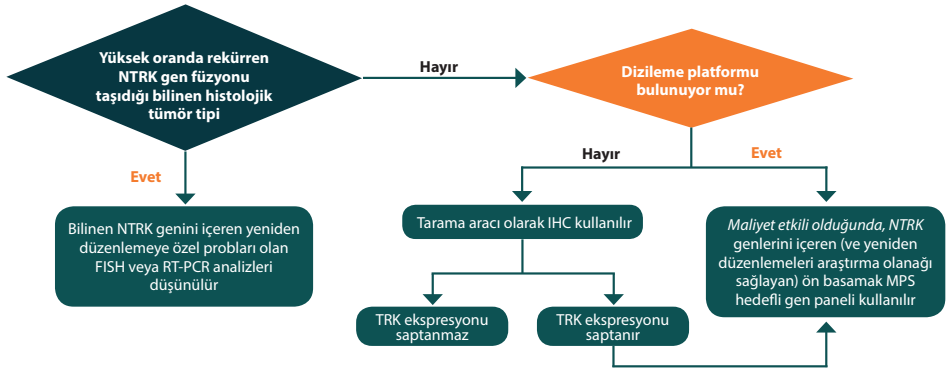
EPRI7341 klonunu (Abcam/Ventana) kullanarak pan-TRK immunhistokimyasal değerlendirme, NTRK1-3 gen yeniden düzenlemelerinin FISH, RT-PCR ya da NGS sonuçlarıyla önemli ölçüde uyumluluk göstermiştir. Bu konuda literatürde henüz sınırlı sayıda araştırma olmasıyla birlikte uygulanabilir bir tarama testi olarak kabul edilmektedir. Ancak IHC ile yanlış pozitiflik olabileceği unutulmamalıdır (14).

KHDAK'da NTRK füzyonları için test rehberleri netleşmese de literatürde bazı öneriler mevcuttur (20, 27, 49).

Pan-TRK immun pozitifliği NTRK füzyonlarını saptamada spesifik değildir. Özellikle nöroendokrin tümörlerde yanlış pozitifliğin görülebildiği belirtilmektedir (53, 73).

KHDAK 'larında NTRK füzyonları NTRK1 ve daha az oranda NTRK3 füzyonları olarak bildirilmiştir.

Şekil 10: ESMO tarafından önerilen NTRK gen füzyonu saptama algoritması*



ESMO: Avrupa Medikal Onkoloji Derneği FISH: floresan in situ hibridizasyon IHC: İmmünohistokimya MPS: Masif paralel dizileme; NTRK: Nörotrofik reseptör tirozin kinaz RT-PCR: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu.

*Reis-Filho JS hazırlanırken ESMO Çalışma Grubu adına Marchio C'den uyarlanmıştır. (ESMO 2018 Kongresi; 19-23 Ekim 2018; Münih, Almanya)

Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri; aynı anda çok fazla nükleik asit (DNA veya RNA) parçasını dizilemeye imkan veren, yüksek çıktılı teknolojilerdir (118). YND yöntemleri ile bir hücrenin genomu veya ekzonu yanı sıra, kullanılan cihaza göre değişiklik göstermekle birlikte, eş zamanlı olarak onlarca hastanın onlarca geni dizilenebilmektedir. YND ile elde edilen yüksek veri çıktısının işlenmesi ve sekans verilerinin yorumlanması için güçlü bir biyoinformatik destek gerekmektedir.

Nükleik asit izolasyonu sonrası analiz edilmek istenen gen bölgeleri çoğaltılmakta ve nükleotid dizisi ortaya çıkarılmaktadır. Gen bölgelerini çoğaltmak için farklı yöntemler (amplifikasyon ve hibridizasyon bazlı) kullanılabilir; nokta mutasyonları, küçük insersiyon-delesyonlara ek olarak kullanılan yöntemlere göre füzyonlar da saptanabilmektedir.

YND ile aynı anda birçok hastaya ait birçok gen bölgesinin analiz edilebilmesi; hem DNA hem RNA sekanslamaya imkan vermesi; nokta mutasyonları, küçük insersiyon delesyonlar yanı sıra makro düzeyde mutasyonların (amplifikasyon, füzyon vb) saptanabilmesi nedenleri ile KHDak'da uygulanan moleküler testler için önerilen bir yaklaşım halini almaya başlamıştır. ESMO non-skuamöz KHDak vakalarında rutin olarak YND kullanılmasını önermektedir (119). YND yapılan merkezlerde gerekli iç ve dış kalite çalışmalarının yapılmasının önemi de vurgulanmaktadır.

KHDak başta olmak üzere birçok solid tümörde hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesi amacı ile kullanımı FDA (Food and Drug Administration) tarafından onay almış birçok YND panelleri (FoundationOne CDx, MSKIMPACT vb.) bulunmaktadır (120).

Likit Biyopsi-ctDNA Analizi

Dolanan kanda bulunan tümöre ait DNA'nın plazmadan izolasyonu ve analizi, KHDak başta olmak üzere bir çok kanser türünde klinik tedavi kararı öncesi tedaviye yön verecek potansiyele sahip bir araçtır.

Akciğer kanserinde güncel likit biyopsi kullanımı özellikle primer EGFR aktive edici mutasyonu olan hastalarda direnç geliştiğinde doku biyopsisi alımı zor olduğunda yada hızlı sonuç için önerilir (detaylar için KHDak EGFR Mutasyon testi).

Öneriler

Moleküler testler için doku biyopsisi altın standarttır ancak dokunun yetersiz ya da sınırlı olduğu veya biyopsi alınamadığı durumlarda EGFR mutasyonlarının saptanması için ctDNA testleri kullanılabilir. Ancak testin sensitivitesinin çeşitli nedenlere bağlı olarak %70 olduğu belirtilmektedir (173).

KHDak'nin ilk tanısı için ctDNA'nın kullanımı destekleyecek yeterli kanıt yoktur. Progrese olan ya da EGFR Tirozin Kinaz inhibitörlerine direnç gelişen KHDak hastalarında EGFR-T790M mutasyonunun saptanması için ctDNA metotları kullanılabilir. Negatif bir likit

biyopsi sonucu hangi yöntemle test edilmiş olursa olsun tümör biyopsisi alınarak dokudan tekrar test edilmeli ve doğrulanmalıdır. ctDNA izolasyonu için serum yerine plazmanın tercih edilmesi önerilir.

Moleküler testlerin hem doku örneği hem de likit biyopsi ile çalışılması daha fazla hastanın tespit edilmesine olanak sağlayabilir.

EGFR aktive edici mutasyonlar ve T790M mutasyonunun tespiti için valide edilmiş ve duyarlılığı yüksek PCR temelli metotlar kullanılmalıdır.

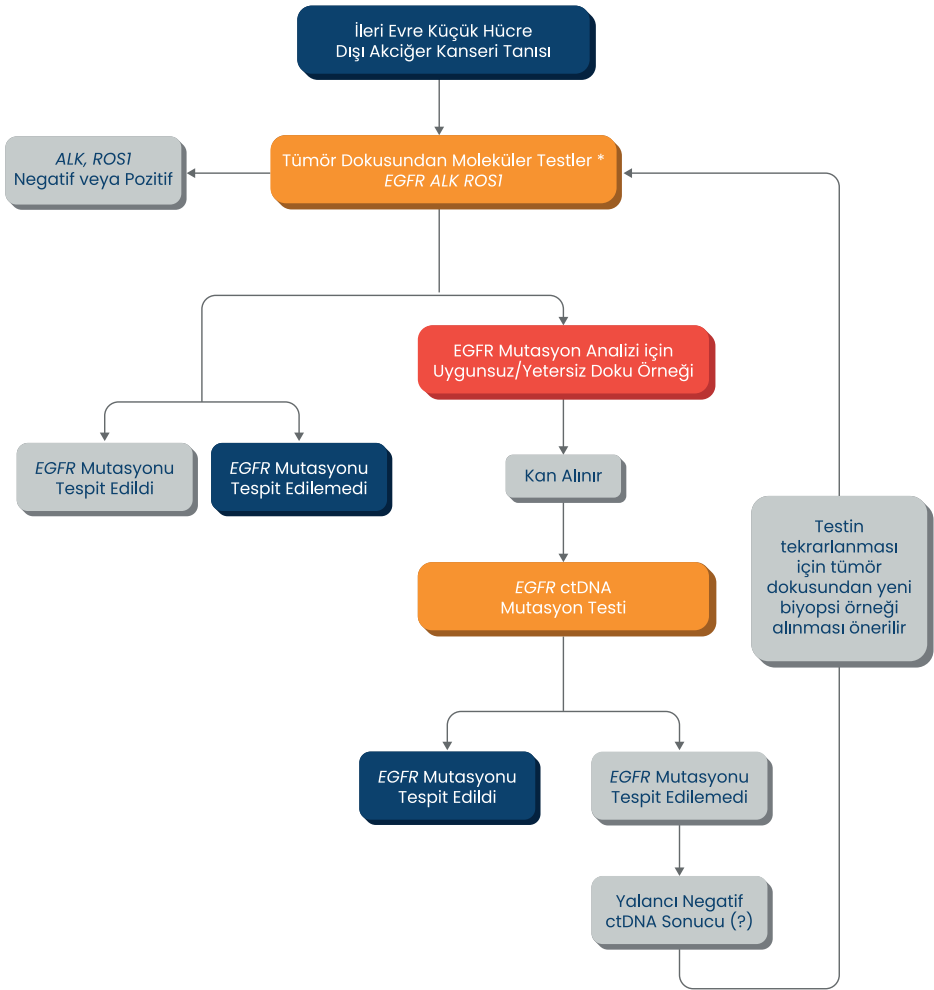
PCR temelli metotlar ALK ve ROS1 rearanjmanlarının tespiti için henüz standardize edilmemiştir.

Kanser hastalarının progresyon açısından klinik çalışmalar haricinde ctDNA moleküler testleri ile non-invaziv olarak takip edilmesi için henüz yeterli kanıt yoktur.

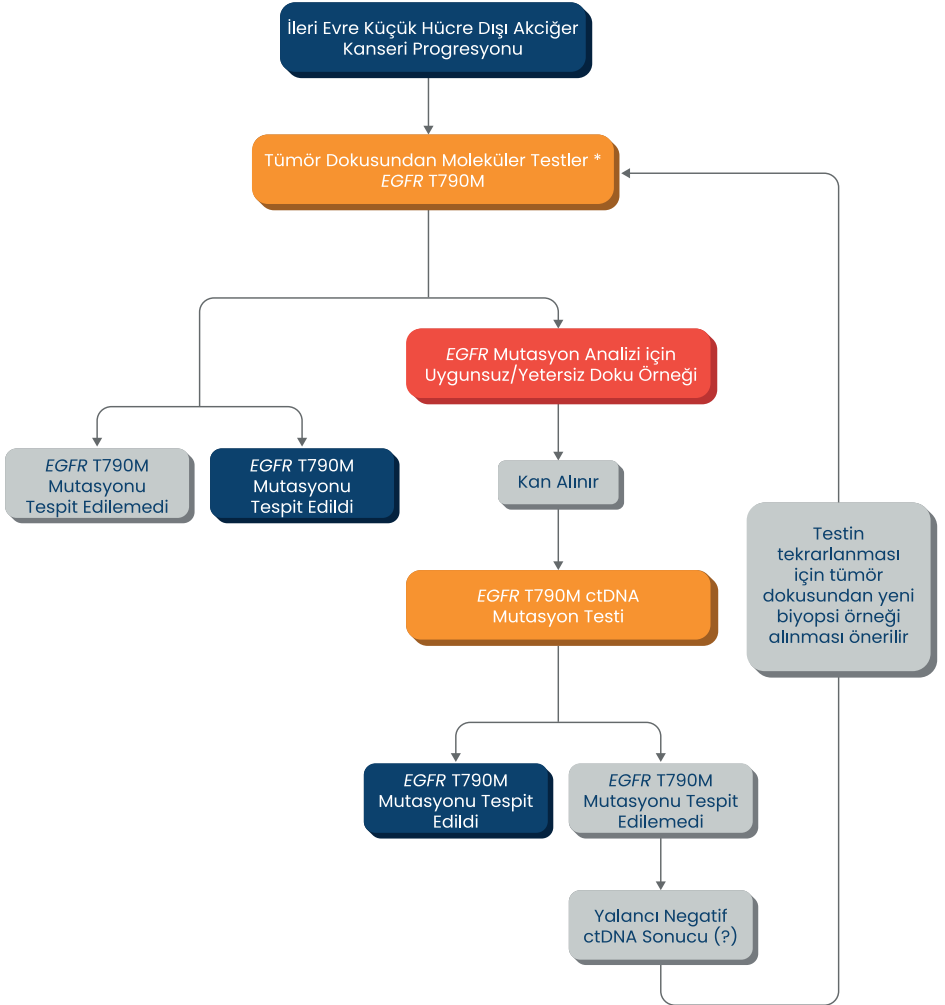
Primer KDDAK, EGFR ve diğer mutasyonların ya da direnç/progresyon sırasında EGFR -T790M mutasyonlarının saptanması amacı ile dolanan kanda tümör hücrelerinin (CTC) moleküler analizi için henüz yeterli kanıt yoktur.

Immüno-onkolojide likit biyopsinin kullanımı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir ancak günümüzde rutin kullanımda değildir.

Şekil 11: KHDAK İlk Tanı Anında Önerilen Test Algoritması (121-127)



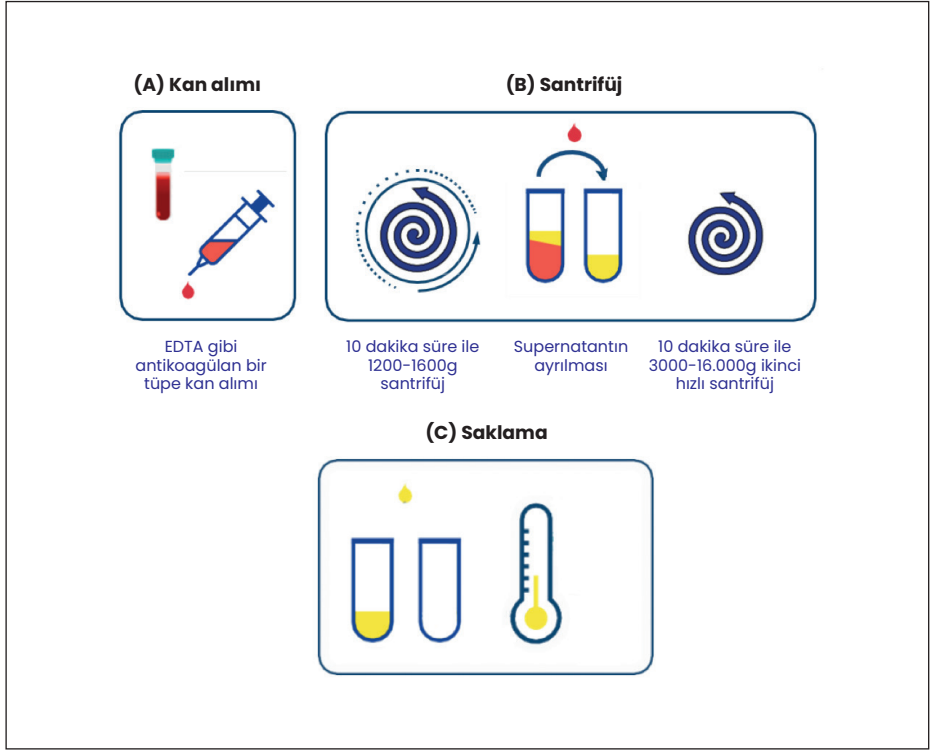
Şekil 12: Progrese KHDAK İçin Önerilen ctDNA Test Algoritması (121-127)



Akciğer Kanserinde Likit Biyopsi için Önerilen Uygulama Esasları

- Plazma izolasyonu ve ctDNA ekstraksiyonu için EDTA tüpleri ya da ctDNA prezervatif özel tasarlanmış tüplere en az 10 ml kan alınması önerilir.
- EDTA tüplerine test yapılacak merkezde örnek alınması ya da tüplerin 30 dakika içerisinde testin yapılacağı merkeze nakledilmesi önerilir.
- EDTA tüplerindeki örneklerinin işlenmesi için önerilen azami süre 4 saat ve ctDNA prezervatif tüpler için önerilen azami süre 3 gündür. Bazı protokollerde 7 güne kadar kan saklanabilmektedir.
- Kan örneği hangi tüp ile alınmış olursa olsun dondurulmamalıdır.
- Plazma izolasyonu için tüplere alınan örneklerin iki defa santrifüj edilmesi önerilir;
 - Tam kan örneği 800–2,000 x g'de 10 dakika santrifüjlenmeli, plazma üst fazı ayrılmalı (beyaz kan hücresi tabakasını bozmaktan kaçının) ve yeni bir tüpe transfer edilmelidir.
 - Plazma 2.000–16.000 x g'de 10 dakika santrifüjlenmelidir.
 - Yüksek hızda döndürme mümkün değilse, hiç ilave döndürme yapılmaması yerine üst fazın düşük bir hızda ikinci kez döndürülmesi önerilir.
- DNA ekstraksiyonu, küçük fragmente DNA ekstraksiyonu için tasarlanmış kitler ile yapılmalıdır.
- Ekstraksiyon sonrası ctDNA analizi için valide edilmiş qPCR, ddPCR, BEAMing ve multipleks NGS panelleri kullanılabilir.
- Likit biyopsi sonucu için önerilen raporlama süresi 2 haftadır (10 iş günü).
- Likit biyopsi raporunda kullanılan test platformu, klinik ve analitik sensitivite (tespit sınırı), spesifite, test sonucunda bulunan moleküler değişimler ve yorum kısmı bulunmalıdır.

Şekil 13: Likit Biyopsi ctDNA testi için önerilen pre-nalitik süreç (121-127)



PD-L1 Testi

İmmün kontrol noktası inhibitörleri, ileri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinin tedavisini yeni bir çağa geçirmiştir.

İmmünoterapi seçeneği için belirlenecek hastalarda biyobelirteç arayışı henüz son halini almasa da tümör dokusunda PD-L1 araştırması önerilmektedir. Tümörün inflamasyon yoğunluğu, tümör antijenlerinin yoğunluğu, tümör mutasyon yükü, mikrosatellit instabilite durumu, hastanın immün supresyon durumu gibi diğer belirteçler de günlük kullanıma girmeye adaydır.

Şekil 14: İmmüno onkolojide biyobelirteçler (128, 130)

Tumor antijenleri

Tümörü yok etmek için konak immün sistemi tarafından yabancı olarak algılanan tümörün ürettiği antijenler^{1,2}
TMB | MSI-H/dMMR | Neo antijenler

İmmün supresyon

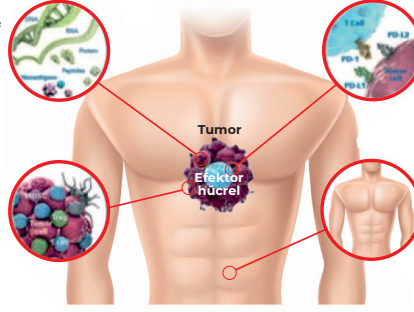
T hücre aktivasyonu supresyonu, T hücre tükenmesini teşvik edici ya da reg T hücrelerini aktive eden immün sistemi frenleme amaçlı mekanizmalar^{4,5}
LAG-3 | Tregs | MDSCs | IDO

Inflame tumor

İmmün hücre infiltrasyonu ve tümör mikroçevresinin aktivasyonuna dair kanıtlar sunan bir tümör alt grubu³
PD-L1 | PD-L2 | TILs | İnflamasyon gen imzası

Konak çevresi

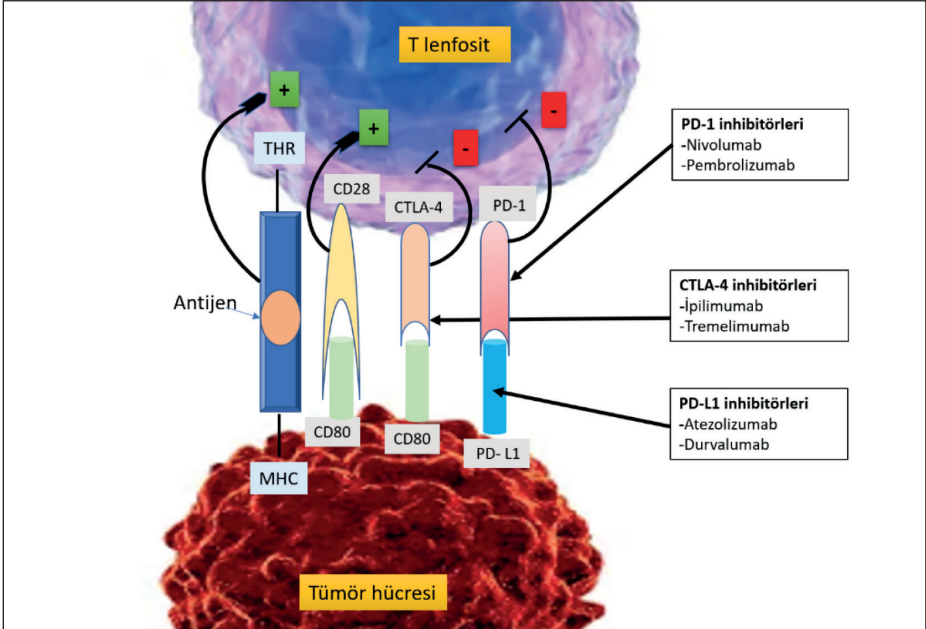
Her bireydeki farklı faktörler kanserin başlamasını, ilerlemesini ve/veya kanser tedavisine verdiği cevabı etkiler⁶
Mikrobiota | Germline mutasyonları



*Efektör hücreleri veya NK hücresi.

İmmüno onkolojide farklı ilaçlar rutindeki yerlerini almışlardır. Bu ilaçlar arasında öne çıkanlar ve neye karşı geliştirildikleri Şekil 12'de özetlenmiştir.

Şekil 15: (133)



Anti PD-1 ve Anti PD-L1 ajanları son eklenenler olup bunların verileceği hasta seçimleri için ilaç üreticisi firmalar farklı diagnostik firmalar ile işbirliği içerisinde çalışmıştır. İmmünohistokimyasal boyama cihazları olarak iki firma öne çıkmaktadır; DAKO (Agilent firmasına ait) ve Roche Diagnostics. Bu iki firmanın ürettiği farklı PD-L1 primer antikorların KHDAK'larında ekspresyonunu değerlendiren retrospektif ve prospektif çalışmalar ve ilaç kullanımı ile anlamlı ilişkileri olup olmadığını test eden pek çok araştırma literatürde yerini almıştır (131, 133-135).

Anti PD-1 ve Anti PD-L1 ilaçları dokuda tümör ve tümör ilişkili lenfositlerde (TIL) PD-L1 pozitifliğinin biyobelirteç olarak kullanılması kabul görmüş durumdadır. Bugün artık Amerika'da CAP /AMP ve Akciğer patoloğları ile pek çok Avrupa ülkesinde KHDAK hastaları hedefli tedaviler için moleküler testler yanı sıra PD-L1 testi de uygulanmaktadır (133).

Tablo 5: Rutinde KHDAK için ilaç Firmaların da ilişkili Olduğu 5 PD-L1 Primer Antikoru ve 2 İmmünohistokimya Cihazı ile Çalışma Önerileri*

İlaç	PD-L1 Diagnostik Antikor Klonu	PD-L1 “+”lık sınırı	Platform
Nivolumab	28-8	≥%1 tümör hücresi (TH)	DAKO Link 48 Autostainer
	SP263	≥ %1, ≥ %5 ve ≥ %10 TH	VENTANA BenchMark
Pembrolizumab	22C3	≥%1 TH %1-49 TH PD-L1 + ≥%50 tümör hücresi	DAKO Link 48 Autostainer
	SP263	≥%50 TH 1.basamak ≥%1 TH 2.basamak	VENTANA BenchMark
Atezolizumab	SP142	≥%50 TH veya ≥%10 TIL	VENTANA BenchMark
Durvalumab	SP263	≥%1 TH Kemoradyoterapi sonrası	VENTANA BenchMark
Avelumab	73-10	≥%1 TH	DAKO Link 48

*Tümör hücresi (TH), TH3=TH >%50 TIL= TIL >%10, TH2/TIL2= TH veya TIL >%5 TH1 /TIL1= TC veya TIL >%1

Tablo 5’de özetlenen her ilaç için farklı PD-L1 immün uygulamalarını, çoğunlukla küçük biyopsi örnekleri ile tanı alan her hastaya uygulanmasının mantıklı ve pratik olmadığı

aşıkardır. Bu nedenle Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği (IASLC- The International Association For The Study Of Lung Cancer) önderliğinde aynı dokularda farklı PD-L1 klonlarını karşılaştıran, Blue Print 1 ve 2 olarak isimlendirilen çalışmalar ve ayrıca Almanya, Fransa ve ABD ülkelerin Akciğer patoloğlarının gerçekleştirdiği karşılaştırma çalışmalarının sonuçları literatürde yerini almıştır (133, 136-139).

Özetle, Hem 22C3 (DAKO), 28-8 (DAKO) ve SP263 (ROCHE Ventana) PD-L1 klonları oldukça birbirine yakın boyanma sonuçları vermiştir ve bu sonuçlar araştırmaya katılan tüm patoloğların yüksek uyumu sonucunda ispatlanmıştır (138). Ancak bazı güncel çalışmalarda VENTANA platformu ile SP263 klonu uygulamasının diğerlerine üstün olduğu belirtilmektedir (155, 156).

Her bir ilaç için farklı eşik değerler (Cut-Off) önerileri olması uygulama zorluklarına neden olabilmektedir. Bu nedenle patoloğun yapması gereken, raporunda hangi primer antikoru hangi platformla uyguladığını açıklamakla, tümör hücrelerinde ve TIL'de pozitiflik durumunu belirtmesi olacaktır (135).

İlaçların kullanım izinleri arasında da farklılıklar bulunmaktadır. 1. basamak KHDAK tedavisine pembrolizumab (MSD) monoterapisi için tümörün PD- L1 durumunun bilinmesi şartı aranmaktadır. Diğer bir deyişle PD-L1 skorlaması pembrolizumab (MSD) için tamamlayıcı, diğer anti PD-1/PD-L1 immünoterapi ilaçları için eşlikçi olarak yorumlanmaktadır (135).

Literatür incelendiğine ilaç endüstrisi ilişkili klonlar dışında bir de LIE3N PD-L1 klonu sıkça kullanılmaktadır. Bu primer antikor da diğer bir immünhistokimya cihazı (Leica BOND) ile uygulanmıştır. Bu antikor diğerleri ile kıyaslayan ve kullanılabilir olduğunu gösteren bir araştırma mevcuttur (140).

PD-L1 Değerlendirmesinde Patoloğun Bilmesi Gerekenler

- PD-L1, B7 ligand ailesine ait tip bir transmembran proteindir (B7-H1). Hematopoetik hücrelerde (dendritik hücreler, makrofajlar, mast hücreleri, T-lenfositler ve B-lenfositler) ve endotel, epitelyal ve tümör hücreleri gibi non-hematopoetik hücrelerde eksprese edilebilir (141).
- Tümör hücre yüzeyinde eksprese edilen PD-L1, regülatör T-hücresi üzerinde eksprese edilen PD-1 bağlanarak T hücresinin inflamatuvar aktivitesini azaltır ve tümörün yabancı olarak tanınmasını inhibe eder; immün sistemin kendi kendine toleransını (down regülasyonunu) sağlar (134, 142).
- PD-L1'in immünohistokimyasal (İHK) boyama ile ekspresyonunun değerlendirilmesi, KHDAK hastalarının arasında PD-L1 inhibitörleri kullanılabilecek olanları seçmek için temel strateji olmuştur.
- PD-L1, başlıca membran inhibitör ligandır ve KHDAK'da immünoterapi biyobelirteç arayışında şimdiye kadar en çok çalışılan metabolittir.
- PD-L1 pozitifliği tümör hücrelerinde >%50 ve üzeri boyanma olan hastalarda anti PD-1/ anti PD-L1 immunterapötik ilaçlarla oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır (135, 142).

- PD-L1, KHDAK hastalarında sigara içenlerde daha yüksek oranda pozitifdir.
- Adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom olgularında PD-L1 pozitifliği karşılaştırıldığında benzer pozitiflik oranı bildirilmektedir (142).
- PD-L1 pozitifliği KHDAK'larında çoğunlukla kötü prognozla ilişkilidir (137, 141, 142).
- Tümörde PD-L1 pozitifliği dinamik bir süreçtir, tedavilerden ve hastanın özelliklerinden etkilenecek değişim gösterebilir; PD-L1, örneğin radyoterapi alan hastada önce negatif iken tedavi sonrası pozitifleşebilir (radyoterapinin apiskobal etkisi) (143, 144).
- Tümörlerdeki PD-L1 pozitifitesi zaman içerisinde değişken olduğu gibi tümörlerde de heterojendir. Bu nedenle mümkün olan en büyük tümör alanına çalışılmalıdır (131, 135).
- Primer tümör ve metastazındaki PD-L1 ekspresyonları eş zamanlı olduğunda paralel bulunmuştur ancak daha sonra gelişen metastazda PD-L1 pozitifliği değişebilir (142).
- PD-L1 immünoterapi için en yaygın kullanılan biyo-belirteç olmasına karşın daha farklı belirteç arayışı da devam etmektedir (157, 158).
- Rutin uygulamaya henüz geçmemekle birlikte Tümörde Mutasyon Yüğü son yıllarda araştırılan parametredir (145). Ancak henüz rutin uygulamalar için standardize edilememiştir (159-161).
- CD8 T lenfosit yoğunluğu, CAR-T oranı, INF- γ yoğunluğu gibi parametreler de araştırılmaktadır, ancak rutin uygulama için yeterli uzlaşa sağlanamamıştır (145, 162, 163).
- İleri evre KHDAK hastasının en az 100 hücre içeren ve en güncel olan doku biyopsisi var ise PD-L1 testi için bu doku tercih edilmelidir.

Preanalitik Dönemde Dikkat Edilmesi Gerekenler

- IASLC PD-L1 değerlendirme rehberi kitabından alınan özet Tablo 6 olarak verilmiştir.
- Dokunun fiksateye konma, fiksasyon süresi bilgileri çok önemlidir (Tablo 6).
- Aşırı fiks edilmiş (fiksatif içinde fazla kalmış dokuların) PD-L1 çalışmaları yalancı negatif olabilir; primer antikor kesite nüfuz etmeyebilir (146).
- 3 yıldan daha eski blokların kesitlerine, 3-6 aydan eski hazır kesitlere yapılmamalıdır.
- 3-5 μ kalınlıkta kesitler pozitif şarjlı lamlara alınmalı, mutlaka pozitif kontrol eklenmelidir (normal tonsil dokusu önerilir).
- Ancak doku biyopsisi yetmediğinde ya da yoksa sitolojik materyaller de PD-L1 testinde kullanılabilir (146, 164, 165).

Tablo 6: Preanalitik Aşamaların Sorunları ve Önlemleri

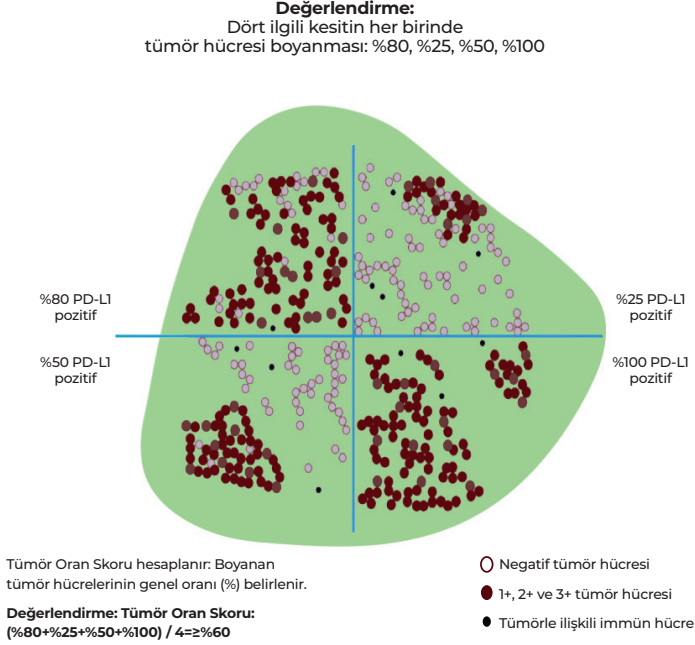
Parametre	Öneri
Soğuk iskemî Süresi	Mümkünse 30 dakikadan daha kısa; en fazla 1 saat
Fiksatif	%10 nötral tamponlu formalin
Fiksasyon süresi (Doku)	6-48 saat
Fiksasyon süresi (Rezeksiyon)	24-48 saat
Hazırlık	3-5 µm kalınlıkta kesilmiş parafine gömülü kesitler
Örneğin saklanması	Doku blokları
Bloklar için saklama süresi	PD-L1 İHK için 3 yıldan daha az
Bloklar için saklama koşulları	Işıktan, sıcaktan, nemden korunmalı
Kesitler için saklama süresi	Saklama koşullarına göre değişken. Kullanılacak testin içeriğine göre karar verilmeli
Dekalsifikasyon	Gerekli ise EDTA

PD-L1 İHK Çalışmasını Değerlendirirken Dikkat Edilmesi Gerekenler

- Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu membranöz boyanma dikkate alınarak değerlendirilmelidir; membranöz boyanmaya eşlik etmeyen tek başına sitoplazmik boyanmalar pozitif sayılmamalıdır (135).
- Tümörün H&E kesitleri ile birlikte değerlendirilmesi morfolojiye hakimiyeti sağlar; kesitteki tüm tümör değerlendirilmiş olur.
- KHDAK'larda PD-L1 testi deneyim gerektiren bir testtir, mümkünse değerlendirici patologlar bir eğitim almalıdır (147, 148).
- On-line eğitim de mümkündür (62).
- Patoloji laboratuvarı ticari olarak kanıtlanmış PD-L1 primer antikoru ve platform kullanmayacaksa, laboratuvarında geliştirilmiş test seçilmiş ise bu testin validasyon çalışmasını yapmış olmalıdır.
- Farklı immünoterapi ilaçları için 1.hat ve 2. hat tedavilerde farklı PD-L1 eşik değerleri belirlenmiştir (örn. pemrolizumab için 1.hat tedavi için PD-L1> %50 ve üzeri ve 2.hat tedavide ya da kombine tedavi için PD-L1> %1 olmalıdır.)

- Nivolumab ve atezolizumab ilaç erişimi için PD-L1 durumunun bilinmesi şart değildir (166, 167).
- Müsinöz tümörlerde membranı değerlendirmek zor olabilir.
- Tümördeki PD-L1 heterojen ise kesitte farklı alanlara göre sanal bölümlenme yapıp her bir bölümün PD-L1 skoru çıkarılıp % verilebilir (149).

Şekil 16: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Yorumlama Kılavuzu-Örnek Hesaplama, KHD AK



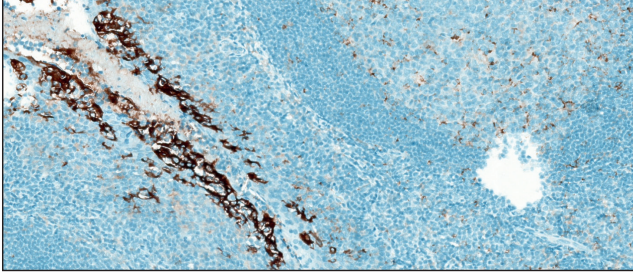
PD-L1 IHC ile Tümör Hücre Proporsiyon Skorlaması (TPS)

Tümörde PD-L1 pozitifliği hiç yoksa (0) ya da çok fazla hücre var ise ve pozitiflik %1 den az ise:

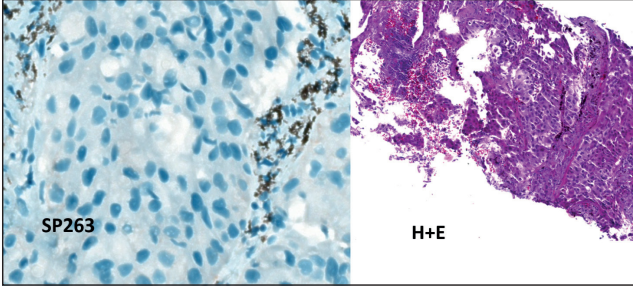
- TPS <%1 Negatif PD-L1 skoru,
- PD-L1 pozitifliği %1-49 ise Düşük PD-L1 skoru,
- PD-L1 pozitifliği >%50 ise Güçlü PD-L1 skoru olarak yorumlanabilir.

Şekil 17: Çapa Tıp Fakültesi patoloji arşivinden alınan örnek preparatlarda PD-L1 değerlendirmesi

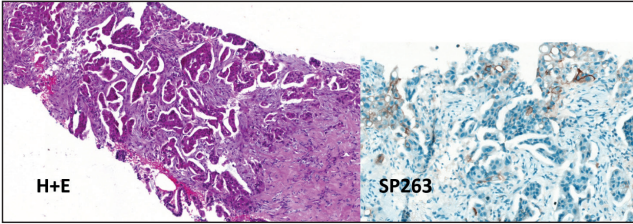
a- Kontrol Tonsil dokusu: Kript epiteli kuvvetli (+), germinal merkez hücrelerinde zayıf granüller (+)



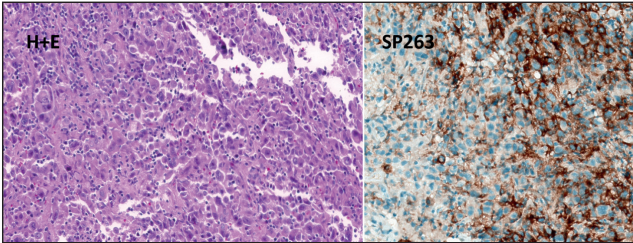
b- PD-L1 negatif 19718 /21



c- PD-L1 %1-49 21952/21



d- PD-L1 >%50 19711/21

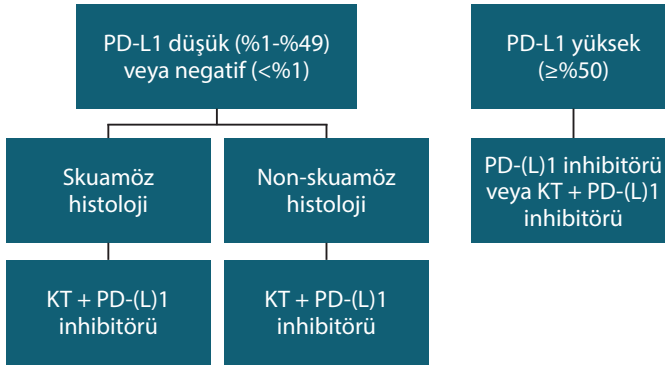


PD-L1 Test Sonucunu Rapor Etmek;

Aşağıdaki bilgileri içeren rapor düzenlenmesi önerilir (135):

- Hastanın demografik verileri
- Tümör tanısı
- Biyopsi /sitolojik materyal
- Canlı tümör sayısı (100 hücreden az/çok)
- Kullanılan PD-L1 klonu
- İmmünohistokimya cihazı
- Pozitif kontrol boyanması
- TH'de membranöz boyanan hücre yüzdesi
- Tümör proporsiyon skoru
- Yorum

Şekil 17: Hedeflenebilir Mutasyon İzlenmeyen İleri Evre KHDAK'de İmmünoterapiye İlişkin Mevcut Paradigma



- PD-L1 düşük (%1-%49) veya negatif (<%1) durumunda standart tedavi ICI+KT kombinasyonudur.
- ≥%50 PD-L1 durumunda tercih edilen tek ajan ICI veya ICI + KT
- Tek ajan ICI, ≥%1 PD-L1 için onaylı olmakla birlikte genel olarak Mayıs 2020'de, nivolumab/ipilimumab PD-L1'in ≥%1 olarak ölçüldüğü ileri evre KHDAK'ın birinci basamak tedavisinde onaylanırken, nivolumab/ipilimumab artı 2 siklus platin bazlı ikili kemoterapi EGFR veya ALK genomik aberasyonlarının izlenmediği ileri evre KHDAK'ın birinci basamak tedavisinde onaylanmıştır, uzmanlar tarafından önerilmez.

KHDAK’da Moleküler Test Patoloji Raporu İçeriği

Moleküler Testlerde Raporda Yer Alması Gereken Ortak Parametreler

- Hasta bilgileri (Birden fazla sayfa var ise her sayfada yer almalıdır)
- Test isteyen ve testi raporlayan doktorların bilgileri
- Test istem tarihi, örneğin kabul edildiği tarih ve rapor tarihi
- Önceki tedaviye dair bilgiler
- Biyopsi zamanı (ilk, relaps, progresyon)
- Örneğin alındığı doku (lenf nodu, akciğer vb.)
- Test edilen materyalin özellikleri (İİA, parafin blok vb)
- Patolojik tanı
- Tümör yüzdesi ve örneğin yeterliliği
- Kullanılan test metodu
- Testin analitik sensitivitesi
- Test edilen gen/genler
- Sonuç
- Sonuçla ilgili yorum (ilaç duyarlılığı/ilaç direnci/prognostik etkisi vb.)
- Birden fazla sayfa var ise her sayfada sayfa numarası (örn: 1/2, 1/3 vb.)

EGFR/BRAF/KRAS Gibi Genlerde Nokta Mutasyonu/Küçük İnsersiyon-Delesyonlara Yönelik Mutasyon Testi Raporunda Yer Alması Gerekenler

- Test edilen gen/genler ve ekzonları
- Mutasyon türü (tekli nükleotid değişimi/insersiyon/ delesyon vb.)
- Mutasyonun ilgili genin hangi transkript varyantına göre isimlendirildiği (Örn: EGFR için NM_005228.5 veya LRG_304 vb.)
- Nükleotid ve proteinde meydana gelen değişiklik (Örn: c.34G>A, p.G12S)

ALK ve ROSI Rearanjmanı Analiz Raporu Raporunda Yer Alması Gerekenler

- Kullanılan metod
 1. İmmünohistokimya
 - Antikor klonu
 - Kullanılan platform
 - Hangi hücrelerde boyanma olduğu ve boyanma paterni
 2. FISH
 - Prob
 - Analiz yapılan nukleus sayısı
 - Rearanjman durumu ve paterni (split, füzyon, 3' pattern vb.)
 - Eşik değeri
 - Sonuçla ilgili yorum

Kaynaklar

1. lamgeer M, Ganju V, Watkins DN. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(3):394-401.
2. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the association for molecular pathology and college of American pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(3):341-365.
3. Boelle V, Alamgeer M, Watkins DN, et al. The Evolution of Therapies in Non- Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1815-1846.
4. Gallant JN, Lovly CM. Established, emerging and elusive molecular targets in the treatment of lung cancer. *J Pathol*. 2018;244:565-577.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics. 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424. .
6. 2016 Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2019.
7. Aisner DL, Rumery MD, Merrick DT, et al. Do More With Less: Tips and Techniques for Maximizing Small Biopsy and Cytology Specimens for Molecular and Ancillary Testing: The University of Colorado Experience. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140:1206-1220.
8. Koopman B, van der Wekken AJ, Elst A, et al. Relevance and Effectiveness of Molecular Tumor Board Recommendations for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Rare or Complex Mutational Profiles. *JCO Precis Oncol*. 2020;4:393-410.
9. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10: 1243-1260.
10. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE, Non-Small-Cell Lung Cancer Working G. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small- cell lung cancer working group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol*. 2008;26:983-994.
11. Malapelle U, Mayo-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R, Savic S, Bihl M, et al. Consistency and reproducibility of next-generation sequencing and other multigene mutational assays: a worldwide ring trial study on quantitative cytological molecular reference specimens. *Cancer Cytopathol*. 2017;125:615-626.
12. Farago AF, Taylor MS, Doebele RC, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer harbouring an NTRK gene fusion. *JCO Precis Oncol*. 2018.
13. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AC, et al. Diagnostic procedures for non-small cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax*. 2016; 71:177-184.
14. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Pan- TRK immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(11):1547-1551.
15. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AC, et al. Diagnostic procedures for non-small cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax*. 2016; 71:177-184.
16. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10: 1243-1260.
17. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/ American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(5):685-705.
18. Coley SM, Crapanzano JP, Saqi A. FNA, core biopsy, or both for the diagnosis of lung carcinoma: Obtaining sufficient tissue for a specific diagnosis and molecular testing. *Cancer Cytopathol*. 2015;123: 318-326.
19. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.
20. Penault-Llorca F, Rudzinski ER, Sepulveda AR. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol*. 2019;72(7):460-467.
21. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19:341-365.

22. Aisner DL, Rumery MD, Merrick DT, et al. Do More With Less: Tips and Techniques for Maximizing Small Biopsy and Cytology Specimens for Molecular and Ancillary Testing: The University of Colorado Experience. *Arch Pathol Lab Med*. 2016; 140:1206-1220.
23. Oktay MH, Adler E, Hakima L, et al. The application of molecular diagnostics to stained cytology smears. *J Mol Diagn*. 2016;18:407-415.
24. Betz BL, Dixon CA, Weigelin HC, et al. The use of stained cytologic direct smears for ALK gene rearrangement analysis of lung adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2013;121:489-499.
25. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *Eur Respir Rev*. 2017 28;26(144).
26. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM, Dooms C, Elmberger G, García RC, Kerr KM, Lim E, López-Ríos F, Thunnissen E, Van Schil PE, von Laffert M. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax*. 2016 ;71(2):177-84.
27. Solomon, J.P., Linkov, I., Rosado, A., Mullaney, K., Rosen, E.Y., Frosina, D., Jungbluth, A.A., Zehir, A., Benayed, R., Drilon, A., Hyman, D.M., Ladanyi, M., Sireci, A.N., Hechtman, J.F., 2020. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod. Pathol*. 33 (January 1), 38-46.
28. Sung S, Crapanzano JP, DiBardino D, Swinarski D, Bulman WA, Saqi A. Molecular testing on endobronchial ultrasound (EBUS) fine needle aspirates (FNA): Impact of triage. *Diagn Cytopathol*. 2018 ;46(2):122-130.
29. Rosenblum F, Hutchinson LM, Garver J, Woda B, Cosar E, Kurian EM. Cytology specimens offer an effective alternative to formalin-fixed tissue as demonstrated by novel automated detection for ALK break-apart FISH testing and immunohistochemistry in lung adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2014 ;122(11):810-21.
30. Betz BL, Dixon CA, Weigelin HC, Knoepp SM, Roh MH. The use of stained cytologic direct smears for ALK gene rearrangement analysis of lung adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2013 ;121(9):489-99.
31. Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology*. 2014;25(6):356-71.
32. Zhou F, Moreira AL. Lung carcinoma predictive biomarker testing by immunoperoxidase stains in cytology and small biopsy specimens: advantages and limitations. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(12):1331-7.
33. Lee GD, Lee SE, Oh DY, Yu DB, Jeong HM, Kim J, et al. MET Exon 14 skipping mutations in lung adenocarcinoma: clinicopathologic implications and prognostic values. *J Thorac Oncol*. 2017;12(8):1233-46.
34. 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.
35. Pisapia P, Lozano MD, Vigliar E, Bellecine C, Pepe F, Malapelle U, et al. ALK and ROS1 testing on lung cancer cytologic samples: perspectives. *Cancer*. 2017;125(11):817-30.
36. Savic S, Bode B, Diebold J, Tosoni I, Barascud A, Baschiera B, et al. Detection of ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: high accuracy of immunocytochemistry with the 5A4 clone. *J Thorac Oncol*. 2013;8(8):1004-11.
37. Van der Wekken AJ, Pelgrim R, Hart N, Werner N, Mastik MF, Hendriks L, et al. Dichotomous ALK-IHC is a better predictor for ALK inhibition outcome than traditional ALK-FISH in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(15):4251-8.
38. Wang W, Tang Y, Li J, Jiang L, Jiang Y, Su X. Detection of ALK rearrangements in malignant pleural effusion cell blocks from patients with advanced non-small cell lung cancer: a comparison of Ventana immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(2):117-22.
39. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med* 2018; 378: 731-739.
40. Shan L, Lian F, Guo L, Qiu T, Ling Y, Ying J, Lin D. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR. *PLoS One*. 2015; 5;10(3):e0120422.
41. Da Cunha Santos G. Standardizing preanalytical variables for molecular cytopathology. *Cancer Cytopathol*. 2013;121(7):341-3.

42. Moelans CB, Oostenrijk D, Moons MJ, van Diest PJ. Formaldehyde substitute fixatives: effects on nucleic acid preservation. *J Clin Pathol*. 2011;64(11):960–7.
43. https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2F00428-012-1281-4/MediaObjects/428_2012_1281_MOESM2_ESM.pdf Son erisim tarihi: 19.06.2021.
44. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin- embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138.
45. Planchard D, Remon J, Nowak F, et al. Genetic/genomic biomarker testing in non-small cell lung cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2017;37:12–17.
46. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018;13(3):323–358.
47. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pa.
48. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;1;29(Suppl 4):iv192–iv237.
49. Marchio C, Scaltriti M, Ladanyi M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1417–1427.
50. Planchard D, Remon J, Nowak F, et al. Genetic/genomic biomarker testing in non-small cell lung cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2017;37:12–17.
51. Hyman DM, Laetsch TW, Kummar S et al. The efficacy of larotrectinib (LOXO-101), a selective tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitor, in adult and pediatric TRK fusion cancers. *J Clin Oncol* 2017; 35(18 Suppl): LBA2501.
52. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5268–5272.
53. Shim HS, Lee da H, Park EJ et al. Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society lung adenocarcinoma classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(10):1329–34.
54. Tsao, AS, Tang XM, Sabloff B et al. Clinicopathologic characteristics of the EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006;1:231–239.
55. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;20;32(6):579–86.
56. Yu JY, Yu SF, Wang SH, et al. Clinical outcomes of EGFR-TKI treatment and genetic heterogeneity in lung adenocarcinoma patients with EGFR mutations on exons 19 and 21. *Chin J Cancer*. 2016; 35:30.
57. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ et al (2007) Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007;10;25(5):587–95.
58. Wu JY, Shih JY. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on uncommon E709X epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2016;9:6137–6145.
59. Cheng C, Wang R, Li Y, et al. EGFR Exon 18 mutations in east Asian patients with lung adenocarcinomas: a comprehensive investigation of prevalence, clinicopathologic characteristics and prognosis. *Sci Rep*. 2015; 5:13959.
60. Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2019; 4: 5.
61. T Tanaka, M Matsuoka, A Sutani, et al. Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *Int J Cancer*. 2010; 126:651–655.
62. Vamsidhar Velcheti, Pallavi D Patwardhan, Frank Xiaoqing Liu, Xin Chen, Xiting Cao, Thomas Burke. Real-world PD-L1 testing and distribution of PD-L1 tumor expression by immunohistochemistry assay type among patients with metastatic non-small cell lung can. 2018 Nov 8;13(11):e0206370.
63. Normanno N, Maiello MR, Chicchinelli N, et al. Targeting the EGFR T790M mutation in non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21:159–165.

64. Wu SG, Shih JY. Management of acquired resistance to EGFR TKI targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. 2018;17: 38.
65. Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, et al. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(5):1103-1110.
66. Chevallier M, Tsantoulis P, Addeo A, Friedlaender A. Influence of Concurrent Mutations on Overall Survival in EGFR-mutated Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2020;17(5):597-603.
67. Santoni-Rugiu E, Melchior LC, Urbanska EM, et al. Intrinsic Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers*. 2019;11(7):923.
68. Ricordel C, Friboulet L, Facchinetti F et al. Molecular mechanisms of acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs in EGFR T790M-mutant lung cancer *Cell Reports Medicine*. *Ann Oncol*. 2019;1;30(5):858.
69. Cheng L. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Modern Pathology* 2012; 25(3): 347-69.
70. Yu HA1, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller VA, Ladanyi M, Riely GJ. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2013;15;19(8):2240-7.
71. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4247-4253.
72. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2008;3(1):13-17.
73. https://s3.us-east-1.amazonaws.com/fonteva-customermmedia/00D3i000000D3mbEAC/TRGNBBDV_IASLC_Atlas_2020_Interactive_.pdf Son erişim tarihi:21.06.2021.
74. Paik JH, Choe G, Kim H, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol*. 2011;6(3):466-472.
75. Lantuéjoul S. Comparison of different assay platforms for ALK testing. In: Tsao MH, Hirsch FR, Yatabe Y, editors. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer*. North FortMyers: EditorialRxPress;2016; sayfa 73-83.
76. Thunissen E. Reporting of ALK and ROS1 testing. In: Tsao MS, Hirsch FR, Yasushi Y, editors. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer*. NorthFortMyers: EditorialRxPress;2016; sayfa 91-94.
77. Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, et al. Differential crizotinib response duration among ALK fusion variants in ALK-positivenon-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(28):3383-3389.
78. Cai W, Lin D, Wu C, et al. Intratumoral heterogeneity of ALK-rearranged and ALK/EGFR coalttered lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3701-09.
79. Nicholson A. Sample acquisition, processing, and general diagnostic procedures. In: Tsao MH, Hirsch FR, Yatabe Y, editors. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer*. 2nd ed. North FortMyers:EditorialRxPress; 2016. sayfa 19-23.
80. Hiley CT, Le Quesne J, Santis G, et al. Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *Lancet* 2016;388:1002-11.
81. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(10):1118-33.
82. McCoach CE, Le AT, Gowan K, et al. Resistance mechanisms to targeted therapies in ROS1 (+) and ALK (+) non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24(14):3334-47.
83. 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.
84. 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.
85. Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2016; 469:489-503.
86. Hirsch FR, Tsao MS, et al. Candidates for ALK and ROS1 testing. In: Tsao MS, Hirsch F, Yasushi Y, editors. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*.

87. Sholl LY, Nicholson AG, Lantuejoul S, et al. ROS1 test with IHC. In: Tsao MH, Hirsch FR, Yatabe Y, editors. IASLC Atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer. North FortMyers: EditorialRxPress;2016; sayfa: 35–40.
88. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol*. 2014;27(5):711–20.
89. Conde E, Hernandez S, Martinez R, Angulo B, De Castro J, Collazo-Lorduy A, et al. Assessment of a new ROS1 immunohistochemistry clone (SP384) for the identification of ROS1 rearrangements in non-small cell lung carcinoma patients: the ROSING study. *J Thorac Oncol*. 2019;14(12):2120–2132.
90. Mescam-Mancini L, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer*. 2014;83(2):168–73.
91. Varella-Garcia M. ROS1 testing with FISH. In: Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, editors. IASLC atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer. NorthFortMyers: Editorial RxPress; 2016; sayfa:52–62.
92. Guisier F, Piton N, Salaun M, Thiberville L. ROS1-rearranged NSCLC with secondary resistance mutation: case report and current perspectives. *Clin LungCancer*. 2019; 20(6):e593–e596.
93. McCoach CE, Le AT, Gowan K, et al. Resistance mechanisms to targeted therapies in ROS1(+) and ALK(+) non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24(14):3334–47.
94. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011;29:2046–2051.
95. Dagogo-Jack I, Martinez P, Yeap BY, et al. Impact of BRAF mutation class on disease characteristics and clinical outcomes in BRAF-mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25:158–165.
96. Ortiz- Ortiz-Cuarn S, Mezquita L, et al. Circulating Tumor DNA Genomics Reveal Potential Mechanisms of Resistance to BRAF-Targeted Therapies in Patients with BRAF-Mutant Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;1;26(23):6242–6253.
97. Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27:85–94.
98. Kim EK, Kim KA, Lee CY, et al. Molecular diagnostic assays and clinicopathologic implications of MET exon 14 skipping mutation in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2019;20:e123–e132.
99. Drilon A, Cappuzzo F, Ou SI, et al. Targeting MET in lung cancer: Will expectations finally be MET? *J Thorac Oncol*. 2017; 12:15–26120.
100. Caparica R, Yen CT, Coudry R, et al. Responses to Crizotinib Can Occur in High-Level MET-Amplified Non-Small Cell Lung Cancer Independent of MET Exon 14 Alterations. *J Thorac Oncol*. 2017;12(1):141–144.
101. Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*. 2015;5:842–849.
102. Li BT, Ross DS, Aisner DL, et al. HER2 amplification and HER2 mutation are distinct molecular targets in lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2016;11:414–419.
103. Bu S, Wang R, Pan Y, et al. Clinicopathologic characteristics of patients with HER2 insertions in non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*. 2017; 24:291–297.
104. Chuang JC, Stehr H, Liang Y, et al. ERBB2-mutated metastatic nonsmall cell lung cancer: response and resistance to targeted therapies. *J Thorac Oncol*. 2017;12:833– 842.
105. Ferrara R, Auger N, Auclin E, et al. Clinical and translational implications of RET rearrangements in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;13:27–45.
106. Belli C , Penault-Llorca F, Ladanyi M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect RET fusions and mutations in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2021;32(3): 337–350.
107. Tan AC, Seet AOL, Lai GGY, et al. Molecular Characterization and Clinical Outcomes in RET-Rearranged NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2020;15(12):1928–1934.
108. Liu P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2019;9(5):871–879.
109. Uras IZ, Moll HP, Casanova E.Targeting KRAS Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: Past, Present and Future. *Int J Mol Sci* 2020;21(12):4325.

110. Lamberti G, Andriani E, Sisi M, et al. Beyond EGFR, ALK and ROS1: Current evidence and future perspectives on newly targetable oncogenic drivers in lung adenocarcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2020;156:103119.
111. Skoulidis F, Byers LA, Diao L, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discov.* 2015;5(8):860-77.
112. Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, et al. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2014;4(4):415-22.
113. Russo A, Lopes A, Scilla K et al. NTRK and NRG1 gene fusions in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Precision Cancer Medicine* 2020;3:14.
114. Cheema PK, Doherty M, Tsao MS. A Case of Invasive Mucinous Pulmonary Adenocarcinoma with a CD74-NRG1 Fusion Protein Targeted with Afatinib. *J Thorac Oncol.* 2017;12(12):e200-e202.
115. Berland L, Heeke S, Humbert O, et al. Current views on tumor mutational burden in patients with non-small cell lung cancer treated by immune checkpoint inhibitors. *J Thorac Dis.* 2019;11(Suppl 1):S71-S80.
116. Shao C, Li G, Huang L, et al. Prevalence of high tumor mutational burden and association with survival in patients with less common solid tumors. *JAMA Netw Open.* 2020;3(10):e2025109.
117. Hatakeyama K, Nagashima T, Urakami K, et al. Tumor mutational burden analysis of 2,000 Japanese cancer genomes using whole exome and targeted gene panel sequencing. *Biomed Res.* 2018;39(3):159-167.
118. Rizzo JM and Buck MJ. Key Principles and Clinical Applications of "Next-Generation" DNA Sequencing. *Cancer Prev Res.* 2012; 5(7): 887-900.
119. Remon MJ, Mateo J, Westphalen CB, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 31(11): 1491-1505.
120. <https://www.fda.gov/media/119249/download> Son görüntülenme tarihi:21.06.2021.
121. Normanno, Nicola, Marc G Denis, Kenneth S Thress, Marianne Ratcliffe, and Martin Reck. "Guide to Detecting Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations in CtdNA of Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *Oncotarget* 8, no. 7 (December 12, 2016): 12501-16.
122. Merker, Jason D., Geoffrey R. Oxnard, Carolyn Compton, Maximilian Diehn, Patricia Hurley, Alexander J. Lazar, Neal Lindeman, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Journal of Clinical Oncology* 36, no. 16 (March 5, 2018): 1631-41.
123. Rolfo, Christian, Philip C. Mack, Giorgio V. Scagliotti, Paul Baas, Fabrice Barlesi, Trevor G. Bivona, Roy S. Herbst, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *Journal of Thoracic Oncology* 13, no. 9 (September 1, 2018): 1248-68.
124. Lindeman, Neal I., Philip T. Cagle, Dara L. Aisner, Maria E. Arcila, Mary Beth Beasley, Eric H. Bernicker, Carol Colasacco, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 142, no. 3 (January 22, 2018): 321-46.
125. Conde, E, B Angulo, E Izquierdo, L Paz-Ares, C Belda-Iniesta, M Hidalgo, and F López-Ríos. Lung Adenocarcinoma in the Era of Targeted Therapies: Histological Classification, Sample Prioritization, and Predictive Biomarkers. *Clinical & Translational Oncology*[g: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico] 15, no. 7 (July 2013): 503-8.
126. Planchard, D, S Popat, K Kerr, S Novello, E F Smit, C Faviere-Finn, T S Mok, et al. "Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up†." *Annals of Oncology* 29, no. Supplement_4 (October 1, 2018): iv192-237.
127. Jenkins, Suzanne, James C-H. Yang, Suresh S. Ramalingam, Karen Yu, Sabina Patel, Susie Weston, Rachel Hodge, et al. Plasma CtdNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 12, no. 7 (July 1, 2017): 1061-70.

128. Weijie Ma, Barbara M Gilligan, Jianda Yuan, Tianhong Li. "Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy". *J Hematol Oncol*. 2016 May 27;9(1):47.
129. G.T. Gibney, L.M. Weiner, M.B. Atkins, Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy, *Lancet Oncol*. 17 (2016) e542–e551.
130. Stefani Spranger. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *Int Immunol*. 2016 Aug;28(8):383–91.
131. J. Yuan, P.S. Hegde, R. Clynes, P.G. Foukas, A. Harari, T.O. Kleen, P. Kvistborg, C. Maccalli, H.T. Maecker, D.B. Page, H. Robins, W. Song, E.C. Stack, E. Wang, T.L. Whiteside, Y. Zhao, H. Zwierzina, L.H. Butterfield, B.A. Fox, "Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy", *J. Immunother. Cancer*. 4 (2016).
132. Padmanee Sharma, James P Allison. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):56–61.
133. R.A. de Mello, A.F. Veloso, P. Esrom Catarina, S. Nadine, G. Antoniou, Potential role of immunotherapy in advanced non-small-cell lung cancer, *Oncotargets Ther*. 10 (2016) 21–30.
134. M. Marino, P. Visca, M. Ottaviano, PD-L1 Testing in Lung Cancer: An International Pathologist's Initiative in an Unknown "Middle Earth," *J. Thorac. Oncol*. 13 (2018) 1239–1241.
135. IASLC Atlas of PD-L1 Testing in Lung Cancer | International Association for the Study of Lung Cancer, (n.d.). <https://www.iaslc.org/publications/iaslc-atlas-pd-l1-testing-lung-cancer> (accessed June 11, 2018).
136. F.R. Hirsch, A. McElhinny, D. Stanforth, J. Ranger-Moore, M. Jansson, K. Kulangara, W. Richardson, P. Towne, D. Hanks, B. Vennapusa et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*. 12 (2017) 208–222.
137. R. Büttner, J.R. Gosney, B.G. Skov, J. Adam, N. Motoi, K.J. Bloom, M. Dietel, J.W. Longshore, F. López-Rios, F. Penault-Llorca et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non-Small-Cell Lung Cancer, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol*. 35 (2017) 3867–3876.
138. M.S. Tsao, K.M. Kerr, M. Kockx, M.-B. Beasley, A.C. Borczuk, J. Botling, L. Bubendorf, L. Chirieac, G. Chen, T.-Y. Chou et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*. 13 (2018) 1302–1311.
139. I.A. Cree, R. Booton, P. Cane, J. Gosney, M. Ibrahim, K. Kerr, R. Lal, C. Lewanski, N. Navani, A.G. Nicholson, M. Nicolson, Y. Summers, PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation, *Histopathology*. 69 (2016) 177–186.
140. D.L. Rimm, G. Han, J.M. Taube, E.S. Yi, J.A. Bridge, D.B. Flieder, R. Homer, W.W. West, H. Wu, A.C. Roden et al. A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer, *JAMA Oncol*. 3 (2017) 1051–1058.
141. Cristina Teixidó and Noelia Vilariño and Roxana Reyes and Noemí Reguart, PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2018;10:1758835918763493
142. Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, Midha A, Walker J. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*. 2017 Oct;112:200–215.
143. A. A. Oweida, S. Lennon, D. Calame, S. Korpela, S. Bhatia, J. Sharma, C. Graham, D. Binder, N. Serkova, D. Raben, L. Heasley, E. Clambey, R. Nemenoff, S.D. Karam, Ionizing radiation sensitizes tumors to PD-L1 immune checkpoint blockade in orthotopic murine head and neck squamous cell carcinoma, *Oncoimmunology*. 6 (2017) e1356153.
144. T. Kordbacheh, J. Honeychurch, F. Blackhall, C. Faivre-Finn, T. Illidge, Radiotherapy and anti-PD-1/PD-L1 combinations in lung cancer: building better translational research platforms, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol*. 29 (2018) 301–310.
145. Voong KR, Feliciano J, Becker D, Levy B. Beyond PD-L1 testing-emerging biomarkers for immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med*. 2017 Sep;5(18):376.

146. L. Bubendorf, S. Lantuejoul, A.J. de Langen, E. Thunnissen, Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza, Eur. Respir. Rev. 26 (2017) 170007.
147. G. Troncone, C. Gridelli, The reproducibility of PD-L1 scoring in lung cancer: can the pathologists do better?, Transl. Lung Cancer Res. 6 (2017) S74-S77.
148. Cooper WA, Russell PA, Cherian M, Duhig EE, Godbolt D, Jessup PJ, Khoo C, Leslie C, Mahar A, Moffat DF, Sivasubramaniam V, Faure C, Reznichenko A, Grattan A, Fox SB. Intra- and Interobserver Reproducibility Assessment of PD-L1 Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2017 Aug 15;23(16):4569-4577.
149. Dako. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual. 2015. Available from: http://www.dako.com/us/29109_pd-l1-ihc-22c3-interpretation-manual.pdf.
150. Dacic S, Villaluz LC, Abberbock S, et al. ALK FISH patterns and the detection of ALK fusions by next generation sequencing in lung adenocarcinoma. Oncotarget 2016;7:82943-52.
151. Conde E, Rojo F, Gómez J, et al. Molecular diagnosis in non-small-cell lung cancer: expert opinion on ALK and ROS1 testing, Journal of Clinical Pathology Published Online First: 19 April 2021
152. Bob T. Li, M.D., Ph.D., M.P.H., Egbert F. Smit, M.D., Ph.D., Yasushi Goto, M.D., Ph.D., et al. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England Journal of Medicine.
153. Pan Yue, Deng Chao, Qiu Zhenhua, Cao Chenghui, Wu Fang. The Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. Frontiers in Oncology 2021; 11:3945
154. Miguel García-Pardo and Antonio Calles. ROS-1 NSCLC therapy resistance mechanism. Precision Cancer Medicine 2021;4:0
155. Hendry S, Byrne DJ, Wright GM, et al. Comparison of four PD-L1 immunohistochemical assays in lung cancer. J Thorac Oncol. 2018;13(3):367-376.
156. Munari E, Rossi G, Zamboni G, et al. PD-L1 assays 22C3 and SP263 are not interchangeable in non-small cell lung cancer when considering clinically relevant cutoffs: an interclone evaluation by differently trained pathologists. Am J Surg Pathol. 2018;42(10):1384-1389
157. Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC) J Nicholas Bodor, Yanis Bومber Hosseini Borghaei Cancer2020 Jan 15;126(2):260-270. doi: 10.1002/cncr.32468. Epub 2019 Nov 6.
158. Wang L, Hu Y, Wang S, Shen J, Wang X. Biomarkers of immunotherapy in non-small cell lung cancer. Oncol Lett. 2020 Nov;20(5): 139. doi: 10.3892/ol.2020.11999.
159. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2017;376:2415-2426.
160. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand (PD-L)-ligand 1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. J Clin Oncol 2018; 36: 633-641.
161. Stenzinger A, Endris V, Jan Budczies J et al. Harmonization and standardization of panel-based tumor mutational burden measurement: real-world results and recommendations of the quality in pathology study. J Thorac Oncol 2020;15: 1177-1189.
162. Conde E, Caminoa A, Dominguez C, et al. Aligning digital CD8+ scoring and targeted next-generation sequencing with programmed death ligand 1 expression: a pragmatic approach in early-stage squamous cell lung carcinoma. Histopathology. 2018;72(2):270-284.
163. Lu S, Stein JE, Rimm DL, et al. Comparison of bio-marker modalities for predicting response to PD-1/ PD-L1 checkpoint blockade: A systematic review and meta-analysis. JAMA Oncol. 2019;5(8):1195-1204.
164. Gosney JR, Boothman AM, Ratcliffe M, et al. Cytology for PD-L1 testing: a systematic review. Lung Cancer. 2020;141:101-106.
165. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. J Thorac Oncol. 2019;14(3):377-407.
166. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2016; 375: 1823-1833.

167. Herbst RS, Garon EB, Kim D-W et al. Long-term follow-up in the KEYNOTE-010 study of pembrolizumab (pembro) for advanced NSCLC, including in patients (pts) who completed 2 years of pembro and pts who received a second course of pembro. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 10); LBA4.
168. Stransky N, Cerami E, Schalm S et al. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun* 2014; 5:4846.
169. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15:731-747.
170. Farago AF, Taylor MS, Doebele RC, et al. Clinico- pathologic features of non-small-cell lung cancer harboring an NTRK gene fusion. *JCO Precis Oncol* 2018;2018:1-14.
171. Drilon A, Siena S, Ou SI et al. Safety and antitumor activity of the multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK inhibitor entrectinib: combined results from two phase I trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov* 2017; 7: 400-409.
172. Popper, H.H., Gruber-Mösenbacher, U., Pall, G. et al. The 2020 update of the recommendations of the Austrian working group on lung pathology and oncology for the diagnostic workup of non-small cell lung cancer with focus on predictive biomarkers. *Memo*; 2020;13:11-26
173. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. NSCLC v6.2021, Biomarker Testing for Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices.
174. Nathan A. Pennell, Maria E. Arcila, David R. Gandara, and Howard West, American Society of Clinical Oncology Educational Book 2019: 39, 531-542
175. F. Mosele, J. Remon, J. Mateo, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology* 2021;31(11):1491-1505
176. Pirker R, Herth FJ, Kerr KM, Filipits M, Taron M, Gandara D, Hirsch FR, Grunenwald D, Popper H, Smit E, Dietel M, Marchetti A, Manegold C, Schirmacher P, Thomas M, Rosell R, Cappuzzo F, Stahel R; European EGFR Workshop Group. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol.* 2010 Oct;5(10):1706-13.
177. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. Ret, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012;18:378-81.
178. Lira ME, Choi Y-L, Lim SM, et al. A single-tube multiplexed assay for detecting ALK, ROS1, and RET fusions in lung cancer. *J Mol Diagn* 2014; 16:229-43.
179. Drilon A, Wang L, Arcila ME, 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;21:3631-9.

Kısaltmalar

ADK: Adenokanser

ALK: Anaplastic lymphoma kinase

BHNEK: Büyük hücreli nöroendokrin kanser

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

cfDNA: Hücresiz DNA

ctDNA: Hücresiz DNA fraksiyonu

CTC: Dolanan kanda tumor hücreleri

EBUS: Endobronşiyal ultrasonografi

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptörü-epidermal growth factor receptor

ERBB2 (HER2): erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

EUS: Endoskopik ultrasonografi

FFPE: Formalin fikse parafine gömülü

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

FOB: Fiber optik bronkoskopi

HB: Hücre bloğu

İİA: İnce iğne aspirasyonu

İİAB: İnce iğne aspirasyon biyopsisi

IASLC: Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği

İHK: İmmünhistokimyasal

KHK: Küçük hücreli kanser

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

KHDAK-NOS: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri-spesifik tanı konulamayan

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MET: Mezenkimal epitelyal transisyon faktör

NE: Nöroendokrin

NTRK: Nörotrofik tirozin reseptör kinaz

NGS: Yeni nesil sekanslama-Next Generation Sequencing

NOS: Spesifik tanı koyulamayan-not otherwise specified

PAP: Papanicolaou

PCR: Polimeraz zincirleme tepkimesi-Polymerase Chain Reaction

PD-1: Programlanmış hücre ölüm reseptörü-1 (programmed death -1)

PD-L1: Programlanmış ölüm ligandı-1

RET: Rearranged during transfection

ROS1: ROS proto-oncogene 1 receptor tyrosine kinase

SBS: Sıvı bazlı sitoloji

SKHK: Skuamöz hücreli kanser

SLBx: Skalen lenf bezi biyopsisi

SK: Sitokeratin

TBBx: Transbronşiyal biyopsi

TBİİA: Transbronşial ince iğne aspirasyonu

TİL: Tümörü infiltre eden lenfosit

TKİ: Tirozin kinaz inhibitörü

TTF-1: Thyroid transcription factor-1

Cell-free DNA (cfDNA): Tümör hücreleri de dahil olmak üzere bir çok kaynaktan derive edilen plazma ya da serum içeriğindeki toplam hücresiz (cell-free) DNA içeriğidir.

Circulating tumor DNA (ctDNA): Tümör hücrelerinden köken alan hücresiz (cell-free) DNA fraksiyonudur. ctDNA varlığı genellikle hücresiz (cell-free) DNA içeriğindeki somatik varyantların tespiti ile gösterilir. Bu nedenle bir ctDNA yöntemi çalışılmadan ctDNA varlığı konfirme edilmez.

Likit Biyopsi: Dolaşan kanda bir tümöre ait kanser hücrelerini veya tümör kaynaklı DNA fragmanlarını aramak için kullanılan, bir kan örneği üzerinde yapılan minimal invaziv testleri kapsar.

