



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRİMER MİDE ADENOKARSİNOMLARININ
İMMUNOHİSTOKİMYA VE İN-SİTU
HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ İLE MOLEKÜLER
SINIFLAMASI, TRK YOLAĞININ SINIFLAMADAKİ OLASI
ROLÜNÜN BELİRLENMESİ, KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELER İLE İLİŞKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. MEDİNE ÖZGÜR GÜNAY

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2020



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRİMER MİDE ADENOKARSİNOMLARININ
İMMUNOHİSTOKİMYA VE İN-SİTU
HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ İLE MOLEKÜLER
SINIFLAMASI, TRK YOLAĞININ SINIFLAMADAKİ OLASI
ROLÜNÜN BELİRLENMESİ, KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELER İLE İLİŞKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. MEDİNE ÖZGÜR GÜNAY

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. ÇİĞDEM ATAİZİ ÇELİKEL

İSTANBUL 2020

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca, yardım ve desteğini benden esirgemeyen, her türlü bilgi ve deneyimini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Çiğdem Ataizi Çelikel'e,

Deneyimlerini benimle paylaşan, birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Süheyla Uyar Bozkurt, Prof. Dr. Asiye Rengin Ahıskalı, Prof. Dr. Handan Kaya, Prof. Dr. Şirin Funda Eren, Prof. Dr. Hüseyin Kemal Türköz, Prof. Dr. Zeliha Leyla Cinel, Prof. Dr. Pelin Bağcı Çulçi, Doç. Dr. Deniz Filinte, Dr. Öğrt. Üyesi İpek Erbarut Seven ve Dr. Öğrt. Üyesi Emine Bozkurtlar'a,

Çalışma arkadaşlarım Dr. Fatma Gerin, Dr. Hasan Toper, Dr. Gamze Akbaş, Dr. İdris Önem, Dr. Hülya Şahin Özkan, Dr. İrem Şahver İşgör, Dr. Selim Yiğit Erçetin, Dr. Tuba Oğuzsoy, Dr. Beyza Keskin, Dr. Mehmet Fatih Tekin, Dr. Ebru Akar, Dr. Cem Berk Türk, Dr. Damla Çeliktaş, Dr. Orkhan Farmanlı, Dr. İhsan Turan Ceran ve Dr. Nurşah Arı'ya,

Başta tezimde emeği geçen Elif Uğurlu, Banu Büyükturgay, Mücahit Özkelle, Başak Atmaca ve Selin Tokat olmak üzere tüm laboratuvar ekibine, sekreter ve personel arkadaşlarıma,

Desteklerini benden esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili eşim ve aileme sonsuz teşekkürlerimle...

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda; 1) literatürde tanımlanmış moleküler alt tipler göz önüne alınarak, primer gastrik adenokarsinomu (G-ACa) immünohistokimya (İHK) ve in-situ hibridizasyon (İSH) gibi daha yaygın, ulaşılabilir ve düşük maliyetli teknikler kullanarak sınıflamak, kendi popülasyonumuzdaki dağılımlarını değerlendirmek, morfolojik yansımalarını ve klinik-patolojik parametrelerle olan ilişkilerini belirlemek; 2) İHK (pan-TRK) yöntemi ile G-Ca'larda NTRK gen füzyonlarının oranını belirlemek, moleküler sınıflama alt tipleri ile ilişkisini ve her grup içindeki bağımsız prognostik rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 2013-2018 yılları arasında, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi (MÜTF, Pendik EAH) Tıbbi Patoloji bölümünde, rezeksiyon materyallerinde primer G-ACa tanısı alan 240 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. *Tissue microarray* (TMA) analiz için, her olguya ait farklı morfolojideki tümör alanlarındaki tümörü en iyi temsil ettiği düşünülen 4 adet örnek, alıcı bloklardaki 3 mm çaplı yuvacıklara (korlara) yerleştirilmiştir. Çalışmamızda, Setia ve arkadaşlarının, daha önce yayınlanan moleküler sınıflamaları göz önüne alarak önerdikleri sınıflamaya benzer şekilde, EBER-kromojenik İSH (CISH) ile MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, E-kaderin ve p53 İHK analizi uygulanarak, 240 G-ACa olgusu beş gruba ayrılmıştır.

Çalışmamızda NTRK gen füzyonlarının G-ACa'lardaki görülme sıklığı ve moleküler çalışmaları baz alan G-ACa grupları ile ilişkisi İHK (pan-TRK-EPR17341) yöntemi uygulanarak değerlendirilmiştir. Ekspresyon izlenen olgularda konfirmasyon amaçlı NTRK 1/2/3 floresan-İSH (FİSH) analizi uygulanmıştır. Pan-TRK negatif olan G-ACa'lar arasından kontrol grubu oluşturmak amacıyla, ileri evreli beş olgu seçilerek, NTRK 1/2/3 FİSH analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamıza, olgulara ait rutinde uygulanmış HER2 İHK ve İSH (FİSH/SİSH) analizleri dahil edilmiş ve sonuçlarına olguların hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı patoloji raporlarından ulaşılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda yer alan olguların takip süresi ortalama 19,97 aydır. Genel sağ kalımda; tümör makroskopik tip 1 (polipoid), iyi farklılaşma derecesi (grade 1 ve grade 2), erken evre mide duvar invazyon seviyesi (pT1+pT2) ve lenf nodu tutulumu (pN0+pN1), lenfatik/anjioinvazyon negatifliği ile cerrahi sınır negatifliğinin uzun sağ kalımla istatistiksel anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir. Nüksüz sağ kalım analizlerinde ise; ileri evre lenf nodu metastazı (pN3), lenfatik invazyon, anjioinvazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınırda tümör pozitifliği ve desmoplastik yanıtın, azalmış nüksüz sağ kalım ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızda, İHK ve İSH analizi kullanılarak 240 olgu sırasıyla 5 gruba ayrılmıştır; %3,7'sinin (n=9) EBV (+), %12,1'inin (n=29) dMMR, %12,9'inin (n=31) E-kaderin aberran, %47,9'unun (n=115) P53 aberran ve %23,4'ünün (n=56) P53 normal grupta olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda, EBV (+) grupta, olgu sayısının sınırlı olması nedeniyle, diğer gruplara göre histomorfolojik ve sağ kalım özellikleri açısından istatistiksel anlamlı farklılık elde edilememiştir. Buna karşın, olguların tümünün erkek olması, 6 olgunun (%66) proksimal yerleşim göstermesi ve 7 olguda (%77) lenfositik yanıtın saptanması dikkat çekici özelliktedir. Çalışmamızdaki EBV (+) olan 9 olgunun histolojik tipi incelendiği zaman; 2 olguda (%22) medüller karsinom, 5 olguda (%55) mikst tip karsinom (zayıf koheziv+tubuler), 1 olguda (%11) zayıf koheziv karsinom (taşlı yüzük komponenti içeren), 1 olguda (%11) tubuler karsinom (kötü diferensiyel/ solid patern baskın) görülmüştür. EBV (+) olguların tümünde İHK olarak yanlış eşleşme tamir proteinleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) korunmuştur (mutually exclusive patern).

dMMR grupta görülen yaş ortalaması, diğer moleküler gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (ortalama 71 yaş). Lenfositik yanıt varlığı, p53 aberran grup ile birlikte, diğer moleküler gruplardan daha yüksek oranda izlenmiştir. Histolojik tip olarak, p53 aberran grup ile birlikte Lauren intestinal tip/DSÖ tubuler tip görülme oranı, diğer moleküler gruplara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Perinöral invazyon, diğer moleküler gruplarla karşılaştırıldığı zaman, istatistiksel olarak anlamlı şekilde az oranda saptanmıştır. Çalışmamızda dMMR grupta yer alan 18 tubuler G-ACa olgusu dışında, 3 olguda medüller karsinom, 3 olguda zayıf koheziv G-ACa, 4 olguda mikst karsinom ve 1 olguda müsinöz karsinom saptanmıştır. Bir

olguda ise tubuler morfolojiye %10 oranında mikropapiller paternin eşlik ettiği görülmüştür. dMMR grupta, MLH1 ve PMS2 kaybı dominant patern (%86,2) olarak izlenmiştir.

E-kaderin aberran grupta diğer moleküler gruplara göre daha yüksek oranda Lauren diffüz tip/ DSÖ zayıf koheziv tip saptanmış olmakla birlikte, yaş açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmemiştir. Kötü farklılaşma gösterme oranının, E-kaderin aberran grupta, diğer gruplara göre anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür.

P53 aberran grubun, istatistiksel olarak anlamlı şekilde, Lauren intestinal tip (%62,6) ve DSÖ tubuler tipe (%54,8) yüksek oranda korelasyon gösterdiği saptanmıştır. P53 aberran gruptaki HER2 pozitiflik oranının (HER2 İHK skor 3), diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür.

Tanımlanan 5 moleküler grup arasında, genel ve nüksüz sağ kalım oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

240 olgudan 3'ünde pan-TRK ile az sayıda neoplastik hücrede zayıf immunekspresyon izlenmiştir. Konfirmasyon amaçlı yapılan NTRK 1/2/3 FISH analizinde, NTRK 1/2/3 genlerindeki split oranı her 3 olguda da %5'den daha az oranda saptanmıştır. Pan-TRK İHK negatif kontrol grubunu oluşturan beş olgunun iki tanesinde NTRK1 gen split oranı %10 (%10 ve %14)'dan fazladır.

Sonuç: Çalışmamızda, İHK ve İSH analizleri yardımıyla, literatürdeki moleküler bazlı çalışmalar esas alınarak oluşturulan G-ACa gruplarının, çalışma kapsamına aldığımız kendi popülasyonumuzdaki dağılımı belirlenmiştir. Histolojik sınıflamalara göre, gruplardaki olguların dağılımı arasında anlamlı fark izlenmekle birlikte, hiçbir grup için özgün histolojik tip saptanmamıştır. Bu doğrultuda, hedef tedavileri yönlendirme açısından etkin olabilecek G-ACa gruplarının belirlenebilmesi için, İHK ve İSH yöntemlerinin rutin uygulanmasının önemli olduğunu bu çalışma göstermiştir.

Pan-TRK İHK ekspresyonu saptanan olgularımızda uygulanan FISH analiz sonuçları güncel kriterlere göre negatif kabul edilse de, çalışma ve kontrol gruplarında elde edilen FISH sonuçlarının, ilerleyen zamanlarda yapılacak kapsamlı moleküler

alışmalarla, prediktif ve/veya prognostik açıdan anlamlılık derecesinin araştırılması gerektiğine inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Gastrik adenokarsinom, moleküler sınıflandırma, TCGA, ACRG, mikrosatellit instabilite, EBV, nörotrofik- tropomiyozin reseptör tirozin kinaz (NTRK) gen füzyonu, pan-TRK, prognoz.



İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Aim: The aims of this study are; 1) to reclassify primary gastric adenocarcinoma (G-ACa), by using more common, accessible and cost-effective techniques such as immunohistochemistry (IHC) and in-situ hybridization (ISH) in accordance with the identified molecular subtypes, to evaluate their distribution in our population, to evaluate their morphological reflections and their relationship with the clinical and pathological parameters; 2) to determine the ratio of NTRK gene fusion in G-ACa by IHC (pan-NTRK) method, to investigate its relationship with our molecular classification subtypes and to investigate its independent prognostic role in individual subtypes.

Material and Methods: A total number of 240 gastrectomy specimens, which had been diagnosed as primary G-ACa in the Pathology Department of Marmara University School of Medicine, between 2013 and 2018 were included in the study. For tissue microarray (TMA) analysis, 4 samples, which are thought to best represent the tumor in tumor areas of different morphology, were placed in 3 mm diameter cores in the recipient blocks. In our study, 240 G-ACa cases were divided into five groups by EBER-chromogenic ISH (CISH) as well as, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, E-cadherin and p53 IHC, similar to the classification proposed by Setia et al., considering the previously published molecular classifications.

In our study, the prevalence of NTRK gene fusions in G-ACa and its relationship with G-ACa groups based on molecular studies were evaluated by applying the IHC (pan-TRK-EPR17341) method. NTRK 1/2/3 fluorescence-ISH (FISH) analysis was performed for confirmation in cases with pan-TRK expression.

In order to create a control group among the Pan-TRK negative cases, five cases with advanced stage were selected and NTRK 1/2/3 FISH analysis was applied.

The routine HER2 ISH and ISH (FISH / SISH) analyzes of the cases were also included in our study, and the results were obtained from the pathology reports recorded in the hospital information management system.

Findings: The mean follow-up period of the cases in our study was 19,97 months. In overall survival analysis; tumor macroscopic type 1 (polypoid), well differentiation

(grade 1 and grade 2), early gastric wall invasion level (pT1 + pT2) and lymph node involvement (pN0 + pN1), lymphatic / angioinvasion negativity and surgical margin negativity were associated with long survival. In relapse-free survival analysis; advanced stage lymph node metastasis (pN3), lymphatic invasion, angioinvasion, perineural invasion, tumor positivity at the surgical margin and desmoplastic response were associated with short recurrence-free survival.

In our study, 240 cases were divided into 5 groups by using IHC and ISH analysis; 3,7% (n = 9) EBV (+) group, 12,1% (n = 29) dMMR group, 12,9% (n = 31) E-cadherin aberrant group, 47,9% (n = 115) P53 aberrant group and 23,4% (n = 56) P53 normal group.

In our study, due to the limited number of EBV (+) cases, no statistically significant difference was found in terms of histomorphological and survival characteristics compared to other molecular groups. However, it is remarkable that all of the cases were male, 6 cases (66%) were proximally localized, and lymphocytic response was detected in 7 cases (77%). When the histological type of 9 cases with EBV (+) in our study was examined; 2 cases (22%) medullary carcinoma, 5 cases (55%) mixed type carcinoma (poorly cohesive + tubular), 1 case (11%) poorly cohesive carcinoma (containing signet ring cell component), 1 case (11%) tubular carcinoma (poorly differentiated / solid pattern dominant) was observed. In all EBV (+) cases, mismatch repair proteins (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) were detected as intact (mutually exclusive pattern) as IHC.

The average age seen in the dMMR group was found to be significantly higher than the other molecular groups (mean age 71 years). The presence of lymphocytic response was detected at a higher rate with the p53 aberrant group compared to other molecular groups. As histological type, with p53 aberrant group, Lauren intestinal type / WHO tubular type were found to be significantly higher than other molecular groups. Perineural invasion was found to be statistically significantly less when compared with other molecular groups. In our study, except for 18 tubular G-ACa cases in the dMMR group, 3 cases had medullary carcinoma, 3 cases had weak cohesive G-ACa, 4 cases had mixed carcinoma and 1 case had mucinous carcinoma. In one case, micropapillary

pattern was found to accompany tubular morphology at a rate of 10%. In the dMMR group, loss of MLH1 and PMS2 was found to be the dominant pattern (86.2%).

Although there was a higher rate of Lauren diffuse type / WHO weak cohesive type in the E-cadherin aberrant group compared to other molecular groups, no statistically significant difference was found in terms of age compared to the other groups. It was also observed that E-cadherin aberrant group had significantly higher differentiation grade compared to the other groups.

p53 aberrant group was found to be statistically significantly correlated with Lauren intestinal type (62,6%) and WHO tubular type (54.8%). The HER2 positivity rate (HER2 IHC score 3) in the p53 aberrant group was found to be statistically significantly higher than the other groups.

No statistically significant difference was found between the 5 defined molecular groups in terms of overall and recurrence-free survival rates.

In 3 out of 240 cases, weak immunoexpression was observed in a small number of neoplastic cells with pan-TRK. In the NTRK 1/2/3 FISH analysis applied for confirmation, the split ratio in NTRK 1/2/3 genes was found to be less than 5% in all 3 cases. The NTRK1 gene split ratio is more than 10% (10% and 14%) in two of the five Pan-TRK IHC negative cases.

Conclusion: In our study, with IHC and ISH analyzes, groups formed on the basis of molecular-based studies in the literature, the distribution of G-ACa's in our own population was determined. Although there was a significant difference between the distribution of cases in the groups according to histological classifications, no specific histological type was detected for any of the groups. In this respect, this study has shown that it is important to routinely apply IHC and ISH methods in order to determine the G-ACa groups that can be effective in directing target therapies.

Although the results of the FISH analysis performed in our cases with pan-TRK IHC expression are considered negative according to current criteria, we believe that the FISH results obtained in the study and control groups should be investigated in terms of predictive and / or prognostic significance with extensive molecular studies in the future.

Keywords: Gastric adenocarcinoma, molecular classification, TCGA, ACRG, microsatellite instability, EBV, neurotrophic- tropomyosin receptor tyrosine kinase (NTRK) gene fusion, pan-TRK, prognosis.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	vi
İÇİNDEKİLER	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİL DİZİNİ	xvii
TABLO DİZİNİ	xix
RESİM DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. EMBRİYOLOJİ	4
3. ANATOMİ.....	6
3.1. Midenin Kanlanması	6
3.2. Midenin İnervasyonu.....	7
3.3. Midenin Lenfatik Drenajı	7
4. HİSTOLOJİ.....	8
4.1. Yüzey Epiteli	8
4.2. Kardiak ve Antral Mukoza	9
4.3. Oksintik Mukoza	9
4.4. Endokrin Hücreler	10
4.5. Lamina Propria	10
4.6. Submukoza	10
4.7. Kas Yapıları.....	11
5. EPİDEMİYOLOJİ	12
6. ETİYOLOJİK RİSK FAKTÖRLERİ.....	13
6.1. Çevresel Faktörler	13
6.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu	13
6.1.2. Sigara kullanımı.....	15
6.1.3. Radyasyon.....	15
6.1.4. EBV enfeksiyonu.....	15
6.1.5. Beslenme.....	16

6.2. Genetik Faktörler	16
6.2.1. Gastrik adenokarsinomların eşlik ettiği herediter sendromlar	17
7. MAKROSKOPİK ÖZELLİKLER	20
7.1. Makroskopik Görünüme Göre Sınıflama	20
7.2. Lokalizasyona Göre Sınıflama	21
8. MİKROSKOPİK ÖZELLİKLER	22
8.1. Preneoplastik Lezyonlar	22
8.1.1. Non- atrofik gastrit.....	22
8.1.2. Atrofik gastrit.....	23
8.1.3. İntestinal metaplazi	23
8.1.4. Displazi	23
8.2. Histolojik Sınıflama	25
8.2.1. DSÖ 2019 Sınıflaması	26
8.2.2. Lauren sınıflaması.....	30
8.2.3. Diğer histolojik sınıflamalar	30
8.3. İmmünohistokimyasal Özellikler	31
9. MOLEKÜLER ÖZELLİKLER.....	32
9.1. Gastrik Adenokarsinomların Genomik Özellikleri	32
9.1.1. Somatik gen mutasyonları	32
9.1.2. Kromozomal kararsızlık (kromozomal instabilite).....	33
9.1.3. Genomik kararsızlık (mikrosatellit instabilite)	34
9.1.4. Epigenetik değişiklikler	34
9.2. Moleküler Sınıflama.....	35
10. NTRK GEN DEĞİŞİMLERİ	39
10.1. TRK Sinyal Yolağı.....	39
10.2. TRK Aktivasyonu ve Karsinogenezis	41
10.2.1. NTRK gen füzyonları	41
10.2.2. Füzyon dışı NTRK gen değişimleri	42
10.3. NTRK Gen Füzyonlarının İnsidansı.....	44
10.4. NTRK Gen Füzyonları ve Gastrik Adenokarsinom	45
10.5. NTRK Gen Füzyonlarının Saptanması.....	45
10.5.1. İmmünohistokimya	46
10.5.2. Floresan in-situ hibridizasyon.....	47
10.5.3. RT-PCR (reverse transcriptase- polymerase chain reaction).....	48

10.5.4. Yeni nesil dizileme	49
10.6. TRK İnhibisyonu	50
11. KLİNİK ÖZELLİKLER	52
11.1. Erken Mide Kanseri.....	52
11.2. Prognostik Faktörler	53
11.2.1. Evre	53
11.2.2. Farklılaşma Derecesi.....	55
11.2.3. Tümör yerleşimi.....	55
11.2.4. Mikroskopik tip.....	55
11.2.5. Moleküler profil.....	55
11.2.6. HER2	56
11.3. Mide Kanseri Tedavi	56
12. GEREÇ VE YÖNTEM	57
12.1. Olgu Seçimi	57
12.2. Etik Kurul Onayı	57
12.3. Demografik ve Histomorfolojik Veriler	57
12.3.1. Makroskopik sınıflama	58
12.3.2. Tümör yerleşim yeri.....	58
12.3.3. Histolojik sınıflama.....	58
12.3.4. Farklılaşma derecesi (grade).....	58
12.3.5. Evreleme (stage)	59
12.3.6. Lenfatik, vasküler ve perinöral invazyon	59
12.3.7. Cerrahi sınırlar	59
12.3.8. Tümör çevre mukoza değişiklikleri	59
12.4. Klinik İzlem Verileri	59
12.5. Tissue Microarray (TMA)	61
12.6. İmmünohistokimya ve İn-situ Hibridizasyon Uygulama Yöntemi	61
12.6.1. İHK uygulama yöntemi	61
12.6.2. HER2 ve NTRK1/2/3 FİSH uygulama yöntemi	62
12.6.3. HER2 gümüş in- situ hibridizasyon (SİSH) uygulama yöntemi.....	63
12.6.4. EBER kromojenik in- situ hibridizasyon (CISH) uygulama yöntemi	64
12.7. İmmünohistokimya ve İn-situ Hibridizasyon (İSH) değerlendirmesi	65
12.7.1. MLH1, MSH2, MSH6, PMS2- immünohistokimyasal değerlendirme	65
12.7.2. p53- immünohistokimyasal değerlendirme	65

12.7.3. E-Kaderin- immünhistokimyasal değerdendirme.....	67
12.7.4. Pan-TRK immünhistokimya ve NTRK1/2/3 FİSH değerdendirmesi.....	71
12.7.5. HER2 immünhistokimya ve İSH değerdendirmesi	71
12.7.6. EBER CISH değerdendirmesi	72
12.8. Moleküler Klasifikasyon	72
12.9. İstatistiksel Analiz	73
13. BULGULAR.....	74
13.1. Demografik Veriler, Klinik İzlem Bulguları ve Sağ Kalım Analizleri	74
13.2. Histomorfolojik Bulgular	76
13.3. İmmünhistokimya ve İn-situ hibridizasyon Analiz Bulguları	84
13.4. İHK ve İSH Sonuçları Doğrultusunda Moleküler Sınıflama	87
13.4.1. Gruplara göre demografik verilerin karşılaştırılması.....	88
13.4.2. Gruplara göre histomorfolojik özelliklerin dağılımı.....	88
13.4.3. Gruplara göre HER 2 durumunun karşılaştırılması	92
13.4.4. Gruplara göre pan-TRK durumunun değerdendirilmesi	93
13.4.5. Gruplara göre sağ kalım analizlerinin ve klinik takip bulgularının karşılaştırılması.....	94
13.5. Histomorfolojik Bulgulara Göre Sağ kalım Analizleri	97
13.6. HER2 Durumuna Göre Sağ kalım Analizleri.....	106
14. TARTIŞMA	107
15. SONUÇLAR	121
16. RESİMLER.....	124
17. KAYNAKLAR	145

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-FU: 5-Florourasil

ACRG: The Asian Cancer Research Group

AFP: Alfa-Fetoprotein

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ARID1A: AT-rich interactive domain-containing protein 1A

ATP1B: ATPase subunit beta-1

BDNF: Brain-derived Neurotrophic Factor

BRCA: Breast Cancer Gene

Cag PAI: Pathogenicity Island

cDNA: komplementer DNA

CISH: kromojenik in- situ hibridizasyon

CpG: Cytidine-phosphateguanosine

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EBER: Epstein Barr virus encoded small RNAs

EBV: Epstein Barr virus

EC: Enterokromaffin

ECL: Enterokromaffin benzeri

EGFR: Endothelial Growth Factor Receptor

EMT: Epithelial Mesenchymal Transition

ESMO: European Society for Medical Oncology

ETV6: ETS Variant Transcription Factor 6

FDA: Food and Drug Administration

FİSH: Floresan in-situ hibridizasyon

G-ACa: Gastrik Adenokarsinom

G-DIF: Genomik diffüz

G-INT: Genomik intestinal

GS: Genomik stabil

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor
İHK: İmmünohistokimya
İSH: İn- situ hibridizasyon
JGCA: Japanese Gastric Cancer Association
LMNA: Lamin A/C
LOH: Loss of heterozygosity
MAPK: Mitogen- activated protein kinase
MSI: Mikrosatellit instabil
MSS: Mikrosatellit stabil
NF-kB: Nuclear factor kappa B
NGF: Nerve Growth Factor
NGS: Next- generation sequencing
NT: Nörotrofin
NTRK: Nörotropik tropomiyosin reseptör kinaz
PAS: Periyodik asit-Schiff
PCR: Polymerase chain reaction
PD-1: Programmed cell death -1
PD-L1: Programmed cell death ligand-1
PI3K/AKT: Phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B
RHOA: Ras homolog family member A
RNF43: Ring Finger Protein 43
ROS1: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase reactive oxygen species
RTK: Reseptör tirozin kinaz
SALL4: Sal-like protein 4
SPEM: Spazmolitik peptid ekspresyon eden metaplazi
STK11: Serine/threonine kinase 11
TCGA: The Cancer Genome Atlas
TGF-B: Transforming Growth Factor- beta
TNF: Tumour Necrosis Factor

TPM3: Tropomyosin alpha-3 chain

TRK: Tropomiyosin reseptör kinaz

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 . A, B ve C: Midenin uzun eksenini etrafındaki rotasyonunun önden görünümü; D ve E: Midenin anteroposterior eksen etrafındaki rotasyonu.....	5
Şekil 2. Borrmann makroskopik sınıflaması.....	20
Şekil 3. Özofagogastrik bileşke tümörlerinde Siewert sınıflaması	21
Şekil 4. H. Pylori enfeksiyonunun ana klinik sonuçları ve gastrik adenokarsinomda görülen prekanseröz sekans basamakları	22
Şekil 5. TRK sinyal yolağı	40
Şekil 6. NTRK füzyonlarının aktivasyon mekanizması.....	42
Şekil 7. Yetişkin ve pediatrik tümörlerdeki NTRK füzyonlarının görülme sıklığı ve dağılımı	44
Şekil 8. Erken mide kanserinin makroskopik sınıflanması.....	52
Şekil 9. Gastrik adenokarsinomda sağ kalım ile histolojik invazyon derinliği (a) ve histolojik lenf nodu metastazı (b) ilişkisi	53
Şekil 10. Nüksüz sağ kalım grafiği.....	75
Şekil 11. Genel sağ kalım grafiği.....	75
Şekil 12. Makroskopik ve mikroskopik değerlendirme sonuçları	82
Şekil 13. Tümör çevre mukoza değişiklikler	83
Şekil 14. İHK ve İSH analiz bulguları	86
Şekil 15. Olguların gruplara dağılım şeması.....	87
Şekil 16. Gruplara göre genel sağ kalım analizi grafiği (p=0,280).....	96
Şekil 17. Gruplara göre nüksüz sağ kalım analizi grafiği (p=0,635).....	96
Şekil 18. Makroskopik tiplere göre genel sağ kalım analiz grafiği.....	99
Şekil 19. Farklılaşma derecesine göre genel sağ kalım analiz grafiği	100
Şekil 20. T evrelerine göre genel sağ kalım analiz grafiği.....	100
Şekil 21. N evrelerine göre genel sağ kalım analiz grafiği	100
Şekil 22. N evrelerine göre nüksüz sağ kalım analizi grafiği.....	101
Şekil 23. Lenfatik invazyon varlığına göre genel sağ kalım analiz grafiği.....	101
Şekil 24. Lenfatik invazyon varlığına göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği	101
Şekil 25. Anjioinvazyon varlığına göre genel sağ kalım analiz grafiği	102
Şekil 26. Anjioinvazyon varlığına göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği.....	102

Şekil 27. Perinöral invazyon varlığına göre genel sağ kalım analiz grafiği.....	102
Şekil 28. Cerrahi sınır durumuna göre genel sağ kalım analiz grafiği.....	103
Şekil 29. Cerrahi sınır durumuna göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği.....	103
Şekil 30. Desmoplastik yanıt varlığına göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği.....	103



TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Gastrik adenokarsinom gelişimine neden olan karsinojen ajanlar.....	13
Tablo 2. Gastrik adenokarsinomların eşlik ettiği hereditör sendromlar	19
Tablo 3. Gastrik adenokarsinomlarda kullanılan histolojik sınıflamalar	26
Tablo 4. Gastrik adenokarsinoma yönelik moleküler sınıflamalar ve bu sınıflamaların tedaviye olan yansımaları	38
Tablo 5. Gastrik adenokarsinom evreleme.....	54
Tablo 6. Değerlendirilen demografik ve histomorfolojik veriler ve değerlendirilme kriterleri.....	60
Tablo 7. İmmünohistokimya uygulamasında kullanılan antikorlar ve özellikleri	62
Tablo 8. Tümörde makroskopik ve mikroskopik değerlendirme sonuçları	79
Tablo 9. Tümör çevre mukoza değişiklikleri	80
Tablo 10. İHK ve İSH analiz bulguları	84
Tablo 11. Pan-TRK pozitif üç tümörün NTRK1/2/3 FISH analiz bulguları	85
Tablo 12. Pan-TRK negatif beş tümörün NTRK1/2/3 FISH analiz bulguları	85
Tablo 13. Gruplara göre demografik verilerin değerlendirilmesi	88
Tablo 14. Gruplara göre histomorfolojik özelliklerin değerlendirilmesi	91
Tablo 15. Gruplara göre tümör çevre mukoza özelliklerinin değerlendirilmesi	92
Tablo 16. Gruplara göre HER2 analizlerinin karşılaştırılması.....	93
Tablo 17. Pan-TRK pozitif üç tümörün gruplara göre dağılımı	94
Tablo 18. Pan-TRK negatif beş tümörün gruplara göre dağılımı	94
Tablo 19. Gruplara göre klinik takip bulgularının değerlendirilmesi	95
Tablo 20. Histomorfolojik değişkenlere göre genel sağ kalım analiz sonuçları	104
Tablo 21. Histomorfolojik değişkenlere göre nüksüz sağ kalım analiz sonuçları ..	105
Tablo 22. HER2 durumuna göre genel sağ kalım ilişkisi	106
Tablo 23. HER2 durumuna göre nüksüz sağ kalım ilişkisi	106

RESİM DİZİNİ

Resim 1. P53 intakt ekspresyon (İHKx20)	66
Resim 2. P53 aberran ekspresyon ($\geq$ %70 güçlü nükleer ekspresyon) (İHKx20)	66
Resim 3. P53 aberran ekspresyon ($<$ %5 ekspresyon) (İHKx20)	67
Resim 4. E-kaderin heterojen +1 ekspresyon (İHKx20).....	68
Resim 5. E-kaderin heterojen +2 ekspresyon (İHKx20).....	68
Resim 6. E-kaderin heterojen +3 ekspresyon (İHKx20).....	69
Resim 7. E-kaderin intakt ekspresyon (İHKx20).....	69
Resim 8. E-kaderin aberran (sitoplazmik, granüler) ekspresyon (İHKx20)	70
Resim 9. E-kaderin aberran (komplet kayıp) ekspresyon (İHKx20)	70
Resim 10. EBV (+) G-ACa; Medüller karsinom (H/Ex20)	124
Resim 11. EBV (+) G-ACa; Tubuler adenokarsinom (H/E x20).....	124
Resim 12. A. EBV (+) G-ACa; Mikst karsinom (H/Ex20), B. EBER CISH heterojen boyanma paterni; tubuler komponent pozitif, zayıf koheziv komponent negatif (CISHx20).....	125
Resim 13. A. EBV (+) G-ACa; Mikst karsinom (H/Ex20), B. EBER CISH heterojen boyanma paterni; tubuler komponent pozitif, zayıf koheziv komponent negatif (CISHx20).....	126
Resim 14. A. EBV (+) G-ACa; Zayıf koheziv karsinom (H/Ex20), B. EBER CISH heterojen boyanma paterni; belli belirsiz boyanma gösteren tubuler yapılar, diskoheziv tümör hücreleri negatif (CISHx20).....	127
Resim 15. dMMR G-ACa; Medüller karsinom (H/E x20)	128
Resim 16. dMMR G-ACa; Tubuler adenokarsinom (H/E x20).....	128
Resim 17. dMMR G-ACa; Mikropapiller patern gösteren tümör hücreleri (H/E x20)	129
Resim 18. dMMR G-ACa; Müsinöz adenokarsinom, taşlı yüzük hücresi içeren (H/E x20).....	129
Resim 19. dMMR G-ACa; Zayıf koheziv karsinom, taşlı yüzük hücresi içeren (H/E x20).....	130
Resim 20. E-kaderin aberran G-ACa; Yolk sac benzeri karsinom (H/E x10)	130
Resim 21. E-kaderin aberran G-ACa; Tubuler karsinom (H/E x20)	131

Resim 22. E-kaderin aberran G-ACa; müsinöz komponent ve taşlı yüzük hücresi içeren zayıf koheziv karsinom (H/Ex20)	131
Resim 23. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Mikst tip karsinom (H/E x20)	132
Resim 24. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Müsinöz karsinom (H/E x20)	132
Resim 25. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Medüller karsinom (H/E x20)	133
Resim 26. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Zayıf koheziv karsinom (H/E x20).....	133
Resim 27. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Tubulopapiller karsinom (H/E x20).....	134
Resim 28. P53- aberran ($< 5\%$ ekspresyon) G-ACa; Medüller karsinom (H/E x20)	134
Resim 29. P53- aberran ($< 5\%$ ekspresyon) G-ACa; Müsinöz karsinom (H/E x20)	135
Resim 30. P53- aberran ($< 5\%$ ekspresyon) G-ACa; Mikst karsinom (H/E x20).....	135
Resim 31. P53- aberran ($< 5\%$ ekspresyon) G-ACa; Zayıf koheziv karsinom (H/E x20)	136
Resim 32. P53- aberran ($< 5\%$ ekspresyon) G-ACa; Tubuler karsinom (H/E x20) .	136
Resim 33. A. Mikst karsinom (Olgu 1) (H/Ex20) , B. Pan-TRK ile sitoplazmik noktasal ekspresyon (İHKx40).....	137
Resim 34. A. Medüller karsinom (Olgu 3) (H/Ex20), B. Pan-TRK ile nükleer ekspresyon (İHKx40).....	138
Resim 35. A. Tubuler karsinom (Olgu 2) (H/Ex20), B. Pan-TRK ile nükleer ekspresyon (İHKx40).....	139
Resim 36. Pan-TRK nükleer ekspresyon izlenen p53-normal grupta yer alan olguya (Olgu 2) ait NTRK1 FISH analizi (split oranı %4,2).....	140
Resim 37. Pan-TRK negatif dMMR grupta yer alan olguya (Olgu 4) ait NTRK1 FISH analizi (split oranı %14)	141
Resim 38. Pan-TRK negatif E-kaderin aberran grupta yer alan olguya (Olgu 5) ait NTRK1 FISH analizi (split oranı %10)	141

Resim 39. MLH1 ve PMS2 kaybı birlikteliği; A. PMS2 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20), B. MLH1 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20).....	142
Resim 40. MSH2 ve MSH6 kaybı birlikteliği; A. MSH6 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20), B. MSH2 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20).....	143
Resim 41. Yalnız PMS2 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20)	144
Resim 42. HER2 FİSH amplifikasyon (yeşil: kromozom17, kırmızı: HER2 geni). 144	



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gastrik adenokarsinom (G-ACa), tüm dünyada görülme sıklığı açısından beşinci, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer alır [8]. Genellikle mortalitesi yüksek, kötü prognozlu tümörlerdir. İleri evre hastalıkta ortalama sağ kalım süresi yaklaşık 11 ay, 5 yıllık sürvi %25-30 düzeyindedir [9, 10].

G-ACa, morfolojik ve moleküler düzeyde, heterojen bir tümör grubudur. Bu nedenle günümüze değin, prognozu değerlendirmek ve tedaviyi yönlendirmek amacı ile, farklı sınıflama sistemleri kullanılmıştır. G-ACa'ları intestinal ve difüz tip olmak üzere iki ana gruba ayıran, 1965'te öne sürülen Lauren Sistemi, halen en yaygın kullanılan histolojik sınıflama sistemidir ve farklı epidemiyolojik, klinik-patolojik, moleküler özellikleri yansıttığı kabul edilmektedir [11]. Diğer yaygın olarak kullanılan histolojik sınıflama sistemi, 2010 yılında kabul edilen Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasıdır [12]. DSÖ sınıflamasında; tubuler, papiller, müsinöz, taşlı yüzük hücre komponenti içerebilen zayıf koheziv ve mikst alt tiplerin yanısıra diğer nadir görülen histolojik varyantlar (yaklaşık %5) tanımlanmıştır. Her iki sınıflama sistemi de, klinik yönlendirici olma özelliği açısından ileri derecede sınırlıdır.

Son yıllarda, çok sayıda araştırmacı hedefe yönelik tedavi seçimlerinin arttırılabilmesi için G-ACa'ların moleküler alt yapısını çözümlemeye ve biyolojik-klinik açıdan homojen alt tiplerin belirlenmesine odaklanmıştır. Bu doğrultuda, G-ACa'larda sınıflama, moleküler tekniklerin uygulanabilirlik kazanması ile gelişme göstermiştir [13-19]. 2014'te TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) ve 2015'te ACRG (*Asian Cancer Research Group*) tarafından yayınlanan moleküler sınıflamalar bu alandaki en önemli ve kapsamlı çalışmalardır. Çok sayıda farklı moleküler platform kullanılarak elde edilen verilere göre TCGA'da dört genomik tip tanımlanmıştır; kromozomal kararsız (kromozomal instabil; CIN), genomik kararsız (mikrosatellit instabil; MSI), genomik stabil (GS) ve Epstein- Barr virüs (EBV) ilişkili [19]. ACRG sınıflamasında ise, EBV pozitifliğinin yerine P53 mutasyonu kullanılarak prognoz, nüks sıklığı ve özelliği gibi klinik bilgilerle korelasyon gösteren dört moleküler tip tanımlanmıştır: MSI, mikrosatellit stabil (MSS)/EMT (*epithelial mesenchymal transition*), MSS/P53+ (normal P53 aktivitesi) ve MSS/P53- (P53 fonksiyon kaybı) [14]. G-ACa'ların biyolojik açıdan tanımlanmasında önemli gelişmeler olduğu kabul

edilmekle birlikte, belirtilen sınıflamaların uygulanabilmesi, RNA-DNA sekanslama, DNA metilasyon analizi, tam ekzon sekanslama ve fosfoproteomik analiz gibi her laboratuvarında olmayan yüksek maliyetli ve kompleks metodolojilerin kullanılmasını gerektirir. Ayrıca bu sınıflamaların prognostik değerleri, hastaların sınırlı takip süreleri nedeniyle netleştirilememiştir. Literatürde, rutin pratikte kullanılan, basit metodların yardımıyla tanımlanan, farklı moleküler özellikteki alt grupları, prognostik ve prediktif önemi olan farklı immünofenotipteki alt gruplara dönüştüren taksonomik çalışmalar bulunmaktadır [20-24].

Günümüzde, G-ACa'da erken evrede küratif tedavi, yalnız yeterli cerrahi rezeksiyon ile olasıdır. İleri evre ve rezeke edilemeyen G-ACa'larda ise kloropirimidin ve platinum bazlı kemoterapi rejimleri neoadjuvan veya adjuvan tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Konvansiyonel kemoterapötik rejimlere ek olarak, spesifik onkojenik yollar göz önüne alınarak geliştirilen monoklonal antikorlara yönelik hedef tedaviler, yeni tedavi rejim önerilerini oluşturmaktadır. Faz III klinik çalışmalara göre, trastuzumab (anti-HER2; human epidermal growth factor receptor) [25] ve ramucirumab (anti-VEGFR2; vascular endothelial growth factor receptor) [26, 27] monoklonal antikorları, ileri evre/metastatik G-ACa'larda kullanılan FDA (*Food & Drug Administration*) onaylı hedefe yönelik tedavi ajanlarıdır, ancak klinik açıdan faydaları oldukça sınırlıdır. HER2, G-ACa'da hedefe yönelik tedavi için şu anda klinik pratikte kullanılan tek biyolojik belirteçtir. Hedefe yönelik yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için, diğer kanserlerde olduğu gibi, G-ACa'da da kapsamlı çalışmalar sürdürülmektedir.

Nörotrofinler (NT), tropomiyosin reseptör kinaz (TRK) ve p75^{NTK} reseptörlerine bağlanarak etki gösteren, santral ve periferik sinir sisteminin normal gelişiminden sorumlu büyüme faktörleridir [28, 29]. TRK reseptörlerinin uyarılması, hücre devamlılığını, büyümeyi ve gelişmeyi sağlarken; p75^{NTK} reseptörlerinin uyarılması genellikle inhibe edici etki gösterir [28]. Bağlanan NT'lerin farklılık gösterdiği TRK ailesinin tanımlanan üç üyesi sırasıyla nörotropik tropomiyosin reseptör kinaz 1 (NTRK1), NTRK2 ve NTRK3 genleri tarafından kodlanan TRKA, TRKB ve TRKC reseptörleridir [30].

NT'ler ile reseptörlerinin, nörodejeneratif hastalıklar ve beyin tümörlerinin yanı sıra, akciğer, meme, kolon, pankreas kanseri gibi sık görülen tümörlerin

gelişiminden sorumlu olabilecekleri son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [28]. Önceki yıllarda NTRK genlerinin proto-onkogenik özelliklerinin olduğu düşünülmesine karşın, son yıllarda yapılan çalışmalarda tropomyosin-3, lamin A/C gibi genlerle NTRK genleri arasındaki translokasyonlar sonucu gelişen onkogenik füzyonların karsinogenezden sorumlu ana mekanizma olduğu bildirilmiştir. Akciğer ve kolon kanserlerinde %1-3, memenin sekretuar karsinomlarında %100'e ulaşan oranlarda NTRK füzyonu olduğu belirlenmiştir. Literatürde farklı tümörlerde uygulanan sınırlı sayıda çalışmaya göre, NTRK gen füzyonlarını saptamak için, pan-TRK immünohistokimya (İHK) yönteminin yüksek duyarlılık ve özgüllük değerleriyle ilk basamakta yararlı bir tarama metodu olabileceği öne sürülmüştür [31].

Hedefe yönelik tedavi amaçlı kullanılan NTRK inhibitörlerinden larotrectinib ve entrectinibe füzyon tipinin, tümör tipi ve tümör yerleşiminden bağımsız yanıt oranları sırasıyla %75 ve %57 olarak bildirilmiştir [32, 33]. Tedaviye yanıtın etkisinin spesifik NTRK füzyon içeren kanserlerde yüksek oranda olduğu öne sürülmekteyken, füzyon dışı NTRK gen değişiklikleri içeren kanserlerde yanıt elde edilememiştir [34].

Çalışmamızda; 1) literatürde tanımlanmış moleküler alt tipler göz önüne alınarak, G-ACa'ları, İHK ve in-situ hibridizasyon (İSH) gibi daha yaygın, ulaşılabilir ve düşük maliyetli teknikler kullanarak sınıflamak, kendi popülasyonumuzdaki dağılımlarını değerlendirmek, morfolojik yansımalarını ve klinik-patolojik parametrelerle olan ilişkilerini belirlemek; 2) İHK (pan-TRK) yöntemi ile G-ACa'larda NTRK gen füzyon oranını belirlemek, moleküler sınıflama alt tipleri ile ilişkisini ve her grup içindeki bağımsız prognostik rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

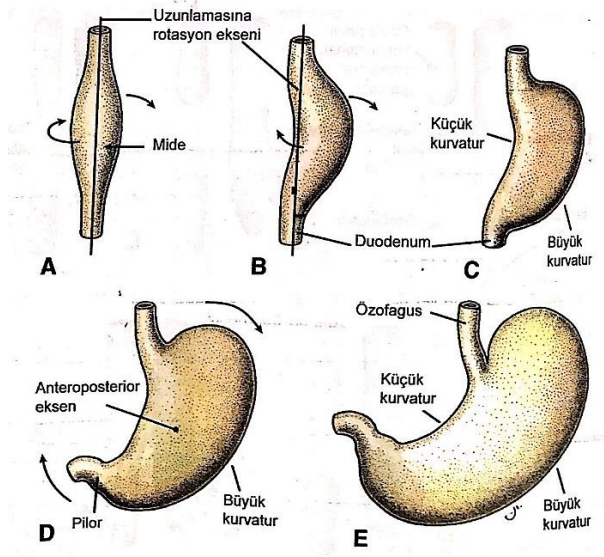
2. EMBRİYOLOJİ

Mide, 7 mm uzunlukta gelişiminin 4. haftasındaki embriyoda endoderm kökenli ön bağırsağın (*foregut*), özofagus kaudalinde fuziform şekilde dilate olmasıyla gelişir. Sonraki haftalarda, mide duvarının değişik bölgelerinin farklı büyüme hızında olması ve etrafındaki organların pozisyon değişiklikleri sonucunda midenin şekil ve pozisyonu önemli ölçüde değişim gösterir [35]. Mide pozisyonundaki değişiklikler, longitudinal ve ön-arka eksen etrafında döndüğü kabul edilerek açıklanabilir (Şekil 1).

Mide longitudinal eksen etrafında, saat yönünde 90 derece döndüğü zaman, sol tarafı öne ve sağ tarafı arkaya bakan duruma gelir (Şekil 1 A-C). Bu dönüş sırasında midenin orijinal arka duvarının ön duvardan daha hızlı büyümesi, büyük ve küçük kurvaturaların oluşumu ile sonuçlanır (Şekil 1 C). Midenin başlangıçta orta hatta yer alan sefalik ve kaudal uçları, midenin ön-arka eksen etrafında dönmesi sonucunda sırasıyla sağa-aşağıya ve sola-yukarıya doğru yer değiştirir (Şekil 1 D-E).

Mide başlangıçta karın arka ve ön duvarına, sırasıyla dorsal ve ventral mezogastriyum aracılığıyla tutunur. Midenin dönüşü sırasında dorsal mezogastriyum sola doğru çekilerek mide arkasında *bursa omentalis* (küçük periton kesesi) olarak adlandırılan peritoneal boşluk oluşur. Mide genişledikçe, dorsal mezogastriyumdan *omentum majus* (büyük omentum) ve ventral mezogastriyumdan *omentum minus* (küçük omentum) gelişir [35, 36].

Embriyo 80 mm uzunluğa erişince midede ilk bez yapıları ortaya çıkmaya başlar. Fetal gelişimin 4. ayında başlayan enzim üretimi ve asit salgısı doğuma kadar olgunlaşır. Yenidoğan midesi tamamen olgunlaşmış yetişkin midesi görünümündedir [36].



Şekil 1 . A, B ve C: Midenin uzun eksenli etrafındaki rotasyonunun önden görünümü;
D ve E: Midenin anteroposterior eksen etrafındaki rotasyonu [21]

3. ANATOMİ

Mide anatomik olarak dört bölüme ayrılır: **1) Kardiya, 2) Fundus, 3) Korpus ve 4) Antrum.** Midenin üst-iç yüzü küçük kurvatur, alt-dış yüzü büyük kurvatur olarak adlandırılır. Gastroözofageal bileşke, anatomik olarak özofagusun sakküler mideye dönüştüğü nokta olarak tanımlanır. Kişinin boy uzunluğuna bağlı olarak değişmekle birlikte, kesici dişlerden yaklaşık 40 cm distalde yer alır. Kardiya, gastroözofageal bileşkeden itibaren 1-3 cm distale doğru uzanan küçük ve sınırları belirsiz alandır. Fundus, sol hemidiyaframın hemen altında, gastroözofageal bileşkenin üzerinde yer alan kubbe şeklindeki kısımdır. Antrum, midenin distal üçte birini oluşturan, pilorik sfinkterin proksimalinde yer alan bölümdür. Midenin geri kalan kısmına korpus adı verilir. Korpustan antruma geçişin keskin ve ani olmadığı, anatomik olarak küçük kurvaturun katlantı noktası olan *incisura angularis*’ ten başladığı kabul edilir.

Midenin iç yüzü ruga olarak adlandırılan, özellikle korpus ve fundusta daha belirgin olan katlantılarla kaplıdır. Mide boşken belirgin olan bu katlantılar, midenin genişleyip yüzeyinin gerginleşmesiyle düzleşir.

Mide duvarı dört tabakadan oluşur: **1) Mukoza, 2) Submukoza, 3) Muscularis propria ve 4) Subseroza.** Mukoza dışındaki diğer tabakalar tüm gastrointestinal kanal boyunca benzer özelliklere sahiptir [36].

3.1. Midenin Kanlanması

Mideyi besleyen beş arter vardır. Sol gastrik arter kardiyayı, sağ gastrik arter küçük kurvaturu, sağ ve sol gastroepiploik arter ile kısa gastrik arterler büyük kurvaturu besler. Tüm bu arterler birbirleriyle subserozal tabakada, submukozada ve muskularis propriada serbest şekilde anastomozlaşır. Mukozal arterler submukozal damar pleksusundan köken alır ve her bir mukozal arter uç arter özelliği göstererek mukozanın kendine ait olan kısımlarını besler [36].

3.2. Midenin İnervasyonu

Midenin sempatik inervasyonu çölyak pleksustan çıkan sinirlerle, parasempatik inervasyonu gastroözofageal bileşkede vagustan ayrılan ön ve arka dallarla sağlanır. Sempatik ve parasempatik sinirler mide duvarına girdikten sonra, muskularis propria'da sirküler ve longitudinal kas lifleri arasında Auerbach sinir pleksusunu, submukozada ise Meissner sinir pleksusunu oluştururlar [36].

3.3. Midenin Lenfatik Drenajı

Lamina proprianın tüm seviyelerinde lenfatik kanalların bulunduğu görüşü, son yıllarda yapılan çalışmalar ile değişiklik göstermiştir [37, 38]. Elektron mikroskopisi ile yapılan incelemelerde, lenfatik kanalların sadece muskularis mukoza'nın üst komşuluğundaki lamina propria'da bulunduğu tespit edilmiştir. Buradan çıkan lenfatik kanallar, muskularis mukoza tabakasını aşarak, submukozadaki daha büyük lenfatik kanallara açılır. Muskularis mukozaya ulaşmamış erken evre mide kanserlerinde lenfatik metastazların görülmesi, lenfatiklerin tanımlanan bu yerleşimleri ile açıklanmaktadır [36].

Midede, arter ve venleri takip eden dört ana lenfatik drenaj alanı vardır. Özofagusun distalinden başlayarak küçük kurvaturun çoğunluğunu kapsayan en büyük alanı, sol gastrik lenf nodları; küçük kurvaturun distalinden pilora doğru uzanan bölgeyi, sağ gastrik ve hepatik lenf nodları drene eder. Büyük kurvaturun proksimal kısmının lenfatik drenajı pankreatikosplenik lenf nodlarına, distal kısmının lenfatik drenajı sağ gastroepiploik lenf nodları ile pilorik lenf nodlarına doğrudur. Belirtilen lenf nodlarının tümünün drenajı çölyak lenf nodlarıdır [36].

4. HİSTOLOJİ

Mide mukozası bütün anatomik bölgelerinde benzer özelliklere sahiptir ve iki kısımdan oluşur: **1)** Mide yüzey epitelinin içe doğru katlanması sonucu gelişen yüzeyel çukurcuklar (foveolae, pits), **2)** Daha derinde bulunan, foveolaların tabanlarına açılan, bulundukları anatomik bölgeye göre farklı yapı ve işlevleri olan bezler.

Gastroözofageal bileşkenin komşuluğunda kardiak mukoza bulunur. Midenin distalinde, pilordan proksimale doğru uzanan antral (pilorik) mukoza vardır. Kardiak ve antral mukozadaki bezler benzer özelliklere sahiptir ve mukus sekrete ederler. Korpus ve fundusta, asit ve enzim sekrete eden bezler içeren oksintik mukoza bulunur. Oksintik mukozadan antral mukozaya geçiş aşamalıdır, arada 1-2 cm genişlikte mikst histolojik görünüme sahip olan geçiş bölgesi bulunur. Gastrik ve duodenal mukozanın iç içe geçtiği pilorik alanda da benzer olarak mukozal geçiş zonu yer alır. Bu iki geçiş bölgesinden farklı olarak, mikroskopik ve makroskopik açıdan, özofagusun non-keratinize skuamöz epitelinden kardiyak kolumnar mukozaya geçişi anidir. Histolojik olarak bu geçişin görüldüğü yer olan skuamokolumnar bileşkenin pozisyonu değişkendir ve bu pozisyon anatomik gastroözofageal bileşke ile her zaman örtüşmeyebilir. Bazı kişilerde skuamokolumnar bileşke, gastroözofageal bileşkenin 0,5-2,5 cm proksimalinde yer alır ve testere dişi (*serrated*) görünümündedir (Z çizgisi) [36].

4.1. Yüzey Epiteli

Gastrik mukoza, mukus sekrete eden uzun kolumnar hücrelerle döşelidir. Yüzey ve foveolaları döşeyen epitel hücreleri tüm mide mukozası boyunca benzer özelliktedir. Epitel hücrelerindeki mukus, histokimyasal olarak periyodik asit-Schiff (PAS) boyasıyla magenta-pembe renkte boyanan nötral özelliktedir [36].

4.2. Kardiak ve Antral Mukoza

Kardiak ve antral mukozada, hafifçe villöz görünüme neden olan foveolalar, mukoza kalınlığının yaklaşık yarısını oluşturur. Midenin diğer bölgelerinde olduğu gibi, kardiak ve antral mukozada mukus salgılayan bezler ile foveolalar arasında destek olarak lamina propria bulunur. Kardiak ve antral mukozada, özellikle oksintik mukozaya geçiş bölgelerinde, tek tek veya küçük gruplar halinde pariyetal hücrelere rastlanabilir. Buna karşın, esas hücrelerin, oksintik mukoza ve geçiş bölgeleri dışında bulunması nadirdir. Antral bölgedeki bezler yalnızca nötral münin salgılayarak, kardiadaki bezler nötral münine ek olarak az miktarda siyalomünin salgılayabilir [36].

4.3. Oksintik Mukoza

Oksintik mukozada foveolalar, mukoza kalınlığının dörtte birinden azını oluşturur. Oksintik mukoza bezleri, kardiak ve antral mukoza bezlerine göre daha düz ve birbirine yakın şekilde gruplanmıştır. Bu bezler taban, boyun ve istmus olarak üç kısma ayrılır. Taban kısmında, çoğunlukla pepsinojen salgılayan, esas hücreler (*chief cells*) olarak da adlandırılan zimojenik hücreler bulunur. İstmustaki baskın hücre grubu hidroklorik asit ve intrensek faktör salgılayan pariyetal hücrelerdir. Boyun bölgesinde, esas hücreler ve pariyetal hücrelere ek olarak, müköz boyun hücreleri bulunur [36].

Yapılan çalışmalar, müköz boyun hücrelerinin tüm midede bulunduğunu ve mukozal rejenerasyondan sorumlu kök hücre özelliğinde farklılaşmamış hücreler olduğunu göstermiştir. Müköz hücreler farklılaşma göstererek lümene ve tabana doğru göç eder. Lümene doğru göç ile foveolar ve yüzey epitel hücrelerini, tabana doğru göç ile zimojenik, pariyetal ve nöroendokrin hücreleri oluştururlar [39]. İnsanlarda mide yüzey epitelinin her 4-8 günde bir yenilendiği düşünülmektedir [36].

4.4. Endokrin Hücreler

Mide mukozasında hormon üreten birçok farklı hücre tipi yaygın olarak yer alır. Antral mukozada endokrin hücrelerin yaklaşık yarısı, gastrin sentezleyen G hücrelerinden oluşur. Geriye kalan endokrin hücrelerin çoğu serotonin üreten enterokromaffin (EC) hücreler ile daha az oranda somatostatin üreten D hücreleridir. Oksintik mukozada bulunan endokrin hücrelerin çoğunluğunu, histamin salgılayan enterokromaffin benzeri (ECL) hücreler oluşturur. Endokrin hücreler tarafından sentezlenen hormonlar kana karışır (hormonal etki) veya çevredeki hücreleri doğrudan etkiler (parakrin etki) [36].

4.5. Lamina Propria

Yüzey epiteli, foveola ve bezleri oluşturan hücreler bazal membranın üzerinde yer alır. Bazal membranın altında, destek tabakası özelliğinde olan kollajen, elastik ve retikülin lifler içeren lamina propria bulunur. Lamina propriada fibroblastlar, histiyositler, plazma hücreleri ve lenfositler gibi çeşitli hücreler görülebilmekle birlikte, nötrofiller ve mast hücreleri nadiren izlenir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, mide dokusunda normal olarak primer lenfoid foliküllerin bulunabildiğini göstermiştir [40]. Ancak germinal merkezlerin görüldüğü sekonder lenfoid foliküllerin varlığı, genellikle *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna bağlı gelişen gastriti düşündürür [36].

4.6. Submukoza

Muskularis mukoza ve muskularis propria arasında bulunan submukoza, çok sayıda elastik lif içeren gevşek bağ dokusudur. Submukozada Meissner plexusu ile venlerin, arterlerin ve lenfatik damarların oluşturduğu plexuslar bulunur [36].

4.7. Kas Yapıları

Muskularis eksterna olarak da adlandırılan muskularis propria en dışta longitudinal, ortada sirküler ve en ite oblik lifler olmak üzere üç tabakadan oluşur. En dıştaki longitudinal lifler özofagusun longitudinal kas tabakası ile devamlılık gösterir. Sirküler lifler pilorik sfinkteri oluşturur. Oblik lifler sirküler liflerin iç tarafında çoğunlukla kardiak bölgede bulunan inkomplet tabakadır.

Muskularis mukoza ise dışta longitudinal ve içte sirküler olarak iki tabakadan oluşur. Özellikle distal antrumda muskularis mukozadan lamina propriaya penetre olan düz kas lifleri, yüzey epitelinin bazal membranına kadar uzanım gösterir [36].



5. EPİDEMİYOLOJİ

Eski Mısır'da M.Ö. 3000 yılında yazılan hiyeroglif yazıtlar ve papirüs el yazmalarındaki referanslara göre mide kanseri bilinen en eski kanserlerden biridir.

Helicobacter pylori eradikasyonundaki ve kanser taramalarındaki ilerlemeyle birlikte G-ACa insidansı ve mortalitesi son yıllarda azalma göstermiştir. Buna rağmen GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında 1 milyonun üzerinde yeni vaka ve 783.000 kansere bağlı ölüm bildirilmiştir. G-ACa, dünyada, görülme sıklığı açısından beşinci, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sıradadır [8].

G-ACa insidansı yaşla beraber artış gösterir ve tanı anında ortalama yaş güncel SEER verilerine göre 68' dir [41]. G-ACa, erkeklerde kadınlara göre gelişmiş ülkelerde 2,2 kat, gelişmekte olan ülkelere 1,83 kat fazladır [8, 42]. İran, Türkmenistan ve Kırgızistan gibi bazı Batı Asya ülkelerinde, erkeklerde insidansın ve mortalitenin en yüksek oranda olduğu kanser tipidir.

G-ACa insidansı dünyada coğrafik dağılım ve etnisite açısından farklılık gösterir. İnsidans oranı en yüksek olan bölgeler Orta ve Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika iken, en düşük olan bölgeler Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Afrika'dır. Bazı göç çalışmalarında, yüksek insidanslı bölgeden düşük insidanslı bölgeye göç eden kişilerde G-ACa görülme sıklığının azalması, çevresel faktörlerin mide kanseri gelişiminde önemli rol oynadığını düşündürmektedir [43].

G-ACa dünyada olduğu gibi ülkemizde de en sık görülen kanserlerdendir. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı'nın 2014 yılı istatistiklerine göre Türkiye'de G-ACa erkeklerde 15,9/100000 insidans ile beşinci, kadınlarda 7,1/100000 insidans ile altıncı sıklıkta yer alır [44]. Erkekler ve kadınlar için sırasıyla tüm kanserlerin %6'sı ve %3,9'u mide kanseridir. Türkiye'de G-ACa'un batı popülasyonuna göre daha ileri evrede ve daha genç yaşta saptandığı bildirilmiştir [45].

G-ACa genellikle yüksek mortaliteye ve kötü prognoza sahiptir ve 5 yıllık sürvi %31 düzeyindedir [41]. Çevresel ve genetik faktörlerin yol açtığı yüksek orandaki tümöral heterojenitenin kötü klinik gidişin nedenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir [46].

6. ETİYOLOJİK RİSK FAKTÖRLERİ

G-ACa etiyojisi altta yatan kompleks genetik ve çevresel faktörler nedeniyle multifaktöriyel kabul edilir [47, 48].

6.1. Çevresel Faktörler

DSÖ'nün 2011 yılında yayınladığı bildiriye göre G-ACa gelişiminde etkili olan ajanların kanıta dayalı sınıflandırılması Tablo 1' de gösterilmiştir [7, 49, 50].

Tablo 1. Gastrik adenokarsinom gelişimine neden olan karsinojen ajanlar [37]

Kanıt düzeyi yeterli olan ajanlar	Kanıt düzeyi sınırlı olan olası ajanlar
<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu	Asbest inhalasyonu
Sigara kullanımı	EBV enfeksiyonu
Radyasyon maruziyeti	Salamura sebzeler
Plastik üretim endüstrisinde çalışmak	İşlenmiş et tüketimi
	Tuzlu balık
	Nitrat veya nitrit içeren besinler
	İnorganik kurşun bileşikler

6.1.1. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu

Barry Marshall ve Robin Warren isimli Avustralyalı araştırmacılar tarafından 1984 yılında keşfedilen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 1994 yılında DSÖ tarafından mide kanserine neden olan mutlak karsinojenler arasında tanımlanmıştır [51, 52]. *H. pylori*,

ürettiği üreaz enzimiyle çevresini nötralize ederek mide epitelinde kolonize olabilen gram negatif bir bakteridir [53]. *H. Pylori* ile enfekte birçok olguda klinik semptom görülmemesine karşın, uzun süreli enfeksiyon mide epitelinde inflamasyona neden olarak yaklaşık %10 oranında peptik ülser, %1-3 oranında mide kanseri ve %0,1 oranında mukoza ilişkili lenfoid doku kaynaklı lenfoma gelişimine zemin hazırlar [54, 55].

H. pylori'nin G-ACa gelişimine neden olan onkogenik etkileri iki ayrı mekanizma ile açıklanır: direkt etki ve indirekt inflamatuvar etki [56]. *H. pylori* direkt etkisini toksik özellikteki virulans faktörleri ile genetik ve epigenetik değişikliklere yol açarak gösterir. Tüm virülans faktörleri arasında, cag PAI (*Pathogenicity Island*) /cag A ile vac A geniş ölçüde araştırılan iki major patojenik faktördür. cag PAI, cag A proteinini ve cag A'nın hedef hücreye aktarılmasını sağlayan bakteriyal tip 4 sekresyon sistemini kodlayan gen bölgesidir [57]. cag A ile birlikte hücre içine transfer olan *H. pylori* peptidoglikan, MAPK (*mitogen- activated protein kinase*), NF-kB (*nuclear factor kappa B*) ve PI3K/AKT (*phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B*) yolağını indükleyerek neoplastik transformasyonu başlatır [56]. vac A, *H. pylori*'nin mide epitelinde kolonize olma kapasitesini arttırarak ve T-hücre cevabını baskılayarak etki gösteren toksindir. İn vitro vakuolize etme kapasitesine göre, vac A gen yapısında sinyal (s1 ve s2), orta (m1 ve m2) ve ara (i1 ve i2) bölgelerde farklılıklar bildirilmiştir. Buna göre, vac A s1 veya m1 pozitif türlerin mide kanseri gelişiminde yüksek risk yarattığı saptanmıştır [58]. Sonuç olarak, cag A ve/veya vac A pozitif türlerin negatif olanlara göre daha şiddetli inflamasyon, atrofi ve yüksek oranda karsinom gelişiminden sorumlu olduğu bildirilmiştir [59].

İndirekt etki "Correa kaskadı" olarak bilinen, aşamalı olarak ilerleyen kronik inflamatuvar yanıt ile gerçekleşir. Mide epitel hücreleri tümör supresör genlerinde susturucu etki yaratan aberran DNA metilasyonunun, *H. pylori* ilişkili inflamatuvar yanıt ile paralellik gösterdiği bulunmuştur [60].

6.1.2. Sigara kullanımı

Sigara kullanımının kardial lokalize mide kanseri riskini doz ve süre bağımlı olarak arttırdığı rapor edilmiştir [61]. Ayrıca sigara kullanımının, *H. Pylori* tarafından tetiklenen karsinogenez sürecini hızlandıran bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir [62]. Meta-analitik bir çalışmada sigara kullanıcılarında G-ACa gelişme riskinin yaklaşık 1,53 kat arttığı bulunmuştur ve risk erkeklerde kadınlara göre daha fazladır [63].

6.1.3. Radyasyon

Hiroshima ve Nagasaki’de, atom bombalarından sonra hayatta kalanların izlemelerine göre, radyasyonun G-ACa gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu saptanmıştır [64]. Farklı bir çalışmada subdiyafragmatik radyoterapi alan Hodgkin lenfoma hastalarında doz bağımlı G-ACa gelişim riskinin arttığı rapor edilmiştir [65]. Testiküler kanser nedeniyle radyoterapi alan hastalarda mide kanseri riskinin 5,9 kat fazla olduğu bulunmuştur [66].

6.1.4. EBV enfeksiyonu

EBV ilişkili G-ACa’lardaki ana moleküler özellik, kanser ilişkili genlerdeki CpG (*cytidine-phosphateguanosine*) ada promoter bölgelerinin metilasyon göstermesidir [67]. G-ACa’ların yaklaşık %5-10’u EBV enfeksiyonuyla ilişkili bulunmuştur [68]. EBV ilişkili G-ACa’lar erkeklerde kadınlara göre 2 kat fazla saptanmıştır. EBV ilişkili kanserlerin, kardiada veya cerrahi sonrası kalan midede (*gastric stump*) gelişme riski daha fazladır [69].

6.1.5. Beslenme

Yüksek miktarda tuz tüketimi, mukozal bariyere zarar vererek, N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin gibi bileşiklerin mide mukozası üzerindeki karsinojenik etkisini artırır. Japonlar gibi beslenmeleri tuzdan ve salamura gıdalardan zengin olan kültürlerde, mide kanserinin görülme sıklığı yüksektir. Amerika'ya göç ederek batı tipi beslenmeye uyum sağlayan Japonlarda, beslenme tipini değiştirmeyenlere göre , G-ACa insidansının anlamlı olarak azaldığı rapor edilmiştir [70].

Endojen olarak sentezlenen ve/veya dışarıdan alınan nitritin ve N-nitrozo bileşiği olan nitrozometilaminin mide kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır. N-nitrozo bileşiklerinden zengin işlenmiş etlerin yanısıra doymuş yağlardan zengin ve omega-3 gibi koruyucu yağlardan fakir kırmızı etlerin tüketiminin, inflamatuvar prosesleri arttırarak mide kanseri gelişimine yol açtığı bildirilmiştir [70].

Sebze ve meyveler, karotenoidler, folat, fitokimyasallar ve vitamin C gibi ksenobiyotik metabolizmasını düzenleyen ajanlar ile antioksidanları yüksek oranda içermektedir. Vaka-kontrol çalışmalarında, yüksek oranda sebze ve meyve tüketiminin mide kanseri gelişim riskini %37 oranında azalttığı saptanmıştır [70]. Ayrıca meta-analitik çalışmalarda lifli besin tüketiminin mide kanseri gelişimi ile negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir [71].

6.2. Genetik Faktörler

G-ACa'ların %90'ı sporadik olarak gelişir. Sporadik kanser gelişimine yol açan genetik hasarın oluşumunda, çevresel etkenlere ek olarak, tek nükleotid polimorfizmine bağlı genetik yatkınlık, somatik mutasyonlar, kromozomal instabilite, MSI ve epigenetik mekanizmalar önemli rol oynar.

Sporadik vakaların yanında mide kanserlerinin %10'u ailesel/herediter geçiş gösterir. Ancak, tüm G-ACa'ların yaklaşık %1-3'ünün herediter sendromlarla ilişkili

olduğu düşünülmektedir [47, 72-75]. G-ACa'ların eşlik ettiği hereditör sendromlar Tablo 2'de verilmiştir.

6.2.1. Gastrik adenokarsinomların eşlik ettiği hereditör sendromlar

6.2.1.1. Hereditör diffüz mide kanseri

E-kaderin genindeki (CDH1) germline mutasyonlar sonucu gelişen ve hereditör mide kanseri sendromları içinde ilk tanımlanan sendromdur [76]. CDH1 genine ek olarak alfa-E-katenin geninde (CTNNA1) da mutasyonlar tanımlanmıştır [77]. Morfolojik olarak taşlı yüzük hücreli G-ACa görülür. Mutasyonu taşıyan ailelerde, 80 yaşına kadar diffüz mide kanseri penetrans riski, erkek ve kadın tüm bireyler için %80'nin üzerindedir. Kadınlarda G-ACa yanında lobüler meme karsinomu gelişme olasılığı %60 düzeyindedir [78]. Pozitif aile öyküsü olan hastalarda E-kaderin germline mutasyonları için tarama testi ve genetik danışmanlık önerilir. Mutasyonu taşıyan hastalarda profilaktik gastrektominin yaşam süresini uzattığı bildirilmiştir. Profilaktik gastrektomi spesimenlerinde iki farklı öncül intraepitelyal lezyon saptanmıştır: 1) in-situ taşlı yüzük hücreli karsinom ve 2) foveolar hücre bazali ve bazal membran arasında pagetoid yayılım gösteren taşlı yüzük hücreleri [73, 79].

6.2.1.2. Gastrik adenokarsinom ve midenin proksimal polipozisi

2012 yılında tanımlanan, otozomal dominant geçiş gösteren, fundik gland polipozis zemininde gelişen displazi ve adenokarsinom ile karakterize sendromdur [80]. Kolorektal/ duodenal polipozis veya diğer hereditör gastrointestinal sendromlarla ilişkisi yoktur. Genetik nedeni henüz saptanamamıştır [81].

6.2.1.3. Ailesel intestinal mide kanseri

Otozomal dominant geçiş gösteren intestinal tip mide kanseri ile karakterizedir [82]. Pratik olarak gastrik polipozis zemini olmayan, intestinal tip adenokarsinom morfolojisinde kanserlere sahip ailelerde düşünölmelidir. Bu sendroma neden olabilecek germline mutasyon saptanmamıştır ve genetik nedeni henüz bilinmemektedir [73, 83, 84].

6.2.1.4. Gastrik hiperplastik polipozis

Otozomal dominant geçiş gösteren hiperplastik gastrik polipozis, şiddetli psöriazis ve diffüz tip mide kanseri görölme sıklığında artış ile karakterize sendromdur [85]. Sekonder hipergastrineminin sonucu olarak geliştiğı düşönölen kolorektal adenokarsinom riski de artmıştır [86].

6.2.1.5. Herediter nonpolipozis kolorektal kanser sendromu

Temel moleköler özellik, hatalı eşleşme tamir genlerindeki mutasyon sonucu gelişen mikrosatellit instabilitedir. Hastaların %5-11' inde, çoğunlukla intestinal morfolojide G-ACa gelişmektedir [87].

6.2.1.6. Li- Fraumeni sendromu

Sendromlu hastaların %50-70'inde TP53 germline mutasyonu vardır. En yaygın neoplaziler, sarkom, meme kanseri ve beyin tümörleridir. Hastaların %10'undan azında gastrointestinal sistem tümörleri görölür ve bunların %50'sinden fazlasını multipl özellikte de olabilen mide kanserleri oluşturur [88, 89].

6.2.1.7. Ailesel adenomatöz polipozis

APC (*adenomatous polyposis coli*) genindeki germline mutasyonlar sonucunda 100'den fazla kolorektal adenom ve erken dönemde kolorektal kanser gelişimi ile karakterize sendromdur [90, 91]. Midede fundik gland polipleri ve antrumda adenomlar görülebilir. G-ACa'lar genellikle adenom zemininde gelişir, ancak fundik gland poliplerin de adenokarsinoma dönüşebileceği bildirilmiştir [92].

6.2.1.8. Peutz- Jeghers sendromu

STK11 (*serine/threonine kinase 11*) geninde mutasyonlar sonucunda gelişen, hamartomatöz gastrointestinal polipler, erken yaşta görülen gastrointestinal sistem ve meme kanserlerinde artmış risk ve mukokütanöz pigmentasyonla karakterize sendromdur. Meta-analitik bir çalışmada 65 yaşına kadar olan kümülatif mide kanseri riski %29 olarak bildirilmiştir [93, 94]

Tablo 2. Gastrik adenokarsinomların eşlik ettiği herediter sendromlar

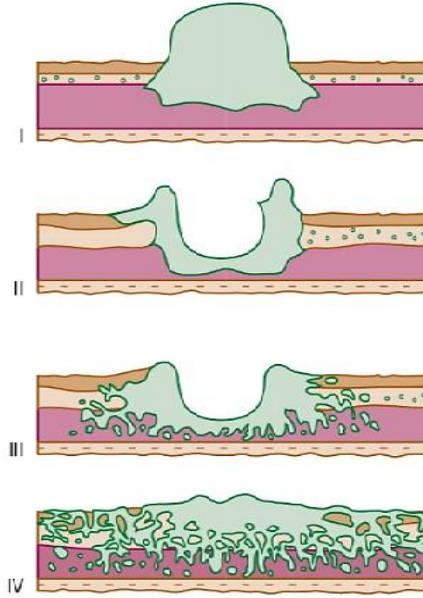
Sendrom	Gen
Hereditör Diffüz Mide Kanseri	CDH1
Gastrik Adenokarsinom ve Midenin Proksimal Polipozisi	-
Ailesel İntestinal Mide Kanseri	-
Gastrik Hiperplastik Polipozis	-
Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser Sendromu	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2
Li- Fraumeni Sendromu	TP53
Ailesel Adenomatöz Polipozis	APC
Peutz- Jeghers Sendromu	STK11

7. MAKROSKOPİK ÖZELLİKLER

7.1. Makroskopik Görünüme Göre Sınıflama

İleri evre G-ACa'lar için makroskopik özelliklere göre 1926'da Borrmann tarafından öne sürülen sınıflama, prognostik önemi nedeniyle günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır [95, 96]. Borrmann sınıflamasına göre mide karsinomları dört tipe ayrılır (Şekil 2): **1)** Polipoid, **2)** Mantar gibi büyüyen (*fungating*), **3)** Ülser, **4)** Diffüz infiltratif (*linitis plastica*).

Polipoid tip lümeneye doğru polipoid şekilde büyür ve bazen sap içerebilir. Fungating tipte, tümörün ortası çökük, kenarları yüzeyden hafif kabarıktır. Ülser tipin fungating tipten farkı, tümörün kenarları mukoza ile aynı seviyededir. Skiröz karsinom olarak da adlandırılan diffüz infiltratif tipte kitle lezyon görülmez, mukozal kıvrımlar düzleşmiş ve duvar ileri derecede kalınlaşmıştır.



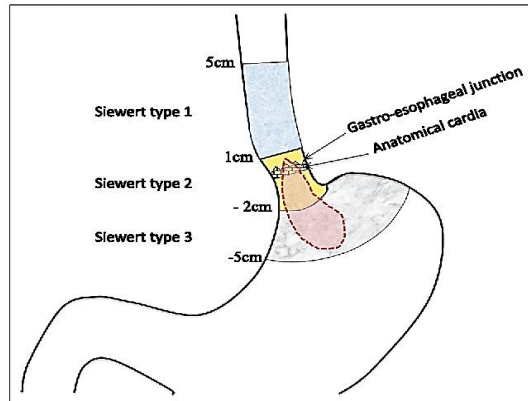
Şekil 2. Borrmann makroskopik sınıflaması [3]

7.2. Lokalizasyona Göre Sınıflama

Gastrik ve özofagogastrik bileşke tümörleri; insidans, coğrafik dağılım, etiyoloji, klinik ve tedavi açısından farklı özellikler taşıdığı için, anatomik lokalizasyona göre tümör sınıflaması yapılması son derece önemlidir [32].

Siewert sınıflamasına göre, özofagogastrik bileşkeyi tutan tüm tümörler ‘‘Özofagogastrik bileşke tümörleri’’ başlığı altında ele alınarak 3 tipe ayrılmıştır (Şekil 3): **1)** Tümör merkezi özofagogastrik bileşkenin 1-5 cm üzerinde olan tümörler Tip 1 (özofagus adenokarsinomu), **2)** Tümör merkezi özofagogastrik bileşkenin 1 cm’den daha az yukarısında ve 2 cm’nin daha az altında olan tümörler Tip 2 (gerçek kardial adenokarsinomu), **3)** Tümör merkezi özofagogastrik bileşkenin 2-5 cm altında olan tümörler Tip 3 (subkardial gastrik adenokarsinom).

Sekizinci basım AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) 2017 TNM evrelemesine göre özofagogastrik bileşke tutulumu olan tümörlerin merkezi özofagogastrik bileşkeye 2 cm’den uzak ise tümör G-ACa olarak, tümör merkezi özofagogastrik bileşkeye 2 cm’den yakın ise tümör özofagus kanseri olarak kabul edilir ve evrelendirilir [2].

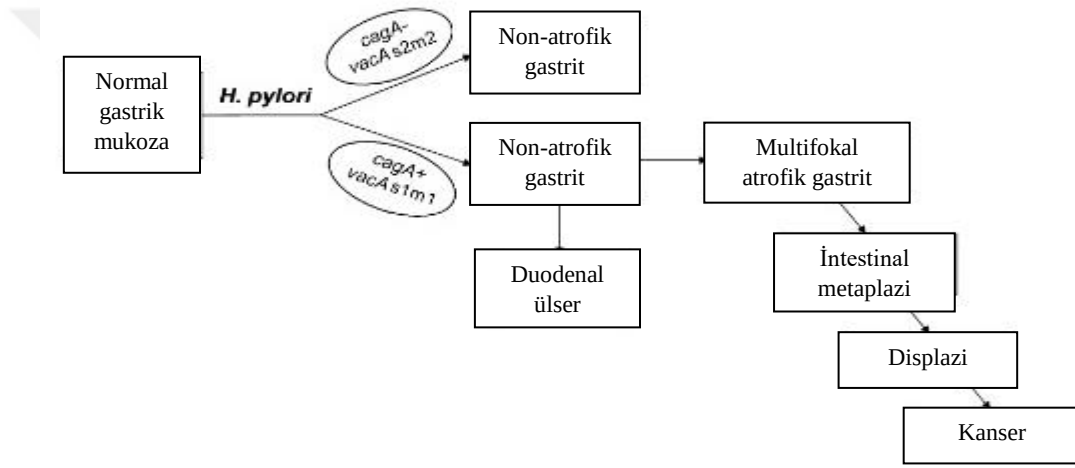


Şekil 3. Özofagogastrik bileşke tümörlerinde Siewert sınıflaması [5]

8. MİKROSKOPİK ÖZELLİKLER

8.1. Preneoplastik Lezyonlar

İntestinal tip G-ACa'da karsinogenez süreci ilk kez 1975 yılında Correa ve ekibi tarafından tanımlanmış, tanımlanan model 1988 ve 1992 yılında güncellenmiştir [97-99]. Güncellenmiş Corea modeline göre karsinogenez sürecinde görülen lezyonlar sırasıyla; **1) Non-atrofik gastrit, 2) İntestinal metaplazi içermeyen multifokal atrofik gastrit, 3) Komplet intestinal metaplazi, 4) İnkomplet intestinal metaplazi, 5) Düşük dereceli displazi, 6) Yüksek dereceli displazi, 7) İnvaziv adenokarsinomdur** (Şekil 4).



Şekil 4. H. Pylori enfeksiyonunun ana klinik sonuçları ve gastrik adenokarsinomda görülen prekanseröz sekans basamakları [4]

8.1.1. Non- atrofik gastrit

En yaygın gastrit nedeninin *H. Pylori* enfeksiyonu olduğu bildirilmektedir. Polimorfonükleer nötrofil infiltrasyonu (aktivite) genellikle *H.pylori* ile ilişkilidir. *H. Pylori* ilişkili kronik gastritin diğer bir karakteristik özelliği germinal merkez içeren lenfoid foliküllerin varlığıdır. *H. Pylori*'ye bağlı gelişen inflamatuvar yanıt ile prekanseröz süreçlerin tetiklenmesi, *H. Pylori*' nin türüne, konağın genetik yatkınlığına ve çevresel faktörlere bağlı değişkenlik gösterir [4].

8.1.2. Atrofik gastrit

Glandüler doku kaybı, prekanseröz sekansta ilk tanımlanabilen özgün basamaktır. Genellikle uzamış inflamatuvar sürecin sonrasında görülür ve multifokal olma eğilimindedir. Atrofi antrum ve korpusta lokalize olup, süreç ilerledikçe yaygınlığı artar. Atrofiye giden glandların yerinde lamina propriada fibrozis gelişebilir.

Pernisiyöz anemi sonucunda gelişen, antral mukozanın olağan olduğu, oksintik mukozaya sınırlı olan şiddetli diffüz atrofi farklı bir atrofi tipidir ve yukarıda bahsedilen prekanseröz sekansta yer almaz [4].

8.1.3. İntestinal metaplazi

Mide mukozasındaki epitelyal hücrelerin intestinal fenotipe değişim göstermesi olarak tanımlanır.

Morfoloji ve müsin histokimyası göz önüne alınarak iki ana tipe ayrılır: komplet tip (Tip I- ince bağırsak tipi) ve inkomplet tip (Tip II veya III- kolonik tip). Komplet tip metaplazi ince bağırsak epitelini taklit eder, dağınık halde goblet hücreleri ve apikal çok sayıda mikrovilli (fırçamsı kenar) ile karakterize olan metaplazi tipidir. Sialomüsin sekrete eder ve Paneth hücreleri izlenebilir. İnkompлет metaplazide morfolojik ve müsin ekspresyonu olarak (sülfomüsin) kolon tipinde mukozaya değişim başlar. İnkompлет metaplazi varlığının kanser gelişim riskini arttırdığı ve inkomplet metaplazinin hafif form displazi olarak düşünülebileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır [100-104].

Mide mukozası hasarı sonucunda, oksintik mukozada, pilorik tip glandlara benzer değişimin görüldüğü spazmolitik peptid eksprese eden metaplazi (SPEM) gelişebilir. SPEM'in H.pylori enfeksiyonu ve kronik gastrit ile indüklenerek geliştiği ve G-ACa'a progrese olabildiği bildirilmektedir [105].

8.1.4. Displazi

Displazi, foveola ve/veya bez epitelinin neoplastik fenotipe dönüşmesidir. İntraepitelyal neoplazi veya non- invaziv neoplazi olarak da adlandırılır. Makroskopik

incelemede düz, çökük (deprese) veya polipoid lezyon şeklinde izlenir. Displazi, de novo gelişebilir veya fundik gland polip, hiperplastik polip gibi benign lezyonların zemininden kaynaklanabilir [7].

Midede morfolojik olarak iki ana tip displazi tanımlanmıştır: intestinal tip ve foveolar (gastrik) tip. Birçok vakada, intestinal ve foveolar tip displazi birlikte (mikst tip displazi) görülebilir. İntestinal tip displazi MUC2, CD10 ve CDX2 ile immunreaktivite gösteren yüksek kolumnar hücrelerle döşeli tubuler, tubulovillöz ve villöz yapısal özelliktedir. Foveolar tip displazi ise genellikle mide foveola hücrelerine benzeyen küboidal veya alçak kolumnar hücrelerle döşeli tubulovillöz lezyonlar ve/veya testere dişi (serrasyon) görünümünde glandüler yapılarla karakterizedir. MUC5AC ve MUC6 ile immunreaktivite görülür, MUC2 pozitif hücreler nadiren saptanır [7].

Gastrik displazi subtipleri olarak, klinik etkileri henüz net olarak bilinmeyen, gastrik pit/kript displazisi ve serrated displazi tanımlanmıştır. Gastrik pit/kript displazisinde, displazi gastrik pitlerin bazal bölümünde sınırlıdır, glandüler yapılar yüzey matürasyonu gösterir. Kansere gelişiminde bağımsız prediktif faktör olduğu düşünülmektedir. Serrated displazi sıklıkla mukozal yüze kadar uzanan ve MUC5AC ekspresyonu gösteren mikropapiller paterne sahiptir [7].

Morfolojik tipten bağımsız olarak displazi; nükleer atipi, mitotik aktivite ve bezlerin yapısal bozukluğu göz önüne alınarak düşük ve yüksek olmak üzere derecelendirilir. Düşük derece displazide, neoplastik hücreler minimal dizilim bozukluğu ve hafif-orta derecede sitolojik atipi gösterir. Nükleuslarda polarite korunmuştur ve bazalde lokalizedir. Yüksek derece displazide belirgin sitolojik atipi vardır. Nükleer polarite kaybı ve lümenal yüzeye kadar uzanan atipik nükleusların yanı sıra, sık mitoz görülür. Bezler genellikle kompleks yapıdadır. P53 overekspresyonu yüksek dereceli displazide sıklıkla saptanır [7].

Karsinogenez sürecinde görülen intraepitelyal neoplastik değişiklikler için çeşitli sınıflama sistemleri öne sürülmüştür. Gastrik intraepitelyal lezyonlara yaklaşım Japonya ve diğer Batı ülkelerinde farklılık gösterir. Adenokarsinom tanısı için Japonlarda sitoarkitektürel atipi yeterliyken, Batı ülkelerinde stromal invazyon şartı aranır. Japonya'da gastrik non-invaziv yüksek derece neoplastik lezyonlara non-invaziv karsinom olarak tanı verilirken, benzer morfolojik özelliklere sahip lezyonlar

Batı ülkelerinde yüksek derece displazi olarak sınıflandırılır. Bu yaklaşım farklılıklarına çözüm bulmak amacıyla 2000 yılında Padova sınıflaması yayınlanmıştır [106]. Padova sınıflamasına göre gastrik epitelyal lezyonlar beş kategoriye ayrılır: 1) Displazi açısından negatif, 2) Displazi açısından şüpheli, 3) Düşük derece veya yüksek derece displazi, 4) İnvaziv karsinom açısından şüpheli, 5) İnvaziv adenokarsinom.

8.2. Histolojik Sınıflama

G-ACa'lar morfolojik ve moleküler düzeyde heterojen bir tümör grubudur. Günümüze değin prognozu değerlendirmek ve tedaviyi yönlendirmek için farklı sınıflama sistemleri kullanılmıştır (Tablo 3). Yayınlanan histolojik sınıflama sistemlerinin bazıları şunlardır; Lauren (1965) [11], Nakamura (1968) [107], Ming (1977) [108], Goseki (1992) [109], Carneiro (1995) [110], Solcia (2009) [111], DSÖ (2010) [12] ve JGCA (*Japanese Gastric Cancer Association*- 2011) [112].

1965'te öne sürülen Lauren Sistemi halen en yaygın kullanılan histolojik sınıflama sistemidir. Diğer yaygın olarak kullanılan histolojik sınıflama sistemi, 2010 yılında kabul edilen DSÖ sınıflamasıdır. 2010 DSÖ [12] sınıflamasında; tubuler, papiller, müsinöz, taşlı yüzük hücre komponenti içerebilen zayıf koheziv ve mikst alt tiplerin yanısıra diğer nadir görülen histolojik varyantlar (yaklaşık %5) tanımlanmıştır. 2019 yılında yayınlanan DSÖ sınıflaması ile G-ACa'ların histolojik sınıflaması güncellenmiştir [7]

Tablo 3. Gastrik adenokarsinomlarda kullanılan histolojik sınıflamalar

Lauren (1965)	Ming (1977)	Goseki (1992)	Carneiro (1995)	Solcia (2009)	DSÖ (2019)
İntestinal	Ekspansil	İyi tubuler farklılaşma: * müsin fakir * müsin zengin	Glandüler	Koheziv	- Tubuler, iyi farklılaşma - Tubuler, orta derecede farklılaşma
Diffüz	İnfiltratif	Kötü tubuler farklılaşma: * müsin fakir * müsin zengin	İzole hücreli	Diffüz	Zayıf koheziv
Mikst			Mikst		Mikst
İntestinal/diffüz/ indetermine				Müsinöz	Müsinöz
İndetermine			Solid	Anaplastik	Tubuler, kötü farklılaşma (solid)
Tanımsız (not defined)					Diğer nadir histolojik alt tipler

8.2.1. DSÖ 2019 Sınıflaması

DSÖ 2019 sınıflamasında G-ACa'da beş ana alt tip tanımlanmıştır: 1) Tubuler, 2) Papiller, 3) Zayıf Koheziv, 4) Müsinöz, ve 5) Mikst tip. Lenfoid stroma içeren mide (adeno)karsinomu, hepatoid adenokarsinom, mikropapiller adenokarsinom, mide adenokarsinomu- fundik gland tipi, mukoepidermoid karsinom, paneth hücreli

karsinom ve parietal hücreli karsinom diğer ve nadir görülen histolojik alt tipler olarak ayrı bir başlık altında değerlendirilmiştir [7].

8.2.1.1. Tubuler adenokarsinom

En yaygın görülen alt tiptir. Farklı çaplarda dilate görünümde veya yarıklanma şeklinde tubuler yapıda bezler içerir, asiner yapıda bezler görülebilir. Neoplastik hücreler kolumnar, küboidal veya yassı özelliktedir. Sıklıkla kardial/ özofagogastrik bileşke bölgesinde yerleşim gösteren berrak hücreli varyantı tanımlanmıştır. Bu kategori farklılaşma derecesine göre üç gruba ayrılmıştır: **1) İyi farklılaşma, 2) Orta derecede farklılaşma, 3) Kötü farklılaşma (solid tip)** [7].

8.2.1.2. Papiller adenokarsinom

G-ACa'ların %2,7- 9,9'unu oluşturan, daha nadir görülen alt tiptir. Genellikle egzofitik büyüme paterni gösteren, fibrovasküler korlar içeren kolumnar veya küboidal hücrelerle döşeli uzun parmaklı yapılara sahiptir. Bazı tümörlerde tubuler yapılar görülebilir (tubulopapiller). İtici (*pushing*) sınırlara sahip sıklıkla inflamatuvar hücre infiltrasyonu içeren iyi farklılaşma gösteren bir tümör olmasına karşın, karaciğer metastaz oranı yüksektir ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır [7].

8.2.1.3. Zayıf koheziv karsinom

G-ACa'ların yaklaşık %20-54'ünü oluşturur. Zayıf koheziv karsinomlarda neoplastik hücreler iyi forme gland yapıları oluşturmaksızın izole olarak veya küçük gruplar halinde bulunur. Taşlı yüzük hücre tipinde morfoloji görülebilir. Histiositik ya da lenfositik morfolojide neoplastik hücreler ile pleomorfik bizar nükleuslu hücreler

izlenebilir. Farklı hücre tipleri birarada görülebilir. Zayıf koheziv karsinomlara, özellikle submukozayı aşan derin invazyon olduğu zaman belirgin desmoplazi eşlik edebilir. Taşlı yüzük hücreli karsinomların kemo(radyo) terapiye daha az duyarlı olduğunu öne süren yeni çalışmalar bulunmaktadır [7].

8.2.1.4. Müsinöz adenokarsinom

G-ACa'ların %2,1- 8,1'ini oluşturur. Tanı için, tümör yüzey alanının %50'sinden fazlasını kaplayan ekstraselüler müsin gölleri içermelidir. İki ana büyüme paterni izlenebilir: **1)** İnterstisyel müsin içeren, kolumnar epitelle döşeli glandüler veya tubul yapıları ve **2)** Müsinle çevrili olan tek sıralı, yuvalar halinde veya izole tümör hücreleri (müsin gölcüklerinde, taşlı yüzük hücreleri görülebilir). Son kapsamlı genetik analizlere göre ikinci tip müsinöz adenokarsinomların mutasyon profilinin intestinal veya diffüz tip G-ACa'lardan farklı olduğu gösterilmiştir [7].

8.2.1.5. Mikst adenokarsinom

İki veya daha fazla farklı histolojik komponenti içeren tümörlerdir. Genetik çalışmalara göre, mikst adenokarsinomların klonal olduğu ve fenotipik farklılıklarının E-kaderin (CDH1) genindeki somatik mutasyonla geliştiği saptanmıştır. Tek komponent içeren adenokarsinomlara göre daha kötü prognoza sahip oldukları bildirilmiştir [7].

8.2.1.6. Lenfoid stroma içeren mide (adeno)karsinomu

G-ACa'ların %1-7'sini oluşturur. Lenfoepitelyoma benzeri karsinom veya medüller karsinom olarak da adlandırılır. Belirgin lenfositik infiltrasyon içeren stromada, düzensiz tabakalanmalar, trabeküller, tubuller halinde büyüme paterni gösteren veya birbirleri ile birleşme eğiliminde tabakalar (sinsisyum) oluşturan neoplastik hücreler

ile karakterizedir. Sıklıkla proksimal midede veya operasyon sonrası geri kalan midede (gastric stump) lokalizedir. Erkeklerde daha sıktır. Bu alt tipte EBV enfeksiyonu oranı %22,5 – 100 arasında değişkenlik göstermektedir. MSI G-ACa'ların bir kısmının benzer morfolojiye sahip olmasına rağmen, genetik profillerinin EBV ilişkili tiplere göre farklılık gösterdiği bulunmuştur [7].

8.2.1.7. Hepatoid adenokarsinom ve ilişkili diğer antiteler

Hepatoid adenokarsinom, hepatosit benzeri eozinofilik sitoplazmalı, büyük poligonal neoplastik hücrelerden oluşur. Bu hücrelerde immünhistokimyasal olarak AFP (alfa fetoprotein) pozitifliği saptanabilir. Tümör hücrelerinde, safra ve PAS pozitif intrasitoplazmik eozinofilik globüller saptanabilir. Sıklıkla birarada bulunan diğer AFP üreten karsinomlar; iyi farklılaşma gösteren berrak sitoplazmalı papiller veya tubuler adenokarsinom, enteroblastik farklılaşma gösteren adenokarsinom ve yolk sak tümör benzeri karsinomdur. Hepatoid adenokarsinom ve diğer AFP üreten karsinomlarda SALL4 (*sal-like protein 4*), klaudin-6 ve glipikan-3 gibi fetal barsak proteinlerinin ekspresyonu görülebilir. SALL4 ve klaudin-6, hepatoid adenokarsinomu hepatosellüler karsinomdan ayırmada tanısal açıdan faydalı olan immünhistokimyasal belirteçlerdir [7].

8.2.1.8. Mikropapiller adenokarsinom

Boşluklar içinde yer alan, fibrovasküler kor içermeyen, küçük gruplar halinde neoplastik hücrelerle karakterizedir. Bu komponent, tubuler veya papiller adenokarsinomlara, tüm tümörün %10-90'ını oluşturacak şekilde eşlik edebilir. Saf

mikropapiller adenokarsinom, özofagogastrik bileşkede bildirilmiştir. Kötü prognoz ve lenf nodu metastazı ile ilişkilidir [7].

8.2.1.9. Mide adenokarsinomu- fundik gland tipi

Bu alt tipin oksintik gland adenomundan geliştiği düşünülmektedir. Endoskopik submukozal diseksiyon yapılan erken mide kanserlerinin %1' ini oluşturduğu bildirilmiştir. Submukozal invazyon vakaların %60'ında izlenir. İHK ile Pepsinojen I ve MUC 6 pozitifliği gösterir. Yavaş büyür ve lenf nodu metastazı çok nadirdir [7].

8.2.2. Lauren sınıflaması

G-ACa'lar, intestinal ve diffüz olarak iki ana gruba ayrılır. Farklı epidemiyolojik, klinik-patolojik ve moleküler özelliklerin yansımaları olduğu kabul edilir. İki ana gruba sınıflandırılmayan adenokarsinomlar, mikst ve belirsiz (*indeterminate*) tip olarak sınıflanır [11].

İntestinal tip tümörler, sıklıkla *H. pylori* enfeksiyonunun neden olduğu şiddetli atrofik gastrit ve intestinal metaplazi zemininde gelişen, bez benzeri yapılar oluşturan tümörlerdir. Birbirleri ile zayıf bağlantılar oluşturan, kötü farklılaşma gösteren diffüz tip tümörlerde ise spesifik karsinogenezi sekansı henüz tanımlanmamıştır. İntestinal tip G-ACa'lar çoğunlukla ileri yaşta ve erkeklerde, diffüz tip adenokarsinomlar daha genç yaşta ve sıklıkla kadınlarda görülür.

8.2.3. Diğer histolojik sınıflamalar

Ming sınıflamasında, G-ACa'lar büyüme ve invazyon paternlerine göre ekspansil ve infiltratif olmak üzere ikiye ayrılır [108]. Ekspansil tip çoğunlukla iyi farklılaşma gösterir, infiltratif tip ise kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.

Carneiro sınıflamasında G-ACa'ları glandüler, solid, izole hücreli ve mikst olarak dört gruba ayrılır [110]. Carneiro ve arkadaşları, dual farklılaşma paterni

(glandüler/solid tip ve izole hücre tipi) gösteren mikst adenokarsinomların, çok değişkenli analizlere göre, Lauren sınıflamasındaki iki ana alt tipe göre daha kötü prognoza sahip olduklarını saptamışlar ve mutlaka rapor edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Goseki ve **Solcia** sınıflamaları klinik açıdan yönlendirici olan diğer önemli histolojik sınıflamalardır [113-115]. Goseki sınıflamasında, tubuler/glandüler farklılaşma ve intrasitoplazmik müsin içeriği birlikte değerlendirilir. İyi tubuler farklılaşma gösteren müsin fakir ve zengin tip ile kötü tubuler farklılaşma gösteren müsin fakir ve zengin tip şeklinde sınıflanır [109]. Solcia sınıflamasında histolojik, klinikopatolojik ve moleküler parametreler temelinde, G-ACa'lar; koheziv, müsinöz, diffüz ve anaplastik olarak dört gruba ayrılır [111].

8.3. İmmünohistokimyasal Özellikler

G-ACa'lar; AE1&AE3, CK18, CK19, CK7 ve CK20 gibi keratinlere yönelik antikorlarla immünreaktivite gösterir. Sıklıkla, CK7 ve CK20 birlikte pozitifdir, ancak yaklaşık %25 oranında biri negatif diğeri pozitif olabilir. Düşük oranda, her ikisi de negatifdir. Başlangıçta kolon karsinomlarına spesifik olduğu düşünülen CDX2 ile G-ACa'ların %50'den fazlasında immünreaktivite bildirilmiş ve CDX2 pozitifliğinin iyi prognoz göstergesi olabileceği öne sürülmüştür [116]. Hepatositlere spesifik belirteçlerden biri olan Hep Par-1 ile G-ACa'larda sıklıkla reaktivite saptanmıştır [117].

Müsin İHK'sına göre G-ACa'lar dört fenotipik gruba ayrılır [3]. İntestinal fenotipin, iyi farklılaşma gösteren G-ACa'larda daha sık olduğu, gastrik fenotipten intestinal fenotipe doğru tümör progresyonunun arttığı bildirilmiştir [118] :

- **G (gastrik fenotip):** MUC5AC+ ve/veya MUC6+; MUC2- ve CD10-
- **I (intestinal):** MUC2+ ve/veya CD10+; MUC5AC- ve MUC6-
- **GI (gastrik ve intestinal fenotip)**
- **N (null fenotip)**

9. MOLEKÜLER ÖZELLİKLER

9.1. Gastrik Adenokarsinomların Genomik Özellikleri

Son yıllarda, yeni nesil dizileme (NGS; *next-generation sequencing*) teknolojisindeki gelişmelerin hız kazanması, G-ACa patogeneğinde önemli rol oynayan genetik ve epigenetik değişimlerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır [119] .

9.1.1. Somatik gen mutasyonları

Kromatin yeniden modellenmesi, genom bütünlüğü, hücre adhezyon/hücre iskeleti/motilite yanısıra Wnt, TGF- B (*transforming growth factor- beta*) ve RTK (reseptör tirozin kinaz) yolakları ile ilgili gen mutasyonları, G-ACa'larda tanımlanan mutasyonlardır [47, 120]

Karsinogeneğinde önemli rol oynayan genomik instabilite, TP53 ve BRCA2 (*breast cancer gene*) gibi tümör supresör genlerin mutasyonları sonucu gelişir. SW1-SNF bir kromatin yeniden modellenme kompleksidir ve G-ACa'larda sıklıkla mutant olan ARID1A (*AT-rich interactive domain-containing protein 1A*) geni, bu kompleksin bir subunitini kodlar. CDH1, CTNNA1 ve RHOA (*Ras homolog family member A*) gibi hücre adhezyon/hücre iskeleti/motilite ile ilgili genler, hücre-ekstraselüler matriks ve interselüler etkileşimleri düzenler. Bu genlerdeki mutasyonlar sıklıkla diffüz tip G-ACa'larda görülür [47, 120].

NGS ile G-ACa'larda tanımlanan üç ana aberran yolak; Wnt sinyal yolağı, TGF-B yolağı ve RTK yolağıdır. Wnt sinyal yolağı embriyolojik dönemde morfogenezini düzenleyen mekanizmalardan biri olarak bilinir [121]. Kontrol dışı Wnt sinyal yolağında; CTNNB1 geninde aktive edici mutasyonlar, APC ve RNF43 (*Ring Finger Protein 43*) genlerinde ise inaktivasyon mutasyonları görülür. TGF-B yolağındaki SMAD4 ve ELF3 mutasyonları, MSI ve MSS G-ACa'larda saptanmıştır. RTK yolağı hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve metabolizması ile ilgili önemli roller üstlenir. Bu yolak, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) ailesine ait ERBB2, ERBB3 ve ERBB4 mutasyonları ile MSI ilişkili G-ACa'larda saptanan KRAS mutasyonlarını içermektedir. PIK3, RTK sinyal yolağı

ile ilgili farklı bir moleküldür. PIK proteininin ana katalitik komponenti olan PIK3CA (PIK3 *catalytic subunit alpha*), MSI ve EBV pozitif G-ACa'larda sıklıkla mutant olarak bulunmuştur [14, 19]. Wnt ve RTK sinyal yolları, G-ACa tedavilerinde önemli hedef noktaları arasında yer almaktadır [47, 120].

9.1.2. Kromozomal kararsızlık (kromozomal instabilite)

Kromozomal instabiliteye yol açan dinamik süreçler, tümör progresyonunda önemli role sahiptir. Kromozomun tamamını veya bir bölümünü etkileyen kayıp ya da kazançlarla gelişen kromozomal instabiliteye, DNA kopya sayı farklılıkları (anaploidi), amplifikasyon, delesyon, heterozigotluk kaybı (LOH; *loss of heterozygosity*) veya yeniden düzenlenmeler neden olur. Kromozomal instabilite, mide karsinomlarında yaygın olarak saptanmıştır [47].

Kromozomlardaki spesifik kayıp ya da kazançların tümör tipi ve progresyonuyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Kromozom 8 kazancı sıklıkla MSI alt tip G-ACa'da saptanırken, 18q kaybı EBV pozitif G-ACa'da siktir [122]. 8q, 17q ve 20q'da lokalize kopya sayı kazançları intestinal tip G-ACa; 12q ve 13q kazançları diffüz tip G-ACa ile ilişkilidir [123, 124]. 8q23.3 ve 8q23.2 bölgesindeki kazançlar sıklıkla erken evre G-ACa, 8q24.21ve 8q24.3 bölgesindeki kazançlar ise ileri evre G-ACa ile korelasyon gösterir [125].

RTK/RAS/MAPK sinyal yolağıyla ilgili EGFR, ERBB2, FGFR2, MET, VEGFA ve KRAS gen amplifikasyonları, artmış tümör proliferasyonuna, farklılaşmasına, apoptozuna, adhezyonuna ve migrasyonuna neden olur. 9p24.1'de lokalize, PD-L1 (*programmed cell death ligand-1*) ve PD-L2 proteinlerini kodlayan CD274 ve PDCD1LG2 genlerindeki amplifikasyonlar çoğunlukla EBV ilişkili G-ACa'larda görülür [19]. MYC, GATA4, KLF5 gibi onkogenik transkripsiyon faktör genlerindeki ve CCNE-1, CCND1 ve CDK6 gibi hücre döngüsü düzenleyicisi genlerdeki amplifikasyonlar, G-ACa'lardaki amplifikasyon gösteren diğer genleri oluşturmaktadır [47].

G-ACa'larda, PTEN, SMAD4, CDKN2A ve ARID1A gibi tümör supresyon genlerinde fokal genomik kayıplar tanımlanmıştır [47] .

Kromozomal instabilitenin diğerk bir göstergesi olan LOH, APC ve TP53 gibi tümör supresyon genlerinde kayıplara neden olur. Erken ve ileri evre G-ACa'larda LOH paterni farklılık gösterir [47, 120].

Genomik yeniden düzenlenme sonucunda ortaya çıkan füzyon genleri, G-ACa'larda tanımlanmıştır. Tanımlanan füzyon genleri arasında CD44-SLC1A2, SLC34A2-ROS1 ve CLDN18-ARHGAP26 bulunur [19, 126, 127].

9.1.3. Genomik kararsızlık (mikrosatellit instabilite)

DNA üzerinde tekrar eden kısa sekansların (mikrosatellitler) uzunluğundaki değişimlerle karakterize olan MSI, DNA yanlış eşleşme tamir genlerinin mutasyonal inaktivasyonu veya epigenetik susturulması sonucu gelişir [128]. Sonuç olarak, defektif olan yanlış eşleşme tamir sistemi, hücre içindeki birçok gende mutasyona ve genomik kararsızlığa neden olur. G-ACa'ların önemli bir kısmının MSI özelliği gösterdiği bildirilmiştir [19, 126, 127].

MSI tümörlerin, düşük sıklıkta TP53 mutasyonu gösterdiği ve MSS tümörlere göre daha yüksek sağ kalım oranı ile ilişkili olduğu saptanmıştır [119, 129]. Yüksek oranda sağ kalım, immün bloke edici tedavilere bu tümörleri daha duyarlı kılan, immün sistem stimülasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Bu teoriyi destekleyen bir çalışmada, pembrolizumabın (anti PD-1; *programmed cell death -1*), MSI özellik taşıyan kolorektal, endometrial ve mide kanserlerinde, MSS olanlara göre, daha yüksek oranda hastalık kontrolü sağladığı bulunmuştur [130].

9.1.4. Epigenetik değişiklikler

DNA CpG ada hipermetilasyonu, hipometilasyon, histon modifikasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi veya miRNA değişiklikleri gibi DNA sekansları ile ilişkili olmayan epigenetik değişiklikler, gen ekspresyon profilinde farklılıklara neden olur.

G-ACa'larda, CpG ada metilasyonu, öncelikle CDH1, CDKN2A, CDKN2B ve hMLH1 genlerinin promotor bölgelerini etkiler ve bu genlerin ekspresyonlarında

azalmaya yol açar. CpG ada metilasyonu, midede karsinogenez sürecini potansiyalize ederek malign transformasyona dönüşümü hızlandırır [131-133].

miRNA'lar, kısa, stabil, kodlanmayan RNA segmentleridir. miRNA'lar, DNA'ya bağlanarak veya translasyona hazır olan mRNA'yı degrade ederek gen ekspresyonlarını düzenler. miRNA'lar onkogen (onkomiRNA), tümör supresor (tsmiRNA) veya hücre yolağı düzenleyicisi olarak işlev gösterebilir. G-ACa gelişiminde önemli rol oynayan çok sayıda miRNA tanımlanmıştır [74, 134].

9.2. Moleküler Sınıflama

G-ACa'lar, morfolojik ve moleküler açıdan son derece heterojen özelliktedir. Klasik histolojik sınıflama sistemlerinin klinik açıdan yönlendirici olma özelliği sınırlıdır. Son yıllarda, hedefe yönelik tedavi seçimlerinin arttırılabilmesi için, çok sayıda araştırmacı G-ACa'ların moleküler alt yapısını çözümleyerek biyolojik-klinik açıdan homojen alt tiplerin belirlenmesine odaklanmıştır. Bu doğrultuda, G-ACa'larda sınıflama, moleküler tekniklerin uygulanabilirlik kazanması ile gelişme göstermiştir (Tablo 4).

G-ACa'lar, ilk olarak 2003 yılında, Singapur'da Patrick Tan ve ekibi tarafından kapsamlı moleküler çalışma sonrası sınıflandırılmış ve 3 moleküler alt tip tanımlanmıştır: 1) Tümörojenik, 2) Reaktif ve 3) Gastrik- benzeri [15]. Tanımlanan alt tiplerin Lauren histolojik alt tipleri veya tümör derecesi ile korelasyonu bulunmamıştır [135].

2011 yılında aynı Singapur grubu, gen ekspresyon profillerine göre G-ACa'ları genomik intestinal (G-INT) ve genomik diffüz (G-DIF) olarak 2 ana gruba ayıran farklı bir sınıflama yayınlamıştır [16]. Lauren intestinal tip ile ilişkili olan G-INT alt tipin, Lauren diffüz tip ile ilişkili olan G-DIF alt tipe oranla daha iyi prognozlu olduğu saptanmıştır. İn vitro çalışmalarda, G-INT tipin 5-FU (5-florourasile) ve oksaplatine, G-DIF tipin sisplatine duyarlı olduğu bulunmuştur.

Patrick Tan grubu, 2013 yılında, 248 G-ACa üzerinde çalışarak, moleküler, morfolojik ve klinik açıdan farklı özelliklere sahip 3 alt tipten oluşan yeni bir moleküler sınıflama daha yayınlamıştır [13]. Tanımlanan alt tipler şunlardır: mezenşimal, proliferatif ve metabolik. Mezenkimal alt tip, Lauren diffüz tipe

ilişkilidir; diğer iki alt tipin Lauren intestinal tipe uyduğunu gösterilmiştir. Mezenşimal tip düşük oranda CDH1 transkript düzeylerine sahip olmakla birlikte, kanser kök hücre ve epitelyal-mezenşimal geçiş özellikleri göstermektedir. Bu tip mTOR yolak inhibitörlerine duyarlıdır. Proliferatif alt tip, yüksek genomik instabilite, TP53 mutasyonu ve onkogenik yollarda aktivasyon (ERB2, CCNE1, MYC ve KRAS) ile karakterizedir. Metabolik alt tipte ekspresyon artışı saptanan genler, normal mide mukozasında eksprese edilen genlerle benzerdir. Bu tip yüksek oranda anaerobik glikolizle ilişkili olduğu için tümör hücreleri 5-FU tedavisine duyarlıdır. SPEM'in, normal mide mukozası ile metabolik alt tip arasında bir ara basamak olabileceği düşünülmektedir. Bu sınıflamadaki her üç alt tip, moleküler olarak farklı özellikler göstermesine karşın, sağ kalım düzeyleri açısından aralarında anlamlı fark saptanmamıştır [135].

2014'te **TCGA** tarafından yayınlanan çalışma, moleküler sınıflama konusunda yapılmış olan en kapsamlı ve önemli çalışmadır [19]. 295 G-ACa üzerinde, çok sayıda farklı moleküler platform kullanılarak elde edilen verilere göre TCGA'da dört genomik tip tanımlanmıştır; EBV ilişkili, MSI, GS ve kromozomal instabil. EBV ilişkili tip (%9) tümör hücrelerinde EBV pozitifliği ile karakterizedir. Çoğunlukla erkeklerde, fundus veya korpus bölgesinde lokalizedir ve gen susturulmasının işareti olan yaygın CDKN2A promoter hipermetilasyonu içerir. Bununla birlikte, PIK3CA mutasyonları (%80) ve JAK2 veya PD-L1/L2 gen amplifikasyonları sıklıkla saptanır. MSI grup (%21), CpG ada metilatör fenotipin (CIMP) göstergesi olan MLH1 promoter hipermetilasyonuna ve HER2 (%5), EGFR (%5), HER3 (%14), JAK2 (%11), FGFR2 (%2), MET (%3), PIK3CA (%42) gibi genlerde artmış mutasyon oranına sahiptir. MSI kolorektal karsinomlarda sıklıkla görülen BRAFV600E mutasyonu, MSI G-ACa'larda görülmez. EBV ilişkili ve MSI tipler, ortak morfolojik özellik olarak belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonuna sahiptir. Birçok çalışmada, PD-L1 ekspresyon artışının, moleküler olarak EBV ve MSI ilişkili alt tiplerle korelasyon gösterdiği bulunmuştur [136-140]. GS tip (%20), diğer tiplere göre Lauren diffüz tipte korelasyonu daha fazla olan tiptir. Bu alt tipte, çoğunlukla, hücre adhezyonuyla ilgili moleküler değişiklikler olan, CDH1 (%26) ve RHOA (%15) gen mutasyonları ile CLDN18- ARHGAP genlerini içeren kromozomal translokasyonlar (%15) görülür. Kromozomal instabil grup (%50), sıklıkla gastroözofagial bileşke/kardia lokalizedir

ve Lauren intestinal tiple ilişkilidir. Yüksek TP53 mutasyon oranına ek olarak, farklı tirozin kinaz reseptörlerinde ve ilgili yollarda gen amplifikasyonu sıklığı; HER2 (%24), EGFR (%10), HER3 (%8), JAK2 (%5), FGFR (%8), MET (%8), PIK3CA (%10) ve KRAS/NRAS (%18) [135].

2015'te, **ACRG** tarafından yayınlanan sınıflamada, EBV pozitifliğinin yerine p53 mutasyonu kullanılarak, her alt tipi prognoz, nüks sıklığı ve özelliği gibi klinik bilgilerle korele ederek, dört moleküler tip tanımlanmıştır [14]; MSI, MSS/EMT, MSS/P53+ (intakt P53 aktivitesi) ve MSS/P53- (P53 fonksiyonel kaybı). Çoğunlukla antrumda lokalize ve Lauren intestinal fenotipte olan MSI grupta, hipermetilasyon ve MLH1 kaybı sıklığıdır. KRAS, ALK, ARID1A ve PI3K yolak genlerinde mutasyon oranı yüksektir. Diğer gruplara göre en iyi prognozludur. MSS/EMT, en kötü prognozlu gruptur; sıklıkla genç yaşta ve Lauren diffüz fenotipte görülür. CDH1 ekspresyon kaybı çoğunlukla saptanır. MSS/p53 intakt grup, MSI gruptan sonra en iyi prognoza sahip olan gruptur ve çoğunlukla EBV pozitifliği gösterir. MSS/p53 inaktif grupta, TP53 mutasyon ve tirozin kinaz reseptörlerinde amplifikasyon oranı yüksektir [135].

Tablo 4' de de gösterildiği gibi, ACRG ve TCGA moleküler alt tipleri, önemli oranda örtüşen özelliklere sahip olmalarına rağmen, kısmen izlenen farklılıkların, hasta populasyonları, tümör örnekleme şekilleri ve kullanılan teknolojik platformlarla ilgili olduğu düşünülmektedir [48, 135].

Bu sınıflamalar, G-ACa'ları biyolojik açıdan tanımlamak için önemli gelişmeler olarak kabul edilmekle birlikte; kullanılan metodoloji RNA-DNA sekanslama, DNA metilasyon analizi, tam ekzon sekanslama ve fosfoproteomik analiz gibi her laboratuvarında olmayan, yüksek maliyetli ve kompleks özellikte analizleri gerektirir. Ayrıca, bu sınıflamaların prognostik değerleri, hastaların sınırlı takip süreleri nedeniyle netleştirilememiştir. Literatürde, rutin pratikte kullanılan basit metodların yardımıyla, yukarıda bahsedilen çalışmalarda tanımlanan farklı moleküler özellikteki alt tipleri, prognostik ve prediktif önemi olan farklı immunfenotipteki gruplara dönüştüren taksonomik çalışmalar mevcuttur [20-24, 141].

Tablo 4. Gastrik adenokarsinomlara yönelik moleküler sınıflamalar ve bu sınıflamaların tedaviye olan yansımaları

Tan 2011 [16] (n=270)			G-DIF: *Kötü prognoz *Sisplatin duyarlı *Diffüz fenotip	G-INT: *İyi prognoz *5-FU ve oksaplatin duyarlı *İntestinal fenotip	
Lei 2013 [13] (n=248)			Mezenşimal: *Düşük E- kaderin mRNA *mTOR inhibitörleri *Diffüz fenotip	Proliferatif: *Yüksek TP53 mutasyonu *Onkogen amplifikasyonu (ERB2, CCNE1, MYC, KRAS) *İntestinal fenotip	Metabolik: *Normal mide mukoza gen ekspresyon profil *5-FU duyarlı *İntestinal fenotip
Bass 2014 [19]: TCGA (n=295)	EBV (%9): *CDKN2A susturulması *PDL1/2 amplifikasyonu *JAK2 amplifikasyonu *PD-1/PD-L1 inhibitörleri	MSI (%21): *MLH1 susturulması *HER2/3 mutasyonu *EGFR mutasyonu *PD-1/PD-L1 inhibitörleri	GS (%20): *CDH1 mutasyonu *RHOA mutasyonu *CLDN18- ARHGAP füzyonu *Diffüz fenotip	CIN (%50): *Yüksek TP53 mutasyonu *TRK amplifikasyonu *İntestinal fenotip	
Cristescu 2015 [14]: ACRG (n=251)	MSS/TP53(aktif): *Orta prognoz *İntestinal fenotip	MSI: *MLH1 kaybı *Hipermutasyon (KRAS, ALK, ARID1A, PIK3A) *En iyi prognoz *İntestinal fenotip	MSS/EMT: *CDH1 ekspresyon kayıbı *Kötü prognoz *Diffüz fenotip	MSS/TP53(inaktif): *Yüksek TP53 mutasyonu *Onkogen amplifikasyonu (ERB2, CCNE1, MYC, EGFR, CCDN1, MDM2, ROBO2, GATA6) *Orta prognoz *İntestinal fenotip	

10. NTRK GEN DEĞİŞİMLERİ

10.1. TRK Sinyal Yolağı

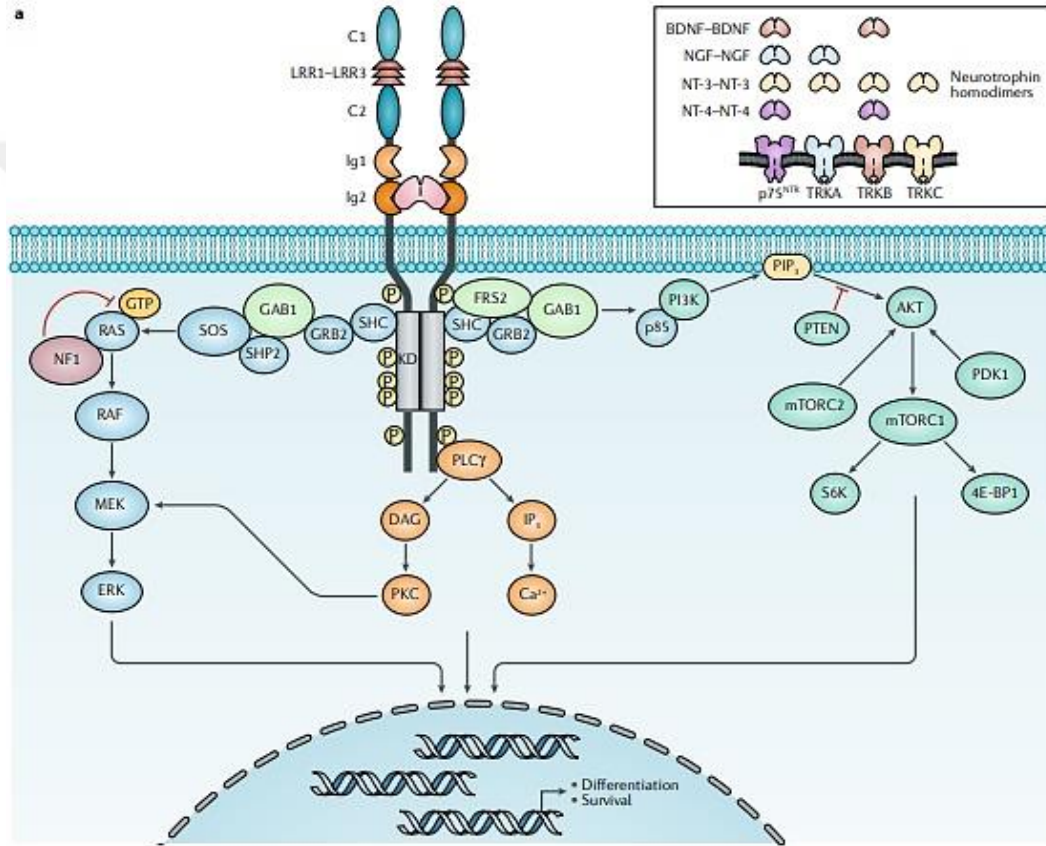
TRK (*tropomiyosin reseptör kinaz*) sinyal yolağı, primer olarak nöronal homeostazdan sorumludur ve sinir sisteminin gelişimi ile fonksiyonunda önemli role sahiptir [29, 142, 143]. Bu yolda yer alan nörotrofinler (NT), TRK ve p75^{NTK} reseptörlerine bağlanarak etki gösteren büyüme faktörleridir. TRK reseptörlerinin uyarılması, stimulator etki ile hücre devamlılığını, büyümeyi ve gelişmeyi sağlarken, p75^{NTK} reseptörleri genellikle inhibe edici etki gösterir [28].

NT reseptörlerinin, başlangıçta, sadece nöronlarda eksprese edilerek, fizyolojik olaylarda ve nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir [28]; yapılan son çalışmalarda, astrositler, oligodendrositler, makrofajlar, pankreas beta hücreleri, immun hücreler, endotel hücreleri, akciğer, kemik, testis ve kas hücreleri gibi non-nöronal hücrelerde de fizyolojik olarak eksprese edildikleri bildirilmiştir [28, 144-146].

Spesifik NT'ler tarafından uyarılan transmembran TRK reseptörlerinin tanımlanan üç üyesi, sırasıyla nörotropik tropomiyosin reseptör kinaz 1 (NTRK1), NTRK2 ve NTRK3 genleri tarafından kodlanan, RTK ailesine ait olan TRKA, TRKB ve TRKC reseptörleridir. NGF (*nerve growth factor*) TRKA reseptörlerine, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ve NT-4 TRKB reseptörlerine, NT-3 ise primer olarak TRKC reseptörlerine bağlanır [30, 147-149]. Her üç TRK reseptörü, ligand bağlayıcı ekstraselüler bölge, transmembran bölge ve tirozin kinaz aktivitesi gösteren intraselüler bölge içerir. Ayrıca, normal ve tümöral dokularda yapılan genomik çalışmalarda, TRK proteinlerinin, NT'ler için farklı afiniteye sahip, farklı ekzon kombinasyonları ile kodlanan çok sayıda splice varyantı tanımlanmıştır [150, 151].

p75^{NTK} reseptörleri, tüm NT ile düşük afiniteyle etkileşim gösterebilen, TNF (*tumour necrosis factor*) reseptör ailesine ait olan pan-NT reseptörleridir [152]. p75^{NTK} reseptörleri direkt olarak TRK reseptörlerine bağlanarak, NT'in TRK reseptörleri üzerindeki etkileri için düzenleyici kontrol mekanizması oluşturur. p75^{NTK} reseptörlerinin hücre üzerindeki etkileri, NT'in konsantrasyonuna, eksprese edilen nörotrofin reseptörünün tipine ve yoğunluğuna bağlı olarak değişim gösterir [6].

NF hücre yüzeyindeki TRK reseptörlerine bağlanarak reseptör dimerizasyonuna yol açar [153]. Dimerize TRK reseptörlerinde intraselüler tirozin kalıntıların otofosforilasyonu yoluyla, hücre içindeki diğer sinyal yolları aktive olur [154]. Hücre içinde aktiflenen üç ana yolak; RAS/MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR ve PLC γ /PKC yollarıdır [155, 156]. Bu sinyal yollarının her biri nöronların devamlılığı ve farklılaşmasında görevli olan genlerin transkripsiyonunu regüle eder (Şekil 5).



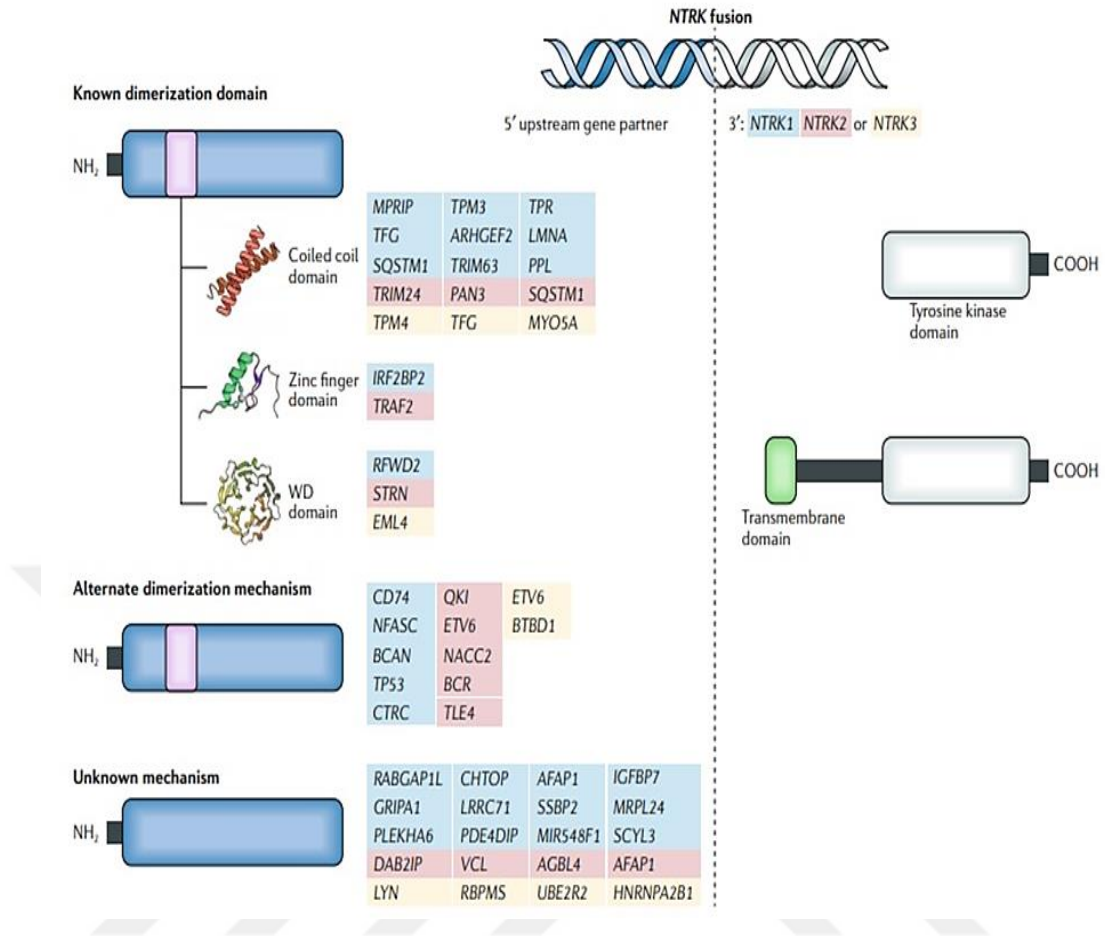
Şekil 5. TRK sinyal yolağı [6]

10.2. TRK Aktivasyonu ve Karsinogenezis

10.2.1. NTRK gen füzyonları

NTRK1, 2 veya 3 gen füzyonları onkojenik TRK aktivasyonunun ana mekanizması olarak bilinmektedir [144]. NTRK gen füzyonları, 1986'da, Martin-Zanca ve ekibi tarafından, bir kolorektal kanser hastasında 1. kromozomdaki intrakromozomal translokasyon sonucunda, TPM3 (*Tropomyosin alpha-3 chain*) ve NTRK1 genleri arasında oluşan onkojenik füzyon ile keşfedilmiştir [157]. NTRK genleri ile seksenin üzerinde farklı gen partneri arasında oluşan onkojenik füzyon genleri, bugüne kadar birçok kanser tipinde tanımlanmıştır.

İntrakromozomal veya interkromozomal translokasyon sonucunda, NTRK genlerinin kinaz aktivitesine sahip intraselüler bölge kodlayan 3' sekanslarının, farklı gen partnerlerinin 5' sekansları ile biraraya gelmesiyle hibrid genler oluşur (Şekil 6) [144]. 5' gen partnerlerinin büyük çoğunluğu, ligand bağımsız aktivasyona yol açan dimerizasyon/oligomerizasyon alanı kodlama özelliğindedir [158]. Füzyon sonucunda, ekstraselüler ligand bağlayıcı bölge içermeyen, ligand bağımsız aktivasyon gösteren tirozin kinaz ile karakterize kimerik onkoprotein üretilir [144, 159]. Onkojenik füzyon proteinleri ile hücre içi TRK sinyal yollarının tümü veya bir kısmı aktive olur.



Şekil 6. NTRK füzyonlarının aktivasyon mekanizması [6]

10.2.2. Füzyon dışı NTRK gen değişimleri

NTRK genlerinde, gen füzyonlarına ek olarak; nokta mutasyonları, delesyonlar, gen amplifikasyonları, mRNA overekspresyonu gibi onkogenik ve/veya TRK inhibitörlerinin etkinliği için prediktif olup olmadığı hala net olarak bilinmeyen diğer somatik genomik değişimler bildirilmiştir [160-165]. Okamura ve ekibinin farklı tiplerdeki 13,467 pediatrik ve yetişkin hastaya ait tümör örneğinde yaptığı çalışmada, NTRK gen füzyonlarının görülme sıklığı %1'den, diğer NTRK gen değişimlerinin insidansı %14 olarak saptanmıştır [166].

Somatik NTRK mutasyonları kolorektal kanser, over kanseri, akciğer kanseri, tiroid kanseri, malign melanom ve akut miyeloid lösemi gibi çeşitli tümör tiplerinde tanımlanmıştır [167-170]. Ancak, in vivo çalışmalarda bu mutasyonlara sahip

reseptörlerin, fonksiyonel olarak wild tip reseptörlerden ayırt edilemediği gösterilmiştir [169]. Bu nedenle, NTRK mutasyonlarının karsinogenezisteki potansiyel rolü hala net olarak kanıtlanmamıştır. Ayrıca, nokta mutasyonların, NTRK füzyonlu tümörlerde uygulanan TRK inhibisyonuna karşı kazanılmış direnç mekanizması yoluyla da gelişebildiği gösterilmiştir [32, 171].

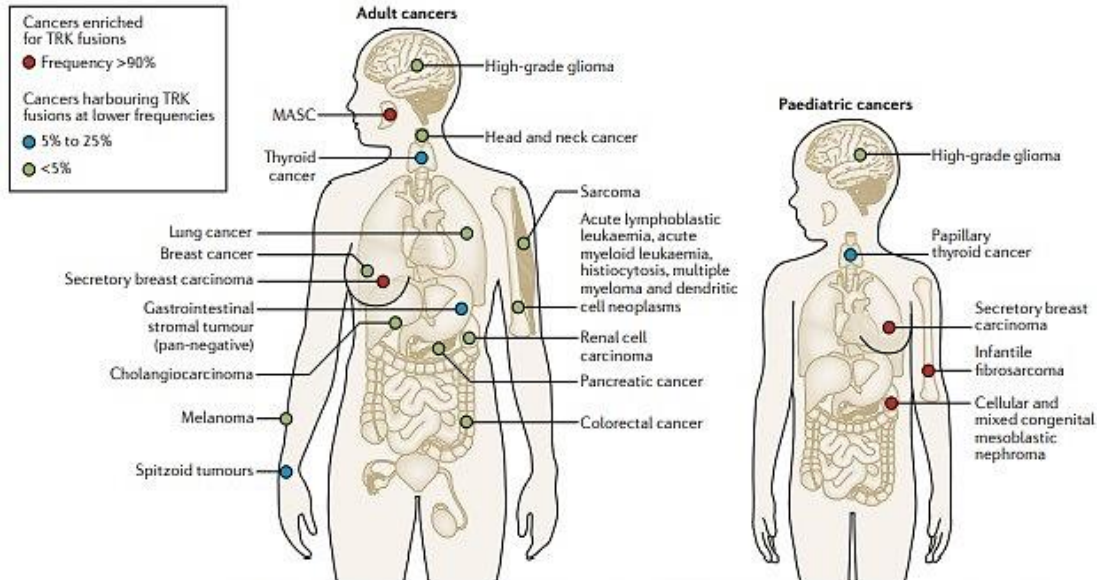
NTRK1 geninde aktive edici splice varyantlar bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, nöroblastomda tanımlanan splice varyant TRKAIII ile akut miyeloid lösemide tanımlanan genomik in-frame delesyon mutantın (Δ TRKA), onkojenik özellikte olduğu rapor edilmiştir [165, 172].

TRK ekspresyon artışı, literatürde meme kanseri, kutanöz bazal hücreli karsinom, nöroblastom, G-ACa ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser tiplerinde bildirilmiştir [173-175]. Nöroblastomda, TRKA ve TRKC ekspresyon artışı iyi prognoz göstergesi iken, TRKB çoğunlukla MYCN amplifikasyonu da içeren yüksek dereceli tümörlerde eksprese edilmektedir [176]. G-ACa'larda, NT molekülleri ve TRK reseptörlerinin değerlendirildiği çalışmalarda, TRKB ekspresyon artış oranının %39-42 olduğu belirlenmiş ve TRKB ekspresyon oranı ile G-ACa sağ kalımı arasında negatif yönde ilişki saptanmıştır. Tanaka ve ekibi, G-ACa'da derin invazyon alanında izlenen TRKB ekspresyon artışını bağımsız prognostik faktör olarak tanımlamıştır [177-180]. Bu çalışmalarda elde edilen verilerden farklı olarak, Kamiya ve ark., yüksek oranda TRKA veya TRKC ekspresyonunun mide kanserinde tümör progresyonunda önemli rol oynayabileceğini öne sürmüştür [181].

NTRK gen amplifikasyonlarının da onkojenik bir alterasyon olup olmadığı konusu, nokta mutasyonları ve TRK ekspresyon artışında olduğu gibi hala netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte, Pasini ve ekibi, 31 malign melanom vakasında, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (*comparative genomic hybridization*) testini kullanarak, NTRK1 geninin kodlandığı 1q23.1 lokalizasyonunda, tümör progresyonuyla ilişkili olan amplifikasyon bölgesi rapor etmişlerdir [163]. Sonrasında aynı çalışmada, 64 primer melanom hastasında PCR kullanılarak validasyon analizi yapılmış ve hastaların %50'sinde kötü klinik gidişle korele olan NTRK1 amplifikasyonu saptanmıştır.

10.3. NTRK Gen Füzyonlarının İnsidansı

Son zamanlarda NGS ve diğer kapsamlı moleküler test metodlarının kullanımının artmasıyla, NTRK gen füzyonlarının prevalansı hakkında daha net sonuçlar bildirilmektedir. Füzyonların saptanma oranına göre tümörler iki ana kategoriye ayrılabilir (Şekil 7) [6]. İlk grupta, NTRK füzyonlarını yüksek oranda (>%90) içeren nadir görülen tümörler bulunur. İnfantil fibrosarkom, konjenital mezoblastik nefrom ve meme ile tükrük bezinin sekretuar karsinomu için ETV6 (*ETS Variant Transcription Factor 6*) -NTRK3 füzyonunun patognomonik olduğu saptanmıştır [171, 182-185]. İkinci grupta ise, NTRK füzyonlarını çok daha düşük oranda içeren (%5-25 veya <%5) yaygın görülen tümörler yer alır. Papiller tiroid karsinomu, spitzoid melanositik tümörler, gastrointestinal stromal tümörler, pediatrik gliomların bir bölümü NTRK füzyonlarını %5-25 oranında içeren tümörler arasındayken; pankreas adenokarsinomları, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomu, biliyer, kolorektal ve renal hücreli karsinomlar, meme karsinomları, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu, melanomlar, erişkin glial tümörler ve yumuşak doku sarkomları NTRK füzyonunu %5'den daha az oranda (ağırlıklı olarak <%1) içeren tümörlerdir [159, 186, 187].



Şekil 7. Yetişkin ve pediatrik tümörlerdeki NTRK füzyonlarının görülme sıklığı ve dağılımı [6]

10.4. NTRK Gen Füzyonları ve Gastrik Adenokarsinom

Bazı çalışmalarda G-ACa'larda da NTRK gen rearranjmanları araştırılmış, bunların hiçbirinde NTRK genlerini kapsayan füzyon transkripti saptanmamıştır. Arnold ve ekibinin çalışmasında ise, pan-TRK immunhistokimyasal yöntemi ile toplam 438 gastrik ve özofageal adenokarsinomda TRK ekspresyonu değerlendirilmiş, herhangi bir tümörde ekspresyon elde edilememiştir [166, 188-190]. Mart 2020'de yayınlanan yeni bir olgu çalışmasında ise ilk kez bir G-ACa'da NTRK rearranjmanı olduğu gösterilmiş, yapılan RNA sekanslama ile bu tümörde ATP1B(*ATPase subunit beta-1*)-NTRK1 füzyonu keşfedilmiştir [191].

10.5. NTRK Gen Füzyonlarının Saptanması

NTRK füzyonları, kromozomal rearranjmanlarla başlayan, füzyon genlerinin translasyonu ve kimerik TRK proteinlerinin ekspresyonuyla sonuçlanan onkogenik bir aktivasyon sürecidir. Bu birbirini izleyen basamaklar ışığında, NTRK füzyonlarını saptamak için farklı laboratuvar testler kullanılabilir. DNA durumunu değerlendirmek için FISH (floresan in-situ hibridizasyon) ve DNA bazlı NGS testleri kullanılırken, transkribe RNA durumunu değerlendirmede RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) ve RNA bazlı NGS testleri kullanılmaktadır. İHK analizi ile direkt olarak protein üretimi değerlendirilir. Her bir tanısal test farklı avantaj ve sınırlılıklara sahiptir.

NTRK füzyonu içeren tümörlerin saptanmasında optimal olan tek bir tanısal strateji olası değildir. Tüm ileri evre solid tümörleri NTRK genlerini içine alan geniş kapsamlı NGS uygulaması ile test etmek en ideal yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, iş akışı ve maliyet gereksinimleri göz önüne alınarak, kaynak kullanımını optimize etmek amacıyla daha detaylı bir yaklaşım modeli zorunludur. Bu konuda literatürde, tümörün sahip olduğu histolojik özellikler ve genomik durumun yanı sıra, laboratuvar imkanları düşünülerek çeşitli tanısal algoritmalar öne sürülmüştür.

10.5.1. İmmünohistokimya

Son çalışmalarda, moleküler genomik profillemenin rutin olarak yapılamadığı merkezlerde ve NTRK gen füzyonlarını düşük insidanda içeren tümörlerde, TRK füzyonlarını saptamak için gerekli ileri moleküler testlerin yapılacağı hastaları belirlemek açısından İHK'nın etkili bir tarama yöntemi olduğu gösterilmiştir. Bu yöntem için sık olarak kullanılan pan-TRK monoklonal antikor EPR17341 (Abcam, Cambridge, UK), her üç TRK proteininde ortak olarak bulunan tirozin kinaz bölgesindeki C-terminal epitopuna bağlanarak reaksiyon gösterir.

İHK ile saptanan TRK ekspresyon paterni, yoğunluk ve selüler lokalizasyon (membranöz, sitoplazmik, perinükleer, nükleer) açısından farklıdır. NTRK füzyonu içeren tümörlerdeki TRK immünoekspresyonunu analiz eden çalışmalarda, füzyon proteinlerinin hücredeki lokalizasyonunun, 5' gen partnerleri tarafından belirlendiği öne sürülmüştür [192, 193]. Örneğin, LMNA (Lamin A/C)-NTRK1 füzyon pozitif olgularda, LMNA geni nükleer lamin proteinini kodladığı için, pan-TRK ile perinükleer ekspresyon paterni görülürken; TPM gen partneri ile gerçekleşen NTRK füzyonlarında, TPM hücre iskelet proteinlerini kodlayan bir gen olduğu için membranöz boyanma paterni izlenmiştir [194].

Hechtman ve ark.'nın, DNA bazlı NGS testi ile NTRK gen füzyonu içerdiği gösterilen 23 tümör üzerinde yaptığı çalışmada, 20/21 tümörde pan-TRK ile immünoekspresyon saptanmıştır [192]. Aynı çalışmada, NTRK füzyonu içermeyen 20 vakalık seride pan-TRK ile immünoekspresyon saptanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre, pan-TRK için duyarlılık ve özgüllük, sırasıyla %95,2 ve %100 olarak bulunmuştur. Yetmiş-dokuz pediatrik mezenşimal tümör ile yapılan farklı bir çalışmada, benzer sonuçlar elde edilmiş, pan-TRK için duyarlılık %97, özgüllük %98 olarak gösterilmiştir [195]. Gatalica ve ekibi ise çeşitli kanserlere ait 11502 tümör örneğinde ArcherDx füzyon testi ile 31 vakada (%0,27) NTRK füzyonu saptamış, 21/28 tümörde pan-TRK İHK'sı, %75 duyarlılık ile pozitif (herhangi bir yoğunluktaki $\geq$ %1 tümör hücresinde boyanma) olarak skorlanmıştır [196].

Bu çalışmalardan elde edilen veriler göz önüne alındığı zaman, pan-TRK İHK'sı NTRK füzyonu içeren tümörleri saptamada bazı avantajlara sahiptir: **1)** Yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları, **2)** Farklı laboratuarlarda, kolaylıkla uygulanabilen hızlı bir metod olması, **3)** Ucuz ve sınırlı materyal gerektirmesi.

Ancak İHK yöntemi, bazı önemli sınırlılıklar içerir [197]: **1)** pan-TRK antikoru ile *wild* tip protein ve füzyon proteini ekspresyonu arasında ayırım yapılamadığı için, TRK proteinlerinin fizyolojik olarak eksprese edildiği dokulardan köken alan tümörlerde füzyon olmaksızın TRK protein ekspresyonu görülebilmektedir. Bu nedenle nöroendokrin tümörlerde, bazı yumuşak doku sarkomlarında, gastrointestinal stromal tümörlerde, küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde ve santral sinir sistemi tümörlerinde pan-TRK İHK kullanımı tanısal açıdan etkin bir yaklaşım değildir ve yanlış pozitif sonuç olasılığını artırır [31, 188, 192], **2)** NTRK füzyonu içeren tümörlerin bir bölümünde (çoğunlukla NTRK3), TRK immünekspresyonu görülmez ve yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir [192], **3)** pan-TRK ile füzyon dışı NTRK gen değişikliklerinde de pozitif sonuçlar görülebilir. Lee ve ekibinin çalışmasında, 1250 tümör örneğinde NGS yöntemiyle NTRK gen amplifikasyonu değerlendirilmiş, 28 tümörde (%2) NTRK gen amplifikasyonu (≥ 4.0 kopya/hücre) saptanmıştır. Gen amplifikasyonu ve protein ekspresyonu arasındaki korelasyon değerlendirildiği zaman, bu tümörlerin 4/27'sinde (%15) pan-TRK ile ekspresyon elde edilmiştir [161].

İmmünohistokimyasal analizin sınırlılıkları göz önüne alındığı zaman, TRK reseptörlerinin ekspresyonu, NTRK1/2/3 füzyonları için tanısal olmayıp, bu füzyonların bulunabileceğini öngörmeye yardımcı bir tarama yöntemidir. NTRK füzyonlarının doğru bir şekilde saptanabilmesi için diğer yardımcı yöntemlerin de uygulanması gereklidir.

10.5.2. Floresan in-situ hibridizasyon

FİSH, gen füzyonlarını saptamada altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, formalin fikse parafine gömülü tümör örneklerinde belli gen sekanslarına bağlanan floresanla işaretli RNA veya DNA probaları kullanılır [198].

FİSH yönteminin majör avantajlarından biri, hedef genin 5' ve 3' uçlarına yönelik break-apart problemleri kullanılarak, füzyon gen partneri bilgisi olmaksızın, hedef geni içeren bir füzyon olup olmadığını saptayabilmesidir [198]. Bununla birlikte birkaç faktör break-apart testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünü etkileyebilir. Füzyonun intrakromozomal olduğu hedef kromozomdaki problemlerin genomik olarak birbirinden ne kadar ayrı olduğu bu faktörlerden biridir. Özellikle NTRK1 intrakromozomal reorganizasyonlarına interstisyel delesyonlar da eşlik ettiği zaman, yanlış negatif FİSH sonucu olasılığı artmaktadır [31].

FİSH yararlı bir metod olmasına karşın, füzyon partneri bilinmediği zaman, kullanılan problemlerin sekans spesifik olması nedeniyle her bir NTRK geni için ayrı FİSH analizi yapılması gereklidir. Ayrıca, DNA düzeyinde gen değişiklikleri saptanması nedeniyle FİSH analizi onkojenik füzyon proteininin üretilip üretilmediği konusunda herhangi bir bilgi vermez [198].

10.5.3. RT-PCR (reverse transcriptase- polymerase chain reaction)

Taze frozen ya da formalin fikse parafine gömülü örneklerden ekstrakte edilen tümör RNA'sı ters transkripsiyon işlemiyle komplementer DNA (cDNA) sekanslarına dönüştürülür. cDNA spesifik füzyon varlığında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyona uğrar. RT-PCR, FİSH analizi ile karşılaştırıldığında, düşük transkript düzeylerinde bile sonuç verebilen yüksek oranda spesifik, hızlı, ekonomik ve duyarlı bir metottur [198].

NTRK gen füzyonlarını saptamak için iki ana RT-PCR yaklaşımı kullanılmaktadır [31]. Bunlardan ilki olan konvansiyonel RT-PCR, spesifik 5' gen partnerleri ile spesifik NTRK genleri arasındaki füzyonları yüksek oranda içeren tümör tiplerinde etkin bir tanısal yöntemdir [31, 199]. Yapılan çalışmalarda, infantil fibrosarkom, sekretuar meme kanseri ve konjenital mezoblastik nefromada ETV6-NTRK3 füzyon transkriptlerini saptamada bu yaklaşımın yararlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir [182, 184, 200, 201]. Ancak, giderek artan çok sayıdaki 5' füzyon gen partnerine ve şimdiye kadar tanımlanan füzyonların çeşitliliğine bağlı olarak, bu yaklaşım, diğer varyant füzyonların saptanmasını engelleyebilir [31].

Diğer alternatif yaklaşım ise, NTRK gen transkriptlerinin 3' ve 5' amplikonlarının ekspresyon oranlarının dengesizliğine dayalı olarak NTRK gen füzyonu varlığını değerlendirmek için kullanılan indirekt yöntemdir. NTRK füzyonu içeren tümör dokusu, normal dokuların çoğunda eksprese edilmeyen ya da düşük düzeyde eksprese edilen NTRK genlerinin 3' kinaz bölgesi, 5' ekstrasellüler bölgeye oranla çok daha yüksek oranda transkribe edilir [202]. Bu yöntem daha önce Brzezianska ve ekibi tarafından, papiller tiroid karsinomlarındaki NTRK1 gen füzyonlarının saptanmasında kullanılmıştır [203].

10.5.4. Yeni nesil dizileme

NGS teknolojisi, son yıllarda, beraberinde getirdiği avantajlar nedeniyle birçok alandaki moleküler tanıya yönelik uygulamaların vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. NGS, önceki dizi bilgisi olmayan milyonlarca DNA fragmanından düşük maliyetle, hızlı ve paralel olarak çok büyük miktarda veri elde edilmesini sağlamaktadır [204].

NGS ile DNA veya RNA'ya dayalı olarak tüm genom, ekzom, transkriptom veya hedefli gen analizleri yapılabilmektedir [31, 205]. Füzyonları tespit etmede en yaygın kullanılan metod ise spesifik gen panellerinin analizidir [198].

Sekanslanacak genlerin izolasyonu, amplikon dizileme veya prob-yakalama (*capture*) tabanlıdır. Amplikon dizilemede, hedef bölge PCR ile çoğaltılarak zenginleştirilir. Bu yöntemde daha az miktarda dokuya ihtiyaç duyulmasına karşın, füzyonların başarılı bir şekilde tespit edilebilmesi için, 5' gen partnerleriyle birlikte füzyonların tam ve kesin olarak bilinmesi gereklidir. Prob-yakalama metodunda, hedef bölgeye özgü dizayn edilmiş problemlerin hedefe hibridizasyonu ve ardından zenginleştirilmesi ile çalışılır. Bu yöntem daha fazla miktarda doku gerektirmesine karşın, bilinmeyen füzyonların keşfedilmesine olanak sağlar [31, 198, 202].

DNA bazlı sekanslama yöntemlerinde önemli bir dezavantaj, büyük intronik bölgeler içinde lokalize olan füzyonların tespit edilmesidir [206]. NTRK2 ve 3 genleri son derece uzun intron alanları içerdiği için, DNA sekanslama ile özellikle NTRK2 ve 3 füzyonlarının saptanması problem oluşturur.

RNA bazlı sekanslama tekniklerinin tümünde öncelikle, ters transkripsiyon yoluyla RNA cDNA'ya dönüştürülür. DNA bazlı sekanslamalarla karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir. RNA içindeki intron bölgeleri uç-birleştirme (*splicing*) mekanizması ile uzaklaştırıldığından, DNA bazlı sekanslamalardaki teknik sınırlılıklar RNA sekanslama ile ortadan kaldırılır. Aynı zamanda, RNA düzeyinde füzyonların saptanması, füzyonların fonksiyonel olarak transkripsiyonunun kanıtıdır ve *splicing* sekansların analizi translasyonla proteinlerin üretilip üretilmeyeceği konusunda bilgi verir [202]. RNA materyali ile çalışmada ana problem, RNA'nın labil özellikte bir molekül olmasıdır. RNA formalin fikse parafine gömülü dokulardan ekstrakte edilebilir, fakat degradasyon ve fragmantasyona duyarlılığı nedeniyle özellikle eski materyallerde yeterli kalite kontrolü gereklidir [202].

10.6. TRK İnhibisyonu

Klinik çalışmaların ve onay alma sürecinin çeşitli aşamalarında olan birçok TRK tirozin kinaz inhibitörü tanımlanmış durumdadır. Entrectinib, TPX-0005 ve DS-6051b gibi moleküller multipl kinaz hedefleyicileri arasında; larotrectinib ise TRK kinazlar için spesifik bir moleküldür.

TRK inhibisyonunun klinik etkisi, öncelikle, larotrectinib ve entrectinib ile tedavi edilen TRK füzyonu içeren tümörlerde rapor edilmiştir. Faz1 ve 2 çalışmalardan yayınlanan verilere göre bu ajanların TRK füzyonu içeren tümörlerin tedavisinde etkin moleküller oldukları kanıtlanmıştır [171, 207-213].

Larotrectinib, TRKA, TRKB ve TRKC'e yüksek derecede seçici, ATP-yarışmalı ve oral yolla uygulanan inhibitördür. Larotrectinibin potansiyel etkisi, ilk olarak 55 yetişkin ve pediatrik hastadaki NTRK gen füzyonu içeren 17 farklı tip tümör üzerinde konfirme edilmiştir [32]. Bu çalışmada, larotrectinibe NTRK füzyon tipi, tümör tipi ve tümör yerleşiminden bağımsız yanıt oranı %75 olarak bildirilmiştir. Larotrectinib (VITRAKVI), yetişkin ve pediatrik hastalardaki NTRK gen füzyonu içeren solid tümörlerin tedavisinde kullanılmak üzere Kasım 2018'de FDA onayı almıştır.

Entrectinib, TRKA, TRKB, TRKC, ROS1 (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase reactive oxygen species*) ve ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) tirozin kinaz

reseptör için oral uygulanan inhibitör moleküldür. Entrectinib aktivitesi, NTRK füzyonlu tümörlerde, 54 yetişkin hastadaki 10 farklı tümör tipi üzerinde test edilmiştir. Yaklaşık 16 aylık takip sonrası, yanıt oranı %57 olarak bildirilmiştir [33].

Literatürde, füzyon dışı NTRK gen değişimlerinin, TRK inhibisyonuna yanıt olarak klinik yararı konusunda öne sürülen sınırlı sayıda veri vardır. Yapılan çalışmalarda, füzyon dışı NTRK değişimlerinde TRK inhibitörlerine karşı terapötik yanıt elde edilememiştir [34, 166].



11. KLİNİK ÖZELLİKLER

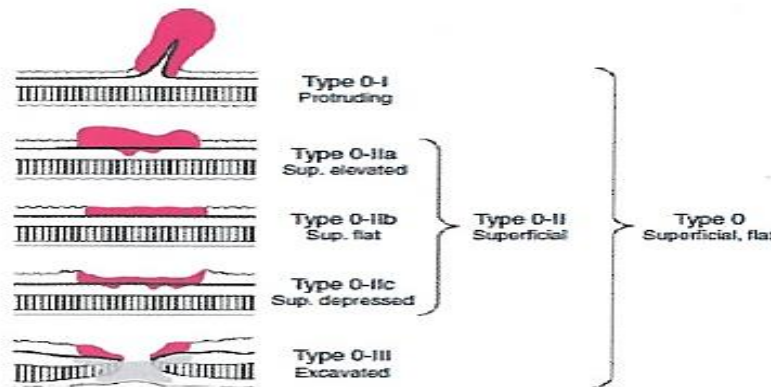
11.1. Erken Mide Kanseri

Erken mide kanseri, lenf nodu durumuna bakılmaksızın, mukoza veya submukoza sınırlı olan invaziv karsinomlar için kullanılır [214]. Bu tanım Japonya’da mide tarama programları sonucu asemptomatik hastalarda erken evre kanserin gösterilmesi sonucunda kullanılmıştır. Tüm dünyada artan üst gastrointestinal sistem endoskopik taramalarına bağlı olarak, saptanma oranı artış göstermiştir.

Erken mide kanserlerinin çoğu 50 yaşın üstündeki erkeklerde görülür. Sıklıkla 2-5 cm arasında ve tipik olarak küçük kurvaturda yerleşim gösterir [214, 215]. Hastaların %3-13’ünde, kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilen çoklu tümör saptanmıştır [216, 217]. Histolojik olarak erken mide kanserlerinin büyük çoğunluğu tubuler veya papiller morfolojideki iyi farklılaşma gösteren G-ACa’lardır.

Erken mide kanseri endoskopik/makroskopik görünümüne göre üç gruba ayrılır (Şekil 8): I) protrüde, II) yüzeysel, III) kavite oluşturan [218]. Yüzeysel grup; IIa) eleve, IIb) düz (*flat*) ve IIc) deprese olarak üç alt tipe ayrılır. Makroskopik görünümün lenf nodu metastaz riski açısından belirleyici olduğu ve en düşük risk oranlarının tip I ile IIa’da olduğu bildirilmiştir [219].

Erken mide kanserlerinde, tümör çapı ve tümör invazyon derinliği en önemli prognostik faktörlerdir. Cerrahi rezeksiyon ile, 5 yıllık sağ kalım oranı %90’ın üzerindedir [220].

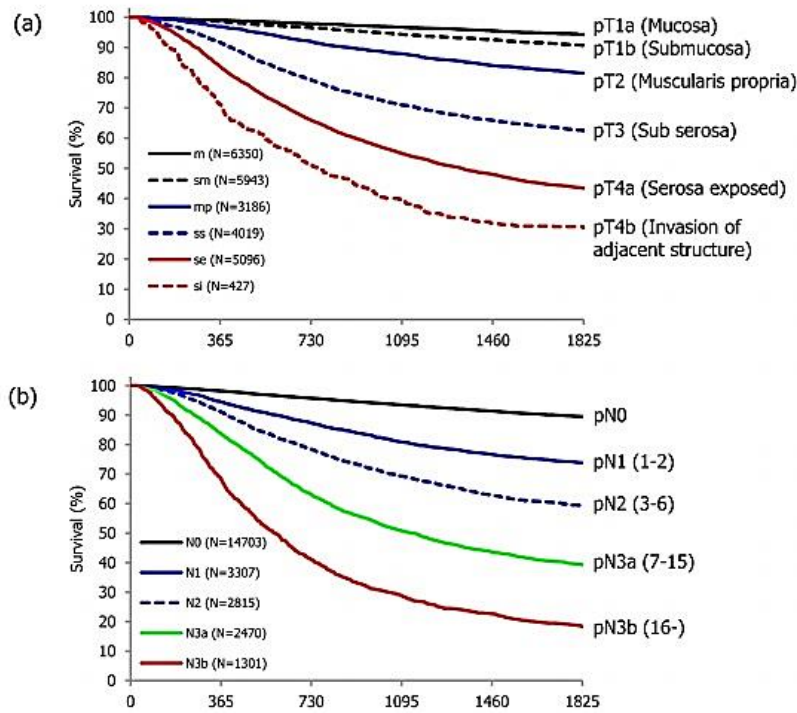


Şekil 8. Erken mide kanserinin makroskopik sınıflandırması [7]

11.2. Prognostik Faktörler

11.2.1. Eyre

G-ACa'larda patolojik evreleme (pTNM), cerrahi rezeksiyon sonrası makroskopik incelemede tümörün mide duvarındaki invazyon seviyesine (T), lenf nodu tutulumuna (N) ve metastaz durumuna (M) dayanır. TNM evrelemesi (Tablo 5), G-ACa'larda prognostik açıdan en önemli faktör olarak kabul edilmektedir. pT1 ve pN0 olan mide kanserlerinde 5 yıllık sağ kalım oranı %90'ın üzerindedir [7]. Sağ kalım oranı, pT ve pN kategorisi arttıkça, aşamalı olarak azalma gösterir (Şekil 9) [1].



Şekil 9. Gastrik adenokarsinomda sağ kalım ile histolojik invazyon derinliği (a) ve histolojik lenf nodu metastazı (b) ilişkisi [1]

Tablo 5. Gastrik adenokarsinom evreleme [2]

TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümöre ilişkin bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ; lamina propria invazyonu olmaksızın intraepitelyal tümör
T1	Submukozaya kadar invazyon
T1a	Lamina propria veya muscularis mucosa invazyonu
T1b	Submukoza invazyonu
T2	Muscularis propria invazyonu
T3	Viseral periton veya komşu organ invazyonu olmaksızın subseroza bağ dokusu invazyonu
T4	Viseral periton (seroza) veya komşu organ invazyonu
T4a	Seroza invazyonu
T4b	Komşu organ invazyonu

NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1-2 bölgesel lenf nodu metastazı
N2	3-6 bölgesel lenf nodu metastazı
N3	≥ 7 bölgesel lenf nodu metastazı
N3a	7-15 bölgesel lenf nodu metastazı
N3b	≥ 16 bölgesel lenf nodu metastazı

M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

11.2.2. Farklılaşma Derecesi

G-ACa'ların derecelendirilmesinde, tümörün bez yapabilme yeteneğine göre düşük ve yüksek dereceli olarak ikili sistem kullanılır. Derecelendirme primer olarak tubuler ve papiller tip G-ACa'larda uygulanır [7]. Derecelendirmenin patoloji raporlarında belirtilmesi gereklidir, ancak prognoza olan etkisi netlik kazanmamıştır. Chiaravalli ve ekibi, G-ACa'larda derecenin prognoza olan etkisini araştırmış, düşük dereceli olan tümörlerin daha iyi klinik gidişe sahip olduklarını bildirmiştir [221].

11.2.3. Tümör yerleşimi

Distal yerleşimli G-ACa'ların, proksimal G-ACa'lara oranla daha iyi prognoza sahip oldukları görüşü tartışmalıdır. Saito ve ark. kardiada lokalize tümörlerde 5 yıllık sağ kalım oranını %61 düzeyinde saptarken, midenin distal üçte birinde lokalize tümörlerde bu oran %82,6 düzeyindedir [222]. Başka bir çalışmada, bu oranlar birbirine yakın değerlerdedir; proksimal ve distal lokalizasyona göre sırasıyla %28, %29 olarak bildirilmiştir [223].

11.2.4. Mikroskopik tip

Histolojik fenotipin prognozu etkilediği öne sürülmektedir. En kötü prognozla ilişkili olan histolojik tipin, %15'den daha az 5 yıllık sağ kalım oranı ile, yoğun fibröz stromaya sahip zayıf koheziv karsinom (*linitis plastica* veya skiröz karsinom) olduğu bildirilmiştir [7].

11.2.5. Moleküler profil

G-ACa'larda son yıllarda öne sürülen prognozla ilişkili olan moleküler profiller, sadece karsinogenez sürecinde meydana gelen genetik değişimleri tanımlamakla kalmayıp, aynı zamanda gelecekte G-ACa'lar için yeni potansiyel terapötik ajanların bulunmasına öncülük etmesi açısından önemlidir [7].

11.2.6. HER2

Anti- HER2 tedavisi, rezektabl olmayan veya metastatik HER2 pozitif mide kanserlerinde verilmekle birlikte, HER2 overekspresyonu/ HER2 amplifikasyonu ile prognoz ilişkisi tartışmalıdır [7].

11.3. Mide Kanseri Tedavi

Günümüzde, G-ACa'larda erken evrede küratif tedavi sadece yeterli cerrahi rezeksiyon ile mümkündür. İleri evre ve rezeke edilemeyen mide kanserlerinde ise kloropirimidin ve platinum bazlı kemoterapi rejimleri neoadjuvan veya adjuvan tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Konvansiyonel kemoterapötik rejimlere ek olarak, spesifik onkojenik yollar göz önüne alınarak geliştirilen monoklonal antikorlara yönelik hedefli tedaviler, önerilen yeni tedavi rejimlerini oluşturmaktadır. Faz III klinik çalışmalara göre, trastuzumab (anti-HER2) ve ramucirumab (anti-VEGFR2) monoklonal antikorları, ileri evre/metastatik G-ACa'larda kullanılan FDA onaylı hedefe yönelik tedavi ajanlarıdır, ancak klinik açıdan faydaları oldukça sınırlıdır. HER2, G-ACa'da hedefe yönelik tedavi için şu anda klinik pratikte kullanılan tek biyolojik belirteçtir. Ancak, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilebilmesi için, diğer kanserlerde olduğu gibi, G-ACa'larda da kapsamlı çalışmalar sürdürülmektedir.

12. GEREÇ VE YÖNTEM

12.1. Olgu Seçimi

2013-2018 yılları arasında, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi (MÜTF, Pendik EAH) Tıbbi Patoloji bölümünde, rezeksiyon materyallerinde primer G-ACa tanısı alan 382 olgu çalışmaya alınmıştır. Uygun fiksasyona sahip olmayan / yeterli tümör alanı içermeyen materyaller (5 olgu) ve klinik bilgilerine ulaşılamayan takipsiz olgular (135 olgu) çalışma dışında bırakılmıştır. Tümör merkezi özofago-gastrik bileşkeye 2 cm'den yakın yerleşimli ve bileşke tutulumu gösteren 2 olgu, AJCC 2017 (*American Joint Committee on Cancer*) 8. basım kılavuzuna göre bileşke tümörü olarak kabul edilerek çalışmaya dahil edilmemiştir. Sonuçta, MÜTF Pendik EAH'si Onkoloji kliniği tarafından takipli 240 olgu çalışma kapsamını oluşturmuştur.

12.2. Etik Kurul Onayı

09.2019.196 protokol numaralı projemiz, 01.02.2019 tarihli yazı ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Projemiz, SAG-C-TUP-250919-0287 numarası ile Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin finansal desteği ile gerçekleştirilmiştir.

12.3. Demografik ve Histomorfolojik Veriler

Çalışmada değerlendirilen ve Tablo 6' da özetlenen demografik ve histomorfolojik verilere, olgulara ait hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı bulunan patoloji raporlarından ulaşılmıştır.

12.3.1. Makroskopik sınıflama

Olgular, Borrmann sınıflaması göz önüne alınarak; polipoid (tip 1), fungoid (tip 2), ülser (tip 3) ve diffüz infiltratif- flat (tip 4) olarak dört gruba ayrılmıştır.

12.3.2. Tümör yerleşim yeri

Olgular, tümör yerleşimine göre, kardial, korpus/fundus ve antrum olarak gruplandırılmıştır.

12.3.3. Histolojik sınıflama

Olgular, Lauren sınıflamasına göre, intestinal, diffüz, mikst tip ve tanımsız (*not defined*) olarak; DSÖ 2019 kriterlerine göre tubuler/papiller, zayıf koheziv, müsinöz, mikst tip ve diğer nadir histolojik alt tipler göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır.

12.3.4. Farklılaşma derecesi (grade)

Olgular düşük dereceli ve yüksek dereceli olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. CAP (*College of American Pathologists*) protokolü kriterlerine göre intestinal ve mikst tip olgular glandüler farklılaşma oranlarına göre derecelendirilmiştir. Tümörün %50 veya daha fazlasının glandüler yapılardan oluşması düşük dereceli, %50'den azının glandüler yapılardan oluşması yüksek dereceli olarak gruplandırılmıştır. Difüz tip olgular yüksek dereceli olarak değerlendirilmiştir. Lauren sınıflamasına göre tanımsız grupta yer alan, DSÖ 2019 sınıflamasına göre medüller karsinomlarda derecelendirme yapılmamıştır.

12.3.5. Evreleme (stage)

Evreleme, AJCC 2017 kılavuzuna göre yapılmıştır. Tüm olgularda evreleme için tümör invazyon seviyesi (T), lenf nodu metastazı (N) ve uzak metastaz (M) olmak üzere üç komponent değerlendirilmiştir. T kategorisinde olgular, istatistiksel analiz amaçlı, erken (T1+T2) ve ileri (T3+T4) evre olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. N kategorisinde N0, N1, N2 ve N3 olarak gruplandırma yapılmıştır.

12.3.6. Lenfatik, vasküler ve perinöral invazyon

Lenfatik, vasküler ve perinöral invazyon her olgu için ayrı ayrı belirtilmiştir.

12.3.7. Cerrahi sınırlar

Proksimal, distal ve küçük kurvatür cerrahi sınır örneklerinde, doku işaretleme boyasında invaziv karsinom varlığı, cerrahi sınır pozitifliği olarak kabul edilmiştir.

12.3.8. Tümör çevre mukoza değişiklikleri

Çalışmada değerlendirilen çevre mukoza değişiklikleri Tablo 6’ da özetlenmiştir.

12.4. Klinik İzlem Verileri

Olgulara ait operasyon sonrası nüks verileri için onkoloji klinik takip dosyaları gözden geçirilmiştir (Temmuz 2020). Sağ kalım verilerine, T.C. Sağlık Bakanlığı Ölüm Bildirim Sistemi’nden ulaşılmıştır.

Tablo 6. Değerlendirilen demografik ve histomorfolojik veriler ve değerlendirilme kriterleri

Demografik ve Histomorfolojik Veriler	Değerlendirme
Yaş	Sayısal olarak değerlendirildi.
Cinsiyet	Kadın, Erkek
Makroskopik tip	Polipoid, fungoid, ülser, flat
Tümör çapı	Sayısal olarak değerlendirildi.
Tümör yerleşimi	Kardia, korpus/fundus, antrum
Lauren histolojik tip	İntestinal, diffüz, mikst, tanımsız
DSÖ 2019 histolojik tip	Tubuler/papiller, zayıf koheziv, müsinöz, mikst, diğer
Derece	Düşük, yüksek
Tümör invazyon seviyesi (T)	Erken, ileri
Lenf nodu metastazı (N)	N0, N1, N2, N3
Metastatik lenf nodu perinodal invazyon	Var, yok
Lenfatik invazyon	Var, yok
Anjiointinvazyon	Var, yok
Perinöral invazyon	Var, yok
Desmoplastik yanıt	Var, yok
Lenfositik yanıt	Var, yok
Cerrahi sınır pozitifliği	Var, yok
Tümör çevresi mukozada <i>H. Pylori</i>	Var, yok
Tümör çevresi mukozada atrofi	Var, yok
Tümör çevresi mukozada SPEM	Var, yok
Tümör çevresi mukozada paneth hücre metaplazisi	Var, yok
Tümör çevresi mukozada displazi	Var, yok

12.5. Tissue Microarray (TMA)

Retrospektif olarak taranıp çalışmaya alınan olgulara ait arşivimizde bulunan formalin fikse, parafine gömülü tümör örneklerinden hazırlanan H/E boyalı kesitler morfolojik açıdan yeniden değerlendirilmiştir. TMA analizi için her olguya ait, tümörü en iyi temsil ettiği düşünülen, morfolojik açıdan farklı tümör alanlarından punch şeklinde alınan dört örnek, alıcı (*recipient*) bloklardaki 3 mm çaplı yuvacıklara (korlara) yerleştirilmiştir. Toplam 240 G-ACa'ya ait 4'er örnek ile oluşturulan 40 adet alıcı bloktan hazırlanan histolojik kesitlere H/E, İHK ve İSH uygulanmıştır.

12.6. İmmünohistokimya ve İn-situ Hibridizasyon Uygulama Yöntemi

12.6.1. İHK uygulama yöntemi

MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, p53, E-Kaderin ve Pan-TRK İHK boyaları için, TMA bloklardaki 3 mm çaplı kordlarda yer alan formalin fikse parafine gömülü dokulardan hazırlanan 3 µm kalınlıktaki kesitler elektrostatik yüklü lamalara alınmış ve 70 °C'de en az 1 saat kurutulmuştur. Bölümümüzde G-ACa olgularında rutin olarak uygulanan HER2 İHK'sı için, tümör bloklarından hazırlanan tam doku kesitlerinde aynı işlem uygulanmıştır. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm İHK boyama süreci, tam otomatik İHK boyama cihazında (Ventana BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) gerçekleştirilmiştir. İşlem için cihaza uygun, biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) kullanılmıştır. Pan-TRK İHK'sı için, OptiView DAB Detection Kit kullanılmıştır. Zıt boyama, hematoksilin ve mavileştirici solüsyon (bluing reagent) ile boyama cihazında tamamlanan kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılması ve lamel ile kapatılması aşamaları elde yapılarak işlem sonlandırılmıştır.

Çalışmada fare monoklonal MLH1 (Klon ES05, Dako, Carpinteria, CA, USA), fare monoklonal MSH2 (Klon FE11, Dako, Carpinteria, CA, USA), tavşan monoklonal MSH6 (Klon EP49, Dako, Carpinteria, CA, USA), tavşan monoklonal PMS2 (Klon

EP51, Dako, Carpinteria, CA, USA), fare monoklonal p53 (Klon ES05, DO-7, Dako, Glostrup, Denmark), fare monoklonal E-Kaderin (Klon NCH-38, Dako, Carpinteria, CA, USA), tavşan monoklonal Pan-TRK (Klon EPR17341, Abcam, Cambridge, UK) ve tavşan monoklonal HER2 (Klon SP3, Thermo Scientific™ Lab Vision™, USA) antikorları kullanılmıştır (Tablo 7).

Dış kontrol olarak “mismatch repair” (MMR) protein paneli (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) için kolon dokusu, p53 İHK’sı için endometrium seröz adenokarsinom dokusu, pan-TRK İHK’sı için kortikal beyin dokusu, E-kaderin ve HER2 İHK’sı için meme karsinom dokusu kullanılmıştır.

Tablo 7. İmmünohistokimya uygulamasında kullanılan antikorlar ve özellikleri

Antikor	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi	Sıcaklık
MLH1	ES05	Kullanıma hazır	2 saat	37 °C
MSH2	FE11	Kullanıma hazır	2 saat	37 °C
MSH6	EP49	Kullanıma hazır	2 saat	37 °C
PMS2	EP51	Kullanıma hazır	2 saat	37 °C
p53	DO-7	Kullanıma hazır	1 saat	37 °C
E-Kaderin	NCH-38	Kullanıma hazır	32 dakika	37 °C
Pan-TRK	EPR17341	1/500	1 saat	37 °C
HER2	SP3	1/100	1 saat	37 °C

12.6.2. HER2 ve NTRK1/2/3 FİSH uygulama yöntemi

Rutinde FİSH için formalin fikse parafine gömülü dokulardan hazırlanan 3 µm kalınlıktaki kesitler elektrostatik yüklü lamlara alınmıştır. Lamlar deparafinizasyon işlemi için 56 °C’ lik etüvde bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Deparafinizasyon işleminin devamı olarak lamlar 3x5 dakika ksilen ve 2x10 dakika etanol ile muamele edilmiştir. Ortamdan alkolü uzaklaştırmak için lamlar 2 dakika süre ile distile suda bekletilmiştir. Dokunun açılmasını sağlamak amacıyla 98 °C su banyosunda, sitrat tamponu içinde, dokunun yapısına göre değişmekle birlikte yaklaşık 25-30 dakika kadar bekletilmiştir. Ardından distile suda çalkalanmış ve bir dakika süreyle distile

suda bekletilmiştir. Örnekler bağ doku proteinlerinin yıkımını sağlamak amacıyla, hibridizasyon cihazında 37 °C’de 10 dakika pepsin solüsyonu ile muamele edilmiştir. Cihazdan alınan örnekler kit (ZytoVision FISH Tissue Implementation Kit) içerisindeki yıkama solüsyonunda 5 dakika bekletilmiş ve yeniden distile su ile çalkalanarak bir dakika distile suda bekletilmiştir. Lamalar %70- %90- %100’lük alkol serilerinden geçirilerek havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan dokunun üzerine, HER2 in situ hibridizasyon için yaklaşık 10 mikrolitre HER2 probu (ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe) ve NTRK in situ hibridizasyon için yaklaşık 10 mikrolitre NTRK1/2/3 probu (ZytoLight SPEC NTRK1/2/3 Dual Color Probe) damlatılmıştır. Laminin üzeri probun yayılmasını sağlayacak şekilde lamel ile kapatılmış ve dokunun hava almasını engellemek amacıyla lamelin etrafı Fixogum Rubber Cement ile yapıştırılmıştır. Kapatılan lamalar hibridizasyon cihazında 75 °C’de 10 dakika denatüre edildikten sonra 37 °C’de 19-21 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün hibridizasyon cihazından alınan lamellerin etrafındaki Fixogum Rubber Cement yapıştırıcısı sökülerek lameller çıkarılmıştır. Lamalar kit içerisindeki yıkama solüsyonuyla 3 x 5 dakika yıkanıp, bir dakika distile suda bekletildikten sonra; %70- %90- %100’lük alkol serilerinden geçirilerek havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler nükleusları boyamak amacıyla yaklaşık 25 mikrolitre DAPI solüsyonu damlatılarak, lamaların üzeri büyük boy lamelle kapatılmıştır. Otuz dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4 °C’ye alınan örnekler floresan mikroskopunda incelenmiştir.

12.6.3. HER2 gümüş in- situ hibridizasyon (SISH) uygulama yöntemi

Olgulara ait formalin fikse parafine gömülü doku örneklerinden hazırlanan 4 mikron kalınlığındaki kesitlere Ventana otomatik boyama platformunda (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA), Inform HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay, Ventana, NewYork, USA kullanılarak, HER2 geni ve kromozom 17 sentromeri için çift renkli in-situ hibridizasyon uygulanmıştır. Proteaz süreleri ve DNA problemleri ile olan inkübasyon süreleri, doku morfolojisi korunarak sinyallerin görünür kılındığı optimal süre olacak şekilde her materyal için ayarlanmıştır. HER2 genini tanımak için dinitrofenil (DNP) işaretli prob kullanılarak, “ultraView SISH DNP” tanıma kiti ile

HER2 hibridizasyon ışık mikroskopunda görünür hale getirilmiştir. Kromozom 17 sentromerini tanımak için digoksinin (DIG) işaretli probu ve “ultraView Kırmızı ISH DIG” tanıma kiti kullanılarak Kromozom 17 ışık mikroskopunda görünür hale getirilmiştir. HER2 gen kopyaları normal dokuda iki siyah nokta halinde, Kromozom 17 sentromeri ise iki kırmızı nokta şeklinde izlenmiştir.

12.6.4. EBER kromojenik in- situ hibridizasyon (CISH) uygulama yöntemi

Olgulara ait TMA bloklardaki formalin fikse parafine gömülü doku örneklerinden 4-µm kalınlığında kesitler alınarak, kromojenik ISH yöntemiyle EBER (Ebstein Barr virus encoded small RNAs) araştırılmıştır. Bu amaçla, floresanla konjuge edilmiş oligonukleotid EBER probu (INFORM EBER Probe, Ventana Medical Systems, Tucson, USA) ve proba uygun üretilmiş kullanıma hazır ISH kiti (ISH VIEW Blue Detection Kit, Ventana Medical Systems, Tucson, USA) kullanılmıştır. Boyama tam otomatik İHK ve İSH boyama cihazında (Benchmark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, USA), üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Seçilen kesitler, tanımlanan cihazda deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemine tabi tutularak, proteinaz K uygulaması ardından, floresan işaretli EBER probu ile inkübe edilmiştir. Daha sonra anti-floresan primer fare antikoru ile inkübe edilerek antikorun proba bağlanması sağlanmıştır. Spesifik floresan işaretli problemleri göstermek için, indirekt biotin streptavidin sistemi kullanılan kit ile in situ hibridizasyon yapılmıştır. Bu sistemde, önce at anti-fare IgG içeren biyotinli sekonder antikor, primer fare antikoruna bağlanmakta, daha sonra streptavidin enzim kompleksi, sekonder antikordaki biotine bağlanmaktadır. Enzim aracılığıyla presipite olan bu ürün yoluyla, ışık mikroskopta değerlendirilebilecek bir boyanma reaksiyonu elde edilmektedir. Bu işlemler sırasında, her inkübasyon basamağının ardından, reaksiyon durdurularak, dokuya bağlanmayan ve sonraki basamaklardaki reaksiyonu örtme riski oluşturan materyali uzaklaştırmak amacıyla ara yıkamalar yapılmıştır. Tam otomatik boyama cihazındaki işlemler tamamlandıktan sonra preparatlar elde yıkanmıştır.

12.7. İmmünohistokimya ve İn-situ Hibridizasyon (İSH) değerlendirmesi

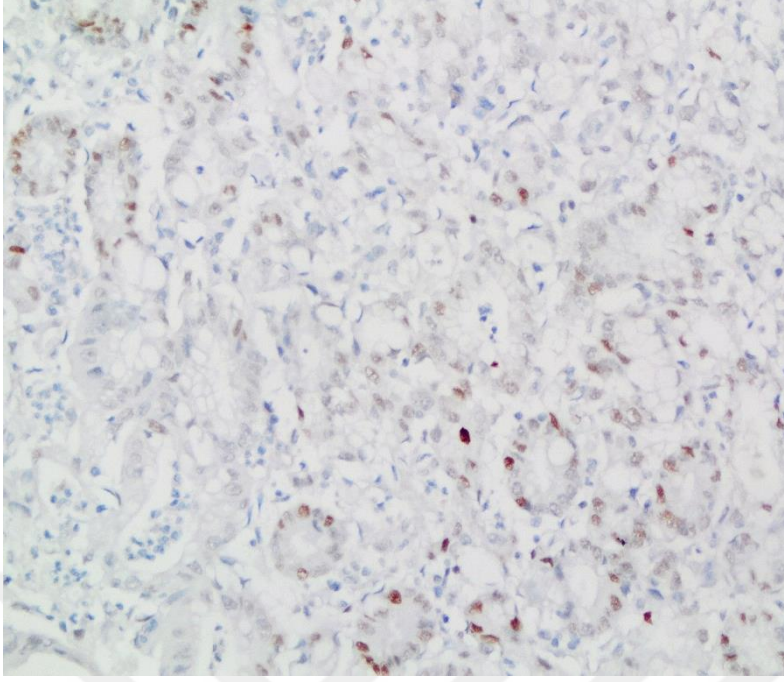
12.7.1. MLH1, MSH2, MSH6, PMS2- immünohistokimyasal değerlendirme

İHK incelemesinin, MSI durumunu tespit etme yönünden, PCR test sonuçlarıyla karşılaştırıldığı zaman yüksek korelasyon değerlerine (>%90) sahip olduğu raporlanmıştır [224]. Olağan mukoza, düz kas hücreleri ve lenfositler pozitif iç kontrol olarak değerlendirilmiş, MLH1, MSH2, MSH6 ve/veya PMS2 ile komplet nükleer immünoekspresyon kaybı gösteren tümörler, *MMR protein deficient (dMMR)* olarak gruplanmıştır. Kısmi nükleer ekspresyon kaybı gösteren veya nükleer ekspresyon kaybı göstermeyen tümörler, *MMR protein proficient (pMMR)* olarak değerlendirilmiştir.

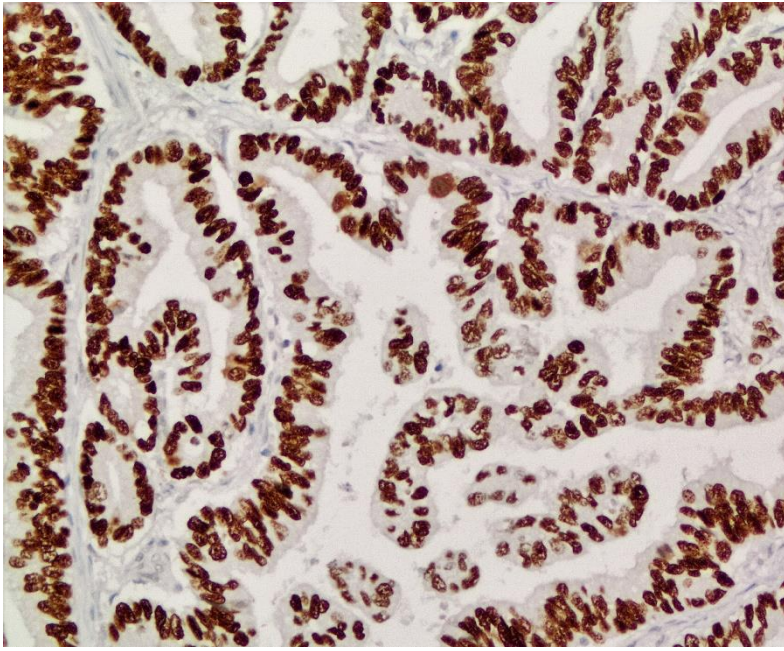
12.7.2. p53- immünohistokimyasal değerlendirme

Yapılan çalışmalara göre, TP53 gen mutasyonlarının çoğunlukla (~%75) yanlış anlamlı (*missense*) mutasyon özelliği taşıdığı ve non-fonksiyonel protein birikimi nedeniyle İHK'da nükleer p53 ekspresyon artışına yol açtığı rapor edilmiştir [225, 226]. Literatürde, p53 ekspresyon artışı için eşik değerler geniş ölçüde değişkenlik göstermekle birlikte, son çalışmalarda tümör hücrelerinde $\geq$ %70 güçlü nükleer boyanma oranının TP53 gen mutasyonunu gösterme açısından anlamlı sonuç verdiği bildirilmiştir [225, 227-229].

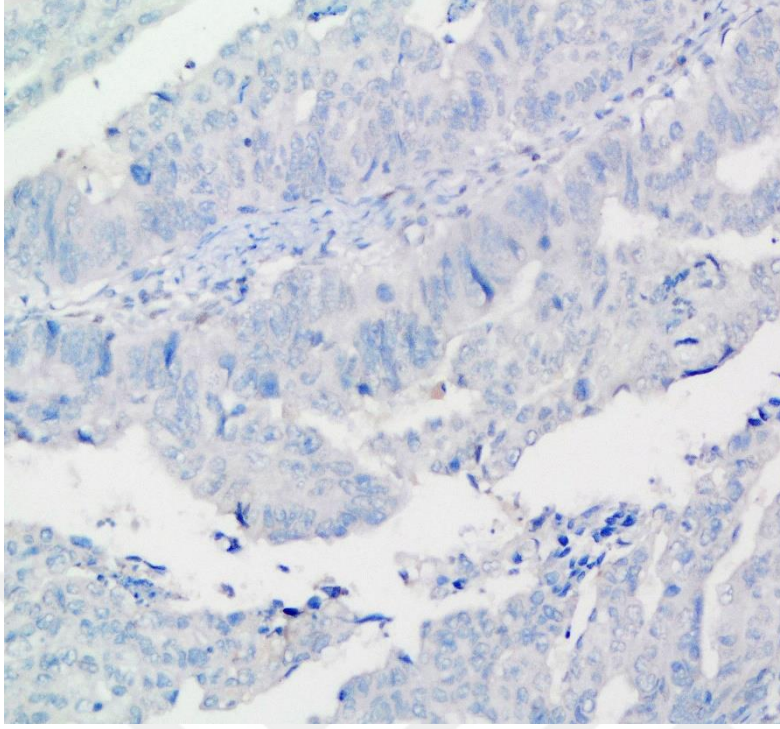
Çalışmamızda, literatürdeki diğer çalışmalar göz önüne alınarak $\geq$ %70 güçlü nükleer boyanmaya sahip olan tümörler veya komplet ekspresyon kaybı (<%5 ekspresyon) gösteren tümörler, "*aberran*" p53 ekspresyonu olarak kabul edilmiştir. Zayıf, dağınık veya yamasal boyanma "*intakt*" p53 ekspresyonu olarak değerlendirilmiş, her bir tümöre ait boyanma yüzdeleri ayrı ayrı belirtilmiştir. Boyanma yüzde değerleri, 200x büyütmede immün ekspresyonun yüksek olduğu "*hot spot*" alanda, toplam 1000 hücre sayılarak belirlenmiştir.



Resim 1. P53 intakt ekspresyon (İHKx20)



Resim 2. P53 aberran ekspresyon ($\geq$ %70 güçlü nükleer ekspresyon) (İHKx20)



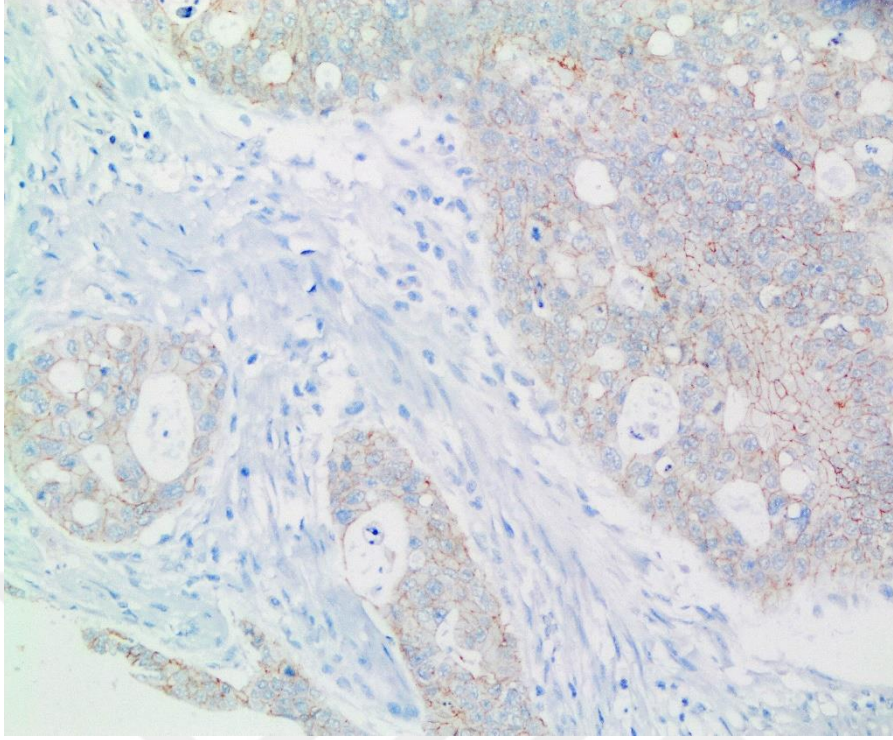
Resim 3. P53 aberran ekspresyon (<%5 ekspresyon) (İHKx20)

12.7.3. E-Kaderin- immünohistokimyasal değerlendirme

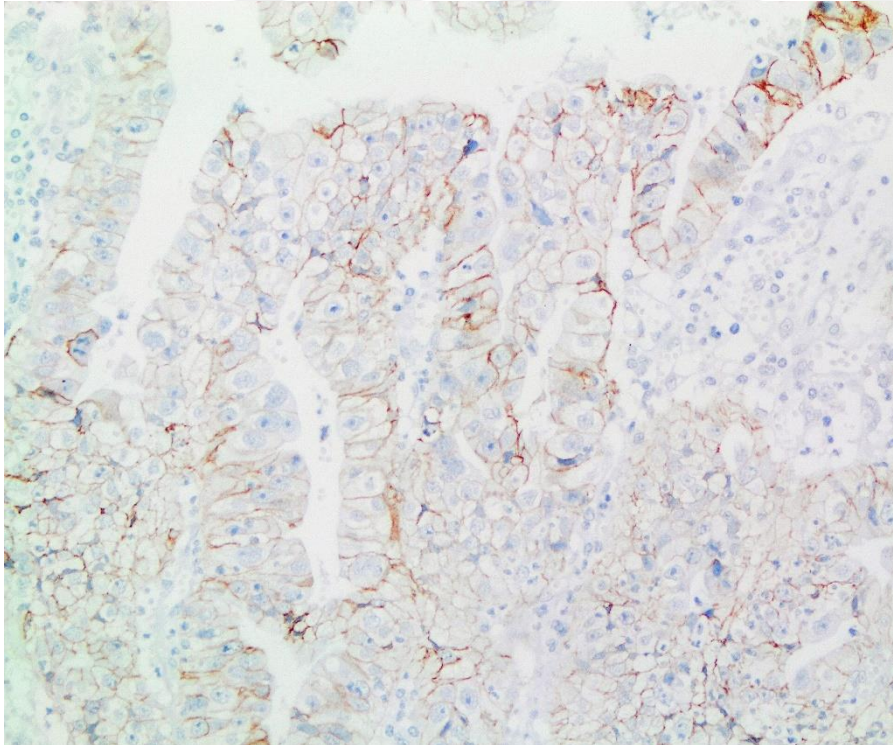
E-Kaderin ile membranöz immünekspresyon, bazı tümörlerdeki heterojen boyanma paterni göz önüne alınarak, Xia ve ekibinin çalışmasına benzer şekilde iki aşamalı metod kullanılarak değerlendirilmiştir [230].

İlk aşamada, membranöz boyanma kaybı gösteren hücrelerin oranı değerlendirilmiştir. Yüzde 90'dan fazla oranda komplet membranöz boyanma kaybı "*aberran*" ekspresyon, $\geq 10\%$ komplet membranöz boyanma kaybı "*heterojen*" ekspresyon ve $< 10\%$ komplet membranöz kaybı "*intakt*" ekspresyon olarak kabul edilmiştir.

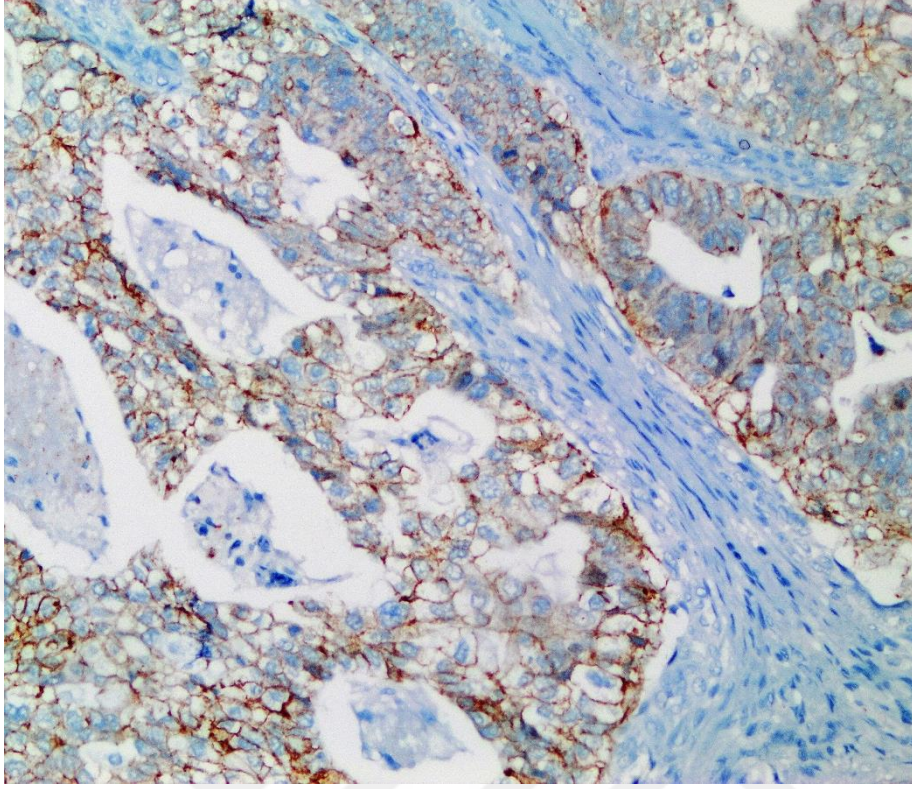
İkinci aşamada, heterojen ekspresyon gösteren tümörlerde, HER2 protein ekspresyon artışını değerlendirmek amacıyla kullanılan sisteme benzer şekilde membranöz boyanma şiddeti (heterojen boyanma; 1+, 2+ veya 3+) skorlanmıştır. Boyanma şiddeti heterojen olan G-ACa'da, yaygın görülen boyanma şiddetine göre skor verilmiştir.



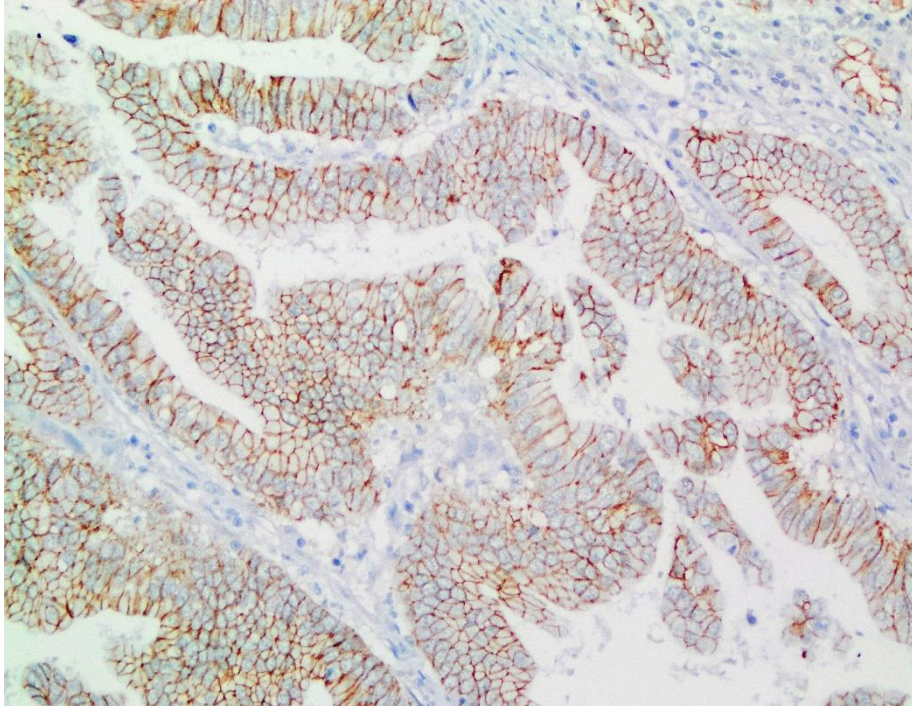
Resim 4. E-kaderin heterojen +1 ekspresyon (İHKx20)



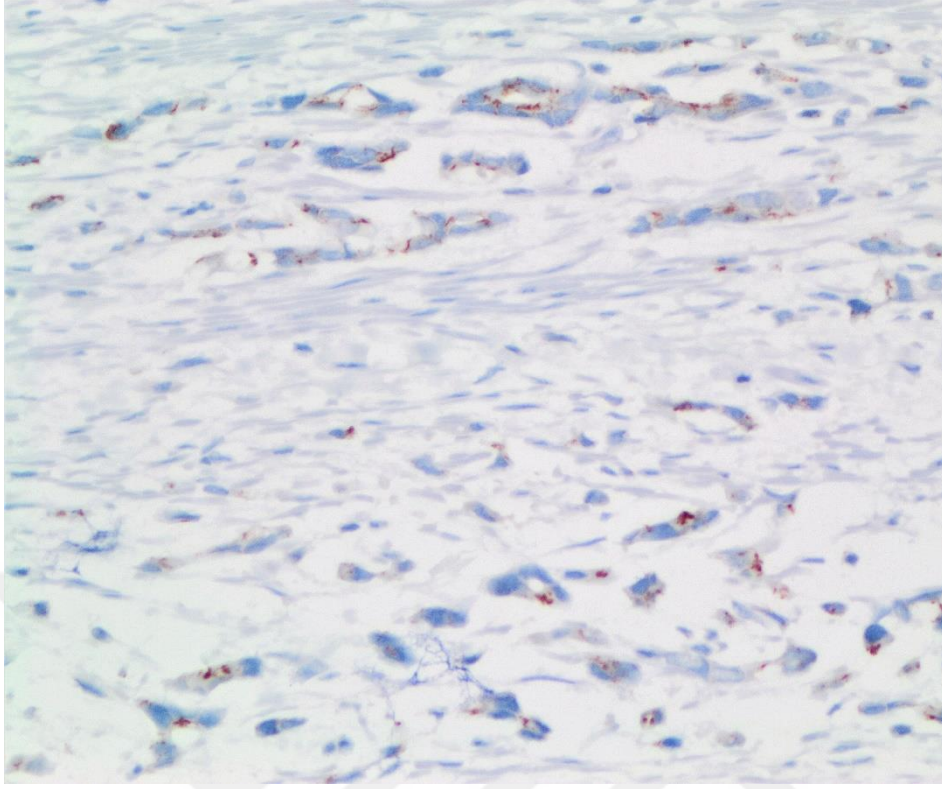
Resim 5. E-kaderin heterojen +2 ekspresyon (İHKx20)



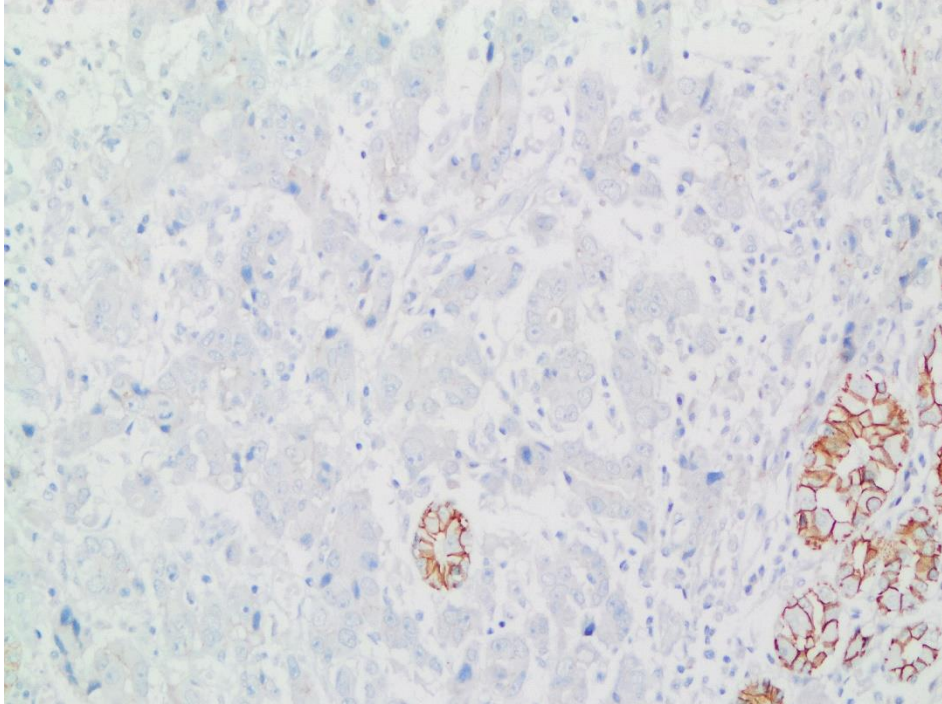
Resim 6. E-kaderin heterojen +3 ekspresyon (IHKx20)



Resim 7. E-kaderin intakt ekspresyon (IHKx20)



Resim 8. E-kaderin aberran (sitoplazmik, granüler) ekspresyon (İHKx20)



Resim 9. E-kaderin aberran (komplet kayıp) ekspresyon (İHKx20)

12.7.4. Pan-TRK immünohistokimya ve NTRK1/2/3 FISH değerlendirmesi

NTRK3 füzyonunun belirlenmesinde kullanılan İHK yönteminin duyarlılık oranı (%79,4), NTRK1 ve NTRK2 füzyonları (kombine %96,9) ile karşılaştırıldığı zaman, daha düşük düzeyde olduğu rapor edilmiştir. İHK ile saptanan pan-TRK ekspresyonunun patern, yoğunluk ve hücre içi lokalizasyonu (membranöz, sitoplazmik, perinükleer, nükleer) açısından farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir [192]. Bazı çalışmalarda, NTRK3 füzyonu gösteren olguların bir bölümünde, fokal (<%5) ve zayıf şiddette pan-TRK ekspresyonu olabileceği bildirilmiştir [188]. Bu nedenle çalışmamızda, literatürde yer alan çalışmalar göz önüne alınarak, herhangi bir yoğunluktaki **en az %1 oranındaki** tümör hücresinde pan-TRK ekspresyonu görülen olgular, pozitif olarak değerlendirilmiştir [188, 196].

NTRK1/2/3 FISH için skorlamanın en az 50 üst üste binmeyen tümör hücre çekirdeğinde floresan sinyaller sayılarak yapılması önerilmektedir [231]. Yüzde 10-15'den fazla tümör hücresinde, iki hibridizasyon probu sinyali büyüklüğünden daha uzak mesafeyle ayrılan, kırmızı ve yeşil renkli ‘*split-apart*’ sinyaller içeren olgular, füzyon pozitif olarak kabul edilmiştir [231]. Çalışmamızda, literatürdeki yaklaşımı göz önüne alarak, değerlendirme kriterine uyan en az 50 tümör hücresindeki “*split-apart*” sinyal oranı belirlenmiştir.

12.7.5. HER2 immünohistokimya ve İSH değerlendirmesi

İHK analizi, rutin pratikte, HER2 ekspresyon artışını saptamak için genellikle ilk aşamada kullanılan metottur. İHK ile öncelikle, tümör hücrelerindeki membranöz protein ekspresyonu değerlendirilir ve İHK 2+ ve 3+ G-ACa'larda İSH uygulanarak HER2 amplifikasyonu belirlenir.

Çalışmamızda, olgulara ait rutinde uygulanmış HER2 İHK ve İSH sonuçlarına olguların hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı patoloji raporlarından ulaşılmıştır. Rutin pratiğimizde, ASCO/CAP kılavuzunda yer alan ToGA kriterlerine göre, boyanma şiddeti ve immunekspresyon gösteren tümör hücre oranı göz önüne alınarak HER2 ekspresyonu skorlanır [232]. Neoplastik hücrelerde immunekspresyon yok veya %10'dan az neoplastik hücrede membranöz immunekspresyon izleniyorsa **skor 0**;

≥ 10 neoplastik hücrede çok zayıf/zorlukla seçilebilen parsiyel membranöz immünekspresyon izleniyorsa **skor 1** olarak yorumlanmış ve negatif olarak kabul edilir. ≥ 10 neoplastik hücrede komplet, bazolateral veya lateral membranöz immünekspresyon zayıf/orta şiddette ise **skor 2**; güçlü ise **skor 3** olarak değerlendirilir. Skor 2 ve skor 3 olgular, İSH (FISH/SISH) yöntemiyle HER2 amplifikasyonu açısından yorumlanır. HER2 amplifikasyonu için, dual prob İSH yöntemleriyle (FISH / SISH), en az 20 hücredeki, HER2 kopya sayısı ile kromozom 17 kopya sayısı arasındaki oran göz önüne alınır. Tek kromozomlu hücreler monozomik olarak kabul edilir ve her iki prob için İSH sinyali ≥ 1 olan hücreler değerlendirmeye alınır [233]. HER2/CEP17 oranı, ≥ 2 olan olgular pozitif, < 2 olan olgular negatif kabul edilir [232]. HER2/CEP17 oranı 2'ye yakın olan “borderline” olgularda ek 20 hücre değerlendirilir [232].

12.7.6. EBER CISH değerlendirmesi

Latent EBV enfeksiyonunu tespit etmek için altın standart olarak kabul edilen yöntem, EBER (EBV-encoded small RNA)'i hedef alan İSH analizidir. EBER kromojenik in situ hibridizasyon yöntemi ile güçlü nükleer boyanma gösteren olgular pozitif olarak kabul edilmiştir.

TMA kesitlerde, histolojik klasifikasyonda mikst grupta yer alan tümörlerin bir kısmında, neoplastik alanlarda yamasal dağılım gösteren güçlü nükleer boyanma izlenmiştir. Heterojen boyanma paterni gösteren bu olgular, farklı bloklarda tam doku kesitleriyle tekrar değerlendirilmiştir. Heterojen boyanma paternini tam doku kesitlerinde koruyan 3 olgu, literatürdeki benzer özelliklere sahip olgular göz önüne alınarak, pozitif gruba dahil edilmiştir [234].

12.8. Moleküler Klasifikasyon

Çalışmamızda, TCGA ve ACRG tarafından yayınlanan G-ACa'ların moleküler klasifikasyonu göz önüne alınarak, Setia ve ekibinin çalışmasına benzer şekilde, İHK ve İSH analizi kullanılarak 240 olgu sırasıyla 5 gruba ayrılmıştır; 1) EBV pozitif grup, 2) dMMR grup, 3) E-kaderin *aberran* grup, 4) p53-*aberran* grup, 5) p53-normal grup.

12.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) (Kaysville, Utah, USA) programı uygulanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) kullanılmıştır. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk testi ve grafiksel değerlendirmeler ile sınanmıştır. Normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri sayıdaki grubun karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test Bonferroni Dunn test kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırılmasında, Pearson Ki-Kare testi ve Fisher-Freeman-Halton Exact testi; sağ kalım değerlendirmesinde, Kaplan Meier sağ kalım analizi ve Log Rank testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde anlamlılık, en az $p < 0,05$ düzeyidir.

Nüksüz sağ kalım (*recurrence-free survival*) analizi için, operasyon tarihi ile ilk nüksün gerçekleştiği tarih; nüks yoksa operasyon tarihi ile son takip tarihi arasındaki süre hesaplanmıştır. Genel sağ kalım (*overall survival*) analizi için, operasyon tarihi ile ölüm tarihi arasındaki süre hesaplanmıştır.

13. BULGULAR

13.1. Demografik Veriler, Klinik İzlem Bulguları ve Sağ Kalım Analizleri

2013-2018 yılları arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi (MÜTF- Pendik EAH) Patoloji Kliniği'nde tanı alan, %29,6'sı (n=71) kadın, %70,4'ü (n=169) erkek, toplam 240 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Olguların tanı anındaki yaş ortalaması $64,44 \pm 11,91$ ' dir (yaş dağılımı: 21-90; ortanca değer: 65).

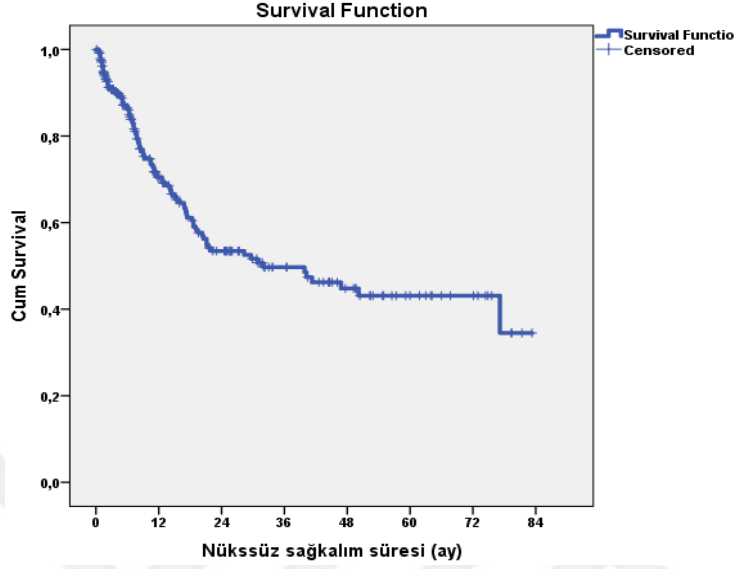
Olgulara ait spesmenlerin incelenme yıllarına göre dağılımı; 49'u (%20,4) 2013, 18'i (%7,5) 2014, 45'i (%18,7) 2015, 62'si (%25,8) 2016, 38'i (%15,8) 2017, 28'i (%11,6) 2018 şeklindedir.

Çalışma kapsamı, MÜTF- Pendik EAH Cerrahi Kliniği'nde opere olan ve Onkoloji Kliniği'nde izlenen olgularla sınırlandırılmıştır. Neo-adjuvan tedavi öyküsü 25 (%10,4) olguda vardır. Tanı anında uzak metastaz, toplam 9 olguda (%3,7) saptanmıştır. Olguların 5'inde karaciğer, 2'sinde omentum, 1'inde bölgesel-dışı lenf nodu (peripankreatik superior lenf nodu) ve 1'inde çoklu organ metastazı bildirilmiştir.

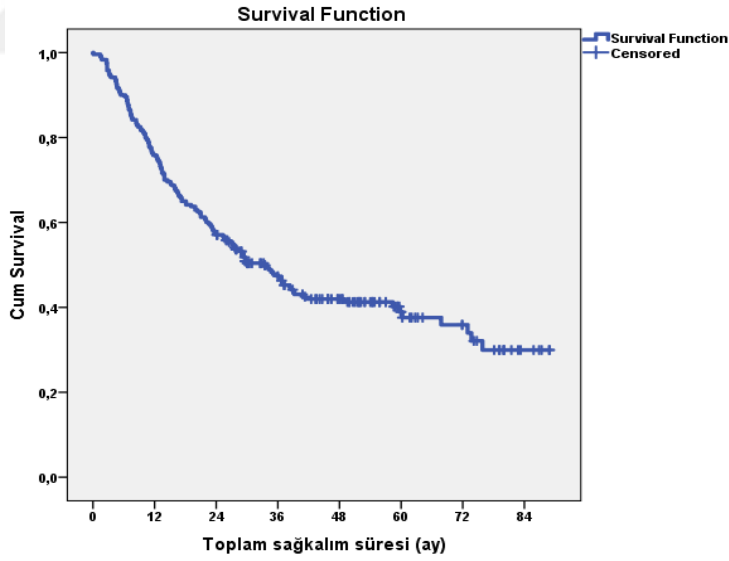
Olguların izlem süre ortalaması $19,97 \pm 20,83$ aydır (süre dağılımı: 0,1-83,3 ay; ortanca değer: 11,5 ay). İzlem süresi, 78 (%32,5) olguda 6 aydan; 11 (%4,58) olguda 1 aydan azdır. İzlem süresi 1 aydan az olan olguların ölüm nedenlerinin cerrahi komplikasyona bağlı olup olmadığı klinik takip dosyalarına işlenmemiştir. İzlem sürecinde, 92 (%38,3) olguda nüks (lokal ve/veya uzak organ), 142 (%59,2) olguda ölüm gelişmiştir. Nüks, cerrahi sonrası ortalama $12,56 \pm 12,73$ ayda (süre dağılımı: 0,48-77,16 ay; ortanca değer: 8,52 ay) izlenmiştir. En son nüks 77,16 ayda görülmüştür; bu aydaki kümülatif nüksüz sağ kalım oranı %34,5, standart hatası %8,5'dir (Şekil 10). Nüks gelişen 77 (%83,6) olguda, ilerleyen dönemde ölüm gerçekleşmiştir. İzlem 142 olguda, cerrahiden ortalama $19 \pm 15,53$ ay (süre dağılımı: 0,12-75,84 ay; ortanca değer: 13,92 ay) sonra ölüm ile sonlanmıştır. En son ölüm 75,84 ayda görülmüştür; bu aydaki kümülatif sağ kalım oranı %30, standart hatası %4,5'dir (Şekil 11).

Olgularda; ortalama toplam sağ kalım süresi $32,16 \pm 22,92$ ay (süre dağılımı: 0,1-88,9 ay; ortanca değer: 27,9 ay), ortalama nüksüz sağ kalım süresi $19,31 \pm 20,67$

aydır (süre dağılımı: 0,1-83,3 ay; ortanca değer: 11 ay). Tanı anındaki yaş ortalaması, nüks olan olgularda $63,24 \pm 11,66$ (yaş dağılımı: 34-85; ortanca değer: 63,5); ölen olgularda $66,42 \pm 11,51$ 'dir (yaş dağılımı: 34-90; ortanca değer: 67,5).



Şekil 10. Nüksüz sağ kalım grafiği



Şekil 11. Genel sağ kalım grafiği

13.2. Histomorfolojik Bulgular

Olgulara ait mide rezeksiyon spesmenlerinin, tümör açısından makroskopik ve mikroskopik değerlendirme sonuçları Tablo- 8 ve Şekil- 12’de; tümör çevre mukoza değişiklikleri Tablo- 9 ve Şekil- 13’de özetlenmiştir.

* **Tümör boyutu:** Ortalama $5,99 \pm 2,76$ cm (boyut dağılımı: 1-18 cm; ortanca değer: 5,5 cm)

- ° <2 cm: 7 (%2,92)
- ° 2-5 cm: 103 (%42,92)
- ° >5 cm: 130 (%54,16)

* **Makroskopik tip**

- ° Tip 1: 17 (%7,09)
- ° Tip 2: 40 (%16,66)
- ° Tip 3: 154 (%64,16)
- ° Tip 4: 29 (%12,09)

* **Yerleşim yeri**

- ° Kardia: 50 (%20,8)
- ° Korpus/Fundus: 83 (%34,6)
- ° Antrum: 107 (%44,6)

* **Lauren histolojik tip**

- ° Difüz: 31 (%12,9)
- ° İntestinal: 116 (%48,3)
- ° Mikst: 84 (%35)

° **Tanımsız** (*medüller karsinom 8 olgu ve yolk salk tümör benzeri karsinom 1 olgu*): 9 (%3,8)

* **DSÖ 2019 histolojik tip**

- ° Tubuler/Papiller: 100 (%41,67)
- ° Müsinöz: 16 (%6,67)
- ° Zayıf koheziv: 31 (%12,91)
- ° Mikst: 84 (%35)

° **Diğer nadir histolojik alt tipler** (*medüller karsinom 8 olgu ve yolk salk tümör benzeri karsinom 1 olgu*): 9 (%3,75)

*** Farklılaşma Derecesi**

° **Düşük:** 79 (%32,92)

° **Yüksek:** 153 (%63,76)

° **Derecelendirilemeyen** (*medüller karsinom*): 8 (%3,32)

***Tümör İnvazyon Seviyesi (pT)**

° **T1:** 13 (%5,42)

° **T2:** 18 (%7,5)

° **T3:** 88 (36,67)

° **T4:** 121 (%50,41)

*** Lenf nodu metastazı (pN)**

° **N0:** 50 (%20,83)

° **N1:** 38 (%15,83)

° **N2:** 62 (%25,83)

° **N3:** 90 (%37,51)

*** Lenfatik invazyon**

° **Yok:** 29 (%12,1)

° **Var:** 211 (%87,9)

*** Anjiointvazyon**

° **Yok:** 102 (%42,5)

° **Var:** 138 (%57,5)

*** Perinöral invazyon**

° **Yok:** 63 (%26,2)

° **Var:** 177 (%73,8)

*** Desmoplastik yanıt**

° **Yok:** 59 (%24,6)

° **Var:** 181 (%75,4)

*** Lenfositik yanıt**

° **Yok:** 83 (%34,6)

° **Var:** 157 (%65,4)

*** Metastatik lenf nodu sayısı:** Ortalama $6,77 \pm 8,17$ (sayı dağılımı: 0-55; ortanca değer: 4)

* **Metastatik en büyük lenf nodu çapı:** Ortalama $1,29 \pm 0,72$ cm (çap dağılımı: 0,1-5; ortanca değer: 1,2 cm)

* **Metastatik lenf nodunda perinodal invazyon (n=190)**

° **Yok:** 48 (%25,3)

° **Var:** 142 (%74,7)

* **Cerrahi sınır:**

° **Tümör negatif:** 168 (%70)

° **Tümör pozitif:** 72 (%30)

* **H. Pylori**

° **Yok:** 141 (%58,7)

° **Var:** 99 (%41,3)

* **Atrofi**

° **Yok:** 90 (%37,5)

° **Var:** 150 (%62,5)

* **İntestinal Metaplazi**

° **Yok:** 55 (%22,9)

° **Var:** 185 (%77,1)

* **SPEM (n=173)**

° **Yok:** 150 (%86,7)

° **Var:** 23 (%13,3)

* **Paneth hücre metaplazisi (n=173)**

° **Yok:** 90 (%52)

° **Var:** 83 (%48)

* **Displazi**

° **Yok:** 167 (%69,6)

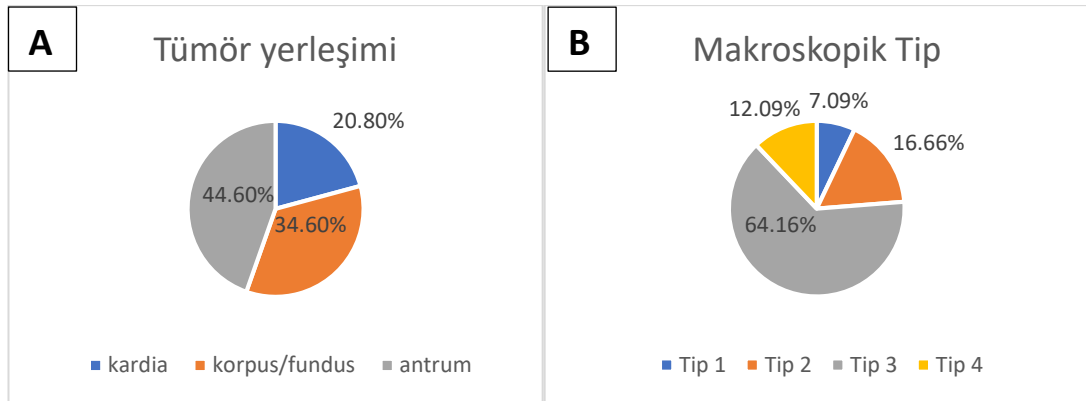
° **Var:** 73 (%30,4)

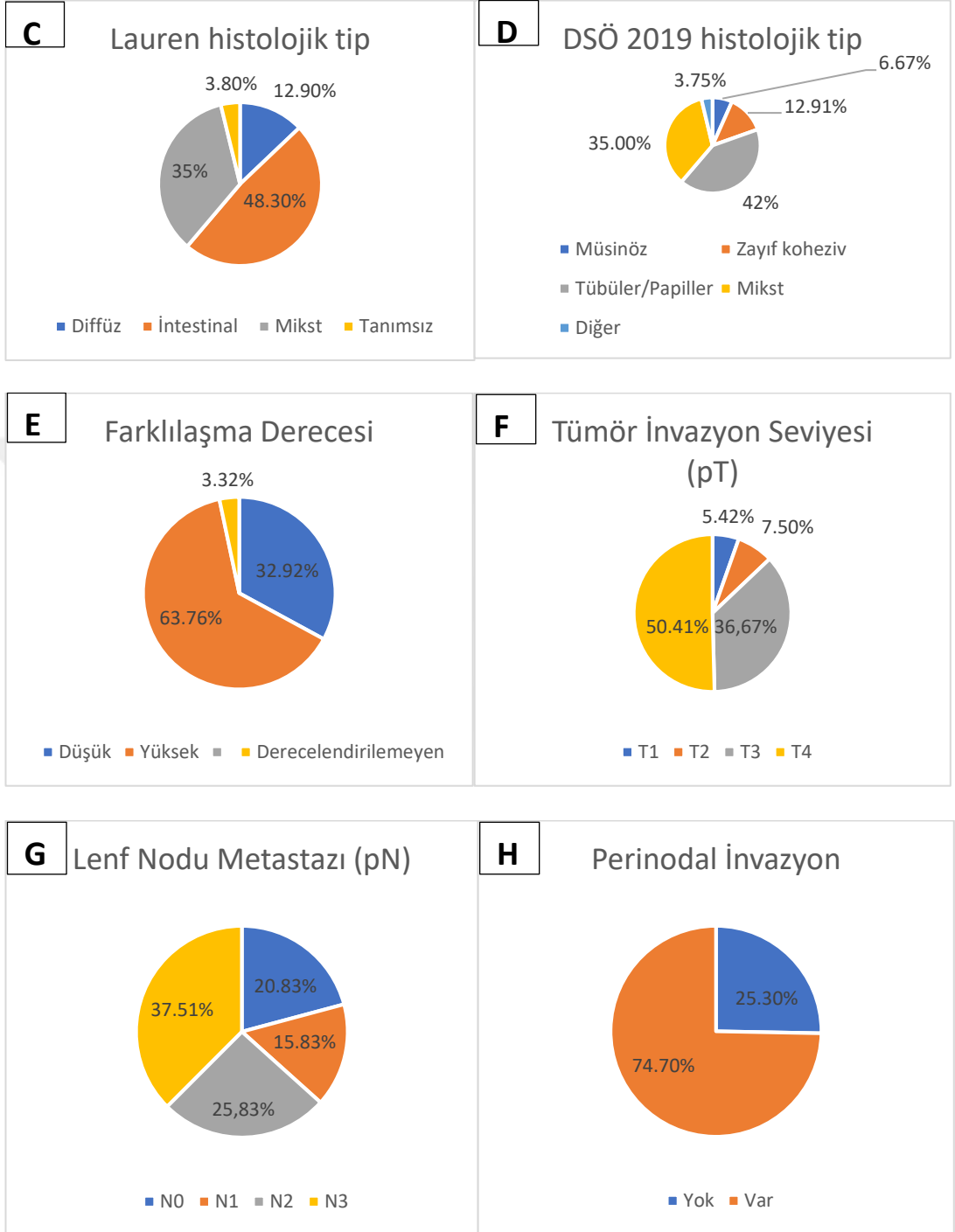
Tablo 8. Tümörde makroskopik ve mikroskopik değerlendirme sonuçları

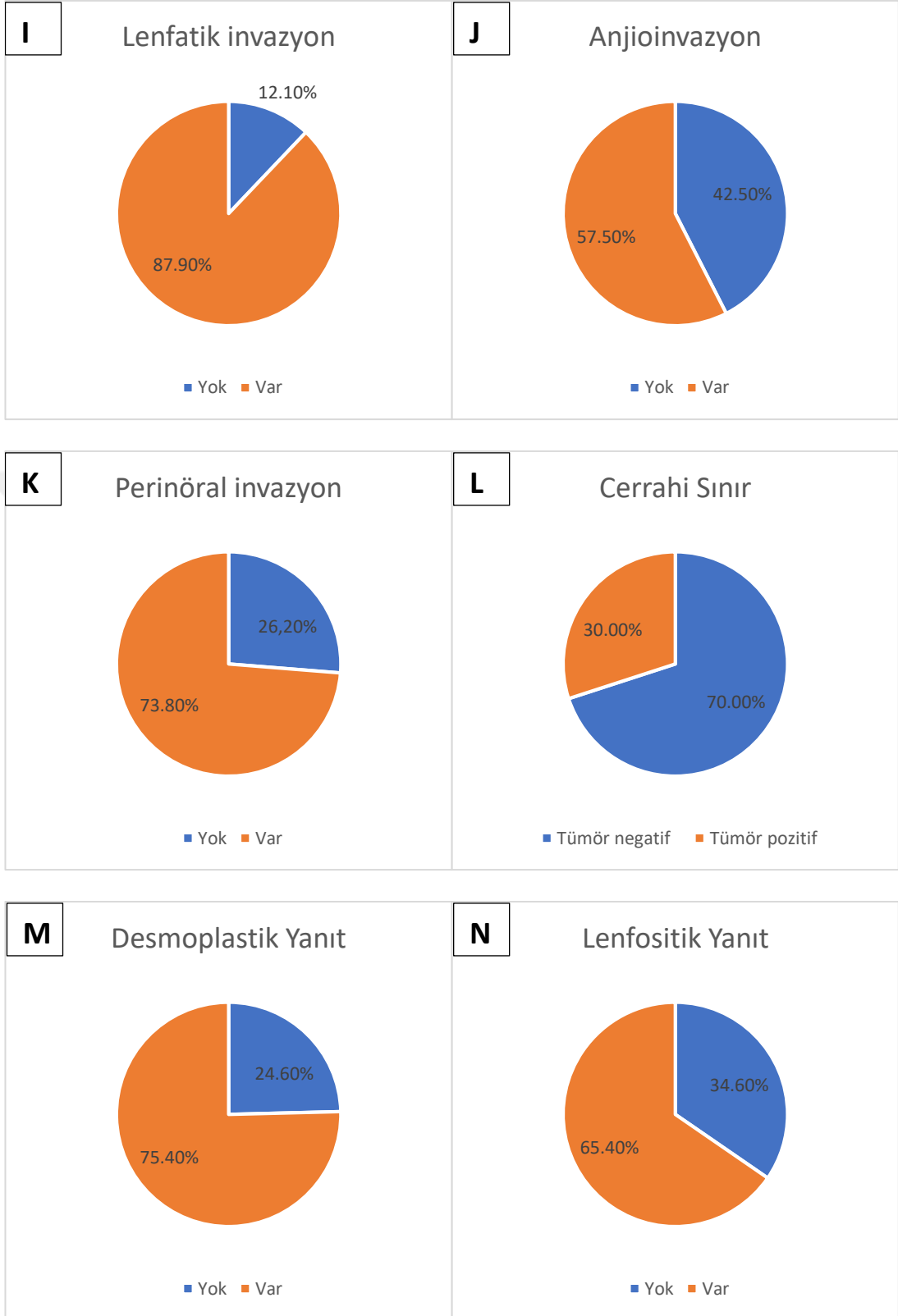
		n	%
Tümör boyutu	<2 cm	7	2,92
	2-5 cm	103	42,92
	>5 cm	130	54,16
Makroskopik tip	Tip 1	17	7,09
	Tip 2	40	16,67
	Tip 3	154	64,16
	Tip 4	29	12,08
Yerleşim yeri	Antrum	107	44,6
	Kardia	50	20,8
	Korpus/ fundus	83	34,6
Lauren histolojik tip	Difüz	31	12,9
	İntestinal	116	48,3
	Mikst	84	35,0
	Tanımsız	9	3,8
DSÖ-2019 histolojik tip	Müsinöz	16	6,67
	Zayıf koheziv	31	12,91
	Tubuler/papiller	100	41,67
	Mikst	84	35
	Diğer nadir histolojik tipler	9	3,75
Farklılaşma Derecesi	Düşük	79	32,92
	Yüksek	153	63,76
	Derecelendirilemeyen	8	3,32
pT evresi	T1	13	5,42
	T2	18	7,5
	T3	88	36,67
	T4	121	50,41
pN evresi	Evre 0	50	20,83
	Evre 1	38	15,83
	Evre 2	62	25,83
	Evre 3	90	37,51
Lenfatik invazyon	Negatif	29	12,1
	Pozitif	211	87,9
Anjioinvazyon	Negatif	102	42,5
	Pozitif	138	57,5
Perinöral invazyon	Negatif	63	26,2
	Pozitif	177	73,8
Desmoplastik yanıt	Negatif	59	24,6
	Pozitif	181	75,4
Lenfositik yanıt	Negatif	83	34,6
	Pozitif	157	65,4
Metastatik lenf nodu sayısı	Min-Mak (Medyan)	0-55 (4)	
	Ort±Ss	6,77±8,17	
Metastatik lenf nodu en büyük çap	Min-Mak (Medyan)	0,1-5 (1,2)	
	Ort±Ss	1,29±0,72	
Metastatik lenf nodu-perinodal invazyon	Negatif	48	25,3
	Pozitif	142	74,7
Cerrahi sınır	Negatif	168	70,0
	Pozitif	72	30,0

Tablo 9. Tümör çevre mukoza değişiklikleri

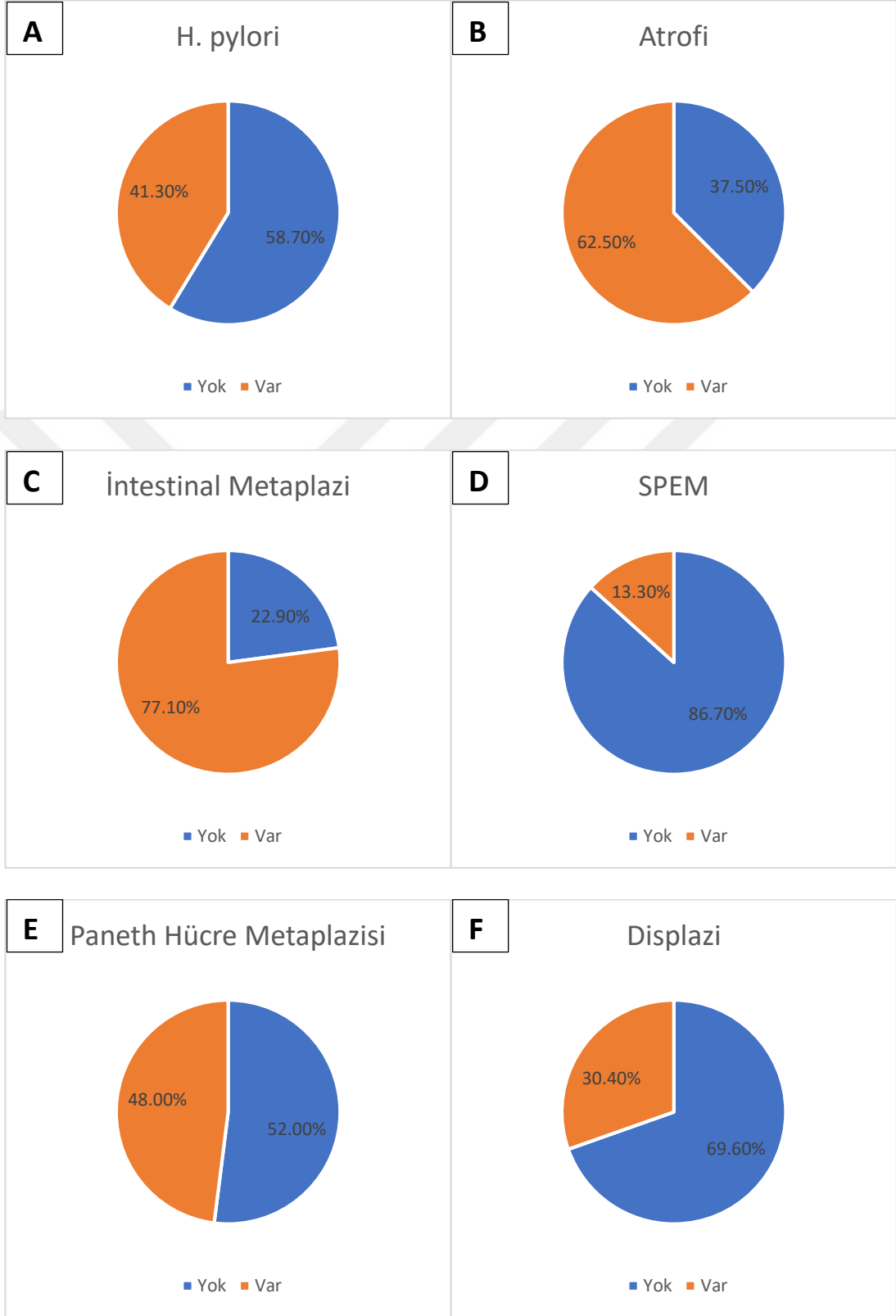
		n	%
H. pylori	Negatif	141	58,7
	Pozitif	99	41,3
Atrofi	Negatif	90	37,5
	Pozitif	150	62,5
İntestinal metaplazi	Negatif	55	22,9
	Pozitif	185	77,1
SPEM (n=173)	Negatif	150	86,7
	Pozitif	23	13,3
Paneth hücre metaplazisi (n=173)	Negatif	90	52,0
	Pozitif	83	48,0
Displazi	Negatif	167	69,6
	Pozitif	73	30,4







Şekil 12. Makroskopik ve mikroskopik değerlendirme sonuçları



Şekil 13. Tümör çevre mukoza değişiklikler

13.3. İmmünohistokimya ve İn-situ hibridizasyon Analiz Bulguları

Tüm olgularda tümörü en iyi temsil eden alanlarda değerlendirilen İHK ve İSH analiz bulguları tablo 10, tablo 11, tablo 12 ve şekil-14’de özetlenmiştir.

Tablo 10. İHK ve İSH analiz bulguları

	Özellik	n	%
P53	Ekspresyon kaybı (<%5)	43	17,9
	≥%70 ekspresyon	111	46,7
	Normal	86	35,4
E- KADERİN	Heterojen +1	32	13,3
	Heterojen +2	40	16,7
	Heterojen +3	79	32,9
	İntakt	55	22,9
	Aberran (>%90 ekspresyon kaybı)	34	14,2
MMR protein	İntakt	211	87,9
	MLH1 (-), PMS2 (-)	25	10,40
	MLH1 (-), PMS2 (-), MSH2 (-)	2	0,9
	MSH2 (-), MSH6 (-)	1	0,4
	PMS2 (-)	1	0,4
EBER-CISH	EBV (-)	231	96,25
	EBV (+)	9	3,75
HER2- İHK	Skor 0	131	54,58
	Skor 1	10	4,17
	Skor 2	48	20
	Skor 3	51	21,25
HER2- FISH/SISH	Amplifikasyon negatif	36	36,36
	Amplifikasyon pozitif	35	35,36
	Uygulanmayan*	28	28,28
Pan-TRK – İHK	Negatif	237	98,75
	≥ %1 ekspresyon	3	1,25

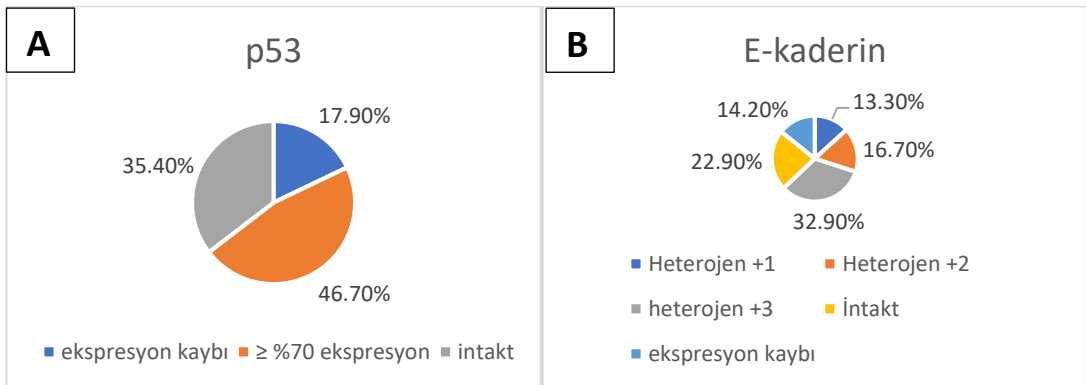
*: HER2 İHK skor 2+/3+ olan, ancak FISH/SISH uygulanmayan olgular.

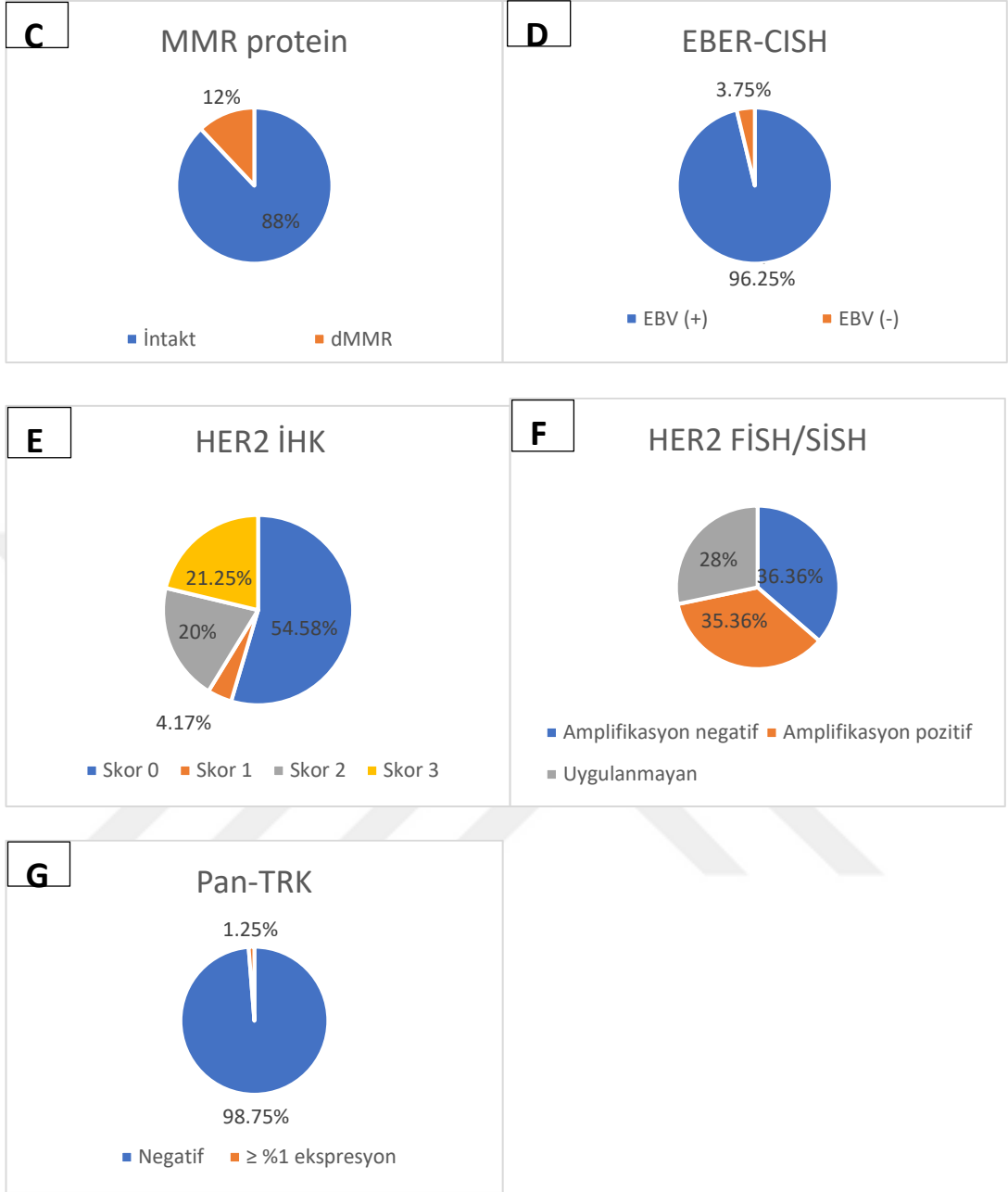
Tablo 11. Pan-TRK pozitif üç tümörün NTRK1/2/3 FISH analiz bulguları

	NTRK1 split	NTRK 2 split	NTRK 3 split
Olgu 1	%2,9	%1	%4
Olgu 2	%4,2	%0	%1,4
Olgu 3	%2,4	%0,7	%3,6

Tablo 12. Pan-TRK negatif beş tümörün NTRK1/2/3 FISH analiz bulguları

	NTRK1 split	NTRK 2 split	NTRK 3 split
Olgu 1	%1,5	%0	%0,9
Olgu 2	%0,6	%0,8	%0
Olgu 3	%6	%3	%3,7
Olgu 4	%14	%2	%1
Olgu 5	%10	%7	%9

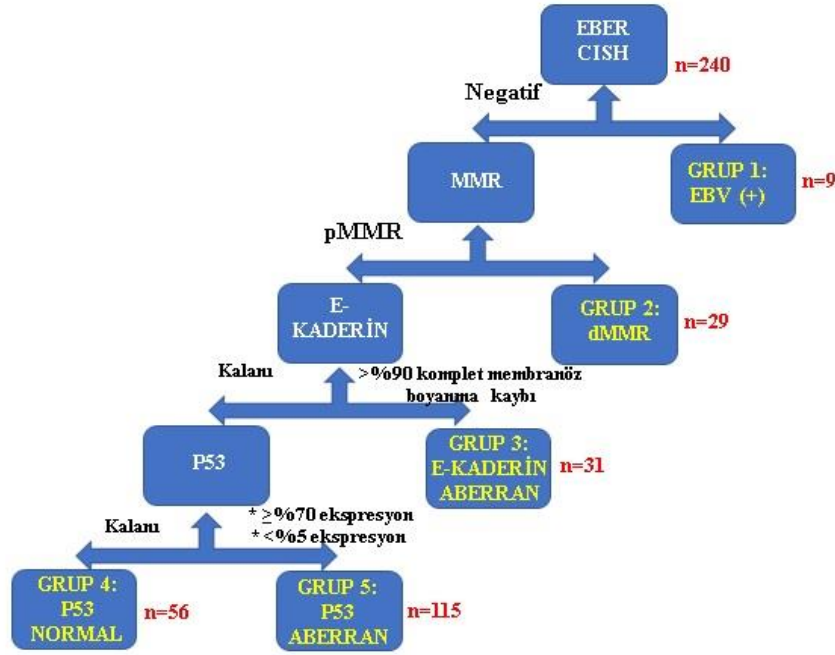




Şekil 14. İHK ve İSH analiz bulguları

13.4. İHK ve İSH Sonuçları Doğrultusunda Moleküler Sınıflama

Çalışmamızda, İHK ve İSH analiz sonuçları göz önüne alınarak, 240 olgu TCGA'nın önerdiği G-ACa moleküler sınıflamasına göre beş gruba ayrılmıştır (Şekil 15). Bu doğrultuda; olguların %3,7'si (n=9) **EBV (+) grup**, %12,1'i (n=29) **dMMR grup**, %12,9'u (n=31) **E-kaderin-aberran grup**, %47,9'u (n=115; 80 olguda $\geq$ %70 ekspresyon ve 35 olguda ekspresyon kaybı) **P53-aberran grup** ve %23,4'ü (n=56) **P53-normal grup** olarak sınıflanmıştır.



Şekil 15. Olguların gruplara dağılım şeması

Moleküler dağılım şemasında, 31 olgu E-kaderin-aberran gruptadır. E-kaderin İHK ekspresyonu negatif olan diğer 3 olgudan, 1'i EBV (+), 2'si dMMR grup içerisinde yer almaktadır.

Moleküler dağılım şemasında 56 olgu, p53-normal gruptadır. p53 İHK'sı olağan olarak değerlendirilen diğer 30 olgunun, 4'ü EBV (+) grup, 14'ü dMMR grup, 12'si E-kaderin- aberran grup içerisinde yer almaktadır.

Moleküler dağılım şemasında, 115 olgu p53- aberran gruptadır. p53 İHK'sı anormal olarak değerlendirilen diğer 39 olgunun, 4'ü EBV (+), 14'ü dMMR, 21'i E-kaderin- aberran grup içerisinde yer almaktadır.

13.4.1. Gruplara göre demografik verilerin karşılaştırılması

Gruplara göre demografik verilerin karşılaştırılması tablo 13’de özetlenmiştir.

İHK ve İSH ile belirlenen moleküler gruplara göre, olgu yaşları arasında istatistiksel açıdan **anlamlı farklılık saptanmıştır** ($p=0,006$). dMMR grupta yer alan olgular, E-kaderin-*aberran*, P53-*aberran* ve P53-normal gruplara oranla daha ileri yaştadır (sırasıyla $p=0,001$; $p=0,046$; $p=0,018$). P53-*aberran* grupta, E-kaderin-*aberran* gruba kıyasla, olguların yaşları daha yüksektir ($p<0,05$). Gruplar arasında diğer karşılaştırmalarda, istatistiksel fark yoktur ($p>0,05$).

Gruplar arasında, cinsiyet dağılımı açısından, istatistiksel anlamlı fark saptanmamakla birlikte ($p>0,05$), EBV (+) grupta yer alan olguların tümünün erkek cinsiyette olduğu dikkati çekmiştir.

Tablo 13. Gruplara göre demografik verilerin değerlendirilmesi

		EBV (+) (n=9)	dMMR (n=29)	E-kaderin Aberran (n=31)	P53 Aberran (n=115)	P53 Normal (n=56)	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Yaş (yıl)	Min-Mak (Medyan)	52-81 (67)	34-87 (71)	29-76 (59)	21-90 (65)	33-85 (63,5)	0,006
	Ort±Ss	67,56±10,74	69,38±11,8	59,06±10,66	64,91±11,84	63,38±11,97	
Cinsiyet	Kadın	0 (0)	13 (44,8)	8 (25,8)	32 (27,8)	18 (32,1)	0,108
	Erkek	9 (100)	16 (55,2)	23 (74,2)	83 (72,2)	38 (67,9)	

13.4.2. Gruplara göre histomorfolojik özelliklerin dağılımı

Gruplar arasında, histomorfolojik özelliklerin karşılaştırılması tablo 14’te özetlenmiştir. Moleküler gruplara göre tümör çevre mukoza özelliklerinin değerlendirilmesi tablo 15’te özetlenmiştir.

Tümör boyutu ve makroskopik özellik açısından gruplar arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Ağırlıklı olarak; P53-normal, dMMR ve E-kaderin-*aberran* grupta yer alan tümörler antrum; EBV (+) ve p53-*aberran* grupta yer alan tümörler korpus/fundus yerleşimlidir. Gruplar arasında, tümör yerleşim yerleri açısından istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,05$). P53-normal, dMMR ve E-kaderin-*aberran* grupların antrumda saptanma oranı, P53-*aberran* gruptan daha yüksektir ($p<0,05$). P53-normal grupta yer alan tümörlerin yerleşim yerlerinin kardias olma oranı, dMMR grubu olgulardan daha yüksektir ($p<0,05$). P53-*aberran* grup olguların yerleşim yerlerinin korpus/fundus olma oranı, P53-normal grup olgulardan daha yüksektir ($p<0,05$).

Gruplar arasında, Lauren histolojik sınıflaması açısından istatistiksel **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p=0,001$). E-kaderin-*aberran* grup ağırlıklı olarak difüz tip (%41,9) veya mikst tip (%35,5) morfolojidedir. dMMR grup ve p53-*aberran* grup tümörler genellikle intestinal, P53-normal ve EBV (+) gruplarda yer alan tümörler mikst tip morfolojidedir.

DSÖ-2019'a göre histolojik subtiplerin dağılımı, gruplar arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık göstermiştir** ($p=0,001$). Ağırlıklı olarak; E-kaderin-*aberran* grup, zayıf koheziv veya mikst tip; dMMR grup ve p53-*aberran* grup tümörler tubuler ve papiller, P53-normal ve EBV (+) gruplarda yer alan tümörler mikst tip morfolojidedir.

Tümör farklılaşma derecesi açısından, gruplar arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p=0,001$). dMMR, P53-*aberran* ve P53-normal gruplarda olguların düşük farklılaşma derecesinde olma oranı, EBV (+) ve E-kaderin-*aberran* grup olgulara oranla daha yüksektir. E-kaderin-*aberran* grup tümörlerin %90,3'ü ve EBV (+) grup tümörlerin %77,8'i kötü farklılaşma göstermektedir. dMMR grupta yer alan tümörlerin kötü farklılaşma gösterme oranları, P53-*aberran* ve P53-normal gruplara oranla daha düşüktür.

Gruplar arasında, pT ve pN evreleme kategorilerinin dağılımı açısından, istatistiksel anlamli farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). dMMR grupta, pN0 (%41,4) ve pN1 (%20,7) olgular diğer gruplara oranla yüksektir, ancak bu değerler gruplar arası istatistiksel farklılık olarak yansımamıştır ($p>0,05$).

Perinöral invazyon görülme oranları açısından, gruplar arasında istatistiksel **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p=0,001$). dMMR grubu olguların, diğer grupta yer alan olgulara göre, daha düşüktür ($p<0,05$). P53-normal grupta, P53-*aberran* gruba oranla, perinöral invazyon pozitiflik oranı yüksektir ($p<0,05$).

Peritümöral lenfositik yanıt görülme oranları açısından, gruplar arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p=0,001$). dMMR ve P53-*aberran* grupta lenfositik yanıt pozitiflik oranı, E-kaderin-*aberran* ve P53-normal gruptan daha yüksektir ($p<0,05$). EBV (+) grupta, lenfositik yanıt oranı yüksek olarak saptanmış olmakla birlikte, ikili karşılaştırmalarda olgu sayısı azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlılık gösterilememiştir ($p>0,05$).

Gruplar arasında; lenfatik invazyon, anjioinvazyon, desmoplastik yanıt, metastatik lenf nodu çapı, perinodal invazyon, cerrahi sınır pozitifliği açısından fark yoktur ($p>0,05$).

Tümör çevre mukoza değişiklikleri (H. pylori, atrofi, intestinal metaplazi, SPEM, paneth hücre metaplazisi, displazi) açısından gruplar arasında fark izlenmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 14. Gruplara göre histomorfolojik özelliklerin değerlendirilmesi

		EBV (+ (n=9)		dMMR (n=29)	E-kaderin Aberran (n=31)	P53 Aberran (n=115)	P53 Normal (n=56)	P
		n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Tümör boyutu	Min-Mak (Medyan)	4-13,3 (6,5)		2,2-17 (6,5)	1,3-14 (5,5)	1,8-14 (5)	1-18 (6)	0,409
	Ort±Ss	7,12±3,12		6,41±3,00	5,59±3,13	5,85±2,44	6,09±2,95	
Makroskopik Tip	Tip 1	2 (22,2)		5 (17,2)	0 (0)	7 (6,1)	3 (5,4)	0,080
	Tip 2	1 (11,1)		5 (17,2)	3 (9,7)	16 (13,9)	15 (26,8)	
	Tip 3	5 (55,6)		18 (62,1)	25 (80,6)	76 (66,1)	30 (53,6)	
	Tip 4	1 (11,1)		1 (3,4)	3 (9,7)	16 (13,9)	8 (14,3)	
Yerleşim yeri	Antrum	3 (33,3)		18 (62,1)	17 (54,8)	40 (34,8)	29 (51,8)	0,045
	Kardia	2 (22,2)		2 (6,9)	6 (19,4)	26 (22,6)	14 (25,0)	
	Korpus/ Fundus	4 (44,4)		9 (31)	8 (25,8)	49 (42,6)	13 (23,2)	
Lauren Histolojik Tip	Difüz	1 (11,1)		3 (10,3)	13 (41,9)	4 (3,5)	10 (17,9)	0,001
	İntestinal	1 (11,1)		19 (65,5)	6 (19,4)	72 (62,6)	18 (32,1)	
	Mikst	5 (55,6)		4 (13,8)	11 (35,5)	36 (31,3)	28 (50,0)	
	Tanımsız	2 (22,2)		3 (10,3)	1 (3,2)	3 (2,6)	0 (0)	
DSÖ-2019 Histolojik Tip	Müsinöz	0 (0)		1 (3,4)	4 (12,9)	9 (7,8)	2 (3,6)	0,001
	Zayıf koheziv	1 (11,1)		3 (10,3)	13 (41,9)	4 (3,5)	10 (17,9)	
	Tubuler/Papiller	1 (11,1)		18 (62,1)	2 (6,5)	63 (54,8)	16 (28,6)	
	Mikst	5 (55,6)		4 (13,8)	11 (35,5)	36 (31,3)	28 (50)	
	Diğer	2 (22,2)		3 (10,3)	1 (3,2)	3 (2,6)	0 (0)	
Derece	Derece 1/ 2 (düşük)	0 (0)		13 (44,8)	3 (9,7)	45 (39,1)	18 (32,1)	0,001
	Derece 3 (yüksek)	7 (77,8)		13 (44,8)	28 (90,3)	67 (58,3)	38 (67,9)	
	Derecelendirilmeyen	2 (22,2)		3 (10,3)	0 (0)	3 (2,6)	0 (0)	
pT evresi	T1-T2 (erken evre)	1 (11,1)		6 (20,7)	8 (25,8)	10 (8,7)	6 (10,7)	0,079
	T3-T4 (ileri evre)	8 (88,9)		23 (79,3)	23 (74,2)	105 (91,3)	50 (89,3)	
pN evresi	Evre 0	2 (22,2)		12 (41,4)	7 (22,6)	21 (18,3)	8 (14,3)	0,213
	Evre 1	1 (11,1)		6 (20,7)	3 (9,7)	17 (14,8)	11 (19,6)	
	Evre 2	4 (44,4)		4 (13,8)	6 (19,4)	33 (28,7)	15 (26,8)	
	Evre 3	2 (22,2)		7 (24,1)	15 (48,4)	44 (38,3)	22 (39,3)	
Lenfatik invazyon	Negatif	1 (11,1)		3 (10,3)	6 (19,4)	13 (11,3)	6 (10,7)	0,766
	Pozitif	8 (88,9)		26 (89,7)	25 (80,6)	102 (88,7)	50 (89,3)	
Anjio invazyon	Negatif	3 (33,3)		16 (55,2)	15 (48,4)	43 (37,4)	25 (44,6)	0,408
	Pozitif	6 (66,7)		13 (44,8)	16 (51,6)	72 (62,6)	31 (55,4)	
Perinöral invazyon	Negatif	1 (11,1)		16 (55,2)	9 (29,0)	30 (26,1)	7 (12,5)	0,001
	Pozitif	8 (88,9)		13 (44,8)	22 (71,0)	85 (73,9)	49 (87,5)	
Desmo plastik yanıt	Negatif	2 (22,2)		9 (31)	8 (25,8)	23 (20)	17 (30,4)	0,556
	Pozitif	7 (77,8)		20 (69)	23 (74,2)	92 (80)	39 (69,6)	
Lenfositik yanıt	Negatif	2 (22,2)		5 (17,2)	16 (51,6)	30 (26,1)	30 (53,6)	0,001
	Pozitif	7 (77,8)		24 (82,8)	15 (48,4)	85 (73,9)	26 (46,4)	
Perinodal invazyon	Negatif	3 (42,9)		6 (35,3)	7 (29,2)	22 (23,4)	10 (20,8)	0,517
	Pozitif	4 (57,1)		11 (64,7)	17 (70,8)	72 (76,6)	38 (79,2)	
Cerrahi sınır	Negatif	5 (55,6)		24 (82,8)	20 (64,5)	83 (72,2)	36 (64,3)	0,318
	Pozitif	4 (44,4)		5 (17,2)	11 (35,5)	32 (27,8)	20 (35,7)	

Tablo 15. Gruplara göre tümör çevre mukoza özelliklerinin değerlendirilmesi

		EBV (+) (n=9)	dMMR (n=29)	E-kaderin Aberran (n=31)	P53 Aberran (n=115)	P53 Normal (n=56)	P
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
H. pylori	Negatif	7 (77,8)	21 (72,4)	14 (45,2)	67 (58,3)	32 (57,1)	0,198
	Pozitif	2 (22,2)	8 (27,6)	17 (54,8)	48 (41,7)	24 (42,9)	
Atrofi	Negatif	2 (22,2)	6 (20,7)	12 (38,7)	46 (40)	24 (42,9)	0,248
	Pozitif	7 (77,8)	23 (79,3)	19 (61,3)	69 (60)	32 (57,1)	
İntestinal metaplazi	Negatif	1 (11,1)	5 (17,2)	9 (29)	23 (20)	17 (30,4)	0,379
	Pozitif	8 (88,9)	24 (82,8)	22 (71)	92 (80)	39 (69,6)	
SPEM (n=173)	Negatif	5 (83,3)	16 (80)	14 (73,7)	73 (90,1)	42 (89,4)	0,243
	Pozitif	1 (16,7)	4 (20)	5 (26,3)	8 (9,9)	5 (10,6)	
Paneth hücre metaplazisi (n=173)	Negatif	2 (33,3)	7 (35)	9 (47,4)	43 (53,1)	29 (61,7)	0,278
	Pozitif	4 (66,7)	13 (65)	10 (52,6)	38 (46,9)	18 (38,3)	
Displazi	Negatif	6 (66,7)	19 (65,5)	23 (74,2)	82 (71,3)	37 (66,1)	0,900
	Pozitif	3 (33,3)	10 (34,5)	8 (25,8)	33 (28,7)	19 (33,9)	

13.4.3. Gruplara göre HER 2 durumunun karşılaştırılması

Gruplara göre, HER2 İHK değerlendirmeleri arasında istatistiksel olarak **anlamlı farklılık saptanmıştır** ($p<0,05$). P53- *aberran* grubunda yer alan olguların, E-kaderin- *aberran* ve P53- normal grup olgulara kıyasla, HER2 İHK skoru-3 olma oranı daha yüksektir ($p<0,05$). Benzer doğrultuda, HER2 İHK skoru 0/1 ve İHK skoru 2/3 birlikte gruplandığı zaman, gruplar arasında istatistiksel anlamlılık düzeyi artmıştır ($p=0,003$; $p<0,01$). dMMR grup olguların HER2 İHK skorunun 2/3 olma oranı, E-kaderin-*aberran* grup olgulardan daha yüksektir. P53-*aberran* grup olguların HER2 İHK skorunun 2/3 olma oranı da, E-kaderin- *aberran* ve P53-normal grup olgulardan daha yüksektir.

Gruplara göre HER2 FISH/SISH görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Gruplar arasında, HER2 analizlerinin karşılaştırılması tablo 16'da özetlenmiştir.

Tablo 16. Gruplara göre HER2 analizlerinin karşılaştırılması

		EBV (+) (n=9)	dMMR (n=29)	E-kaderin Aberran (n=31)	P53 Aberran (n=115)	P53 Normal (n=56)	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
HER2 İHK	Skor 0	7 (77,8)	14 (48,3)	23 (74,2)	50 (43,5)	37 (66,1)	0,018
	Skor 1	0 (0)	1 (3,4)	1 (3,2)	5 (4,3)	3 (5,4)	
	Skor 2	0 (0)	10 (34,5)	5 (16,1)	25 (21,7)	8 (14,3)	
	Skor 3	2 (22,2)	4 (13,8)	2 (6,5)	35 (30,4)	8 (14,3)	
HER2 İHK	Skor 0/1	7 (77,8)	15 (51,7)	24 (77,4)	55 (47,8)	40 (71,4)	0,003
	Skor 2/3	2 (22,2)	14 (48,3)	7 (22,6)	60 (52,2)	16 (28,6)	
HER2 FISH/SISH	Negatif	0 (0)	8 (80,0)	3 (60,0)	16 (38,1)	9 (64,3)	0,056
	Pozitif	1 (100)	2 (20,0)	2 (40,0)	26 (61,9)	5 (35,7)	

13.4.4. Gruplara göre pan-TRK durumunun değerlendirilmesi

Çalışmamızda yer alan 240 olgudan, 3'ünde pan-TRK ile çok az sayıda hücrede, zayıf immunekspresyon izlenmiştir. Ekspresyon izlenen 3 olgudan 2'sinde nükleer boyanma paterni, diğerinde sitoplazmik noktasal boyanma paterni vardır. Ekspresyon izlenen bir olgu p53-aberran, bir olgu p53- normal, diğer olgu ise EBV (+) gruptadır. P53-aberran olgu; tip 4 makroskopi, mikst tip karsinom, PT4aN3b evre özelliklerini göstermektedir. p53- normal grupta yer alan olgu; tip 2 makroskopi, tubulopapiller, PT3N1 evre özelliklerini göstermektedir. EBV (+) olgu; tip 4 makroskopi, medüller karsinom, pT4aN3b evre özelliklerini göstermektedir (Tablo 17).

Çalışmamızda ek olarak, Pan-TRK negatif olan G-ACa'lar arasından ileri evreli (pT) 5 olgu seçilerek (NTRK FISH kontrol grubu), NTRK 1/2/3 FISH analizi uygulanmıştır (Tablo 18).

Pan-TRK İHK'sında nükleer pozitiflik saptanan üç tümördeki FISH analiz sonuçları Tablo 10-1'de ve Pan-TRK İHK'sı negatif olan beş tümördeki FISH analiz sonuçları tablo 10-2'de verilmiştir.

Tablo 17. Pan-TRK pozitif üç tümörün gruplara göre dağılımı

	Grup	DSÖ-2019 Histolojik tip	Patolojik Evre	Pan-TRK Boyanma Paterni
Olgu 1	p53- aberran	Mikst	pT4aN3b	Sitoplazmik noktasal
Olgu 2	p53- normal	Tubulopapiller	pT3N1	Nükleer
Olgu 3	EBV (+)	Medüller	pT4aN3b	Nükleer

Tablo 18. Pan-TRK negatif beş tümörün gruplara göre dağılımı

	Grup	DSÖ-2019 Histolojik tip	Patolojik Evre
Olgu 1	p53- normal	Tubulopapiller	pT3N3a
Olgu 2	dMMR	Tubuler	pT4aN3a
Olgu 3	EBV (+)	Mikst	pT3N0
Olgu 4	dMMR	Tubuler	pT3N1
Olgu 5	E-kaderin aberran	Zayıf koheziv	pT4aN2

13.4.5. Gruplara göre sağ kalım analizlerinin ve klinik takip bulgularının karşılaştırılması

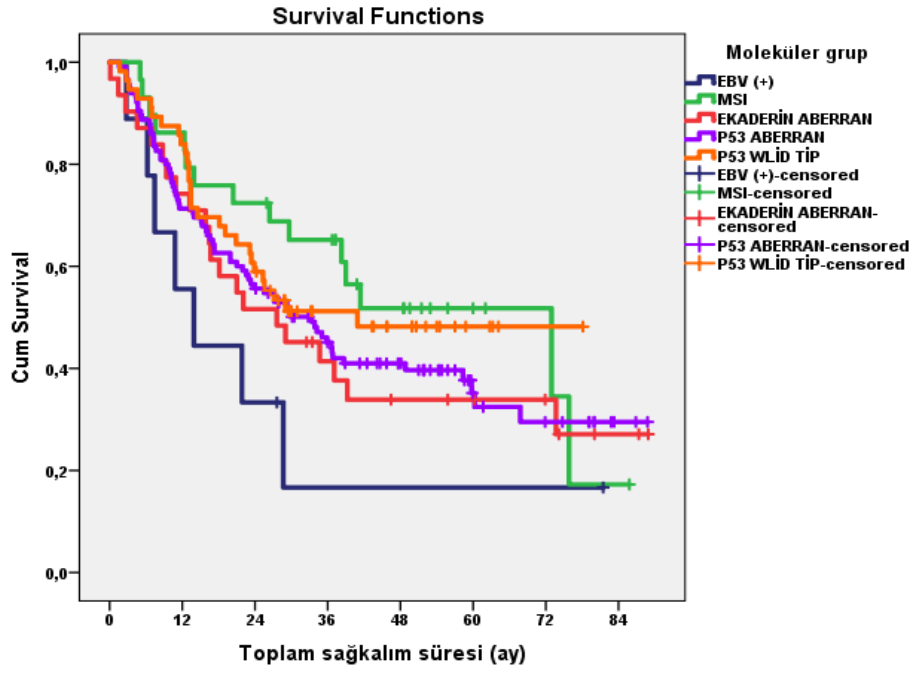
Gruplara göre klinik takip bulgularının değerlendirilmesi Tablo 19’da özetlenmiştir. Nüks oranları, gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Mortalite yüzdesi, EBV (+) grupta (%77,8), diğer gruplara oranla daha yüksek olmakla birlikte, gruplar arasındaki analiz sonucu istatistiksel anlamlılık kazanmamıştır ($p>0,05$).

EBV (+) grupta, genel sağ kalım süresi ortalama 22,31 ay, nüksüz sağ kalım süresi ortalama 14,32 aydır. Genel ve nüksüz sağ kalım süresi göz önüne alındığı zaman, EBV (+) gruptaki bu değerler, diğer gruplara oranla kısadır; ancak, gruplar arasındaki istatistiksel analizde fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Genel ve nüksüz sağ kalım süresi dMMR grupta (sırasıyla; ortalama 37,93 ay ve 24,26 ay), diğer gruplara göre uzun olmakla birlikte, gruplar arasında istatistiksel açıdan farklılık yoktur ($p>0,05$).

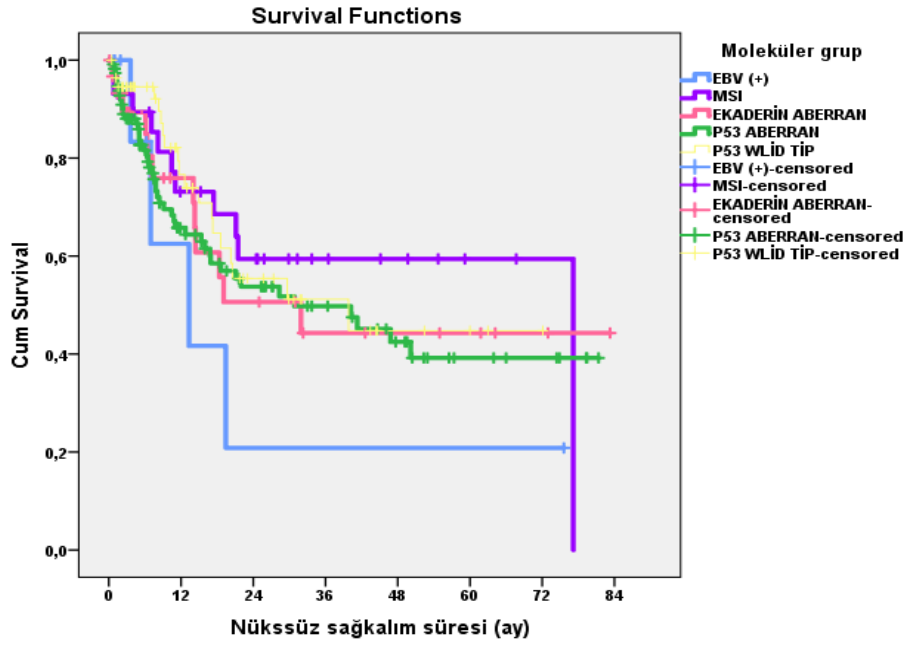
Tablo 19. Gruplara göre klinik takip bulgularının değerlendirilmesi

		EBV (+) (n=9)	dMMR (n=29)	E-kaderin Aberran (n=31)	P53 Aberran (n=115)	P53 Normal (n=56)	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Mortalite	Yok	2 (22,2)	14 (48,3)	10 (32,3)	44 (38,3)	28 (50,0)	0,271
	Var	7 (77,8)	15 (51,7)	21 (67,7)	71 (61,7)	28 (50,0)	
Genel Sağ kalım süresi (ay)	Min-Mak (Medyan)	2,8-81,5 (13,9)	5-85,8 (38,3)	0,1-88,9 (27,6)	1,6-88,8 (27,8)	1,7-78,1 (27,5)	0,290
	Ort±Ss	22,31±24,07	37,93±22,12	33,56±27,40	32,26±23,59	29,76±18,61	
Nüks	Yok	5 (55,6)	18 (62,1)	19 (61,3)	69 (60,0)	37 (66,1)	0,946
	Var	4 (44,4)	11 (37,9)	12 (38,7)	46 (40,0)	19 (33,9)	
Nüksüz Sağ kalım süresi (ay)	Min-Mak (Medyan)	0,8-75,6 (6,2)	0,8-77,2 (21,1)	0,1-83,3 (10,2)	0,5-81,4 (8,4)	0,5-72,1 (12,1)	0,323
	Ort±Ss	14,32±23,80	24,26±21,29	20,62±23,92	18,69±21,02	18,08±17,19	

Gruplara göre genel sağ kalım eğrileri Log Rank test ile değerlendirildiği zaman, grupların **genel sağ kalım oranları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır** ($p>0,05$). Gruplara göre nüksüz sağ kalım eğrileri Log Rank test ile değerlendirildiği zaman, grupların **nüksüz sağ kalım oranları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır** ($p:0,635$; $p>0,05$). Gruplara göre sağ kalım analizleri Kaplan-Meier grafikleri ile Şekil 16 ve 17’de gösterilmiştir.



Şekil 16. Gruplara göre genel sağ kalım analizi grafiği (p=0,280)



Şekil 17. Gruplara göre nüksüz sağ kalım analizi grafiği (p=0,635)

13.5. Histomorfolojik Bulgulara Göre Sağ kalım Analizleri

Histomorfolojik değişkenlerin, genel ve nüksüz sağ kalım ilişkileri Log Rank testi ile değerlendirilmiş, sonuçlar Tablo 20 ve 21’de özetlenmiştir. İstatistiksel analizlerde anlamlı sonuç veren özellikler, Kaplan-Meier grafikleri ile Şekil 18-30’de yansıtılmıştır.

° Makroskopik tip:

Makroskopik tip-1 olguların sağ kalım oranları, diğer makroskopik tiplerdeki olgulara oranla daha yüksektir ve istatistiksel **anlamlı farklılık saptanmıştır** ($p<0,05$). Ancak, makroskopik tip grupları ile nüksüz sağ kalım oranları arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir. ($p>0,05$).

° Tümör yerleşim yeri:

Tümör yerleşim yerinin, genel ve nüksüz sağ kalımla ilişkisi saptanmamıştır ($p>0,05$).

° Lauren histolojik tip:

Lauren histolojik sınıflamanın, genel ve nüksüz sağ kalımla ilişkisi saptanmamıştır ($p>0,05$).

° DSÖ-2019 histolojik tip:

DSÖ histolojik sınıflama grupları arasında, genel ve nüksüz sağ kalım oranları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

° Tümör Farklılaşma Derecesi:

Tümör farklılaşma derecesi ile, sağ kalım oranları arasında istatistiksel **anlamlı fark saptanmıştır** ($p<0,05$). İyi farklılaşma gösteren olguların, genel sağ kalım oranları daha yüksektir ($p<0,01$). Nüksüz sağ kalım eğrileri, farklılaşma derecesine ile ilişkilendirilememiştir ($p>0,05$).

° **pT evresi:**

Tümör invazyon seviyelerine göre, genel sağ kalım oranları arasında istatistiksel **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,01$). pT3/pT4 evre olguların sağ kalım oranları, pT1/pT2 olgulardan daha düşüktür. Benzer ilişki, nüksüz sağ kalım eğrileri ile gösterilememiştir ($p>0,05$).

° **pN evresi:**

N evrelerine göre, genel sağ kalım eğrileri arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,01$). Yapılan karşılaştırmalarda, pN3 olgularda sağ kalım, diğer evredeki olgulardan daha düşüktür ($p<0,05$). pN2 olgularda sağ kalım, pN0 olgulardan daha düşüktür ($p<0,05$). Diğer karşılaştırmalar arasında anlamli fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

N evrelerine göre, nüksüz sağ kalım eğrileri arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,01$). pN3 olguların nüksüz sağ kalım oranları, pN0 ve pN1 olgulardan daha düşüktür ($p<0,01$). Benzer şekilde, pN2 olguların nüksüz sağ kalım oranları, pN0 ve pN1 olgulardan daha düşüktür ($p<0,05$). pN2 ve pN3 olguların nüksüz sağ kalım oranları arasında anlamli fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

° **Lenfatik invazyon:**

Lenfatik invazyon sonuçlarına göre, genel sağ kalım eğrileri arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,05$); Lenfatik invazyon sonucu pozitif olanların genel sağ kalım oranları daha düşüktür. Benzer istatistiksel **anlamli farklılık** nüksüz sağ kalım eğrileri arasında **saptanmıştır** ($p<0,01$). Lenfatik invazyon sonucu pozitif olanların, nüksüz sağ kalım oranları daha düşüktür.

° **Anjiointvazyon:**

Anjiointvazyon sonuçlarına göre, genel sağ kalım eğrileri arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,01$). Anjiointvazyon sonucu pozitif olanlarda genel sağ kalım daha düşüktür. Benzer istatistiksel **anlamli farklılık** nüksüz sağ kalım eğrileri arasında **saptanmıştır** ($p<0,01$). Anjiointvazyon saptanan olguların, nüksüz sağ kalım oranları daha düşüktür.

° Perinöral invazyon:

Perinöral invazyon sonuçlarına göre, genel sağ kalım eğrileri arasında istatistiksel **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,05$). Perinöral invazyon varlığında, genel sağ kalım oranları daha düşüktür. Perinöral invazyon ile, nüksüz sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamli farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

° Cerrahi sınır:

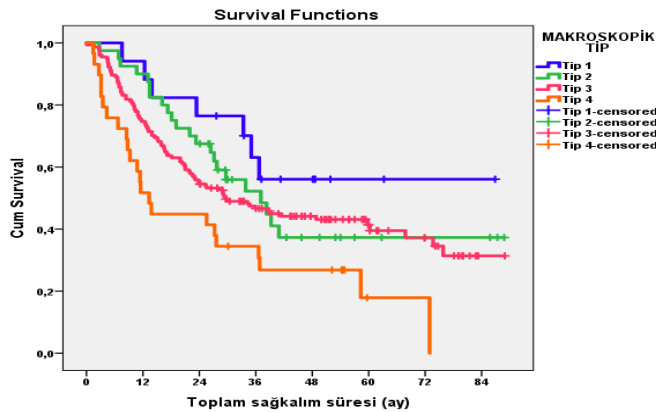
Cerrahi sınır sonuçlarına göre, genel sağ kalım eğrileri değerlendirildiği zaman, sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,01$). Cerrahi sınır sonucu pozitif olanların. sağ kalım oranları daha düşüktür. Benzer istatistiksel **anlamli farklılık** nüksüz sağ kalım eğrileri arasında **saptanmıştır** ($p<0,01$). Cerrahi sınır sonucu pozitif olanların nüksüz sağ kalım oranları daha düşüktür.

° Desmoplastik yanıt:

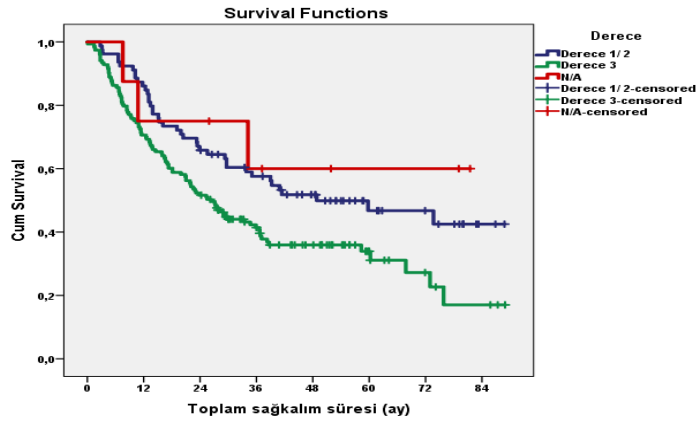
Desmoplastik yanıt sonuçları ile, genel sağ kalım eğrileri arasında istatistiksel anlamli fark yoktur ($p>0,05$); ancak nüksüz sağ kalım açısından istatistiksel **anlamli farklılık saptanmıştır** ($p<0,05$). Desmoplastik yanıt izlenen olgularda, nüksüz sağ kalım oranları daha düşüktür.

° Diğer histomorfolojik parametreler:

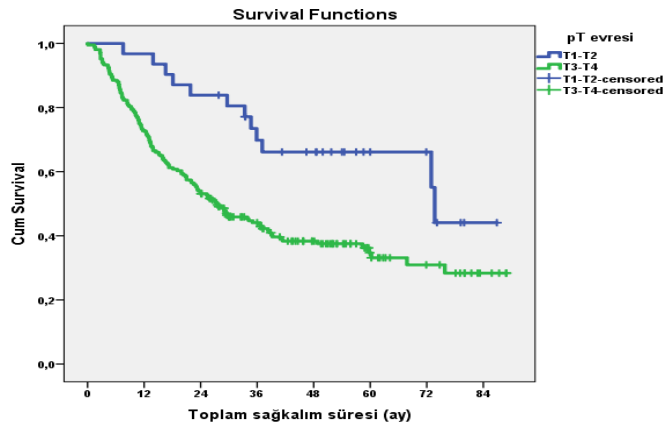
Diğer histomorfolojik parametreler (lenfositik yanıt, metastatik lenf nodu perinodal invazyonu) açısından, genel ve nüksüz sağ kalım oranları arasında istatistiksel anlamli farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).



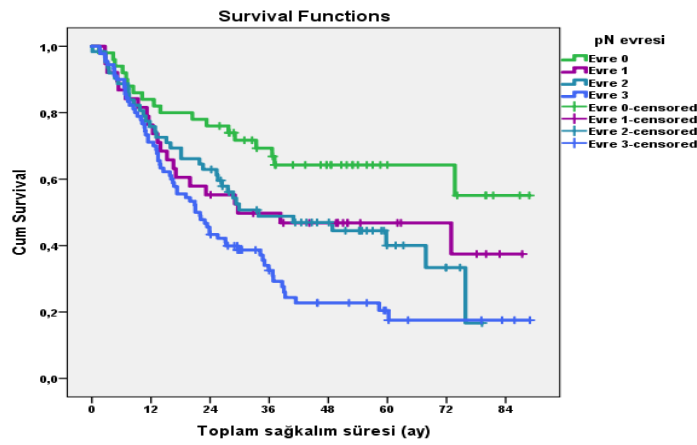
Şekil 18. Makroskopik tiplere göre genel sağ kalım analiz grafiği



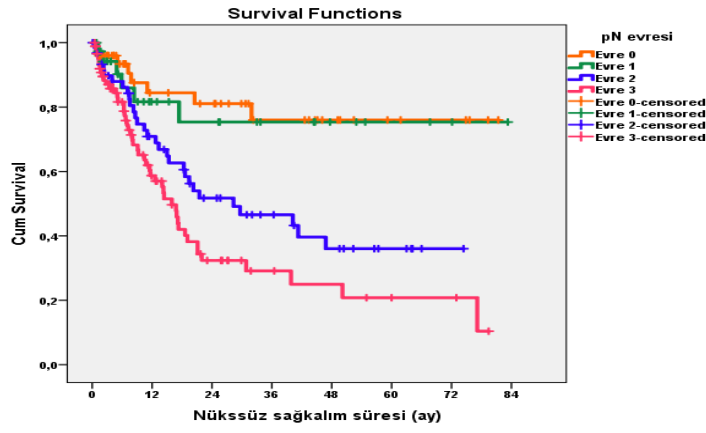
Şekil 19. Farklılaşma derecesine göre genel sağ kalım analiz grafiği



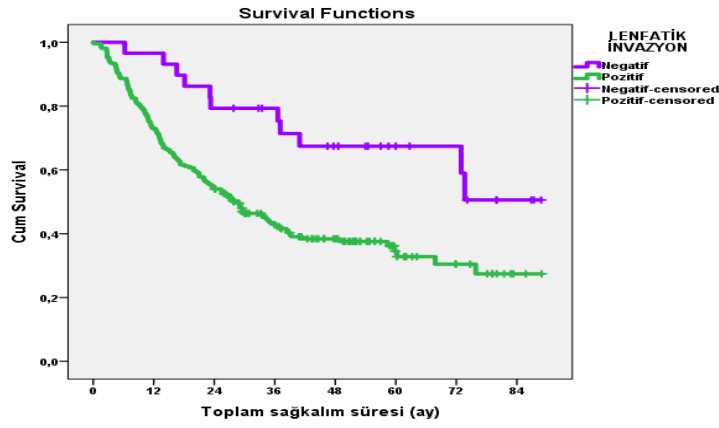
Şekil 20. T evrelerine göre genel sağ kalım analiz grafiği



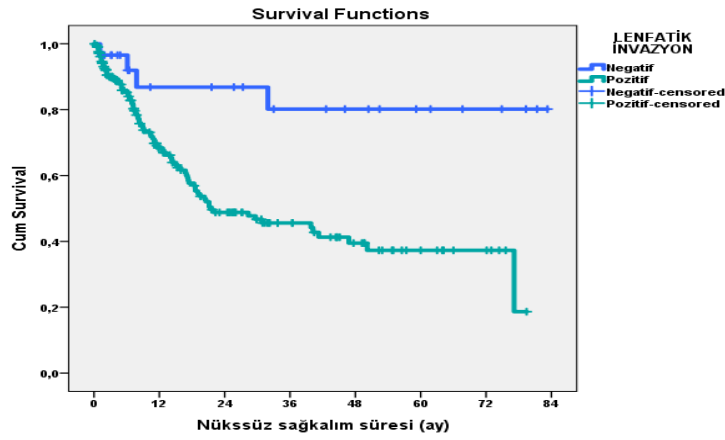
Şekil 21. N evrelerine göre genel sağ kalım analiz grafiği



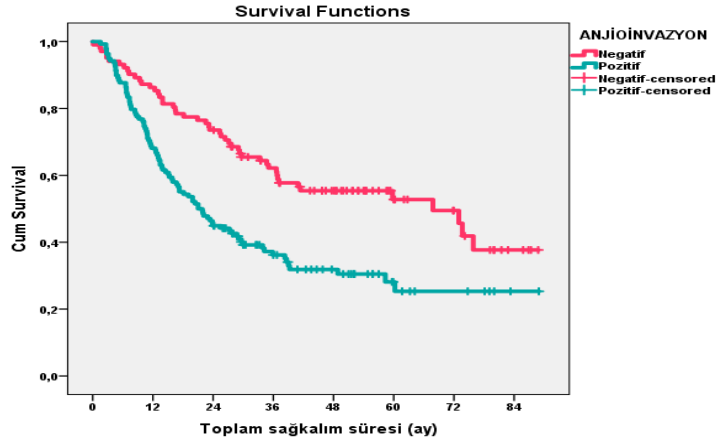
Şekil 22. N evrelerine göre nüksüz sağ kalım analizi grafiği



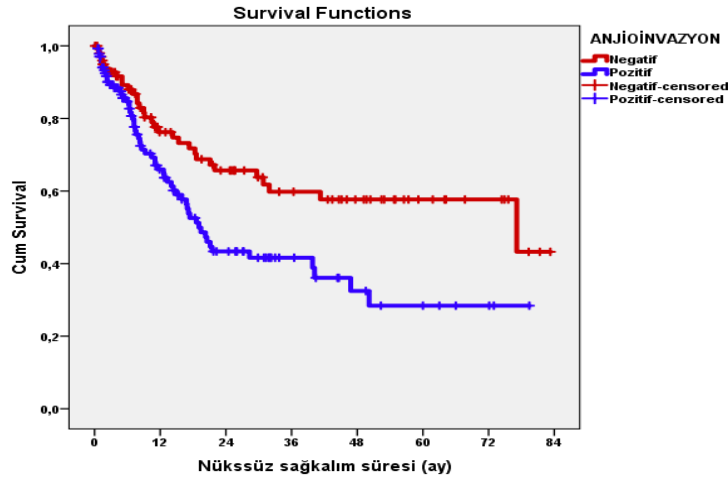
Şekil 23. Lenfatik invazyon varlığına göre genel sağ kalım analiz grafiği



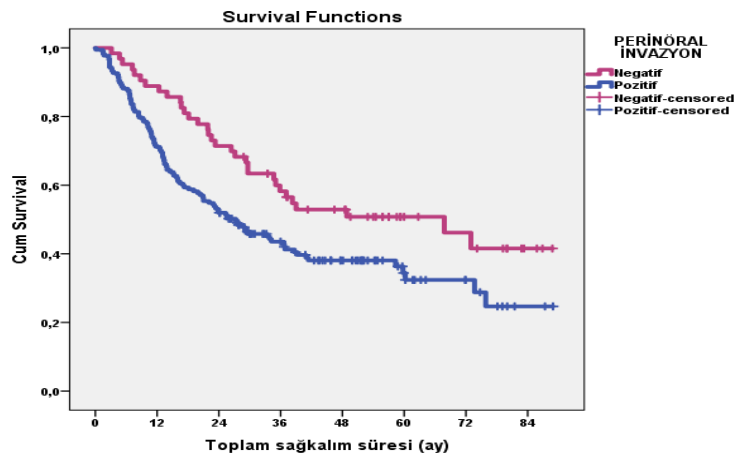
Şekil 24. Lenfatik invazyon varlığına göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği



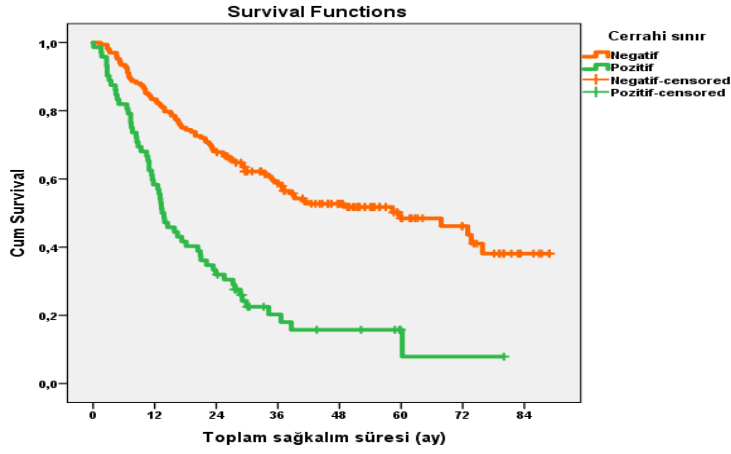
Şekil 25. Anjioinvazyon varlığına göre genel sağ kalım analiz grafiği



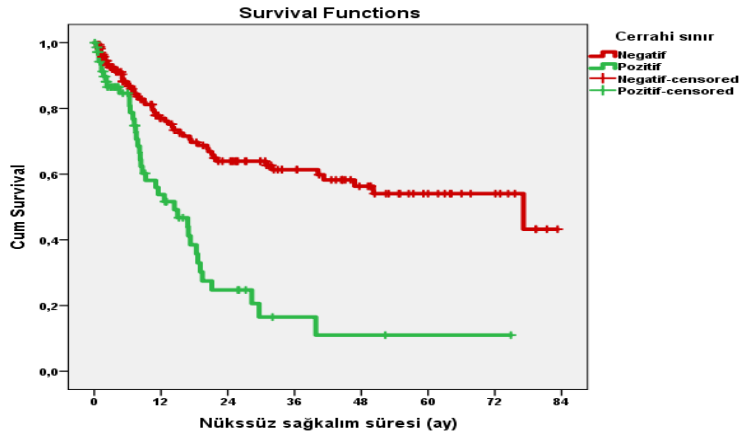
Şekil 26. Anjioinvazyon varlığına göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği



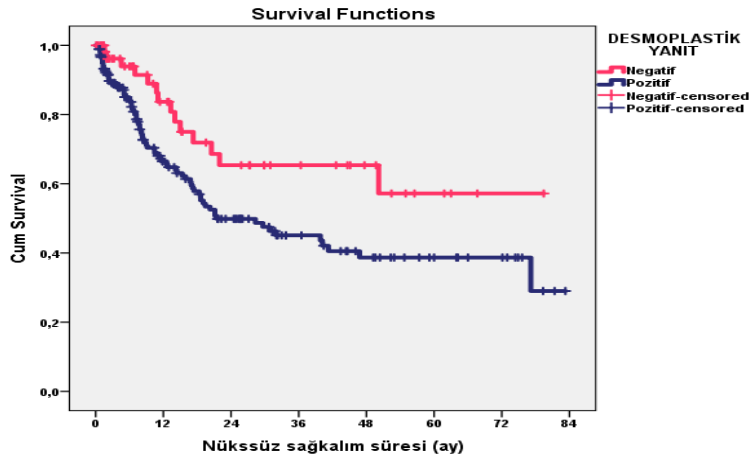
Şekil 27. Perinöral invazyon varlığına göre genel sağ kalım analiz grafiği



Şekil 28. Cerrahi sınır durumuna göre genel sağ kalım analiz grafiği



Şekil 29. Cerrahi sınır durumuna göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği



Şekil 30. Desmoplastik yanıt varlığına göre nüksüz sağ kalım analiz grafiği

Tablo 20. Histomorfolojik değişkenlere göre genel sağ kalım analiz sonuçları

		N	Ölü	Yaşayan	Genel sağkalım süresi (ay)	95% CI		Log Rank Test; p
						Lower	Upper	
Makroskopi Tipi	Tip1	17	7	10	59,24±8,03	43,51	74,97	0,013
	Tip2	40	22	18	47,98±5,62	36,96	58,98	
	Tip3	154	90	64	45,18±2,96	39,37	50,97	
	Tip4	29	23	6	27,77±5,12	17,74	37,80	
Yerleşim Yeri	Antrum	107	61	46	46,09±3,44	39,34	52,82	0,624
	Kardia	50	29	21	45,62±5,26	35,32	55,92	
	Korpus/ Fundus	83	52	31	41,52±3,95	33,78	49,25	
Lauren histolojik tip	Diffüz	31	20	11	40,69±6,52	27,91	53,45	0,600
	İntestinal	116	67	49	46,71±3,35	40,14	53,27	
	Mikst	84	51	33	39,43±3,73	32,11	46,74	
	Tanımsız	9	4	5	50,35±11,69	27,44	73,25	
DSÖ-2019 histolojik tip	Müsinöz	16	12	4	33,17±7,94	17,60	48,73	0,314
	Zayıf koh	31	20	11	40,69±6,52	27,91	53,45	
	Tub/Pap	100	55	45	48,90±3,61	41,81	55,98	
	Mikst	84	51	33	39,43±3,73	32,11	46,74	
	Diğer	9	4	5	50,35±11,69	27,44	73,25	
Derece	Düşük	79	40	39	52,96±4,01	45,09	60,82	0,01
	Yüksek	153	99	54	38,54±2,87	32,90	44,17	
	Yok	8	3	5	56,31±11,53	33,71	78,90	
pT evre	T1+2	31	12	19	63,06±5,35	52,56	73,54	0,004
	T3+4	209	130	79	41,74±2,52	36,80	46,68	
pN evre	N0	50	18	32	61,95±5,06	52,02	71,87	0,001
	N1	38	21	17	47,27±5,93	35,64	58,89	
	N2	62	36	26	42,79±3,96	35,02	50,54	
	N3	90	67	23	32,87±3,32	26,36	39,37	
Lenfatik invazyon	Negatif	29	11	18	65,29±5,71	54,09	76,49	0,003
	Pozitif	211	131	80	41,65±2,51	36,72	46,58	
Anjio invazyon	Negatif	102	49	53	54,91±3,48	48,095	61,723	0,001
	Pozitif	138	93	45	36,91±3,04	30,945	42,868	
Perinöral invazyon	Negatif	63	32	31	54,54±4,30	46,103	62,967	0,012
	Pozitif	177	110	67	40,87±2,76	35,466	46,283	
Desmo plastik yanıt	Negatif	59	31	28	45,38±4,46	36,630	54,123	0,413
	Pozitif	181	111	70	43,53±2,67	38,288	48,767	
Lenfositik yanıt	Negatif	83	49	34	43,24±4,10	35,202	51,282	0,722
	Pozitif	157	93	64	45,32±2,88	39,677	50,953	
Perinodal İnvazyon	Negatif	48	29	19	42,61±5,11	32,597	52,617	0,543
	Pozitif	142	95	47	39,36±2,91	33,660	45,053	
Cerrahi Sınır	Negatif	168	83	85	52,84±2,79	47,376	58,312	0,001
	Pozitif	72	59	13	23,32±2,95	17,530	29,109	

Tablo 21. Histomorfolojik değişkenlere göre nüksüz sağ kalım analiz sonuçları

		N	Nük (+)	Nüks (-)	Nüksüz sağ kalım süresi (ay)	95% CI		Log Rank Test; p
						Lower	Upper	
Makro Tipi	Tip1	17	5	12	54,95±8,86	37,58	72,31	0,087
	Tip2	40	13	27	52,43±6,64	39,42	65,43	
	Tip3	154	58	96	43,26±3,37	36,65	49,87	
	Tip4	29	16	13	26,32±4,82	16,87	35,76	
Yerleşim yeri	Antrum	107	45	62	41,87±4,06	33,91	49,81	0,362
	Kardia	50	15	35	50,96±6,01	39,17	62,74	
	Korpus/ Fundus	83	32	51	40,12±4,74	30,83	49,41	
Lauren histolojik tip	Diffüz	31	8	23	55,58±7,87	40,15	71,01	0,347
	İntestinal	116	44	72	45,26±3,96	37,49	53,01	
	Mikst	84	37	47	31,32±3,20	25,03	37,59	
	Tanımsız	9	3	6	49,22±11,94	25,81	72,61	
DSÖ- 2019 histolojik tip	Müsinöz	16	6	10	47,85±10,82	26,63	26,63	0,496
	Zayıf koheziv	31	8	23	55,58±7,87	40,15	40,15	
	Tubuler/Papiller	100	38	62	45,23±4,30	36,79	36,79	
	Mikst	84	37	47	31,32±3,20	25,03	25,03	
	Diğer	9	3	6	49,22±11,94	25,81	25,81	
Derece	Düşük	79	28	51	49,93±4,56	40,99	58,87	0,328
	Yüksek	153	61	92	38,80±3,57	31,81	45,79	
	Derecelendirilmeyen	8	3	5	49,22±11,94	25,81	72,61	
pT evre	T1+2	31	8	23	53,91±7,20	39,80	68,01	0,103
	T3+4	209	84	125	42,16±3,05	36,19	48,13	
pN evre	N0	50	8	42	65,10±5,16	54,97	75,21	0,001
	N1	38	6	32	64,76±6,82	51,40	78,12	
	N2	62	30	32	37,79±4,32	29,28	46,29	
	N3	90	48	42	27,99±3,93	20,28	35,69	
Lenfatik invazyon	Negatif	29	4	25	69,61±6,24	57,385	81,837	0,002
	Pozitif	211	88	123	39,08±2,84	33,520	44,637	
Anjio invazyon	Negatif	102	32	70	53,17±4,11	45,116	61,213	0,004
	Pozitif	138	60	78	34,83±3,60	27,778	41,888	
Perinöral invazyon	Negatif	63	22	41	50,88±4,97	41,132	60,631	0,109
	Pozitif	177	70	107	41,02±3,41	34,341	47,703	
Desmo plastik yanıt	Negatif	59	14	45	53,82±5,50	43,049	64,600	0,017
	Pozitif	181	78	103	40,56±3,19	34,298	46,821	
Lenfositik yanıt	Negatif	83	26	57	43,33±5,28	32,993	53,670	0,692
	Pozitif	157	66	91	43,33±3,28	36,905	49,750	
Perinodal İnvazyon	Negatif	48	17	31	48,07±6,30	35,717	60,419	0,196
	Pozitif	142	67	75	34,93±3,27	28,524	41,329	
Cerrahi sınır	Negatif	168	53	115	52,06±3,29	45,609	58,501	0,001
	Pozitif	72	39	33	20,63±3,60	13,574	27,690	

13.6. HER2 Durumuna Göre Sağ kalım Analizleri

HER2 FISH/ SISH ve HER2 İHK sonuçlarına göre genel sağ kalım eğrileri Log Rank test ile değerlendirildiği zaman genel sağ kalım oranları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 22).

HER2 FISH/ SISH ve HER2 İHK sonuçlarına göre nüksüz sağ kalım eğrileri Log Rank test ile değerlendirildiği zaman, nüksüz sağ kalım oranları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 23).

Tablo 22. HER2 durumuna göre genel sağ kalım ilişkisi

		N	Ex	Yaşayan	Genel Sağ kalım oranı	Ortalama sağ kalım süresi	95% Confidence Interval		Log Rank Test; p
							Lower	Upper	
HER2 FISH/SISH	Negatif	36	22	14	38,9%	32,37±3,87	24,790	39,949	0,237
	Pozitif	36	19	17	47,2%	47,55±5,07	37,608	57,485	
HER2 İHK	Skor 0	131	85	46	35,1%	40,99±3,07	34,963	47,008	0,296
	Skor 1	10	4	6	60,0%	53,02±10,57	32,290	73,742	
	Skor 2	48	23	25	52,1%	43,81±4,27	35,435	52,188	
	Skor 3	51	30	21	41,2%	46,29±5,00	36,491	56,091	

Kaplan-Meier Analizi

Tablo 23. HER2 durumuna göre nüksüz sağ kalım ilişkisi

		N	Nüks (+)	Nüks (-)	Nüksüz Sağ kalım oranı	Ortalama sağ kalım süresi	95% Confidence Interval		Log Rank Test; p
							Lower	Upper	
HER2 FISH/SISH	Negatif	36	11	25	69,4%	36,65±4,34	28,145	45,154	0,185
	Pozitif	36	17	19	52,8%	35,23±5,93	23,609	46,849	
HER2 İHK	Skor 0	131	53	78	59,5%	41,48±3,83	33,967	48,987	0,515
	Skor 1	10	3	7	70,0%	23,21±7,43	8,650	37,766	
	Skor 2	48	15	33	68,8%	41,99±4,31	33,538	50,433	
	Skor 3	51	21	30	58,8%	42,69±6,05	30,831	54,550	

Kaplan-Meier Analizi

14. TARTIŞMA

Mide kanseri, dünyada görülme sıklığı açısından, beşinci sırada yer alır [8]. *H. pylori* eradikasyonu ve kanser tarama programlarındaki ilerlemeye bağlı olarak, son yıllarda mide kanseri mortalitesinde azalma görülmekle birlikte, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında günümüzde üçüncü sıradadır [8]. Mortalite riskinin yüksek olması, mide kanser olgularının geç dönemde tanı almasına ve mevcut tedavi rejimlerine düşük oranda yanıt vermesine bağlanmaktadır. Güncel tedavi protokollerine karşın, yüksek mortalite oranlarından, mide kanserlerinin makroskopik, mikroskopik ve moleküler düzeyde belirgin heterojenite göstermesi sorumlu tutulmaktadır [46].

Son yıllarda, moleküler yöntemlerin gelişimi ve büyük veri setlerinin detaylı analizleri sayesinde, G-ACa moleküler alt yapısının çözümlenmesi, hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin arttırılması ve biyolojik-klinik açıdan homojen alt grupların belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. 2014’de TCGA ve 2015’de ACRG tarafından yayınlanan moleküler sınıflamalar, bu alandaki en önemli ve kapsamlı çalışmalardır [14, 19]. Bu iki büyük proje dışında, farklı çalışma grupları tarafından, G-ACa’lara yönelik çeşitli moleküler sınıflamalar ileri sürülmüştür [13, 15, 16, 18, 122].

Moleküler düzeyde G-ACa açısından kaydedilen bu ilerlemelerin, günlük klinik pratiğe yansması sınırlı düzeydedir. Genom bazlı moleküler incelemelerin, her laboratuvarında mevcut olmayan, pahalı ve kompleks özellikte analizleri gerektirmesi, uygulama alanını sınırlamaktadır. Bu doğrultuda, G-ACa’ların moleküler özelliklerini baz alan, rutin pratikte kolaylıkla uygulanabilen, daha ucuz ve klinik açıdan yönlendirici sınıflama sistemlerine gereksinim doğmuştur. Literatürde, bu amaç doğrultusunda, İHK ve İSH gibi basit yöntemler yardımıyla, prognostik ve prediktif değere sahip sınıflamaların oluşturulabilmesi açısından son yıllarda farklı taksonomik çalışmalar bulunmaktadır [20-24, 141, 235-238]. Ancak, İHK ve İSH uygulamalarını göz önüne alarak oluşturulan algoritmalar ve değerlendirme kriterleri açısından bu çalışmalar arasında henüz görüş birliği sağlanamamıştır.

Çalışmamızda, Setia ve ekibinin, daha önce yayınlanan moleküler sınıflamaları göz önüne alarak önerdikleri sınıflamaya benzer şekilde [20], EBER-CISH ile MLH1,

MSH2, MSH6, PMS2, E-kaderin ve p53 İHK analiziyle, 240 G-ACa olgusu beş gruba ayrılmıştır. Amaçlarımızdan öncelikli olanı, bu grupların, hasta demografik verileri, tümör ve tümör çevresi histomorfolojik parametreleri ve hasta sağ kalım analizlerini karşılaştırmak ve önerilen sınıflamanın etkinlik durumunu, kendi hasta grubumuzda değerlendirmektir.

Öncelikle, çalışma kapsamına alınan 240 olgunun histopatolojik değişkenleri ile genel sağ kalım ve nüksüz sağ kalım ilişkileri incelenmiş ve bulgularımızın literatürle uyumlu olduğu görülmüştür [1, 221, 239]. Genel sağ kalımda; tümör makroskopik tip 1 (polipoid), iyi farklılaşma derecesi, erken evre mide duvar invazyon seviyesi (pT1+pT2) ve lenf nodu tutulumu (pN0+pN1), lenfatik/anjioinvazyon negatifliği ile cerrahi sınır negatifliğinin uzun sağ kalımla istatistiksel anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir. Nüksüz sağ kalım analizlerinde ise; ileri evre lenf nodu metastazı (pN3), lenfatik invazyon, anjioinvazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınırda tümör pozitifliği ve desmoplastik yanıtın, azalmış nüksüz sağ kalım ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Saptadığımız verilerin literatürle uyumluluk göstermesi, gruplar arasındaki karşılaştırmalar açısından uygun bir hasta grubunun çalışma kapsamında olduğunu göstermektedir.

° **EBV (+) G-ACa (Grup 1):** EBV, herpes ailesine ait bir DNA virüsüdür. EBV (+) G-ACa'lar, G-ACa'ların %1,8-18'ini oluşturur ve latent olarak EBV taşıyan tümör hücrelerinin monoklonal proliferasyonu ile geliştiği düşünülmektedir [240]. Çalışmamızda yer alan 240 olgudan 9'unda (%3,75), EBER-CISH analizi ile EBV pozitifliği saptanmıştır. Çalışmamızdaki EBV (+) G-ACa oranı, TCGA (%9) dahil literatürdeki diğer yayınlara göre düşük oranda olmakla birlikte, Kim ve ark.'nın 2016 yılında raporladığı oran (%3,3) ile benzerdir [21] ve coğrafi/demografik özellikler ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

Literatürde EBV (+) G-ACa'ların, EBV (-) G-ACa'lara göre, farklı klinikopatolojik özellikler taşıdığı, genellikle genç erkek popülasyonda görüldüğü, mide proksimalinde yerleşim gösterdiği ve prognoz açısından iyi seyirli oldukları ileri sürülmüştür [240]. Çalışmamızda, EBV (+) olgu sayısının az (n=9) olması nedeniyle, diğer moleküler gruplara göre histomorfolojik ve sağ kalım özellikleri açısından anlamlı istatistiksel fark gösterilememiştir (p>0,05). Ancak, olguların tümünün erkek

olması, 6 olgunun (%66) proksimal mide yerleşimi göstermesi ve 7 olguda (%77) lenfositik yanıtın saptanması, dikkat çekici özelliktedir; ve bu parametrelerin EBV (+) olgu sayısı arttığı zaman, istatistiksel anlamlılık kazanabileceği öngörülebilir.

EBV (+) G-ACa'ların, histopatolojik olarak değişken morfolojiler sergileyebildikleri bilinmektedir [240]. Ancak, özellikle bazı çalışmalarda lenfoid stroma içeren G-ACa'ların %80'den fazlasında EBV pozitifliği saptanması, DSÖ 2019 sınıflamasında, EBV (+) G-ACa'ların lenfoid stroma içeren gastrik karsinom (medüller karsinom, lenfoepitelyoma benzeri karsinom) başlığı altında ele alınmasına yol açmıştır. Ancak literatürde, değişen oranlarda lenfositik infiltrasyon içeren, orta veya az farklılaşma gösteren konvansiyonel tip G-ACa'ların %5-10 oranında EBV pozitifliği gösterebileceği rapor edilmiştir [241]. Çalışmamızda, EBV (+) olan 9 olgunun DSÖ histolojik tiplere göre dağılımı incelendiği zaman; %22 (n=2)'si medüller, %55 (n=5)'i mikst tip (zayıf koheziv+tubuler), %11 (n=1)'i zayıf koheziv (taşlı yüzük komponenti içeren), %11 (n=1)'i tubuler G-ACa morfolojisindedir. Bu sayılar, çalışmamızdaki medüller morfolojide G-ACa'ların %25'inde, konvansiyonel tip G-ACa'ların %3 (7/232) 'ünde EBV (+)'liği saptandığını ortaya koymaktadır. Her iki değer de, literatürden düşüktür ve coğrafi/demografik özellikler ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

DSÖ-2019 sınıflamasında, *lenfoid stroma içeren gastrik karsinom (medüller karsinom)* fenotipindeki olgularda %80'den fazla oranda EBV (+)'liği görülebildiği bildirilmiş, MSI G-ACa'ların bir bölümünün, bu morfolojiye sahip olabileceği belirtilmiştir [7]. EBV ilişkili G-ACa'lar ile MSI G-ACa'ların, benzer morfolojik özellikler gösterebilmelerine karşın, farklı moleküler özellikler taşıdıkları detaylı genomik analizler kullanılarak kanıtlanmıştır [19]. Bu nedenle, TCGA çalışmasında, EBV (+) ve MSI tip G-ACa'lar iki ayrı moleküler grupta sınıflandırılmıştır. Her iki grupta da karsinogeneze sorumlu ana mekanizmanın metilasyon olduğu, ancak bu grupların farklı genomik metilasyon paternleri gösterdiği ileri sürülmüştür. EBV (+) G-ACa'ların, MSI G-ACa'lara oranla, çok daha yaygın genomik DNA metilasyon içerdikleri ve MSI G-ACa'larda karakteristik olarak izlenen MLH1 promoter metilasyonunun, EBV (+) G-ACa'larda görülmediği bildirilmiştir [19]. Ahn ve ekibinin çalışmasında, 26 EBV (+) G-ACa'un iki tanesinde MLH1 kaybı saptandığı bildirilmekle birlikte [22], literatürde yer alan diğer çalışmaların büyük kısmında MSI

G-ACa ve EBV (+) G-ACa'ların iki ayrı grupta değerlendirilmesi (*mutually exclusive pattern*) önerilmiştir [19-21, 23]. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, EBV (+) G-ACa'ların hiçbirinde İHK ile yanlış eşleşme tamir protein (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) kaybı görülmemiştir (*proficient MMR*; pMMR).

Çalışmamızdaki EBV (+) 9 olgudan 3'ünde, EBER-CISH analizi ile tümör hücrelerinin bir kısmında güçlü nükleer boyanma izlenirken, diğer kısmında boyanma görülmemiştir (heterojen boyanma paterni). Bu olgulardan, 2'sinin mikst tip (tubuler ve zayıf koheziv), 1'inin taşlı yüzük hücresi içeren zayıf koheziv G-ACa morfolojisinde olduğu görülmüştür. Mikst tip G-ACa olgularında, EBER-CISH analizi ile tubuler komponentte güçlü nükleer boyanma saptanmış, zayıf koheziv komponentte boyanma izlenmemiştir. Taşlı yüzük hücresi içeren zayıf koheziv G-ACa olgusunda ise güçlü nükleer boyanma izlenen alanlarda belli belirsiz tubul yapıları dikkati çekmiştir. Matsuda ve ekibi, 2015 yılında yayınladıkları bir olguda benzer EBER boyanma özelliğini belirtmişler; bu olguyu, morfolojisi farklı iki ayrı tümörden oluşan kollüzyon tümör olarak değerlendirilmişlerdir [234]. Bu durum, genetik veya epigenetik modifikasyonlara bağlı olarak, G-ACa'larda farklılaşma azalmasıyla birlikte, viral latent gen ekspresyonunun azaldığı şeklinde de yorumlanabilir. Çalışmamızdaki üç olguda izlediğimiz heterojen boyanma patterni, ikinci yaklaşımı ön planda destekleyebilir. Gözlemimiz, özellikle zayıf koheziv grup içinde, aslında EVB (+)'liği sürecinden geçen, ancak EBV etkisi gösterilemeyen G-ACa'ların da olabileceğini akla getirmektedir.

Literatürde EBV (+) G-ACa'larda, TP53 mutasyonunun görülebildiği rapor edilmiştir [237]. Gonzalez ve ekibinin çalışmasında, 7 EBV (+) G-ACa olgusunun 3'ünde (%42,8) p53 ile aberran güçlü şiddette ekspresyon saptanmıştır. Çalışmamızda, benzer oranda, EBV (+) 9 olgunun, 4'ünde (%44) aberran p53 ekspresyonu ($\geq$ %70 ekspresyon) izlenmiştir.

EBV (+) G-ACa'lar, çalışmamızın aksine, literatürde çoğunlukla iyi prognozlu G-Ca'lar olarak rapor edilmiştir [14, 240]. Çalışmamızda, gruplar arasındaki analiz sonucu istatistiksel anlamlılık kazanmamakla birlikte, mortalite yüzdesi, EBV (+) grupta (%77,8), diğer gruplara oranla daha yüksektir. Çalışmamıza benzer şekilde, Yoon ve ekibinin çalışmasında da, EBV (+) 3 olgunun 2'sinde erken dönemde ölüm

gerçekleşmiştir. Bu durum, EBV (+) grupta yer alan olgu sayısı azlığına (n=9) ve çalışma popülasyonundaki demografik özelliklere bağlı olabilir.

° **dMMR G-ACa (Grup 2):** DNA üzerinde tekrar eden kısa sekansların (*mikrosatellit*) uzunluk değişimleri ile karakterize mikrosatellit instabilite (MSI), DNA yanlış eşleşme tamir genlerinin kalıtsal mutasyonel inaktivasyonu (Lynch sendromu) veya sporadik olarak epigenetik susturulması (MLH1 hipermetilasyonu) sonucu gelişir. Defektif olan yanlış eşleşme tamir sistemi, hücre içindeki birçok gende mutasyona (genomik instabilite) yol açar. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda, G-ACa'ların önemli bir kısmının MSI özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Literatürde, MSI tip G-ACa'ların, tüm G-ACa'lar arasında görülme sıklığı %7,5-%22 aralığında değişmektedir [242]. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, 240 olgunun 29'unda (%12,1) DNA yanlış eşleşme tamir ("*mismatch repair*"; MMR) protein (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) kaybı (*deficient* MMR; dMMR) saptanmıştır. Çalışmamızda, dMMR grupta, literatürle uyumlu olarak, MLH1 ve PMS2 kaybı dominant patern (%86,2) olarak izlenmiştir. Literatürde, bu durumun çoğunlukla MLH1 metilasyonuna bağlı olarak geliştiği bildirilmiştir [20]. Olgularımızın büyük kısmında, MLH1 metilasyonu değerlendirilmediği için (raporlanan sınırlı olgu dışında), benzer analize bulgularımızda yer verilmemiştir.

Literatürde, MSI G-ACa'larda, T53 mutasyonlarının görülmediğini ileri süren çalışmaların [243] yanısıra, aberran E-kaderin veya aberran p53 ekspresyonunun görülebileceğini rapor eden çalışmalar [244, 245] da bulunmaktadır. Bu durum, CDH1 genindeki hipermetilasyon ve TP53 geninde sıklıkla izlenen heterozigosite kaybının (*loss of heterozygosity*) yarattığı değişimlere bağlanmaktadır. Çalışmamızda, dMMR grup içerisinde, 14 olguda aberran p53 ekspresyonu ve 2 olguda aberran E-kaderin ekspresyonu saptanmıştır. Literatürde, MSI G-ACa'larda, aberran E-kaderin/p53 ekspresyonu saptanmasının prognostik açıdan önem taşımadığını öne süren çalışmalar yer almaktadır [20]. Bu nedenle çalışmamızda aberran E-kaderin/p53 ekspresyonu gösteren 16 olgu, dMMR grup içerisinde değerlendirilmiştir.

dMMR G-ACa'ların, çoğunlukla Lauren'e göre intestinal tip, DSÖ sınıflamasına göre tubuler morfoloji olduğu bildirilmekle birlikte, literatürde farklı histolojik morfolojilerin de izlenebileceği belirtilmiştir. MSI G-ACa'ların arasında

diffüz fenotip oranlarını; Gonzalez ve ekibi [237] %47, Yoon ve ekibi [236] %17,4, Marcus ve ekibi [235] %45,2, Del Arco ve ekibi [24] %14,8, Kim ve ekibi [21] %33,3 şeklinde bildirmiştir.

MMR proteinlerinin fonksiyonel kaybı, DNA replikasyon hatalarının birikimine bağlı, tümör hücrelerinde yüksek mutasyon yüküne neden olur. Yüksek derecede mutant tümör hücreleri, neo-antijenler üreterek, T hücrelerini stimüle eder ve tümörün immün hücreler tarafından infiltrasyonu tetikler [246]. Hissong ve ekibi., medüller tip karsinomların %38'inde MSI saptandığını belirtmişlerdir [247]. Mathiak ve ekibinin çalışmasında ise, MSI G-ACa'ların %62'sinde medüller fenotip saptanmıştır [248].

Çalışmamızda dMMR grupta, %62 (n=18) tubuler; %10,3 (n=3) medüller, %10,3 (n=3) zayıf koheziv, %3,4 (n=1) müsinöz, %13,7(n=4) mikst morfoloji saptanmıştır. Bir olguda, tubuler morfolojiye %10 oranında mikropapiller paternin eşlik ettiği görülmüştür. Çalışmamızdaki medüller G-ACa'ların %37,5'i, tubuler/papiller G-ACa'ların %18'i, zayıf koheziv tip G-ACa'ların %9,6'sı, müsinöz G-ACa'ların %6,25'i, mikst tip G-ACa'ların %4,7'si, dMMR grupta yer almıştır. Literatürle uyumlu olarak, dMMR G-ACa'ların, genellikle tubuler morfolojide karşımıza çıktığını, medüller morfoloji gösteren tümörlerde daha sık olduğunu göstermekle birlikte; dMMR G-ACa'lar için spesifik bir morfolojik pattern tanımlanamayacağını göstermiştir.

MSI G-ACa'ların, mikrosatellit stabil (MSS) G-ACa'lara göre; klinikopatolojik, moleküler ve kemoterapi/ immunotreapiye yanıt açısından farklı özellikler taşıdıkları bildirilmiştir [246]. MSI G-ACa'larda; ileri yaş, kadın cinsiyet, midede distal yerleşim, Lauren intestinal tip, yüksek lenfositik yanıt, düşük oranda lenf nodu tutulumu ve iyi klinik gidiş sıklıkla rapor edilen bulgular arasındadır. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, dMMR grupta, yaş, histolojik tip ve lenfositik yanıt açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. dMMR grupta görülen yaş ortalaması, diğer moleküler gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (ortalama 71 yaş). Lenfositik yanıt varlığı, p53 aberran grup ile birlikte, diğer moleküler gruplardan daha yüksek orandadır. Histolojik tip olarak, p53 aberran grup ile birlikte Lauren intestinal tip ve DSÖ tubuler morfolojide görölme

oranları diğer gruplara göre anlamlı şekilde daha yüksektir. dMMR grupta, pN0 (%41,4) ve pN1 (%20,7) oranları diğer gruplara göre yüksektir, ancak bu değerler gruplar arası istatistiksel farklılık olarak yansımamıştır ($p>0,05$). Ek olarak, çalışmamızda, Zhang ve ekibinin çalışmasına benzer şekilde [249], dMMR grupta perinöral invazyon negatifliği, diğer gruplarla karşılaştırıldığı zaman, istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir. Perinöral invazyonun daha az oranda izlenmesinin, dMMR G-ACa'lardaki iyi klinik gidişte etkin olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda, nüks ve sağ kalım oranları ile genel sağ kalım ve nüksüz sağ kalım süreleri açısından, dMMR grupta diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmemiştir. Ancak, istatistiksel anlamlılık göstermese de genel sağ kalım ve nüksüz sağ kalım sürelerinin diğer gruplara oranla uzun olduğu dikkati çekmiştir.

MSI ve EBV (+) G-ACa'ların yüksek oranda PDL-1/ PD-1 pozitifliği ile korele olduğu bildirilmiştir [250]. Kim ve ekibi, MSI özellik gösteren ve EBV (+) metastatik G-ACa'ların, anti-PD-1 tedavisine (pembrolizumab) dramatik yanıt verdiğini ileri sürmüştür [251]. Bu çalışmada, terapötik yanıt oranı MSI tip olanlarda %85,7 oranındayken, EBV (+) olanlarda %100 oranındadır. Bu sonuçlar, MSI ve EBV pozitifliği açısından, G-ACa'ların rutin olarak değerlendirilmesi gerektiğini ve immunoterapi açısından belirleyici önem taşıdığını göstermektedir. Cerrahi sonrası hastaların tedavi protokolleri bilinmediği ve çalışmamızda PDL-1 değerlendirilmediği için, çalışmamızda bu konuda yorum yapılamamıştır.

° **E-kaderin- aberran G-ACa (Grup 3):** Detaylı genetik analiz yöntemlerine dayanarak oluşturulan TCGA moleküler sınıflamasında, EBV (+) ve MSI özellik gösteren grup belirlendikten sonra; geri kalan olgular, anöploidi (SCNAs; *extensive copy number aberrations*) derecelerine göre genomik stabil (GS) ve kromozomal instabil grup olarak ikiye ayrılmıştır [19]. Bu dört moleküler grubun genetik özellikleri incelendiği zaman, hücre adhezyonu/motilitesiyle ilişkili olan CDH1, RHOA veya CLDN18 gen değişimlerinin özellikle GS grupta daha yüksek oranda olduğu (sırasıyla %37, %15, %15) rapor edilmiştir [19]. Literatürde henüz netlik kazanmamış olmakla birlikte, CDH1 ve RHOA'daki genetik ve epigenetik değişimlerin E-kaderin protein ekspresyonunu azalttığını ileri süren çalışmalar yer almaktadır [20, 252, 253]. Bu doğrultuda çalışmamızda, TCGA sınıflamasındaki GS grup, literatürdeki G-ACa'ları İHK ve İSH ile sınıflandıran diğer çalışmalara benzer şekilde, aberran E-kaderin

ekspresyonuna dayalı olarak belirlenmiştir. GS grubu tanımlamak için, Yoon ve ekibinin çalışmasında yalnız morfoloji (Lauren'e göre diffüz fenotip) baz alınırken [236], Koh ve ekibinin çalışmasında, gruplamalarda E-kaderin İHK'sı ile morfoloji birlikte değerlendirilmiştir [141]. Bizim çalışmamızda, GS grup tanımlanırken, yalnız İHK sonuçları göz önüne alınmıştır.

Çalışmamızda, EBV (+) ve dMMR olgular saptandıktan sonra, Setia ve ekibinin çalışmasına [20] benzer şekilde, ilk olarak aberran E-kaderin ekspresyonu ile karakterize olan olgular tanımlanmıştır. Taksonomik sekans olarak E-kaderin-aberran tip ekspresyon gösteren olguların p53 aberran tip ekspresyon gösteren olgulardan daha önce gruplandırılmasının nedeni, TP53 mutasyonlarını zayıf koheziv karsinom gelişiminde geç dönemde meydana gelen bir genetik değişiklik olarak rapor eden çalışmaların literatürde vurgulanmasıdır [254, 255].

Literatürde, aberran E-kaderin ekspresyonu için kullanılan İHK değerlendirme kriterleri farklılık göstermektedir [22, 23, 230]. Çalışmamızda E-kaderin ekspresyonuna göre olgular 5 gruba ayrılmıştır; intakt (< %10 komplet membranöz ekspresyon kaybı), heterojen +1/+2/+3 ($\geq$ %10- <%90 komplet membranöz ekspresyon kaybı), kayıp (>%90 komplet membranöz ekspresyon kaybı). Beş grup arasında genel ve nüksüz sağ kalım analizlerinde anlamlı farklılık saptanmadığı ($p>0,05$) için, çalışmamızda literatürdeki çoğu çalışmaya benzer şekilde, yalnız >%90 komplet membranöz ekspresyon kaybı olan olgular "*aberran*" olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda yer alan 240 olgudan 31'inde (%12,9) *aberran* E-kaderin ekspresyonu izlenmiştir. Bu oran, Setia ve ekibinin çalışmasında %21 [20], Ahn ve ekibinin çalışmasında %16 [22], Birkman ve ekibinin çalışmasında %11,4 [23], Marcus ve ekibinin çalışmasında %7,3 [235] oranındadır.

TCGA'daki moleküler gruplar histolojik tipe göre incelendiği zaman, genomik stabil grubun diğer gruplara göre daha yüksek oranda (%73) Lauren diffüz fenotip morfolojide olduğu görülmüştür. TCGA çalışmasında GS grupta yer alan olguların yaş ortalaması diğer gruplara göre daha düşüktür [19]. Çalışmamızda da E-kaderin aberran grupta diğer moleküler gruplara göre daha yüksek oranda Lauren diffüz tip/ DSÖ zayıf koheziv tip saptanmış olmakla birlikte, yaş açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmemiştir.

Ahn ve ekibinin çalışmasındaki E-kaderin aberran grupta [22] ve TCGA sınıflamasının prognozla olan ilişkisini değerlendiren Sohn ve ekibinin çalışmasındaki GS grupta [256], diğer gruplara göre daha düşük sağ kalım oranı olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise E-kaderin aberran grupta, diğer gruplara göre sağ kalım, nüks, mortalite açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

° **p53-aberran ve p53-normal tip G-ACa (Grup 4 ve 5):** TCGA moleküler sınıflamasında, kromozomal instabil G-ACa'larda görülen en sık mutasyonun p53 mutasyonu (%71) olduğu bildirilmiştir. Bu doğrultuda, EBV (+), dMMR ve E-kaderin (-) grupları belirlendikten sonra, çalışma kapsamındaki diğer olgular, p53 İHK sonuçlarına üzere göre p53-aberran ve p53-normal olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

TP53 mutasyonunu yansıtan p53 immünekspresyon eşik değeri, çalışmalar arasında büyük farklılık göstermektedir. Önceki yıllarda, %5-10 oranında p53 ekspresyonunun TP53 mutasyonu ile ilişkili olduğu kabul edilmesine karşın, son yıllarda yapılan çalışmalarda p53 immünekspresyon değerlendirmesi büyük ölçüde değişikliğe uğramıştır. Ando ve ekibi, 2014 yılında yayınladıkları bir çalışmada, G-ACa'larda p53 ekspresyonu ile T53 mutasyonları arasındaki korelasyonu, moleküler ve İHK analizleri karşılaştırarak değerlendirmişlerdir [229]. Bu çalışmaya göre, $\geq$ %70 oranında nükleer boyanma yanlış anlamlı (*missense*) TP53 mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmada, %20-50 oranındaki dağınık boyanma (*scattered pattern*)'nın normal TP53 geni, %0-10 oranındaki boyanmanın %80 oranında normal TP53 geni ve %20 oranında anlamsız/yanlış anlamlı (*nonsense/missense*) T53 mutasyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Aynı doğrultuda, Cole ve ekibi, çalışmalarında, TP53 missense mutasyonların, $\geq$ %70 oranında p53 ekspresyon artışına yol açtığını öne sürmüşlerdir [228]. Ando ve ekibinden farklı olarak, Lax ve ekibi ise düşük orandaki p53 ekspresyonunun ($\leq$ %5) non/missense mutasyonlar ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [257]. Bu verileri göz önüne alarak çalışmamızda $\geq$ %70 ve $\leq$ %5 oranda p53 nükleer immünekspresyonu gösteren olgular p53-aberran grupta değerlendirilmiştir.

Çalışma kapsamındaki 240 olgudan 115'inde (%47), aberran p53 ekspresyonu izlenmiş; bu doğrultuda, literatürle uyumlu olarak, P53-aberran grup çalışmamızdaki olguların büyük kısmını oluşturmuştur. P53-aberran grup, Lauren sınıflamasına göre

intestinal tip (%62,6) ve DSÖ sınıflamasına göre tubuler tipe (%54,8) yüksek oranda korelasyon göstermiştir. Benzer ilişki literatürde de belirtilmiştir [19, 20]. P53-*aberran* grup, TCGA sınıflamasında tirozin kinaz reseptör (HER2, EGFR, VEGFR, c-MET, FGFR) amplifikasyon oranının yüksek olduğu grup olarak bildirilmiştir. Benzer şekilde, çalışmamızda, p53 aberran gruptaki HER2 pozitiflik oranı (HER2-İHK skor 3), diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir.

Çalışmamızdaki 240 olgudan 56'sında (%23,4), p53 ekspresyonu normal olarak değerlendirilmiştir. Bu grup, Lei ve ekibinin moleküler sınıflamasındaki metabolik grup, ACRG moleküler sınıflamasındaki MSS/p53 normal grup ile örtüşmektedir. Lei ve ekibi, SPEM (*spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia*)'in, normal mide mukozası ile metabolik grup arasında bir ara basamak olabileceğini ileri sürmüşlerdir [13]. Ancak, çalışmamızda, çevre gastrik mukozada SPEM varlığı açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.

HER2, hedefe yönelik tedavide, güncel klinik pratikte kullanılan tek biyolojik belirteç [141]. Literatürdeki çalışmalarda, HER2 ekspresyon artışı ve/veya HER2 amplifikasyonunun G-ACa prognozu üzerine etkisi netlik kazanmamıştır [7]. HER2'nin G-ACa'larda prognoz üzerine etkisi, çalışmamızın amaçlarından biri olmamakla birlikte, patoloji raporlarında bilgilerine ulaştığımız sonuçlara dayanarak HER2 ile olgulara ait sağ kalım (genel ve nüksüz) ilişkisi açısından, istatistiksel anlamlılık elde edilmemiş ve hastalara ait cerrahi sonrası uygulanan tedaviye yönelik hasta kayıtlarında bilgiye ulaşılamamıştır. Literatürde, çalışmamızda olduğu gibi HER2 ekspresyon artışı ve/veya HER2 amplifikasyonunun sağ kalım üzerine etkisinin gösterilemediği çalışmalar bulunmaktadır [258].

Çalışmamızda NTRK'nın, G-ACa'larda hedefe yönelik tedavi amaçlı kullanılabilecek olası bir biyolojik belirteç olabilir mi sorusunu yanıtlayabilmek için, İHK (pan-TRK-EPR17341) yöntemi uygulanarak NTRK gen füzyonlarının G-ACa'lardaki görülme sıklığı ve literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak, moleküler çalışmaları baz alan G-ACa grupları ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Sık görülen malign tümörlerde, NTRK gen füzyon insidansının çok düşük oranda (çoğunlukla <%1) olmasına karşın, son yıllarda yapılan çalışmalarda NTRK füzyonlarına karşı hedefe yönelik tedavilerden alınan sonuçların etkileyici düzeyde

olması, NTRK1/2/3 füzyon genlerinin saptanmasını önemli hale getirmiştir [231]. TRK inhibisyonunun klinik etkisi öncelikle larotrectinib ve entrectinib ile tedavi edilen TRK füzyonu içeren tümörlerde rapor edilmiştir [33, 208]. Larotrectinib (VITRAKVI), yetişkin ve pediatrik hastalardaki NTRK gen füzyonu içeren solid tümörlerin tedavisinde kullanılmak üzere 2018 yılında FDA onayı almıştır. Yapılan araştırmalarda, füzyon dışındaki NTRK gen değişimlerine karşı TRK inhibitörleri ile terapötik yanıt elde edilemediği belirtilmektedir [166].

NTRK 1, 2 veya 3 gen füzyonları sonucu onkojenik TRK aktivasyonu oluşmasının ana mekanizması, NTRK genlerinin kinaz aktivitesine sahip hücre-içi bölgeyi kodlayan 3' sekanslarının, farklı gen partnerlerinin 5' sekansları ile bir araya gelmesi sonucu hibrid gen oluşmasıdır. Sonuç olarak, hibrid genler tarafından hücre-dışı ligand bağlayıcı bölge içermeyen, ligand bağımsız tirozin kinaz aktivasyonu gösteren onkoproteinler üretilir [144].

NTRK füzyonları, İHK, FISH, PCR ve DNA/RNA bazlı NGS gibi farklı teknikler yardımıyla saptanabilir. Moleküler testler, NTRK gen anormalliklerini saptamak için en duyarlı ve özgül teknik olarak kabul edilmektedir [31]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, İHK'nın TRK füzyonu içeren olguları taramadaki potansiyel rolü üzerinde yoğunlaşmıştır. Literatürde, farklı pan-TRK klonlarına bağlı olarak değişen oranlarda tümör ekspresyon düzeyleri bildirilmektedir [259]. Çalışmalarda en sık kullanılan klon pan-TRK EPR17341'dir. Bu antikor her üç TRK proteininde ortak olarak bulunan tirozin kinaz bölgesindeki C-terminal epitopa bağlanarak reaksiyon gösterir. Birçok çalışmada pan-TRK için en az %1 oranındaki tümör hücresinde herhangi bir yoğunlukta olan boyanma pozitif olarak kabul edilmekle birlikte, standardize edilen eşik değer ve/veya skorlama sistemi günümüzde bulunmamaktadır. Boyanma paterni, NTRK füzyon gen partnerine bağlıdır; membranöz, sitoplazmik, perinükleer veya nükleer boyanma görülebilir [192].

Çalışmalar, pan-TRK için duyarlılığı %75- %96,7 aralığında, özgüllüğü %92- %100 aralığında göstermektedir [194]. Özellikle NTRK3 füzyonları için düşük oranda duyarlılık bildirilmiştir. Solomon ve ekibinin çalışmasında NTRK1, 2 ve 3 için duyarlılık sırasıyla %96, %100 ve %79'dir [188]. Gatalica ve ekibinin çalışmasında, NTRK3 füzyonu içeren tümörlerin %45'inde pan-TRK ile yanlış negatiflik

saptanmıştır [196]. Diğer açıdan, pan-TRK antikoru, füzyon spesifik bir antikor değildir. TRK proteinleri fizyolojik olarak nöral ve düz kas dokusunda eksprese edildiği için, gastrointestinal stromal tümör, nöroendokrin tümör, nöroblastom, glioblastom, leiomyosarkom gibi nöral veya düz kas farklılaşma gösteren tümörlerde düşük özgüllük oranları rapor edilmiştir [188].

NTRK gen füzyonlarını saptamak için kullanılacak metod, tümörün histolojik tipine ve NTRK füzyonlarının tümörlerde görülme sıklığına bağlı olarak değişim göstermektedir [31]. NTRK gen füzyonları için farklı çalışma grupları tarafından önerilen test algoritmaları olmakla birlikte, henüz ortak olarak kabul edilen bir kılavuz yoktur. Genel olarak kabul edilen görüş, NTRK füzyonlarını düşük sıklıkta içeren tümörlerde (küçük hücreli dışı akciğer kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, meme kanseri, melanom gibi), NGS gibi moleküler testler rutin olarak yapılamıyorsa, pan-TRK İHK analizinin çok yüksek duyarlılık oranına sahip olmamakla birlikte, TRK füzyonlarını saptamada bir tarama metodu olarak kullanılabileceği yönündedir [31]. TRK ekspresyonu saptanan olgular sonrasında NGS ya da FISH gibi daha ileri moleküler yöntemlerle mutlaka konfirme edilmelidir [31].

Literatürde, NTRK füzyon pozitif karsinomları, klinikopatolojik verilerle değerlendiren sınırlı sayıda çalışmada ortak olarak belirtilen özellikler; yüksek dereceli/az diferensiyel morfoloji, yaygın lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve kötü klinik seyirdir [159, 260]. Bu özelliklere sahip olan tümörlerin, NTRK füzyonu açısından şüphe uyandırması ve pan-TRK İHK analizi ile tarama yapılması önerilmektedir.

Literatürde yer alan az sayıda çalışmada, G-ACa'lara ait geniş vaka serilerinde, detaylı moleküler analiz yöntemleriyle (DNA/RNA sekanslama), NTRK füzyonu saptanmamıştır [166, 188, 189]. Lee ve arkadaşlarının çalışmasında, benzer şekilde 66 G-ACa'dan birinde İHK olarak TrkA ekspresyonu varlığı rapor edilmiş, ekspresyon saptanan bu tümörde FISH analizinde NTRK1 break-apart problemleri kullanılarak füzyon varlığı saptanmamıştır [261]. Arnold ve ekibinin çalışmasında, 372 G-ACa olgusunda yalnız pan-TRK ekspresyonu değerlendirilmiş, herhangi bir tümörde ekspresyon elde edilmemiştir [190]. Son olarak, Aya ve ekibine ait, Mart 2020'de yayınlanan, pan-TRK ile diffüz orta/güçlü şiddette ekspresyon gösteren bir gastrik

karsinom olgusunda, konfirmasyon amaçlı yapılan RNA sekanslama ile ATP1B-NTRK1 füzyonu olduğu bulunmuştur [191]. ATP1B-NTRK1 füzyonu, G-ACa tanımlanan ilk ve tek NTRK gen füzyonudur.

Çalışmamızda yer alan 240 olgudan 3'ünde pan-TRK ile çok az sayıda neoplastik hücrede immunekspresyon izlenmiştir. Ekspresyon izlenen 3 olgudan 2'sinde nükleer boyanma paterni, diğerinde sitoplazmik noktasal boyanma paterni vardır. Ekspresyon izlenen olguların gruplara göre dağılımına bakıldığında; 1 olgunun p53- *aberran* tip, 1 olgunun p53-normal, diğer olgunun ise EBV (+) grupta olduğu görülmüştür. Olguların üçü de mide duvar invazyon seviyesi açısından ileri evre (pT3 ve pT4) tümörlerdir. Ekspresyon izlenen üç olguda konfirmasyon amaçlı NTRK 1/2/3 FISH analizi uygulandığında, NTRK1, 2 ve 3 genlerindeki split oranının her üç olguda %5'den daha az orandadır. ESMO (*European Society for Medical Oncology*) tarafından ileri sürülen güncel kriterlere göre, %10 -15'den daha fazla tümör hücresinde, iki hibridizasyon probu sinyali büyüklüğünden daha uzak mesafeye ayrılan kırmızı ve yeşil renkli sinyal "split-apart sinyali" içeren olgular, füzyon pozitif olarak kabul edilmektedir [231]. NTRK genlerinde, gen füzyonlarına ek olarak; nokta mutasyonları, delesyonlar, gen amplifikasyonları, mRNA overekspresyonu gibi onkojenik ve/veya TRK inhibitörlerinin etkinliği için prediktif olup olmadığı hala net olarak bilinmeyen diğer somatik genomik değişimler bildirilmiştir [160-165]. Bu doğrultuda çalışmamızda saptanan pan-TRK İHK pozitifliğinin füzyon dışı mekanizmalarla gelişmiş olduğu düşünülebilir. Okamura ve ekibinin farklı tiplerdeki 13,467 pediatrik ve yetişkin hastaya ait tümör örneğinde yaptığı çalışmada, NTRK gen füzyonlarının görülme sıklığını %1, diğer NTRK gen değişimlerinin insidansının %14 olduğu saptanmıştır [166].

Pan-TRK negatif olan G-ACa'lar arasından ileri evreli beş olgu seçilerek (NTRK FISH kontrol grubu), NTRK 1/2/3 FISH analizi uygulanmıştır. Kontrol grubunu oluşturan beş olgunun iki tanesinde NTRK1 gen split oranı %10'dan fazladır (%10 ve %14). Bu sonuç pan-TRK İHK'sının tarama testi olarak kullanılmasını sorgulamamıza neden olmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda, İHK ve İSH analizleri yardımıyla, literatürdeki moleküler bazlı çalışmalar esas alınarak oluşturulan G-ACa gruplarının, çalışma

kapsamına aldığımız kendi popülasyonumuzdaki dağılımı belirlenmiştir. Histolojik sınıflamalara göre gruplardaki olguların dağılımı arasında anlamlı fark olmakla birlikte, hiçbir grup için özgün histolojik tip saptanmamıştır. Bu doğrultuda, hedef tedavileri yönlendirme açısından etkin olabilecek G-ACa gruplarının belirlenebilmesi için, İHK ve İSH yöntemlerinin rutin uygulanmasının önemli olduğunu bu çalışma göstermiştir.

Gruplar arasında, nüks ve mortalite riski ile genel ve nüksüz sağ kalım süreleri açısından çalışmamızda istatistiksel anlamlı fark gösterilememiştir. Çalışma kapsamındaki hastaların cerrahi sonrası tedavi rejimlerine yönelik bilgi bulunmaması nedeniyle bu konuda kesin yorum yapmak olası değildir ve çalışmamızda bazı gruplarda az sayıda olgu bulunması istatistiksel anlamlılığını sınırlamış olabilir.

Detaylı moleküler analizlere dayanarak yapılan sınıflamaların yerine, basit teknikler kullanılarak yapılan sınıflama yöntemlerinin bazı sınırlılıkları olduğu açıktır. En önemli problem, protein ekspresyonlarının, hücre içindeki kompleks moleküler değişiklikleri gösterme açısından yetersiz olmasıdır. Çalışmamızda, TMA analiz için, her bir olgudan, tümörü en iyi temsil ettiği düşünülen, morfolojik açıdan farklı alanlardan 3 mm çaplı dört örnek alınmıştır. TMA tekniği, literatürde, protein ekspresyon analizi açısından faydalı ve doğru bir metod olarak kabul edilmekle birlikte, özellikle G-ACa'lar gibi belirgin heterojenite gösteren tümörlerde, protein ekspresyonlarının doğruluk oranını etkilemiş olabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalarla, moleküler grupları belirlemek için daha yüksek özgünlük ve duyarlılık oranlarına sahip farklı İHK belirteçlerinin araştırılması ve bu belirteçlerin geniş hasta gruplarında değerlendirilmesi gerektiği açıktır.

Pan-TRK İHK ekspresyonu saptanan olgularımızda uygulanan FISH analiz sonuçları güncel kriterlere göre negatif kabul edilse de, çalışma ve kontrol gruplarında elde edilen FISH sonuçları bize, ilerleyen zamanlarda kapsamlı moleküler çalışmalara gereksinim olduğunu, NTRK'nın G-ACa'larda olası prediktif ve/veya prognostik açıdan anlamının araştırılmasının önemli olduğunu göstermiştir.

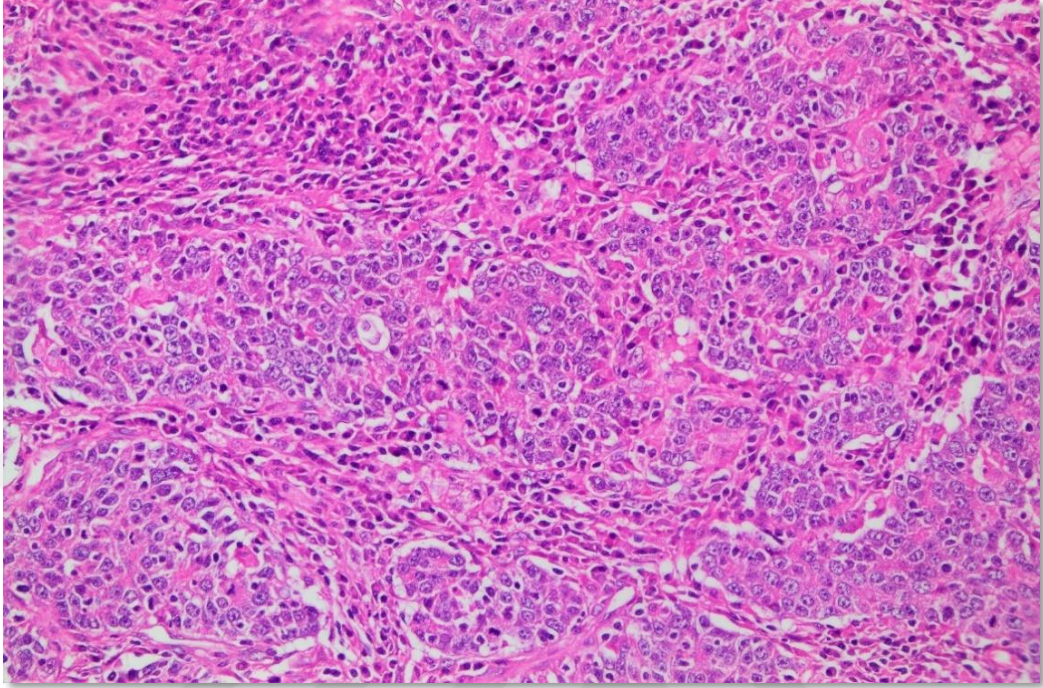
15. SONUÇLAR

- ❖ Çalışmamızda yer alan olguların takip süresi ortalama $19,97 \pm 20,83$ aydır.
- ❖ Çalışmaya katılan 240 olgudan; 98 olgu yaşarken (%40,8), 142 ölüm gözlenmiştir. Ortalama genel sağ kalım süresi $32,16 \pm 22,92$ aydır.
- ❖ Çalışmaya katılan 240 olgudan; 148 olguda nüks saptanmazken (%61,7), 92 olguda nüks saptanmıştır. Ortalama nüksüz sağ kalım süresi $19,31 \pm 20,67$ aydır.
- ❖ Makroskopik tip 1 (polipoid), düşük derece (derece1/2) ve erken evre mide duvar invazyon seviyesine (pT1+pT2) sahip olan olgularda artmış genel sağ kalım saptanmıştır.
- ❖ Olgularımızda; ileri evre lenf nodu metastazı (pN3), lenfatik invazyon, anjioinvazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınırda tümör pozitif olma durumunda, azalmış genel sağ kalım saptanmıştır.
- ❖ Olgularımızda; lenfatik invazyon, anjioinvazyon, cerrahi sınır tümör pozitif olma durumu ve desmoplastik yanıt varlığında, azalmış nüksüz sağ kalım tespit edilmiştir.
- ❖ Olgularımızda; lenfositik yanıt, metastatik lenf nodunda perinodal invazyon, HER2 durum sonuçlarına göre genel ve nüksüz sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.
- ❖ Çalışmamızda, immünohistokimya ve in situ hibridizasyon analizi kullanılarak 240 olgu sırasıyla 5 gruba ayrılmıştır; %3,7'sinin (n=9) EBV (+), %12,1'inin (n=29) dMMR, %12,9'inin (n=31) E-kaderin *aberran*, %47,9'unun (n=115) P53 *aberran* ve %23,4'ünün (n=56) P53 normal grupta olduğu saptanmıştır.
- ❖ Çalışmamızda, EBV (+) olgu sayısının sınırlı olması nedeniyle istatistiksel olarak diğer moleküler gruplara göre histomorfolojik ve sağ kalım özellikleri açısından anlamlı farklılık elde edilememiştir. Buna rağmen, olguların tümünün erkek olması, 6 olgunun (%66) proksimal lokalizasyonlu olması ve 7 olguda (%77) lenfositik yanıtın saptanması dikkat çekici özelliktedir.

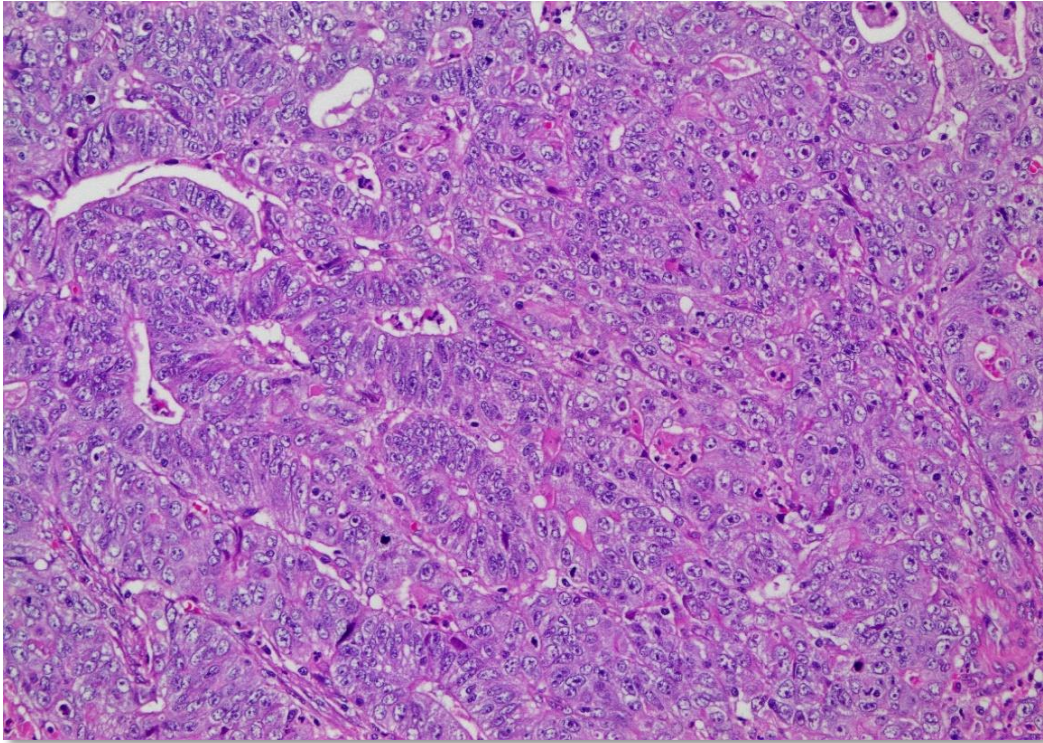
- ❖ Çalışmamızdaki EBV (+) olan 9 olgunun histolojik tipi incelendiği zaman; 2 olguda (%22) medüller karsinom, 5 olguda (%55) mikst tip karsinom (zayıf koheziv+tubuler), 1 olguda (%11) zayıf koheziv karsinom (taşlı yüzük komponenti içeren), 1 olguda (%11) tubuler karsinom (kötü diferensiyel/ solid patern baskın) görülmüştür.
- ❖ EBV (+) olguların tümünde İHK olarak yanlış eşleşme tamir proteinleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) intakt olarak saptanmıştır (*mutually exclusive patern*).
- ❖ dMMR grupta görülen yaş ortalaması, diğer moleküler gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (ortalama 71 yaş). Lenfositik yanıt varlığı, p53 *aberran* grup ile birlikte, diğer moleküler gruplardan daha yüksek oranda saptanmıştır. Histolojik tip olarak, p53 *aberran* grup ile birlikte Lauren intestinal tip/DSÖ tubuler tip görülme oranı diğer moleküler gruplara göre anlamlı şekilde daha yüksek oranda bulunmuştur. Perinöral invazyon, diğer moleküler gruplarla karşılaştırıldığı zaman, istatistiksel olarak anlamlı şekilde az oranda saptanmıştır.
- ❖ Çalışmamızda dMMR grupta yer alan 18 tubuler G-ACa olgusu dışında, 3 olguda medüller karsinom, 3 olguda zayıf koheziv G-ACa, 4 olguda mikst karsinom ve 1 olguda müsinöz karsinom saptanmıştır. Bir olguda ise tübüler morfolojiye %10 oranında mikropapiller paternin de eşlik ettiği görülmüştür.
- ❖ dMMR grupta, MLH1 ve PMS2 kaybı dominant patern (%86,2) olarak saptanmıştır.
- ❖ E-kaderin *aberran* grupta diğer moleküler gruplara göre daha yüksek oranda Lauren diffüz tip/ DSÖ zayıf koheziv tip saptanmış olmakla birlikte, yaş açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmemiştir. Yüksek dereceli olma oranının, E-kaderin *aberran* grupta diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görülmüştür.
- ❖ P53 *aberran* grubun, istatistiksel olarak anlamlı şekilde, Lauren intestinal tip (%62,6) ve DSÖ tubuler tipe (%54,8) yüksek oranda korelasyon gösterdiği saptanmıştır.
- ❖ P53 *aberran* gruptaki HER2 pozitiflik oranı (HER2 İHK skor 3), diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak saptanmıştır.

- ❖ Moleküler gruplara göre, olgularda, lenfatik invazyon, anjioinvazyon, desmoplastik yanıt, metastatik lenf nodu perinodal invazyon, cerrahi sınır, neoadjuvan tedavi, H.pylori, atrofi, intestinal metaplazi, SPEM, paneth hücre metaplazisi, displazi görülme oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.
- ❖ Tanımlanan 5 moleküler grup arasında, genel ve nüksüz sağ kalım oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.
- ❖ 240 olgudan 3'ünde pan-TRK ile az sayıda neoplastik hücrede zayıf immunekspresyon izlenmiştir. Konfirmasyon amaçlı yapılan NTRK 1/2/3 FISH analizinde, NTRK 1/2/3 genlerindeki split oranı her 3 olguda da %5'den daha az oranda saptanmıştır. Pan-TRK İHK negatif kontrol grubunu oluşturan beş olgunun iki tanesinde NTRK1 gen split oranı %10 (%10 ve %14)'dan fazladır.

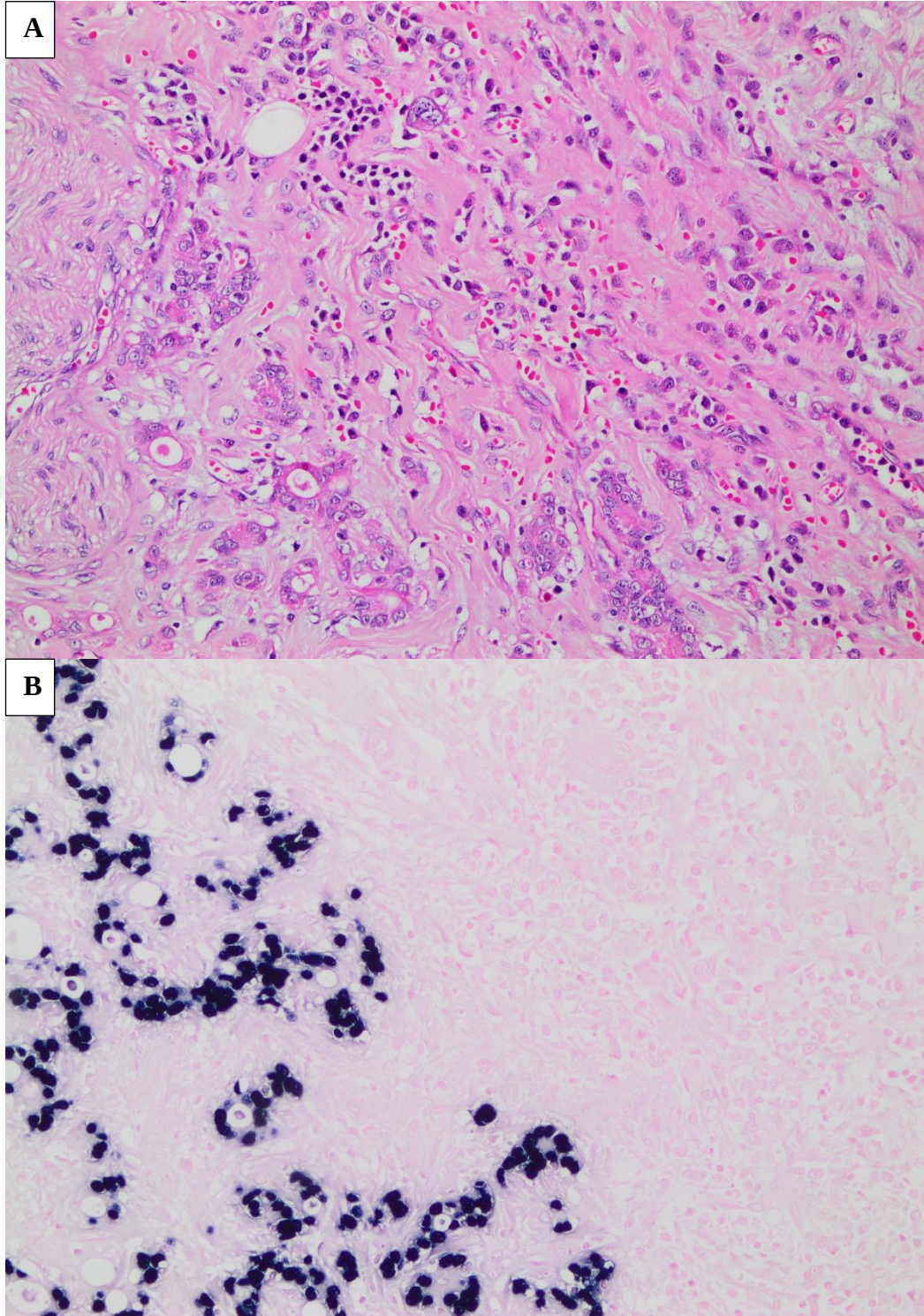
16. RESİMLER



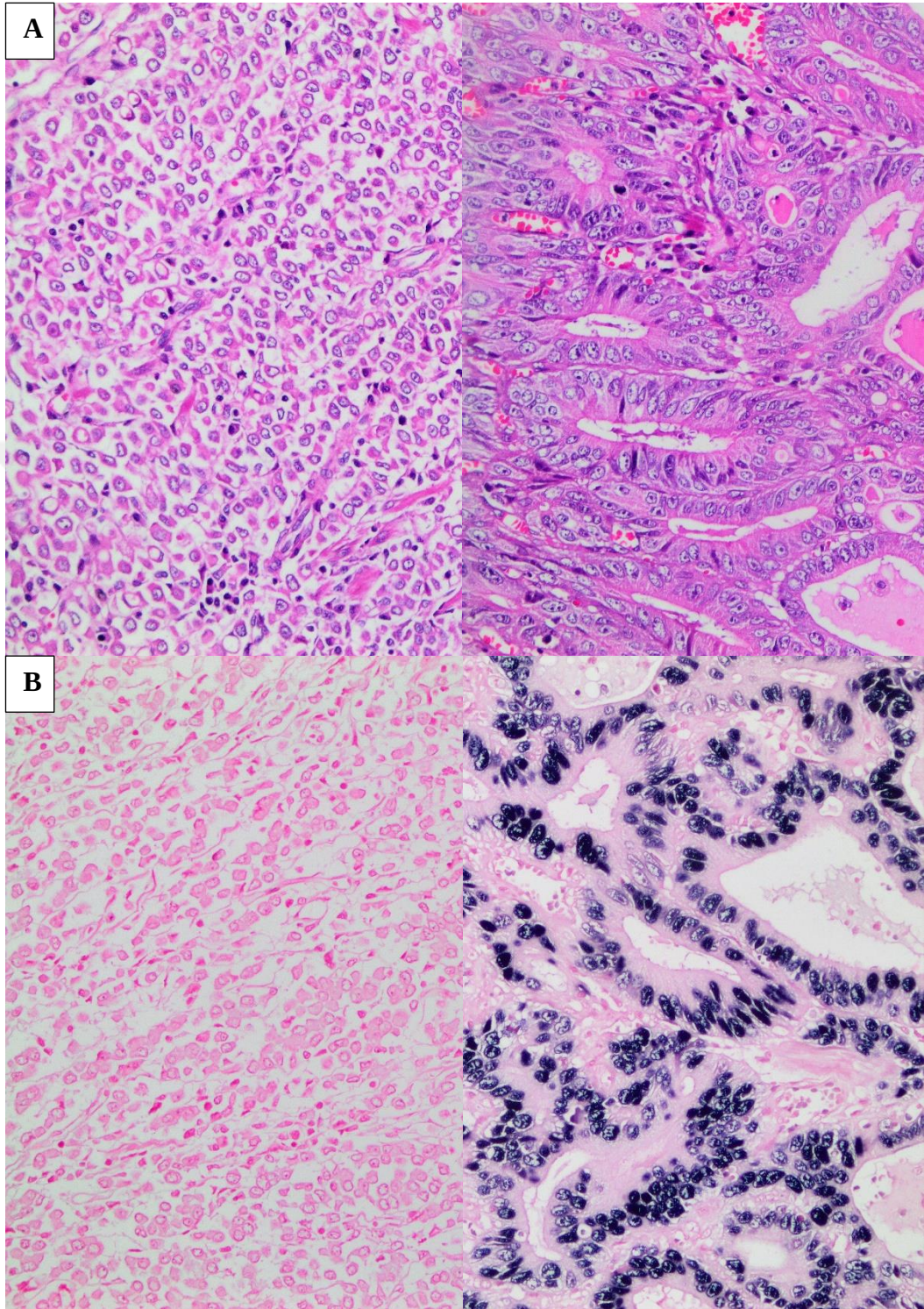
Resim 10. EBV (+) G-ACa; Medüller karsinom (H/Ex20)



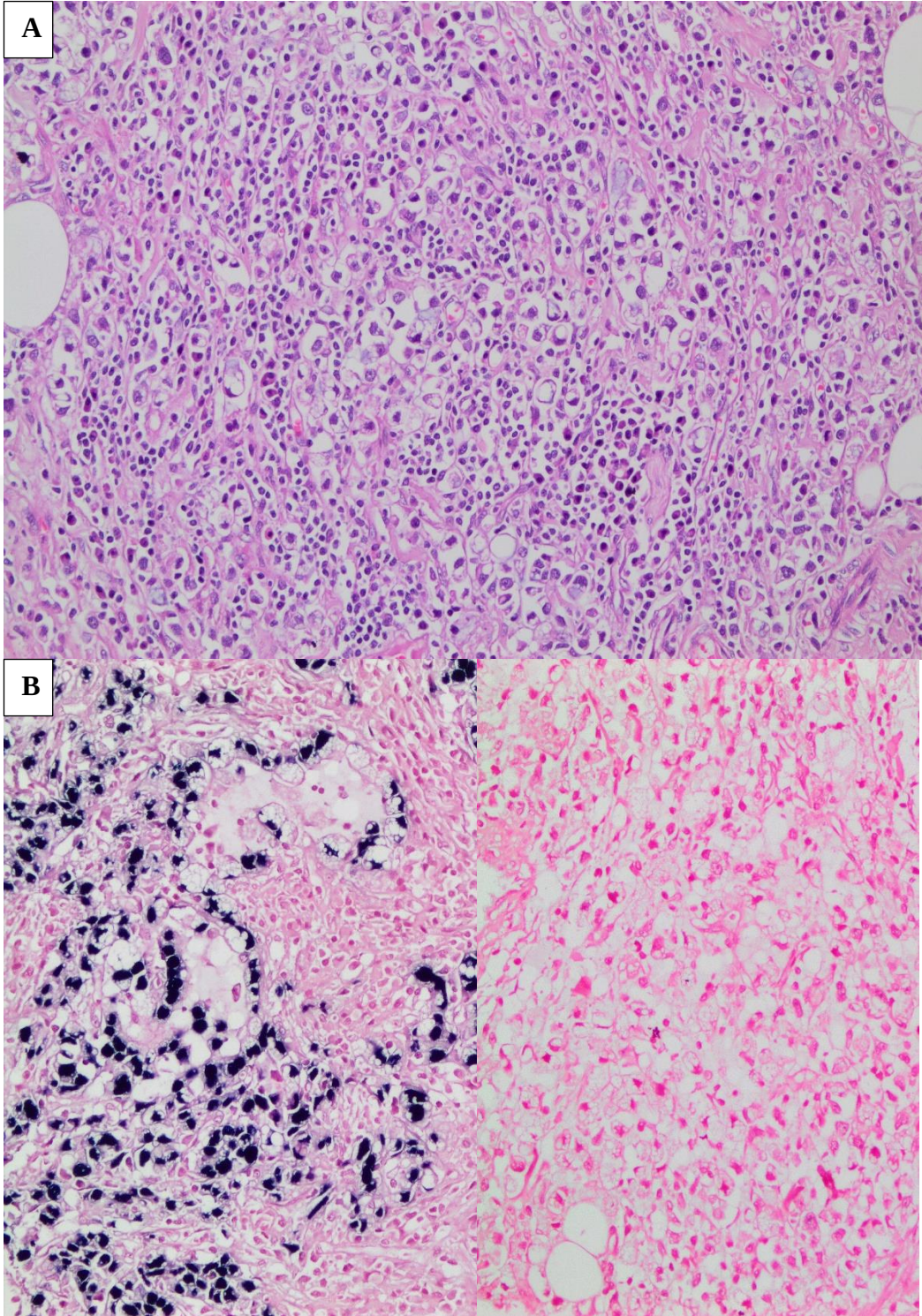
Resim 11. EBV (+) G-ACa; Tubuler adenokarsinom (H/E x20)



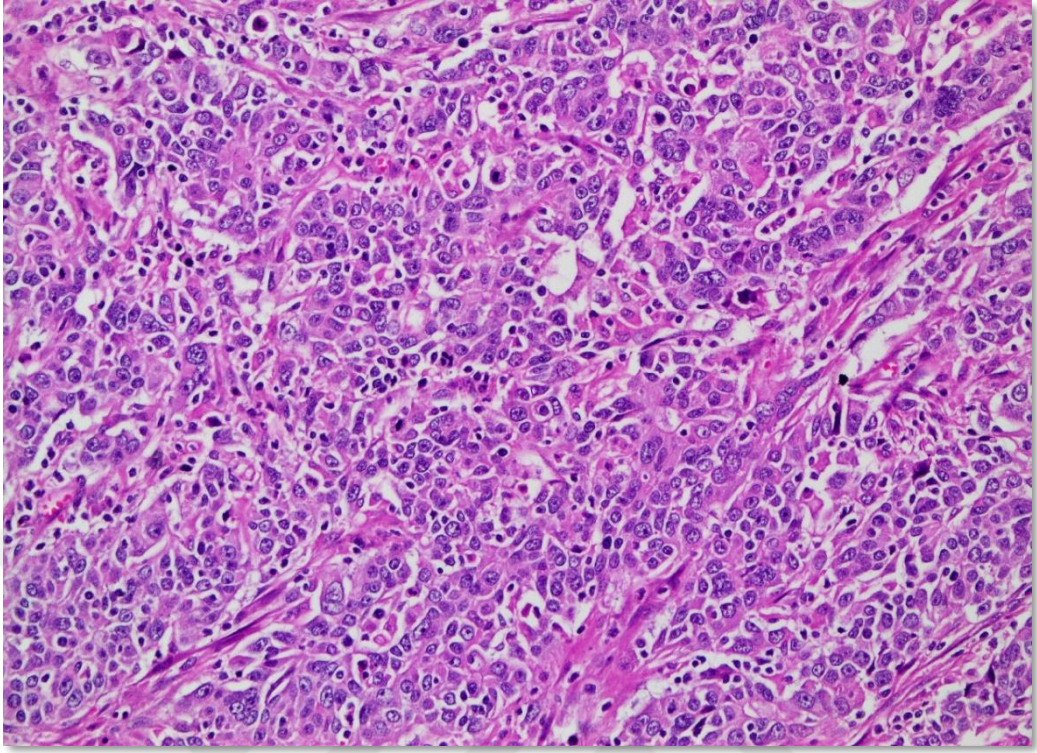
Resim 12. A. EBV (+) G-ACa; Mikst karsinom (H/Ex20), B. EBER CISH heterojen boyanma paterni; tubuler komponent pozitif, zayıf koheziv komponent negatif (CISHx20)



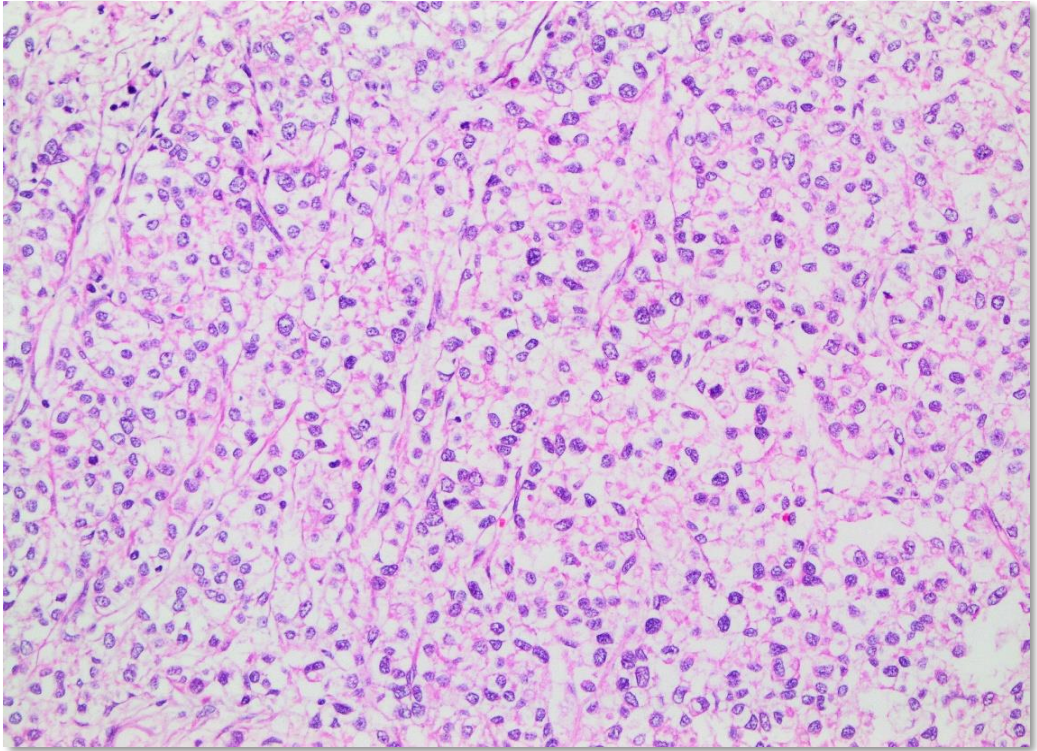
Resim 13. A. EBV (+) G-ACa; Mikst karsinom (H/Ex20), B. EBER CISH heterojen boyanma paterni; tubuler komponent pozitif, zayıf koheziv komponent negatif (CISHx20)



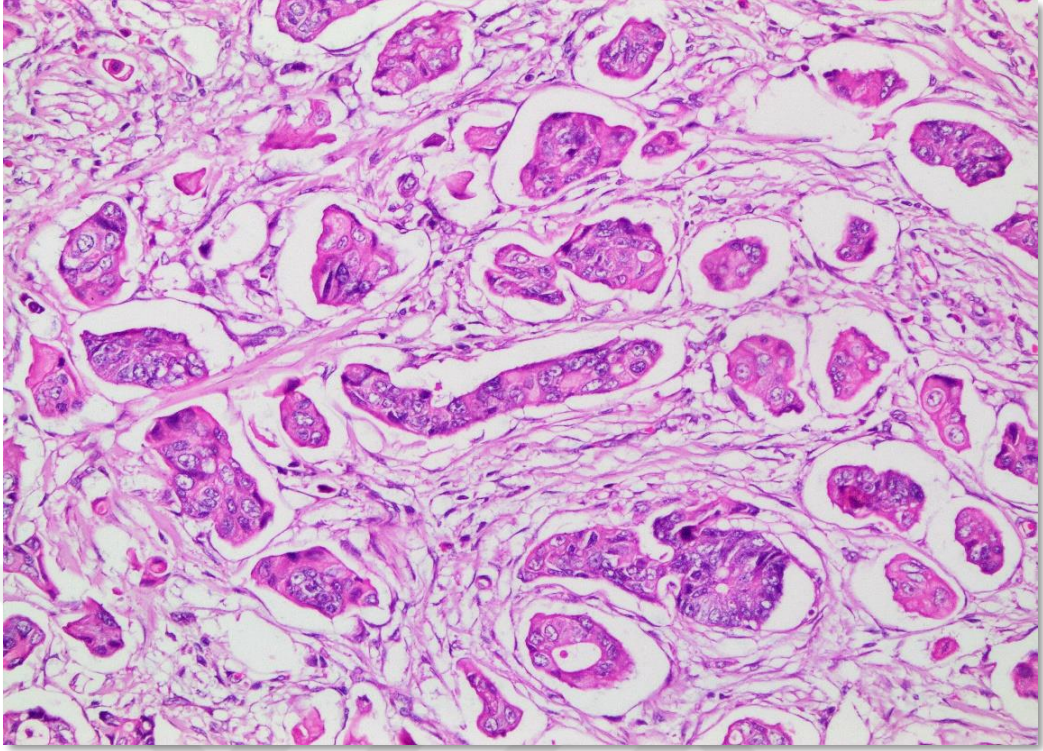
Resim 14. A. EBV (+) G-ACa; Zayıf koheziv karsinom (H/Ex20), B. EBER CISH heterojen boyanma paterni; belli belirsiz boyanma gösteren tubuler yapılar, diskoheziv tümör hücreleri negatif (CISHx20)



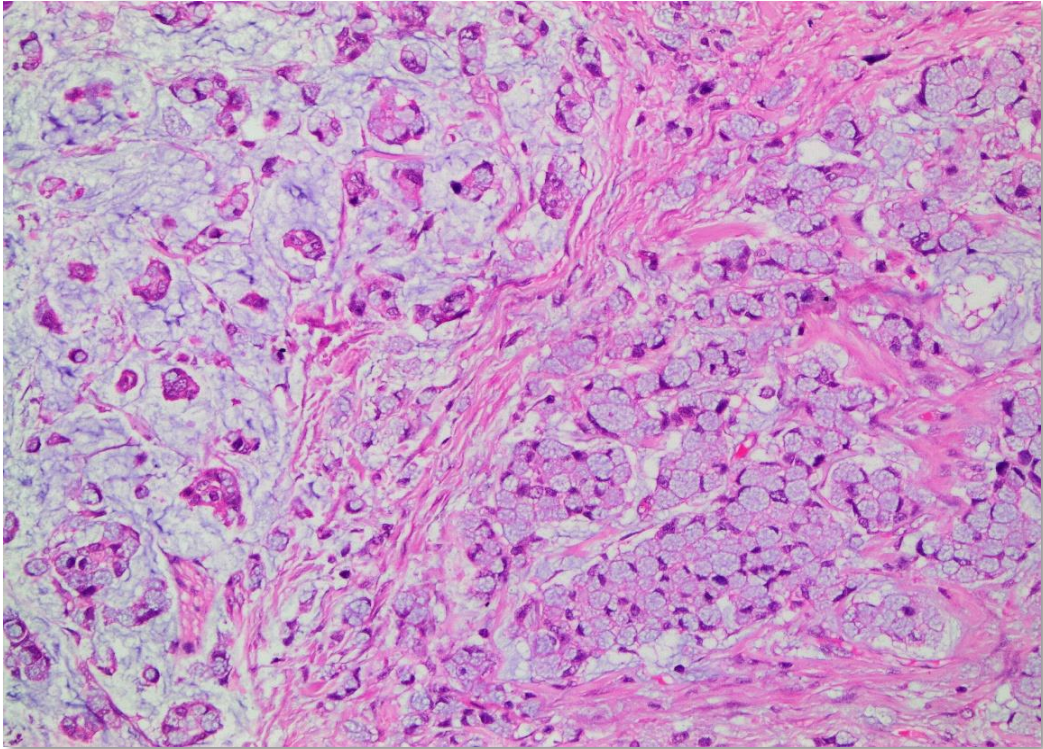
Resim 15. dMMR G-ACa; Medüller karsinom (H/E x20)



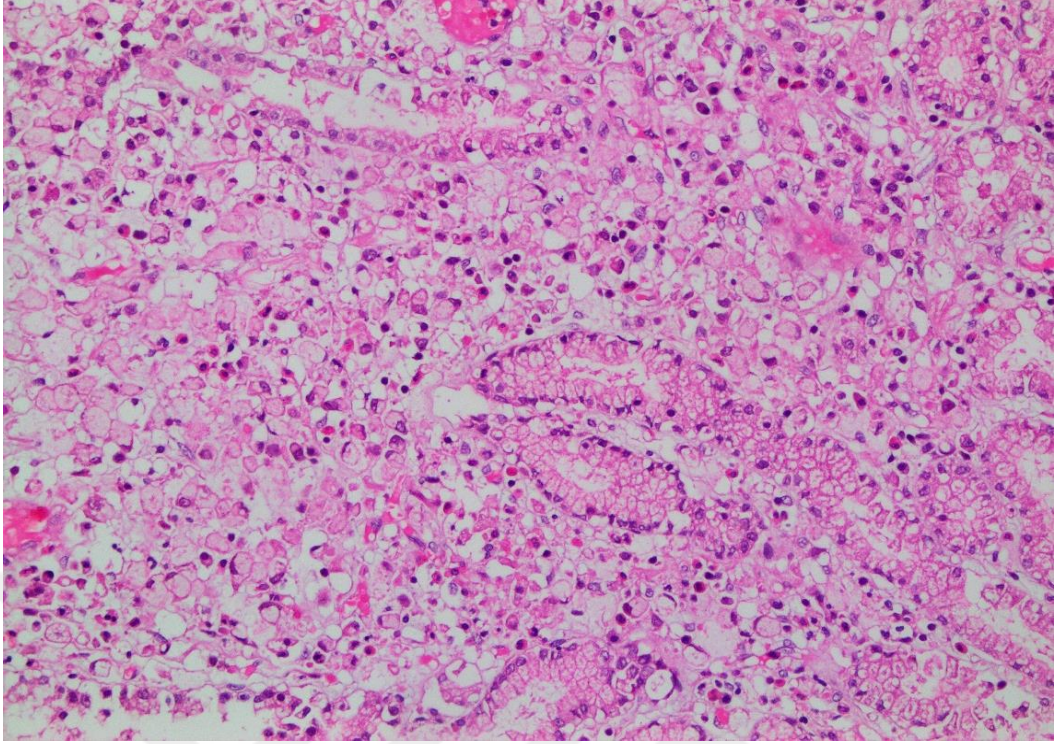
Resim 16. dMMR G-ACa; Tubuler adenokarsinom (H/E x20)



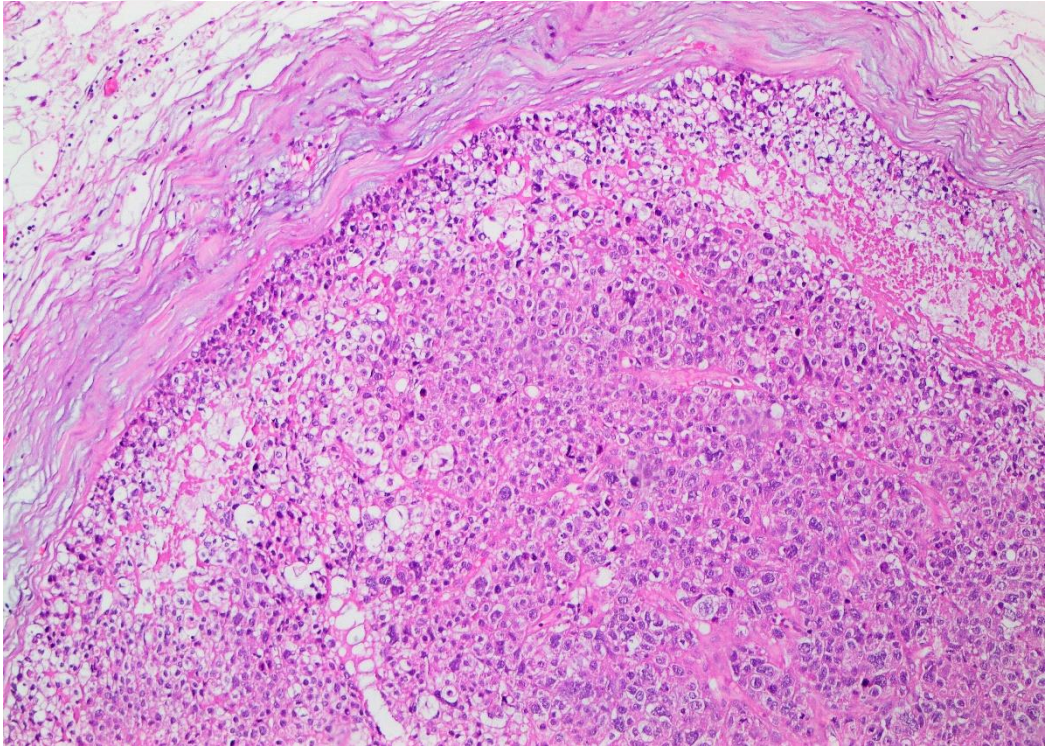
Resim 17. dMMR G-ACa; Mikropapiller patern gösteren tümör hücreleri (H/E x20)



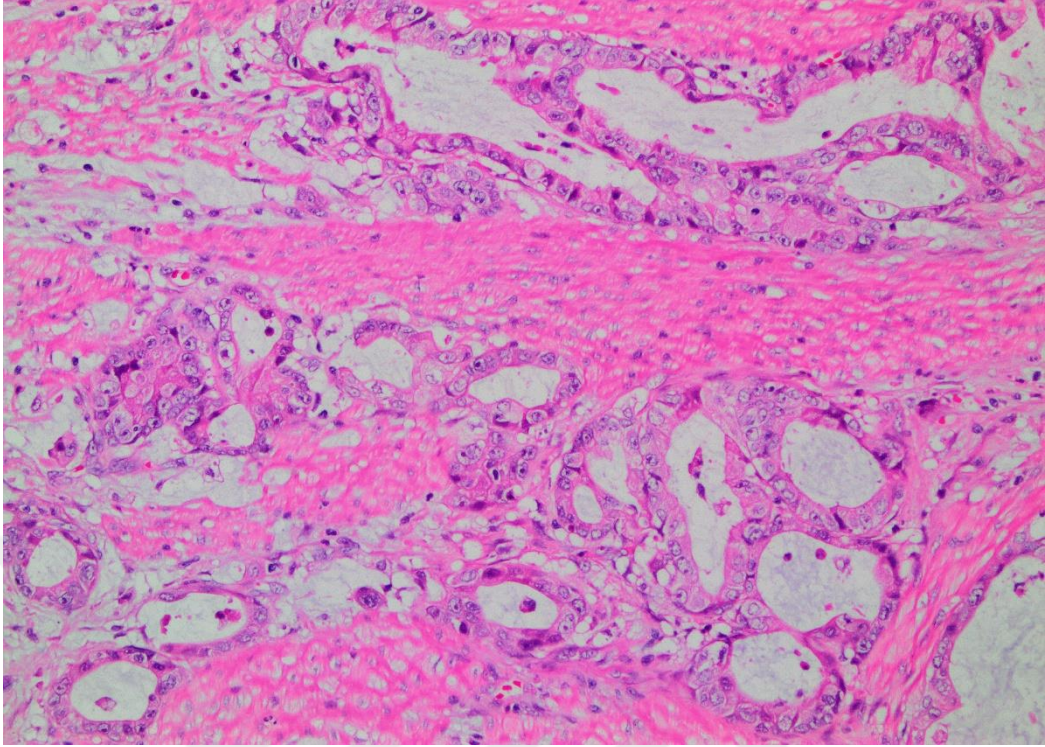
Resim 18. dMMR G-ACa; Müsinöz adenokarsinom, taşlı yüzük hücresi içeren (H/E x20)



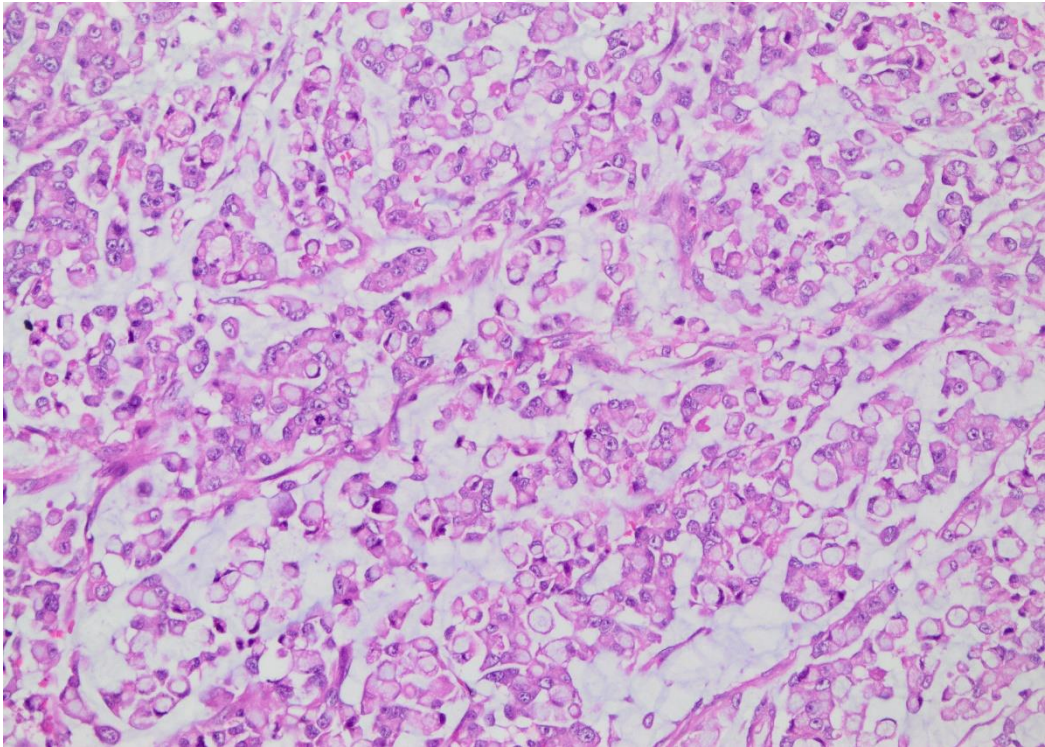
Resim 19. dMMR G-ACa; Zayıf koheziv karsinom, taşlı yüzük hücresi içeren (H/E x20)



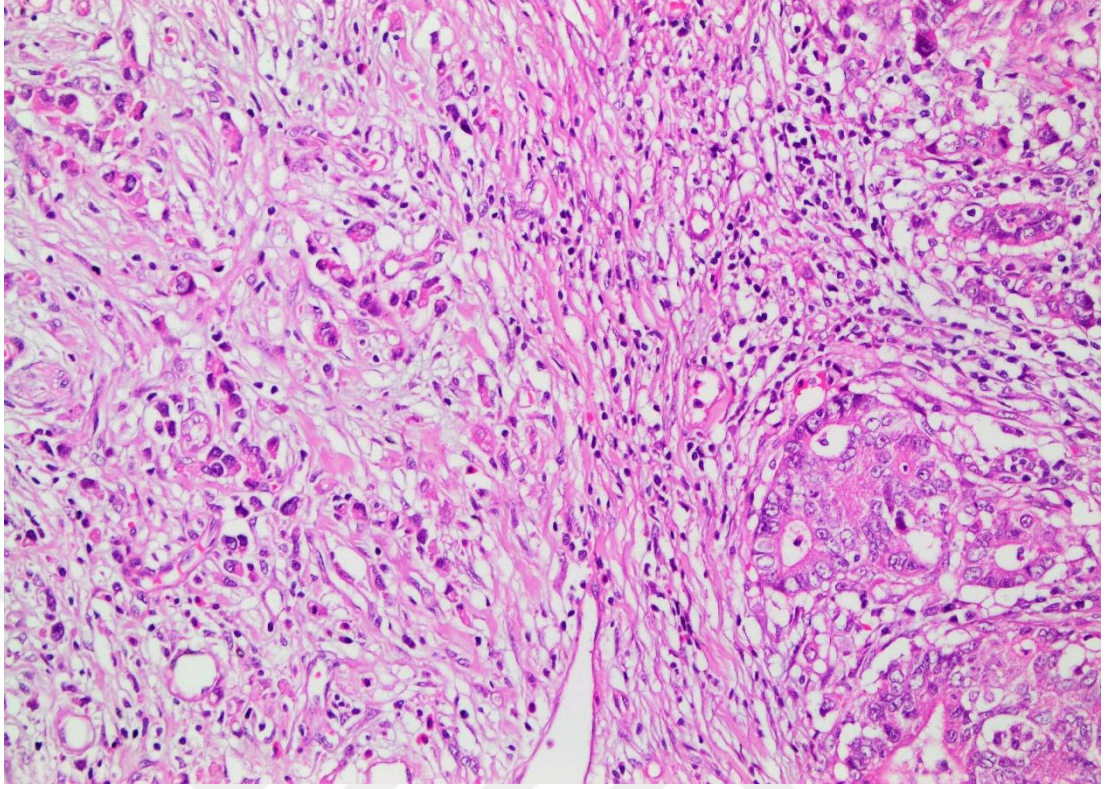
Resim 20. E-kaderin aberran G-ACa; Yolk sac benzeri karsinom (H/E x10)



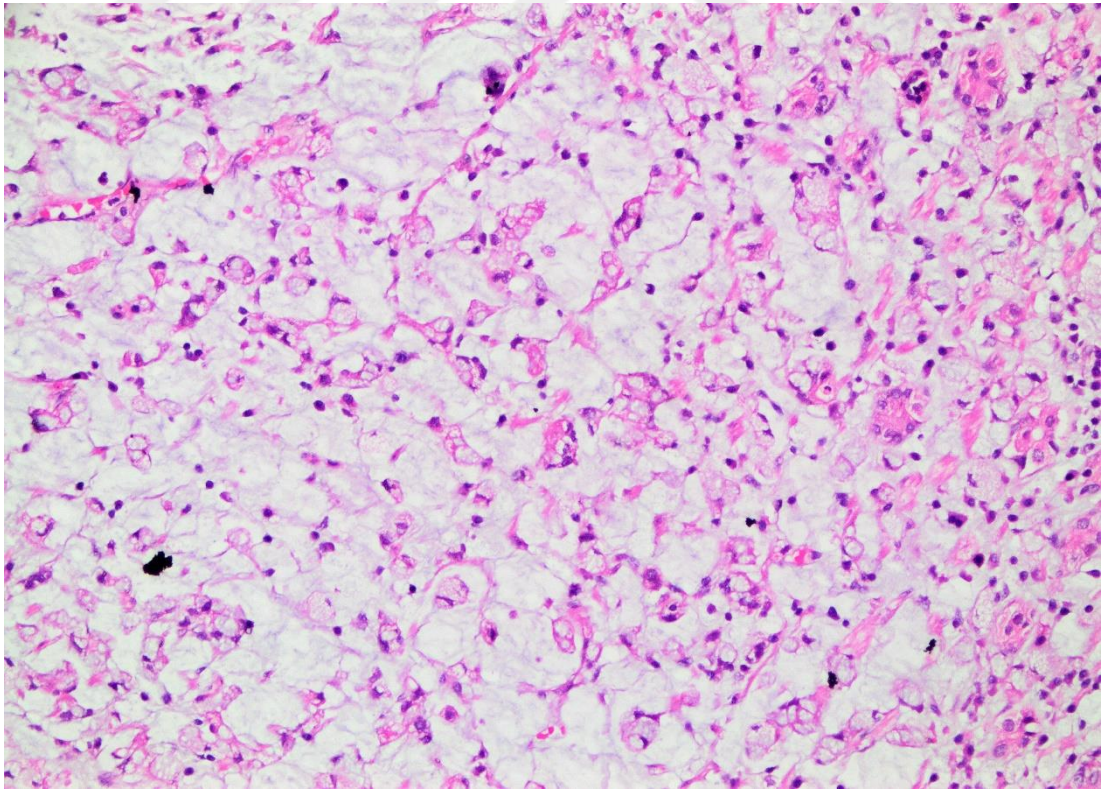
Resim 21. E-kaderin aberran G-ACa; Tubuler karsinom (H/E x20)



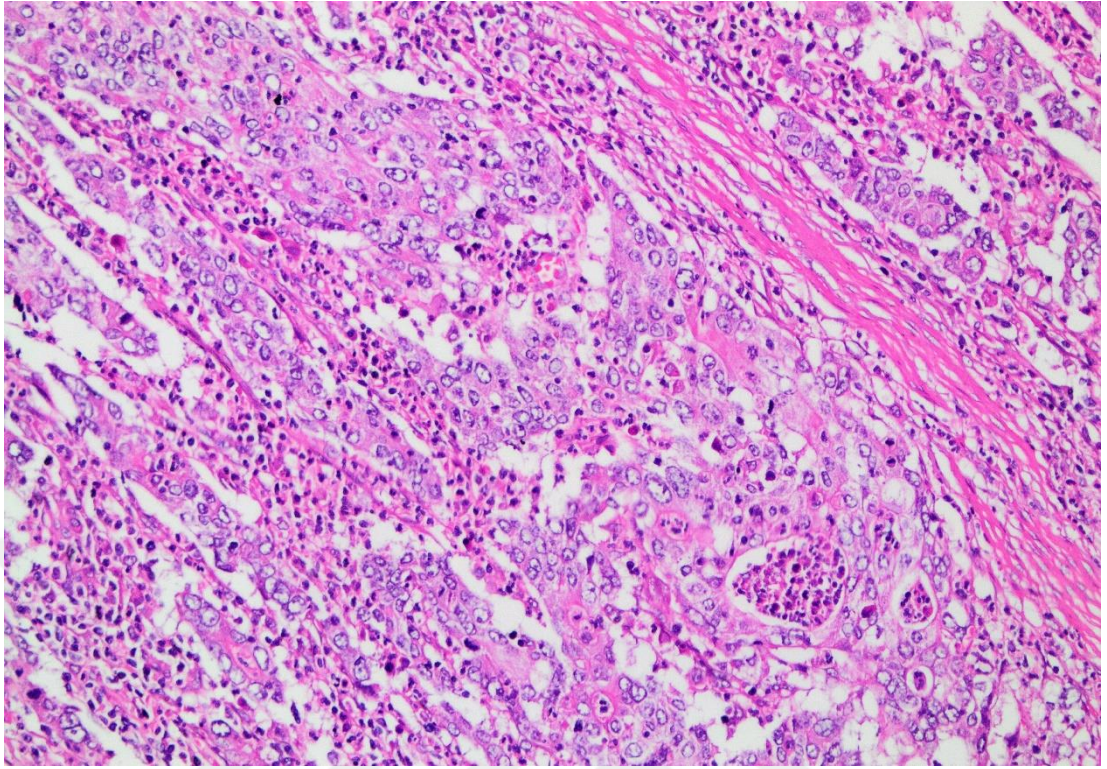
Resim 22. E-kaderin aberran G-ACa; müsinöz komponent ve taşlı yüzük hücresi içeren zayıf koheziv karsinom (H/Ex20)



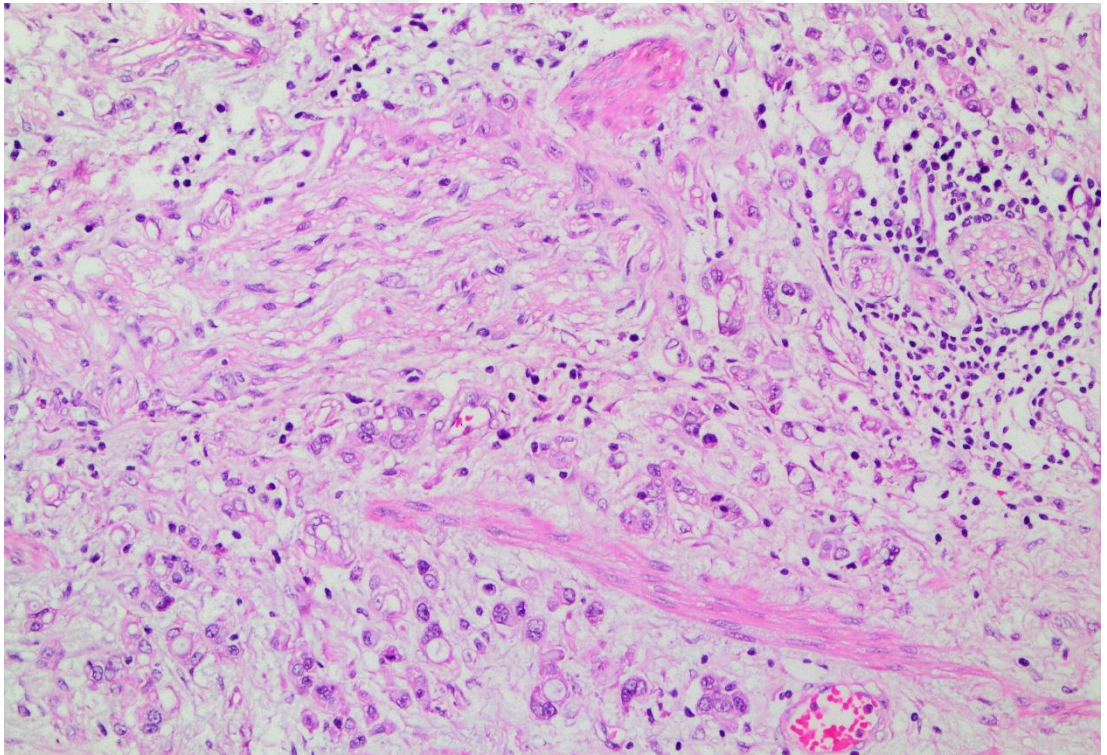
Resim 23. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Mikst tip karsinom (H/E x20)



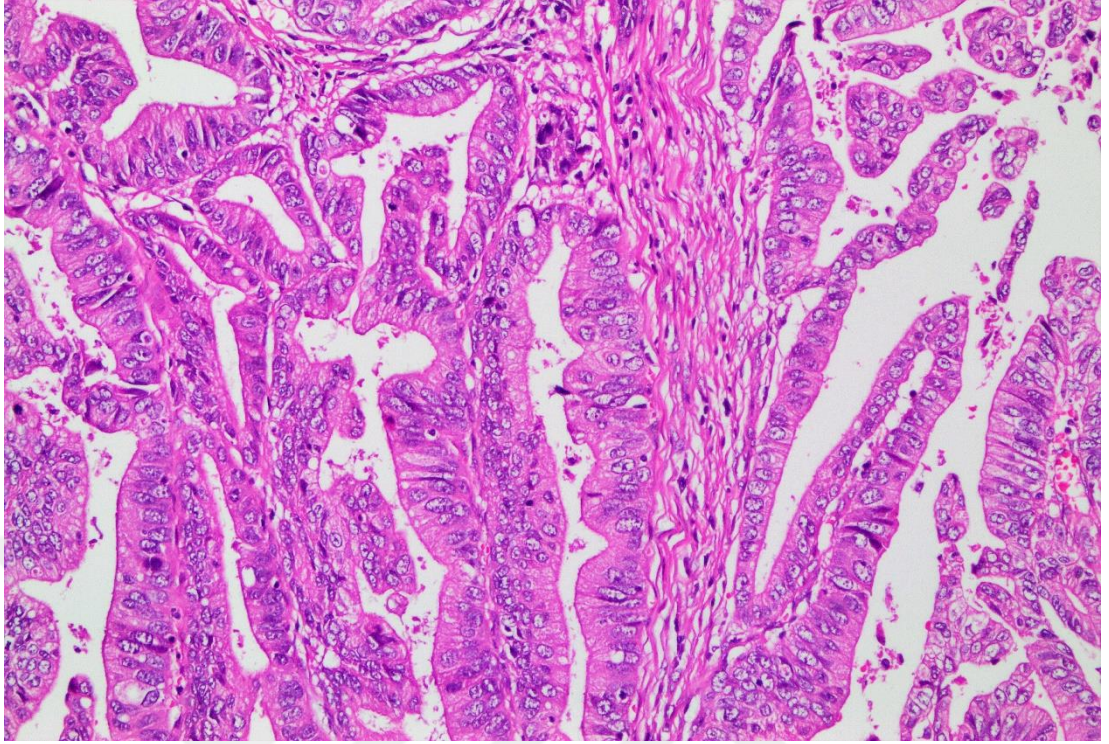
Resim 24. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Müsinöz karsinom (H/E x20)



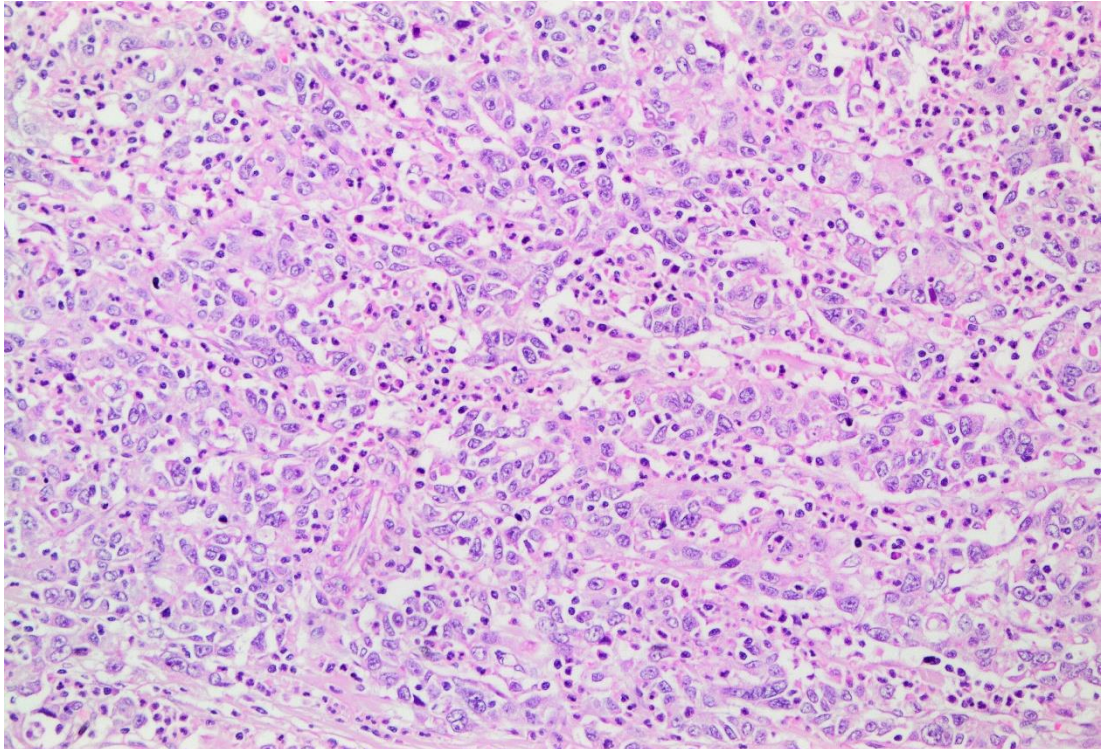
Resim 25. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Medüller karsinom (H/E x20)



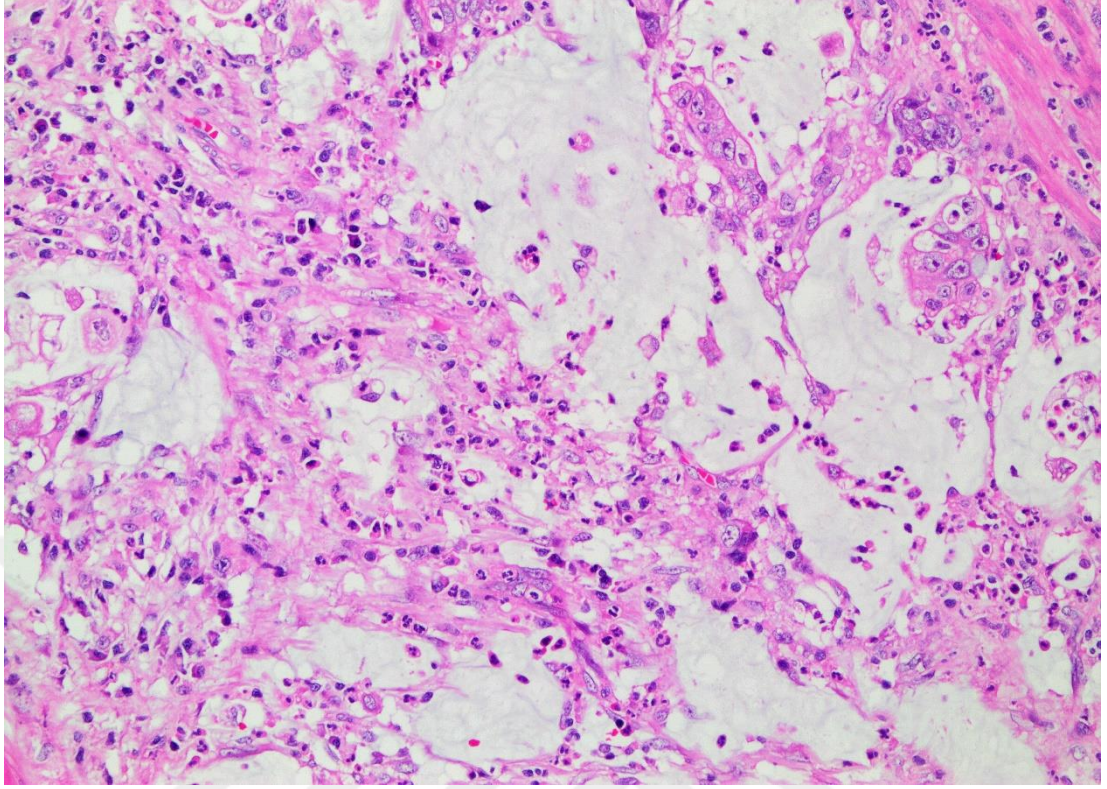
Resim 26. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Zayıf koheziv karsinom (H/E x20)



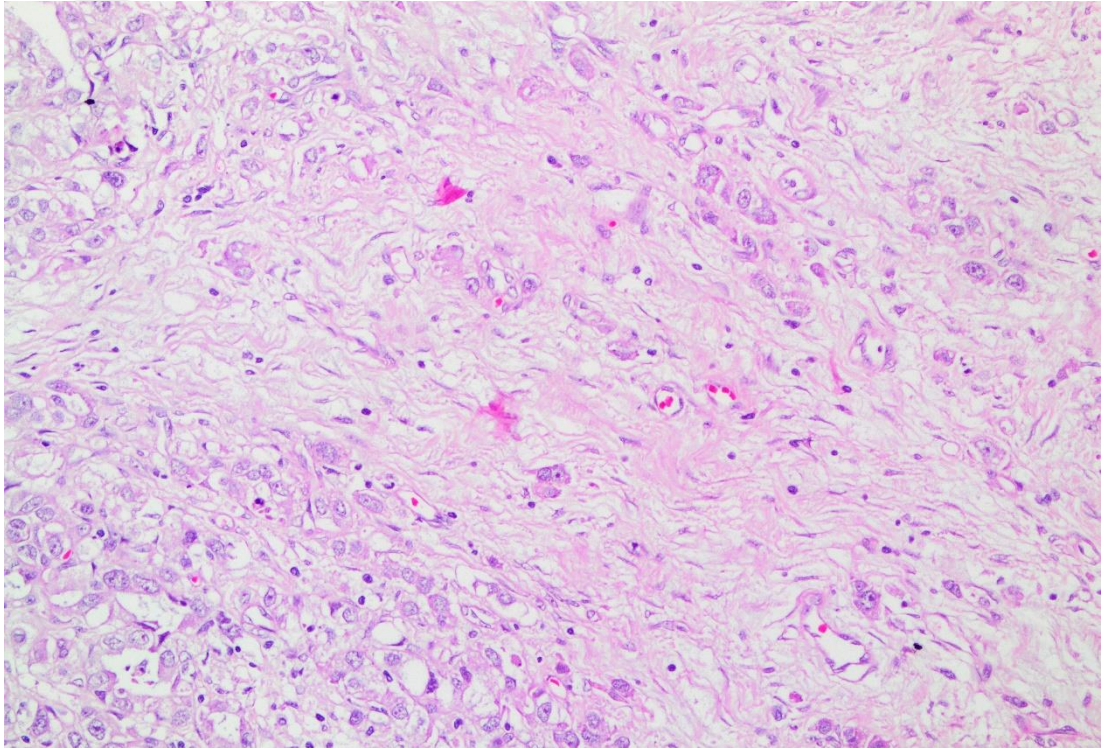
Resim 27. P53- aberran ($\geq 70\%$ ekspresyon) G-ACa; Tubulopapiller karsinom (H/E x20)



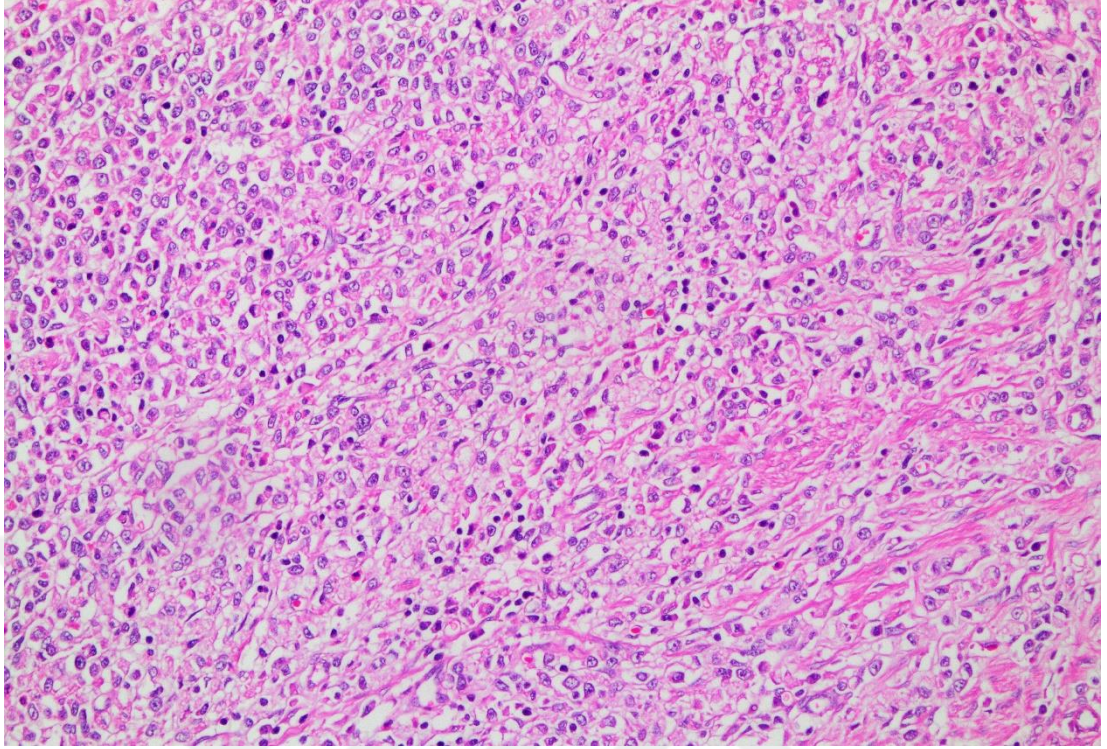
Resim 28. P53- aberran ($< 5\%$ ekspresyon) G-ACa; Medüller karsinom (H/E x20)



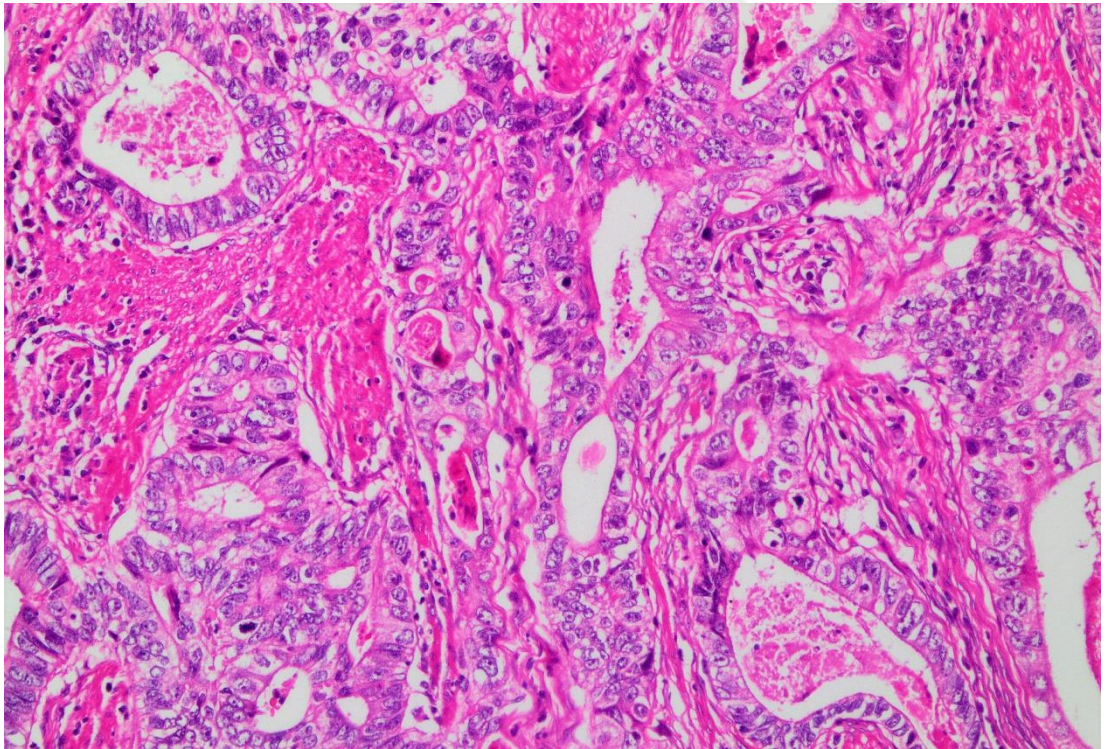
Resim 29. P53- aberran (<%5 ekspresyon) G-ACa; Müsinöz karsinom (H/E x20)



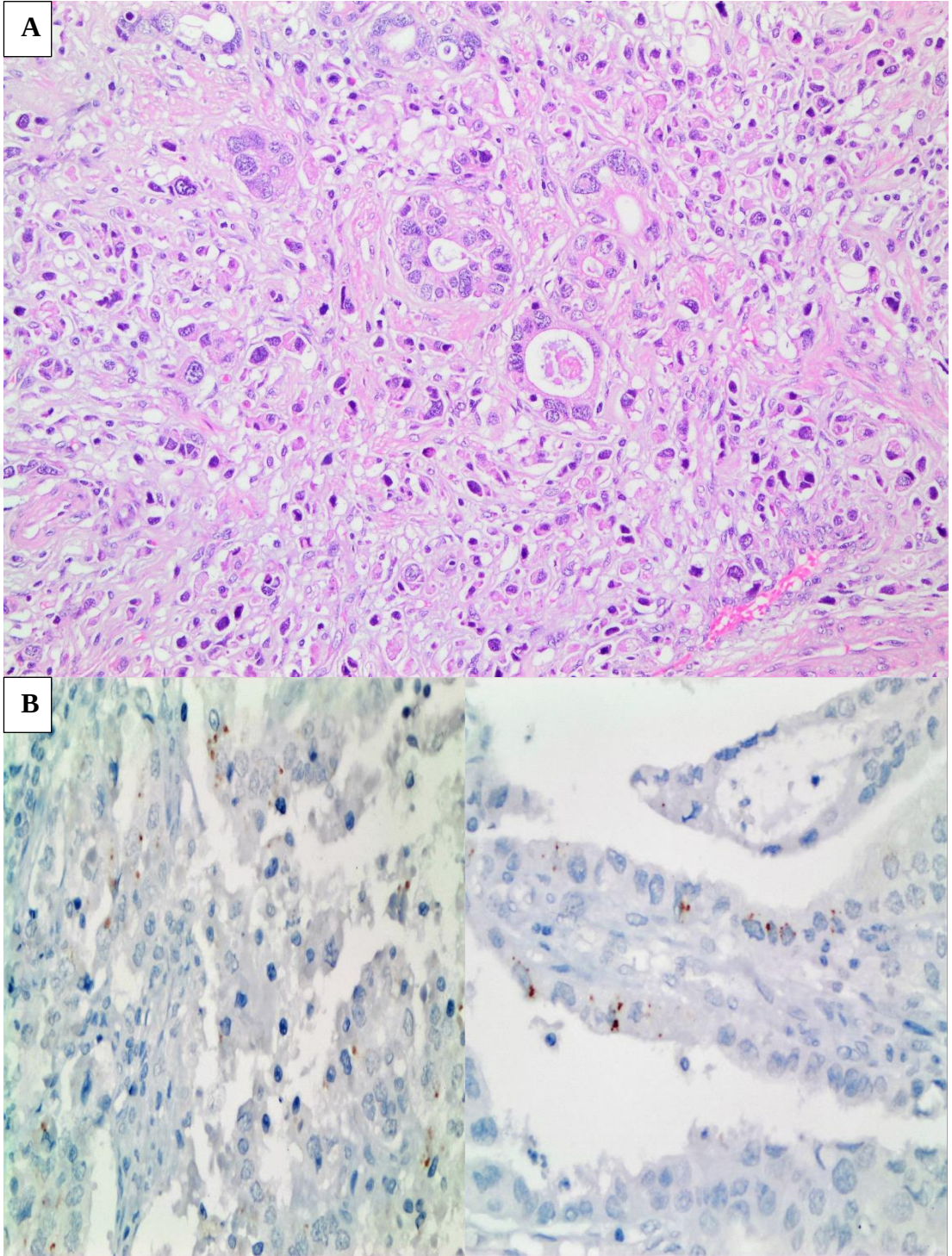
Resim 30. P53- aberran (<%5 ekspresyon) G-ACa; Mikst karsinom (H/E x20)



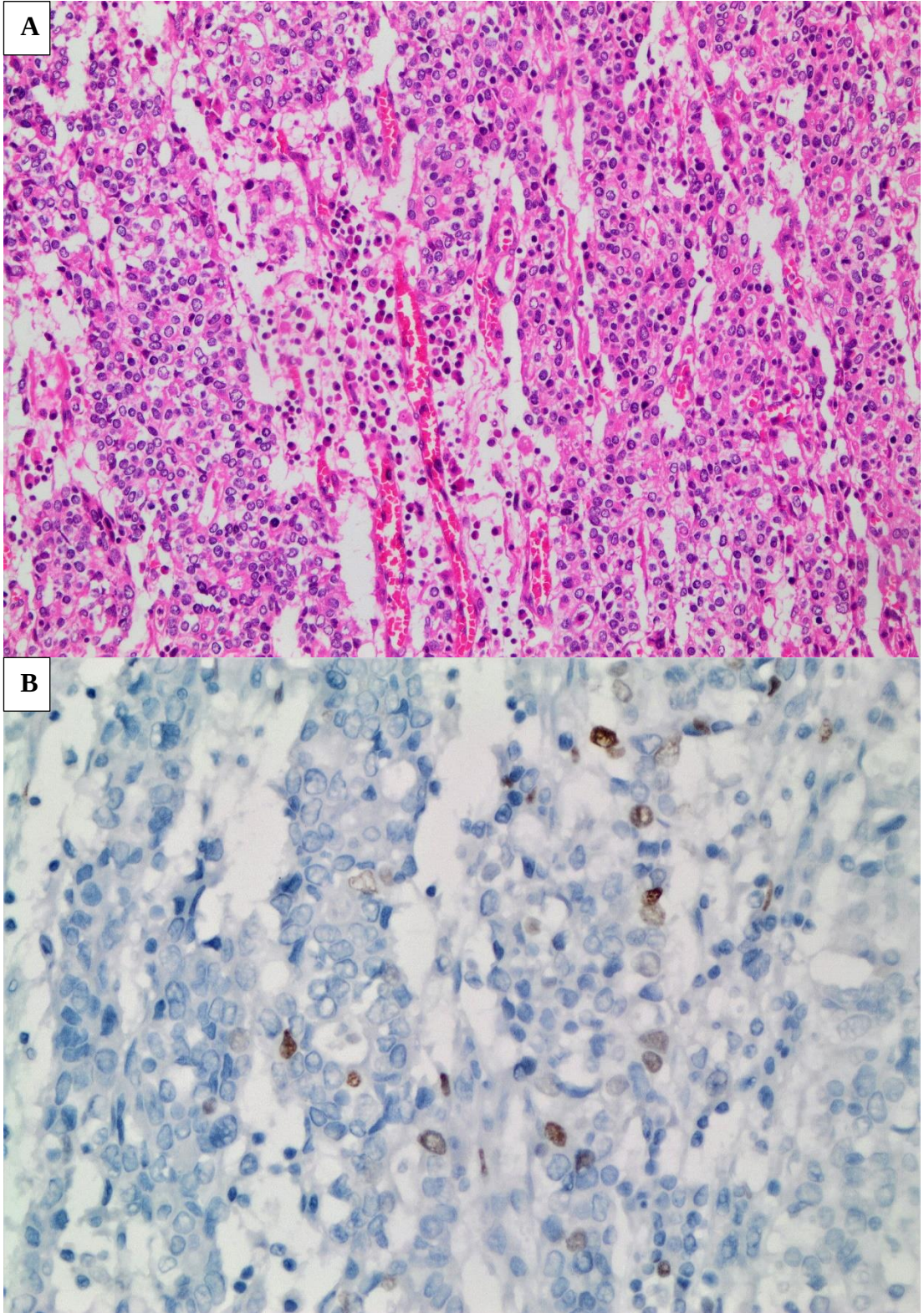
Resim 31. P53- aberran (<%5 ekspresyon) G-ACa; Zayıf koheziv karsinom (H/E x20)



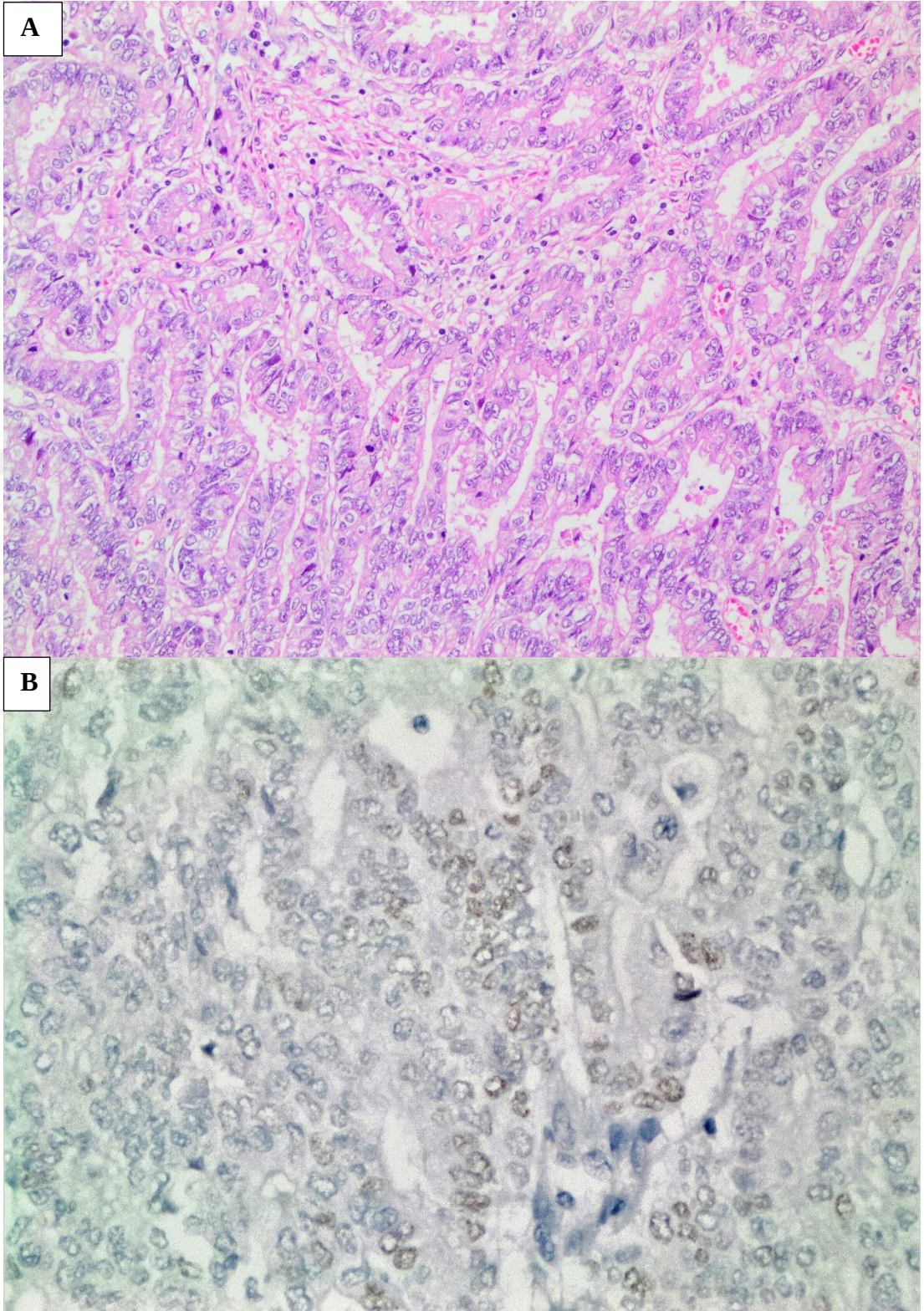
Resim 32. P53- aberran (<%5 ekspresyon) G-ACa; Tubuler karsinom (H/E x20)



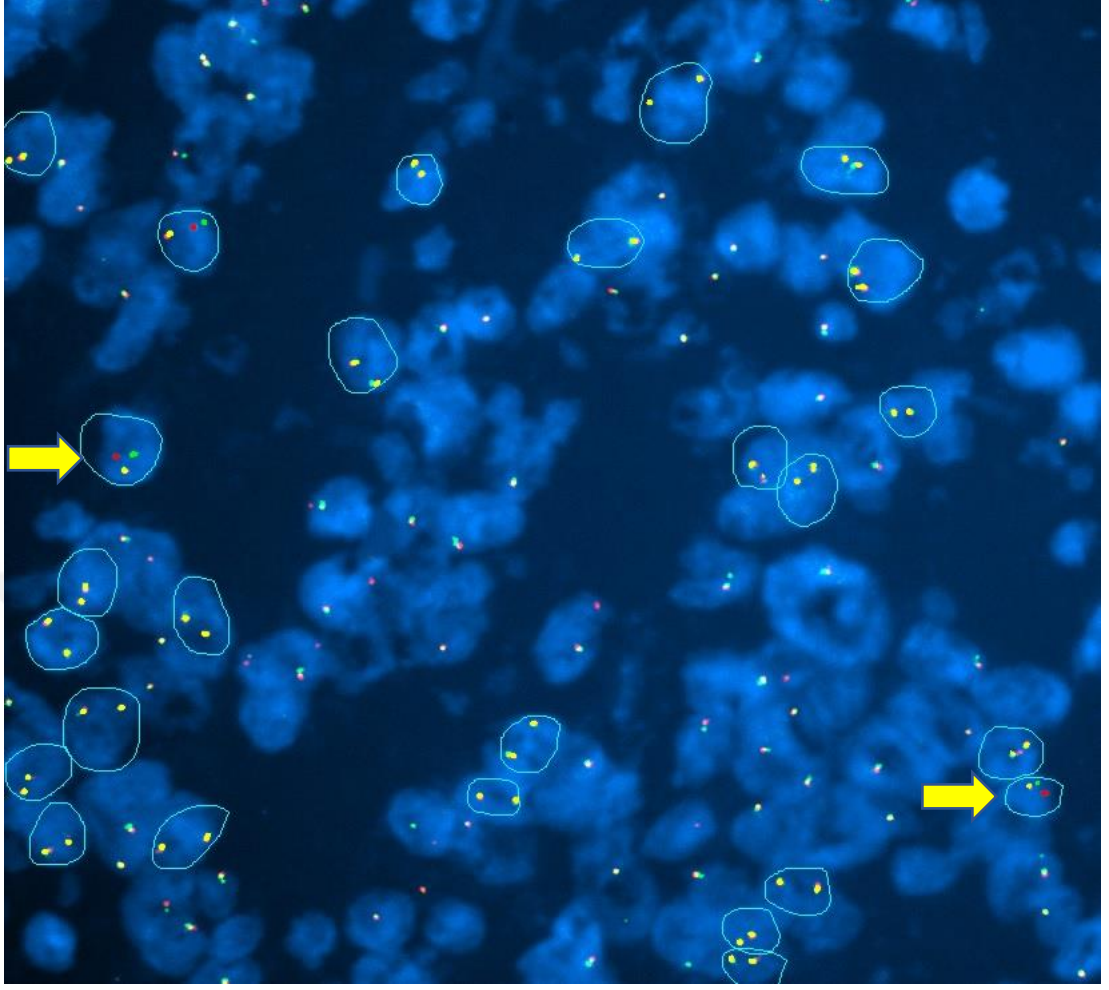
Resim 33. A. Mikst karsinom (Olgu 1) (H/Ex20) , B. Pan-TRK ile sitoplazmik noktasal ekspresyon (İHKx40)



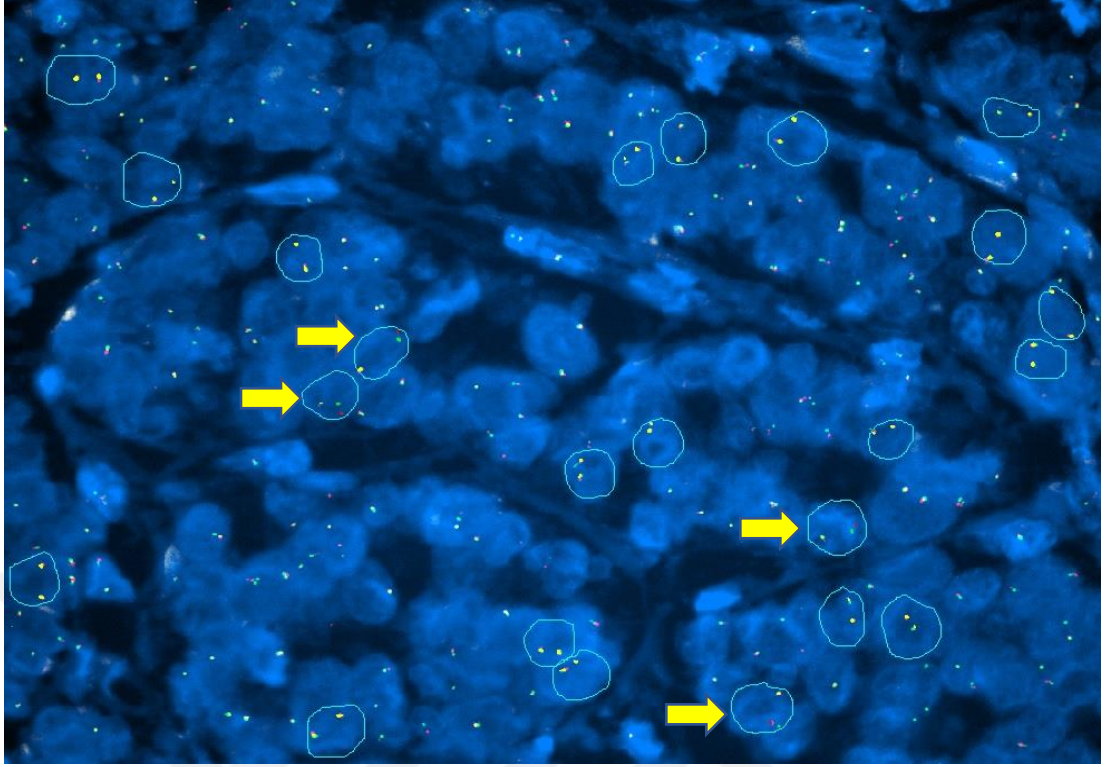
Resim 34. A. Medüller karsinom (Olgu 3) (H/Ex20), B. Pan-TRK ile nükleer ekspresyon (İHKx40)



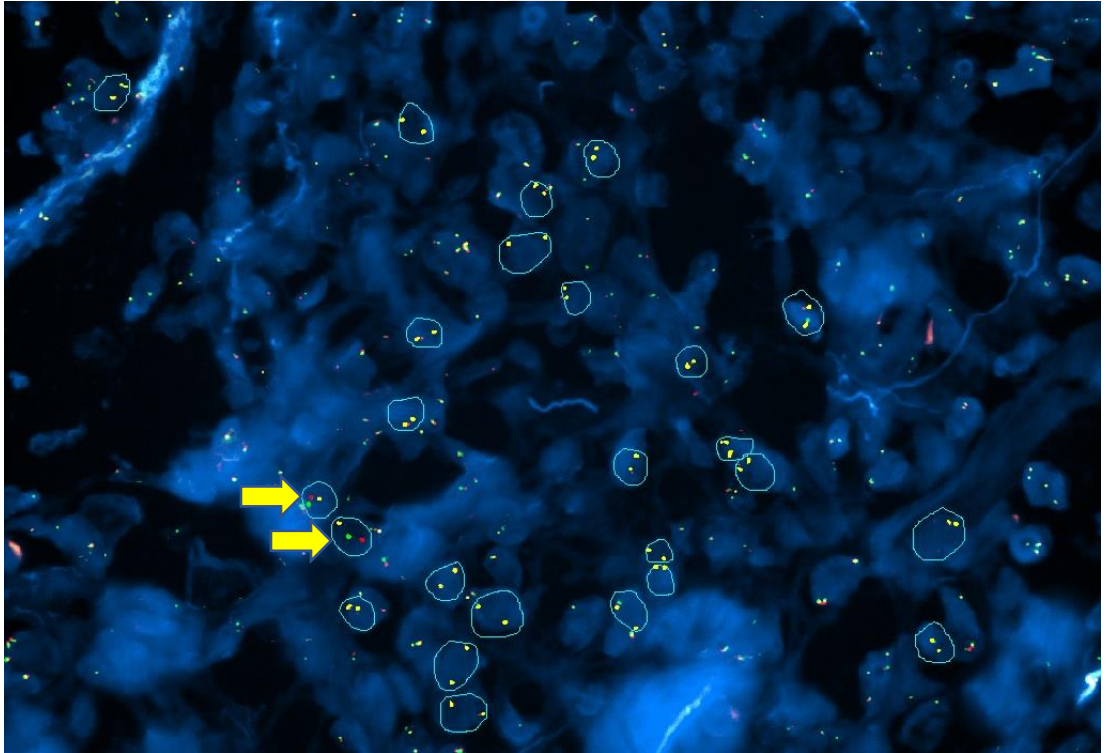
Resim 35. A. Tubuler karsinom (Olgu 2) (H/Ex20), B. Pan-TRK ile nükleer ekspresyon (IHKx40)



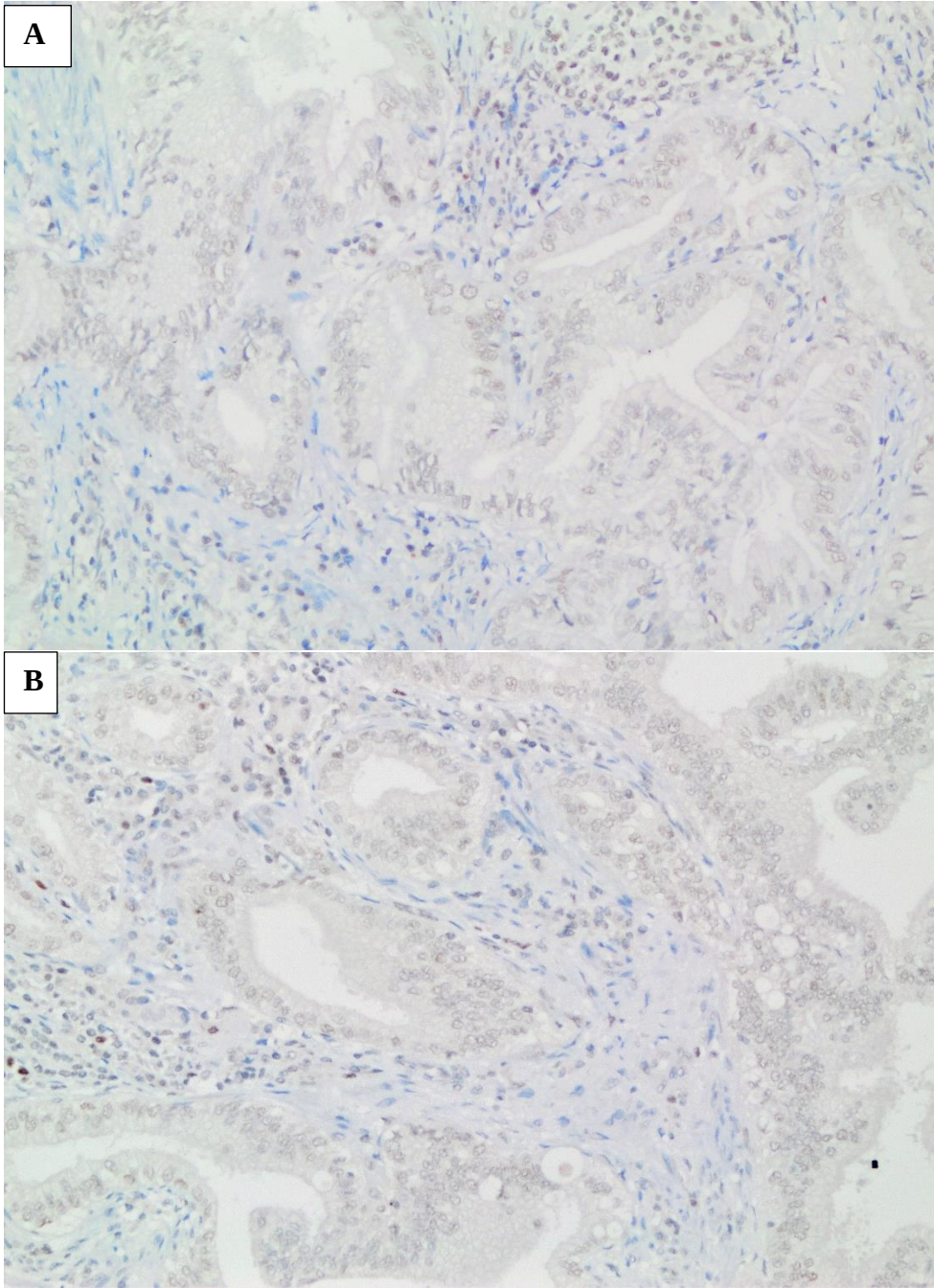
Resim 36. Pan-TRK nükleer ekspresyon izlenen p53-normal grupta yer alan olguya (Olgu 2) ait NTRK1 FISH analizi (split oranı %4,2)



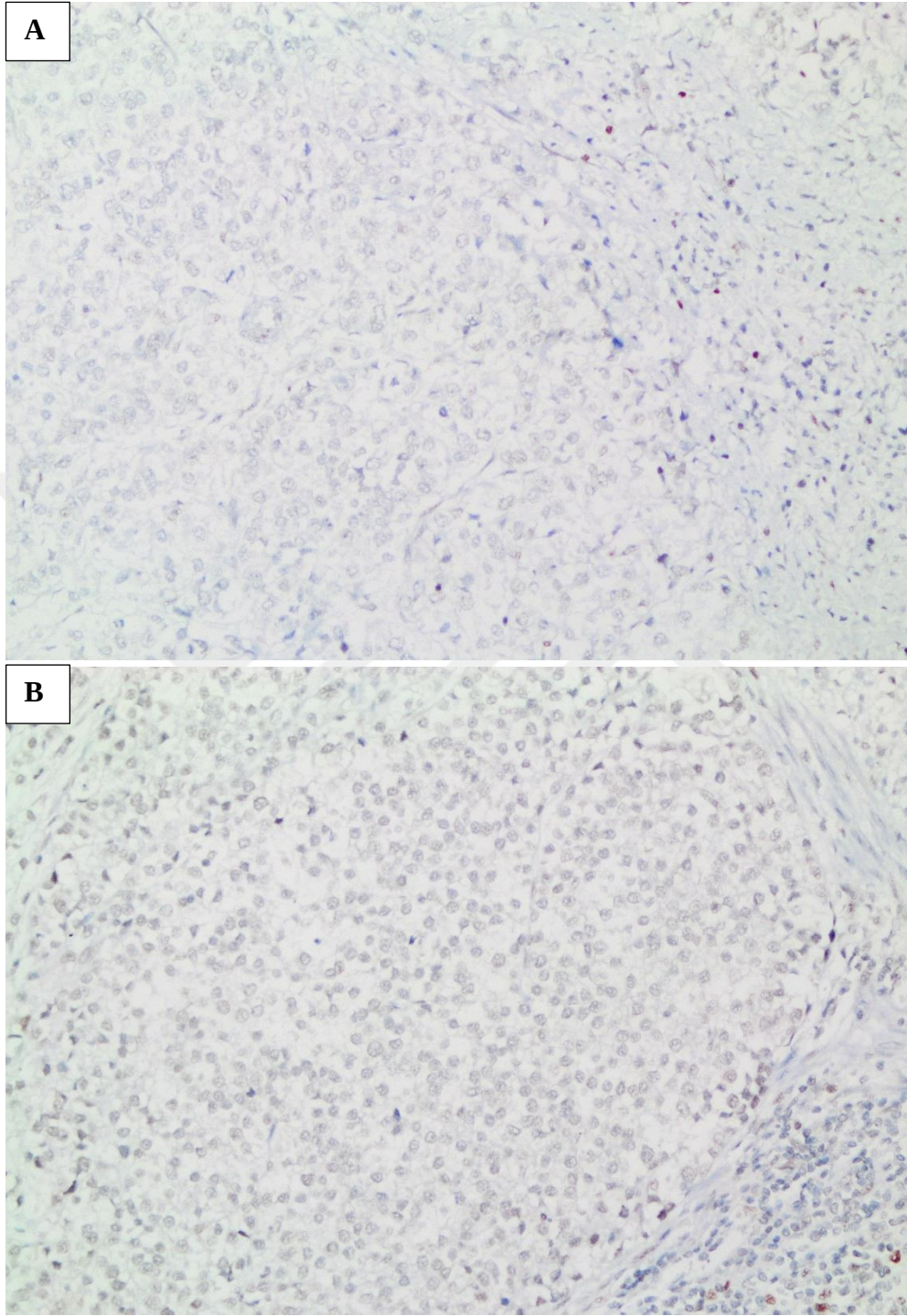
Resim 37. Pan-TRK negatif dMMR grupta yer alan olguya (Olgu 4) ait NTRK1 FISH analizi (split oranı %14)



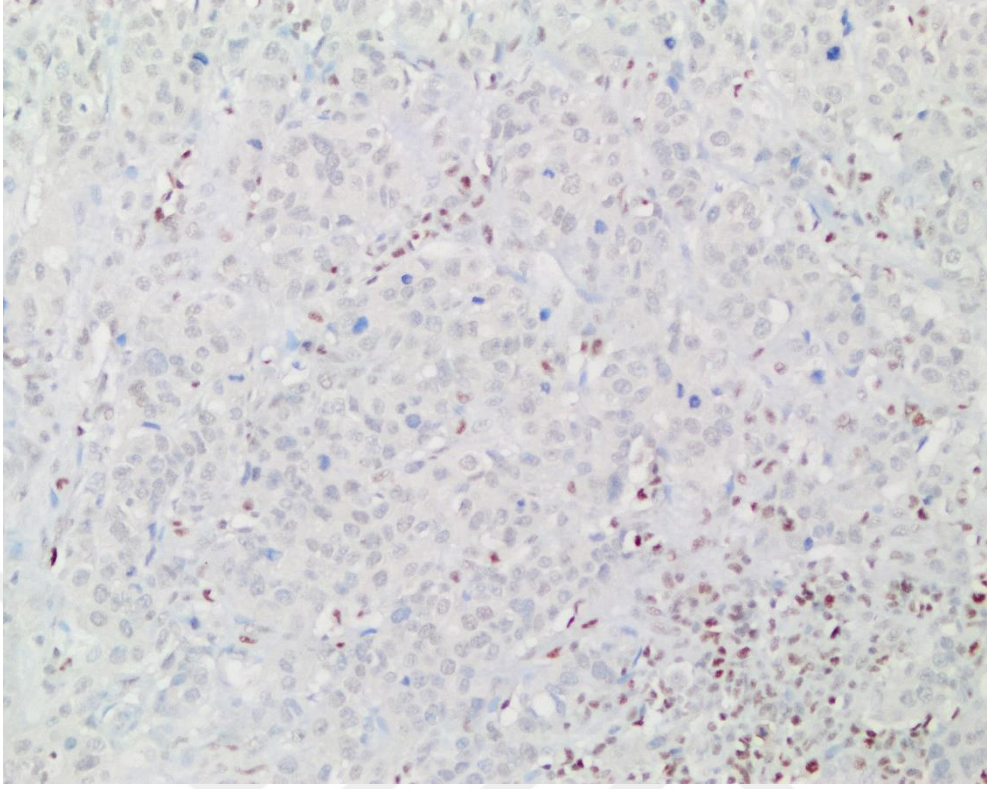
Resim 38. Pan-TRK negatif E-kaderin aberran grupta yer alan olguya (Olgu 5) ait NTRK1 FISH analizi (split oranı %10)



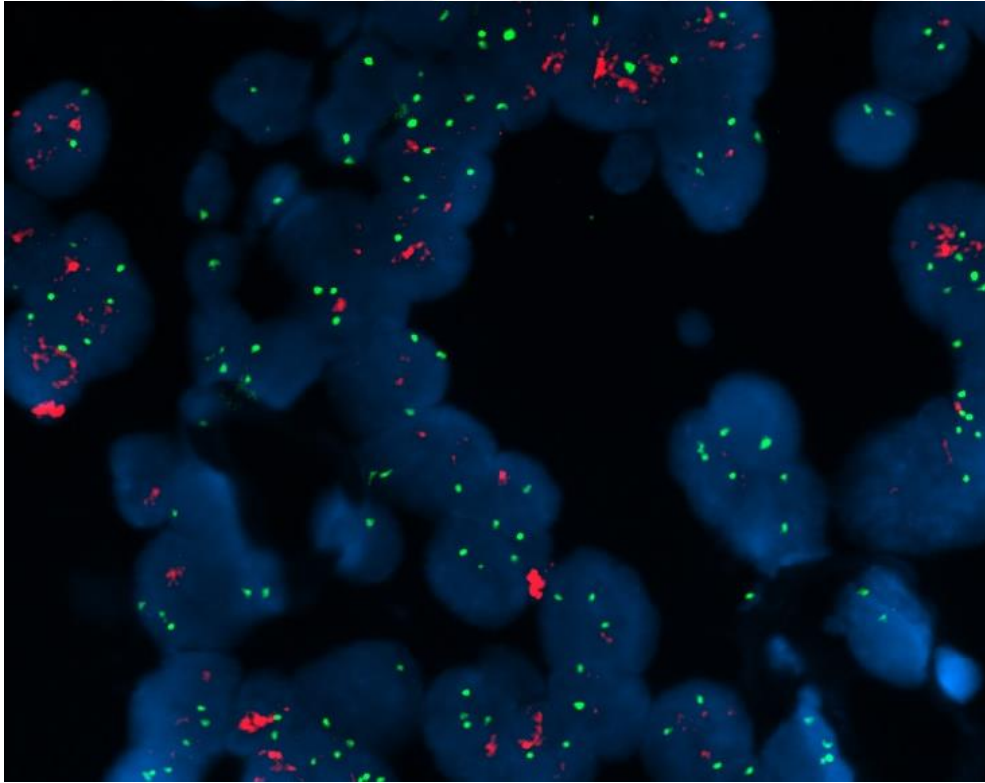
Resim 39. MLH1 ve PMS2 kaybı birlikteliği; A. PMS2 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20), B. MLH1 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20)



Resim 40. MSH2 ve MSH6 kaybı birlikteliği; A. MSH6 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20), B. MSH2 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20)



Resim 41. Yalnız PMS2 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı (İHKx20)



Resim 42. HER2 FISH amplifikasyon (yeşil sinyal: kromozom17 sentromerik bölge, kırmızı sinyal: HER2 geni)

17. KAYNAKLAR

1. Sano, T., et al., Proposal of a new stage grouping of gastric cancer for TNM classification: International Gastric Cancer Association staging project. *Gastric Cancer*, 2017. **20**(2): p. 217-225.
2. Amin, M.B., et al., The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*, 2017. **67**(2): p. 93-99.
3. Odze, R.D. and J.R. Goldblum, *SPEC-Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 2014: Elsevier Health Sciences.
4. Correa, P. and M.B. Piazuelo, The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases*, 2012. **13**(1): p. 2-9.
5. Olefson, S. and S.F. Moss, Obesity and related risk factors in gastric cardia adenocarcinoma. *Gastric cancer*, 2015. **18**(1): p. 23-32.
6. Cocco, E., M. Scaltriti, and A. Drilon, NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018. **15**(12): p. 731-747.
7. Nagtegaal, I.D., et al., The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 2019.
8. Bray, F., 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**(6): p. 394-424.
9. Smyth, E., et al., Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 2016. **27**(suppl_5): p. v38-v49.
10. Waddell, T., et al., Gastric cancer: ESMO–ESSO–ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *European journal of surgical oncology*, 2014. **40**(5): p. 584-591.
11. Lauren, P., THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE

CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL
CLASSIFICATION. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1965. **64**: p. 31-49.

12. Bosman, F.T., et al., WHO classification of tumours of the digestive system. 2010: World Health Organization.
13. Lei, Z., et al., Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology*, 2013. **145**(3): p. 554-65.
14. Cristescu, R., et al., Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*, 2015. **21**(5): p. 449-56.
15. Tay, S.T., et al., A combined comparative genomic hybridization and expression microarray analysis of gastric cancer reveals novel molecular subtypes. *Cancer Res*, 2003. **63**(12): p. 3309-16.
16. Tan, I.B., et al., Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*, 2011. **141**(2): p. 476-485. e11.
17. Cho, J.Y., et al., Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(7): p. 1850-7.
18. Shah, M.A., et al., Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(9): p. 2693-701.
19. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
20. Setia, N., et al., A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Mod Pathol*, 2016. **29**(7): p. 772-84.
21. Kim, H.S., et al., Comprehensive expression profiles of gastric cancer molecular subtypes by immunohistochemistry: implications for individualized therapy. *Oncotarget*, 2016. **7**(28): p. 44608-44620.
22. Ahn, S., et al., High-throughput Protein and mRNA Expression-based Classification of Gastric Cancers Can Identify Clinically Distinct Subtypes, Concordant With Recent Molecular Classifications. *Am J Surg Pathol*, 2017. **41**(1): p. 106-115.

23. Birkman, E.M., et al., Gastric cancer: immunohistochemical classification of molecular subtypes and their association with clinicopathological characteristics. *Virchows Arch*, 2018. **472**(3): p. 369-382.
24. Diaz Del Arco, C., et al., Immunohistochemical classification of gastric cancer based on new molecular biomarkers: a potential predictor of survival. *Virchows Arch*, 2018. **473**(6): p. 687-695.
25. Bang, Y.-J., et al., Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, 2010. **376**(9742): p. 687-697.
26. Fuchs, C.S., et al., Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 2014. **383**(9911): p. 31-39.
27. Wilke, H., et al., Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(11): p. 1224-35.
28. Meldolesi, J., Neurotrophin Trk Receptors: New Targets for Cancer Therapy. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2018. **174**: p. 67-79.
29. Arevalo, J. and S. Wu, Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2006. **63**(13): p. 1523-1537.
30. Davies, A.M., et al., Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 1993. **13**(11): p. 4961-4967.
31. Hsiao, S.J., et al., Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy. *J Mol Diagn*, 2019. **21**(4): p. 553-571.
32. Drilon, A., et al., Efficacy of larotrectinib in TRK fusion–positive cancers in adults and children. *New England Journal of Medicine*, 2018. **378**(8): p. 731-739.

33. Demetri, G., et al., LBA17 Efficacy and safety of entrectinib in patients with NTRK fusion-positive (NTRK-fp) tumors: pooled analysis of STARTRK-2, STARTRK-1 and ALKA-372-001. *Annals of Oncology*, 2018. **29**(suppl_8): p. mdy424. 017.
34. Drilon, A., 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**(4): p. 400-409.
35. Sadler, T.W., *Langman's medical embryology*. 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
36. Mills, S., *Histology for pathologists*. 2019: Lippincott Williams & Wilkins.
37. Lehnert, T., R.A. Erlandson, and J.J. Decosse, Lymph and blood capillaries of the human gastric mucosa. A morphologic basis for metastasis in early gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 1985. **89**(5): p. 939-50.
38. Listrom, M.B. and C.M. Fenoglio-Preiser, Lymphatic distribution of the stomach in normal, inflammatory, hyperplastic, and neoplastic tissue. *Gastroenterology*, 1987. **93**(3): p. 506-14.
39. Matsuyama, M. and H. Suzuki, Differentiation of immature mucous cells into parietal, argyrophil, and chief cells in stomach grafts. *Science*, 1970. **169**(3943): p. 385-7.
40. Genta, R.M., H.W. Hamner, and D.Y. Graham, Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol*, 1993. **24**(6): p. 577-83.
41. Howlader, N., et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2019, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
42. Rawla, P. and A. Barsouk, Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol*, 2019. **14**(1): p. 26-38.
43. Kolonel, L.N., J.H. Hankin, and A.M. Nomura, Multiethnic studies of diet, nutrition, and cancer in Hawaii. *Princess Takamatsu Symp*, 1985. **16**: p. 29-40.

44. Gültekin, M. and G. Boztaş, Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014. **43**.
45. Demir, G., et al., Analysis of resected gastric cancer in Turkish population. Hepatogastroenterology, 2014. **61**(129): p. 259-66.
46. Gullo, I., et al., Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 50-63.
47. Liu, X. and S.J. Meltzer, Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(3): p. 348-358.
48. Alessandrini, L., et al., Proposed molecular and mirna classification of gastric cancer. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(6): p. 1683.
49. Coglianò, V.J., et al., Preventable exposures associated with human cancers. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(24): p. 1827-39.
50. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2012. **100**(Pt B): p. 1-441.
51. Marshall, B.J. and J.R. Warren, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, 1984. **1**(8390): p. 1311-5.
52. Cancer, I.A.f.R.o., Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. Vol. 61. 1994: IARC Lyon.
53. Weeks, D.L., et al., A H⁺-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization. Science, 2000. **287**(5452): p. 482-5.
54. Peek, R.M., Jr. and M.J. Blaser, Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 28-37.
55. Peek, R.M., Jr. and J.E. Crabtree, Helicobacter infection and gastric neoplasia. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 233-48.
56. Ishaq, S. and L. Nunn, Helicobacter pylori and gastric cancer: a state of the art review. Gastroenterology and hepatology from bed to bench, 2015. **8**(Suppl1): p. S6.
57. Hatakeyama, M. and H. Higashi, Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci, 2005. **96**(12): p. 835-43.
58. Ahn, H.J. and D.S. Lee, Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis. World journal of gastrointestinal oncology, 2015. **7**(12): p. 455.

59. Cheng, X.J., J.C. Lin, and S.P. Tu, Etiology and prevention of gastric cancer. *Gastrointestinal tumors*, 2016. **3**(1): p. 25-36.
60. Bartchewsky, W., Jr., et al., Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol*, 2009. **44**(2): p. 153-61.
61. Praud, D., et al., Cigarette smoking and gastric cancer in the Stomach Cancer Pooling (StoP) Project. *European Journal of Cancer Prevention*, 2018. **27**(2): p. 124-133.
62. Wroblewski, L.E., R.M. Peek, and K.T. Wilson, *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*, 2010. **23**(4): p. 713-739.
63. Ladeiras-Lopes, R., et al., Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer causes & control*, 2008. **19**(7): p. 689-701.
64. Preston, D., et al., Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958–1998. *Radiation research*, 2007. **168**(1): p. 1-64.
65. Morton, L.M., et al., Stomach cancer risk after treatment for Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. **31**(27): p. 3369.
66. Hauptmann, M., et al., Increased stomach cancer risk following radiotherapy for testicular cancer. *Br J Cancer*, 2015. **112**(1): p. 44-51.
67. Kaneda, A., et al., Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res*, 2012. **72**(14): p. 3445-50.
68. Boysen, T., et al., EBV-associated gastric carcinoma in high-and low-incidence areas for nasopharyngeal carcinoma. *British journal of cancer*, 2009. **101**(3): p. 530.
69. Murphy, G., et al., Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology*, 2009. **137**(3): p. 824-33.
70. Tsugane, S. and S. Sasazuki, Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric cancer*, 2007. **10**(2): p. 75-83.
71. Zhang, Z., et al., Dietary fiber intake reduces risk for gastric cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 2013. **145**(1): p. 113-120. e3.

72. Van Cutsem, E., et al., Gastric cancer. *The Lancet*, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
73. Oliveira, C., et al., Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(2): p. e60-70.
74. Skierucha, M., et al., Molecular alterations in gastric cancer with special reference to the early-onset subtype. *World journal of gastroenterology*, 2016. **22**(8): p. 2460.
75. McLean, M.H. and E.M. El-Omar, Genetics of gastric cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2014. **11**(11): p. 664.
76. Guilford, P., et al., E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 1998. **392**(6674): p. 402-5.
77. Majewski, I.J., et al., An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol*, 2013. **229**(4): p. 621-9.
78. Fitzgerald, R.C., et al., Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *Journal of medical genetics*, 2010. **47**(7): p. 436-444.
79. Huntsman, D.G., et al., Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med*, 2001. **344**(25): p. 1904-9.
80. Worthley, D.L., et al., Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut*, 2012. **61**(5): p. 774-9.
81. Yanaru-Fujisawa, R., et al., Familial fundic gland polyposis with gastric cancer. *Gut*, 2012. **61**(7): p. 1103-4.
82. Caldas, C., et al., Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *Journal of medical genetics*, 1999. **36**(12): p. 873-880.
83. Corso, G., et al., History, pathogenesis, and management of familial gastric cancer: original study of John XXIII's family. *BioMed research international*, 2013. **2013**.
84. Boland, C.R. and M.B. Yurgelun, Historical perspective on familial gastric cancer. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2017. **3**(2): p. 192-200.

85. Carneiro, F., et al., Hyperplastic polyposis and diffuse carcinoma of the stomach. A study of a family. *Cancer*, 1993. **72**(2): p. 323-329.
86. Niv, Y., et al., Hyperplastic gastric polyposis, hypergastrinaemia and colorectal neoplasia: a description of four cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **15**(12): p. 1361-6.
87. Chung, D.C. and A.K. Rustgi, The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*, 2003. **138**(7): p. 560-70.
88. Kleihues, P., et al., Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol*, 1997. **150**(1): p. 1-13.
89. Kimura, K., et al., Germline p53 mutation in a patient with multiple primary cancers. *Jpn J Clin Oncol*, 2001. **31**(7): p. 349-51.
90. Lipton, L. and I. Tomlinson, The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Familial cancer*, 2006. **5**(3): p. 221-226.
91. Vasen, H.F., et al., Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut*, 2008. **57**(5): p. 704-13.
92. Lynch, H.T., et al., Gastric cancer: new genetic developments. *J Surg Oncol*, 2005. **90**(3): p. 114-33; discussion 133.
93. Utsunomiya, J., et al., Peutz-Jeghers syndrome: its natural course and management. *Johns Hopkins Med J*, 1975. **136**(2): p. 71-82.
94. van Lier, M.G., et al., High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol*, 2010. **105**(6): p. 1258-64; author reply 1265.
95. Borrmann, R., Geschwulste des magens und duodenums. *Handbuch der Spezieller Pathologischen Anatomie und Histologie*, 1926. **825**.
96. Borchard, F., Classification of gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 1990. **37**(2): p. 223-32.
97. Correa, P., A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*, 1988. **48**(13): p. 3554-60.
98. Correa, P., Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*, 1992. **52**(24): p. 6735-40.

99. Correa, P., et al., A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*, 1975. **2**(7924): p. 58-60.
100. Filipe, M.I., et al., Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer*, 1994. **57**(3): p. 324-9.
101. Gonzalez, C.A., et al., Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Int J Cancer*, 2010. **127**(11): p. 2654-60.
102. Rokkas, T., M.I. Filipe, and G.E. Sladen, Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut*, 1991. **32**(10): p. 1110-3.
103. Tava, F., et al., Type or extension of intestinal metaplasia and immature/atypical "indefinite-for-dysplasia" lesions as predictors of gastric neoplasia. *Hum Pathol*, 2006. **37**(11): p. 1489-97.
104. Tosi, P., et al., Gastric intestinal metaplasia type III cases are classified as low-grade dysplasia on the basis of morphometry. *J Pathol*, 1993. **169**(1): p. 73-8.
105. Goldenring, J.R. and K.T. Nam, Oxyntic atrophy, metaplasia, and gastric cancer, in *Progress in molecular biology and translational science*. 2010, Elsevier. p. 117-131.
106. Rugge, M., et al., Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol*, 2000. **24**(2): p. 167-76.
107. Nakamura, K., H. Sugano, and K. Takagi, Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. *Gan*, 1968. **59**(3): p. 251-8.
108. Ming, S.C., Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer*, 1977. **39**(6): p. 2475-85.
109. Goseki, N., T. Takizawa, and M. Koike, Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut*, 1992. **33**(5): p. 606-612.
110. Carneiro, F., M. Seixas, and M. Sobrinho-Simoes, New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach. *Pathology-Research and Practice*, 1995. **191**(6): p. 571-584.

111. Solcia, E., et al., A combined histologic and molecular approach identifies three groups of gastric cancer with different prognosis. *Virchows Arch*, 2009. **455**(3): p. 197-211.
112. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*, 2011. **14**(2): p. 101-12.
113. Songun, I., et al., Classification of gastric carcinoma using the Goseki system provides prognostic information additional to TNM staging. *Cancer*, 1999. **85**(10): p. 2114-8.
114. Martin, I., et al., Goseki histological grading of gastric cancer is an important predictor of outcome. *Gut*, 1994. **35**(6): p. 758-763.
115. Chiaravalli, A.M., et al., Histotype-based prognostic classification of gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2012. **18**(9): p. 896.
116. Ha Kim, G., et al., CDX2 expression is increased in gastric cancers with less invasiveness and intestinal mucin phenotype. *Scand J Gastroenterol*, 2006. **41**(8): p. 880-6.
117. Fan, Z., et al., Hep par 1 antibody stain for the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma: 676 tumors tested using tissue microarrays and conventional tissue sections. *Mod Pathol*, 2003. **16**(2): p. 137-44.
118. Takubo, K., *The Diversity of Gastric Carcinoma: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy*. 2005: Springer.
119. Yamamoto, H., et al., Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology*, 1999. **116**(6): p. 1348-57.
120. Khetpal, N., et al., The Clinical and Biological Significance of Tyrosine Kinases in Gastric Cancer, in *Role of Tyrosine Kinases in Gastrointestinal Malignancies*. 2018, Springer. p. 29-56.
121. OLIVEIRA, L.A.d., et al., The canonical wnt pathway in gastric carcinoma. ABCD. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 2019. **32**(1).
122. Wang, K., et al., Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*, 2014. **46**(6): p. 573-82.

123. Kim, K.M., et al., Genetic classification of intestinal-type and diffuse-type gastric cancers based on chromosomal loss and microsatellite instability. *Virchows Arch*, 2003. **443**(4): p. 491-500.
124. Wu, M.S., et al., Correlation of histologic subtypes and replication error phenotype with comparative genomic hybridization in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **30**(1): p. 80-6.
125. Arakawa, N., et al., Genome-wide analysis of DNA copy number alterations in early and advanced gastric cancers. *Mol Carcinog*, 2017. **56**(2): p. 527-537.
126. Tao, J., et al., CD44-SLC1A2 gene fusions in gastric cancer. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(77): p. 77ra30.
127. Lee, J., et al., Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. *Cancer*, 2013. **119**(9): p. 1627-35.
128. Hause, R.J., et al., Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med*, 2016. **22**(11): p. 1342-1350.
129. Fang, W.L., et al., Microsatellite instability is associated with a better prognosis for gastric cancer patients after curative surgery. *World J Surg*, 2012. **36**(9): p. 2131-8.
130. Le, D.T., et al., PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *New England Journal of Medicine*, 2015. **372**(26): p. 2509-2520.
131. An, C., et al., Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 656-63.
132. Lee, J.H., et al., Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene*, 2004. **23**(26): p. 4646-54.
133. Oue, N., et al., Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer*, 2006. **106**(6): p. 1250-9.
134. Song, S. and J.A. Ajani, The role of microRNAs in cancers of the upper gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(2): p. 109-18.
135. Tirino, G., et al., What's New in Gastric Cancer: The Therapeutic Implications of Molecular Classifications and Future Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(9): p. 2659.

136. Kawazoe, A., et al., Clinicopathological features of programmed death ligand 1 expression with tumor-infiltrating lymphocyte, mismatch repair, and Epstein-Barr virus status in a large cohort of gastric cancer patients. *Gastric Cancer*, 2017. **20**(3): p. 407-415.
137. Derks, S., et al., Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget*, 2016. **7**(22): p. 32925-32.
138. Boger, C., et al., PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*, 2016. **7**(17): p. 24269-83.
139. Dong, M., et al., Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Hum Pathol*, 2016. **53**: p. 25-34.
140. Ma, C., et al., Programmed Death-Ligand 1 Expression Is Common in Gastric Cancer Associated With Epstein-Barr Virus or Microsatellite Instability. *Am J Surg Pathol*, 2016. **40**(11): p. 1496-1506.
141. Koh, J., et al., Development and Validation of an Easy-to-Implement, Practical Algorithm for the Identification of Molecular Subtypes of Gastric Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications. *Oncologist*, 2019.
142. Barbacid, M., et al., The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1991. **1072**(2-3): p. 115-127.
143. Reichardt, L.F., Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006. **361**(1473): p. 1545-1564.
144. Vaishnavi, A., A.T. Le, and R.C. Doebele, TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer discovery*, 2015. **5**(1): p. 25-34.
145. Coppola, V., et al., Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development*, 2004. **131**(20): p. 5185-5195.
146. Kermani, P., et al., Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 653-63.
147. Klein, R., et al., The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 1991. **65**(1): p. 189-197.

148. Kaplan, D.R., et al., The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 1991. **252**(5005): p. 554-8.
149. Soppet, D., et al., The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 895-903.
150. Barbacid, M., The Trk family of neurotrophin receptors. *Journal of neurobiology*, 1994. **25**(11): p. 1386-1403.
151. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 2003. **72**(1): p. 609-642.
152. Zaccaro, M.C., et al., p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(33): p. 31023-31029.
153. Deinhardt, K. and M.V. Chao, Trk receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 2014. **220**: p. 103-19.
154. Cunningham, M.E. and L.A. Greene, A function–structure model for NGF-activated TRK. *The EMBO journal*, 1998. **17**(24): p. 7282-7293.
155. Nakagawara, A., Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer letters*, 2001. **169**(2): p. 107-114.
156. Loeb, D.M., et al., A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(12): p. 8901-8910.
157. Martin-Zanca, D., S.H. Hughes, and M. Barbacid, A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*, 1986. **319**(6056): p. 743-748.
158. Martin-Zanca, D., et al., Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(1): p. 24-33.
159. Farago, A.F., et al., Clinicopathologic Features of Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring an NTRK Gene Fusion. *JCO Precis Oncol*, 2018. **2018**.

160. Iniguez-Ariza, N.M., et al., NTRK1-3 point mutations in poor prognosis thyroid cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 2017. **35**(15_suppl): p. 6087-6087.
161. Lee, S.J., et al., NTRK gene amplification in patients with metastatic cancer. *Precis Future Med*, 2017. **1**(3): p. 129-137.
162. Marchetti, A., et al., Frequent mutations in the neurotrophic tyrosine receptor kinase gene family in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Hum Mutat*, 2008. **29**(5): p. 609-16.
163. Pasini, L., et al., TrkA is amplified in malignant melanoma patients and induces an anti-proliferative response in cell lines. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 777.
164. Qian, K., et al., Characterization of Transforming NTRK2 and NTRK3 Mutations Identified in Leukemia Patient Samples. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 1566-1566.
165. Reuther, G.W., et al., Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(23): p. 8655-66.
166. Okamura, R., et al., Analysis of NTRK alterations in pan-cancer adult and pediatric malignancies: implications for NTRK-targeted therapeutics. *JCO precision oncology*, 2018. **2**: p. 1-20.
167. Geiger, T.R., et al., Functional characterization of human cancer-derived TRKB mutations. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e16871.
168. Harada, T., et al., Role and relevance of TrkB mutations and expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(9): p. 2638-45.
169. Miranda, C., et al., Functional characterization of NTRK1 mutations identified in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014. **53**(10): p. 875-80.
170. Iniguez-Ariza, N.M., et al., NTRK1-3 point mutations in poor prognosis thyroid cancers. 2017, American Society of Clinical Oncology.
171. Drilon, A., et al., What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a

- mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Annals of Oncology*, 2016. **27**(5): p. 920-926.
172. Tacconelli, A., et al., Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future Oncol*, 2005. **1**(5): p. 689-98.
 173. Eggert, A., et al., Expression of the Neurotrophin Receptor TrkA Down-Regulates Expression and Function of Angiogenic Stimulators in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cancer Research*, 2002. **62**(6): p. 1802-1808.
 174. Lagadec, C., et al., TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*, 2009. **28**(18): p. 1960-70.
 175. Rajan, N., et al., Dysregulated TRK signalling is a therapeutic target in CYLD defective tumours. *Oncogene*, 2011. **30**(41): p. 4243-60.
 176. Nakagawara, A., et al., Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(1): p. 759-67.
 177. Zhang, Y., et al., Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*, 2008. **75**(1-2): p. 17-26.
 178. Okugawa, Y., et al., Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *Br J Cancer*, 2013. **108**(1): p. 121-30.
 179. Tanaka, K., et al., Tropomyosin-related receptor kinase B at the invasive front and tumour cell dedifferentiation in gastric cancer. *British journal of cancer*, 2014. **110**(12): p. 2923.
 180. Tanaka, K., et al., Neurotrophic receptor, tropomyosin-related kinase B as an independent prognostic marker in gastric cancer patients. *Journal of surgical oncology*, 2009. **99**(5): p. 307-310.
 181. Kamiya, A., et al., Prognostic value of tropomyosin-related kinases A, B, and C in gastric cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 2016. **18**(6): p. 599-607.
 182. Knezevich, S.R., et al., ETV6-NTRK3 gene fusions and trisomy 11 establish a histogenetic link between mesoblastic nephroma and congenital fibrosarcoma. *Cancer Res*, 1998. **58**(22): p. 5046-8.

183. Rubin, B.P., et al., Congenital mesoblastic nephroma t (12; 15) is associated withETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. *The American journal of pathology*, 1998. **153**(5): p. 1451-1458.
184. Tognon, C., et al., Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell*, 2002. **2**(5): p. 367-76.
185. Skálová, A., et al., Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2016. **40**(1): p. 3-13.
186. Ross, J.S., et al., Abstract P2-09-15: NTRK fusions in breast cancer: clinical, pathologic and genomic findings. 2018, AACR.
187. Lezcano, C., et al., Primary and metastatic melanoma with NTRK-Fusions. *The American journal of surgical pathology*, 2018. **42**(8): p. 1052.
188. Solomon, J.P., et al., NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*, 2019.
189. Zehir, A., et al., Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*, 2017. **23**(6): p. 703-713.
190. Arnold, A., et al., Analysis of NTRK expression in gastric and esophageal adenocarcinoma (AGE) with pan-TRK immunohistochemistry. *Pathology-Research and Practice*, 2019: p. 152662.
191. Shinozaki-Ushiku, A., et al., The first case of gastric carcinoma with NTRK rearrangement: identification of a novel ATP1B-NTRK1 fusion. *Gastric Cancer*, 2020.
192. Hechtman, J.F., et al., Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol*, 2017. **41**(11): p. 1547-1551.
193. Chiang, S., et al., NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol*, 2018. **42**(6): p. 791-798.
194. Solomon, J.P. and J.F. Hechtman, Detection of NTRK fusions: merits and limitations of current diagnostic platforms. *Cancer research*, 2019. **79**(13): p. 3163-3168.

195. Rudzinski, E.R., et al., Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. *Am J Surg Pathol*, 2018. **42**(7): p. 927-935.
196. Gatalica, Z., et al., Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol*, 2019. **32**(1): p. 147-153.
197. Marchio, C., et al., ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*, 2019. **30**(9): p. 1417-1427.
198. Wong, D., S. Yip, and P.H. Sorensen, Methods for Identifying Patients with Tropomyosin Receptor Kinase (TRK) Fusion Cancer. *Pathol Oncol Res*, 2019.
199. Arora, R. and R.D. Press, Measurement of BCR-ABL1 transcripts on the International Scale in the United States: current status and best practices. *Leuk Lymphoma*, 2017. **58**(1): p. 8-16.
200. Bourgeois, J.M., et al., Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. *Am J Surg Pathol*, 2000. **24**(7): p. 937-46.
201. Sheng, W.Q., et al., Congenital-infantile fibrosarcoma. A clinicopathologic study of 10 cases and molecular detection of the ETV6-NTRK3 fusion transcripts using paraffin-embedded tissues. *Am J Clin Pathol*, 2001. **115**(3): p. 348-55.
202. Solomon, J., et al., Identifying patients with NTRK fusion cancer. *Annals of Oncology*, 2019. **30**(Supplement_8): p. viii16-viii22.
203. Brzezianska, E., et al., Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Mutat Res*, 2006. **599**(1-2): p. 26-35.
204. Kamps, R., et al., Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *International journal of molecular sciences*, 2017. **18**(2): p. 308.
205. Sheikine, Y., F.C. Kuo, and N.I. Lindeman, Clinical and Technical Aspects of Genomic Diagnostics for Precision Oncology. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(9): p. 929-933.

206. Davies, K.D., et al., Comparison of Molecular Testing Modalities for Detection of ROS1 Rearrangements in a Cohort of Positive Patient Samples. *J Thorac Oncol*, 2018. **13**(10): p. 1474-1482.
207. Doebele, R.C., et al., An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov*, 2015. **5**(10): p. 1049-57.
208. Landman, Y., et al., Rapid Response to Larotrectinib (LOXO-101) in an Adult Chemotherapy-Naive Patients With Advanced Triple-Negative Secretory Breast Cancer Expressing ETV6-NTRK3 Fusion. *Clin Breast Cancer*, 2018. **18**(3): p. e267-e270.
209. Nagasubramanian, R., et al., Infantile Fibrosarcoma With NTRK3-ETV6 Fusion Successfully Treated With the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Pediatr Blood Cancer*, 2016. **63**(8): p. 1468-70.
210. Ziegler, D.S., et al., Brief Report: Potent clinical and radiological response to larotrectinib in TRK fusion-driven high-grade glioma. *Br J Cancer*, 2018. **119**(6): p. 693-696.
211. Sartore-Bianchi, A., et al., Sensitivity to entrectinib associated with a novel LMNA-NTRK1 gene fusion in metastatic colorectal cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2016. **108**(1).
212. Farago, A.F., et al., Durable clinical response to entrectinib in NTRK1-rearranged non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2015. **10**(12): p. 1670-1674.
213. Sigal, D., et al., Activity of Entrectinib in a Patient With the First Reported NTRK Fusion in Neuroendocrine Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017. **15**(11): p. 1317-1322.
214. Lewin, K.J., Tumors of the esophagus and stomach. 1996: American Registry of Pathology.
215. Correa, P., Pathology of the Gastrointestinal Tract. By Si-Chun Ming and Harvey Goldman. *American Journal of Gastroenterology*, 1999. **94**(2): p. 549-550.
216. Everett, S.M. and A.T. Axon, Early gastric cancer in Europe. *Gut*, 1997. **41**(2): p. 142-50.

217. Marrano, D., et al., Synchronous and metachronous cancer of the stomach. *Eur J Surg Oncol*, 1987. **13**(6): p. 493-8.
218. Association, J.G.C., Japanese classification of gastric carcinoma—2nd English edition—. *Gastric cancer*, 1998. **1**(1): p. 10-24.
219. Craanen, M.E., et al., Early gastric cancer: a clinicopathologic study. *J Clin Gastroenterol*, 1991. **13**(3): p. 274-83.
220. Itoh, H., et al., Complete ten-year postgastrectomy follow-up of early gastric cancer. *Am J Surg*, 1989. **158**(1): p. 14-6.
221. Chiaravalli, A.M., et al., Lower- and higher-grade subtypes of diffuse gastric cancer. *Hum Pathol*, 2009. **40**(11): p. 1591-9.
222. Saito, H., et al., Distinct recurrence pattern and outcome of adenocarcinoma of the gastric cardia in comparison with carcinoma of other regions of the stomach. *World J Surg*, 2006. **30**(10): p. 1864-9.
223. Cunningham, S.C., et al., Survival after gastric adenocarcinoma resection: eighteen-year experience at a single institution. *J Gastrointest Surg*, 2005. **9**(5): p. 718-25.
224. Funkhouser Jr, W.K., et al., Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2012. **14**(2): p. 91-103.
225. Bellini, M.F., et al., Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. *BioMed Research International*, 2012. **2012**.
226. Olivier, M., et al., The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human mutation*, 2002. **19**(6): p. 607-614.
227. Yemelyanova, A., et al., Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Modern pathology*, 2011. **24**(9): p. 1248-1253.
228. Cole, A.J., et al., Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 26191.

229. Ando, K., et al., Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer. *Cancer medicine*, 2015. **4**(1): p. 75-83.
230. Xia, M., et al., Membranous staining of β -catenin and E-cadherin expression in patients with gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2017. **10**(8): p. 8980.
231. Marchiò, C., et al., ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Annals of Oncology*, 2019. **30**(9): p. 1417-1427.
232. Bartley, A.N., et al., HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *American journal of clinical pathology*, 2016. **146**(6): p. 647-669.
233. Rüschoff, J., et al., HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Modern Pathology*, 2012. **25**(5): p. 637-650.
234. Matsuda, I., et al., A case of gastric cancer with heterogeneous components of EB virus (+)/TP53 (+) and EB virus (-)/TP53 (-). *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015. **8**(9): p. 11766.
235. Ramos, M.F., et al., Gastric cancer molecular classification and adjuvant therapy: Is there a different benefit according to the subtype? *Journal of Surgical Oncology*, 2020. **121**(5): p. 804-813.
236. Yoon, J.-Y., et al., Histo-and immunohistochemistry-based estimation of the TCGA and ACRG molecular subtypes for gastric carcinoma and their prognostic significance: A single-institution study. *Plos one*, 2019. **14**(12): p. e0224812.
237. Gonzalez, R.S., et al., Immunohistochemistry as a surrogate for molecular subtyping of gastric adenocarcinoma. *Human pathology*, 2016. **56**: p. 16-21.
238. Di Pinto, F., et al., Are Immunohistochemical Markers Useful in Phenotypic Gastric Cancer Classification? *Oncology*, 2020: p. 1-9.

239. Gong, Y., et al., Clinicopathological Characteristics and Prognosis of Upper Gastric Cancer Patients in China: A 32-Year Single-Center Retrospective Clinical Study. *Gastroenterology Research and Practice*, 2019. **2019**.
240. Shinozaki-Ushiku, A., A. Kunita, and M. Fukayama, Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer. *International journal of oncology*, 2015. **46**(4): p. 1421-1434.
241. Nishikawa, J., et al., Clinical importance of Epstein–Barr virus-associated gastric cancer. *Cancers*, 2018. **10**(6): p. 167.
242. Eso, Y., et al., Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: Toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers. *Journal of gastroenterology*, 2020: p. 1-12.
243. Strickler, J.G., et al., Mutations and Microsatellite Instability in Sporadic Gastric Cancer: When Guardians Fail. *Cancer Research*, 1994. **54**(17): p. 4750-4755.
244. Zazula, M., et al., CDH1 gene promoter hypermethylation in gastric cancer: relationship to Goseki grading, microsatellite instability status, and EBV invasion. *Diagnostic Molecular Pathology*, 2006. **15**(1): p. 24-29.
245. Chung, Y.J., et al., Relationship between intratumor histological heterogeneity and genetic abnormalities in gastric carcinoma with microsatellite instability. *International journal of cancer*, 1999. **82**(6): p. 782-788.
246. Ratti, M., et al., Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018. **75**(22): p. 4151-4162.
247. Hissong, E., et al., Gastric Carcinomas With Lymphoid Stroma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2018. **42**(4): p. 453-462.
248. Mathiak, M., et al., Clinicopathologic characteristics of microsatellite instable gastric carcinomas revisited: urgent need for standardization. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*, 2017. **25**(1): p. 12.
249. Zhang, Q., et al., Clinicopathological features and prognostic value of mismatch repair protein deficiency in gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2018. **11**(5): p. 2579.

250. Gullo, I., et al., The transcriptomic landscape of gastric cancer: insights into Epstein-Barr virus infected and microsatellite unstable tumors. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(7): p. 2079.
251. Kim, S.T., et al., Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nature medicine*, 2018. **24**(9): p. 1449-1458.
252. Liu, X. and K.-M. Chu, E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *BioMed research international*, 2014. **2014**.
253. Chang, Y.-W.E., et al., RhoA mediates cyclooxygenase-2 signaling to disrupt the formation of adherens junctions and increase cell motility. *Cancer research*, 2006. **66**(24): p. 11700-11708.
254. Liu, X.p., et al., Expression of p53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. *Pathology International*, 2001. **51**(6): p. 440-444.
255. Tamura, G., et al., Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Laboratory investigation*, 2001. **81**(4): p. 593-598.
256. Sohn, B.H., et al., Clinical significance of four molecular subtypes of gastric cancer identified by the cancer genome atlas project. *Clinical Cancer Research*, 2017. **23**(15): p. 4441-4449.
257. Lax, S.F., et al., The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*, 2000. **88**(4): p. 814-824.
258. Chua, T.C. and N.D. Merrett, Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes—A systematic review. *International journal of cancer*, 2012. **130**(12): p. 2845-2856.
259. Bourhis, A., et al., Screening for NTRK-rearranged tumors using immunohistochemistry: comparison of 2 different pan-TRK clones in melanoma samples. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2020. **28**(3): p. 194-196.
260. Lasota, J., et al., Colonic adenocarcinomas harboring NTRK fusion genes: a clinicopathologic and molecular genetic study of 16 cases and review of the

literature. The American journal of surgical pathology, 2020. **44**(2): p. 162-173.

261. Lee, S.J., et al., NTRK1 rearrangement in colorectal cancer patients: evidence for actionable target using patient-derived tumor cell line. Oncotarget, 2015. **6**(36): p. 39028.



