

# Patoloji: Morfolojiden Moleküler Analize Geçişte Doku Ekonomisi

## Pathology: Tissue Economics in the Transition From Molecular Analysis to Morphology

Dr. Büge ÖZ

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul

### ÖZET

Kişiselleştirilmiş kanser terapisi çağında, hastanın tümörünün moleküler profiline olan talep sürekli olarak artmaktadır. İleri evre Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarında, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonları ve anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ve c-ros oncogene 1 (ROS1) gen yeniden düzenlemeleri için testler, artık rutin olarak uygulanmaktadır. Anti-EGFR, Anti- ALK ve Anti ROS1 tedavisinden yararlanma olasılığı yüksek olan hastaları seçmek için klinik pratiğin temel bir bileşeni haline gelmiştir. Ayrıca, tekrarlayan veya metastatik tümörlerden veya ilk tedaviye yanıt etkili terapilere direnç geliştiren hastalardan doku örnekleri elde etmek, tümör ilerlemesinin moleküler temelini ve ilaç direncini geliştirmemizi anlamak için gereklidir. Bu nedenle, patolojik tanı ve genomik profillemeye için yeterli miktar ve kalitede olan tümör dokusunun örneklenmesinin en baştan planlanması ve tanı sırasında ekonomik kullanılması çok önemlidir. Bu derlemede, KHDAK hastalarında rutin moleküler analiz sağlamak için biyopsi örneklerinin elde edilmesinde ve işlenmesinde dikkate alınması gereken faktörler tartışılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** KHDAK, patoloji, biyopsi, tanı, doku örnekleme, immunhistokimya.

### SUMMARY

In the era of personalized cancer therapy, the demand for molecular profiling of the patient's tumor is steadily increasing. In advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, testing for epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene (ROS1) genes rearrangements has become an essential component of clinical practice to select patients who are most likely to benefit from EGFR, ALK and ROS1 tyrosine kinase inhibitors, respectively. Furthermore, obtaining tissue specimens from recurrent or metastatic tumors or from patients who develop resistance to initial effective therapies are essential for our understanding of the molecular basis of tumor progression and development of drug resistance. Therefore, the sampling of tumor tissue that is representative and is adequate in quantity and quality for pathological diagnosis and genomic profiling is crucial. In this review, we will discuss factors that should be considered in obtaining and processing biopsy specimens to enable routine molecular analysis in NSCLC patients.

**Keywords:** NSCLC, pathology, biopsy, diagnosis, tissue sampling, immunohistochemistry.

### Yazışma Adresi / Address for Correspondence

Prof. Dr. Büge ÖZ  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
e-posta: ozbug@gmail.com  
DOI: 10.5152/gghs.2018.035

## GİRİŞ

Geçtiğimiz son 20 yıl boyunca, küçük hücreli dışı akciğer karsinomunun (KHDAK) kesin ölümcül olmasının üstesinden gelmek için kapsamlı çabalar sarf edilmiştir. Bununla birlikte, ne yazık ki klasik kemoterapötik ajanların etkinliği sınırlıdır<sup>(1)</sup>. Son zamanlarda sürücü mutasyonlarının keşfi ve spesifik hedefe yönelik ajanlara daha fazla yanıt vermesi ile ilişkilendirilmesi KHDAK'larında özellikle de Non-Skuamöz tip KHDAK'da tedavi geleneksel kemoterapiden hedefli tedaviye geçiş göstermiştir. Bu yeni kişiselleştirilmiş terapi dönemi, ile kanserlerde ve fenotiplerinin yanı sıra genotipik karakterizasyonu saptamanın gerekliliğini ortaya koymuştur. Ancak KHDAK'lu hastaların üçte ikisinden fazlası ne yazık ki tanı esnasında ileri evrede diğer bir deyişle inoperabl bir aşamadır<sup>(2,3)</sup>.

Akciğer kanserlerinin %70'i ileri evrelerde yakalandığı için rezeke edilemediğinden, bu hastalarının çoğunluğunda küçük biyopsi ve sitoloji örnekleri tanı için patoloji Laboratuvarlarına gönderilen tek örnek olmaktadır<sup>(1,2,4)</sup>. Bu nedenle, çoğu için, küçük biyopsi veya sitoloji örnekleri hem tanı hem de moleküler profillemeye için mevcut tek doku olacaktır. Dahası, birçok araştırmacı son zamanlarda hızlıca nüks eden metastatik hastaların tümörlerinin diğerlerinden farkını veya ilaca dirençli tümörlerin moleküler patolojisini daha iyi anlamaya odaklanmıştır<sup>(1)</sup>. Bunun sonucunda biyopsi tekrarı, biyolojik örneklerin artırılması daha da büyük bir önem kazanmıştır. Son olarak da, hastalığın seyrinde farklı zaman aralığında veya tedavi devam ederken farklı tedavi seçeneklerine karar vermek için tümörün yeniden detaylı analizi gerekmektedir.

Sondan bir önceki Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) akciğer tümörleri sınıflamasında (2004)<sup>(5)</sup> özellikle küçük biyopsilerde ve sitolojik örneklerde sadece Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu (KHK) ve Küçük hücreli olmayan Akciğer karsinomu (KHDAK) tanısı yeterli olduğu belirtilmekteydi. Ancak son DSÖ sınıflamasında (2016) bunun yeterli olmadığı vurgulanmaktadır<sup>(6)</sup>. Yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkması KHDAK'da için kesin histolojik alt tiplere zorunlu kılmıştır. Özellikle skuamöz hücreli karsinomlar (SqCC) ile skuamöz hücreli olmayan karsinomları arasındaki ayrımın yapılması gerekmektedir; ikincisi çoğunlukla ADC ve büyük hücreli karsinomları kapsar<sup>(2,4,7)</sup>.

Son faz III çalışmalarında pemetrexed, skuamöz hücreli karsinomlara (SqCC) kıyasla adenokarsinomlarda

(ADC) ve büyük hücreli karsinomlarda üstün etkinlik göstermiştir, ayrıca pemetrexedin SqCC karsinomlarda kullanımı ölümcül kanamalara neden olmuştur<sup>(3,4,7)</sup>. Bu nedenle de Öncelikle KHK ayırımından sonra ADC ve adenokarsinom dışında kalanları belirlemek akciğer patoloğunun görevi olmuştur.

## Biyopsi Yapılacak Alanın Seçimi ve Biyopsi Sayısı ve Klinisyenin Dikkat Etmesi Gereken Önemli Noktalar

Biyopsi için uygun lezyonların seçimi genellikle klinisyenler, cerrahlar veya girişimsel radyologlar tarafından belirlenir. Tanı için biyopsi alınacak lokalizasyon belirlenirken kolay ulaşılabilirliği yanı sıra nekrotik olmamasına da dikkat edilmelidir. Nekroz artık yeni radyolojik inceleme yöntemleri ile belirlenebilmektedir<sup>(8,9)</sup>.

Tek bir alandan biyopsi/sitolojik materyal alınacak ise tümör büyüklüğüne göre birden çok örnekleme yapılmaya çalışılmalıdır. Tek bir biyopsi örneği alınan materyal tümörün tüm özelliklerini yansıtmayabilir; bunun nedeni tümörün çoğunlukla heterojen genetik profilinin olmasıdır<sup>(10)</sup>. Genomik çalışmalar, aynı tümörün farklı bölgelerinde, primer ve metastatik tümörlerde ve hatta eşzamanlı farklı metastatik bölgeler arasındaki heterojenlik ve tümörün de genetik evrim geçirdiğini göstermiştir<sup>(10,11)</sup>. Tüm bu veriler doğrultusunda akciğer kanseri düşünülen hastadan alınacak biyopsi yeri seçilirken maksimum örnekleme yapmayı amaç edilmek çok çok önemlidir.

Bir lezyondan elde edilebilecek insizyonel biyopsi veya kor biyopsinin net sayısı yoktur, mümkün olduğunca fazla tümör dokusu elde etmenin yararlarını vurgulayan pek çok ulusal ya da uluslararası rehberler yazılmıştır<sup>(12-14)</sup>. Servikal mediastinoskopi, torakoskopi ile sonucu primer tümörden elde edilen biyopsiler 3-6 biyopsi örneği alınabilmesi tanı ve testlerde yalancı negatif çıkma olasılığını %10'un altına indirmektedir<sup>(12)</sup>. Transtorakal ince iğne aspirasyon biyopsilere gelince tanı ve genotipleme için yeterli doku sağlamak için hedef lezyon başına en az dört iğne aspirasyonu yapılması önerilmektedir.

Özetle, en az beş endobronşiyal/transbronşiyal forseps biyopsisi alınmalıdır. Yine doku hacmini en üst düzeye çıkarmak için, ek bir beş forseps biyopsisi veya iki kryobiopsisi düşünülebilir. Hedef lezyon başına en az dört adet EBUS/endoskopik ultrason iğne aspirasyonu önerilir. 18-20 G iğne kullanarak en az iki perkütan ince iğne biyopsisi yapılmalıdır. Doku hacmini maksimuma çıkarmak için 3-6 kor iğne biyopsisi düşünülebilir<sup>(12)</sup>. KHDAK şüphesi olan hastalardan biyopsinin mümkünse cuma günü ya da uzun

tatillerden hemen önceki gün yapılmaması gereklidir. Daha sonra anlatılacak olan materyallerin sağlıklı fiksasyonu için bu çok önemlidir. Fiksasyonun uygun olmaması tanıya ulaşımı fazlaca olumsuz etkilemeye de daha sonra gerekecek olan moleküler testlerin başarısını oldukça olumsuz etkileyecektir<sup>(12)</sup>.

Örnek eğer sadece kemik dokudan alınabileceyse, patoloğun bunun için önceden uyarılması çok önemlidir. Kemik dokular uygun doku takip işlemlerin yapılabilmesi için dekalsifikasyona tabi tutulmaktadır. Dekalsifikasyon işlemi asit ile muamele edilerek yapılır. Asit ise moleküler testlerin başarısını oldukça olumsuz etkileyen bir sıvıdır; asit ile muamele dokularda DNA ve RNA degrade olur, parçalanır hücre sayısı yeterli olsa bile sağlıklı sonuç alınmaz<sup>(3,15)</sup>. Eğer patolog kemik dokudan akciğer kanseri tanısı ve moleküler işlemler yapacağını bilirse dokuyu daha az zedeleyebilecek dekalsifikasyon işlemi (asit içermeyen ETDA ile dekalsifikasyon) yapabilir ve bu işleme gerek olmayan yumuşak kısımları hemen takibe alabilir ve testler bu dokulara uygulanabilir.

### Örnekler Patolojiye Ulaştıktan Sonra Patoloğun Dikkat Etmesi Gerekenler

**Analiz öncesi aşamadaki gereklilikler:** Tamı için alınmış biyopsinin yerinin önemi yoktur; biyopsiler derhal uygun bir miktarda (biyopsinin en az 5-10 katı volümüne) nötr tamponlu %10 formalinle uygun şekilde fikse edilmelidir. Dokular mümkün olan en kısa sürede (30-60 dakikadan daha kısa süre içinde) fiksatif konmalıdır.

Moleküler analiz için optimal fiksasyon süresi, küçük biyopsi örnekleri için 6-12 saat ve daha büyük cerrahi örnekler için 12-48 saattir<sup>(16)</sup>. Son kılavuzlar, 6-48 saatlik fiksasyon zamanlarının klinik moleküler testler için kabul edilebilir olduğunu göstermektedir<sup>(7,15)</sup>. Hematoksin ve eosin boyama, immünohistokimya ve FISH analizi olumsuz etkilendiğinden, fiksasyon süresi altı saatten az olmamalıdır. Fiksasyon süresi 48 saati aşarsa da, DNA'nın kalitesi bozulur<sup>(1,17)</sup> moleküler tetkik başarısız olur ve FISH analizindeki sinyaller zayıflar. Ayrıca, geleneksel boyama ile immünohistokimya (IHC) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizleri olumsuz etkilendiği için altı saatin altındaki fiksasyon süresi de önerilmez. Örneklemeye veya rezeksiyondan 10 dakika sonra dokularda belirgin biyokimyasal değişiklikler meydana geldiğinden, hücrelerde RNA ve proteinlerin bozulmasını azaltmak için ön sabitleme süresi en aza indirilmelidir<sup>(3,7,12,15)</sup>. Rezeksiyon materyallerinde ise numunenin makroskopik incelenmesi ve ince dilimlere ay-

ırılması, fiksatiflerin penetrasyonunu kolaylaştırmak için mümkün olan en kısa sürede yapılma ve yine hemen fiksatif konmalıdır<sup>(1,7)</sup>. Ayrıca, patoloğun ya da biyopsiyi alan merkeze fiksatif koyarak parçayı gönderecekse fiksasyonun başlama saatini gönderme kağıdına yazması yukarıda anlatılan süreler uymak için son derece önemlidir (yazarın yorumu).

Alkol bazlı fiksatifler rutin boyama ile ilgili olarak aynı özelliklere sahiptir ve nükleik asit korunumu için özellikle güvenlidir, ancak nükleer morfolojiyi değiştirebilirler. Ancak, FISH testinde sinyalleri bozabilecekleri için önerilmemektedir<sup>(7,18)</sup>. Pikrik asit (Bouin, Dubosq- Brazil, Hollande) içeren fiksatifler, hızlı nükleik asit degradasyonundan sorumludur ve fiksasyon süreleri ne olursa olsun ciddi biçimde olumsuz etkilenen FISH ve moleküler analizler nedeniyle önerilmemektedir<sup>(7)</sup>.

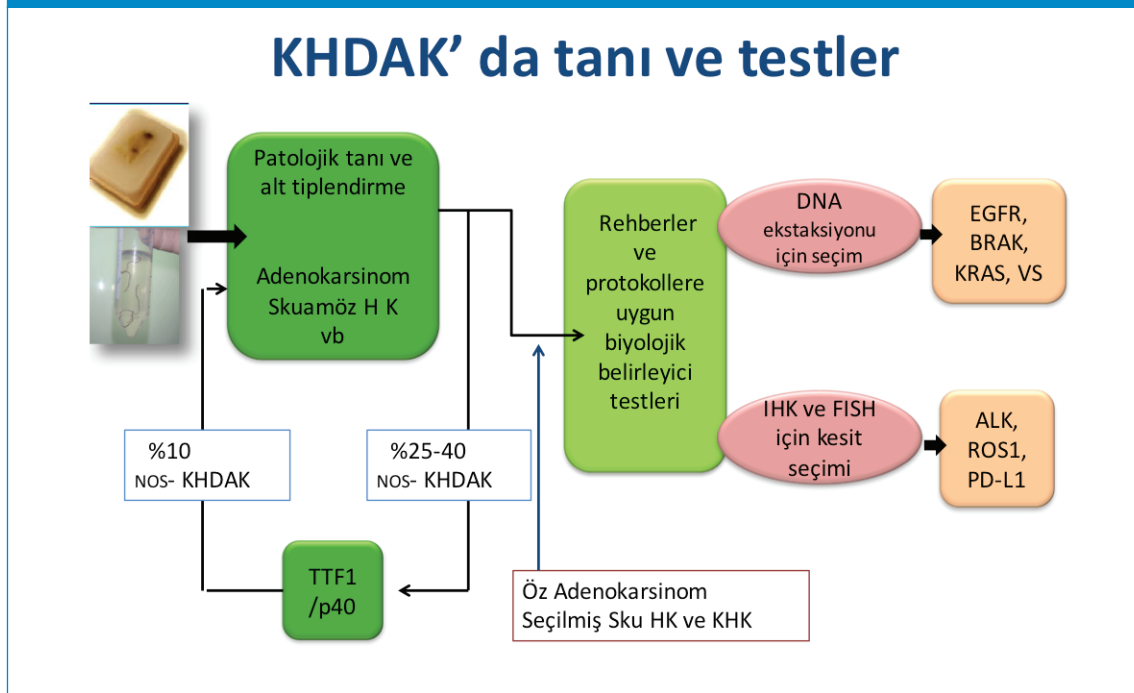
Uygun fiksasyonu tamamlanan dokular doku takibi sonrası parafin bloklara gömülmelidir.

**Mikroskopik inceleme:** Mikroskopik incelemede karsinom saptandığında ilk gereken şey KHAK ile KHDAK'ı ayırımının yapılmasıdır. Sonra KHDAK düşünülüyorsa, hematoksilen + eozin (H+E) boya ile tanıya gidilebiliyorsa ek immünohistokimyasal inceleme gerekmez (sadece adenokarsinom düşünülüyorsa akciğer kaynaklı olduğunu ispat etmek için TTF-1 uygulanabilir). Eğer karsinomun alt tip tayini için morfoloji, H+E boyası yeterli değil ise bir Adenokarsinom bir de SqCC lehine boyanacak iki primer antikor ile immünohistokimyasal boya uygulanması önerilmektedir<sup>(2,4,7)</sup>. Bu anlatılanlar Şekil 1'de şema ile özetlenmiştir.

Bir adenokarsinom ile skuamöz hücreli kanser ayrımı için literatürde en kabul gören primer antikorlar TTF1 ve p63/p40'dır. Bu iki antikor ile sonuçların nasıl yorumlanacağı Tablo 1'de verilmiştir. Sadece Bu iki primer antikor uygulaması ve Tablo 1'deki şekilde yorumlanması ile %73-87 oranında sağlıklı ve doğru bir şekilde KHDAK'da alt tiplendirme yapılabileceği bildirilmektedir<sup>(19,20)</sup>.

Sitolojik materyaller de, akciğer kanseri tanısında güçlü bir araçtır. Sitolojinin avantajları, minimal invaziv ve basit bir prosedür olması, daha hızlı raporlama yapılmasına yardımcı olması ve nispeten ucuz olmasıdır. Sitolojik muayenenin doğruluğu, malzemenin toplanması, hazırlanması, boyanması ve yorumlanması kalitesine büyük ölçüde bağlıdır<sup>(4,7)</sup>. Bu nedenle de sitopatoloji dünyada her yerde patolojinin bir yan dalıdır ve patoloji üzerine yapılan yan dal eğitimi ile sitopatolog yetişmektedir.

Şekil 1. KHDAK tanısında ve moleküler testler için ilk hazırlıklar olarak yapılması gerekenler.



Tablo 1. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri alt tiplendirme.

	P63/p40-	P63/p40+	P63/p40++
TTF1++	ADC	ADC	ADC
TTF1+	ADC	ADC	SqCC
TTF1-	Ayırım yapılmaz KHDAK-nos	Ayırım yapılmaz KHDAK-nos	SqCC

Sitolojik inceleme yapılması planlanan hastada işlem başında patoloğun, radyolog ya da sitolojik inceleme için materyali alacak olan hekime (göğüs hastalıkları uzmanı) hasta başı yeterliliği vermesi başarıyı arttıran çok önemli bir hizmettir. Ancak ülkemizde her hastanede yeterli sitopatolog bulunmaması nedeniyle gerektiği ölçüde uygulanamamaktadır.

Hücre bloğu oluşturmak; sitolojik materyallerin alınından sonraki işlemlerde patoloğun önemli bir görevi de hücre bloğu oluşturmak olmalıdır. Şırınga içinde/küçük doku parçaları içeren sıvıdan oluşturulan pıhtıdan hücre bloğu hazırlanması tanı ve daha sonraki testler için çok faydalıdır. Literatürde birkaç farklı hücre bloğu oluşturma metodu bulunmaktadır<sup>(7)</sup>. Tanı için ve sonrasındaki işlemlerde kullanmak için (IHC ve moleküler testler gibi) gelecekte özel çalışmalar için ek materyal bu şekilde sağlanmış olacaktır. Moleküler çalışmalarda da hücre bloğu numuneleri genellikle smear lamaları kadar yararlı olacaktır; çünkü hücre bloğu kesitlerinde tümör hücreleri doku

gibi kolaylıkla değerlendirilebilir, böylece hem orijinal tanısal slaytlar arşivlenebilir ve hem de gerektiğinde ek yardımcı testler yapılabilir.

Patoloğun bir görevi de KHDAK tanısı koyduktan sonra eğer geride kalan materyal moleküler testler için yeterince tümör hücresi içermiyorsa bunu raporda belirtmek olmalıdır.

Bazı ülkelerde KHDAK tanısı konmasının hemen ardından, hasta ileri evrede ise moleküler testler ek bir istemi beklemeden yapılabilmektedir (=refleks test<sup>(15)</sup>). Ülkemizde ise SGK kuralları gereği tedaviyi düzenleyecek hekim (tercihan medikal onkolog) tarafından resmi test isteminin yapılması gerekmektedir.

Genel olarak, dondurularak saklanmış preparatlar da hücre miktarı ve elde edilen DNA'nın konsantrasyonu mutasyon analizinde daha az sorunludur. Sitoloji örneğinin yanı sıra çok düşük miktarda DNA veren küçük biyopsi örnekleri, daha hassas tespit yöntemleri kullanıldığında mutasyonları tespit edebilir<sup>(15,21)</sup>. Fakat 300 hücreden az tümör hücresi



içeren bir materyal bir de formalinle fikse edilmiş ise DNA az da olsa parçalanabilir; örneklerde mutasyonların saptanamaması (yalancı negatiflik) riskini arttırır.

Sonuç olarak; hedefe yönelik tedaviden yararlanacak akciğer kanseri hastalarının genomik profilini belirlemek artık standart olmuştur. KHDAK için tümör dokusunun malignite temsilcisi olarak yeterli miktar ve yeterli kalitede olması kritik öneme sahiptir. Tümör örnekleri biyopsi sırasında mümkün olduğunca bol olarak alınmalıdır. Sitolojik aspirasyon biyopsilerinde numunenin yeterliliğini sağlamak için bir patolog veya iyi eğitilmiş bir teknisyen tarafından yerinde hızlı değerlendirme sisteminin kurulması çok önemlidir. Optimal moleküler analiz için tümör hücreliliği, materyalin fiksasyon durumu ve kalitesi çok önemlidir. Göğüs hastalıkları uzmanı, medikal onkolog, patolog ve moleküler patolog arasındaki yakın iletişim, doğru histopatolojik tanı ve moleküler test için yeterli tümör dokularını elde etmede başarı için şarttır. Tanı ve tedavi için yeterli biyopsinin alınmasının uygun yolunu ve kişiselleştirilmiş kanser tedavisi için tedavi stratejisinin doğru yönlendirilmesini sağlamak için kritik öneme sahiptir.

Daha sonra yapılacak moleküler testler için çeşitli rehberler ve nasıl yapılacağını tarifleyen güncel yayınlar mevcuttur<sup>(3,14,16,22-25)</sup>.

#### KAYNAKLAR

1. Kim L, and Tsao MS. Tumour tissue sampling for lung cancer management in the era of personalised therapy: What is good enough for molecular testing? *The European Respiratory Journal* 2014; 44: 1011-22.
2. Kerr KM, Loo PS and Nicolson MC. Pathology and personalized medicine in lung cancer. *Lung Cancer Management* 2013; 2: 35-46.
3. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2014; 25: 1681-90.
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2013; 137: 668-84.
5. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink KM 2004. *biology and genetics: Tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC Press 2004.
6. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink KM. *Pathology and genetics: Tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. In: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (eds). Lyon: IARC Press 2016.
7. Thunnissen E, Kerr, KM, Herth FJ, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012; 76: 1-18.
8. Beddy P, Genega EM, Ngo L, et al. Tumor Necrosis on Magnetic Resonance Imaging Correlates with Aggressive Histology and Disease Progression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer* 2014; 12: 55-62.
9. Egeland TAM, Gaustad, JV, Galappathi K, Rofstad EK. Magnetic resonance imaging of tumor necrosis. *Acta Oncologica* 2011; 50: 427-34.
10. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine* 2012; 366: 883-92.
11. Vignot S, Frampton GM, Soria JC, et al. Next-generation sequencing reveals high concordance of recurrent somatic alterations between primary tumor and metastases from patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2013; 31: 2167-72.
12. Diel M, Bubendorf L, Dingemans AMC, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016; 71: 177-84.
13. Lee HS, Lee GK, Lee, HS, et al. Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal staging of non-small cell lung cancer: how many aspirations per target lymph node station? *Chest*. 2008; 134: 368-74.
14. Shiau, CJ, Babwah, JP, Da Cunha Santos G, et al. Sample features associated with success rates in population-based EGFR mutation testing. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 947-56.
15. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2018; 142: 321-46.
16. Pirker R, Herth FJF, Kerr KM, et al. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1706-13.
17. Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran R, M, Gutman P. Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology* 1994; 3: 148-55.
18. Babic A, Loftin IR, Stanislaw M, et al. The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E, dual hapten, dual color in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization assays. *Methods* 2010; 52: 287-300.
19. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, et al. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 442-7.
20. Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, et al.  $\Delta Np63$  (p40) and thyroid transcription factor-1 immunoreactivity on small biopsies or

- cellblocks for typing non-small cell lung cancer: A novel two-hit, sparing-material approach. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 281-90.
21. Williams C, Pontén F, Moberg C, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *The American Journal of Pathology* 1999; 155: 1467-71.
  22. Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: A review with recommendations. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 2016; 469: 489-503.
  23. Hofman P, ALK in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathobiology, Epidemiology, Detection from Tumor Tissue and Algorithm Diagnosis in a Daily Practice. *Cancers* 2017; 9: 2018.
  24. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guide- line for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Patholo- gists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013; 8: 823-59.
  25. Tan DSW, Yom SS, Tsao MS, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Consensus Statement on Optimizing Management of EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Status in 2016. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 946-63.