



Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu Alt Tiplendirmesi; İkili Boyama Çare Değil!

Non-Small Cell Lung Carcinoma Subtyping; Double Staining is Not The Remedy!

Nazlı DEMİR GÖK¹ , Demir Kürşat YILDIZ² 

¹ Izmit SEKA Devlet Hastanesi, Patoloji Bölümü, KOCAELI

² Bahçelievler Memorial Hospital, Patoloji Bölümü, ISTANBUL

ÖZET

Amaç: Skuamöz ya da glandüler farklılaşma göstermeyen KHDAK biyopsilerinde ayırıcı tanı için günlük uygulamada kullandığımız IHC antikorların tekli ve ikili boyama yöntemleri ile elde edilen etkinlikleri karşılaştırılmış ve ikili antikor boyamasıyla daha az doku kullanarak gerekirse uygulanacak moleküler testler için doku tasarrufunu sağlamanın mümkün olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: KHDAK tanılı 40 az diferansiye olgu ve kontrol grubu olarak 8 iyi diferansiye olgu çalışma kapsamına alındı. Tüm az diferansiye olgular IHC olarak TTF-1, p63, CK7 ve CK5/6 antikorları ile tekli ve ikili boyama yöntemleriyle boyanarak değerlendirildi. İyi diferansiye olgular ise eş zamanlı olarak ikili boyama yöntemi ile boyandı.

Bulgular: Bu antikor paneli ile tekli boyama yöntemi ile olguların %87,5'inde, ikili boyama yöntemi ile olguların ancak %70'inde alt tiplendirme yapılabildi. Ayrıca tekli boyamalar temel alındığında ikili boyama yönteminde çekirdek antikorları (TTF-1, p63) ile yalancı negatiflik oranları, sitoplazmik antikorlar (CK7, CK5/6) ile yalancı pozitiflik oranları yüksek bulundu. İkili boyama ve tekli boyama yöntemleri sonucunda elde edilen tanımlar karşılaştırıldığında 14 olguda (%35) tanı değişikliği olduğu izlendi.

Sonuç: Çok sayıda antikor kullanımı, tümörlü doku miktarı, laboratuvar kaynaklarının yeterliliği ve moleküler çalışmalar için doku gereksinimine bağlı olarak pratik ve mümkün olmayabilir. İkili veya çoklu boyamalarla doku ve işlem tasarrufu yapılması bakımından bu çalışmada uygulanan yöntemle elde edilen sonuçlar yüz güldürücü değildir. Bizim değerlendirmemiz, tekli antikor işlemlerinde elde edilen sonuçlara göre karşılaştırması yapılmadan uygulamaya konulacak çoklu antikor kullanımının güvenilirliğinin tartışılmalı olacağını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Akciğer karsinomu, Küçük hücreli dışı, İkili boyama, İmmünohistokimya

ABSTRACT

Aim: We compared the efficiencies achieved with the single and double staining methods of IHC antibodies used in daily practice for differential diagnosis in NSCLC biopsies not displaying a squamous or glandular differentiation. Less tissue was used with double antibody staining and it was verified whether it was possible to achieve tissue saving for the molecular tests to be applied where necessary.

Materials and Methods: Forty less differentiated and 8 well differentiated NSCLC cases identified as the control group were included into the scope of the study. Less differentiated cases were evaluated with IHC via TTF-1, p63, CK7 and CK5/6 antibodies with the single and double staining methods.

Results: Only 87.5% and 70% of the cases could be subtyped with the single staining method and double staining method. The false-negativity rates resulted to be high with the double staining method with the nucleus antibodies (TTF-1, p63) and that the false-negativity rates resulted to be high with the cytoplasmic antibodies (CK7, CK5/6). A change in diagnosis was observed in 14 cases (35%) in the comparison of the diagnoses achieved as a result of double and single staining methods.

Conclusion: In terms of saving tissues and procedures in double or multiple staining procedures, the results obtained with the method utilized in this study are not satisfactory. Our evaluation demonstrates that the reliability of the use of multiple antibodies to be put into practice without making a comparison according to the results obtained from single antibody procedures will be debatable.

Key Words: Lung cancer, Non-small cell, Double staining, Immunohistochemistry

GİRİŞ

Akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi ile küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) için kesin alt tiplendirilmenin yapılması ihtiyacı doğmuştur. Geliştirilen yeni tedavilerin histolojik alt tipe bağlı olarak farklı tedavi edici veya olumsuz etkileri olduğu görülmüş ve böylece geçmiş yılların aksine, adenokarsinom (AK) ve yassı epitel hücreli karsinom (YEHK) arasındaki farklılaşma, tedavi edici ajana göre önem kazanmıştır.

Tanı sırasında olguların çoğunda tümörler ileri evrede olduklarından rezeksiyon oranları %10 ile %15 arasındadır. Dolayısıyla, nispeten az sayıda olguda tümörün tümü histopatolojik olarak incelenip, DSÖ sınıflandırılmasına göre değerlendirilebilir. Sonuç olarak hastaların çoğunda tedavi küçük bir tümör biyopsisi ya da bir sitoloji örneği üzerinde yapılan patolojik inceleme ve tanı temelinde planlanmaktadır (1).

Ayrıca az diferansiye YEHK ile az diferansiye AK'nin morfolojik ayrımı konusunda uzlaşa, deneyimli akciğer patolojileri arasında dahi zor olabilir (2). Tek başına, küçük biyopsiler ile morfolojik alt tiplendirme yapmanın doğruluğu ve güvenilirliği değerlendirildiğinde biyopsi ile sonraki rezeksiyon örnekleri arasındaki korelasyon düşüktür (3,4). Bu nedenle ışık mikroskopide morfolojik olarak skuamöz veya glandüler farklılaşma görülmeyen az diferansiye KHDAK olgularında alt tiplendirme için ek yöntemlere gereksinim vardır.

YEHK-AK ayrımı için literatürde birçok immünohistokimyasal (IHK) belirteç ve çeşitli antikorlardan oluşan paneller kullanılarak yapılan çalışmalar vardır (5,6,7,8,9,10,11). Buna ek olarak, ikili veya kokteyl IHK boyama teknikleri de son zamanlarda geliştirilmiş yeni IHK yöntemlerdir (12,13).

Ayrıca ileri evre akciğer kanseri hastalarında hedefe yönelik tedavilerin uygulanabilirliği açısından, moleküler testlere başvurulmaktadır. Bu nedenle küçük doku örnekleri sadece tanı için değil, aynı zamanda moleküler testler için de kullanılmaktadır. Bu, güncel tanı ve moleküler testler için doku, hücre ve sıvı örneklerinin alınması ve inceleme işlemleri için optimal doku yönetiminin yanısıra kurumsal disiplin ve koordinasyon gerekmektedir. (14).

Bu çalışmada, küçük doku örneklerinde az diferansiye KHDAK olgularında ayırıcı tanıya yardımcı olacak, günlük rutinde kullanılan IHK antikor panelinin etkinliğini literatürdeki çalışmalar ışığında değerlendirmek ve doku tüketimini azaltmak için uygulanan ikili antikor boyaması ile tekli boyama yöntemlerinin etkinliğini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada laboratuvar arşivimizdeki KHDAK tanılı akciğer transtorasik ve transbronşial biyopsi materyallerinin Hematoksilen-Eozin (HE) boyalı lamalarında yeterli tümör

dokusu içeren 40 az diferansiye olgu çalışma kapsamına alındı. Bu olgular IHK olarak TTF-1, p63, CK7 ve CK5/6 belirteçleri için tekli ve ikili boyama yöntemi ile boyanarak değerlendirildi. Kontrol grubu 4'ü YEHK ve 4'ü AK tanılı 8 iyi diferansiye olgudan oluşturuldu ve kontrol grubu ve çalışma grubundaki olgular eş zamanlı olarak ikili boyama yöntemi ile boyandı.

Tekli (Elde) IHK Boyama Yöntemi

Parafin bloklara gömülü biyopsi bloklarından poli-L-lizin kaplı lamlara 4µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitlere sodyum sitrat tampon çözeltisi ile antijen geri kazanım işlemi uygulandı ve labeled streptavidin-biotin peroksidaz tekniği ile IHK boyama uygulandı. Uygulamada; önce kesitlere protein blocking solution damlatıldı. Daha sonra kullanıma hazır primer antikorlarla uygun konsantrasyonlarda reaksiyona sokuldu. Primer antikorlar uygulanmış kesitler sırasıyla sekonder antikorlar; biotinlenmiş IgG, streptavidin peroksidaz solüsyonunda bekletilip daha sonra PBS ile yıkandı. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) ile inkübasyon yapıldı. Mayer hematoksilen ile zıt boyama sonrasında ışık mikroskopunda tümör hücrelerinin en az %5'inde, antijenin özelliğine göre çekirdek veya sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi.

İkili IHK Boyama Yöntemi

İkili (Double) IHK boyama; aynı lam üzerinde hem DAB kromojen, hem de AEC kromojen yardımı ile boyama yaparak, kahverengi (DAB) ve kırmızı (AEC) ayırımına dayalı immünohistokimya tekniğidir. İkili boyama yöntemi Leica Bond-Max cihazında yapıldı. Yöntemin çalıştığı rezeksiyon materyalleri üzerinde test edildi. Çalışma kapsamındaki az diferansiye olgular ile iyi diferansiye olgular eş zamanlı boyanarak ikinci kontrol sağlandı.

Leica Bond-Max cihazında yapılan Double Boyama Tekniği

Parafin bloklara gömülü biyopsi bloklarından poli-L-lizin kaplı lamlara 4µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Antijenin geri kazanımı için ER 2 (diğer adı ile EDTA buffer) ile yüksek pH'da (yaklaşık 8) uygulandı. İlk olarak, çekirdek antikorları (TTF-1 veya P63) 30 dakika uygulandı. Post primary ve polymer aşamalarından sonra AEC kromojeni ile 10 dakika ve 5 dakika olarak 2 kez inkübasyon yapıldı. İkinci olarak sitoplazmik antikorlar (CK7 veya CK5/6) 30 dakika uygulandı. Tekrar post primary ve polymer aşamalarından geçirildikten sonra DAB kromojeni ile 2 kez toplam 8 dakika inkübasyon yapıldı. Zıt boyama olarak hematoksilen uygulandı ve işlem sonlandırıldı.

Tekli Boyama İmmünreaktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

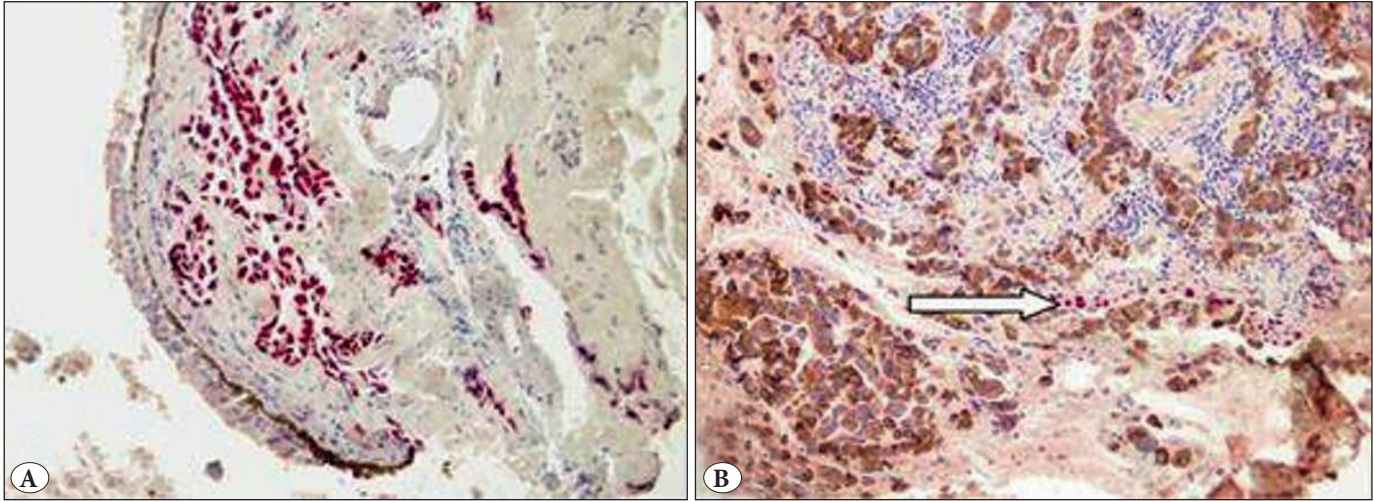
IHK boyanmanın değerlendirilmesi, iki başlı mikroskopta, iki farklı gözlemci tarafından eşzamanlı olarak değerlendirildi.

Her bir immün belirteç için pozitif iç kontrol olarak doku içindeki yüzey epitel hücreleri kullanıldı. TTF-1 ve P63 için nükleus reaksiyonu, CK7 ve CK5/6 için stoplazma reaksiyonları dikkate alındı.

İkili Boyama İmmünreaktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

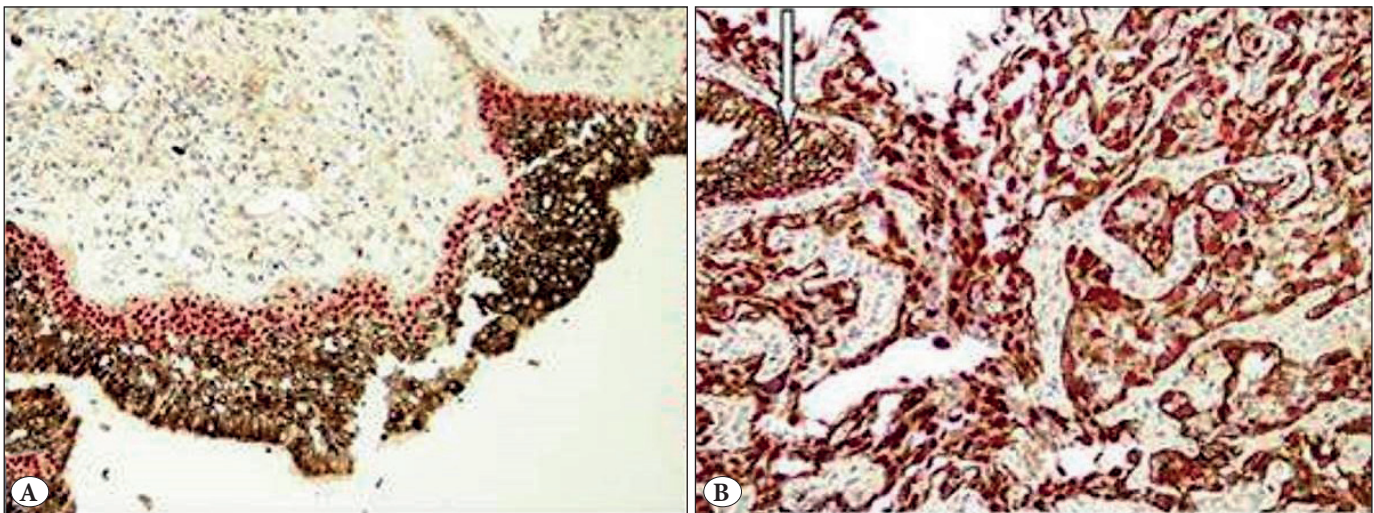
İkili IHK boyanmanın değerlendirilmesi, iki başlı mikroskopta, iki farklı gözlemci tarafından aynı anda değerlendirildi.

Her bir immün belirteç için pozitif iç kontrol olarak doku içindeki yüzey epitel hücreleri ve kontrol grubu olarak seçilen eş zamanlı boyanan olgular kullanıldı. TTF-1 ve p63 için nükleus reaksiyonu, CK7 ve CK5/6 için stoplazmik reaksiyon dikkate alındı. İkili boyamanın değerlendirilmeleri, olguların tekli boyama sonuçları bilinmeden kaydedildi. Antikor çiftleri olarak bir AK ve bir YEHK belirteci kombine edildi. Kesitlerden birine TTF1-CK5/6 uygulanırken, diğer kesite p63-CK7 uygulandı. (Şekil 1A,B, Şekil 2A,B)



Şekil 1: Olgu 1: TTF1-CK5/6 (x200): Normal bronş mukozasında CK5/6 pozitifliği ve mukozanın altında tümör hücrelerinde TTF1 pozitifliği izlenmektedir (A). P63-CK7 (x200): Tümörde yaygın olarak CK7 pozitifliği ve okla işaretli alanda normal mukozanın hücrelerinde p63 pozitifliği izlenmektedir (B).

*Olgu 1 kontrol grubundan seçilmiştir. Tekli ve ikili boyama sonuçları ile TTF1 ve CK7 pozitifliği göstermiş ve her iki boyama sonucuna göre AC tanısı almıştır.



Şekil 2: Olgu 2: P63-CK7 (x200): Normal bronş mukozasındaki p63 ve CK7 antikorlarının iç kontrol olarak değerlendirilen pozitif reaksiyonu izlenmektedir (A). P63-CK7 (x200): Sol üst köşede (ok) normal bronş mukozasında ve tümörde genel olarak her iki antikorun pozitifliği izlenmektedir (B).

*Olgu 2 tekli boyama sonuçları ile tüm antikorlar pozitif boyanmış ve NSCLC-NOS olarak tanı verilmiştir. İkili boyama sonuçları ile TTF-1 negatif, CK7 pozitif, p63 pozitif ve CK5/6 pozitif reaksiyon saptanmış ve olgu ikili boyama sonuçlarına göre SCC tanısı almıştır.

SONUÇLAR

Çalışmaya dahil edilen az diferansiye KHDAK tanısı almış biyopsi materyallerinin 24'ü bronkoskopik biyopsi iken 16'sı transtorasik biyopsi idi. Histopatolojik tanıları tekli boyama sonuçları esas alınarak verilmiş olup; buna göre 18 olgu AK ve 17 olgu YEHK tanılıdır. 5 olguda ise tekli boyama sonuçları ile alt tiplendirme yapılamamış, KHDAK-NOS tanısı verilmiştir. Tekli boyama ile alt tiplendirme oranı % 87,5'tir.

İkili boyama sonuçlarına göre ise 19 olgu AK, 9 olgu YEHK olarak tiplendirilmiş, geri kalan 12 olgu KHDAK-NOS tanısı almıştır. İkili boyama ile alt tiplendirme oranı %70'dir.

Kontrol grubu; 4 iyi diferansiye AK ve 4 iyi diferansiye YEHK olmak üzere toplam 8 olgudan oluşmaktaydı. İkili boyamalarda kontrol grubunda tanı değişikliğine neden olacak antikör reaksiyonunu izlenmedi.

Tekli ve İkili Boyamanın Antikora Göre İrdelenmesi

TTF-1: Tekli boyama ile AK tanılı 18 olgunun 13'ünde pozitif, 5'inde negatif reaksiyon, YEHK tanılı 17 olgunun 4'ünde pozitif, 13'ünde negatif reaksiyon izlendi. Tekli boyama ile (tüm panel sonucunda NOS tanısı almış olgular dahil) negatif reaksiyon gösteren 21 olgunun tamamı ikili boyamada da negatif. Ancak tekli boyama ile TTF-1 için pozitif reaksiyon veren 19 olgunun sadece 4'ünde ikili boyama ile pozitif reaksiyon izlendi. Sonuç olarak tekli boyama sonuçları temel alındığında; TTF-1 ikili boyama yapıldığında yalancı pozitiflik izlenmedi. 15 olguda (%41,7) yalancı negatif reaksiyon verdi. Tüm panel birlikte değerlendirildiğinde; 9 olguda tanı değişikliğine neden olmaktadır.

CK7: Tekli boyama ile AK tanılı 18 olgunun 16'sında pozitif, 2'sinde negatif reaksiyon izlendi. YEHK tanılı 17 olgunun 5'inde pozitif, 12'sinde negatif reaksiyon izlendi. Tekli boyama ile (tüm panel sonucunda NOS tanısı almış olgular dahil) CK7 için pozitif boyanan 24 olgunun 23'ünde ikili boyama ile pozitiflik izlendi. Tekli boyama ile negatif reaksiyon gösteren 16 olgunun 11'i ikili boyamada da negatif iken 5 olgu pozitif reaksiyon verdi. Sonuç olarak tekli boyama sonuçları temel

alındığında; CK7 ikili boyama yapıldığında 5 olguda (% 17,8) yalancı pozitif, 1 olguda (% 8,3) yalancı negatif reaksiyon verdi. Tüm panel birlikte değerlendirildiğinde; ikili boyama 6 olguda tanı değişikliğine neden olmaktadır.

p63: YEHK tanılı 17 olgunun 15'inde pozitif, 2'sinde negatif, AK tanılı 18 olgunun 3'ünde pozitif, 15'inde negatif reaksiyon izlendi. Tekli boyama ile (tüm panel sonucunda NOS tanısı almış olgular dahil) pozitif boyanan 21 olgunun sadece 8'inde ikili boyama ile pozitif reaksiyon izlenirken 13 olgu negatif. Tekli boyama ile negatif boyanan 19 olgunun tamamı ikili boyamada da negatif. Sonuç olarak tekli boyama sonuçları temel alındığında; P63 ikili boyama yapıldığında yalancı pozitif reaksiyon saptanmadı. 13 olguda (% 40,6) yalancı negatif reaksiyon verdi. Tüm panel birlikte değerlendirildiğinde; 8 olguda tanı değişikliğine neden olmaktadır.

CK5/6: YEHK tanılı 17 olgunun 9'unda pozitif, 8'inde negatif reaksiyon verdi. AK tanılı 18 olgunun 1'inde pozitif, 17'sinde negatif reaksiyon izlendi. Tekli boyama ile (tüm panel sonucunda NOS tanısı almış olgular dahil) pozitif boyanan 12 olgunun 10'unda ikili boyama ile pozitiflik izlendi. Tekli boyama ile negatif reaksiyon gösteren 28 olgunun 24'ü negatif iken 4 olgu pozitif boyandı. Sonuç olarak tekli boyama sonuçları temel alındığında; CK5/6 ikili boyama yapıldığında 4 olguda (% 28,6) yalancı pozitif, 2 olguda (% 7,7) yalancı negatif reaksiyon verdi. Tüm panel birlikte değerlendirildiğinde 3 olguda tanı değişikliğine neden olmaktadır.

Özetle; Tekli boyama sonuçları temel alındığında ikili boyama tekniğinde nükleus boyaları (TTF-1 ve p63) ile yalancı pozitif reaksiyon izlenmedi. Ancak TTF-1 % 41,7 ve p63 % 40,6 yalancı negatif reaksiyon verdi. Sitoplazmik boyalardan CK7 ile % 17,8 yalancı pozitif ve % 8,3 yalancı negatif reaksiyon izlenirken CK5/6 ile % 28,6 yalancı pozitif ve %7,7 yalancı negatif reaksiyon izlendi. Alt tiplendirme oranı tekli boyama ile % 87,5 iken ikili boyama ile ancak % 70'dir. Çekirdek boyalarının ikili boyamadaki düşük boyanma oranları nedeniyle 40 olgunun 14'ünde ikili boyama sonuçlarında tanı değişikliği gerçekleşti (Tablo I-II).

Tablo I: Tekli boyama sonuçlarına göre antikör pozitiflikleri ve elde edilen tanıları.

Tekli boyama sonrası elde edilen tanıları (olgu sayısı)	TTF-1 (olgu sayısı)	CK7 (olgu sayısı)	P63 (olgu sayısı)	CK5/6 (olgu sayısı)
AK (18)	%72,2 (13)	%88,8 (16)	%16,6 (3)	% 5,5 (1)
YEHK (17)	%23,5 (4)	%29,4 (5)	%88,2 (15)	%52,9 (9)
KHDK-NOS (5)	%40,0 (2)	%60,0 (3)	%60,0 (3)	%40,0 (2)

Tablo II: Tekli ve ikili boyama sonuçları (olgu sayıları antikör pozitiflikleri ve tanı değişikliklerine göre saptanmıştır).

	Tekli boyama sonrası elde edilen tanıları	İkili boyama sonrası elde edilen tanıları
AK	18 (% 45)	19 (% 47,5)
YEHK	17 (% 42,5)	9 (% 22,5)
KHDAK-NOS	5 (% 12,5)	12 (% 30)

Kontrol grubunda ise tekli ve ikili boyamada tanı değişikliğine neden olacak antikör reaksiyonu izlenmedi. AK tanılı olgularda TTF1-CK7 pozitifliği ve YEHK tanılı olgularda P63-CK5/6 pozitifliği izlendi (Şekil 1A,B).

TARTIŞMA

Tarihsel olarak, küçük biyopsi ve sitoloji materyallerinde patoloğlar için en önemli karar, KHAK ve KHDAK arasındaki ayrım olmuştur. Ancak günümüzde hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi ile KHDAK'nin kesin alt tiplendirmesinin yapılması ihtiyacı doğmuştur.

KHDAK alt tiplendirmesi HE boyamasında görülen morfoloji temeline dayanmaktadır ve küçük biyopsi örneklerinde %30-50 oranında KHDAK-NOS tanısı verilmektedir (15). İHK profili tanı kriterleri arasında yer almamaktadır. Ancak morfolojik kanıt yokluğunda antikör profilleri belirli bir histolojik alt tip için destekleyici bulgu olarak kullanılabilir. Yine de bütün çabalara rağmen alt tiplendirme yapılamayan belli bir sayıda olgu KHDK - NOS olarak rapor edilmektedir.

Literatürde alt tiplendirmeye yönelik yapılan yayınlarda çoklu antikör panellerinin kullanıldığı ve en küçük üçlü-dörtlü antikör paneli ile %65-%77 oranında subtiplendirme yapılabildiği belirtilmektedir. Çalışmalarda çok çeşitli antikör panelleri kullanılmış olmakla beraber doku tasarrufu ve yeterliliği gözetildiğinde en küçük uygulanabilir antikör paneli genellikle iki AK belirteci (en sık TTF1, NapsinA veya CK7) ve iki YEHK belirteci (en sık p63, CK5/6) olarak belirlenmiştir. (1,5,6,8,9-11,15-18)

Yine tüm olgularda pozitif olmamasına rağmen müsün boyanması akciğer AK'nun belirleyici özelliklerinden biridir. Bu nedenle literatürde müsün boyalarını (PAS-AB veya D-PAS) panele ekleyen çalışmalar da mevcuttur. (1,9,16,17)

Ancak yukarıdaki çalışmaların çoğunda morfolojik olarak diferansiyasyon gösteren olgular incelenmiştir. Literatürde çok az sayıda çalışma az diferansiye olguları incelemiştir. Üstelik birçoğunda İHK paneller rezeksiyon materyalleri üzerinde uygulanmıştır. Tümör farklılaşması azaldıkça antikörlerin duyarlılıklarında azalma olduğu gerçeği (6) düşünüldüğünde tümör dokusu küçük ve az diferansiye biyopsiler için en uygun antikör panelinin hangisi olabileceği konusunda literatür yetersiz kalmaktadır.

Bölümümüzde TTF-1, CK7, P63 ve CK5/6'dan oluşan dörtlü panel uygulanmaktadır. Malign olarak tanı koyduğumuz 550 transtorasik ve transbronşial akciğer biyopsilerininin 405 tanesi KHDAK'dır. 108 olgu KHAK olup geri kalan 37 olgu yalnızca "malign" veya "karsinom" tanısı alanlar, metastatik tümörler ve mezenkimal tümörlerden oluşmaktadır. Morfolojik ölçütlerle tanı konulan AK ve YEHK olgularında daha seyrek olarak doğrulama amacıyla İHK incelemeye başvurulmuştur. Küçük hücreli dışı karsinom morfolojisine sahip olup morfolojik zeminde alt tiplerine ayrılamayan 256 olguda bu antikör paneli ile yapılan İHK inceleme sonucunda 130'u AK,

101'i YEHK olarak tiplendirilmiştir (%90,23). 25 olguda ise (%9,77) İHK incelemeye rağmen alt tiplendirme yapılamamış ve KHDAK-NOS olarak rapor edilmiştir.

Küçük biyopsi ve sitoloji örneklerinde daha kesin bir sınıflandırmanın ele alınmasındaki temel sorun KHDAK doğasında bulunan histolojik heterojenite varlığıdır (1). Roggli ve ark. (19) 100 akciğer kanseri olgusunu kapsayan çalışmalarında 39 AK olgusunun 2'sinde (%5) skuamöz komponent ve 27 YEHK olgusunun 4'ünde (%15) adenokarsinom komponenti saptamıştır. Başka bir sorun ise solid patern gösteren tümörlerde küçük biyopsi veya sitoloji örneklerinde skuamöz veya adenokarsinom yönünde farklılaşma fokal veya ayırt edilemez olabilmesidir. Bu da cerrahi materyal ile küçük biyopsideki histolojik sınıflandırmayı karşılaştırılıp hata oranı gösteren sayısız makalenin konusu olmuştur (3). Böyle bir çalışmada, bronşiyal biyopsilerde yassı epitel hücreli karsinomun % 10, adenokarsinomların % 14 ve büyük hücreli karsinomun % 50 oranında yanlış sınıflandırıldığı görülmüştür (3).

Travis küçük biyopsi örneklerinde AK'larda %20-30 oranında p63 pozitifliği görülebildiğini ancak p40 ile hemen hemen hiç pozitiflik bulunmadığını belirtmektedir.

Küçük biyopsi örneklerinde nadiren AK ve YEHK'nin her ikisinin hem morfolojik hem de İHK özellikleri birlikte görülebilir. Bu olgular eş zamanlı olarak glandüler ve skuamöz farklılaşma düşündürülen ışık mikroskopi ve İHK bulguları olduğunu bildiren bir yorum ile birlikte KHDAK-NOS olarak raporlanmalıdır. Ancak skuamöz diferansiyasyon göstermeyen aynı tümör hücre grubu AK belirteçleri ile pozitif ise YEHK belirteçlerinin ekspresyon durumu önemsenmeden KHAK-AK lehine olarak değerlendirilebileceğini bildirmektedir. Çünkü p63 AK'ların 1/3'ünde eksprese olabilir ve bu tümörler skuamöz hücre morfolojisi içermez. Neredeyse tüm TTF-1 ve p63 koekspresyonu gösteren olguların AK olduğu ve bu durumun ALK pozitif AK'larda sık olduğu belirtilmiştir. Travis ve ark. göre eğer tümör hücrelerinin bir popülasyonu AK belirteçleri ile pozitif ve başka bir popülasyonu YEHK belirteçleri ile pozitif reaksiyon gösteriyor ise olgu adenoskuamöz karsinom olabileceği için kesin alt tiplendirme için rezeksiyon materyali incelenmelidir (15).

Bununla birlikte, immünohistokimyasal olarak kullanılan antikörlerin hiçbirini bu ayrımı yapmak için % 100 sensitif ve spesifik değildir. Örneğin doku microarray kullanılarak yapılan bir çalışmada AK'lerin %30'unda p63 pozitifliği izlenmiştir (20). YEHK'lerde ise %5-21 oranında TTF-1 pozitifliği bildirilmiştir (1). Bu çalışmalara göre sonuçlar tek tek belirteçlerle sınırlamalara rağmen, yüksek doğruluk oranları için bir panel yaklaşımı kullanmak gerektiği yönündedir. Ancak doku tasarrufu açısından en uygun kombinasyonu uygulamak önemlidir. Çok sayıda antikör kullanımı, tümürlü doku miktarı, laboratuvar kaynaklarının yeterliliği ve moleküler çalışmalar için doku gereksinimine bağlı olarak pratik ve mümkün olmayabilir.

Ayrıca mikro-RNA gibi diğer moleküler teknikler ile YEHK ve AK ayrımı yapılabilmektedir (21). Sonuçta, basit İHK paneli kullanılarak, moleküler çalışmalar için gerekli olabilecek doku tüketilmeden kullanılmalıdır. Bu yeni teknikler morfolojik olarak sınıflandırılmayan KHDAK'da daha kesin bir sınıflandırma yapılabilmesi için yardımcı olacaktır.

Küçük biyopsi örneklerinde tanı sonrası moleküler çalışmalara doku sağlamak amacıyla son zamanlarda daha az sayıda kesit kullanılarak ikili veya kokteyl İHK boyama teknikleri de geliştirilmiştir. Ancak literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır (12,13).

Ağaçkiran ve ark. desmoglein-3 ve napsin-A antikorları ile ikili boyama yöntemini uyguladıkları çalışmalarında yüksek özgüllük ve duyarlılık ile YEHK ve AK ayrımı yapılabildiğini belirtmişler. Rezeksiyon materyalleri üzerine uyguladıkları bu yöntemle YEHK veya AK olduğu bilinen toplam 99 olgunun 88'inde (%88,8) ayrım yapabilmişler (12).

Yanagita ve ark. çalışmalarında TTF-1, Napsin-A, p63 ve CK14 antikorları ile kokteyl oluşturmuş ve tek kesit üzerine dördü antikor uygulamışlardır. Bu çalışmada da histomorfolojik olarak iyi diferansiye olgular kullanılmıştır (13).

Literatürde KHDAK ayırıcı tanısında çok farklı paneller kullanılması en önemli nedeni kullanılan antikorların standart olmayışı ve her laboratuvarın kendi kullandığı antikorlar konusunda farklı güvenilirlik deneyimine sahip olmasıdır. Laboratuvarımızda kullandığımız dördü panel literatürle karşılaştırıldığında yeterli ayırt ediciliğe sahip görünmektedir.

İkili veya çoklu boyamalarla doku ve işlem tasarrufu yapılması bakımından bu çalışmada uygulanan yöntemle elde edilen sonuçlar yüz güldürücü değildir. Uygulamada maliyeti etkileyen birkaç unsur bulunmaktadır: Doku tasarrufu, antikor ve işlem (malzeme, insan gücü, zaman) maliyeti. Bu konuda yazılı kaynak araştırmalar yetersizdir. Ancak kullanıma hazır ikili veya çoklu antikorların daha yüksek antikor maliyetine sahip olduğu bilinmektedir.

Bizim değerlendirmemiz, tekli antikor işlemlerinde elde edilen sonuçlara göre karşılaştırması yapılmadan uygulamaya konulacak çoklu antikor kullanımının güvenilirliğinin tartışmalı olacağını göstermektedir. Antikor maliyetinin göreceli olarak daha fazla olması bir kenara bırakılsa bile elde edilen reaksiyonların tümör antijenitesini doğru yansıtmaması tedavi konusunda yanlış yönlendirmelere neden olacaktır.

Doku tasarrufu için biyopsinin optimal koşullarda tespit ve takibinin yapılması, parafine gömülürken ve kesit alınırken doku kaybının gözetilmesi, belki de çok daha anlamlı görünmektedir.

Akciğer kanserlerinin tanısında morfolojinin temel alınması, küçük hücreli ve küçük hücreli dışı ayrımının doğru yapılmasına özen gösterilerek, gerektiğinde İHK incelemeye baş-

vurulması önemlidir. Skuamöz veya glandüler farklılaşmanın sağlam kanıtlarının öncelikle aranması, az diferansiye KHDAK olgularında parafin blokların fazla tıraşlanmamasına özen gösterilerek İHK incelemeler için kesit alınması gerekmektedir. Bununla birlikte literatürde AK veya YEHK lehine tipik morfoloji varlığında İHK uygulamasına gerek olmadığı ancak tipik morfolojinin izlenmediği durumlarda ikili antikor paneli (1 AK ve 1 YEHK belirteci) kullanılmasının moleküler testler için doku korunması açısından önemli olduğu ve immünoaktivitenin açıkça AK veya YEHK lehine olmadığı durumlarda KHDAK-NOS tanımının kullanılması uygun olduğu bildirilmektedir (22).

Çoklu antikor uygulamaları söz konusu olduğunda özellikle nükleus reaksiyonu beklenen antikorların tek kullanıldıklarında elde edilen sonuçlarla karşılaştırmalı bir ön değerlendirme olmaksızın günlük uygulamaya sokulması sakıncalı görünmektedir.

Kullanıma hazır "kokteyl" antikorlar akciğer rezeksiyon materyallerinden elde edilen indeks olgularda zaman zaman gözden geçirilmesinde yarar vardır.

Maliyet ve doku tasarrufu bakımından değerlendirildiğinde ikili boyamalarda elde edilen doku tasarrufu ile ikili boyama işleminde elde edilen sonuçların güvenilirliği karşılaştırıldığında, KHDAK alt tip tayininde yanlış sonuçlara yol açacağından uyguladığımız ikili boyama yönteminin yararlı olmayacağı görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010;5:442-7.
2. Grilley-Olson JE, Hayes DN, Moore DT, Leslie KO, Wilkerson MD, Qaqish BF, Hayward MC, Cabanski CR, Yin X, Socinski MA, Stinchcombe TE, Thorne LB, Allen TC, Banks PM, Beasley MB, Borczuk AC, Cagle PT, Christensen R, Colby TV, Deblis GG, et al. Validation of interobserver agreement in lung cancer assessment: Hematoxylin-eosin diagnostic reproducibility for non-small cell lung cancer: The 2004 World Health Organization classification and therapeutically relevant subsets. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:32-40.
3. Cataluna JJ, Perpina M, Greses JV, Calvo V, Padilla JV, Paris F. Cell type accuracy of bronchial biopsy specimens in primary lung cancer. *Chest.* 1996;109:1199-203.
4. Edwards SL, Roberts C, McKean ME, Cockburn JS, Jeffrey RR, Kerr KM. Preoperative histological classification of primary lung cancer: Accuracy of diagnosis and use of the non-small cell category. *J Clin Pathol.* 2000;53:537-40.
5. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol.* 2011;35:15-25.

6. Tsuta K, Tanabe Y, Yoshida A, Takahashi F, Maeshima AM, Asamura H, Tsuda H. Utility of 10 immunohistochemical markers including novel markers (desmocolin-3, glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1190-9.
7. Ring BZ, Seitz RS, Beck RA, Shasteen WJ, Soltermann A, Arbogast S, Robert F, Schreeder MT, Ross DT. A novel five-antibody immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Mod Pathol.* 2009;22:1032-43.
8. Camilo R, Capelozzi VL, Siqueira SA, Del Carlo Bernardi F. Expression of p63, keratin 5/6, keratin7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2006;37:542-6.
9. Terry J, Leung S, Laskin J, Leslie KO, Gown AM, Ionescu DN. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1805-11.
10. Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, Jagirdar J. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:155-62.
11. Kargi A, Gurel D, Tuna B. The diagnostic value of TTF-1, CK 5/6, and p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15:415-20.
12. Agackiran Y, Ozcan A, Akyurek N, Memis L, Findik G, Kaya S. Desmoglein-3 and Napsin A double stain, a useful immunohistochemical marker for differentiation of lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma from other subtypes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20:350-5.
13. Yanagita E, Imagawa N, Ohbayashi C, Itoh T. Rapid multiplex immunohistochemistry using the 4-antibody cocktail YANA-4 in differentiating primary adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of the lung. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011;19:509-13.
14. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Powell CA, Beer D, Riely G, Garg K, Austin JH, Rusch VW, Hirsch FR, Jett J, Yang PC, Gould M; American Thoracic Society. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: International multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: Executive summary. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8:381-5.
15. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. 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. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:668-84.
16. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A, Popat S. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol.* 2010;5:436-41.
17. Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2001;116:823-30.
18. Monica V, Ceppi P, Righi L, Tavaglione V, Volante M, Pelosi G, Scagliotti GV, Papotti M. Desmocolin-3: A new marker of squamous differentiation in undifferentiated large-cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2009;22:709-17.
19. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, Garg K, Hirsch FR, Noguchi M, Powell CA, Rusch VW, Scagliotti G, Yatabe Y. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: A paradigm shift. *J Thorac Oncol.* 2010;5:411-4.
20. Au NH, Gown AM, Cheang M, Huntsman D, Yorida E, Elliott WM, Flint J, English J, Gilks CB, Grimes HL. P63 expression in lung carcinoma: A tissue microarray study of 408 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2004;12:240-7.
21. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, Gefen N, Izraeli S, Rechavi G, Pass H, Nonaka D, Li J, Spector Y, Rosenfeld N, Chajut A, Cohen D, Aharonov R, Mansukhani M. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:2030-7.
22. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I; WHO Panel. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243-60.