

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEDÜLLER, LENFOEPİTELYOMA BENZERİ VE İNDİFERANSİYE GASTRİK
KARSİNOMLARIN MOLEKÜLER VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

Dr. Meral ÜNER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2015**

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEDÜLLER, LENFOEPİTELYOMA BENZERİ VE İNDİFERANSİYE GASTRİK
KARSİNOMLARIN MOLEKÜLER VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

Dr. Meral ÜNER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Aytekin AKYOL**

**ANKARA
2015**

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Doç.Dr.Aytekin Akyol'un yürütücüsü olduğu, TÜBİTAK 1001 kapsamında desteklenen 113S985 no'lu "Kolorektal Kanserlerin Moleküler Alt Tiplendirilmesi ve Yeni Genetik Belirteçlerin Tanımlanması" isimli proje kapsamında bir alt çalışma olarak desteklenmiştir.

Doku mikrodizin bloğumun oluşturulmasını sağlayan, immünohistokimyasal kesitlerimi ve boyamalarımı özveriyle ve başarıyla hazırlayan biyolog Aynur IŞIK'a ve teknisyen Ziya BİRİNCİ'ye, vakaların taranması aşamasında preparatlarımın ve bloklarımın arşivden teminine yardımcı olan Rahime ÇİÇEK'e ve stajyer Dr. Utku ÖZKAYA'ya,

Çalışmamın istatistik danışmanlığı yapan Doç. Dr. Erdem KARABULUT'a,

Her daim yol göstericiliğinden yararlandığım tez hocam Doç. Dr. Aytekin AKYOL'a

Dört yıl boyunca bana dünya standartlarıyla yarışan nitelikte bir eğitim veren, yanısıra akademik ve özel hayatta desteklerini benden esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Eğitim sürecimde derin izler bırakan ve ufkumu genişleten Prof. Dr. Sanjay KAKAR ve Prof. Dr. Linda FERRELL'a,

Asistanlık dönemim boyunca hem en iyi hem de en kötü yanlarıyla, bana hayatı öğreten asistan arkadaşlarıma,

Son olarak da her zaman sevgisini ve desteğini hissettirerek güçlü kalmamı sağlayan eşim Halit ÜNER'e

içtenlikle teşekkür ederim.

ÖZET

Üner M., "Medüller, Lenfoepitelyoma Benzeri ve İndiferansiye Gastrik Karsinomların Moleküler ve Klinikopatolojik Özellikleri", Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2015. Gastrik karsinomlar (GC) değişken sitolojik ve yapısal farklılıklar gösteren heterojen bir hastalık grubudur. Bu tez çalışmasının amacı; nadir görülen, ileri evre, az glandüler farklılaşma gösteren veya hiç göstermeyen, medüller, lenfoepitelyoma benzeri ve indiferansiye gastrik karsinomları daha detaylı tanımlamaktır. Çalışmaya 2000-2015 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda raporlanmış 654 mide rezeksiyon materyali arasından uygun kriterleri sağlayan 53 gastrik karsinom dahil edilmiştir. Araştırmaya dahil edilen örneklerle ait slaytlar tekrar değerlendirilmiş, klinik ve patolojik veriler kaydedilmiştir. Olgulara ait parafin bloklardan tümörün morfolojisini en iyi temsil eden iki ayrı odak örneklenerek doku mikrodizini ve bloğu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu bloklardan yapılan seri kesitlere E-cadherin, Beta-catenin, MUC5AC, p53, CDX2, hatalı eşleşme tamir mekanizması proteinleri (MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6), LMP1, SALL4, C-erbB2, AXIN, Ki-67 ve Bcl-2 antikoları kullanılarak immünohistokimyasal çalışmalar uygulanmıştır. Epstein-Barr Virus (EBV) statüsü ise EBER in situ hibridizasyon çalışması ve LMP1 pozitifliği ile değerlendirilmiştir. Morfolojik, immünohistokimyasal ve moleküler veriler ışığında 53 vaka medüller (29 olgu, DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren), EBV ilişkili (10 olgu) ve indiferansiye (14 olgu) gastrik karsinom olarak üç ana tanı grubuna ayrılmıştır. Üç farklı gruptaki gastrik karsinomların klinikopatolojik özellikleri ve sağkalımlarına ait veriler tekrar değerlendirilmiştir. Nadir görülen ve morfolojik olarak tanı zorluğu taşıyan gastrik karsinomlarda karsinogenez sürecinin aydınlatılması ve farklı tedavi alternatiflerinin uygulanabilmesi için biyobelirteç destekli sınıflandırma şemalarının kullanılması uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Gastrik karsinom, az diferansiye, medüller, MMR, EBV

ABSTRACT

Uner M., "Molecular and Clinicopathological Features of Medullary, Lymphoepithelioma Like and Undifferentiated Gastric Carcinomas", Hacettepe University School of Medicine, Pathology Department, Specialty Thesis, Ankara, 2015. Gastric carcinomas (GC) are heterogeneous group of neoplasms with broad cytological and architectural variations. The purpose of this thesis is to further characterize rarely seen advanced GCs with medullary like features, lymphoepithelioma like tumors with inflammatory stroma and undifferentiated carcinomas with minimal or no glandular differentiation. 53 GCs which support the appropriate criteria were included to this study among 654 surgically resected gastric tumor cases, reported at the Pathology Department of Hacettepe University Medical Faculty between 2000-2015. All the slides of these cases were reviewed, also clinical and pathological data were recorded. A tissue microarray (TMA) block and a tissue block (TA) were constructed using paraffin embedded blocks of these cases with typical morphology, representing two cores for each tumor. Immunohistochemistry was performed to the serial sections from these TMA and TA blocks for E-cadherin, Beta-catenin, MUC5ac, p53, LMP1, CDX2, mismatch repair mechanism proteins (MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6), C-erbB2, SALL4, AXIN, Ki-67 and Bcl-2 antibodies. Epstein-Barr Virus (EBV) status was evaluated by both EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemistry. Morphological, immunohistochemical and molecular findings lead us to classify these 53 cases into medullary GC (29 cases with defective DNA mismatch repair mechanism), EBV associated GC (10 cases) and undifferentiated GC (10 cases). Also, clinicopathological features and survival data of 53 GCs were evaluated. In order to clarify the carcinogenesis of these rarely seen gastric carcinomas with hardly recognizable morphology and to apply alternative treatment strategies, biomarker supported classification algorithms will be more convenient.

Key words: Gastric carcinoma, poorly differentiated, medullary, MMR, EBV

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
RESİMLER.....	xii
TABLolar.....	xiv
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Gastrik Karsinomların Dünyada ve Türkiye’deki Yeri (Epidemiyoloji).....	3
2.2 Gastrik Karsinomların Tanımı ve Etyolojisi.....	4
2.3. Gastrik Karsinomlarda Moleküler Alt Yapı	5
2.3.1 Epstein Barr Virüsü.....	5
2.3.2 Mikrosatellit İnstabilite	7
2.3.3 CpG Adası Metilatör Fenotip (CIMP), Mikrosatellit Statüsü ve BRAF Mutasyonu İlişkisi.....	9
2.4 Gastrik Karsinomların Sınıflaması.....	11
2.5 Gastrik Karsinomlarda Tedaviyi Yönlendiren Prognostik ve Prediktif Faktörler	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1 Olguların Seçimi	15
3.2 Doku Mikrodizini (TMA) Bloğunun ve Doku Dizini (TA) Bloğunun Oluşturulması	16
3.3 İmmünohistokimyasal Çalışmalar ve EBER in-situ Hibridizasyon Çalışması.....	18
3.4 İstatistiksel Analiz Yöntemleri	19
4 BULGULAR	21
4.1 Morfolojik Bulgular	21
4.2 İmmünohistokimyasal bulgular	28

4.2.1 Medüller Gastrik Karsinom	32
4.2.2 Epstein Barr Virüsü (EBV) ilişkili Gastrik Karsinom.....	33
4.2.3 İndiferansiye Gastrik Karsinom	34
4.3 Klinik ve İstatistiksel Bulgular	35
5 TARTIŞMA.....	41
6 SONUÇ ve ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	47
EKLER.....	61
Ek 1 İncelenen Hastaların Biyopsi Numaraları	61
Ek 2 İmmünohistokimyasal Çalışmaların Skorlanmış Verileri	62
Ek 3 Hacettepe Üniversitesi Girişimsal Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Çalışma İzni	63

KISALTMALAR

5-FU	: 5-florourasil
APC	: Adenomatosis poliposis geni
ARID1A	: The AT-rich interactive domain 1A gene
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2 proteini
BRAF	: Serine/threonine-protein kinase B-raf (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B)
CD	: Cluster of differentiation
CDX2	: Caudal type homeobox transcription factor 2
CIMP	: CpG adası metilatör fenotip
CTNN1	: Catenin (cadherin-associated protein) Beta 1
dMMR	: DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren “deficient Mismatch repair”
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBER	: “Epstein Barr-encoded small RNAs”
EBV	: Epstein-Barr virüs
EMA	: Epitelyal Membran Antijeni
EPCAM	: Epitelyal Hücre Adhezyon Molekülü
GC	: Gastrik karsinom
H&E	: Hematoksilen-Eozin
İM	: İntestinal metaplazi
Kr.	: Kronik
KRAS	: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (GTPase K-RAS)
KRK	: Kolorektal kanser
KT	: Kemoterapi
LMP1	: Latent membrane protein 1
LOH	: Heterozigosite kaybı “Loss of Heterozygosity”
MLH1	: MutL homolog 1

MMR	: DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması
MSH2	: MutS protein homolog 2
MSH6	: MutS protein homolog 6
MSI	: Mikrosatellit instabilite
MSI-H	: Yüksek mikrosatellit instabilite
MSI-L	: Düşük mikrosatellit instabilite
MSS	: Stabil mikrosatellit statüsü
MUC	: Müsin geni
N/A	: “not available” Ulaşılamayan bilgi
Nİ	: “not informative” Bilgilendirici değil
OR	: Odds Ratio
pdMMR	: Muhtemel DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren “probable deficient Mismatch repair”
pMMR	: DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması göstermeyen “proficient Mismatch repair”
PMS2	: Mismatch tamir endonükleaz
ppMMR	: Muhtemel DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu göstermeyen “probable proficient Mismatch repair”
PL	: Prekürsör lezyon; İntramukozal karsinom, yüksek dereceli displazi ve karsinoma in situ
RER	: Replication Errors
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Radyoterapi
SD	: Standart Deviasyon/Sapma
TCGA	: The Canser Genom Atlas project-Kanser Genom Atlası projesi
TFF1	: Trefoil Faktör 1 protein
TNM	: Tümör-lenf nodu-metastaz evreleme sistemi
TP53, p53	: tümör proteini 53 (tümör süpresör)
USM	: Ubiquitous somatic mutation

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** (A) Ülkemizde tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (B) Ülkemizde tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (C) Ülkemizde mide kanseri evrelerinin yüzde dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009) (D) Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (E) Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı..... 3
- Şekil 2.2.** EBER “*The Epstein–Barr virus-encoded small RNA*”; Epstein-Barr virüsü tarafından kodlanmış küçük RNA yapıları; (A) EBER 1; (B) EBER 2..... 5
- Şekil 2.3.** 3 CIMP kümesinde izlenen genetik alterasyonların karşılaştırması. Her bir küme kendine özgü belirgin genetik özellikler göstermektedir. CIMP1 sık MSI (%80) and BRAF (%53) mutasyonları ile karakterize iken CIMP2 sık KRAS (%92) mutasyonu ile ve CIMP-negatif sık p53 (%71) mutasyonu ile karakterizedir 10
- Şekil 2.4.** (A)TCGA projesi kapsamında oluşturulan 4 GC grubunun lokalizasyon dağılımı ve başlıca moleküler özellikleri (B) Aynı projedeki 295 adet GC’un 4 grup halindeki sayısal dağılımı 12
- Şekil 4.1.** İmmünohistokimyasal verilerin bir kısmına genel bakış. MMR statüsü MLH1 ile PMS2 ve MSH2 ile MSH6 birlikte değerlendirilerek oluşturulmuş; E-kaderin (E-kad.), CDX2, p53, SALL4, Bcl-2 ve MUC5ac için skor 2; Beta-katenin (B-kat.) için skor 3 ve 4; AXIN2 için skor 2 ve 3 farklı renkler kullanılarak renklendirilmiştir. EBER statüsü için EBER in situ hibridizasyon pozitifliği koyu yeşil; LMP1 pozitifliği açık yeşil ile renklendirilmiştir. dMMR, pdMMR, pMMR ve ppMMR statüleri sırasıyla koyu kırmızı, açık kırmızı ve koyu mavi, açık mavi ile renklendirilmiştir..... 30

Şekil 4.2. Sağkalım eğrileri (A) Tüm olguların sağkalım eğrisi (Kaplan-Meier) (B) Olguların gruplara göre ayırımından sonraki sağkalım eğrileri (Kaplan-Meier)	37
Şekil 4.3. 53 olgunun bölgelere göre dağılımı (A) DNA Hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller GC olgularının bölgelere göre dağılımı (B) EBV ilişkili GC olgularının bölgelere göre dağılımı (C) İndiferansiye GC olgularının bölgelere göre dağılımı.....	38
Şekil 4.4. DNA Hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller morfolojideki GC olgularının sağkalım eğrisinin Watanabe ve ark. (1976) nın araştırmasındaki ileri evre lenfoid stromadan zengin 25 olgu ile sağkalım açısından karşılaştırılması (Kaplan-Meier)	40

RESİMLER

- Resim 3.1.** (A) ve (B) Manuel doku mikrodizin cihazı «Advanced Tissue Arrayer (ATA100, CTR scientific)» (C) Tümör morfolojisinin en iyi temsil edildiği işaretli iki odak 17
- Resim 3.2.** (A) 47 GC olgusu ve 3 mikrosatellit instabilite durumu bilinen kolon olgusundan oluşan doku mikrodizinine ait parafin blok (B) “B” deki bloğa ait H&E boyalı kesit (C) Eklenen son 6 olgunun 5’inden oluşturulan doku bloğu (D) “C” deki bloğa ait H&E boyalı kesit 17
- Resim 3.3.** Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji A.D. immünohistokimya laboratuvarına ait otomatik cihaz 19
- Resim 4.1.** DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller karsinomların makroskopik görünümü (A) mide distalinde yerleşmiş ortası deprese, kenarları eleve nitelikte ülserovejetan kitle (B) Benzer nitelikteki bir başka tümörde kesit yüzünde serozaya doğru itici tarzda (ekspansil) büyüme paterni (oklar), tümörün yakınında belirgin genişleme göstermiş metastatik lenf nodülü (yıldız) ve tümör-tümör dışı mukoza geçişi (ok ucu). 23
- Resim 4.2:** dMMR GC grubu medüller morfoloji (A) Glandüler farklılaşma göstermeyen, özefagus alt uca kadar uzanan solid/trabeküler morfolojide neoplazm x100; (B) Neoplastik hücre trabeküllerinin daha yakından görünüşü, trabeküller çevresinde inflamatuvar yanıt mevcut, x200; (C) Neoplastik hücreler, sinsityal geniş eozinofilik sitoplazmalı, veziküle nükleuslu epitelyal görünümde hücreler; neoplastik hücre grupları ortasında nötrofilden zengin nekrotik odaklar (oklar); neoplastik hücreleri infiltre eden lenfositler «TIL» (ok uçları); x400 (D) Tümör serozal yüzeye ulaşıyor ancak itici tarzda kenarlara ve nispeten iyi sınırlı ekspansil bir büyüme paternine sahip (oklar) x200. 24
- Resim 4.3.** dMMR GC grubu medüller morfoloji (A) Trabeküller oluşturan neoplastik hücreler, fokal bir glandüler farklılaşma alanı (iç resim) dışında solid görünüm hakim x100; (B) Neoplastik hücre trabeküllerinin yakından görünümü x400; (C) ve (D) Aynı vakaya ait neoplastik hücrelerde MLH1 ekspresyon kaybı (ok); çevre inflamatuvar hücrelerde pozitif boyanma (ok ucu), x100, x200. 25

Resim 4.4. EBV ilişkili GC, lenfoepitelyoma benzeri (LEB) morfoloji (A) İnflamatuvar stromadan zengin epitelyal görünümde neoplastik hücre adaları; x200x; (B) Neoplastik hücre adalarının yakından görünümü, yer yer TIL'ler dikkati çekiyor; x400	26
Resim 4.5. EBV ilişkili GC, lenfoepitelyoma benzeri (LEB) morfoloji (A) İnflamatuvar stromadan zengin epitelyal görünümde neoplastik hücre adaları (oklar); x100 (B) Neoplastik hücre adaları (ok), lenfoid stroma içerisinde küçük epitelyal gruplar oluşturuyor; x200.	26
Resim 4.6. İndiferansiye GC morfolojisi (A) Geniş nekroz alanları içeren indiferansiye morfolojide, oldukça diskohesiv hücrelerden oluşan tümör x100; nekroz içerisinde inflamatuvar hücreler dikkat çekiyor (iç resim); x400, (B) Kas demetlerini infiltre ederek gelişim gösteren diskohesiv diffüz neoplastik hücre infiltrasyonu; x100, oldukça pleomorfik ve sık mitoz içeren irregüler neoplastik hücrelerin yakından görünümü (iç resim); x400.	27
Resim 4.7. 44/53 olguda izlenen intestinal metaplazi; x100	27
Resim 4.8. (A) ve (B) MLH1 kaybı gösteren olgu (C) ve (D) MSH2 kaybı gösteren olgu (olgu 41), ana resimler, x100; (iç resimler, x400).....	32
Resim 4.9. (A) ve (B) Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek olgu (C) ve (D) Ki-67 proliferasyon indeksi düşük olgu, ana resimler, x100 ;(iç resimler, x400).....	33
Resim 4.10. (A) ve (B) EBER pozitif ve (C) ve (D) EBER negatif olgular, x100 (iç resimler, x400)	34

TABLOLAR

Tablo 2.1. Adenokarsinomların histolojik derecelendirme kriterleri	11
Tablo 2.2. Mide karsinomalarında TNM evrelemesi	14
Tablo 3.1. Dr. Güneş Güner'in tezinde rezeksiyon materyallerine önerilen, primer mide karsinomu sınıflandırma kriterleri	16
Tablo 3.2. Doku mikrodizin bloğunda kullanılan şablon; R: referans kolon adenokarsinomu, 1-47: kronolojik sırayla GC olguları, 48-50: mikrosatellit statüsü bilinen kolon karsinomları.....	18
Tablo 3.3. Olgulara uygulanan immünohistokimyasal çalışmada kullanılan antikorlar, dilüsyonları, kullanılan antikor markası ve klonu.....	19
Tablo 4.1. Olguların H&E düzeyinde başlıca morfolojik bulguları	22
Tablo 4.2. Olguların gruplara göre düzenlenmiş morfolojik verileri (A) DNA Hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller morfolojideki GC olgularının morfolojik bulguları (B) EBV ilişkili GC olgularının morfolojik bulguları (C) İndiferansiye GC olgularının morfolojik bulguları	28
Tablo 4.3. 53 olgunun klinik, morfolojik ve prognostik verilerinin bir kısmı (A) DNA Hatalı eşleşme Tamir Mekanizması bozukluğu gösteren medüller GC Olgularının klinik-morfolojik-prognostik bulguları (B) EBV ilişkili GC Olgularının klinik-morfolojik-prognostik bulguları (C) İndiferansiye GC Olgularının klinik-morfolojik-prognostik bulguları	36

1 GİRİŞ

Gastrik karsinomlar (GC), 2008 verilerine göre dünyada en sık (insidans) 4. kanserdir ve kanserden ölümlerin nedenleri arasında 2. sırada oluşuyla önemli bir mortalite nedenidir¹. Globocan 2012 tahminlerine göre; yaklaşık 1 milyon yeni GC olgusunun 2012 yılında ortaya çıkacağı öngörülmektedir; ki bu rakamlar GC'i akciğer, meme, kolorektal ve prostat kanserinden sonra dünyadaki 5. en sık malignensi yapmaktadır. Olguların %70'inden fazlası gelişmekte olan ülkelerde olup tüm dünyadaki olguların yarısı Doğu Asyada görülmektedir². Yaşa bağlı insidans verileri, erkeklerde kadınlara göre 2 kat daha sık GC görüldüğünü göstermektedir. Her iki cinsiyette kansere bağlı ölüm nedenleri arasında, GC tüm ölümlerin %8.8 'i (723 000 olgu) ile en sık 3. nedendir². 2009 istatistiklerine göre, Türkiye'de mide kanserleri erkeklerde en sık beşinci, kadınlarda en sık altıncı kanserdir. Ortalama sağ kalım süresi 21,5 ay olan GC'ların yaklaşık yarısını bölgesel yayılım gösteren tümörler oluşturmaktadır³.

GC'lar, morfolojik görünüm, biyolojik davranış ve moleküler alt yapı açısından heterojen bir grup tümörün temsil edildiği gerek çevresel gerekse çok etkenli genetik etyolojilere sahip malign epitelyal neoplazilerdir⁴. Gastrik karsinomların büyük kısmını Lauren sınıflamasına göre diffüz ve intestinal olarak gruplandırılan adenokarsinomlar oluşturmaktadır⁵. Zaman içerisinde, bu sınıflamaya eleştiri olarak Ming ve Goseki gibi araştırmacıların alternatif sınıflamaları gündeme gelmiş, Carnerio ve ark. sınıflamayı yeniden ele almışlardır⁶⁻⁸. Son olarak 2010 yılı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflaması standardizasyon amacıyla daha kapsamlı alternatif bir histopatolojik sınıflama önermiş; gastrik karsinomları papiller, tübüler, müsinöz (kolloid) ve "zayıf kohesif" karsinomlar şeklinde 4 temel grup ve yanısıra lenfoepitelyal stromadan zengin (medüller), hepatoid gibi nadir varyantları da içerecek şekilde alt gruplara ayırmıştır⁴. Klinik yaklaşımları ve tedavi stratejilerini yönlendirmek amacıyla Kanser Genom Atlası Projesi (The Cancer Genome Atlas (TCGA)) dahilinde, 2014 yılında kapsamlı bir moleküler sınıflama yayınlanmıştır⁹. Bu çalışma karsinogenezde rol alan sorunlu yolları ve bu yolların olası yönlendirici mutasyonları ("driver mutations") tanımlayarak yeni tedavi yaklaşımlarının önünü

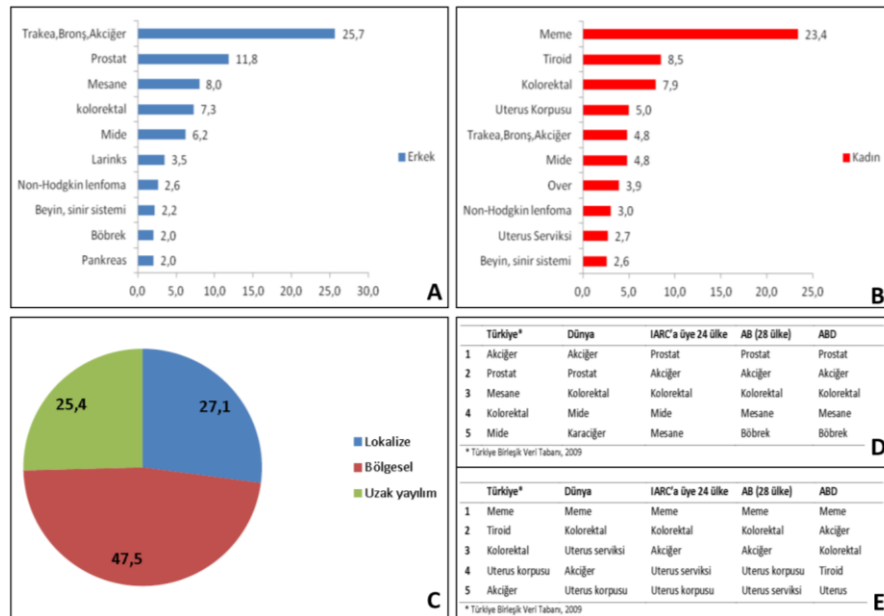
açmayı amaçlamıştır. Tüm sınıflama çalışmalarına rağmen, DSÖ'ün sınıflaması da dahil olmak üzere, GC'ların klinik yaklaşımı ve tedavi stratejilerini yönlendirebilecek tatmin edici bir histolojik sınıflaması henüz yoktur. Ayrıca mevcut sınıflamalardaki belirsizlikler nedeniyle daha az sıklıkta görülen ve az glandüler farklılaşma gösteren veya glandüler farklılaşma göstermeyen bir grup GC biyolojik davranışının kötü olacağı da kabul edilerek az diferansiye veya indiferansiye karsinom benzeri tanılar almakta ve bu hastalara agresif tedaviler uygulanmaktadır.

Bu tez çalışmasında 2000-2015 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.'da raporlanmış 654 adet mide rezeksiyon materyali morfolojik olarak yeniden değerlendirilmiştir. Bunlar arasından az glandüler farklılaşma gösteren veya glandüler farklılaşma göstermeyen 53 adet ileri evre, nadir görülen GC daha ileri sınıflama amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların seçiminde Dr. Güneş Güner'in Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D. uzmanlık tezinde kullanılan morfolojik sınıflama kriterleri dikkate alınmıştır¹⁰ (Tablo 3.1). Bu çalışmada, belirtilen kriterlere göre seçilen 53 olguya ait histomorfolojik, immünohistokimyasal ve bazı moleküler özellikler ile olguların sağkalım oranları karşılaştırılarak gruplandırılmaya, olguların olası biyolojik davranışı ön görülmeye, klinik yaklaşım ve tedavi stratejilerini yönlendirebilecek ipuçları ortaya konmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Gastrik Karsinomların Dünyada ve Türkiye'deki Yeri (Epidemiyoloji)

Gastrik karsinomlar, 2008 verilerine göre dünyada en sık (insidans) 4. kanserdir ve kanserden ölümlerin nedenleri arasında 2. sırada oluşuyla önemli bir mortalite nedenidir¹. Globocan 2012 verilerine göre; yaklaşık 1 milyon yeni GC olgusunun 2012 yılında ortaya çıkacağı öngörülmektedir (952 000 olgu; tüm kanser olgularının %6,8'i); ki bu rakamlar GC'ları akciğer, meme, kolorektal ve prostat kanserinden sonra dünyadaki 5. en sık malignensi yapmaktadır. Ayrıca kanserden ölüm nedenleri arasında da 3. sıraya gerilemektedir. 1975 tahminlerinde en sık kanser olan GC, bu verilere göre kayda değer bir gerileme göstermiştir. Olguların %70'inden fazlası (677 000 olgu; 456 000 erkek ve 221 000 kadın) gelişmekte olan ülkelerde olup tüm dünyadaki olguların yarısı Doğu Asyada (özellikle Çin'de) görülmektedir.



Şekil 2.1. (A) Ülkemizde tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (B) Ülkemizde tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (C) Ülkemide mide kanseri evrelerinin yüzde dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009) (D) Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (E) Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı

Yaş'a göre standardize edilmiş insidans oranları, erkeklerde görülme sıklığının kadınların iki katı olduğunu göstermektedir. Her iki cinsiyet için kansere bağlı ölüm nedenleri arasında Globocan 2012 tahminlerine göre GC tüm ölümlerin %8.8'i (723 000 olgu) ile en sık 3. nedendir². Hastaların büyük kısmı 50 yaşın üzerindedir; ancak nadir genç hastalar hatta çocuk hastalar da bildirilmiştir¹¹. GC'lar 30 yaşın altında oldukça nadirdir; genelde kadın ve erkek popülasyonda insidans yaşla artma eğilimindedir^{4, 12}.

Genç yaş grubunda, GC'lar kadınlarda daha sık görülmekte ve herediter olma eğilimindedir. Bu tümörlerin büyük kısmını "diffüz tip" karsinomlar oluşturur^{4, 13, 14}. Ülkemizdeki verilere bakıldığında ise 2009 yılı istatistiklerine göre, Türkiye'de mide kanserleri erkeklerde en sık beşinci, kadınlarda en sık altıncı kanserdir. Ortalama sağ kalım süresi 21,5 ay (20,6-22,5 ay; %95 GA) olan GC'ların yaklaşık yarısını (%47,5) bölgesel yayılım gösteren tümörler oluşturmaktadır³ (Şekil 2.1).

2.2 Gastrik Karsinomların Tanımı ve Etiyolojisi

Mide neoplazmları çok değişik histolojik kökenlere sahip olabilir; ancak çoğunluğunu karsinomlar oluşturmaktadır. GC'lar, morfolojik görünüm, biyolojik davranış ve moleküler alt yapı açısından heterojen bir grup tümörü temsil etmektedir. Bu karsinomlar, gerek çevresel gerekse genetik, çok etkenli etiyojilere sahip malign epitelial neoplazilerdir⁴. GC'ların patogeneğinde çevresel faktörlerin rolü büyüktür. Etiyolojideki en önemli çevresel faktör Helikobakter pilori mikroorganizması iken bir diğer önemli faktör ise safra reflüsüdür^{4, 15-17}. Pratikte, tüm GC'lar foveolar tabakanın jeneratif (üretken) kök hücre/bazal hücre kısmından köken almaktadır^{18, 19}. Persistan H. Piloni enfeksiyonu sırasıyla kronik gastrit, mukozal atrofi, fokal intestinal metaplazi ve displazi fenotipik değişikliklerine neden olmakta ve sonuçta bu süreç zamanla intestinal tip gastrik adenokarsinoma kadar ilerlemektedir^{4, 19-26}.

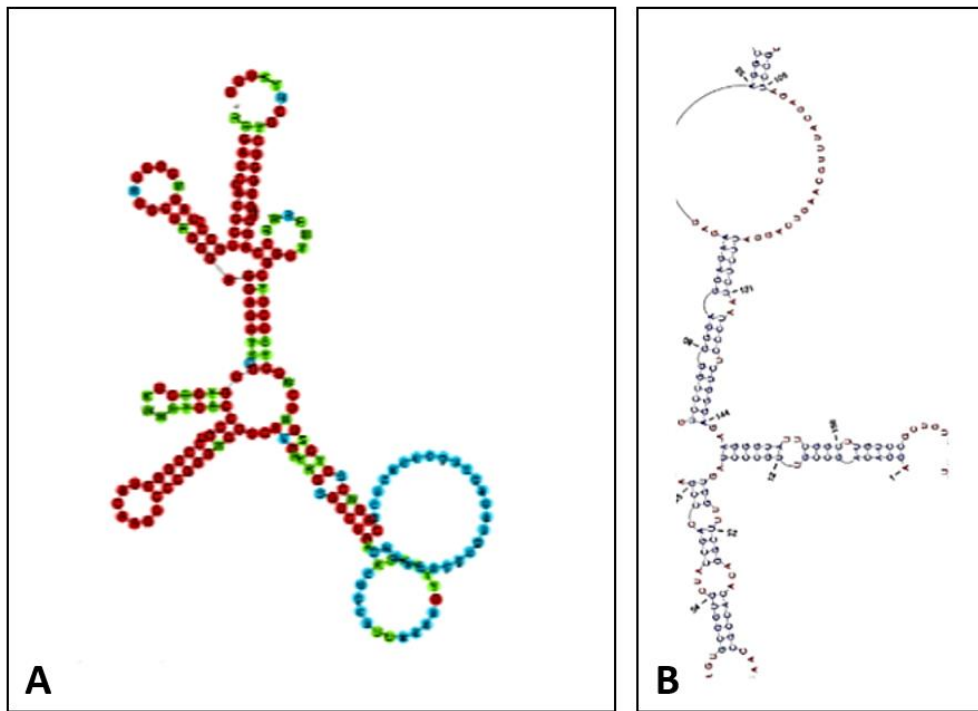
Sigara, beslenme alışkanlıkları (artmış tuzlanmış/tütsülenmiş gıda alımı, taze meyve ve sebze tüketiminin azlığı gibi) diğer iyi bilinen olumsuz çevresel faktörler

arasındadır. B-karoten, vitamin E ve selenyum gibi antioksidan maddelerin alımı olumlu çevresel faktörlerden olup anti-kanserojen etkiye sahiptir^{4, 27}.

Ayrıca minör etkiye sahip etyolojik etkenler arasında gastrik polipler, Menétrier hastalığı, gastrik peptik ülser ve gastrik güdükler sayılabilir. Olguların %85-90'ında GC'a hipokloridi eşlik etmekte; hipokloridinin GC gelişmeden önce midede uzun süre (yıllarca) varolduğu bilinmektedir. Yüksek intragastrik pH, diyetteki nitratları nitritlere indirgeyen ve bu nitritlerin varlığında diyetteki aminleri karsinojenik N-nitrozo bileşiklerine dönüştüren bakterilerin gelişimini tetiklemektedir^{16, 19, 28}.

2.3 Gastrik Karsinomlarda Moleküler Alt Yapı

2.3.1. Epstein Barr Virüsü



Şekil 2.2. EBER “*The Epstein–Barr virus-encoded small RNA*”; Epstein-Barr virüsü tarafından kodlanmış küçük RNA yapıları; (A) EBER 1; (B) EBER 2.

EBER’ler, diğer bir deyişle Epstein-Barr virüsü tarafından kodlanmış küçük RNA yapıları, Epstein–Barr Virüsü (EBV) ile enfekte olmuş insan hücre nükleuslarında

belirgin artış gösteren protein kodlamayan RNA'lardır. İlk kez 1981'de keşfedildiklerinde enfekte hücrelerde en bol bulunan RNA olarak saptanmışlardır²⁹. EBER1 ve EBER2, sırasıyla 167 ve 172 nükleotid uzunluğunda, çoklukla nükleusta bulunan ve protein kodlamayan kısa RNA'lardır. Bu iki RNA konakçının RNA polimeraz III enzimi ile latent EBV enfeksiyonu sırasında transkripte edilirler^{30, 31}. Kuramsal olarak, EBER1 ve EBER2 viral genomdan farkedilebilir bir fenotipik değişiklik olmadan temizlenebilirse de, pratikte doğada hiçbir zaman genomdan tamamen temizlendiği saptanmamıştır³⁰. Latent EBV enfeksiyonun karsinojenik etkisi sorgulandığında, tek başına EBER ekspresyonunun, ciddi kombine immünyetmezlikli farelerde tümör gelişimini indükleyebildiğini gösteren çalışmalar dikkati çekmektedir^{32, 33}.

GC-EBV ilişkisi literatüre ilk kez 1990 ve 1991 yıllarında, kanser genomunda EBV genom varlığının gösterilişi ile girmiştir^{34, 35}. EBV ilişkili mide karsinom insidansı Japonya ve Avrupada %6-7 iken Amerikada %16'ya kadar çıkmakla birlikte günümüzde GC'ların yaklaşık %9-10'unda monoklonal nitelikteki EBV genomunun bulunduğu düşünülmektedir³⁶⁻⁴¹. EBV ilişkili maligniteler arasında EBV ilişkili GC'lar ilk sıralarda yer almaktadır⁴² ve hemen tüm tümör hücrelerinde EBV genomu bulunur. Bu bulgular nedeniyle EBV enfeksiyonunun gastrik karsinogenezde rolünün bulunduğu düşünülür.

EBV ilişkili GC erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür⁴⁰, proksimal yerleşimli, daha düşük TNM evreli olmaya meyillidir ve hastalık-ilişkili sağkalımları diğer GC'lara göre daha uzundur⁴³. Bu farklı özellikleri nedeniyle EBV ilişkili olan ve olmayan GC'ların farklı moleküler mekanizmalarla gerçekleştiği öne sürülmektedir⁴⁴. Lenfoid stromadan zengin olan GC'ların önemli kısmında EBV genomu saptanması⁴⁵, lenfoid stromayı dikkat çekici bir morfolojik ipucu yapmaktadır. Bir başka kaynakta da EBV ilişkili GC'a benzer şekilde lenfoid stromadan zengin ileri evre GC'larda prognoz diğer ileri GC'lara göre daha iyi olduğu rapor edilmiştir⁴⁶.

Ayrıca EBV ilişkili GC'lara önemli bir karsinojenik mekanizma olan hipermetilasyon durumu açısından bakılacak olursa (CpG adası metilatör fenotip-CIMP); EBV-pozitif GC'ların CDKN2A (p16INK4A) "*promoter*" hipermetilasyonu

içerdiği ancak MSI ilişkili CIMP'a karakteristik olan MLH1 hipermetilasyonu içermediği görülür⁴⁷.

2.3.2 Mikrosatellit İnstabilite

Mikrosatellit instabil tümörler üzerindeki çalışmalar mideden önce kolonda başladığından ve bu kanser gelişim yolağı ilk önce kolonda tanımlandığından bilgi birikimi daha çok kolon kaynaklıdır. Ancak mikrosatellit instabil mide tümörleri kolonda görülen emsalleri ile benzer morfolojik, immünohistokimyasal ve klinik özellikler gösterdiği kabul görmektedir^{48, 49}.

Günümüzde, sporadik kolon karsinomlarının yaklaşık %15'inin mikrosatellit instabil (MSI) yolaktan geliştiği bilinmektedir^{50, 51}. Mide tümörlerinin de %15'inde mikrosatellit instabilitesi görülür; bu grubun içinden Lynch sendromlu olan olguları, sporadik mutasyonları olan olgulardan ayıklamak ayrıca genetik testler (sekans analizleri, hipermetilasyon ve BRAF mutasyon yokluğu gibi) gerektirir. Lynch sendromlu kişilerde GC gelişme riski ise %6-13 arasında değişmektedir⁵².

MSI tümörler DNA hatalı eşleşme tamir işlevlerini kaybetmiş tümörlerdir; mikrosatellitler tekli, ikili veya üçlü nükleotid tekrarları olup DNA replikasyonu sırasında insersiyon/delesyon "*loop*" larına neden olurlar; DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bu "*loop*" ları düzelterek mikrosatellitleri "*germline*" uzunluklarında sabit tutar. Bu mekanizmanın çalışmaması, yüksek mikrosatellit instabilite (MSI-H) durumu olarak tanımlanan, genomda değişen uzunluklarda multipl alellerin gelişmesine neden olur^{53, 54}. Yüksek mikrosatellit instabilite daha önceleri literatürde genomda yayılmış somatik mutasyonlar (USM) ve DNA replikasyon hataları (RER) olarak da tanımlanmıştır.

Sporadik MSI tümörlerde MLH1 geninin "*promoter*"ındaki hipermetilasyon MLH1 proteini ve dolayısıyla ona bağlanan PMS2 proteininin epigenetik ekspresyon kaybına neden olmaktadır; böylece DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması (MMR) işlevini yitirmekte, genom yüksek mikrosatellit instabil (MSI-H) duruma gelmektedir.

Bu nedenle sporadik MSI kanserlerde genellikle global hipermetilasyon tespit edilmektedir (CpG adası metilatör fenotip, CIMP).

Lynch sendromunda ise hatalı eşleşme tamir mekanizmasının kaybı daha çok hatalı eşleşme genlerinden birindeki ya da TACSTD1 düzenleyici genindeki (EPCAM) “*germline*” mutasyonundan kaynaklanmaktadır⁵⁵. Lynch sendromunda mikrosatellit instabilitesi sergileyen mide de dahil çeşitli tümörler görülür (mide, kolon, endometrium vb.)⁵².

MLH1 ile PMS2 ve MSH2 ile MSH6 aynı protein kompleksinin üyeleri olduğundan, MSH2 ve MLH1’deki gen ürününün kaybı, bazen bu genlerin ürünü proteinlere bağlanan diğer proteinlerde de (MSH6 ve PMS2) kayba neden olmaktadır. MSH6 geninin kendisi de mikrosatellit içerdiğinden, “*germline*” mutasyon yanısıra DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğunun sonucu olarak da eksprese edilemeyebilir. MSI statüsünün sınıflandırılması, Bethesda paneli olarak bilinen birtakım mono ve dinükleotid tekrarlarının (sekansları) uzunluğundaki değişikliklerin tespitine dayanmaktadır⁵⁶⁻⁵⁸. MSI-H, beş mikrosatellit belirtecinden (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) en az iki tanesinde (ya da daha geniş panellerde > %40) uzunluk artışının tespiti ile tanımlanır. Sporadik MSI-H kolorektal karsinomlar (KRK) (ki MSI-H mide karsinomlarının eşleniği kabul edilmektedirler), Lynch sendromlu KRK’lara oranla daha fazla mikrosatellit değişkenliği (extensive alteration) gösterirler. Çoğu MSI-H kanser diploiddir ya da diploide yakındır; kromozom 5q kaybı da dahil olmak üzere daha az sıklıkta heterozigosite kaybı (LOH) gösterirler⁴. Beşli Bethesda paneli içerisinde 1 anormal belirteç içeren tümörler (geniş setlerde <%40) düşük mikrosatellit instabilite (MSI-L) olarak tanımlanırlar. Bu grup, teknik bir terminolojiyi yansıtmakta olup bu tümörler genellikle mikrosatellit stabil (MSS) tümörlerle birlikte sınıflanırlar.

MSI-H tanısı ayrıca dolaylı bir şekilde MMR proteinlerinin immünohistokimyasal olarak kaybının gösterilmesi ile de yapılabilir; bu yöntemle sporadik MSI tümörler kalıtsal olanlara oranla daha iyi tespit edilirler⁵⁹. Bir çok gen (örneğin TGFBR2, IGF2R, BAX, TCF7L2, E2F4, PTEN, MSH6, MSH3, CASP5 vb.) ekzonik kodlanma alanlarında küçük gruplar halinde nükleotid tekrarları

içerdiğinden MSI-H tümörlerde, bu genlere lokalize sık “frameshift” (çerçeve kayması) mutasyonları mevcuttur⁶⁰⁻⁶⁴. Bu durum genomda sıklıkla hipermutabl (çok sık mutasyona açık) bir durumla sonuçlanmaktadır.

MSI-H tümörlerin mutasyon profili APC ve BRAF mutasyonlarını içerirken (yaklaşık %50), nadiren KRAS mutasyonu içerir. Lynch sendromu ile ilişkili tümörler APC mutasyonuna alternatif olarak CTNNB1 (beta-katenini kodlayan gen) mutasyonları içerebilir⁶⁵; ancak BRAF mutasyonu içermez⁶⁶. Bu özellik MLH1 kaybı içeren tümörlerin sporadik ve herediter olanlarını birbirinden ayırmada oldukça faydalıdır. MSI-H tümörler daha iyi “evreye özgü prognoz”a sahiptir⁶⁷⁻⁶⁹. Tedavi açısından bakıldığında, MSI-H tümörler 5-florourasil gibi terapötiklere daha az yanıt veririrken^{70, 71} irinotekana yanıtları daha iyidir⁷². Ayrıca bir çok çalışma MSI ile multipl tümör varlığı arasında ilişki bildirmiştir^{73, 74}.

GC’larda, MSI-H fenotip “germline” mutasyonlardan çok, herediter olmayan (sporadik), MLH1 geninin promoter’ının metilasyonu yoluyla yani epigenetik susturma (epigenetic silencing) yoluyla gerçekleşmektedir⁷⁵. Sporadik GC’larda MMR genlerinin somatik mutasyonu oldukça nadirdir⁷⁶. Lauren sınıflamasına göre diffüz GC’ların %5-10’unda, intestinal GC’ların ise %15-40’ında MSI saptanmıştır. Yüksek MSI seviyeleri gösteren GC’lar (MSI-H) antral lokalizasyon, intestinal tip olma ve ekspansil büyüme paterni ile karakterizedir. MSI-H tümörler MSS tümörlere oranla daha iyi prognoza sahiptir^{73, 74, 77-79}.

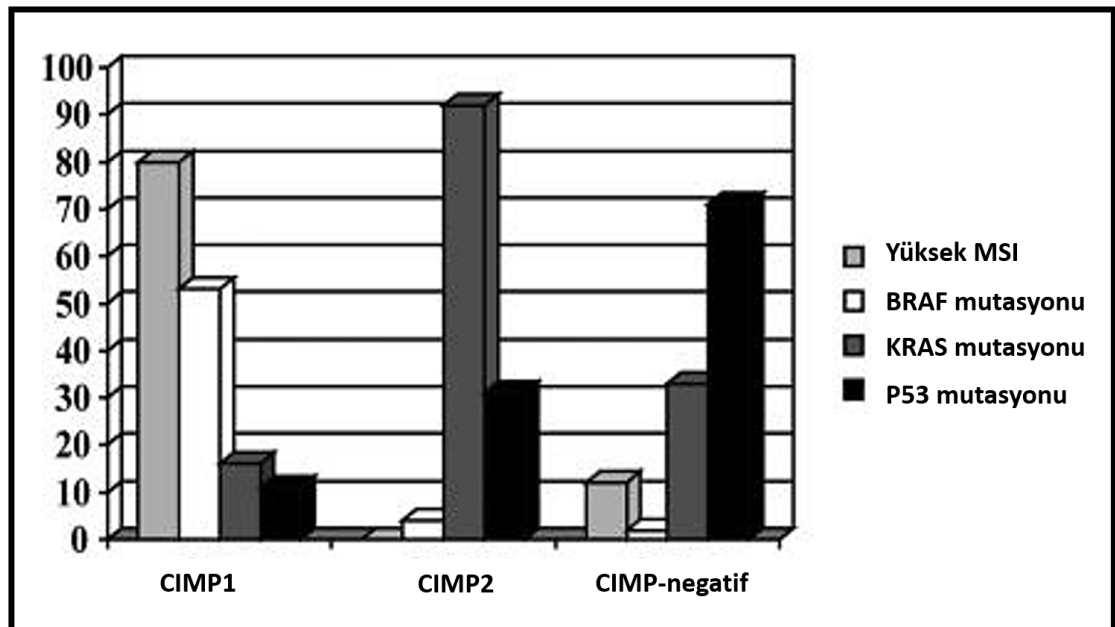
2.3.3 CpG Adası Metilatör Fenotip (CIMP), Mikrosatellit Statüsü ve BRAF Mutasyonu İlişkisi

Bir çok gen promoter bölgelerinde CpG adaları olarak tanımlanan sitozin ve guaninden zengin alanlar içerir. Bu CpG adalarındaki sitozin rezidülerinin metilasyonu, kromozom yapısında değişikliklere yol açar ve gen ekspresyonunu inhibe eder. İnhibe edilen bu genler arasında tümör süpresör genler de olabilir ve bu durum mutasyon olmaksızın, epigenetik olarak tümör gelişiminin baskılanmasının bozulmasına yol açar. Gen “promoter”larının metilasyonu tip A metilasyonda olduğu

gibi yaş ile ilişkili olabilirken, tip C metilasyonda olduğu gibi belirli kanser tiplerine özgü ve yaygın olarak da görülebilir⁸⁰⁻⁸².

CpG adası metilatör fenotipteki tümörler, MLH1 genindeki promotor hipermetilasyonu ile MSI-H olabilirler; ancak CIMP karsinomlarının büyük kısmı mikrosatellit stabildir.

Literatürde CIMP statüsünün MSI statüsü ve TP53, BRAF, KRAS genlerindeki mutasyonlar ile ilişkisini irdeleyen çalışmalarda^{83, 84} CIMP statüsü CIMP1, CIMP2 ve CIMP-negatif olmak üzere 3 grupta toplanmıştır. CIMP1, sık MSI-H (%80) ve BRAF (%53) mutasyonları; nadir KRAS (%16) ve p53 (%11) mutasyonları ile karakterizedir. CIMP2 ise zıt bir şekilde sık KRAS (%92), BRAF (%4) ve p53 (%31) mutasyonları ile ilişkilidir ve mikrosatellit stabildir. CIMP negatif grup ise yüksek p53 (%71) mutasyonu ve düşük MSI (%12), BRAF (%2) veya KRAS (%33) içermektedir⁸³ (Şekil 2.3). MLH1 hipermetilasyonuna bağlı yüksek mikrosatellit instabilite içeren CIMP, aynı zamanda BRAF mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur (OR, 4.5; P < 0.0002). CIMP ayrıca BRAF V600E T-A transversiyonu ile ilişkilidir (OR, 48.5; P < 0.0002)⁸⁴.



Şekil 2.3. 3 CIMP kümesinde izlenen genetik alterasyonların karşılaştırması. Her bir küme kendine özgü belirgin genetik özellikler göstermektedir. CIMP1 sık MSI (%80) and BRAF (%53) mutasyonları ile karakterize iken CIMP2 sık KRAS (%92) mutasyonu ile ve CIMP-negatif sık p53 (%71) mutasyonu ile karakterizedir⁸³.

2.4 Gastrik Karsinomların Sınıflaması

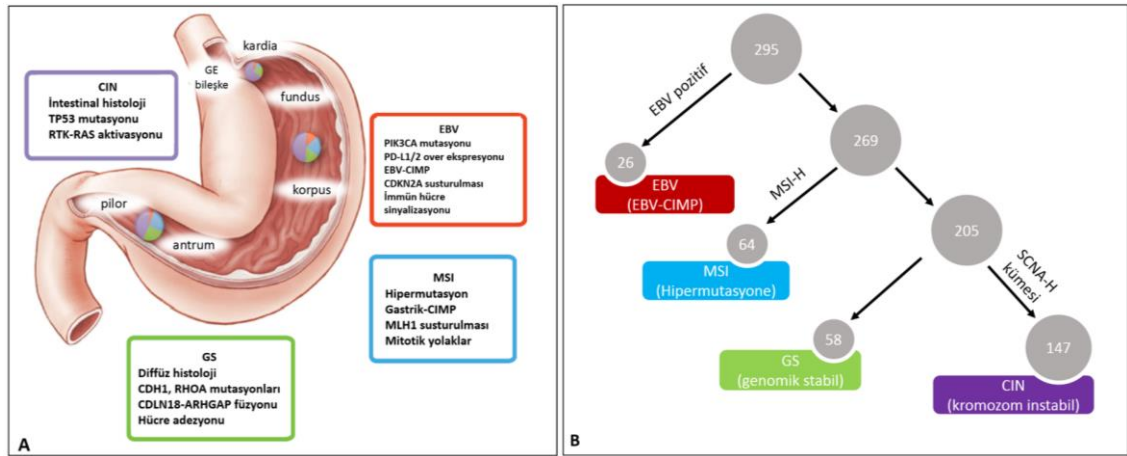
Gastrik karsinomları sınıflama çabası 1926 yılında Borrmann'ın makroskopik sınıflaması (Tip I-polipoid, Tip II-vejetan “*fungating*”, Tip III-ülser, Tip IV-infiltratif) ile başlamıştır¹¹. Sonrasında, günümüzdeki sınıflamaları derinden etkileyen Lauren sınıflaması, gastrik karsinomları diffüz, intestinal, “*indeterminate*” ve mikst olmak üzere dört gruba ayırmıştır⁵. Bu sınıflamada belirleyici etken, “az, orta ve iyi farklılaşma gösteren” şeklinde tümörün gösterdiği glandüler farklılaşma oranı ve özellikle diffüz tipte olmak üzere infiltrasyon paternidir. Zaman içerisinde, bu sınıflamaya eleştiri olarak Ming ve Goseki gibi araştırmacıların alternatif sınıflamaları gündeme gelmiştir. Ming, Lauren sınıflamasının gastrik karsinomları gruplar halinde intestinal tipte bez yapımı yani morfolojik yapıyı dikkate alırken diffüz tip gastrik karsinom grubunda tümörün davranışını dikkate aldığını söyler; ancak tüm GC'ların değişken derecelerde farklılaşma gösterdiğini ve büyüme paternlerinin hücre matürasyonu ile ilişkili olmadığını belirtir⁶. Ming'e göre tümör hücrelerinin glandüler yapılar yapmıyor olması farklılaşmadığı anlamına gelmemektedir; bu nedenle o, gastrik karsinomları büyüme paterni ve invazyon şekline göre ekspansil ve infiltratif olmak üzere iki gruba ayırır⁶. Nakamura tüm tümörleri diferansiyel ve indifferansiyel olarak sınıflandırırken⁸⁵, Goseki tübüler farklılaşma ve intrasitoplazmik mütasyon varlığını baz alarak GC'ları 4 tip olarak gruplandırmıştır⁷.

Tablo 2.1. Adenokarsinomların histolojik derecelendirme kriterleri⁴

KRİTER	DİFERANSİYASYON	SAYISAL DERECE	DİSKRİPTİF DERECE
> %95 gland formasyonu	İyi diferansiyel	1	Düşük
%50-95 gland formasyonu	Orta derecede diferansiyel	2	Düşük
%0-49 gland formasyonu	Az diferansiyel	3	Yüksek
Yüksek MSI	Değişken	Değişken	Düşük

Carnerio ve ark. GC'ları morfolojik ve immünofenotipik özelliklerine göre yeniden ele alıp 4 grupta (glandüler, izole hücre, solid ve mikst) sınıflamışlardır⁸. Bu sınıflamada farklılaşmanın yönünü belirlemek için gastrik (MUC5ac, MUC6 ve TFF1 gibi) ve intestinal (MUC2, CDX2 ve CD10 gibi) immünohistokimyasal belirteçler kullanılmıştır⁸.

Son olarak 2010 yılı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflaması, çeşitli sınıflamalar arasında standardizasyon amacıyla daha kapsamlı bir sınıflama önermiş; GC'ları papiller, tübüler, müsinöz (kolloid) ve "zayıf kohesif" karsinomlar şeklinde 4 temel grup ve yanısıra lenfoepitelyal stromadan zengin (medüller), hepatoid gibi nadir varyantlar olmak üzere alt gruplara ayırmıştır⁴. Ancak bu sınıflama histopatolojik düzeyde olup GC alt tiplerinin klinik verilerle korelasyonunu içermez. DSÖ sınıflamasında klinik sonuçları dikkate alınarak oluşturulmuş tek grup, erken gastrik kanser kavramıdır⁴.



Şekil 2.4. (A) TCGA projesi kapsamında oluşturulan 4 GC grubunun lokalizasyon dağılımı ve başlıca moleküler özellikleri (B) Aynı projedeki 295 adet GC'un 4 grup halindeki sayısal dağılımı

Klinik yaklaşımları ve tedavi stratejilerini yönlendirmek amacıyla Kanser Genom Atlası Projesi (The Cancer Genome Atlas (TCGA)) içerisinde, 2014 yılında kapsamlı bir moleküler sınıflama yayınlanmıştır⁹. Bu çalışmada 295 primer GC'u, EBV pozitif (EBV), mikrosatellit instabil (MSI), genomik stabil (GS), kromozomal instabil (CIN) tümörler olmak üzere 4 alt grupta sınıflanmıştır (Şekil 2.4).

Bu çalışmada oluşturdukları alt grupların midede hangi lokalizasyonlarda hangi sıklıkta görüldüğü, genetik değişiklikler, bunların klinik verilerle korelasyonu yapılmış ve yukarıda bahsedilen 4 alt grup oluşturulmuştur (Şekil 2.4). Her ne kadar kısmi bir morfolojik değerlendirme yapılmışsa da moleküler/genetik değişiklikler ve bunların klinik sonuçları sınıflandırmada daha ön planda tutulmuştur. Çünkü çalışmada temel hedef karsinogenezde rol alan sorunlu yollar ve bu yolların olası yönlendirici mutasyonlarını (driver mutations) tanımlayarak, yeni tedavi modellerinin ve klinik çalışmaların önünü açmaktır.

Son yüzyılda, DSÖ'nün standardizasyonu amaçlayan sınıflaması da dahil olmak üzere birçok GC sınıflaması yapılmışsa da, GC'ların klinik yaklaşımlar ve tedavi stratejilerine etki eden net bir histolojik sınıflaması oluşturulamamıştır.

2.5 Gastrik Karsinomlarda Tedaviyi Yönlendiren Prognostik ve Prediktif Faktörler

GC'larda, tümörün erken veya ileri evre oluşu prognozu etkileyen en önemli etkidir. Bu nedenle DSÖ gastrik karsinomları sınıflarken, erken evre gastrik karsinomları histomorfolojiden bağımsız olarak ayrı bir başlık altında değerlendirmiştir⁴.

Erken gastrik karsinomda damar invazyonu ve lenf nodu metastazı görülme insidansı düşüktür; hastaların %90'nın 10 yıllık sağkalımı mevcut olup erken evre GC'lar iyi prognozlu kanserlerdir⁸⁶⁻⁸⁸. Bu kanserlerde bazı ekollerde sadece mukozal rezeksiyon yeterli tedavi iken lenf nodu metastazı açısından risk faktörleri olan karsinomlarda veya lenf nodu metastazı olan vakalarda daha geniş cerrahi tedaviler tercih edilmektedir⁸⁶⁻⁸⁸. Lenf nodu tutulumu için bağımsız risk faktörleri; submukozal invazyon, tümör çapının 3-3,5 cm'den büyük olması, lenfatik permeasyon varlığı, deprese veya ülserle tümörler ve indiferansiye histolojidir⁸⁶⁻⁸⁸.

İleri evre gastrik karsinomlarda ise TNM evresi, özellikle muskularis propriaya göre invazyon derinliği, en güçlü prognostik faktördür (Tablo 2.2)^{89, 90}. Ayrıca tutulan lenf nodu sayısı 5 yıllık sağ kalım sürelerine direkt etki eden bir faktördür (1-6 lenf nodu: %46 5 yıllık sağ kalım; 7-15 lenf nodu: %30 5 yıllık sağ kalım)⁹¹. Bu nedenle ileri

evre gastrik karsinomlarda daha kapsamlı lenf nodu diseksiyonu sağkalıma olumlu etki etmektedir⁹².

Tablo 2.2. Mide karsinomalarında TNM evrelemesi

Primer tümör (T)		Bölgesel lenf nodları (N)	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor	NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör'e ait kanıt yok	N0	Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok
Tis	Karsinoma in situ	N1	Bölgesel lenf nodlarında 1-2 metastaz
T1	Tümör lamina propria, muskularis mukoza veya submukozaya invaze	N2	Bölgesel lenf nodlarında 3-6 metastaz
T1a	Tümör lamina propria veya muskularis mukoza invaze	N3	Bölgesel lenf nodlarında ≥ 7 metastaz
T1b	Tümör submukozaya invaze	N3a	Bölgesel lenf nodlarında 7-15 metastaz
T2	Tümör muskularis propriaya invaze	N3b	Bölgesel lenf nodlarında ≥ 16 metastaz
T3	Tümör viseral peritonu veya komşu organları penetre etmeden subserozal bağ/yağ dokuya invaze	Uzak metastaz (M)	
T4	Tümör serozaya (viseral periton) veya komşu organlara invaze	M0	Uzak metastaz yok
T4a	Tümör serozaya (viseral periton) invaze	M1	Uzak metastaz var
T4b	Tümör komşu organlara invaze		

Tümör tipinin histolojik olarak belirlenmesinin prognoza etkisi veya yararı tartışmalı bir konudur. Literatürdeki iki çalışma, sadece Goseki sınıflamasının TNM evrelemesine ek prognostik bilgi verdiğini saptamıştır^{93, 94}. Bu çalışmalar, Goseki II ve IV mukustan zengin T3 tümörlerin, Goseki I ve III mukustan fakir T3 tümörlere göre 5 yıllık sağkalımlarının daha kötü seyrettiğini tespit etmiştir⁹³.

Ayrıca medüller morfolojideki tümörlerin diğer histolojik tiplere göre daha iyi prognoza sahip olduğu bilinmektedir⁷⁸; ki bu morfolojideki tümörlerin bir kısmı daha iyi prognoz ile ilişkili MSI-H nitelikte olup bir kısmı da herediter özellikteki Lynch sendromlu hastalardır.

Literatürde fikir birliği sağlanamamış olsa da stromal inflamatuvar yanıtın ve itici tarzda (ekspansil) tümör sınırlarına sahip olmanın daha iyi prognoza işaret ettiğini belirten yayınlar da mevcuttur^{93, 94}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Olguların Seçimi

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan çalışma için etik izni alındıktan sonra (karar no: GO 15/319-15), 2000-2015 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde opere olmuş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nca raporlanmış 654 adet mide rezeksiyon materyaline ait hematoksilen-eozin boyalı kesitler arşivden çıkarılarak değerlendirilmiştir. 2005-2012 yılları arasındaki 434 adet mide tümörü Dr. Güneş GÜNER'in tezi içerisinde değerlendirilmiş olup tez çalışması için ayrılan 335 primer mide karsinomu içerisinde aynı tezde nadir GC grubu¹⁰ olarak tanımlanan tümörlerden medüller benzeri morfoloji gösteren, lenfoepitelyal stromadan zengin ve minimal glandüler farklılaşma gösteren ya da hiç farklılaşma göstermeyen erken evre dışı (ileri evre-TNM sınıflamasına göre T2 ve üzeri) 38 adet GC tespit edilerek bu tez çalışmasına dahil edilmiştir. Ayrıca 2000-2005 yılları arasındaki geriye kalan 214 mide rezeksiyon materyali 2 patolog (Meral ÜNER, Aytekin AKYOL) tarafından morfolojik olarak gözden geçirilmiştir. Bu olgular arasından Dr. Güneş Güner'in tezindeki kriterler kullanılarak 9 adet GC da çalışmaya dahil edilmiştir¹⁰ (Tablo 3.1). Son olarak 2014 ve 2015 yılları içerisinde, 05.06.2015 tarihine kadar raporlanmış primer mide tümörü olguları arasından tipik medüller morfolojiye sahip 6 olgu daha çalışmaya eklenerek nihai 53 olguya ulaşılmıştır.

Morfolojik değerlendirmede sadece midede yerleşmiş primer tümörler dikkate alınmıştır. Kesitlerin morfolojik incelenmesi sırasında hastaların operasyon tarihleri, ölüm tarihleri, patoloji raporu tanıları ile TNM evreleri gibi kriterler dikkate alınmamıştır. Klinik verilerin korelasyonu olgu seçimi sonrasında yapılmıştır.

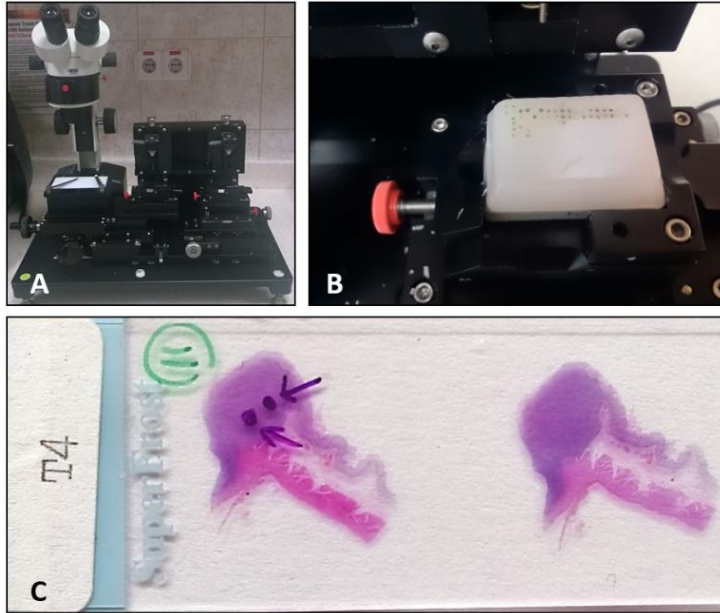
Tablo 3.1. Dr. Güneş Güner'in tezinde rezeksiyon materyallerine önerilen, primer mide karsinomu sınıflandırma kriterleri¹⁰.

Erken Mide Karsinomu		Lenf nodu ve histomorfolojiden bağımsız, en derinde submukozadan ileri invazyon içermeyen karsinomlar (< pT2).
Erken Olmayan Mide Karsinomları (pT ≥ 2)	Adenokarsinom	Baskın komponenti (≥ %60) neoplastik bez yapıları (tübüler veya papiller gibi) oluşturan karsinomlar.
	Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	Baskın komponent (≥ %60) taşlı yüzük hücreli karsinomdur, karakteristik özellikleri: - Genellikle lamina propriada tipik taşlı yüzük hücreleri mevcuttur. - İleri derecede dezmozoplazi içerir, bu stroma içerisinde neoplastik hücreleri ayırt etmek mümkün olmayabilir. - İnfiltratif büyüme paterni gösterirler.
	Müsinöz Karsinom	Baskın komponentini (≥ %60) ekstraselüler müsin gölcüklerinin oluşturduğu karsinomlar.
	Mikst Karsinom	Birden fazla komponent içeren ve herhangi bir morfolojik tipin (adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom ve müsinöz karsinom) baskın olmadığı (< %60) karsinomlar.
	Diğer / Nadir Karsinomlar	Adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, müsinöz ve mikst karsinom olarak sınıflandırılmayan karsinomlar.

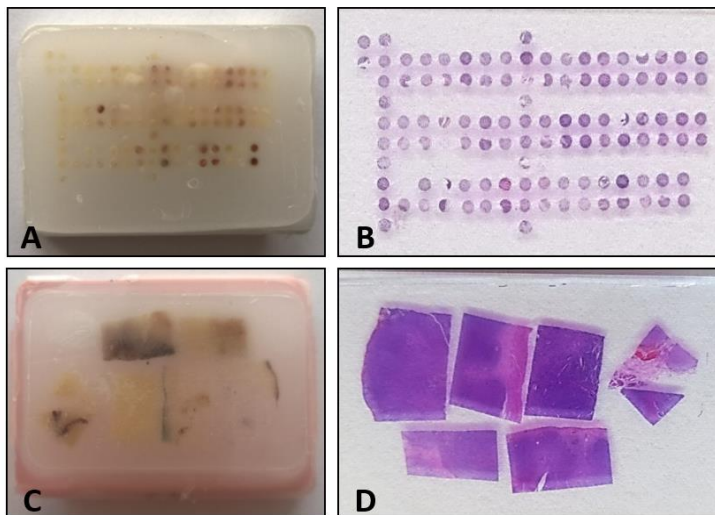
3.2 Doku Mikrodizini (TMA) Bloğunun ve Doku Dizini (TA) Bloğunun Oluşturulması

Tanımlanan morfolojik kriterlerle 47 vakadan oluşan ilk vaka grubunun hematoksilin-eozin (H&E) tümör kesitlerinde tümör morfolojisinin en iyi temsil edildiği iki odak işaretlenmiştir (Resim 3.1 (C)). Bu işaretli odaklara kesitlerin parafin bloklarında karşılık gelen alanlardan 1 mm çaplı tümöral dokular alınmış ve manuel doku mikrodizin cihazı "Advanced Tissue Arrayer (ATA100, CTR scientific) aracılığıyla (Resim 3.1 (A) ve (B)) 47 mide vakası ve 3 mikrosatellit instabilite statüsü bilinen kolon vakasından oluşan parafin blok (Resim 3.2 (A)) tablo 3.2'de gösterilen şablondaki şekilde oluşturulmuştur. Referans noktalar için 8 adet morfolojik olarak kolay tanınabilecek iyi diferansiye kolon adenokarsinomuna ait parafin bloklar seçilmiştir. Oluşturulan bloktan (+) yüklü lamlara immünohistokimyasal ve in situ hibridizasyon çalışmaları için çok sayıda kesit alınmıştır. Bu bloğun

oluşturulmasından sonra çalışmaya dahil edilen 5 vakaya ait ikinci bir doku dizini (Resim 3.2 (B)) tümörü temsil eden birer 3 mm'lik alan ayrılarak oluşturulmuştur. 53. son vakada ise tümörlü parafin bloklar direkt H&E ve immünohistokimya için kullanılarak çalışmaya dahil edilmiştir.



Resim 3.1. (A) ve (B) Manuel doku mikrodizin cihazı «Advanced Tissue Arrayer (ATA100, CTR scientific)» (C) Tümör morfolojisinin en iyi temsil edildiği işaretli iki odak.



Resim 3.2. (A) 47 GC olgusu ve 3 mikrosatellit instabilite durumu bilinen kolon olgusundan oluşan doku mikrodizininine ait parafin blok (B) "A" deki bloğa ait H&E boyalı kesit (C) Eklenen son 6 olgunun 5'inden oluşturulan doku bloğu (D) "C" deki bloğa ait H&E boyalı kesit

Tablo 3.2. Doku mikrodizin bloğunda kullanılan şablon; R: referans kolon adenokarsinomu, 1-47: kronolojik sırayla GC olguları, 48-50: mikrosatellit statüsü bilinen kolon karsinomları

R	R							R									
R	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	R							R									
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
	R							R									
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
	R							R									

3.3 İmmünohistokimyasal Çalışmalar ve EBER in-situ Hibridizasyon Çalışması

Doku mikrodizin çalışmasıyla oluşturulan bloktan 45 adet seri kesit yapılmış ve bunlardan en az doku kaybına uğrayanlarına Tablo 2'deki immünohistokimyasal çalışmalar uygulanmıştır. CDX2, Beta- katenin, E-kaderin, AXIN2, p53 ve MUC5AC çalışmaları konvansiyonel yöntemlerle manuel olarak sorumlu araştırmacıya ait laboratuarda gerçekleştirilmiştir. MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, LMP1, SALL4, Bcl-2, Ki-67 ve Cerb-B2 çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji A.D. immünohistokimya laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tüm bu immünohistokimyasal çalışmalar için Tablo 3.3'de belirtilen dilüsyonlar ve belirtilen klonlar kullanılmıştır.

EBER in-situ çalışması Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji A.D. immünohistokimya laboratuvarına ait otomatik cihaz ile üreticinin talimatları doğrultusunda⁹⁵ gerçekleştirilmiştir (Leica, Bond-max) (Resim 3.3).



Resim 3.3. Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji A.D. immünohistokimya laboratuvarına ait otomatik cihaz

ANTİKOR	DİLÜSYON	MARKA	KLON
CDX2	1/25 EDTA	BioGenex	CDX2-88
LMP1	1/100 EDTA	Leica	CS1-4
B-KATENİN	1/200 sitrat	BD biosciences	14/B-catenin
E-KADERİN	1/500 sitrat	ECM biosciences	CM1681
PMS2	1/250 EDTA	Biocare	A16-4
AXIN2	1/100 sitrat	Biorbyt	orb101437
P53	1/800 sitrat	Leica	DO-7
MUC5AC	1/1000 sitrat	Merck Millipore	CLH2
MLH1	1/75 EDTA	invitrojen	zm 001
MSH2	1/80 EDTA	Leica	25D12
BCL-2	1/50 EDTA	invitrojen	Bcl-2-100
Ki67	1/150 EDTA	Leica	MM1
CERBB2	1/100 EDTA	thermo	sp3
MSH6	1/50 EDTA	İnvitrogen	2D4B5
SALL4	1/150 EDTA	Biocare	6E3

Tablo 3.3. Olgulara uygulanan immünohistokimyasal çalışmada kullanılan antikorlar, dilüsyonları, kullanılan antikor markası ve klonu

3.4 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

53 olguya ait klinik veriler (yaş, tümör çapı, metastatik lenf nodu varlığı, cinsiyet, büyüme paterni, cerrahi sonrası kemoterapi, radyoterapi alıp almama durumu) ve ay olarak hesaplanmış post operatif takip süreleri ve hastaların sağ olup olmadığına dair veriler (Sağlık Bakanlığı Ölüm Bildirim Sistemi) kullanılarak sağkalım oranları Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalında, Doç. Dr. Erdem Karabulut tarafından SPSS medikal istatistik programında Kaplan-Meier ve Log-Rank yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sağkalım eğrileri Kaplan-Meier eğrisi ile

hesaplanmıştır. Yukarıdaki değişkenler açısından (yaş, tümör çapı, metastatik lenf nodu varlığı, cinsiyet, büyüme paterni, cerrahi sonrası kemoterapi, radyoterapi alıp almama durumu) alışmada oluşturulan 3 grup (bulgular kısmında daha detaylı tanımlanacaktır) arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı Log-rank ve ki-kare yöntemleri ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Morfolojik Bulgular

Bu tez çalışmasında Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji A.D.'da 2000-2015 yılları arasında raporlanmış 53 adet minimal glandüler farklılaşma gösteren ya da hiç glandüler farklılaşma göstermeyen GC, 2 patolog tarafından (Dr. Meral ÜNER, Dr. Aytekin AKYOL) 3 oturumda gözden geçirilmiştir. Öncelikli olarak morfolojik bir sınıflama yapılmış; bulgular immünohistokimyasal ve in situ hibridizasyon çalışmaları ile korele edildikten sonra nihai gruplar oluşturulmuştur. Sonuç olarak 53 olgunun 29/53'ü medüller GC (DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren, dMMR, medüller morfoloji); 10/53'ü EBV ilişkili GC ve 14/53'ü indiferansiye GC olarak alt sınıflandırılarak çalışma dahilindeki olgular 3 gruba ayrılmıştır (Tablo 4.2).

A) Medüller GC (DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren),

B) EBV ilişkili GC,

C) İndiferansiye GC,

Her üç grupta ortak olarak çok az odakta glandüler farklılaşma görülmekte veya hiç glandüler farklılaşma görülmemektedir (Tablo 4.1). Medüller GC grubunda tümör çevresindeki inflamatuvar stroma EBV ilişkili GC grubuna göre daha az belirgin iken tümör infiltre eden lenfositler (TİL) diğer gruplara göre daha belirgindir. Bu grupta neoplastik hücreler yer yer sinsityal nitelik kazanan eozinofilik geniş sitoplazmalara sahip olup adalar veya trabeküller yapma eğilimindedir (Resim 4.2). EBV ilişkili GC grubunda ise medüller GC grubunda gözlenen adalar veya trabeküller yapma eğilimi azalmakta, lenfositlerden zengin, görece belirgin inflamatuvar bir zemin içerisinde dağılmış yer yer tek hücreler, küçük hücre grupları, yer yer ise hücre adaları izlenmektedir (Resim 4.3; A ve B). Bu iki grupta benzer olarak sıklıkla fokal küçük nekroz odakları (Resim 4.2; C) görülmekle beraber özellikle medüller GC grubunda bazen geniş nekroz alanları da görülmektedir. Bunlar dışında kalan

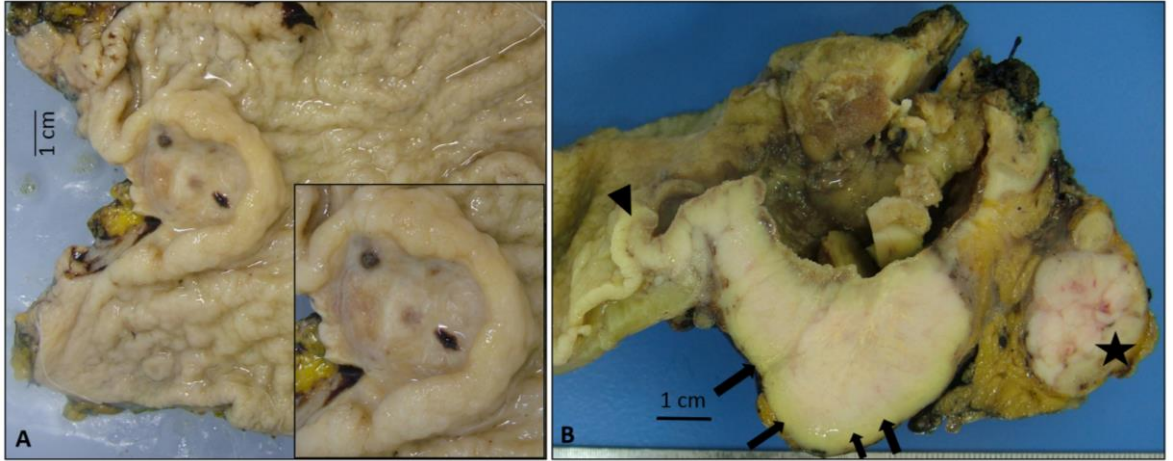
indiferansiye grup ise çok daha diskoheşif nitelikte olup geniş nekroz görölme sıklığı diğer iki gruba göre yüksektir (Resim 4.6).

Olguların tümör dışı mide mukozaları incelendiğinde olguların büyük kısmında tümöre yaygın intestinal metaplazinin eşlik ettiği dikkati çekmiştir (44/53 olgu) (Resim 4.7). Bazı olgularda çalışma içerisinde prekürsör lezyon olarak tanımlanan yüksek dereceli displazi, karsinoma in situ veya intramukozal karsinom odakları tümör dışı mukozada saptanmıştır (14 /53 olgu) (Tablo 4.2). Literatürde bu lezyonların tanım ve terminoloji farklılıkları nedeniyle hepsine birden prekürsör lezyon (PL) denilmesi uygun görölmüştür.

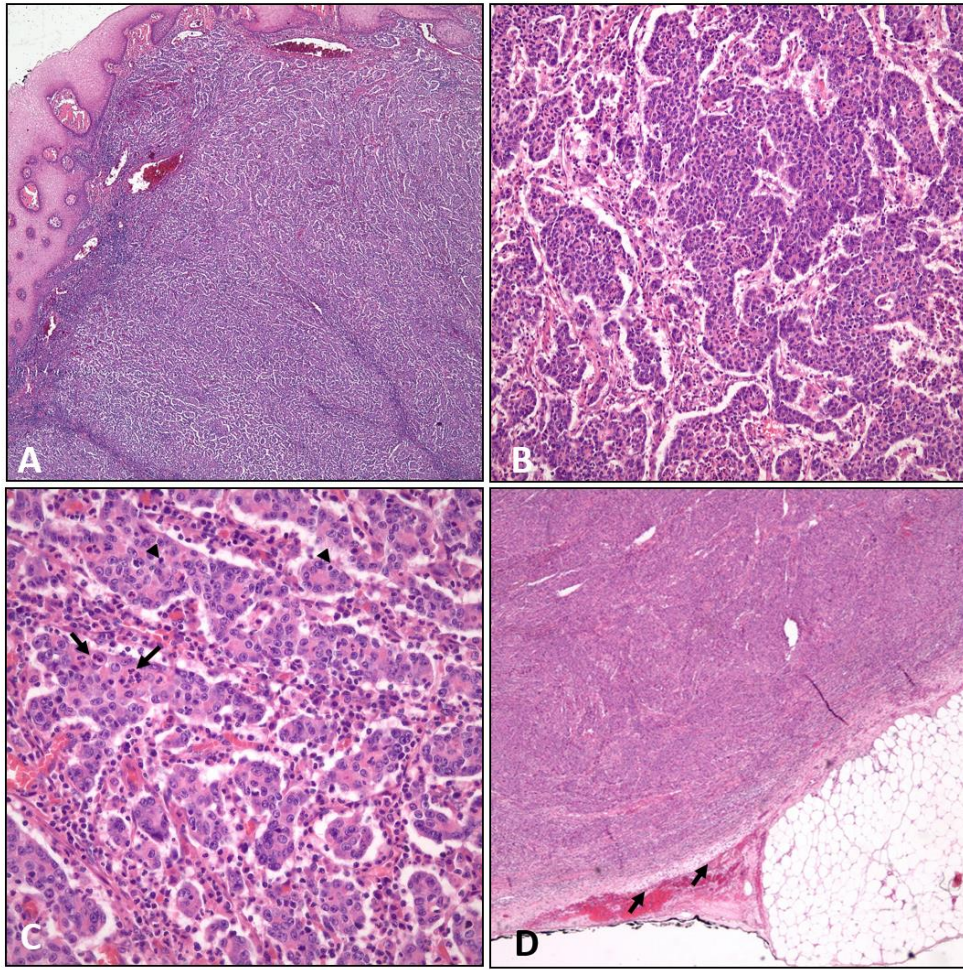
Tablo 4.1. Olguların H&E düzeyinde başlıca morfolojik bulguları

Morfolojik Bulgu	Medüller GC	EBV ilişkili GC	İndiferansiye GC
Patern	Adalar/ trabeküller/sinsityal	Tek veya küçük gruplar yanısıra adalar	Görece diskoheşif
İnflamatuvar reaksiyon	Neoplastik gruplar içinde ve çevresinde	Neoplastik gruplar çevresinde görece belirgin	Neoplastik gruplar çevresinde, görece az
Geniş Nekroz alanları	Bazen (sıklıkla tümör adaları ortasına lokalize küçük nekroz alanları)	Az/yok	sık
Tümör sınırları	ekspansil/iyi sınırlı	İnfiltratif (bazen ekspansil)	infiltratif
Glandüler farklılaşma	Az/yok	Az/yok	yok

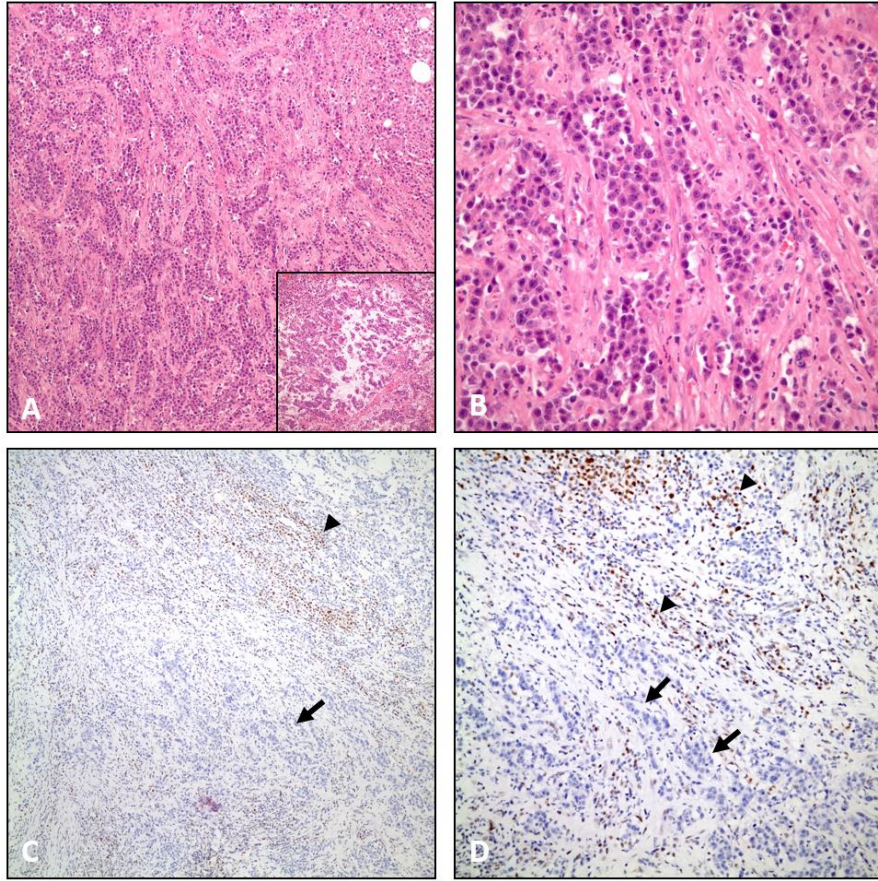
Makroskopik olarak değerlendirildiğinde olguların çoğu ortası deprese, kenarları eleve nitelikte, oval-yuvarlak şekilli solid krem renkli kitlelerdir. Çoğunlukla mide distalinde yerleşme eğilimindedirler ve özellikle DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu olanlarda ekspansil, iyi sınırlı bir büyüme paterni hakimdir (Resim 4.1).



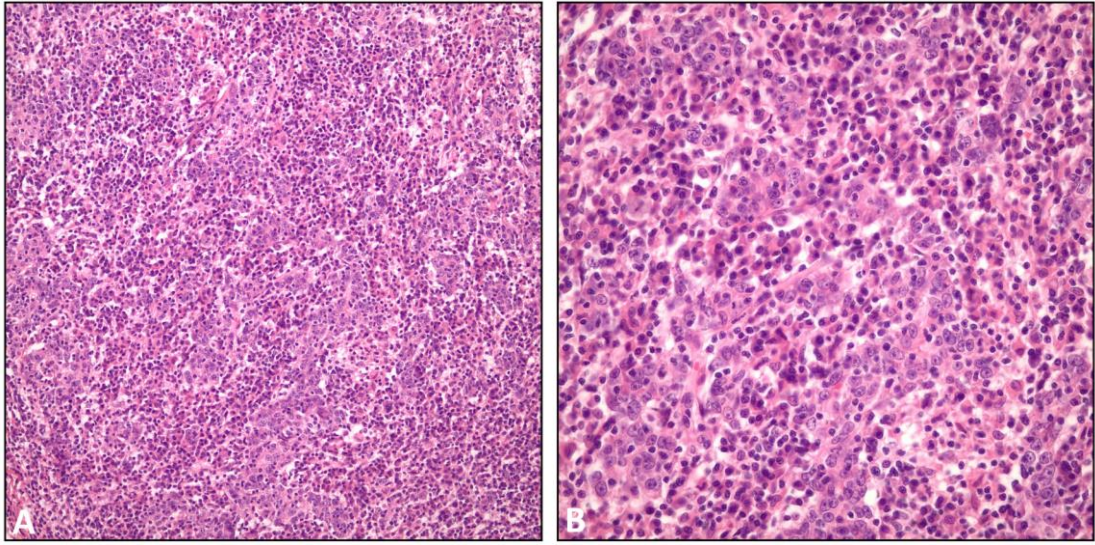
Resim 4.1 DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller karsinomların makroskopik görünümü (A) mide distalinde yerleşmiş ortası deprese, kenarları eleve nitelikte ülserovejetan kitle (B) Benzer nitelikteki bir başka tümörde kesit yüzünde serozaya doğru itici tarzda (ekspansil) büyüme paterni (oklar), tümörün yakınında belirgin genişleme göstermiş metastatik lenf nodülü (yıldız) ve tümör-tümör dışı mukoza geçişi (ok ucu).



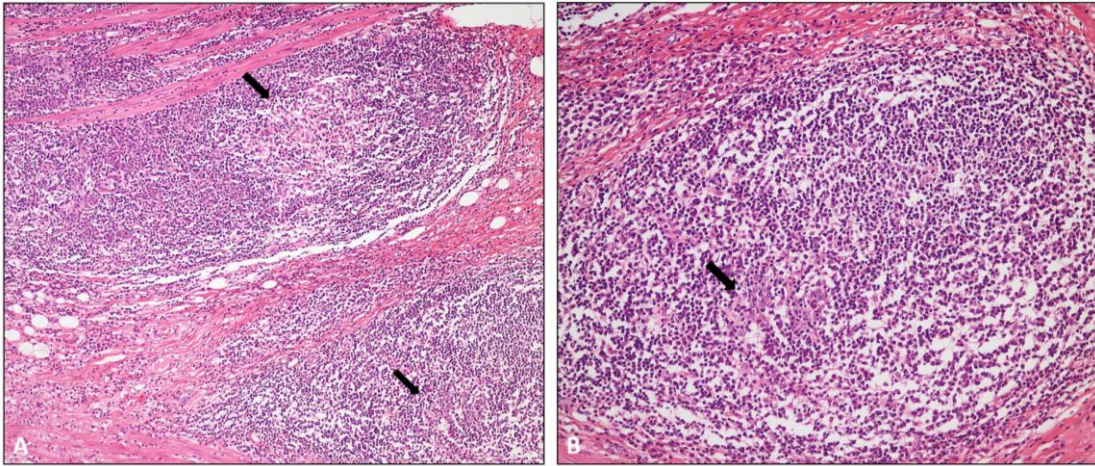
Resim 4.2: dMMR GC grubu medüller morfoloji (A) Glandüler farklılaşma göstermeyen, özefagus alt uca kadar uzanan solid/trabeküler morfolojide neoplazm x100; (B) Neoplastik hücre trabeküllerinin daha yakından görünüşü, trabeküller çevresinde inflamatuvar yanıt mevcut, x200; (C) Neoplastik hücreler, sınırsız geniş eosinofilik sitoplazmalı, veziküle nükleuslu epitelyal görünümde hücreler; neoplastik hücre grupları ortasında nötrofilden zengin nekrotik odaklar (oklar); neoplastik hücreleri infiltre eden lenfositler «TIL» (ok uçları); x400 (D) Tümör serozal yüzeye ulaşıyor ancak itici tarzda kenarlara ve nispeten iyi sınırlı ekspansil bir büyüme paternine sahip (oklar) x200.



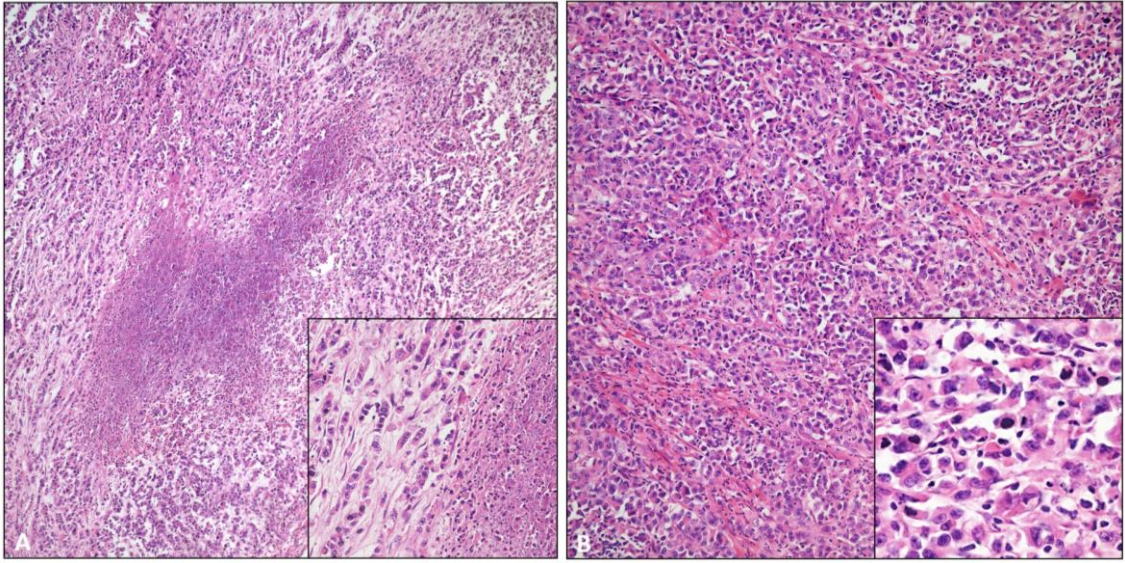
Resim 4.3. dMMR GC grubu medüller morfoloji (A) Trabeküller oluşturan neoplastik hücreler, fokal bir glandüler farklılaşma alanı (iç resim) dışında solid görünüm hakim x100; (B) Neoplastik hücre trabeküllerinin yakından görünümü x400; (C) ve (D) Aynı olguya ait neoplastik hücrelerde MLH1 ekspresyon kaybı (ok); çevre inflamatuvar hücrelerde pozitif boyanma (ok ucu), x100, x200.



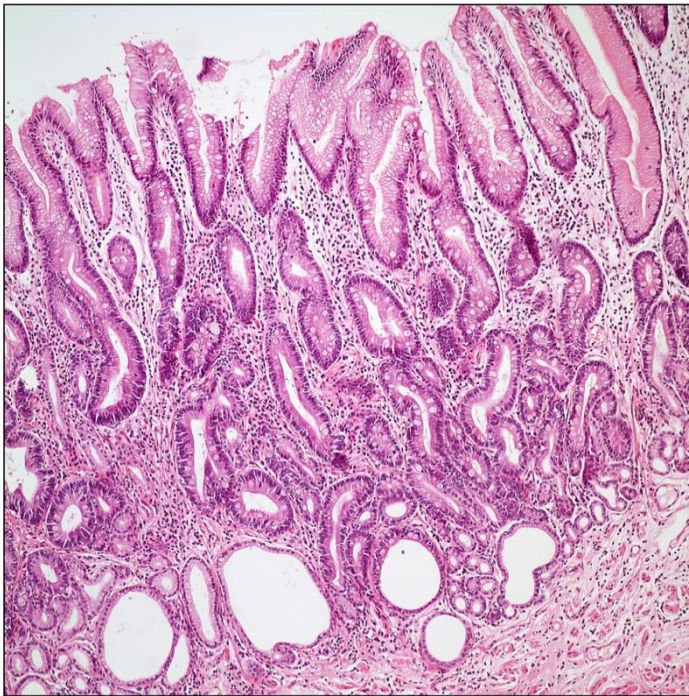
Resim 4.4. EBV ilişkili GC, lenfoepitelyoma benzeri (LEB) morfoloji (A) İnflamatuvar stromadan zengin epitelyal görünümde neoplastik hücre adaları; x200x; (B) Neoplastik hücre adalarının yakından görünümü, yer yer TIL'ler dikkati çekiyor; x400



Resim 4.5. EBV ilişkili GC, lenfoepitelyoma benzeri (LEB) morfoloji (A) İnflamatuvar stromadan zengin epitelyal görünümde neoplastik hücre adaları (oklar); x100 (B) Neoplastik hücre adaları (ok), lenfoid stroma içerisinde küçük epitelyal gruplar oluşturuyor; x200.



Resim 4.6. Indiferansiye GC morfolojisi (A) Geniş nekroz alanları içeren indiferansiye morfolojide, oldukça diskohesiv hücrelerden oluşan tümör x100; nekroz içerisinde inflamatuvar hücreler dikkat çekiyor (iç resim); x400, (B) Kas demetlerini infiltrate ederek gelişim gösteren diskohesiv diffüz neoplastik hücre infiltrasyonu; x100, oldukça pleomorfik ve sık mitoz içeren irregüler neoplastik hücrelerin yakından görünümü (iç resim); x400.



Resim 4.7. 44/53 olguda izlenen intestinal metaplazi; x100 .

Tablo 4.2. Olguların gruplara göre düzenlenmiş morfolojik verileri (A) DNA Hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller morfolojideki GC olgularının morfolojik bulguları (B) EBV ilişkili GC olgularının morfolojik bulguları (C) İndiferansiye GC olgularının morfolojik bulguları

OLGU NO	BÜYÜME PATERNİ	TÜMÖR DIŞI MUKOZA	NEKROZ	İNFLAMATUAR STROMA
2	ekspansil	İM	var	var
5	ekspansil	İM	var	var
8	ekspansil	N/A	var	yok
9	ekspansil	İM	var	var
11	ekspansil	Kr. atrofik gastrit	var	var
12	ekspansil	İM	var	var
16	ekspansil	İM	var	var
17	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
23	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
24	ekspansil	İM	var	var
26	ekspansil	İM	var	var
27	ekspansil	İM	var	var
30	ekspansil	İM	var	var
31	ekspansil	Kr. atrofik gastrit	var	var
32	infiltratif	İM+prekürsör lezyon	yok	var
33	ekspansil	İM	var	var
34	ekspansil	hafif atrofi	var	var
35	ekspansil	İM	var	var
37	ekspansil	İM	var	var
38	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
41	ekspansil	İM	var	yok
45	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
46	ekspansil	İM	var	var
47	ekspansil	İM	yok	var
48	ekspansil	N/A	var	var
49	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
50	infiltratif	Kr. gastrit + prekürsör lezyon	var	var
51	ekspansil	İM+tübüler adenom	var	var
52	infiltratif	İM	yok	var

A

OLGU NO	BÜYÜME PATERNİ	TÜMÖR DIŞI MUKOZA	NEKROZ	İNFLAMATUAR STROMA
3	infiltratif	Kr. atrofik gastrit	yok	var
4	ekspansil	İM	var	var
10	ekspansil	İM	var	var
13	ekspansil	İM	var	var
14	infiltratif	İM	var	var
19	infiltratif	İM	yok	var
21	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
28	infiltratif	İM	var	var
44	infiltratif	İM	var	yok
53	infiltratif	İM+prekürsör lezyon	yok	var

B

OLGU NO	BÜYÜME PATERNİ	TÜMÖR DIŞI MUKOZA	NEKROZ	İNFLAMATUAR STROMA
1	ekspansil	İM	var	var
6	infiltratif	İM	var	yok
7	infiltratif	fokal İM	yok	yok
15	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
18	infiltratif	fokal İM	yok	yok
20	ekspansil	İM	var	var
22	ekspansil	İM+prekürsör lezyon	var	var
25	infiltratif	İM+prekürsör lezyon	var	var
29	infiltratif	İM	yok	yok
36	infiltratif	Kr. atrofik gastrit	yok	yok
39	infiltratif	Prekürsör lezyon	var	yok
40	infiltratif	İM+ prekürsör lezyon	var	yok
42	infiltratif	İM	yok	yok
43	infiltratif	İM	yok	var

C

Kr. : kronik, İM: İntestinal metaplazi, **Prekürsör lezyon**: İntramukozal karsinom, yüksek dereceli displazi ve karsinoma in situ, N/A: «not available» Ulaşılamayan bilgi

4.2 İmmünohistokimyasal bulgular

53 olguya yukarıda belirtilen (Tablo 3.3) dilüsyonlarda CDX2, B-Katenin, E-kaderin, p53, MUC5ac, MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, Bcl-2, AXIN2, SALL4, LMP1, Ki-67, C-erbB2 antikoru ile immünohistokimyasal çalışmalar uygulanmıştır. Tüm sonuçlar (Şekil 4.1)'de özetlenmiştir. Boyamalar değerlendirilirken MLH1 ile PMS2 ve MSH2 ile MSH6 aynı protein kompleksinin üyeleri olduğundan birlikte değerlendirilmiş ve olgular neoplastik hücrelerde ekspresyon kaybı mevcut ve iç kontrolde pozitif hücre varlığı halinde kayıp; neoplastik hücrelerde ekspresyon kaybı mevcut ancak iç kontrol teyiti olmadığında bilgilendirici olmayan (N/i "not informative"), neoplastik hücrelerde fokal nükleer pozitiflik varlığında fokal (F), neoplastik hücrelerde yaygın nükleer pozitiflik varlığında ise intakt/pozitif olarak değerlendirilmiştir. MLH1 ile PMS2 ve MSH2 ile MSH6 dördümlü antikor sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ile olgular DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren "dMMR", muhtemel DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması

bozukluğu gösteren “pdMMR”, DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu göstermeyen “pMMR” ve muhtemel DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu göstermeyen “ppMMR” olmak üzere 4 gruba ayrılmış ve olgular DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu statüsüne göre sınıflanmıştır. dMMR ve pdMMR statüsündeki olgular morfolojik verileri ile de birlikte değerlendirilerek 30 adet DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren GC (n=30; 29 medüller, 1 indiferansiye GC) saptanmıştır.

Medüller GC’lar histomorfolojik olarak diffüz ekspansil büyüme paternine sahip, desmoplastik stroma içermeyen kanserlerdir. İnflamatuar stromadan zengin olup olguların tamamında DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu mevcuttur.

EBV ilişkili GC olgular; EBER in situ hibridizasyon çalışması pozitif (7 olgu) ve immünohistokimyasal olarak fokal (2 olgu) veya yaygın (1 olgu) LMP1 pozitifliği gösteren 10/53 tümördür. Olguların yarısı (5/10) lenfoepitelyoma benzeri morfoloji sergilemekte olup 1 olgu eozinofil lökositlerden zengin inflamatuvar stroma içermektedir. EBV ilişkili 10 tümörün hepsi ppMMR ve pMMR statüsündeki olgulardır.

OLGU NO	İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER											
	MMR	EBV	MUC5ac	B-kat	AXIN2	E-kad	ki-67	CDX2	p53	SALL4	Bcl-2	
2	MEDÜLLER GC	Koyu Kırmızı	Orange	Light Orange	Purple	Yellow						
5			Orange	Light Orange	Purple	Yellow						
8			Orange	Light Orange	Purple	Yellow						
9			Orange	Light Orange	Purple	Yellow						
12			Orange	Light Orange	Purple	Yellow						
16			Orange	Light Orange	Purple	Yellow						
23			Orange	Light Orange	Purple	Yellow						
24			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue		Green		Dark Blue	Purple
26			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
27			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
32			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					Purple
33			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
37			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
38			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
41			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
46			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue			Grey		Purple
47			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue		Green			
48			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
49			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
50			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
51	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue							
52	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue		Green					
11	Koyu Kırmızı	Koyu Yeşil	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
17			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
30			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
31			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
34			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
35			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
45			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
45			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
3	EBV GC	Koyu Yeşil	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
4			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
10			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
13			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
19			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
21			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
53			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
44			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
28	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue			Grey				
14	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue							
1	İNDİF. GC	Koyu Yeşil	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue		Grey	Dark Blue		
6			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue		Green	Grey	Dark Blue	
7			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
15			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
18			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
20			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
22			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
25			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
29			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue					
36			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue			Grey		
39			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue			Grey		
40			Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue		Green		Dark Blue	
42	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue							
43	Orange	Light Orange	Purple	Yellow	Blue							

Şekil 4.1. İmmünohistokimyasal verilerin bir kısmına genel bakış. MMR statüsü MLH1 ile PMS2 ve MSH2 ile MSH6 birlikte değerlendirilerek oluşturulmuş; E-kaderin (E-kad.), CDX2, p53, SALL4, Bcl-2 ve MUC5ac için skor 2; Beta-katenin (B-kat.) için skor 3 ve 4; AXIN2 için skor 2 ve 3 farklı renkler kullanılarak renklendirilmiştir. EBV statüsü için EBV in situ hibridizasyon pozitifliği koyu yeşil; LMP1 pozitifliği açık yeşil ile renklendirilmiştir. dMMR, pMMR, pMMR ve ppMMR statüleri sırasıyla koyu kırmızı, açık kırmızı ve koyu mavi, açık mavi ile renklendirilmiştir.

Yukarıdaki iki grup (Medüller ve EBV ilişkili GC) dışında kalan, DNA hatalı eşleşme tamir mekanizma bozukluğu içermeyen ve EBER ile LMP1 negatif olgular kendilerine özgü morfojik bulgularıyla birlikte indiferansiye GC grubunu oluşturmuştur (n=14). Bu 14 olgu içerisinde sadece bir olguda muhtemel DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu “pdMMR” tespit edilmiş olup bu olgu fokal müsinöz ve taşlı yüzük hücreli karsinom alanları içeren indiferansiye GC grubuna dahil edilmiştir.

SALL4, E-Kaderin, Bcl-2, CDX2, MUC5AC, p53 ve LMP1 immünohistokimyasal çalışmalarının sonuçları diffüz boyanma (> % 50: 2), fokal boyanma (5-%50 :1) ve negatif (<%5 :0) olmak üzere üç grupta skorlanmıştır. AXIN2 immünohistokimyası ise boyanma şiddetine göre (<%5: 0 dan başlayarak 1, 2 ve 3 skorları ile) değerlendirilmiştir.

Beta-katenin boyaması değerlendirilirken membranöz, sitoplazmik ve nükleer boyanmalar için verilen skorların toplamından bir nihai skor verildi. Membranöz boyanma pozitif:1 ve negatif: 0 olacak şekilde; sitoplazmik ve nükleer boyanma diffüz boyanma (> % 50: 2), fokal boyanma (5-%50 :1) ve negatif (<%5 :0) olmak üzere üç skor üzerinden değerlendirilmiş ve her vakaya bu üç kriter üzerinden aldığı toplam skor verilmiştir.

Ki-67 proliferasyon indeksi için ilk değerlendirmede reel değeri 100 üzerinden verilmiş olup ikinci değerlendirmede bu reel değerler 0-%25 :1, %26-%50: 2, %51-%75: 3, %76-%100: 4 olacak şekilde 4 grupta skorlandı.

Olguların tümü C-erbB2 ile negatif sonuç vermiştir. Bu nedenle C- erbB2 için bir değerlendirme kriteri oluşturulmamıştır.

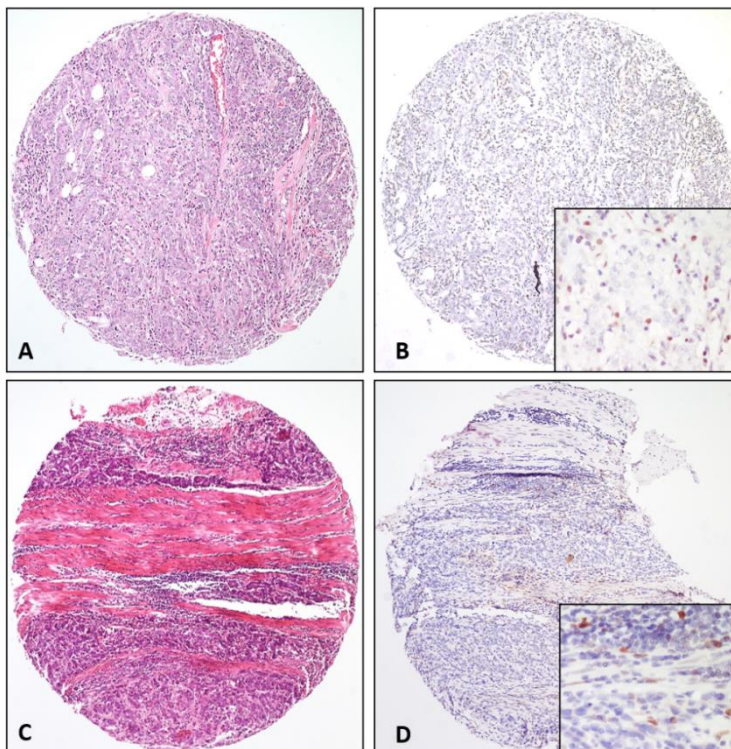
Tüm immünohistokimyasal inceleme sonuçlarının detaylı tablosu için lütfen Ek 2'ye bakınız.

4.2.1 Medüller Gastrik Karsinom

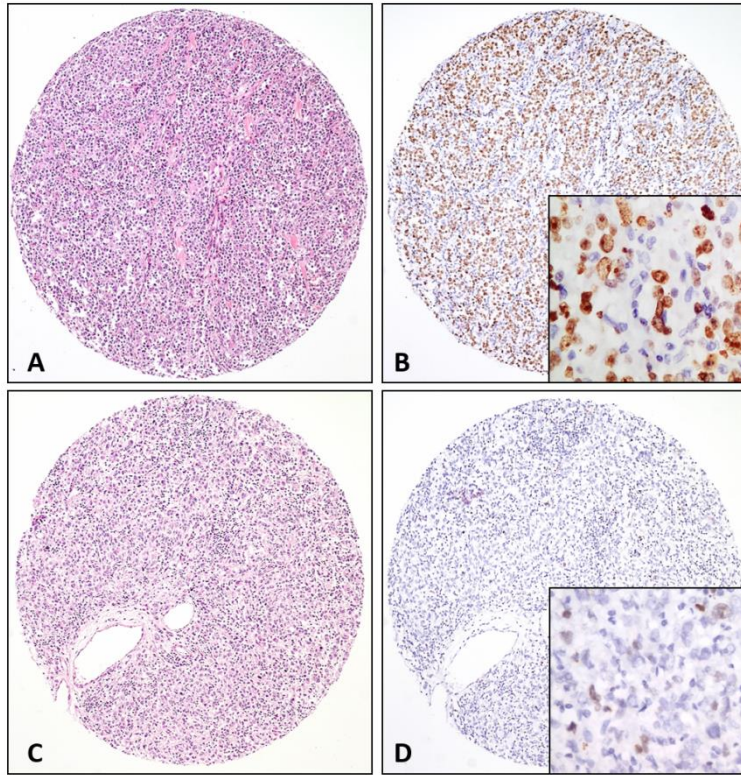
Medüller GC grubunda 3/29 olgu infiltratif büyüme paternine sahip iken olguların çoğunluğu (26/29) ekspansil büyüme paterni sergilemektedir. Olgular diffüz, desmoplaziden yoksun karsinomlardır.

dMMR ve pdMMR statüsündeki olgulardan morfolojik verileri ile de birlikte değerlendirilerek DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller GC (n=29) grubu oluşturulmuştur. Olguların 22/29 'sinde iç kontrol ile teyit edilen MLH1 kaybı; 3/29 olguda ise fokal kayıp saptanmıştır. 3/29 olguda MLH1 için sağlıklı bilgi edinilememiş ancak diğer 3 antikor ile birlikte değerlendirildiğinde pdMMR statüsüne gruplandırılmıştır. Ayrıca sadece 1 olguda MSH2 ve MSH6'da iç kontrol ile teyit edilmiş ekspresyon kaybı tespit edilmiştir.

Diğer immünohistokimyasal bulgulara bakıldığında MUC5AC pozitifliğinin büyük oranda DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller GC grubunda olduğu görülmüştür (14/29 olguda skor 2: > % 50) (Tablo 4.3). Ki-67 yüksekliği, Beta-katenin, E-kaderin ve AXIN2 pozitiflikleri DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller GC grubu için diğer gruplara göre belirgin farklılık göstermemektedir. Yaygın p53 ve SALL4 pozitifliği 2 ayrı olguda; Bcl-2 ve CDX2 pozitifleri 3'er olguda saptanmış olup belirgin bir farklılık göstermemektedir.



Resim 4.8. (A) ve (B) MLH1 kaybı gösteren olgu (C) ve (D) MSH2 kaybı gösteren olgu (olgu 41), ana resimler, x100; (iç resimler, x400)



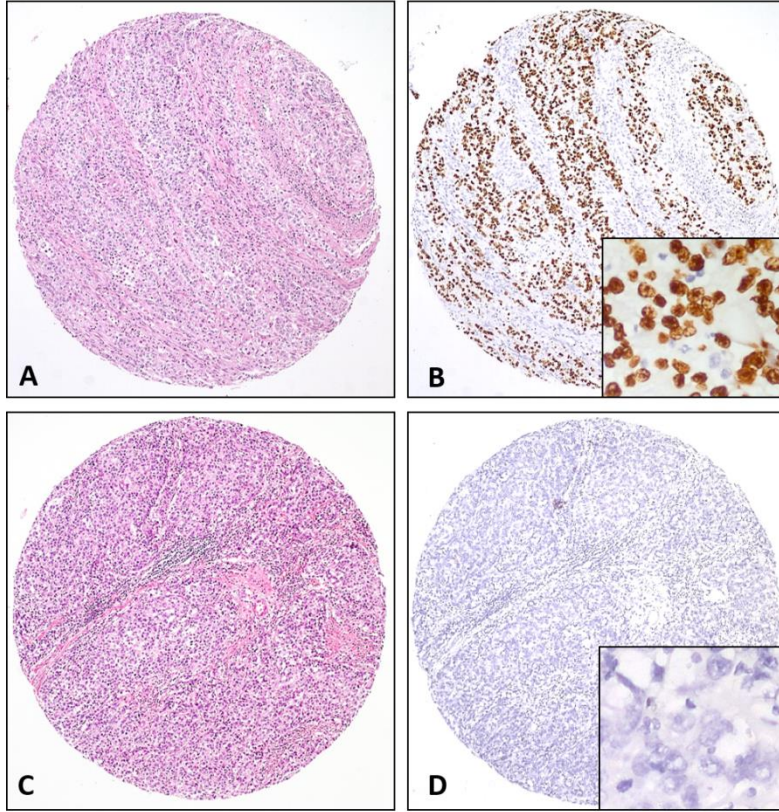
Resim 4.9. (A) ve (B) Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek olgu (C) ve (D) Ki-67 proliferasyon indeksi düşük olgu, ana resimler, x100 ;(iç resimler, x400)

4.2.2 Epstein Barr Virüsü (EBV) ilişkili Gastrik Karsinom

EBV ilişkili GC grubunda 5/10 olgunun lenfoepitelyoma benzeri morfoloji gösterdiği ve bu olgularından sadece 1/10'unun infiltratif, 4/10'unun ekspansil bir büyüme paterni sergilediği dikkati çekmektedir. Geri kalan 5 olgunun 1/10'u mikst müsinöz ve taşlı yüzük hücreli alanlar içermekte olup 1/10'u ise nötrofilden zengin stromaya sahiptir ve her ikisi de infiltratif büyüme paterni sergilemektedir. Kalan 3 olgudan 2/10'u lenfoepitelyoma dışı, 1/10'u taşlı yüzük hücreli bir morfolojide olup üçü de ekspansil büyüme paternine sahip diffüz karsinom niteliğindedir.

EBER in situ hibridizasyon çalışması sonucunda 7/53 olguda pozitiflik saptanmıştır. Ayrıca EBER sonucu negatif olan olgular arasında immünohistokimyasal çalışmalarda 1 olguda yaygın; 2 olguda fokal olmak üzere toplam 3 olguda LMP1 ekspresyonu saptanmıştır. EBER in situ hibridizasyon ve LMP1 immünohistokimyasal çalışmaları birlikte değerlendirilip morfolojik verilerle korele edildiğinde 10/53 olgu EBV ilişkili GC grubunu oluşturacak şekilde sınıflanmıştır.

EBV ilişkili GC grubu olgularının hiçbirinde immünohistokimyasal olarak tespit edilmiş (MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6 antikorları ile) DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu (dMMR) mevcut değildir.



Resim 4.10. (A) ve (B) EBER pozitif ve **(C) ve (D)** EBER negatif olgular, x100 (iç resimler, x400)

Olguların 6/10'unda B-katenin ekspresyonu mevcuttur. 3/10'unda AXIN2 3/10'unda E-kaderin ekspresyonu mevcuttur ve bu boyanma paterni diğer gruplara göre belirgin farklılık göstermemektedir. 2 olguda Ki-67 proliferasyon indeksi %50'nin üzerindedir. 10 olgunun hiçbirinde CDX2, SALL4, MUC5AC veya Bcl-2 ekspresyonu saptanmazken sadece bir olguda belirgin p53 ekspresyonu (> %50) mevcuttur ki bu olgu Ki-67 proliferasyon indeksi %50'nin üzerindeki 2 olgudan biridir (Tablo 4.3).

4.2.3 İndiferansiye Gastrik Karsinom

İndiferansiye GC grubunda 9/14 olgu difüz infiltratif skiröz morfoloji sergilemekte olup 9 olgunun 1'i lenfoepitelyoma benzeri komponent içeren taşlı

yüzük, 1 tanesi mikst müsinoz ve taşlı yüzük hücreli, 5'i sadece taşlı yüzük, 2'si ise pleomorfik taşlı yüzük morfolojisi gösteren karsinomdur. 2/14 olgu daha ileri sınıflandırılmayan, belirgin morfolojik patern içermeyen indiferansiye GC; 2/14 olgu germinom benzeri indiferansiye GC (SALL4 pozitif) ve 1/14 olgu ise lenfoepitelyoma benzeri morfolojideki indiferansiye GC niteliğindedir. 4/14 olgu ekspansil büyüme paternine sahiptir. Kalan 10/14 olgu ise infiltratif bir büyüme paterni sergilemektedir.

İmmünohistokimyasal ve moleküler çalışmalar neticesinde 53 olgudan EBER veya LMP1 pozitifliği ve DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu göstermeyen 13 olgu ve morfolojik olarak karma morfolojiye (müsinoz + taşlı yüzük hücreli) sahip ancak muhtemel DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu (pdMMR) içeren 1 olgunun (39 numaralı olgu) dahil edildiği 14 olgudan oluşan indiferansiye GC grubu oluşturulmuştur. Bu olguların hiçbirinde Bcl-2 ekspresyonu saptanmazken 3'er olguda CDX2 ve p53 ekspresyonu; 2 olguda SALL4 ekspresyonu ve sadece bir olguda MUC5AC ekspresyonu (> %50) mevcuttur. Ki-67 yüksekliği, Beta-katenin, E-kaderin ve AXIN2 pozitiflikleri ise indiferansiye GC grubunda diğer gruplara göre belirgin farklılık göstermemektedir (Tablo 4.3).

4.3 Klinik ve İstatistiksel Bulgular

53 olguda erkeklerin kadınlara oranı 35/18'dir ve erkek baskınlığı dikkati çekmektedir. Olguların ortalama yaşı 63,1 (SD ± 10,5) olup kadınlarda yaş ortalaması 65,7 (SD ± 9,9); erkeklerde yaş ortalaması 61,7 (SD ± 10,7)dir. En genç olgu 33 yaşındaki bir erkek hasta (indiferansiye grup); en yaşlı olgular ise 81 yaşındaki biri erkek biri kadın iki hastadır (Medüller GC grubu).

Medüller GC grubunda ortalama yaş 66,5 (SD ± 9,8)dir. EBV ilişkili GC grubunda ortalama yaş 61,8 (SD ± 6,8) dir. İndiferansiye GC grubunda ortalama yaş 56,9 (SD±11,74) dur. İstatistiksel olarak gruplar arasında yaş açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p> 0,05).

Tüm olgular içinde ortalama tümör çapı 6,1 cm (SD ± 3,2) dir. Ortalama tümör çapına gruplara göre bakıldığında; Medüller GC grubunda tümör çapının 8 (SD ± 3,3) cm, EBV ilişkili GC grubunda 5,7 (SD ± 2,6) cm, indifferansiye GC grubunda 5,46 (SD ± 2,4) cm olduğu görülmüştür. TNM evrelemesine göre, 53 olgu içerisinde N0 olgu sayısı 20; N1 olgu sayısı 9, N2 olgu sayısı 14 ve N3 olgu sayısı 10'dur. Gruplar arasında tümör çapı veya N evresi açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (p> 0,05).

53 olgudan 29'u halen hayatta olup bunlardan 10 'u kadın; 19'i erkektir. 18 hasta hayatta olmayıp bunların 7'si kadın, 11'i erkek cinsiyettedir. 6 (5 erkek, 1 kadın) hastanın ise sağkalım bilgilerine ölüm bildirim sistemi, dosya bilgileri veya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi otomasyon sistemi aracılığıyla ulaşılamamıştır. Oluşturulan tümör grupları arasında cinsiyet ve sağkalım açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (p> 0,05).

Tablo 4.3. 53 olgunun klinik, morfolojik ve prognostik verilerinin bir kısmı (A) DNA Hatalı eşleşme Tamir Mekanizması bozukluğu gösteren medüller GC Olgularının klinik-morfolojik-prognostik bulguları (B) EBV ilişkili GC Olgularının klinik-morfolojik-prognostik bulguları (C) İndifferansiye GC Olgularının klinik-morfolojik-prognostik bulguları

SIRA NO	OLGU NO	YAŞ	CİNSİYET	BÜYÜME PATERNİ	BÖLGE	PATOLOJİK EVRE	TEDAVİ	SAĞKALIM süresi (ay)
1	2	49	K	ekspansil	proksimal	P4n1	KT+RT	sağ 160,5
2	5	81	E	ekspansil	distal	pT4N0	N/A	N/A
3	8	76	K	ekspansil	proksimal	pT3N0	N/A	ex 0,36
4	9	57	E	ekspansil	proksimal	pT3N0	KT	sağ 138,5
5	11	63	K	ekspansil	distal+orta	pT4N2	KT+RT	N/A
6	12	65	E	ekspansil	distal+orta	pT3N3a	KT	sağ 121,5
7	16	66	E	ekspansil	proksimal	pT4N3a	N/A	ex 1
8	17	52	E	ekspansil	distal+orta	pT3N2	KT+RT	ex 21
9	23	54	E	ekspansil	distal	pT4N2	KT	sağ 89,5
10	24	76	K	ekspansil	distal	pT3N2	KT	ex 58
11	26	81	K	ekspansil	distal	pT4N2	-	ex 7
12	27	66	E	ekspansil	orta	pT3N1	-	ex 2
13	30	74	E	ekspansil	distal	pT4N0	KT	sağ 78,5
14	31	68	E	ekspansil	distal+orta	pT4N1	N/A	ex 15
15	32	66	K	infiltratif	distal	pT3N0	-	sağ 76,5
16	33	80	K	ekspansil	distal	pT3N0	-	ex 35
17	34	61	K	ekspansil	distal	pT4N0	KT	sağ 72,5
18	35	73	E	ekspansil	distal	pT3N1	KT+RT	ex 3
19	37	73	K	ekspansil	distal	pT3N0	-	sağ 69,5
20	38	62	E	ekspansil	distal	pT4N0	KT	ex 4
21	41	47	E	ekspansil	distal	pT4N3a	KT+RT	ex 31
22	45	75	K	ekspansil	distal	pT4aN0	KT	sağ 45,5
23	46	73	E	ekspansil	distal	pT4aN1	KT+RT	sağ 41,5
24	47	51	K	ekspansil	proksimal	pT3N0	KT+RT	sağ 39,8
25	48	68	E	ekspansil	distal	pT4N3a	KT	sağ 12,1
26	49	77	E	ekspansil	distal	pT2N0	-	sağ 9,7
27	50	73	E	infiltratif	distal+orta	pT4N2	-	sağ 2,5
28	51	64	E	ekspansil	distal+orta	pT3N0	-	sağ 2,1
29	52	60	K	infiltratif	distal	pT4N0	-	sağ 2

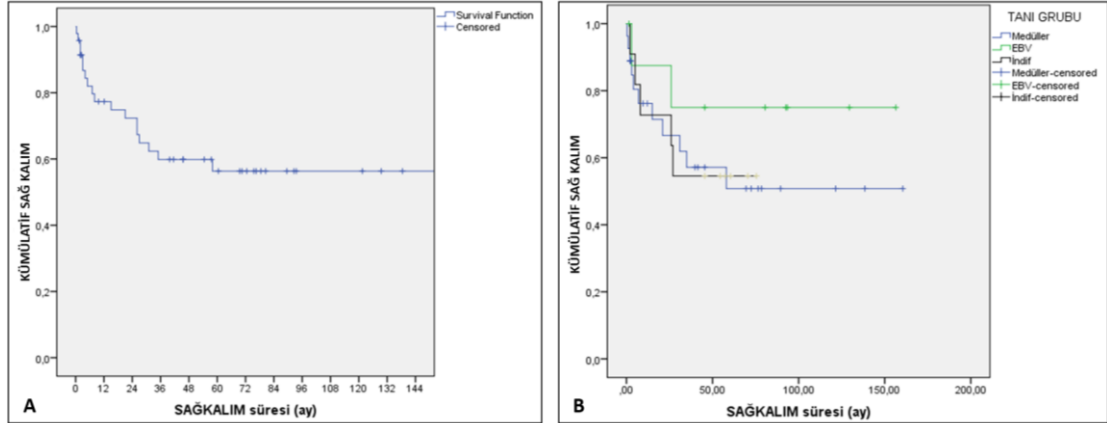
SIRA NO	OLGU NO	YAŞ	CİNSİYET	BÜYÜME PATERNİ	BÖLGE	PATOLOJİK EVRE	TEDAVİ	SAĞKALIM süresi (ay)
1	3	57	E	infiltratif	distal	pT3N0	N/A	sağ 156,5
2	4	64	E	ekspansil	distal	pT4bN2	N/A	N/A
3	10	61	E	ekspansil	proksimal	pT3N3a	N/A	ex 26
4	13	65	E	ekspansil	orta	pT4N0	KT+RT	sağ 129,5
5	14	66	K	infiltratif	proksimal	pT3N2	N/A	ex 3
6	19	70	K	infiltratif	distal	pT3N1	KT+RT	sağ 93,5
7	21	47	E	ekspansil	orta	pT4N2	KT+RT	sağ 92,5
8	28	59	E	infiltratif	distal	pT4N0	KT	sağ 80,5
9	44	59	K	infiltratif	distal	pT3N2	KT+RT	sağ 45,5
10	53	70	E	infiltratif	orta	pT2N0	-	sağ 1,5

SIRA NO	OLGU NO	YAŞ	CİNSİYET	BÜYÜME PATERNİ	BÖLGE	PATOLOJİK EVRE	TEDAVİ	SAĞKALIM süresi (ay)
1	1	59	E	ekspansil	distal	pT4N1Mx	N/A	N/A
2	6	68	E	infiltratif	Proks.+orta+distal	pT4N3aMx	KT	N/A
3	7	42	E	infiltratif	distal	pT4N2Mx	KT	N/A
4	15	63	E	ekspansil	distal	pT4N2Mx	KT+RT	sağ 75,5
5	18	62	E	infiltratif	proksimal	pT4N1Mx	KT	ex 27
6	20	65	E	ekspansil	distal	pT4N3aMx	KT	ex 5
7	22	58	K	ekspansil	orta	pT3N3aMx	KT+RT	ex 8
8	25	69	K	infiltratif	proksimal	pT4N2Mx	KT	ex 2
9	29	53	E	infiltratif	distal	pT4N3aMx	KT	ex 26
10	36	33	E	infiltratif	proksimal-orta	pT4N2Mx	KT+RT	sağ 70,5
11	39	48	E	infiltratif	distal+orta	pT3N1Mx	KT	sağ 60,5
12	40	77	E	infiltratif	distal	pT3N0Mx	N/A	sağ 57,5
13	42	49	E	infiltratif	distal	pT4N3aMx	KT+RT	sağ 54,5
14	43	51	K	infiltratif	distal	pT2N0Mx	-	sağ 45,5

KT: Kemoterapi, RT: Radyoterapi, Ex: hayatta olmayan olgu, E: erkek, K: kadın, N/A: «not available» Ulaşılamayan bilgi

Sağkalım ortalamaları, bilgilerine ulaşılamayan olgular dışlandıktan sonra hesaplanmıştır. En uzun sağkalım 160,5 ay iken en kısa sağ kalım 0,36 aydır. Ortalama sağkalım süresi 46, 8 ((SD ± 44,4) ay olarak tespit edilmiştir. Erkeklerde ortalama sağkalım süresi 47,8 (SD ± 46,2) ay iken kadınlarda sağkalım 44,9 (SD ±

42,2) aydır. Yüksek standart sapmalara (SD) sahip sağkalım verilerinin yalın aritmetik ortalaması bilgi verici değildir. Bu nedenle daha sağlıklı sağkalım bilgisi için Kaplan-Meier sağkalım eğrileri oluşturulmuştur. Bu eğrilerde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı sağkalım farklılığı saptanmamıştır (Şekil 4.2 (B); $p>0,05$)).



Şekil 4.2. Sağkalım eğrileri (A) Tüm olguların sağkalım eğrisi (Kaplan-Meier) (B) Olguların gruplara göre ayırımından sonraki sağkalım eğrileri (Kaplan-Meier)

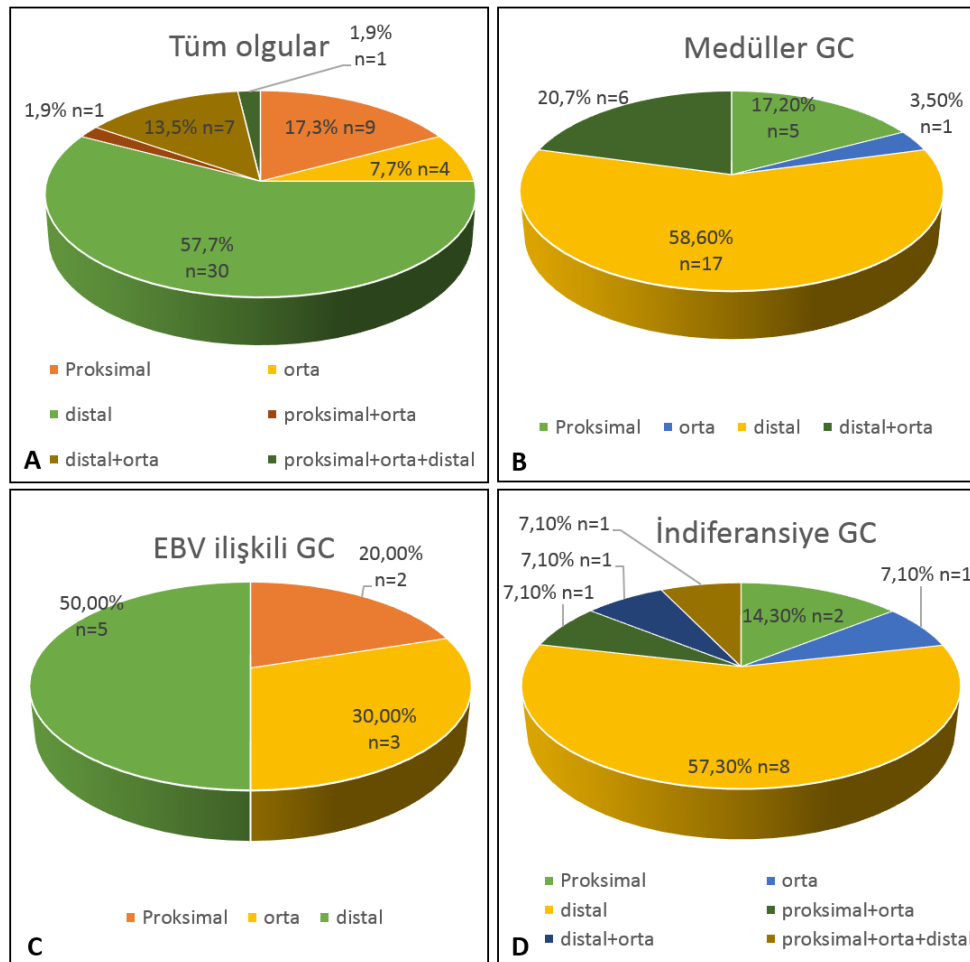
Tüm hastalar (n=53) arasında cerrahi tedavi sonrası 17 hasta kemoterapi (KT), 15 hasta kemoterapi + radyoterapi (KT+RT) almış ve 11 hasta cerrahiye ek bir tedavi almamıştır. 10 hastanın tedavi bilgilerine ulaşamamıştır.

Medüller GC grubunda (n=29) cerrahi sonrası 17 hasta adjuvan tedavi (10 hasta kemoterapi (KT), 7 hasta kemoterapi + radyoterapi (KT+RT)) almış ve 9 hasta cerrahiye ek bir tedavi almamıştır. 4 hastanın ise tedavi bilgilerine ulaşamamıştır. EBV ilişkili GC grubunda (n=10) cerrahi tedavi sonrası 1 hasta kemoterapi (KT), 4 hasta kemoterapi + radyoterapi (KT+RT) almış ve 1 hasta cerrahiye ek bir tedavi almamıştır. 4 hastanın tedavi bilgilerine ulaşamamıştır. İndiferansiye GC grubunda (n=14) cerrahi tedavi sonrası 6 hasta kemoterapi (KT), 4 hasta kemoterapi + radyoterapi (KT+RT) almış ve 1 hasta cerrahiye ek bir tedavi almamıştır. 2 hastanın tedavi bilgilerine ulaşamamıştır.

Tedavi bilgilerine ulaşılan hastalarda (n=47) tüm olgular arasında cerrahi sonrası KT, KT+RT veya tedavisiz hastaların sağkalımlarında birbirlerine göre istatistiksel anlamlı farklılık mevcut değildir; ayrıca KT, KT+RT veya tedavisiz

hastalarda 3 grup içerisinde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

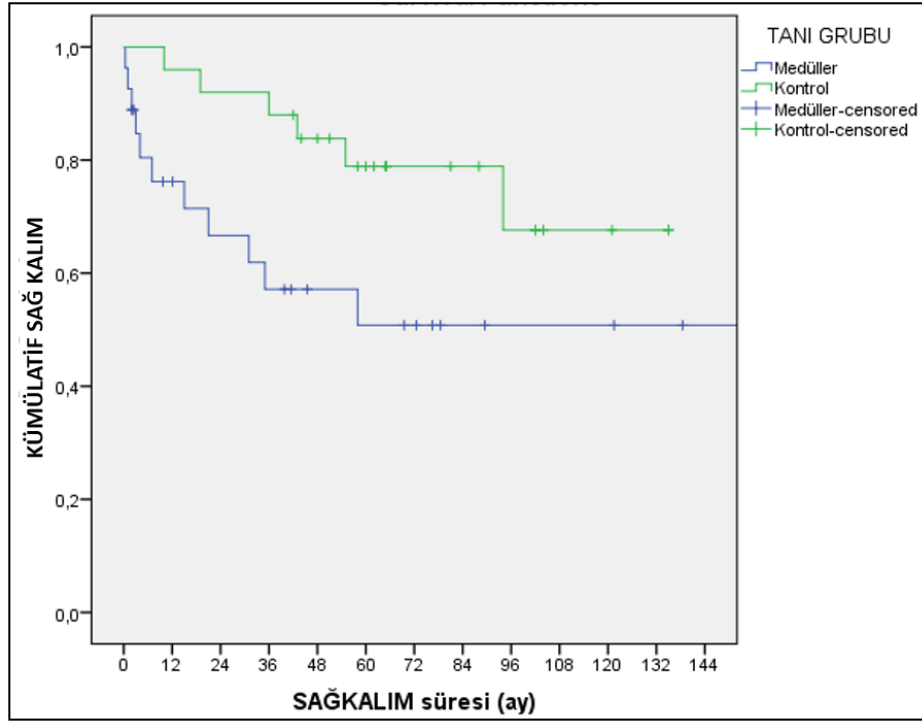
Olguların tümör lokalizasyonları incelendiğinde yarından fazlasının (%57,7) mide distalinde yerleşmiş olduğu görülmektedir. 3 ayrı gruba göre tümör lokalizasyonu açısından istatistiksel anlamlı farklılık mevcut değildir ($p>0,05$) ancak yüzde olarak her 3 grupta mide distalinde yerleşmiş tümörlerin yarıya eşit veya yarından fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. 53 olgunun bölgelere göre dağılımı (A) DNA Hatalı eşleşme Tamir Mekanizması bozukluğu gösteren medüller GC olgularının bölgelere göre dağılımı (B) EBV ilişkili GC olgularının bölgelere göre dağılımı (C) İndiferansiye GC Olgularının bölgelere göre dağılımı

Tümörün büyüme paterni incelendiğinde üç grup arasında, medüller GC grubunun istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterecek şekilde ekspansil büyüme paterninde sahip olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).

Literatürde medüller morfolojideki lenfoid stromadan zengin GC'ların cerrahi tedavi sonrası ek bir KT, RT almaması durumunda prognozunun daha iyi olduğunu ileri süren yayınlar mevcuttur⁹⁶. Ayrıca özellikle medüller morfoloji ile çakışan DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu veya mikrosatellit instabilite içeren GC'ların da daha iyi prognoza sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmamızdaki 29 olgudan oluşan, DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren ve medüller morfolojiye sahip GC'ların çoğu (17/29) cerrahi tedavi sonrası adjuvan KT veya KT+RT almıştır. Olguların bir kısmı (4/29) ise kısa süre (< 4 ay) içerisinde hayatını kaybetmiş; bir kısmı ise (3/29) 3 aydan kısa süredir takibi olan olgulardır. Şekil 4.2 (B)'de izlenen istatistiksel olarak anlamlı sağkalım farkı izlenmeyişi ve literatür bilgileriyle çelişme bu nedenle olabilir. Bu yanlılığı ortadan kaldırmak amacıyla 29 olgudan oluşan medüller GC grubu Watanabe ve ark.⁹⁶ (1976) nın araştırmasındaki ileri evre, lenfoid stromadan zengin 25 olguluk gastrik karsinom serisi ile sağkalım açısından karşılaştırılmış ve cerrahi tedavi sonrası ek tedavi almayan bu 25 olgunun sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı şekilde diğer gruba göre daha iyi bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. DNA Hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller morfolojideki GC Olgularının Sağkalım eğrisinin Watanabe ve ark.⁹⁶ (1976) nın araştırmasındaki ileri evre lenfoid stromadan zengin 25 olgu ile sağkalım açısından karşılaştırılması (Kaplan-Meier)

5 TARTIŞMA

Gastrik karsinomlar; hem kökenleri, hem moleküler yolları, hem histopatolojik çeşitlilikleri hem de biyolojik davranışları açısından oldukça geniş bir gruba temsil etmektedir. Borrmann ve Lauren'den günümüze kadar ki sınıflama çalışmaları içerisinde klinikopatolojik korelasyonu kapsayıcı bir şekilde yapan, prognoz ön görerek tedavi modalitelerine ön açan tatmin edici bir sınıflama henüz mevcut değildir. 2014 yılında yayınlanan TCGA çalışmasında⁹ olduğu gibi yeni moleküler sınıflamalar, hedefe yönelik tedavi çalışmaları açısından umut vericidir. Ancak bu çalışmada oluşturulan moleküler grupların histopatolojik karşılıklarının neler olduğu net belirlenmemiş, prognoz ve biyolojik davranış açısından klinik verilerle korelasyonu detaylı yapılmamıştır . Bu nedenle, bu alanda yapılacak yeni çalışmalar önemlidir.

Mevcut sınıflamalardaki belirsizlikler nedeniyle nispeten nadir görülen, az glandüler farklılaşma gösteren veya glandüler farklılaşma göstermeyen bir grup GC biyolojik davranışının kötü olacağı kabul edilerek "az diferansiye adenokarsinom, indiferansiye karsinom" benzeri tanımlar almakta ve bu hastalara agresif tedaviler (en az 5-6 kür 5-FU+folinik asit, mitomycin C, epirubicin, cisplatin, irinotecan gibi) uygulanmaktadır. Bu durum bez yapısı oluşturmayan ve nispeten nadir görülen bir grup GC'un hem morfolojik, hem immünohistokimyasal hem de moleküler özellikleri açısından daha net tanımlanması ve klinik gidişlerinin daha net ortaya konması gerekliliğini doğurmaktadır.

GC'ların sınıflandırılması, tedavi protokollerinin geliştirilmesi, immünoterapi ve/veya hedefe yönelik tedavilerden yararlanacak hastaların tespiti ve prognozlarının net olarak öngörülebilmesi açısından önemlidir. Kanser Genom Atlası Projesi daha önceki GC altgruplama çalışmalarını da dikkate alarak 2014'de yeni bir moleküler sınıflama önermiştir⁹. Bu yeni moleküler sınıflama stratejisinin diğer morfolojik sınıflamalara göre avantajı özellikle EBV pozitifliği gösteren ve MSI varlığı belirgin alt gruplar açısından hedefe yönelik tedavi çalışmalarına ön açıyor oluşudur.

Tez çalışmasına dahil edilen 53 vakadan 29 tanesi oluşturan medüller GC grubunda istatistiksel olarak anlamlı iki bulgu tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi bu grupta ekspansil büyüme paterninin diğer iki gruba göre daha sık görülmesidir; ki medüller morfolojideki olguların tanınması açısından önemli bir ipucu olan bu bilgi literatürde de yer almaktadır⁴⁹. İstatistiksel olarak anlamlı ikinci bulgu ise medüller GC grubunun Watanabe ve ark.⁹⁶ (1976) nın araştırmasındaki ileri evre lenfoid stromadan zengin 25 olgu ile sağkalım açısından karşılaştırmasının sonucudur.

Literatürde medüller morfolojideki ve/veya lenfoid stromadan zengin GC'ların cerrahi tedavi sonrası ek bir KT, RT almaması durumunda prognozunun daha iyi olduğunu ileri süren yayınlar mevcuttur^{46, 96}. Ancak bazı yayınlar bu durumun özellikle evre II tümörlerin için geçerli olduğunu söylemektedir⁷⁷. Ayrıca özellikle medüller morfoloji ile çakışan DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu veya mikrosatellit instabilite içeren GC'ların da kolondakiler gibi daha iyi prognoza sahip olduğu iddia edilmektedir^{74, 78, 97}. Çalışmamızdaki 29 olgudan oluşan, DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren ve medüller morfolojiye sahip GC'ların çoğu (17/29) cerrahi tedavi sonrası KT veya KT+RT almıştır. Olguların bir kısmı (4/29) ise kısa süre (< 4 ay) içerisinde hayatını kaybetmiş; bir kısmı ise (3/29) 3 aydan kısa süredir takibi olan olgulardır. Şekil 4.2 (B) 'de izlenen istatistiksel olarak anlamlı sağkalım farkı izlenmeyişi ve literatür bildirileriyle çelişme bu nedenle olabilir. Bu yanlılığı ortadan kaldırmak amacıyla 29 olgudan oluşan medüller GC grubu Watanabe ve ark.⁹⁶ (1976) nın araştırmasındaki ileri evre lenfoid stromadan zengin 25 olgu ile sağkalım açısından karşılaştırılmış ve cerrahi tedavi sonrası ek tedavi almayan bu 25 olgunun sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı şekilde diğer gruba göre daha iyi bulunmuştur (Şekil 4.3). Bu karşılaştırmalar arasındaki en önemli sınırlama Watanabe ve ark. araştırmasındaki ileri evre GC grubunun yaş ortalamasının (52, 7 yıl; SD ± 12,1 yıl) bizim grubumuza (66,5 yıl; SD ± 9,8 yıl) göre daha genç oluşu ve bu nedenle yaşam beklentisinin daha uzun oluşudur. Ancak bu sağkalım farkının karşılaştırılması başka bazı kısıtlamalar da içermektedir. 1976 yılında yayınlanan 25 olgudan oluşan ileri evre lenfoid stromadan gastrik karsinomların bir kısmı EBV ilişkili de olabilir, o zaman bu

olguların DNA hatalı eşleşme tamir mekanizmasının da değerlendirilmediği düşünüldüğünde sadece morfolojik sınıflandırma ile grup oluşturulmuştur. Ancak avantajı ise o zaman gastrik karsinomların sadece cerrahi ile tedavi edilmiş olması, ek adjuvan tedavi verilmemiş olması, bizim grubumuzdaki olguların ise büyük çoğunluğuna adjuvan tedavi verilmesi nedeniyle sağkalım açısından özellikle medüller karsinomlarda adjuvan tedavinin verilmesinin faydadan daha çok zarar verebileceğini tartışmaya koymasındır. Bu konuda ileriye dönük, kontrollü klinik araştırma yapılması faydalı olacaktır.

EBV-ilişkili GC'larda, EBV enfeksiyonu PTEN geninin promoter CpG adası hipermetilasyonuna neden olur, PI3K–Akt sinyal yolağını aktive ederek PTEN ekspresyon kaybını indükler⁹⁸⁻¹⁰⁰. Bu nedenle EBV pozitif GC hastaları yeni geliştirilmekte olan programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1)/programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1) antikoları veya fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) inhibitörlerinden fayda görebilirler¹⁰¹. PTEN ekspresyon kaybı invazyon derinliği, farklılaşma derecesi, lenf nodu metastazı ve klinikopatolojik evreleme ile sıkı koreledir¹⁰². EBV ilişkili gastrik karsinomların tüm GC'lardaki görülme oranı % 10 iken⁹⁹ bizim çalışmamızda % 18,8 (10/53) dir. Bu %8,8 'lik fark, çalıştığımız örneklemin daha çok lenfoepitelyal stromadan zengin az glandüler farklılaşma gösteren bir GC grubu oluşuyla açıklanabilir.

Abe ve ark. 2012 yılında yayınlanan bir çalışmasında 67 EBV(+) ve 136 MLH1-kayı gösteren (MSI-H fenotipe karşılık gelen) GC'dan oluşan 857 olguda ARID1A ekspresyon kaybı araştırılmış ve EBV(+) (23/67; 34 %) ve MLH1-kayı gösteren (40/136; 29 %) GC'larda EBV(-)MLH1-korunmuş (32/657; 5 %) GC'lara oranla ARID1A kaybı anlamlı olarak daha sık saptanmıştır (P<0.01)¹⁰³. ARID1A ekspresyonunun azalmasının MSI-H fenotip ve EBV (+) dışındaki GC'larda ise kötü prognozla ilişkili olduğu öne sürülmektedir^{103, 104}. Çalışmamızda yer almamış ARID1A gibi birçok prognostik, prediktif veya tanısal önem taşıyan belirteç gelecekte daha iyi prognoza sahip olduğu düşünülen bu iki grup için araştırılabilecek hedefler arasında yer almaktadır.

Çalışmamız dahilinde indifferansiye GC grubunda, tüm grup için geçerli bir belirteç tespit etmek mümkün olmamıştır. Bunda, bu grubun olası çeşitli patogenetik yollardan köken alan heterojen morfolojide (difüz infiltratif skiröz, taşlı yüzük, lenfoepitelyoma benzeri, pleomorfik taşlı yüzük, germinom benzer gibi) bir grup oluşunun payı büyüktür. Bu grubun daha detaylı sınıflaması için ileride yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Giderek daha çok prediktif biyobelirtecini tanımlanması, sağlık hizmetinin ve bireysel tıp yaklaşımının gelişmesine katkıda bulunacaktır. İmmünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler gastrik karsinom tedavisine yaklaşımımızı tümüyle değiştirecek, tümör heterojenitesi ve klinik sonuçları açısından tümörleri daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Daha iyi bir klinik gidişin sağlanmasında prediktif biyobelirteçlerle zenginleştirilmiş yeni tedavi stratejilerinin oluşturulması kritik öneme sahiptir.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

- * Kötü diferansiye veya indiferansiye mide karsinomları morfolojik görünüm, biyolojik davranış ve moleküler özellikler açısından heterojen bir grup tümörü temsil etmektedir.
- * Biyobelirteç tabanlı alt tiplendirmede nadir görülen kötü diferansiye mide karsinomlarının bir kısmı medüller (DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu içeren) ve EBV ilişkili mide karsinomu olarak alt gruplandırılabilir.
- * Medüller gastrik karsinomların insidansı %4,4 (29/654 olgu) olarak bulunmuştur. Bu tümörler DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu içermekte olup diffüz ekspansil, belirgin dezmoplazi içermeyen mide tümörleridir. Cerrahi tedavi sonrası adjuvan tedavi açısından fayda/zarar değerlendirilmesinin olgu temelli yapılması gerekmektedir. Özellikle yan etkisi fazla, spesifitesi düşük adjuvan tedaviler yerine immünoterapi benzeri tedavilerin faydasının araştırılması açısından bu grup hastaları içeren kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.
- * DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu immünohistokimyasal olarak değerlendirilirken 4'lü panel (MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6) uygulanması spesifiteyi arttırmaktadır. Ancak cerrahi spesmenlerdeki suboptimal fiksasyon nedeniyle bazı olgular immünohistokimyasal kısıtlamalar içermektedir. Bu durumda moleküler olarak PCR tabanlı tanı yöntemleri ile teyit gerekmektedir.
- * Mide karsinomlarında DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu gösteren medüller karsinomlar genellikle MLH1 ve PMS2 de kayıp göstermektedir, sadece 1 olguda MSH2 ve MSH6 kaybı mevcuttur. Bu durum sporadik olguların çokluğunu desteklemekte olup Lynch Sendromlu hasta bu grupta nispeten nadir olduğunu düşündürmektedir.
- * Belirgin glandüler farklılaşma göstermeyen GC'ların ayırıcı tanısında lenfoma ve nöroendokrin tümör olasılıkları ekarte edildikten ve epitelyal köken ispatlandıktan sonra olguların EBV statüsü ile DNA hatalı eşleşme tamir

mekanizması bozukluğu açısından da değerlendirilmesi patolojik ayırıcı tanıda faydalıdır.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer Journal international du cancer 2010, 127:2893-917.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer Journal international du cancer 2015, 136:E359-86.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2009 kanser istatistikleri raporu <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetler/kanser-istatistikleri.html.pdf>.
4. Bosman FT, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer.: WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010.
5. 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 pathologica et microbiologica Scandinavica 1965, 64:31-49.
6. Ming SC: Gastric carcinoma. A pathobiological classification. Cancer 1977, 39:2475-85.
7. Goseki N, Takizawa T, Koike M: Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. Gut 1992, 33:606-12.
8. Carneiro F, Seixas M, Sobrinho-Simoes M: New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach. Pathology, research and practice 1995, 191:571-84.

9. Cancer Genome Atlas Research N: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014, 513:202-9.
10. GUNER G: Histomorphological Classification of Primary Gastric Carcinomas. Pathology. Ankara: Hacettepe University, 2014.
11. Rosai J, Ackerman LV: Rosai and Ackerman's surgical pathology. 10th ed. Edinburgh: Elsevier/Mosby, 2011.
12. Curado M, Edwards B, Shin H, Storm HH, Ferlay J, Heanue M, Boyle P, International Agency for Research on Cancer., International Association of Cancer Registries.: Cancer incidence in five continents. Volume IX. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
13. Kaneko S, Yoshimura T: Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. *British journal of cancer* 2001, 84:400-5.
14. Miyahara R, Niwa Y, Matsuura T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Goto H: Prevalence and prognosis of gastric cancer detected by screening in a large Japanese population: data from a single institute over 30 years. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2007, 22:1435-42.
15. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V, Group WHOIAfRoCMW: A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *The Lancet Oncology* 2009, 10:321-2.
16. Kondo K: Duodenogastric reflux and gastric stump carcinoma. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 2002, 5:16-22.
17. Sinning C, Schaefer N, Standop J, Hirner A, Wolff M: Gastric stump carcinoma - epidemiology and current concepts in pathogenesis and treatment. *European*

- journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology 2007, 33:133-9.
18. Taki K, Kuwabara N: Studies on histogenesis of the gastric carcinoma using minute cancers. *Pathology, research and practice* 1981, 172:176-90.
 19. Rosai J: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology* 10e, 2010.
 20. Correa P: Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer research* 1992, 52:6735-40.
 21. Craanen ME, Blok P, Dekker W, Ferwerda J, Tytgat GN: Subtypes of intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*. *Gut* 1992, 33:597-600.
 22. El-Zimaity HM, Ramchatesingh J, Saeed MA, Graham DY: Gastric intestinal metaplasia: subtypes and natural history. *Journal of clinical pathology* 2001, 54:679-83.
 23. Rugge M, Cassaro M, Leandro G, Baffa R, Avellini C, Bufo P, Stracca V, Battaglia G, Fabiano A, Guerini A, Di Mario F: *Helicobacter pylori* in promotion of gastric carcinogenesis. *Digestive diseases and sciences* 1996, 41:950-5.
 24. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M: *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998, 115:642-8.
 25. Bronner MP: Gastric cancer and intestinal metaplasia. *Human pathology* 1999, 30:733.
 26. Hattori T: Development of adenocarcinomas in the stomach. *Cancer* 1986, 57:1528-34.
 27. Qiao YL, Dawsey SM, Kamangar F, Fan JH, Abnet CC, Sun XD, Johnson LL, Gail MH, Dong ZW, Yu B, Mark SD, Taylor PR: Total and cancer mortality after

- supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2009, 101:507-18.
28. Rugge M, Farinati F, Di Mario F, Baffa R, Valiante F, Cardin F: Gastric epithelial dysplasia: a prospective multicenter follow-up study from the Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Human pathology* 1991, 22:1002-8.
29. Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA: Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, 78:805-9.
30. Conrad NK, Fok V, Cazalla D, Borah S, Steitz JA: The challenge of viral snRNPs. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2006, 71:377-84.
31. Moss WN, Lee N, Pimienta G, Steitz JA: RNA families in Epstein-Barr virus. *RNA biology* 2014, 11:10-7.
32. Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K: Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *Journal of virology* 1999, 73:9827-31.
33. Yamamoto N, Takizawa T, Iwanaga Y, Shimizu N, Yamamoto N: Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS letters* 2000, 484:153-8.
34. Burke AP, Yen TS, Shekitka KM, Sobin LH: Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1990, 3:377-80.
35. Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM: Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense

- lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *The American journal of pathology* 1991, 139:469-74.
36. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS: Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* 2009, 137:824-33.
37. Leoncini L, Vindigni C, Megha T, Funto I, Pacenti L, Musaro M, Renieri A, Seri M, Anagnostopoulos J, Tosi P: Epstein-Barr virus and gastric cancer: data and unanswered questions. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1993, 53:898-901.
38. Shibata D, Weiss LM: Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *The American journal of pathology* 1992, 140:769-74.
39. Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E: Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *The American journal of pathology* 1993, 143:1250-4.
40. Chen JN, He D, Tang F, Shao CK: Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity. *Journal of clinical gastroenterology* 2012, 46:262-71.
41. Imai S, Koizumi S, Sugiura M, Tokunaga M, Uemura Y, Yamamoto N, Tanaka S, Sato E, Osato T: Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, 91:9131-5.
42. Wakiguchi H: Overview of Epstein-Barr virus-associated diseases in Japan. *Critical reviews in oncology/hematology* 2002, 44:193-202.
43. van Beek J, zur Hausen A, Klein Kranenbarg E, van de Velde CJ, Middeldorp JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Bloemena E: EBV-positive gastric

adenocarcinomas: a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004, 22:664-70.

44. Okada T, Nakamura M, Nishikawa J, Sakai K, Zhang Y, Saito M, Morishige A, Oga A, Sasaki K, Suehiro Y, Hinoda Y, Sakaida I: Identification of genes specifically methylated in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Cancer science* 2013, 104:1309-14.
45. Matsunou H, Konishi F, Hori H, Ikeda T, Sasaki K, Hirose Y, Yamamichi N: Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer* 1996, 77:1998-2004.
46. Huang KH, Wang RF, Yang MH, Wu CW, Fang WL, Li AF, Chi CW, Kao HL: Advanced gastric cancer patients with lymphoid stroma have better survival than those without. *Journal of surgical oncology* 2013, 107:523-8.
47. Geddert H, Zur Hausen A, Gabbert HE, Sarbia M: EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1. *Analytical cellular pathology* 2010, 33:143-9.
48. Arai T, Kasahara I, Sawabe M, Honma N, Aida J, Tabubo K: Role of methylation of the hMLH1 gene promoter in the development of gastric and colorectal carcinoma in the elderly. *Geriatrics & gerontology international* 2010, 10 Suppl 1:S207-12.
49. Arai T, Takubo K: Clinicopathological and molecular characteristics of gastric and colorectal carcinomas in the elderly. *Pathology international* 2007, 57:303-14.
50. Chan AO, Soliman AS, Zhang Q, Rashid A, Bedeir A, Houlihan PS, Mokhtar N, Al-Masri N, Ozbek U, Yaghan R, Kandilci A, Omar S, Kapran Y, Dizdaroglu F, Bondy ML, Amos CI, Issa JP, Levin B, Hamilton SR: Differing DNA methylation

patterns and gene mutation frequencies in colorectal carcinomas from Middle Eastern countries. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005, 11:8281-7.

51. Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanani A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Flejou JF, Duval A: [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bulletin du cancer* 2008, 95:121-32.
52. Chun N, Ford JM: Genetic testing by cancer site: stomach. *Cancer journal* 2012, 18:355-63.
53. Bellizzi AM, Frankel WL: Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Advances in anatomic pathology* 2009, 16:405-17.
54. Imai K, Yamamoto H: Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008, 29:673-80.
55. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JH, Leung SY, Hoogerbrugge N: Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature genetics* 2009, 41:112-7.
56. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research* 1998, 58:5248-57.

57. Sinn DH, Chang DK, Kim YH, Rhee PL, Kim JJ, Kim DS, Park CK, Kim JW, Yun SH, Lee WY, Chun HK, Rhee JC: Effectiveness of each Bethesda marker in defining microsatellite instability when screening for Lynch syndrome. *Hepato-gastroenterology* 2009, 56:672-6.
58. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* 2004, 96:261-8.
59. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, Hermens RP, Blokx WA, Dubois SV, van der Linden H, Meijer JW, Mlynek-Kersjes ML, Hoogerbrugge N, Hebeda KM, van Krieken JH: Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *The American journal of surgical pathology* 2008, 32:1246-51.
60. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR: Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *The American journal of pathology* 1998, 153:1063-78.
61. Johannsdottir JT, Jonasson JG, Bergthorsson JT, Amundadottir LT, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S: The effect of mismatch repair deficiency on tumorigenesis; microsatellite instability affecting genes containing short repeated sequences. *International journal of oncology* 2000, 16:133-9.
62. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al.: Inactivation of the type II TGF-

- beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995, 268:1336-8.
63. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ: Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nature genetics* 1996, 14:255-7.
64. Yamamoto H, Sawai H, Perucho M: Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer research* 1997, 57:4420-6.
65. Johnson V, Volikos E, Halford SE, Eftekhari Sadat ET, Popat S, Talbot I, Truninger K, Martin J, Jass J, Houlston R, Atkin W, Tomlinson IP, Silver AR: Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut* 2005, 54:264-7.
66. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espin E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, Aaltonen LA, Imai K, Yamamoto H, Schwartz S, Jr., Hofstra RM: BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005, 24:3995-8.
67. Gatalica Z, Torlakovic E: Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Familial cancer* 2008, 7:15-26.
68. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, Waring PM, Ruzkiewicz AR, Pollett AF, Redston M, Barker MA, Baron JA, Casey GR, Dowty JG, Giles GG, Limburg P, Newcomb P, Young JP, Walsh MD, Thibodeau SN, Lindor NM, Lemarchand L, Gallinger S, Haile RW, Potter JD, Hopper JL, Jass JR, Colon Cancer Family R: Pathology features in Bethesda guidelines predict

colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007, 133:48-56.

69. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR: Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *The American journal of pathology* 1994, 145:148-56.
70. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B: Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *European journal of cancer* 2009, 45:1890-6.
71. Sinicrope FA, Sargent DJ: Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Current opinion in oncology* 2009, 21:369-73.
72. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, Jewell SD, Mayer RJ, Goldberg RM, Saltz LB, Warren RS, Redston M: Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009, 27:1814-21.
73. Choi SW, Choi JR, Chung YJ, Kim KM, Rhyu MG: Prognostic implications of microsatellite genotypes in gastric carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2000, 89:378-83.
74. Lee HS, Choi SI, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kang GH, Kim YI, Lee BL, Kim WH: Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2002, 15:632-40.
75. Carneiro F, Oliveira C, Leite M, Seruca R: Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Seminars in diagnostic pathology* 2008, 25:274-87.

76. Pinto M, Wu Y, Mensink RG, Cirnes L, Seruca R, Hofstra RM: Somatic mutations in mismatch repair genes in sporadic gastric carcinomas are not a cause but a consequence of the mutator phenotype. *Cancer genetics and cytogenetics* 2008, 180:110-4.
77. Beghelli S, de Manzoni G, Barbi S, Tomezzoli A, Roviello F, Di Gregorio C, Vindigni C, Bortesi L, Parisi A, Saragoni L, Scarpa A, Moore PS: Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery* 2006, 139:347-56.
78. dos Santos NR, Seruca R, Constancia M, Seixas M, Sobrinho-Simoes M: Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology* 1996, 110:38-44.
79. Wu CW, Chen GD, Jiang KC, Li AF, Chi CW, Lo SS, Chen JY: A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer* 2001, 92:92-101.
80. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, Giovannucci EL, Fuchs CS: CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009, 58:90-6.
81. Toyota M, Issa JP: CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Seminars in cancer biology* 1999, 9:349-57.
82. Zitt M, Zitt M, Muller HM: DNA methylation in colorectal cancer--impact on screening and therapy monitoring modalities? *Disease markers* 2007, 23:51-71.
83. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JP: Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104:18654-9.

84. Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR: Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008, 14:2560-9.
85. Nakamura K, Sugano H, Takagi K: Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. *Gan* 1968, 59:251-8.
86. Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, Kato Y: Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 2000, 3:219-25.
87. Okabayashi T, Kobayashi M, Nishimori I, Sugimoto T, Namikawa T, Onishi S, Hanazaki K: Clinicopathological features and medical management of early gastric cancer. *American journal of surgery* 2008, 195:229-32.
88. Ryu KW, Choi IJ, Doh YW, Kook MC, Kim CG, Park HJ, Lee JH, Lee JS, Lee JY, Kim YW, Bae JM: Surgical indication for non-curative endoscopic resection in early gastric cancer. *Annals of surgical oncology* 2007, 14:3428-34.
89. Ishigami S, Natsugoe S, Miyazono F, Hata Y, Uenosono Y, Sumikura S, Matsumoto M, Tokuda K, Nakajo A, Hokita S, Aikou T: Clinical merit of subdividing gastric cancer according to invasion of the muscularis propria. *Hepato-gastroenterology* 2004, 51:869-71.
90. Yoshikawa K, Maruyama K: Characteristics of gastric cancer invading to the proper muscle layer--with special reference to mortality and cause of death. *Japanese journal of clinical oncology* 1985, 15:499-503.

91. Roder JD, Bottcher K, Busch R, Wittekind C, Hermanek P, Siewert JR: Classification of regional lymph node metastasis from gastric carcinoma. German Gastric Cancer Study Group. *Cancer* 1998, 82:621-31.
92. Kappas AM, Fatouros M, Roukos DH: Is it time to change surgical strategy for gastric cancer in the United States? *Annals of surgical oncology* 2004, 11:727-30.
93. Martin IG, Dixon MF, Sue-Ling H, Axon AT, Johnston D: Goseki histological grading of gastric cancer is an important predictor of outcome. *Gut* 1994, 35:758-63.
94. de Manzoni G, Verlato G, Guglielmi A: Classification of gastric carcinoma using the Goseki system provides prognostic information additional to TNM staging. *Cancer* 2000, 88:2426-8.
95. Leica Bond Ready to Use ISH EBER Probe catalog no PB0589.pdf.
96. Watanabe H, Enjoji M, Imai T: Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* 1976, 38:232-43.
97. Oliveira C, Seruca R, Seixas M, Sobrinho-Simoes M: The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R, and BAX genes. *The American journal of pathology* 1998, 153:1211-9.
98. Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M: Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer research* 2009, 69:2766-74.

99. Fukayama M: Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathology international* 2010, 60:337-50.
100. Fukayama M, Hino R, Uozaki H: Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer science* 2008, 99:1726-33.
101. Sunakawa Y, Lenz HJ: Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Current treatment options in oncology* 2015, 16:17.
102. Li M, Sun H, Song L, Gao X, Chang W, Qin X: Immunohistochemical expression of mTOR negatively correlates with PTEN expression in gastric carcinoma. *Oncology letters* 2012, 4:1213-8.
103. Abe H, Maeda D, Hino R, Otake Y, Isogai M, Ushiku AS, Matsusaka K, Kunita A, Ushiku T, Uozaki H, Tateishi Y, Hishima T, Iwasaki Y, Ishikawa S, Fukayama M: ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2012, 461:367-77.
104. Wang DD, Chen YB, Pan K, Wang W, Chen SP, Chen JG, Zhao JJ, Lv L, Pan QZ, Li YQ, Wang QJ, Huang LX, Ke ML, He J, Xia JC: Decreased expression of the ARID1A gene is associated with poor prognosis in primary gastric cancer. *PloS one* 2012, 7:e40364.

EKLER**Ek 1. İncelenen Hastaların Biyopsi Numaraları**

200013555	200816171
200204976	200818581
200210369	200819001
200210436	200901067
200210565	200901362
200316725	200905887
200401686	200908436
200411702	200911120
200417816	200912777
200506330	200914221
200508501	201001248
200511502	201008618
200513996	201013413
200514689	201017886
200602064	201018221
200608847	201112455
200700896	201112459
200711173	201113532
200713698	201118475
200714271	201202405
200716423	201410421
200718785	201416470
200721395	201505581
200805477	201506845
200806403	201507362
200808045	201508887
200811206	

Ek 2. İmmünohistokimyasal Çalışmaların Skorlanmış Verileri

OLGU NO	MORFOLOJİK TIP	EBER	LMP1	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	MIMR skoru	MIMR STATÜSÜ	E-cadherin	MUC5ac	B-catenin	AXIN2	p53	Bcl-2	ki-67	ki-67	CDX2	SALL4	CerbB2
1	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	Ni	#VALUE!	ppMIMR	1	0	2	1	2	0	40	2	1	1	0
2	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	1	4	2	0	0	30	2	0	0	0
3	EBV ilişkili GC	1	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0
4	EBV ilişkili GC	1	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	0	0	2	1	0	0	30	2	0	0	0
5	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	2	4	2	0	1	35	2	0	0	0
6	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	0	0	2	1	2	0	40	2	2	2	0
7	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	2	0	4	2	0	0	50	3	2	0	0
8	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	1	5	2	0	0	1	0	0	0	0
9	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	0	3	2	0	0	25	1	0	0	0
10	EBV ilişkili GC	1	0	Ni	Ni	1	Ni	#VALUE!	ppMIMR	2	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0
11	Medüller GC	0	0	0	Ni	Ni	Ni	#VALUE!	ppMIMR	2	1	4	2	0	1	5	1	0	0	0
12	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	1	3	2	0	0	15	1	0	0	0
13	EBV ilişkili GC	1	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	2	0	4	2	0	0	80	4	0	0	0
14	EBV ilişkili GC	0	1	1	1	1	1	4	ppMIMR	2	0	3	2	0	1	25	2	0	0	0
15	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	1	0	3	1	0	0	55	3	1	0	0
16	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	0	0	4	3	0	0	8	1	0	0	0
17	Medüller GC	0	0	F	F	1	1	#VALUE!	ppMIMR	0	0	3	2	0	0	60	3	0	0	0
18	İndiferansiyel GC	0	0	1	Ni	1	1	#VALUE!	ppMIMR	2	0	5	2	0	0	1	0	1	0	0
19	EBV ilişkili GC	1	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	1	0	3	1	0	0	5	1	0	1	0
20	İndiferansiyel GC	0	0	Ni	1	Ni	1	#VALUE!	ppMIMR	1	0	1	2	0	0	3	0	0	0	0
21	EBV ilişkili GC	1	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	1	0	5	2	0	0	40	2	0	0	0
22	İndiferansiyel GC	0	0	Ni	Ni	1	Ni	#VALUE!	ppMIMR	2	0	5	2	1	0	2	0	0	0	0
23	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	0	0	N/A	2	1	0	55	3	0	0	0
24	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	0	4	3	0	2	60	3	2	2	0
25	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	1	0	3	1	1	0	20	1	0	0	0
26	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	1	2	3	1	0	0	90	4	0	0	0
27	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	1	4	2	0	1	25	1	0	0	0
28	EBV ilişkili GC	0	1	F	1	1	1	#VALUE!	ppMIMR	0	0	2	1	2	0	60	3	0	0	0
29	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	#VALUE!	ppMIMR	2	0	3	0	0	0	40	2	0	0	0
30	Medüller GC	0	0	F	0	1	1	#VALUE!	ppMIMR	2	1	4	2	1	0	1	0	0	0	0
31	Medüller GC	0	0	Ni	0	1	Ni	#VALUE!	ppMIMR	1	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
32	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	0	0	4	3	1	2	30	2	1	0	0
33	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	1	3	3	0	0	20	1	0	0	0
34	Medüller GC	0	0	Ni	Ni	1	1	#VALUE!	ppMIMR	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
35	Medüller GC	0	0	Ni	Ni	1	1	#VALUE!	ppMIMR	2	1	5	3	0	0	30	2	0	0	0
36	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	0	0	2	1	2	0	55	3	0	0	0
37	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	0	0	1	2	0	0	90	4	0	0	0
38	Medüller GC	0	0	F	1	1	1	#VALUE!	dMIMR	2	0	N/A	3	1	1	60	3	0	0	0
39	İndiferansiyel GC	0	0	F	0	1	1	#VALUE!	ppMIMR	2	0	4	2	1	0	60	3	0	0	0
40	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	0	0	2	2	0	0	60	3	2	2	0
41	Medüller GC	0	0	1	1	0	0	2	dMIMR	1	2	3	3	0	1	60	3	1	0	0
42	İndiferansiyel GC	0	0	1	1	1	1	4	ppMIMR	1	1	3	1	0	0	80	4	0	0	0
43	İndiferansiyel GC	0	0	F	1	1	1	#VALUE!	ppMIMR	2	N/A	4	1	0	0	55	3	0	0	0
44	EBV ilişkili GC	0	2	1	1	1	F	#VALUE!	ppMIMR	1	0	2	0	0	0	10	1	1	1	0
45	Medüller GC	0	0	0	Ni	1	1	#VALUE!	ppMIMR	1	0	3	2	0	0	80	4	0	0	0
46	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	2	0	5	1	2	0	80	4	1	0	0
47	Medüller GC	0	0	0	0	1	1	2	dMIMR	0	0	4	3	0	2	70	3	2	0	0
48	Medüller GC	0	N/A	0	0	1	1	2	dMIMR	2	0	2	N/A	0	N/A	35	2	0	0	0
49	Medüller GC	0	N/A	0	0	1	1	2	dMIMR	2	1	3	N/A	0	N/A	90	4	0	0	0
50	Medüller GC	0	N/A	0	0	1	1	2	dMIMR	1	2	3	N/A	0	N/A	80	4	0	0	0
51	Medüller GC	0	N/A	0	0	1	1	2	dMIMR	2	1	4	N/A	0	N/A	30	2	0	0	0
52	Medüller GC	0	N/A	0	0	1	1	2	dMIMR	0	0	4	N/A	0	N/A	50	3	2	0	0
53	EBV ilişkili GC	1	N/A	1	1	1	1	4	ppMIMR	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	20	1	1	N/A	0

Ek 3. Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Çalışma İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-575

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 13.05.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/10
Proje No : GO 15/319 (Değerlendirme Tarihi: 13.05.2015)
Karar No : GO 15/319 - 15

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, öğretim üyelerinden Doç. Dr. Aytekin AKYOL'un sorumlu araştırmacı olduğu, Dr. Meral BUĞDAYCI ÜNER'in tezi olan, GO 15/319 kayıt numaralı ve "Medüller, Lenfoepitelyoma Benzeri ve İndiferansiye Gastrik Karsinomların Moleküler ve Klinikopatolojik Özellikleri" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nürten Akarsu (Başkan)	İZİNLİ	9 Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye)
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye)		10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye)		11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)
4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye)	İZİNLİ	12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmenşier (Üye)		13. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye)
İZİNLİ		14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye)
6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)		15. Av. Meltem Onurlu (Üye)
7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye)		
8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)		