

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

**İNTRAHEPATİK KOLANJİOKARSİNOMLARDA
DAMAR İNVAZYONUNUN H-CALDESMON VE
SİTOKERATİN 19 İKİLİ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FAHİRE GÖKNUR AKARCA**

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ ÖZGÜR EKİNCİ**

**ANKARA
NİSAN 2018**

TEŞEKKÜR

Patoloji uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başta tez hocam *Dr. Öğretim Üyesi Özgür EKİNCİ* olmak üzere, sayın hocalarım *Prof.Dr. Leyla MEMİŞ, Prof.Dr. Ayşe DURSUN, Prof.Dr. Gülen AKYOL, Prof.Dr. Aylar POYRAZ, Prof.Dr. Nalan AKYÜREK, Prof.Dr. Özlem ERDEM, Doç.Dr. İpek IŞIK GÖNÜL, Doç.Dr. Güldal ESENDAĞLI, Doç.Dr. Pınar UYAR GÖÇÜN'e*, ve eğitimimin bir kısmında kendisiyle tanışma fırsatı bulduğum ve bundan onur duyduğum sayın *Prof.Dr. Ömer ULUOĞLU'ya*, tıp bilimleri arasında çok özel bir alan olan bu bilim dalını benimle birlikte tercih etmiş, bu yola gönül vermiş, bu yoldaki gördüğüm ve görme ihtimalimin olduğu tüm zorluklarda gerek fiziksel, gerekse manevi olarak daima yanımda olan, uzman olmuş, olmayı bekleyen ve daha yolun başında olan tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, bizlere her konuda ellerinden gelen yardımı yapan tüm laboratuvar personeline, hayat serüvenindeki tüm tecrübeleri ve bilgeliğiyle bana ışık tutan sevgili teknisyenimiz Abdülbaki Akgül'e, arkadaşlığa verdiği önem kadar işine duyduğu saygı ile de hepimize nasıl çalışılması gerektiğini öğreten sevgili sekreterimiz Seval Halledici'ye, tezimin bitmesine tavsiyeleri ve telkinleri ile çok büyük katkıları olan sevgili arkadaşlarım *Dr. Zeliha Cengiz* ve *Dr. Ayşenur Merve Sönmez'e* ve her zorlu dönemde olduğu gibi bu dönemde de tüm sabır ve şefkatleri ile yanımda olan canım aileme, en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
TABLolar	iv
RESİMLER	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İntrahepatik kolanjiokarsinom (İKK)	2
2.2. H-Caldesmon (h-CD)	9
2.3. Sitokeratin 19 (CK19)	10
2.4. Karaciğerin damar ağı	10
2.4.1. Portal venler	11
2.4.2. Hepatik venler	11
2.4.3. Hepatik arterler	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Hastaların Seçimi	13
3.2. İncelenen Parametreler	18
3.3. İmmünohistokimyasal Yöntem	24

3.4. İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Değerlendirilmesi	26
3.5. İstatistiksel Analiz	27
3.6. Etik Kurul Onayı	27
4. BULGULAR	27
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri ve Tümörlerin Özellikleri	27
4.2. Seçilen Olası Vasküler İnvazyon Odaklarının Özellikleri	31
4.3. h-CD ile Normal Karaciğer Alanlarındaki Vasküler Elemanların ve Safra Duktuslarının Boyanmasının İncelenmesi	40
4.4. İkili İHK Uygulaması Sonrası Vasküler İnvazyon Değerlendirmesi ve Evrelerde İzlenen Değişiklikler	46
4.4. İkili İHK Uygulaması Sonrası Vasküler İnvazyon Saptanan Odak Tipleri	48
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR	65
7. KAYNAKLAR.....	67
8. ÖZET.....	78
9. SUMMARY.....	81

TABLÖLAR

Tablo 1: İKK'lerde AJCC/UICC 8. baskıya göre TNM sınıflaması	7
Tablo 2: İKK'lerde AJCC/UICC 8. baskıya göre prognostik evreleme.....	8
Tablo 3: Hastaların demografik özellikleri ve tümörlerin özellikleri.....	28
Tablo 4: Odak tiplerinin dağılımı	31
Tablo 5: Odakların parsiyel hepatektomi materyallerindeki yerleşimi	39
Tablo 6: Normal karaciğer dokularında izlenen vasküler elemanlar ile safra duktuslarının sayısı ve h-CD ile boyanma durumlarına göre çapları	40
Tablo 7: İkili İHK uygulaması sonrası vaka bazında vasküler invazyon durumlarında ilk raporlamaya göre görülen değişiklikler	49
Tablo 8: İkili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyonun görüldüğü odak tiplerinin sayı ve oranlarında ilk raporlamaya göre görülen değişiklikler	49

RESİMLER

Resim 1: Biliyer ağaçtaki anatomik lokalizasyonlarına göre KK sınıflandırması .	3
Resim 2: İKK'nin makroskopik tipleri	5
Resim 3: Karaciğerin arteriyel ve venöz damar yapısı ve safra kanalları.....	12
Resim 4: Tip 1, H&E x200	14
Resim 5: Tip 1, H&E x100	15
Resim 6: Tip 2, H&E x200	16
Resim 7: Tip 2, H&E x100	17
Resim 8: Tip 3, H&E x200	20
Resim 9: Tip 3, H&E x100	21
Resim 10: Tip 3, H&E x100	22
Resim 11: a) Tip1, H&E x200, b) Tip 1, h-CD-CK19 x200	32
Resim 12: a) Tip1, H&E x100, b) Tip 1, h-CD-CK19 x100	33
Resim 13: a) Tip2, H&E x200, b) Tip 1, h-CD-CK19 x200	34
Resim 14: a) Tip2, H&E x100, b) Tip2, h-CD-CK19 x100	35
Resim 15: a) Tip3, H&E x200, b) Tip 3, h-CD-CK19 x200	36
Resim 16 : a) Tip3, H&E x100, b) Tip 3, h-CD-CK19 x100	37
Resim 17: a) Tip3, H&E x100, b) Tip 3, h-CD-CK19 x100	38
Resim 18: Bir portal alandaki h-CD boyanma paterni, h-CD x200	41

Resim 19: Hepatik venlerde izlenen h-CD boyanma örnekleri.	44
Resim 20: Hepatik venlerde izlenen h-CD boyanma örnekleri.	45

KISALTMALAR

TNM:	Tümör- lenf bezi- metastaz
CAP:	College of American Pathologists
AJCC/UICC:	American Joint Committee on Cancer / The Union for International Cancer Control
H&E:	Hematoksilen-Eozin
DAB:	3,3'-diaminobenzidin
İHK:	İmmünohistokimya
KK:	Kolanjiokarsinom
İKK:	İntrahepatik kolanjiokarsinom
HSK:	Hepatoselüler karsinom
CK:	Sitokeratin
CD:	Caldesmon
h-CD:	Yüksek molekül ağırlıklı Caldesmon
CK19:	Sitokeratin 19
KT:	Kemoterapi
RT:	Radyoterapi



1. GİRİŞ

Malign tümörlerde damar invazyonu varlığı, prognostik öneminin olması yanısıra adjuvan kemoterapi (KT) ve/veya radyoterapi (RT) kararını yönlendirmesi açısından da oldukça önemlidir¹. Rutin hematoksilen-eozin (H&E) uygulanan kesitlerde tümörle infiltre olan damarın tespiti oldukça zor olabilmektedir. Tanıyı kolaylaştırmaya ve doğruluğu artırmaya yönelik, endotel için immünohistokimyasal ve venöz/lenfatik damar duvarı için histokimyasal (elastin) yöntemler geliştirilmiştir². Damar invazyonu ile ilgili çalışmalarda incelenen sorun ‘damar invazyonunun histopatolojik değerlendirilmesi’ ile ilgilidir. Çünkü tanım olarak tümörün endotel ile dōşeli bir kanalda bulunması gerekmektedir. Fakat tümöre baēlı desmoplazi, fiksasyon artefaktı gibi faktörler yüzünden endotel ile dōşeli kanal yapısının görölmesi ve damar invazyon tanısı oldukça zor olabilmektedir. Ayrıca küçük damar invazyonlarında lenfatik veya postkapiller venül ayırımı konusunda gözlemciler arası farklılıklar olabilmektedir. Büyük damar invazyonlarında da (müsküler ven gibi) tümöral infiltrasyon yüzünden vasküler yapıyı göstermek oldukça zordur².

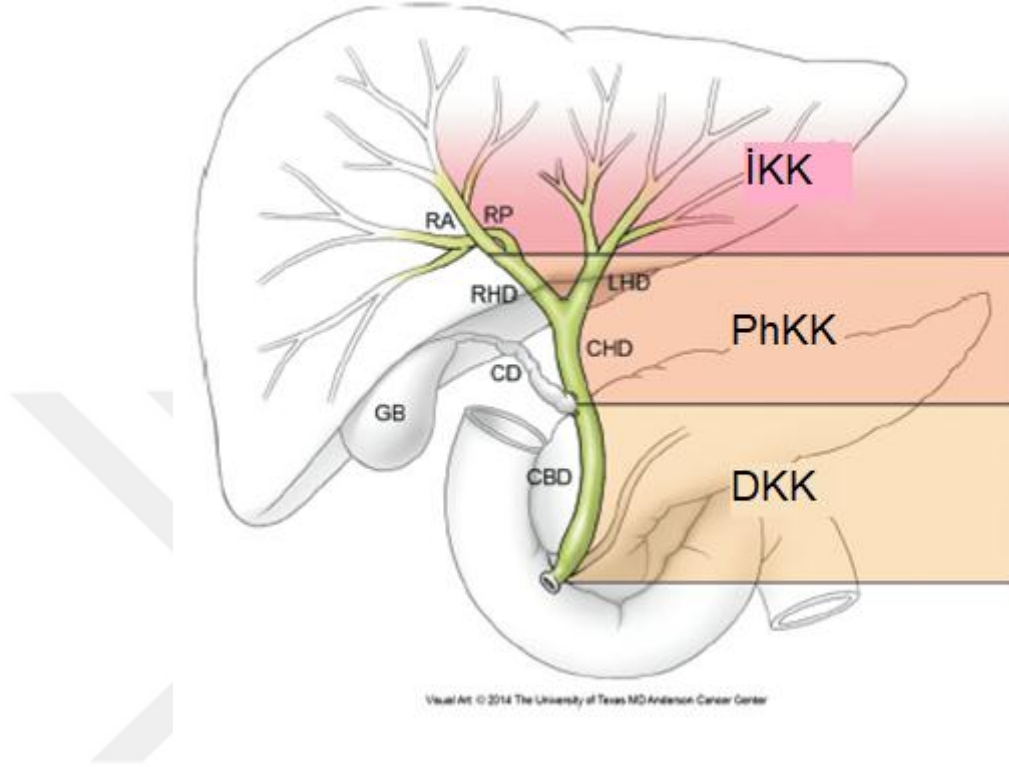
Bu çalışmada intrahepatik kolanjiokarsinomlarda (İKK) prognoz ve evreleme açısından büyük önem arz eden damar invazyonunun H-Caldesmon (h-CD) ve Sitokeratin 19 (CK19) ikili immünohistokimyası (İHK) ile daha kolay fark edilmesi amaçlanmış olup, bu yöntemin kullanışlı bulunması sonucunda rutin pratiēe dâhil olması öngörölmüştür. Damar invazyonu değerlendirilirken endotel belirteçleri yerine düz kas belirteçlerinin kullanılmasının tanıyı kolaylaştıracağı ve tanı doğruluğunu arttıracacağı düşünölmektedir³.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *İntrahepatik kolanjiokarsinom (İKK)*

Tüm dünyada, primer karaciğer kanseri tüm malign tümörler arasında 5. en sık görülen tümördür ve her yıl yaklaşık 600.000 ölüme yol açar⁴.

Kolanjiokarsinom (KK), hepatoselüler karsinomdan (HSK) sonra karaciğerin en sık ikinci primer⁵ ve biliyer ağacın en sık⁶ görülen epitelyal malignitesidir. İKK, intrahepatik safra duktus epitelinden köken alan bir tümördür. Rutin pratikte nadir görülmesine rağmen, görülme sıklığı ve mortalite oranları son yıllarda giderek artmaktadır⁷⁻¹². İKK'ler tüm KK'lerin %10'unu oluşturmakta ve sindirim sistemi karsinomlarının %3'ünü oluşturmaktadır^{13,14}. İKK, biliyer ağaçtaki anatomik lokalizasyonuna göre, intrahepatik, perihiler ve distal KK olarak üç şekilde sınıflandırılır⁵ (Resim 1).

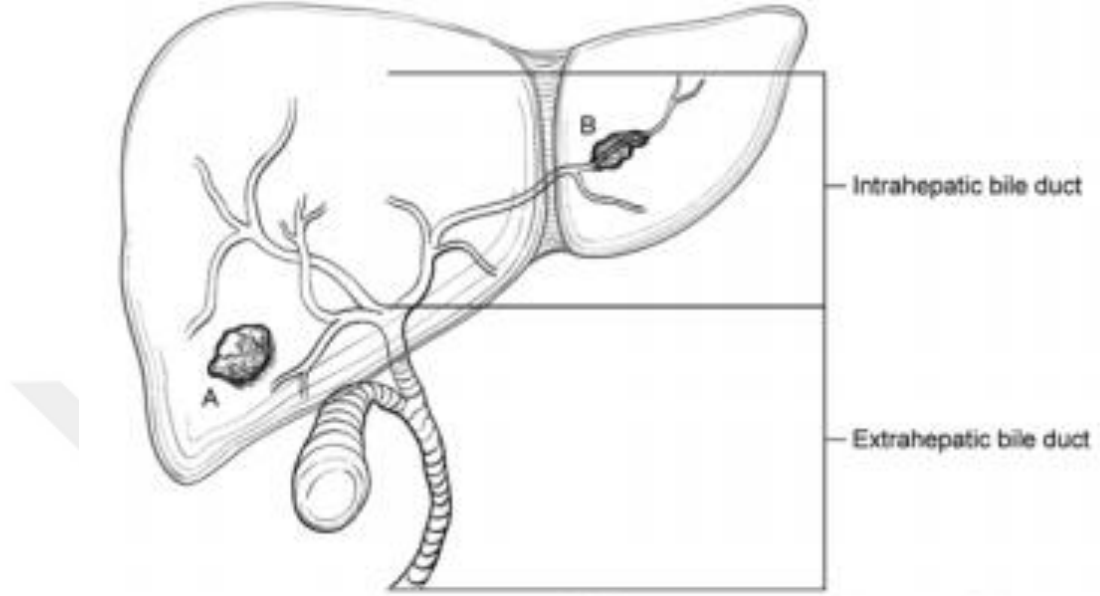


Resim 1: Biliyer ağaçtaki anatomik lokalizasyonlarına göre KK sınıflandırması

(İKK: intrahepatik kolanjiokarsinom, PhKK: perihiler kolanjiokarsinom, DKK: distal kolanjiokarsinom, RA: sağ anterior segmental duktus, RP: sağ posterior segmental duktus, RHD: sağ hepatik duktus, LHD: sol hepatik duktus, KHD: koledok kanalı, DS: duktus sistikus, SK: safra kesesi)

İKK sol ve sağ hepatik duktusların sekonder dallarının proksimalinde yerleşim gösterir. Perihiler KK, sağ ve sol hepatik duktusların sekonder dalları ve duktus sistikus başlangıcı arasındaki tümörleri kapsar. Distal KK ise koledok kanalından ampulla vateriye kadar olan tümörleri tanımlar⁵ (Resim 1).

İKK'nin üç adet büyüme şekli tanımlanmış ve bu tanımlamaya göre makroskopik tipleri belirlenmiştir: kitle oluşturan tip, periduktal tip ve bu iki grubun birlikte görüldüğü, kitle oluşturan / periduktal tip (Resim 2)¹⁵. Genel olarak bakıldığında İKK tanısı alan vakaların %60'ı kitle oluşturan tiptir ve bu tip çevreden iyi sınırla ayrılan, çevre karaciğer parankimine invaze olarak büyüyen bir nodül formasyonu olarak izlenir. %20 vaka safra duktusları boyunca yatay uzanımsal (longitudinal) bir büyüme paterni gösterir. Kalan %20 vaka ise bu iki grubun özelliklerini birlikte gösterir^{15,16}.



Resim 2: İKK'nin makroskopik tipleri A: Kitle oluşturan tip B: Periduktal tip (AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition (2017), published by Springer Science and Business Media LLC, www.springerlink.com)

İKK etyolojisinde birçok etken sayılabilir. Bunlar arasında, hepatit B, hepatit C, AIDS, intrahepatik safra taşları, siroz, primer sklerozan kolanjit, parazitik enfestasyonlar, kimyasal karsinojenler, obezite, tip 2 diabet ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı vardır¹⁷.

Sadece palyatif tedavi yapılabilen İKK hastalarının ortanca sağ kalımı 2-6 ay arasında değişir. KT rejimleri ile 5 yıldan fazla yaşam şansı %10 oranındadır^{8,18,19}. Cerrahi rezeksiyon sonrası 5 yıllık survi oranları %30-35 oranında değişmektedir²⁰. Hepatektomi erken İKK'nin tedavisinde ana çözüm olmasına rağmen İKK hastalarının sadece 1/3'ünün rezeksiyona gitme şansları vardır. Median sağ kalımları bu durumda bile 3 yıldır ve nüks oranı %50-60'lara çıkmaktadır²¹. İKK hastaları çoğunlukla geç evrede tanı alırlar ve radikal rezeksiyon fırsatlarını kaybederler²¹. Bu nedenle gelişen görüntüleme teknikleri ile İKK'nin erken tanınması ve rezeke edildikten sonra yapılacak histolojik evrelemelerin klinik yaklaşıma katkısı çok büyüktür.

İKK'lerin histolojik evrelemesi amacıyla en yaygın kullanılan sistem olan "American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC)"nin 8. baskısına göre, İKK'de damar invazyonunun varlığı evreyi pT1'den pT2'ye yükseltmektedir (Tablo 1 ve Tablo 2)¹⁵. AJCC/UICC'nin son baskısında, 7. baskıdan farklı olarak vasküler invazyon ve multifokal tümör varlığı eşdeğer öneme sahip sayılmış ve bu iki özellikten birini taşıyan tümörün T2 evresinde olduğu belirtilmiştir^{15,22}. Bu nedenle, damar invazyonunun

varlığının kesin bir şekilde ortaya konulması hastaların prognozu ve tedavi yaklaşımları açısından oldukça önemlidir.

Tablo 1: İKK'lerde AJCC/UICC 8. baskıya göre TNM sınıflaması¹⁵

pT	Primer tümör
pTx	Primer tümör değerlendirilememektedir.
pT0	Primer tümör bulgusu bulunmamaktadır.
pTis	Karsinoma in situ (intraduktal tümör)
pT1	Vasküler invazyon olmadan tek tümör odağı, ≤5 cm veya >5 cm
pT1a	Vasküler invazyon olmadan tek tümör odağı, ≤5 cm
pT1b	Vasküler invazyon olmadan tek tümör odağı, >5 cm
pT2	Vasküler invazyon varlığında tek tümör odağı veya vasküler invazyon olsun / olmasın birden çok tümör odağı mevcuttur.
pT3	Tümör viseral peritonu perforasyon etmiş görünümündedir.
pT4	Tümör doğrudan invazyon yolu ile lokal ekstrahepatik yapılara giriş göstermektedir.
N	Bölgesel lenf nodları
pNx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.
pN0	Bölgesel lenf nodu metastazı bulunmamaktadır.
pN1	Bölgesel lenf nodu metastazı mevcuttur.
M	Uzak metastaz
M0	Uzak metastaz mevcut değildir.
M1	Uzak metastaz mevcuttur.

Tablo 2: İKK'lerde AJCC/UICC 8. baskıya göre prognostik evreleme ¹⁵

Evre	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a	N0	M0
Evre IB	T1b	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre IIIA	T3	N0	M0
Evre IIIB	T40	N0	M0
	Herhangi bir T	N1	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

İKK'nin tek küratif tedavi seçeneği cerrahi rezeksiyon olsa da, birçok hasta rezeke edilemeyecek tümör varlığı ile başvurmaktadır. Bu durumda bölgesel lenf nodları eksizyonu sonrası metastaz varlığına göre adjuvan KT önerilmektedir²³. Hastaların prognozunda en önemli faktörler lenf nodu metastazı, pozitif cerrahi sınır, perinöral invazyon ve vasküler invazyon olarak literatürde yer almaktadır^{24,25}. Bu gibi nedenlerle vasküler invazyonun varlığını belirtmek hasta açısından önemli olup, College of American Pathologists' (CAP) kanser raporlama protokolüne göre mutlaka belirtilmelidir²⁶.

2.2. H-Caldesmon (h-CD)

Caldesmon düz kas ve çizgili kasta yaygın eksprese edilen bir proteindir^{27,28}. Caldesmon'un calmodulin, tropomyozin ve kalponine bağlanarak hücre kasılmasının düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir²⁷. Yüksek molekül ağırlıklı Caldesmon (h-CD) ise, Caldesmon'un bir izoformu olup, düz kas hücrelerine spesifiktir ve diğer düz kas belirteçlerinin aksine myofibroblast ve perisitlerde pozitif boyanmaz²⁹. Düz kas hücrelerine spesifik olan h-CD, arter ve ven duvarlarındaki düz kasları da boyadığından, birçok tümörde izlenmesinde zorluk yaşanan vasküler invazyonun belirlenmesinde çok faydalıdır³⁰. Ayrıca h-CD, gastrointestinal sistem tümörlerinde yaygın olarak görülen desmoplazide negatif olup sadece düz kas hücrelerini boyayacak kadar yüksek spesifiteye sahiptir³¹.

2.3. Sitokeratin 19 (CK19)

Sitokeratin 19 (CK19) en düşük moleküler ağırlıklı (40-56 kd³²) grup keratin ailesinden, mukozal yüzey epitelinin bazal tabakasında ve epidermal bazal hücrelerde pozitif boyanabilen, basit bir keratindir. Basit epiteli boyaması ve birçok skuamöz dokuda pozitif olması nedeniyle epitelyal neoplaziler için kullanışlı bir immünohistokimyasal belirteçtir³³. CK19 normal duktal epitelde (safra duktusu, pankreas ve renal toplayıcı tübüller) ve normal gastrointestinal sistem mukozasında pozitif boyanır³⁴. CK19 immünohistokimyasal belirteci rutin patoloji pratiğinde genellikle, primeri bilinmeyen tümörlerde bilier / pankreatik / renal duktuler / gastrik orijini göstermek amacıyla kullanılır. Baş-boyun skuamöz karsinomları, papiller tiroid karsinomları³⁵, HSK'ler^{36,37}, gastrointestinal tümörlerin bir kısmı^{34,38}, renal hücreli karsinomların %50'den fazlası ve çok katlı skuamöz epitelde gelişen tümörler, CK19 ile pozitiflik gösterir³². KK'de ise CK19 diffüz ve kuvvetli pozitif boyanmaktadır. HSK ile KK ayrımında CK19 çok faydalıdır; HSK'de fokal pozitiflik görülebilmemesine karşın KK'de CK19 diffüz kuvvetli pozitifdir³⁹.

2.4. Karaciğerin damar ağı

Karaciğer, portal ven ve hepatic arter tarafından ikili bir sistem ile kanlanır. Karaciğere gelen kanın %70'i portal venden, %30'u ise hepatic arterden sağlanır. Hepatic arter oksijenize kanı karaciğere getirirken, portal ven gastrointestinal sistemden gelen kanı karaciğere taşır. Arteriyel kan her karaciğer

lobülündeki santral venler ile bağlantılıdır. Santral venler de hepatik venlere drene olarak inferior vena kavaya dökülür⁴⁰ (Resim 3).

2.4.1. Portal venler

Portal ven, pankreas boynunun arka kısmında, superior mezenterik ven ve splenik venlerin birleşimiyle oluşur. Karaciğere girdikten sonra her iki lobu besleyen sağ ve sol iki dala ayrılır⁴⁰ (Resim 3).

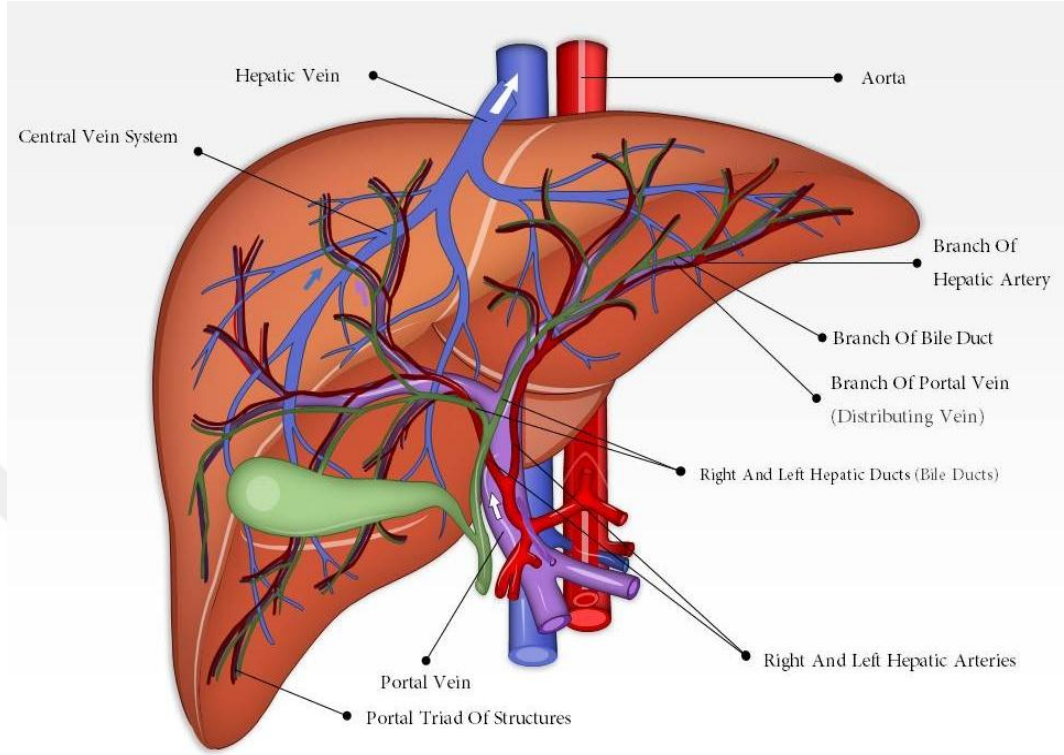
2.4.2. Hepatik venler

Karaciğer lobüllerindeki santral venler, sağ, orta ve sol hepatik venlere dökülerek, inferior vena cava'ya açılır⁴⁰ (Resim 3).

2.4.3. Hepatik arterler

Arteria hepatis communis, trunkus çölyakus'tan köken alır. Duodenumun üst kısmında gastroduodenal arter dalını verdikten sonra, arteria hepatica propria olarak karaciğere gelir ve karaciğere girmeden hemen önce, portal venin yanında, sağ ve sol hepatik arter olarak iki dala ayrılır⁴⁰ (Resim 3).

Karaciğerin ana damar yapısı Resim 3'te şematize edilmiştir.



Resim 3: Karaciğerin arteriyel ve venöz damar yapısı ve safra kanalları

AJCC/UICC'nin 8. baskısına göre, histopatolojik incelemede büyük hepatik damarlar (portal venlerin ve hepatik arterlerin birinci ve ikinci dalları veya üç hepatik venin bir veya daha fazlası (sağ, sol veya orta)) ve / veya daha küçük intraparakimal vasküler yapıların tümör tarafından mikroskopik invazyonu görüldüğünde bu bulgu vasküler invazyon olarak rapor edilir ve bu bulgunun görülmesi, tümör çapından bağımsız olarak, evreyi pT1'den pT2'ye yükseltir²².

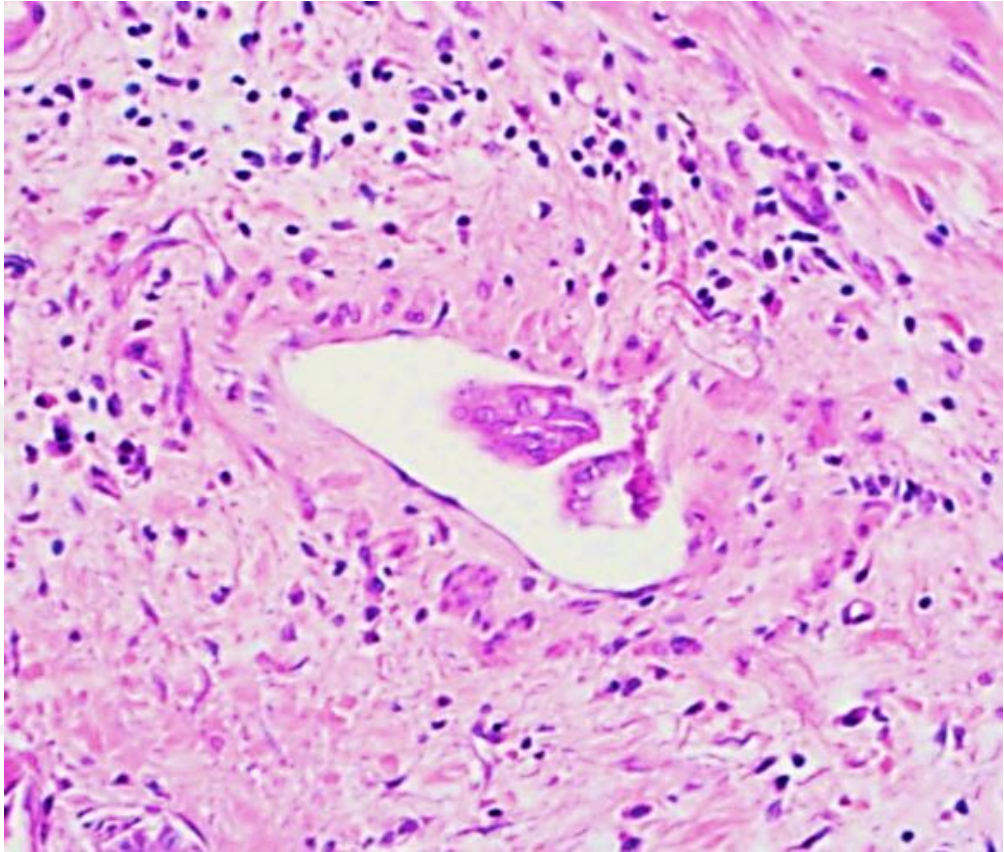
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçimi

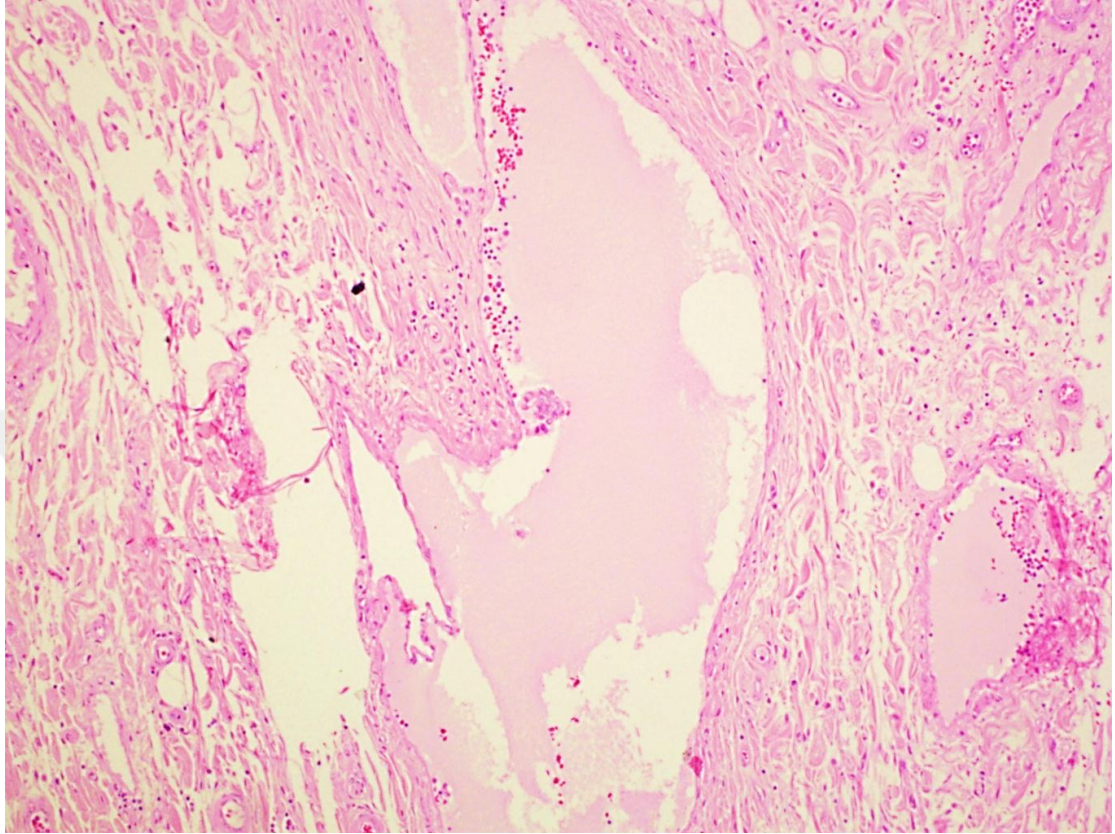
Bu çalışmada, 2009-2018 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan 21 adet hastanın 23 adet parsiyel hepatektomi materyaline ait 82 blokta bulunan toplam 226 odak ele alınmıştır.

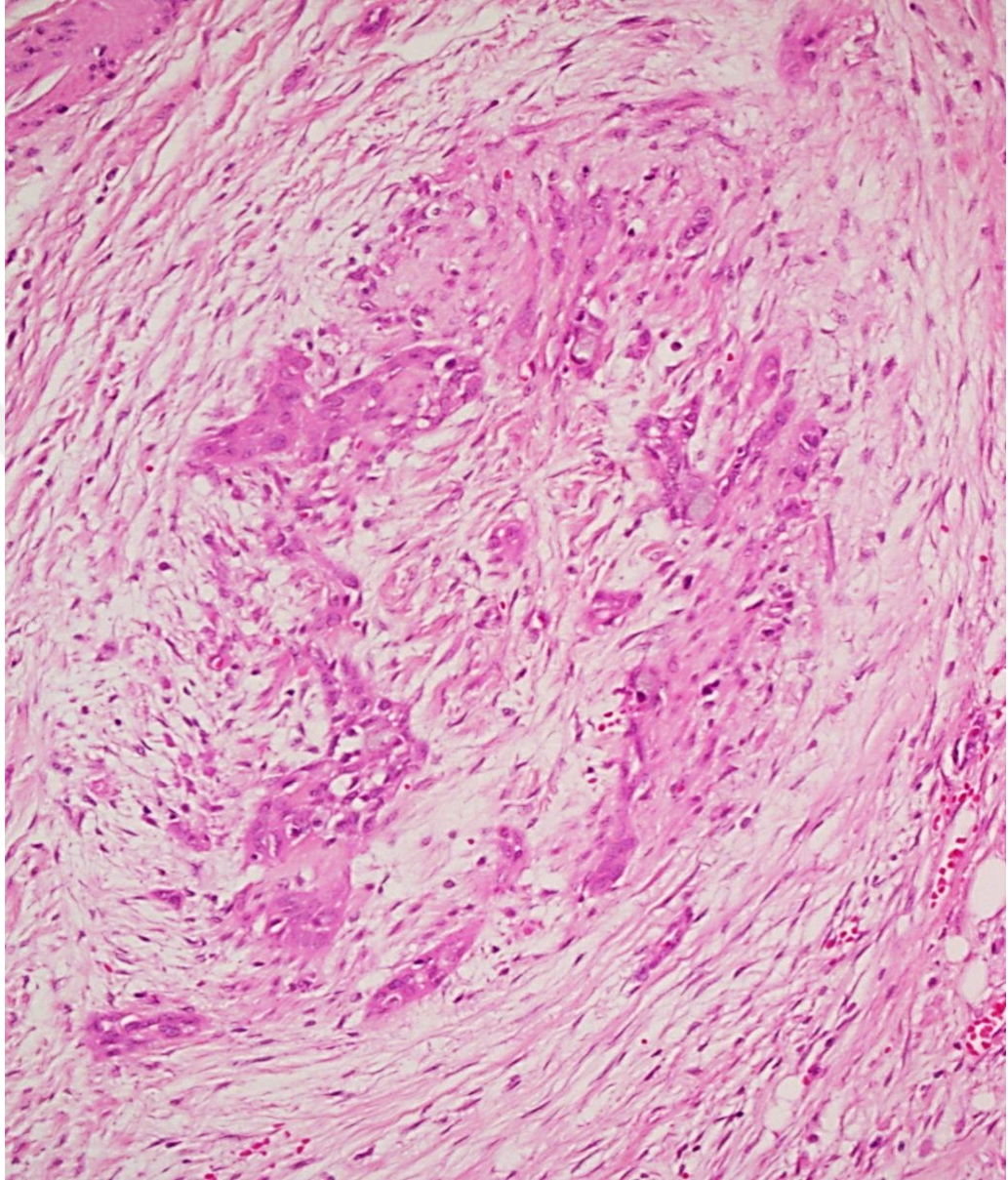
Rezeksiyon materyallerine ait bloklar seçilirken, vasküler invazyon varlığı düşündürülen alanları içeren bloklar dâhil edilmiştir. Bu seçimde aşağıdaki hipotetik kriterler kullanılmıştır:

1. Tip 1: Tümör odağının bir damar lümeninde olduğunu yüksek olasılıkla düşündürülen odaklar; damar duvarına ait kas liflerini ve/veya media tabakasını temsil ettiği düşünülen eozinofilik bir çerçeve ile çevrili (Resim 4) ve boş lümen veya eritrosit varlığının görüldüğü tümör odakları (Resim 5)
2. Tip 2: Tümör odağının etrafında, damar duvarı olduğundan şüphelenilen, tümör odağını “manşonvari örüntüde tamamıyla veya kısmen sarmalayan”, fakat boş lümen veya eritrosit varlığının görülmediği odaklar (Resim 6, Resim 7)

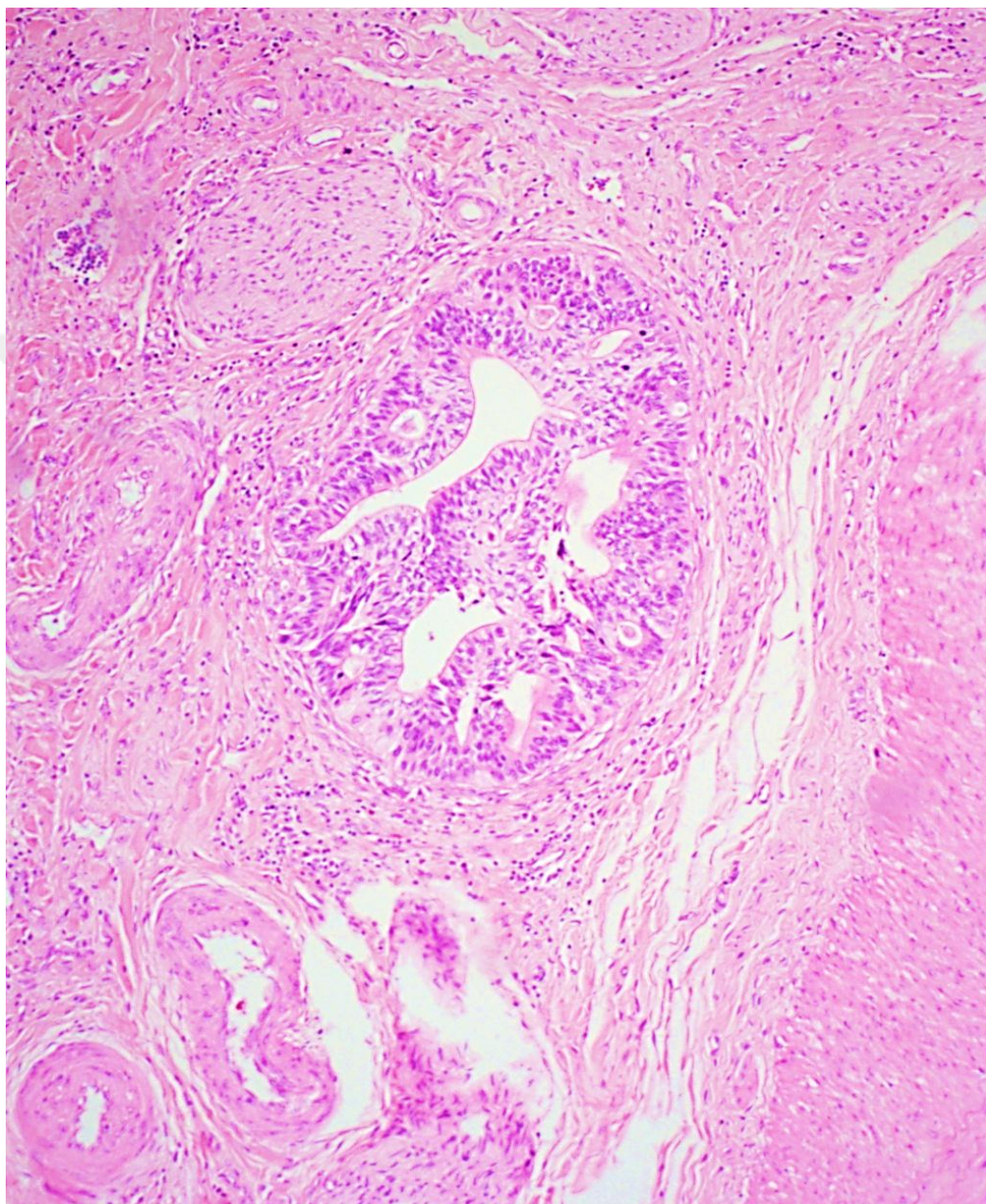


Resim 4: Tip 1, H&E x200





Rosim 6. Tin 2 H&E x200



Resim 7: Tip 2, H&E x100

3.2. İncelenen Parametreler

Yirmi üç adet eksizyon materyalinin alındığı yirmi bir adet hastaya ait yaş, cinsiyet, tümör çapı, tümör yerleşim yeri, lenf nodu metastaz varlığı ve kan biyokimya değerleri gibi bilgilere Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi bilgi yönetim sisteminden ulaşılmıştır. Bilgi yönetim sisteminden elde edilen verilere ek olarak, vasküler invazyon varlığı rapor edilmeyen vakaların vasküler invazyon varlığı / yokluğu incelenmiş ve patolojik evrelendirmesi bu bilgiye göre yapılmıştır. İncelenen tümörlerin tamamı 7. AJCC/UICC evrelendirme sistemine göre, hem de 8. AJCC/UICC evrelendirme sistemine göre evrelendirilmiştir.

Seçilen hastaların rezeksiyon materyalleri tekrar gözden geçirilerek, belirtilen vasküler invazyon kriterlerini bulunduran tümör blokları belirlenmiştir. Bu tümör bloklarına immünohistokimyasal olarak ikili CK19 ve h-CD belirteçleri çalışılmıştır.

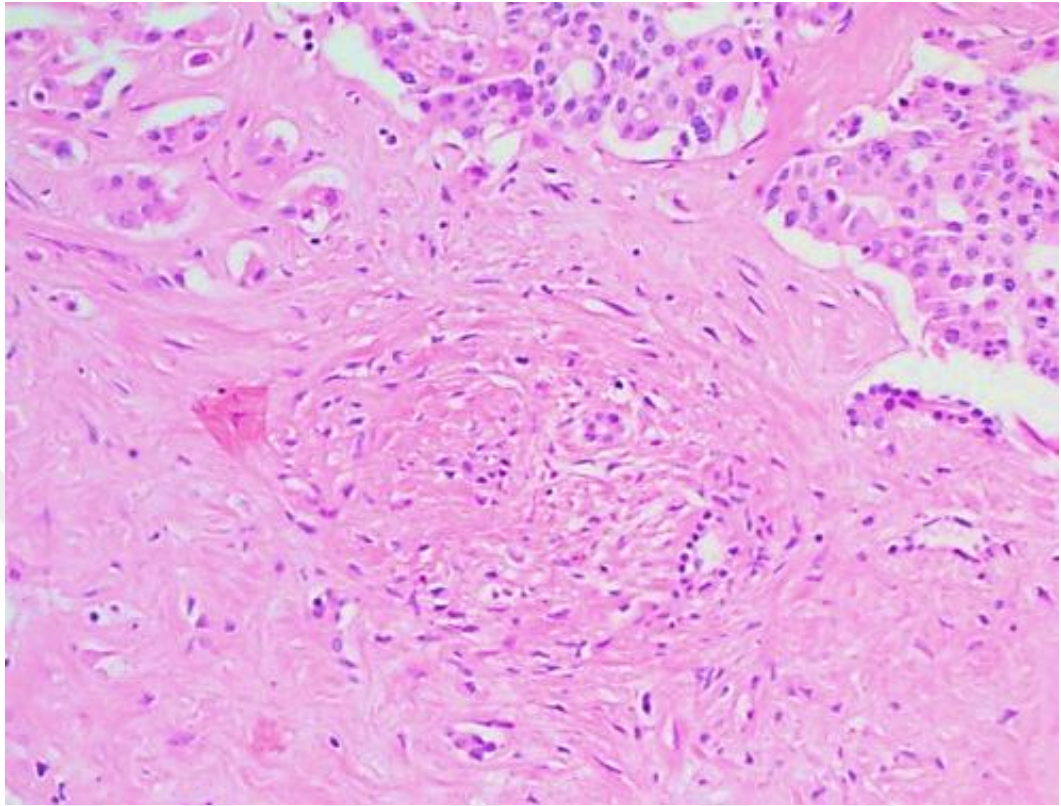
Seçilen tümör odakları, çalışma boyunca elde edilen tecrübeler ile birlikte değerlendirilerek, vasküler invazyon olasılığını düşündürme özelliklerine göre 3 ana tipe ayrılmıştır:

1. Tip 1: Tümör odağının bir damar lümeninde olduğunu yüksek olasılıkla düşündüren odaklar; damar duvarına ait kas liflerini ve/veya media tabakasını temsil ettiği düşünülen eozinofilik bir çerçeve ile çevrili ve boş lümen veya eritrosit varlığının görüldüğü tümör odakları,

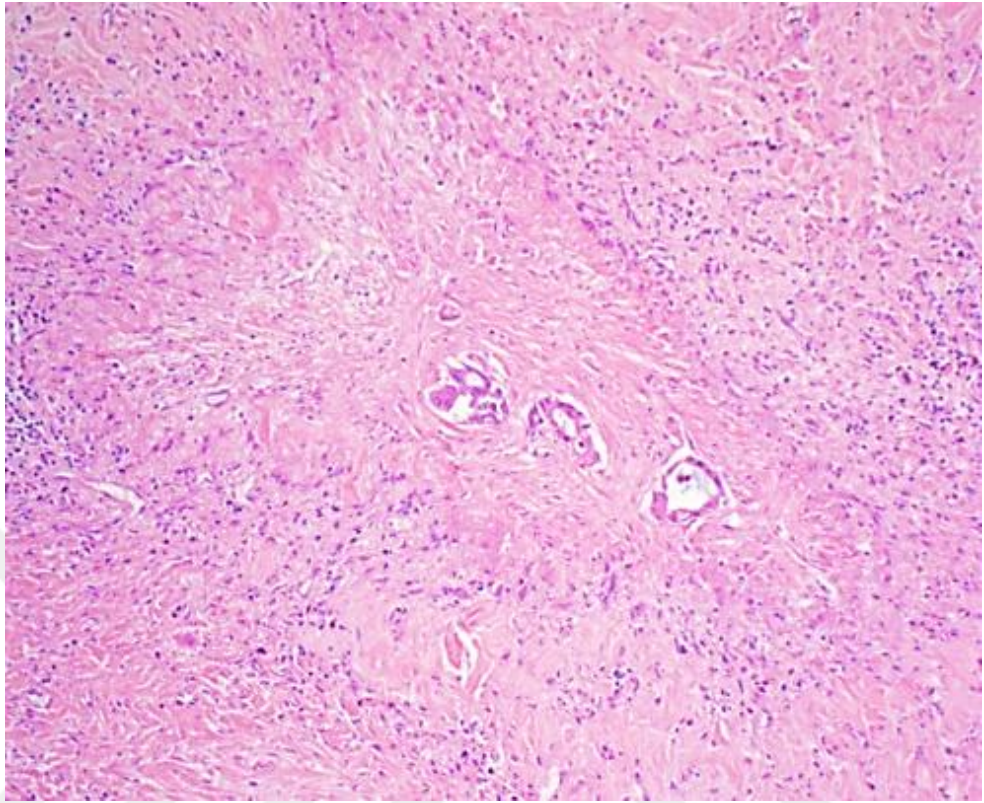
2. Tip 2: Tümör odağının etrafında, damar duvarı olduğundan şüphelenilen, tümör odağını “manşonvari örüntüde tamamıyla veya kısmen sarmalayan”, fakat boş lümen veya eritrosit varlığının görülmediği odaklar,

3. Tip 3:

- a. H&E boyalı kesitlerde vasküler invazyondan şüphelenilmeyen, h-CD ve CK19 ikili İHK uygulaması sonrası tesadüfen fark edilen odaklar (*Resim 8*).
- b. Tümör odağının etrafındaki stroma ile bunun daha dışındaki stroma arasında seçilebilen bir sınırın olduğu odaklar; “çevre dokudan mesafeli bir sınırla ayrılma (distant circumscribed stroma)” (*Resim 9*).
- c. Damar olduğu düşünülen alanın içinde tümör hücresi görülmediği, tümör varlığının ek boyalar ile saptandığı odaklar (*Resim 10*).



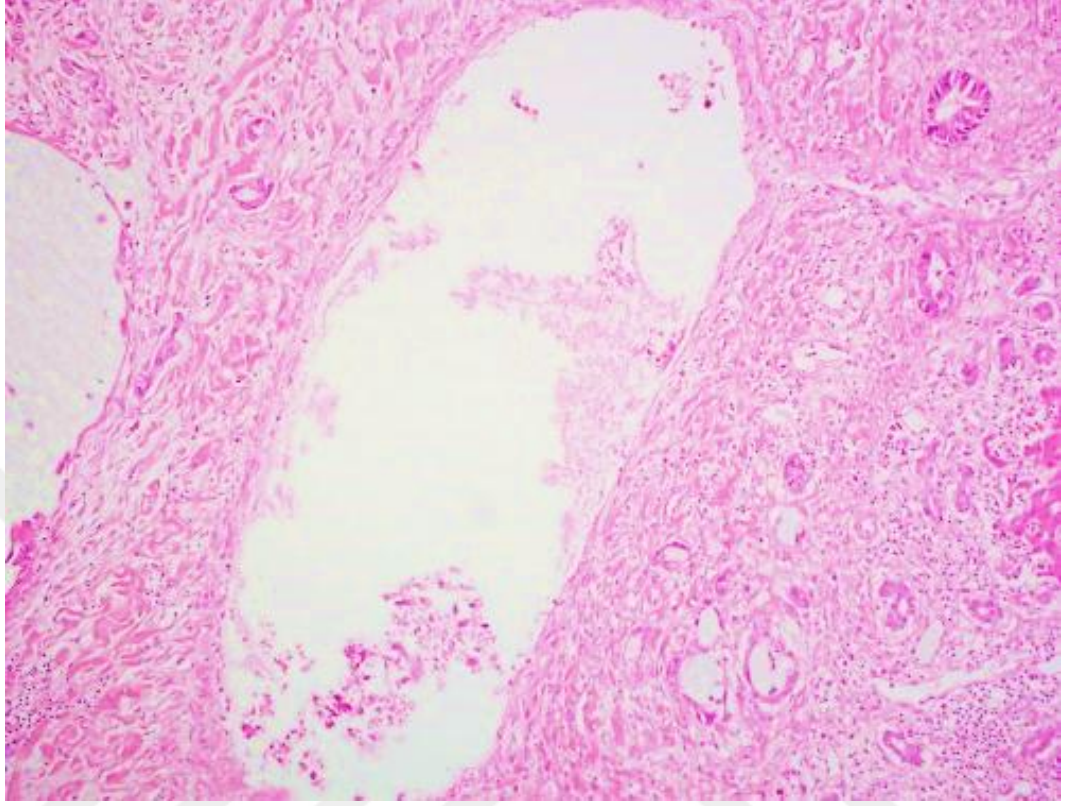
Resim 8: Tip 3, H&E x200



Resim 9: Tip 3, H&E x100



Resim 10: Tip 3, H&E x100



Üstte belirtilen “Tümör odağının bir damar lümeninde olduğunu yüksek olasılıkla düşündüren odaklar” ile “Tümör odağının etrafında, damar duvarı olduğundan şüphelenilen, tümör odağını manşonvari örüntüde tamamıyla veya kısmen sarmalayan, fakat boş lümen veya eritrosit varlığının görülmediği odaklar

ayrımı bazı morfolojik özelliklere dayandırılmıştır. İlk tanımdaki damar duvarı yapısını düşündüren bulgu, ven duvarlarındaki gruplar halinde dizilmiş düz kas demetleri ile uyumlu eozinofilik yapıların ve/veya çevrelenen alan içinde kısmen boş lümen ve/veya eritrositlerin görülmesidir. İkinci tanımdaki morfolojik görünüm, girdapsı laminar katmanlar oluşturan veya katman oluşturmeyan eozinofilik bir çevre ile tümörün kısmen/tümüyle sarılmasıdır.

Seçilen bloklardan yapılan kesitlere uygulanan ikili İHK sonrası, vasküler invazyon izlenen odak sayısı kaydedilmiş ve H&E boyalı kesitler ile karşılaştırılarak odak tiplendirmesi yapılmıştır.

Saptanan odakların intrahepatik yahut ekstrahepatik yerleşimli olduğu kaydedilmiştir.

Yedi adet parsiyel hepatektomi materyalinin tümör dışı karaciğer dokusundan hazırlanan kesitlerine, h-CD tekli olarak boyanmış olup bu kesitlerdeki vasküler elemanların (portal ven, hepatik ven ve hepatik arterler) ve safra duktuslarının boyanma durumları değerlendirilmiştir. Saptanan odakların çapları mikroskopik olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

3.3. İmmünohistokimyasal Yöntem

Çalışmaya dâhil edilen tüm dokular %10'luk formaldehit ile tespit edilmiştir. Olguların H&E boyalı preperatlarından seçilen parafin bloklardan CK19 ve h-CD ekspresyonlarını belirlemek amacıyla, her lama iki ya da üç adet vaka kesiti alınmıştır.

3.3.1 h-CD ve CK19

h-CD antikorunu (h-CD, 10127416, Agilent-Dako) IgG1 ve kappa izotipinde kullanıma hazır monoklonal bir antikor olup, CK19 antikorunu (A53-B/A2.26, 760-4281, CellMarque-Ventana) IgG1 izotipinde kullanıma hazır bir monoklonal antikordur. h-CD antikorunu için biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ticari kullanıma hazır kitler şeklindedir. CK19 antikorunu için boyanma yöntemlerinden çözünebilir enzim immün kompleks metodu (alkalen fosfataz-anti alkalen fosfataz) kullanılmış olup ultraView alkalen fosfataz (FAST RED) ticari kullanıma hazır kitler şeklindedir.

Hazırlanan parafin doku kesitleri h-CD ve CK19 antikorları ile “double-stain” metodu ile aşağıdaki prosedüre göre birlikte boyanmıştır:

1. Pozitif şarjlı lamlara 4 mikrometrelik kesitler alınmıştır.
2. Ventana Benchmark XTIIHC/ISH model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 75°C ve 76°C’de 4'er dakika inkübe edilerek deparafinizasyon yapılmıştır.
3. h-CD ve CK19 için EDTA buffer (pH:8.0) antijen retrieval solüsyonunda short:8 dakika, mild: 30 dakika ve standart: 60 dakika şeklinde antijen açma işlemi uygulanmıştır.

4. h-CD primer antikoru inkübasyonu için otomatik cihazda 28 dakika bekletilmiştir.

5. h-CD'de renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka “*Ultraview universal DAB detection kit*” kullanılmıştır.

6. 90°C'de 4 dakika denatürasyon işlemi uygulanmıştır.

7. CK19 primer antikoru inkübasyon için otomatik cihazda 32 dakika bekletilmiştir.

8. CK19 antikoru için renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla Ventana marka “*ultraView universal FAST RED detection kit*” kullanılmıştır.

9. Counterstain olarak cihazın Ventana marka hematoksileninde 8 dakika bekletilmiştir.

10. Postcounterstain olarak Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 4 dakika bekletilmiştir.

11. Dehidrasyon için kesitler sırasıyla %90, %95 ve %100'lük alkollerde 5'er dakika tutulmuştur.

12. Tüm kesitler ksilolde şeffaflştırılmıştır.

13. Entellan (Thermo) kullanılarak lamalar kapatılmıştır.

3.4. İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal preparatlar iki gözlemci (FGA ve ÖE) tarafından beraber değerlendirilmiş olup her iki gözlemcinin de vasküler invazyon konusunda mutabık kaldığı odaklar çalışmaya alınmıştır.

Tüm boyalar için pozitif kontrol olarak kolon duvarı kullanılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve tabloların oluşturulması amacıyla SPSS (SPSS Inc. Chicago IL, USA) version 15 kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kategorik değişkenlerin sunumu için frekans ve yüzde değerler kullanılmıştır. Satır ve sütun sayısı iki olan kategorik değişkenlerin istatistiksel değerlendirilmesinde Chi-Square (X^2) testi ve gerekli olduğu durumlarda Fisher exact test kullanıldı. Satır ya da sütun sayısı ikiden çok olan çapraz tabloların istatistiksel değerlendirilmesinde ise yine Chi-Square (X^2) testi, istatistiksel olarak anlamlı çıkan Chi-Square testlerinde farklılığın hangi hücreler arasında olduğu belirlemek için ise Marascuilo yöntemi (Post-hoc Chi-Square testleri) kullanıldı. Bütün istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

3.6. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 25.12.2017 tarihinde, 607 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik Özellikleri ve Tümörlerin Özellikleri

Hastaların demografik özellikleri ve tümörlerin özellikleri Tablo 3'te belirtilmiştir.

Çalışmaya katılan hasta sayısı 21, rezeksiyon sayısı 23, blok sayısı 82, odak sayısı 226'dır. Hastaların yaşları 35 ile 77 arasında değişmekte olup ortalaması 59,76 (± 10.26)'dır. Hastaların 18'inin yaşı 50'nin üzerinde (%85,7) ve

3'ünün yaşı 50'nin altındadır (%14,3). Hastaların 13'ü erkek (%61,9), 8'i kadındır (%38,1).

Çalışmada parsiyel hepatektomi materyallerine ait bloklar kullanılmıştır. Tümör yerleşim yerleri incelendiğinde vakaların 14'ü sol hepatik lob (%66,67), 6'sı sağ hepatik lob (%28,57) ve 1'i sağ ve sol hepatik lob yerleşimlidir (%4,76). Tümör çapları ortalaması 5,73 (\pm 2.99) cm olup 1,8 cm ile 12 cm arasında değişmektedir.

Tablo 3: Hastaların demografik özellikleri ve tümörlerin özellikleri

		Sayı (%)	
Yaş	<50	3	14,3
	\geq 50	18	85,7
Cinsiyet	Kadın	8	38,1
	Erkek	13	61,9
Tümörün yerleşim yeri	Sağ hepatik lob	6	28,57
	Sol hepatik lob	14	66,67
	Sağ ve sol hepatik lob	1	4,76
pT - 7.AJCC	pT1	3	14,3
	pT2a	6	28,6
	pT2b	2	9,5
	pT3	5	23,8
	pT4	5	23,8

pT - 8.AJCC	pT1b	1	5,0
	pT2	13	62,0
	pT3	3	14,0
	pT4	4	19,0
Evre - 7.AJCC	I	3	14,3
	II	1	4,8
	III	3	14,3
	IVA	14	66,7
Evre - 8.AJCC	IB	1	4,8
	II	5	23,8
	IIIA	3	14,3
	IIIB	12	57,1
Lenf nodu metastazı	pNx	5	23,8
	pN0	5	23,8
	pN1	11	52,4
Perinöral invazyon	Var	15	71,4
	Yok	-	-
	Belirtilmemiş	6	28,6
İlk raporlamada belirtilen lenfovasküler invazyon	Var	11	52,4
	Yok	4	19,0
	Belirtilmemiş	6	28,6
İkili İHK sonrası lenfovasküler invazyon	Var	19	90,5
	Yok	2	9,5
Zeminde viral hepatit varlığı	Hepatit B	4	19
	Hepatit C	1	4,7
	Yok	16	76,3

Hastaların kan değerleri Gazi Üniversitesi Hastanesi Bilgi Yönetim Sistemi üzerinden İKK tanılı hastalarda zeminde viral hepatit varlığı açısından yapılan incelemede 16 hastada herhangi bir viral hepatit varlığının tespit edilmediği (%76,3), 4 adet hastada hepatit B virusunun bulunduğu ve antikorunun bulunmadığı (HBsAg (+), Anti HBs (-)) (%19) ve 1 hastanın ise hepatit C hastası olduğu (%4,7) görülmüştür.

AJCC/UICC Kanser Evreleme Kılavuzu'nun 7. baskısına ait TNM kategorilerine göre 3 hasta pT1, 6 hasta pT2a, 2 hasta pT2b, 5 hasta pT3, 5 hasta

pT4 olarak sınıflanmıştır. 2017 yılında yenilenen 8. Baskı AJCC/UICC TNM kategorilerine göre ise, pT1a evresinde hasta bulunmamakta olup 1 hasta pT1b evresindedir. 13 hasta pT2, 3 hasta pT3, 4 hasta pT4 olarak sınıflanmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen 21 hastanın 16'sında lenf nodu diseksiyonu yapılmış olup, bu hastaların 5'inde lenf nodu metastazı saptanmamıştır (pN0). 11 adet hastada en az 1 adet lenf nodu metastazı mevcuttur (pN1). 5 adet hastada ise lenf nodu metastazı varlığı bilgisine ulaşılamamıştır (pNx).

15 adet hastada perinöral invazyon görülmüş, 6 adet hastada ise perinöral invazyon varlığı belirtilmemiştir. Perinöral invazyon görülen 15 hastanın 14'ünde (%93,4) vasküler invazyon saptanmış olup, 1'inde (%6,6) vasküler invazyon görülmemiştir.

İlk raporlamada toplam 21 hastanın 11'inde vasküler invazyonun olduğu, 4'ünde vasküler invazyonun olmadığı belirtilmiş ve 6'sında da vasküler invazyon varlığından söz edilmemiştir. İkili İHK uygulaması sonrası 21 hastanın 19'unda vasküler invazyon saptanmış, 2'sinde ise vasküler invazyon görülmemiştir.

Elde edilen TNM verileri göz önüne alındığında, AJCC/UICC Kanser Evreleme Kılavuzu'nun 7. baskısına ait kanser evreleme sistemine göre, 3 hasta evre I, 1 hasta evre II, 3 hasta evre III ve 14 hasta evre IVA olarak sınıflandırılmıştır. Uzak organ metastazı saptanmadığı için Evre IVB olan hasta mevcut değildir. Yenilenen 8. baskı AJCC/UICC kanser evreleme sistemine göre ise evre IA olan hasta görülmemiş olup 1 hasta evre IB'dir. 5 hasta evre II, 3 hasta evre IIIA, 12 hasta evre IIIB olarak sınıflandırılmıştır. Bu sisteme göre, uzak organ metastazı saptanmadığı için evre IV olan hasta mevcut değildir.

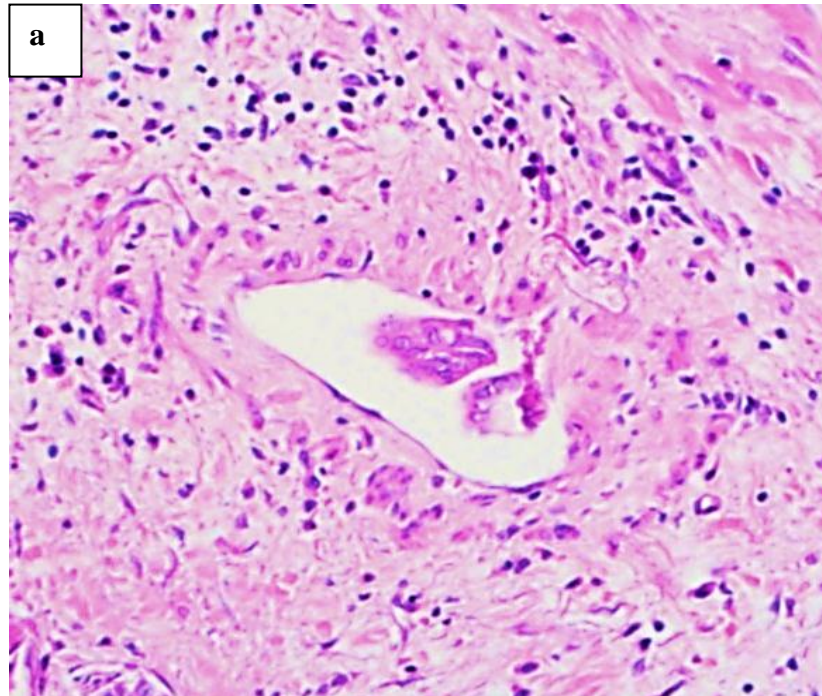
4.2. Seçilen Olası Vasküler İnvazyon Odaklarının Özellikleri

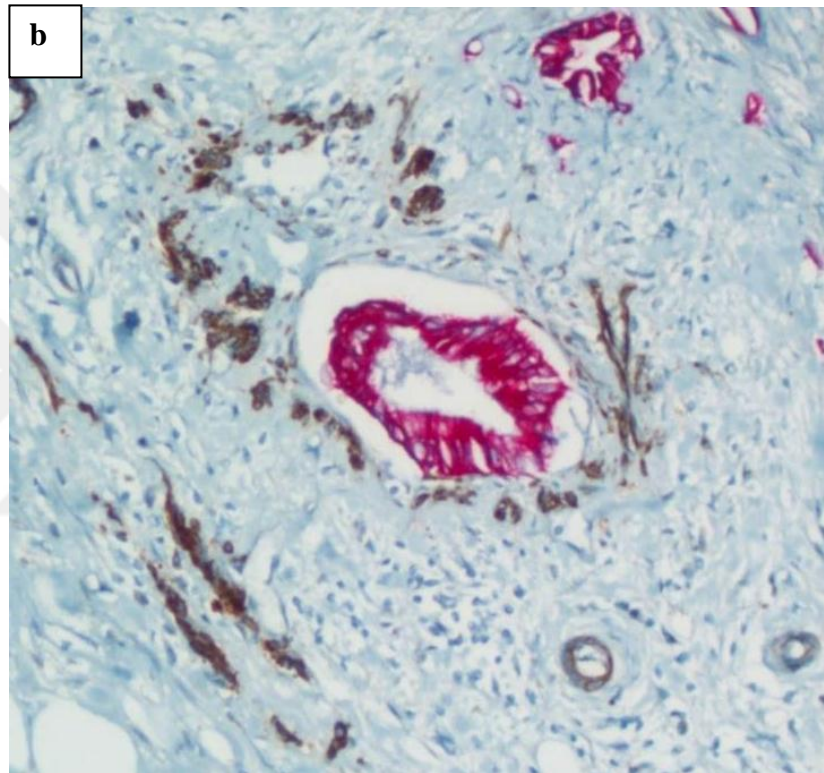
Odak tiplerinin dağılımı Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4: Odak tiplerinin dağılımı

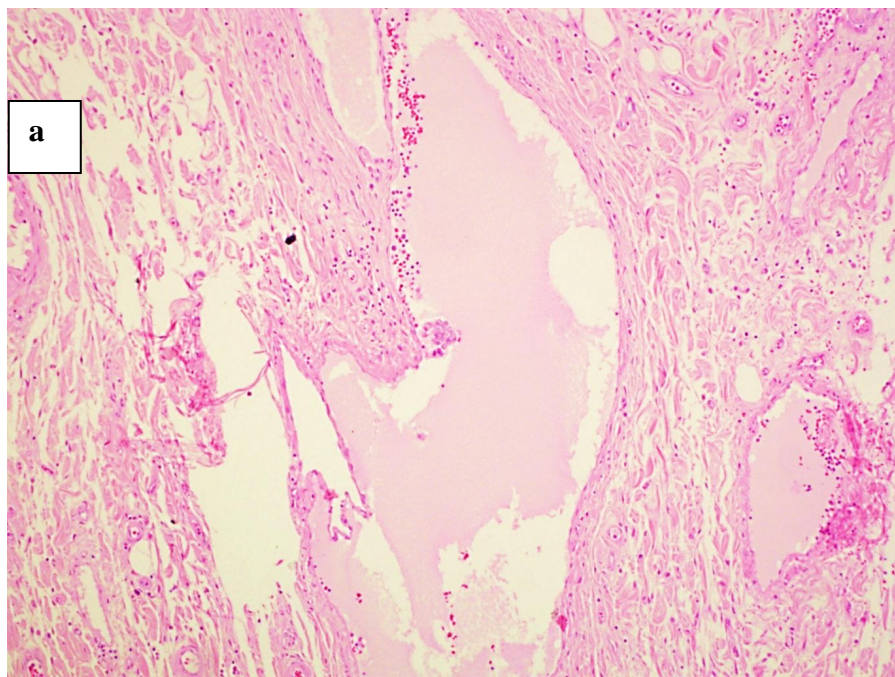
		Sayı	%
ODAK TİPİ	Tip 1	44	19,4
	Tip 2	89	39,3
	Tip 3	93	41,3
Toplam		226	100,0

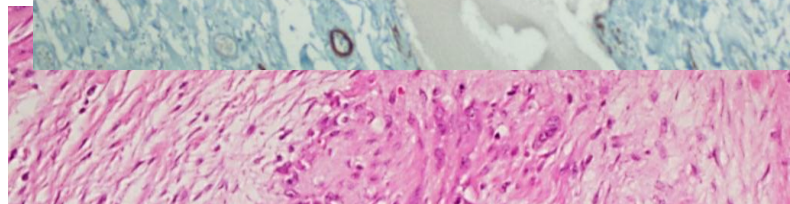
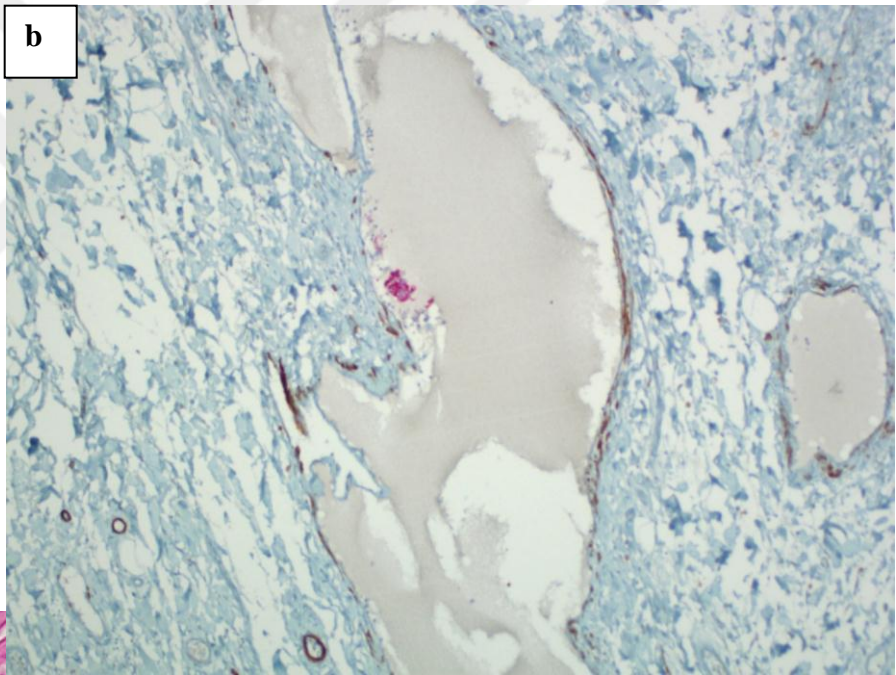
Toplam 226 odağın 44'ü (%19,4) Tip 1, 89'u (%39,3) Tip 2 ve 93'ü (%41,3) Tip 3 olarak belirlenmiştir. Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 odaklarının H&E boyalı kesitlerde ve ikili İHK uygulaması ile gösterilmiş örnekleri Resim 11, Resim 12, Resim 13, Resim 14, Resim 15, Resim 16 ve Resim 17'de gösterilmiştir.



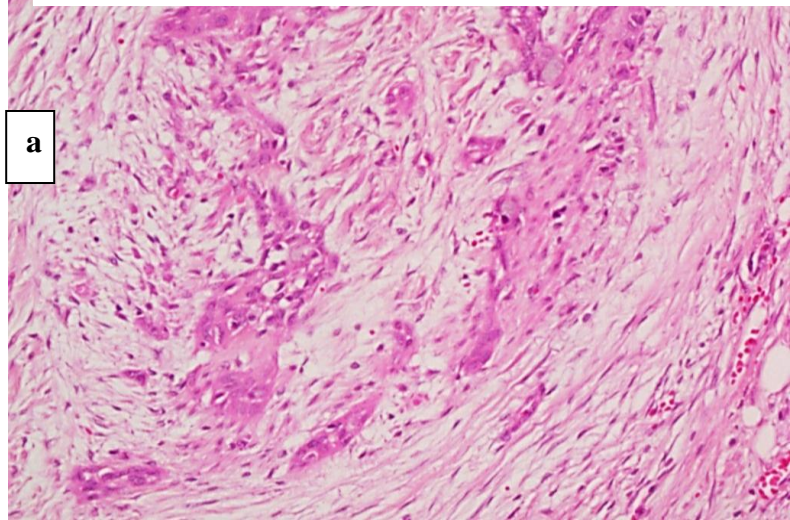


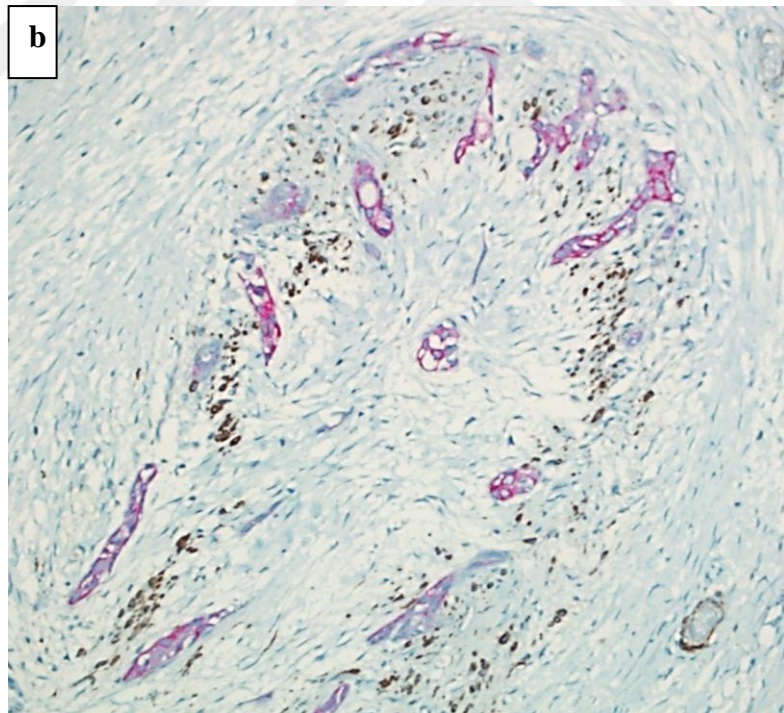
Resim 11: a) Tip1, H&E x200, b) Tip 1, h-CD-CK19 x200



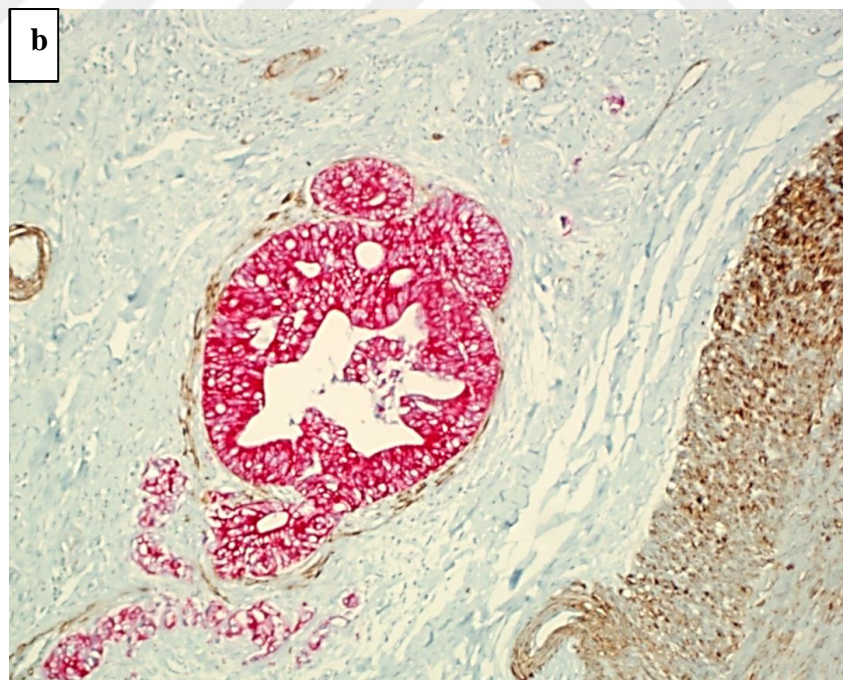
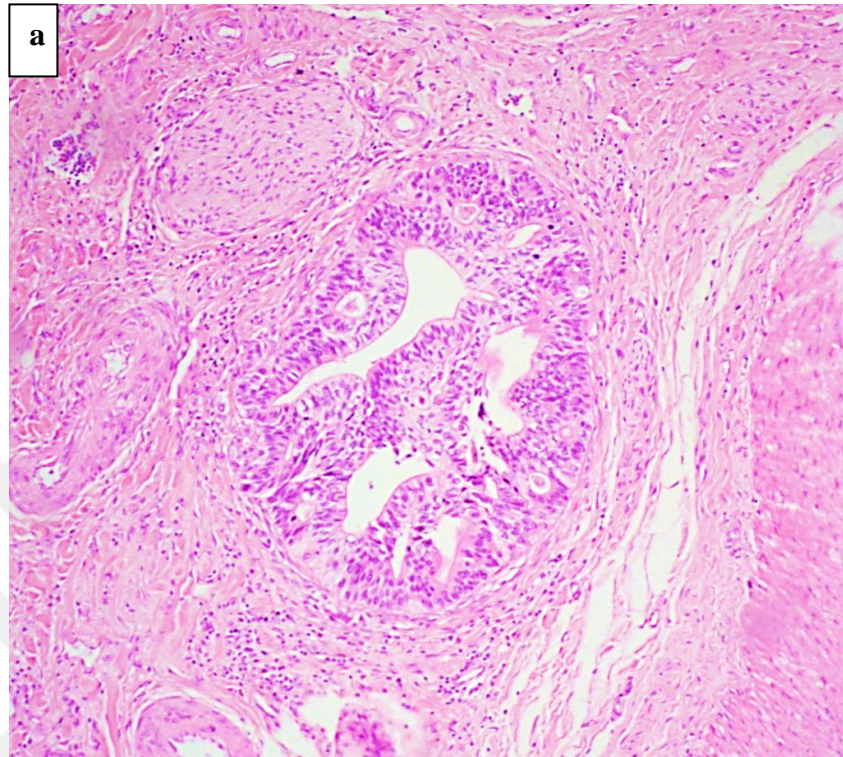


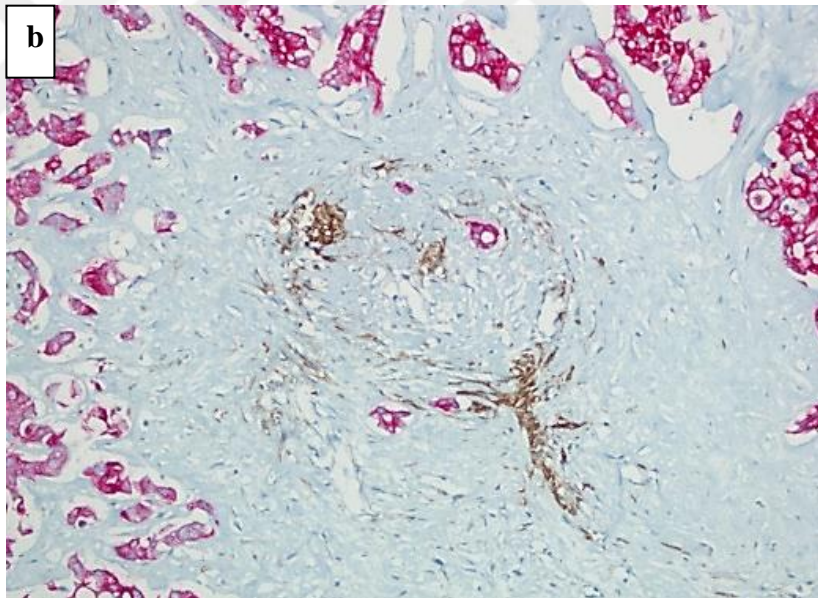
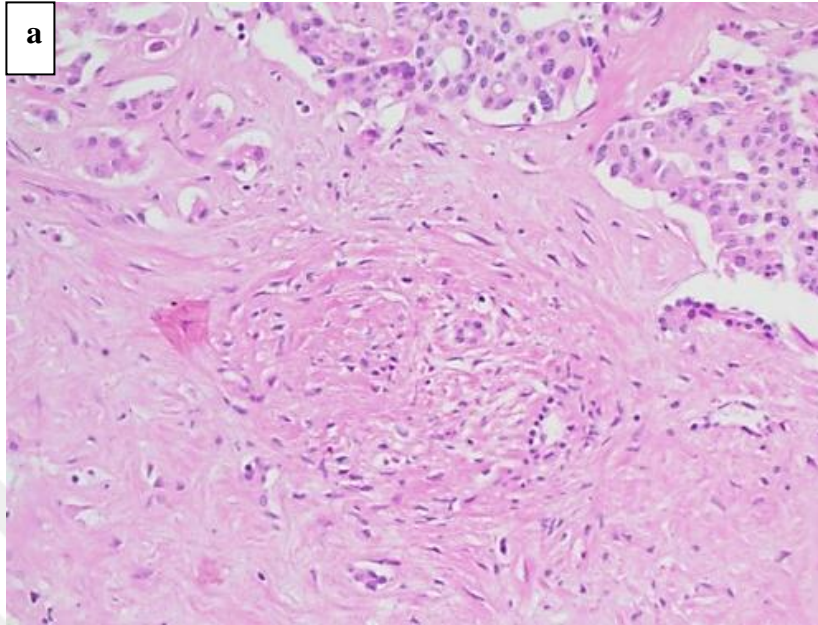
Resim 12: a) Tip1, H&E x100, b) Tip 1, h-CD-CK19 x100



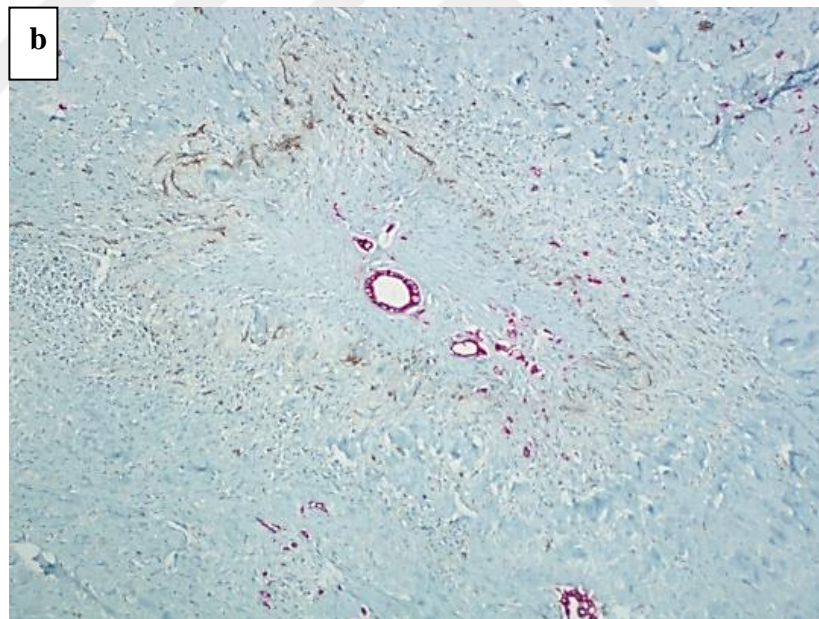
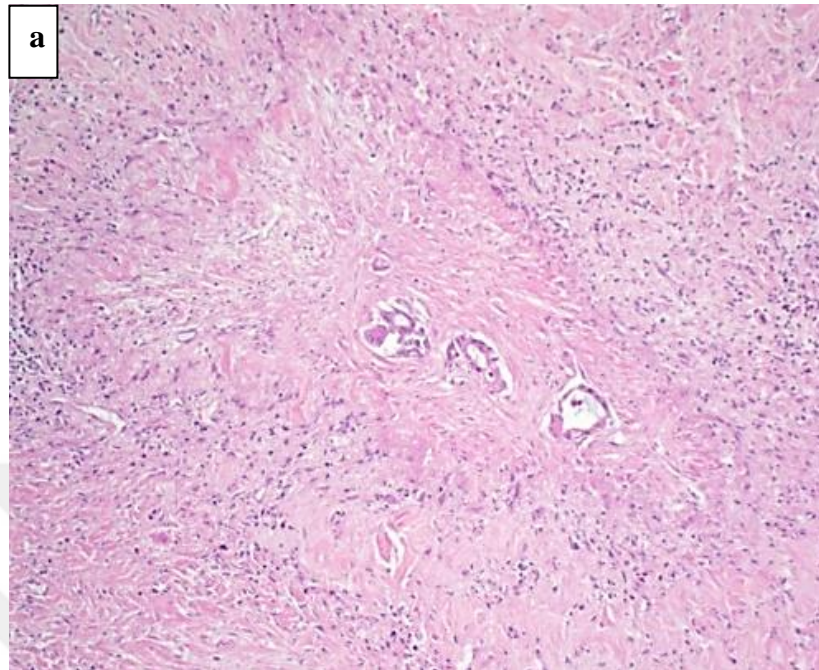


Resim 13: a) Tip2, H&E x200, b) Tip 1, h-CD-CK19 x200

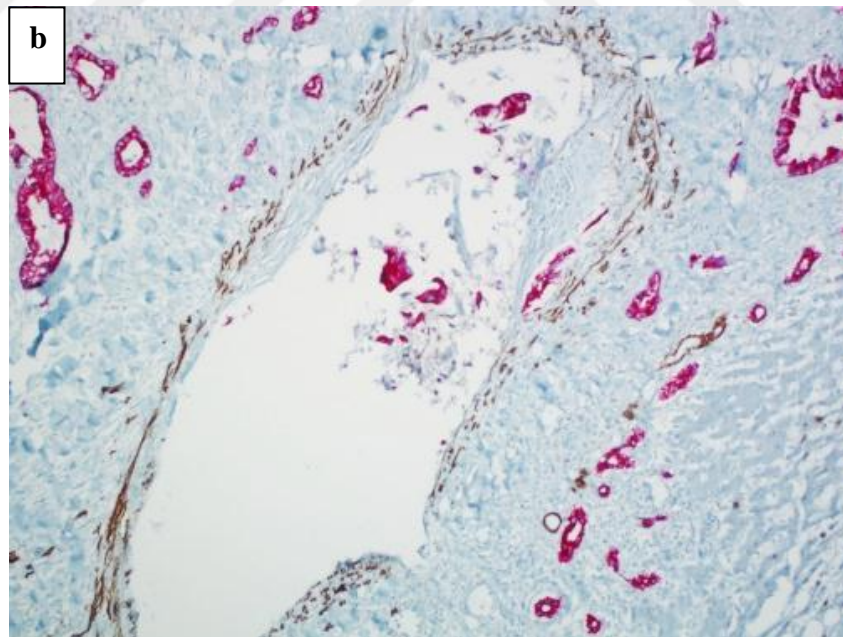
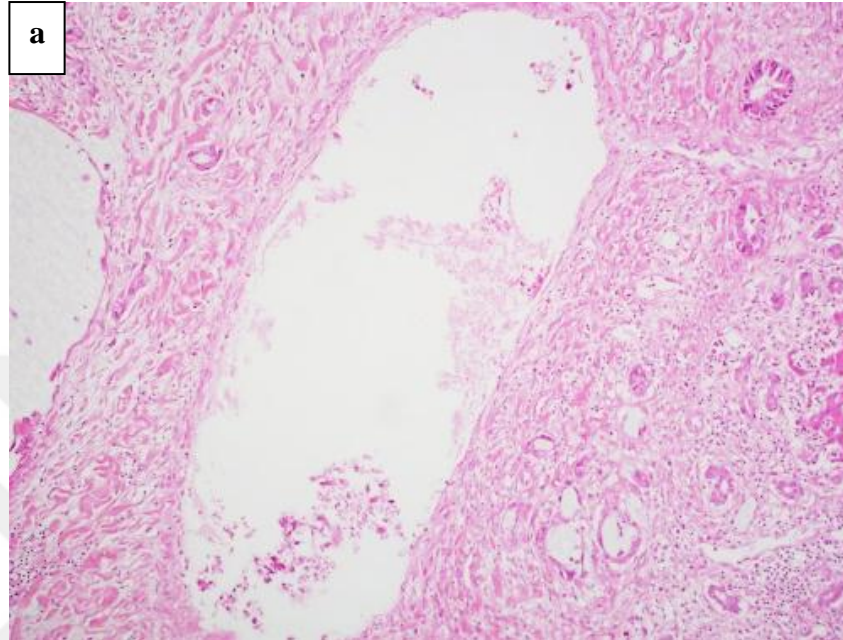




Resim 15: a) Tip3, H&E x200, b) Tip 3, h-CD-CK19 x200



Resim 16 : a) Tip3b, H&E x100, b) Tip 3b, h-CD-CK19 x100



Resim 17: a) Tip3, H&E x100, b) Tip 3, h-CD-CK19 x100

Parsiyel hepatektomi materyallerinde izlenen vasküler invazyon odaklarının intrahepatik ya da ekstrahepatik olma durumları Tablo 5’te verilmiştir.

Parsiyel hepatektomi materyallerindeki 44 adet “Tip 1” odağının 28’i (%63,6) intrahepatik, 16’sı (%36,4) ekstrahepatiktir. 89 adet “Tip 2” odağının 42’si (%47,2) intrahepatik, 47’si (%52,8) ekstrahepatiktir. 93 adet “Tip3” odağının 74’ü (%79,6) intrahepatik, 19’u (%20,4) ekstrahepatiktir.

Tablo 5: Odakların parsiyel hepatektomi materyallerindeki yerleşimi

ODAK TİPİ	YERLEŞİM YERİ		Ki-Kare Değeri	P-değeri
	<i>İntrahepatik Sayı (%)</i>	<i>Ekstrahepatik Sayı (%)</i>		
<i>Tip1</i>	28 (63,6)	16 (36,4)	20,624	<0,001
<i>Tip2</i>	42 (47,2)	47 (52,8)		
<i>Tip3</i>	74 (79,6)	19 (20,4)		

Yerleşim yerleri bakımından odak tipleri arasında fark olup olmadığı Ki-kare testi ile araştırılmış ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($\chi^2=20,624$; $P<0,001$). Farklılığın hangi odak tipi ya da odak tipleri arasında olduğunu incelemek için Marascuilo yöntemi (post-hoc test) uygulanmış ve Tip 2 odak tipinin diğer tiplerden anlamlı bir farklılığa sahip olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Tip 1 ve Tip 3 odakları anlamlı olarak Tip 2'den daha fazla ve birbirine benzer şekilde intrahepatik yerleşimli bulunurken, Tip 2 odaklarında bu odaklarla yerleşim yeri açısından uyum ya da benzerlik saptanmamıştır.

4.3. h-CD ile Normal Karaciğer Alanlarındaki Vasküler Elemanların ve Safra Duktuslarının Boyanmasının İncelenmesi

7 adet parsiyel hepatektomi materyalinin normal karaciğer dokusuna ait parafin bloklardan hazırlanan kesitlerden yalnız h-CD boyanmış olup bu kesitlerdeki vasküler elemanlar (portal ven, hepatik ven ve hepatik arterler) ile safra duktuslarının sayıları ve h-CD ile boyanma durumları değerlendirilmiş, elde edilen veriler Tablo 6'da özetlenmiştir.

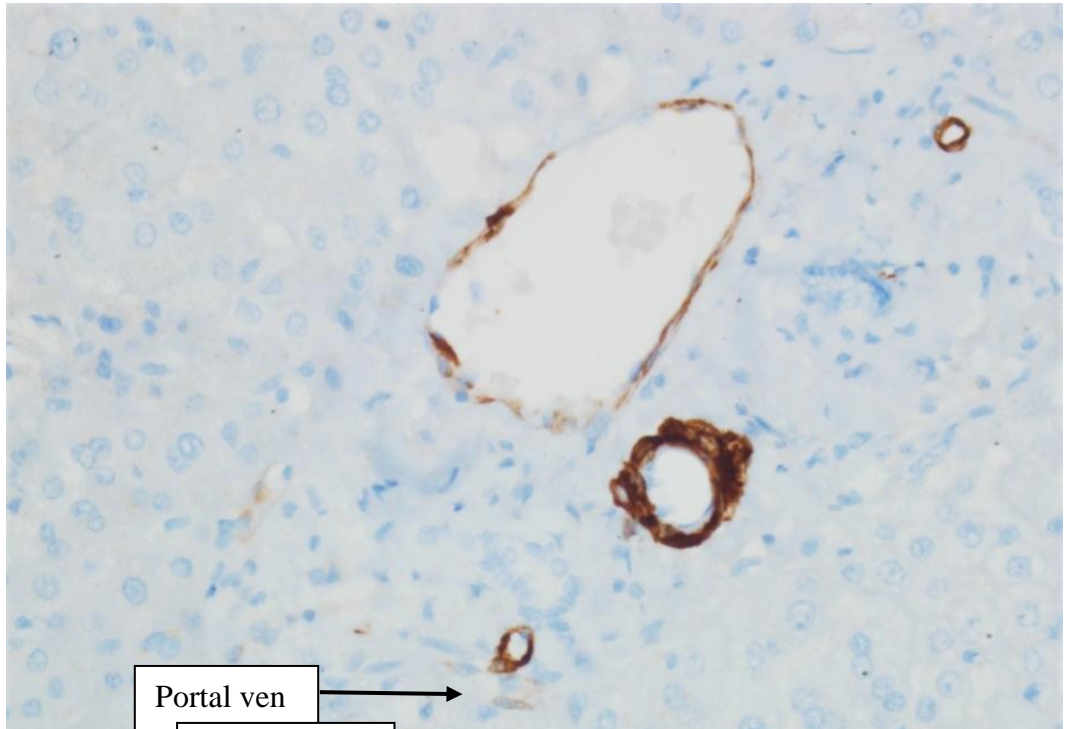
Tablo 6: Normal karaciğer dokularında izlenen vasküler elemanlar ile safra duktuslarının sayısı ve h-CD ile boyanma durumlarına göre çapları

	(+)	(-)	(+) en	(+) en	(-) en	(-) en
--	-----	-----	--------	--------	--------	--------

	(Sayı)	(Sayı)	düşük çap	yüksek çap	düşük çap	yüksek çap
<i>Portal ven</i>	350	0	0,02 mm	2,57 mm	0	0
<i>Hepatik arter</i>	350	0	0,01 mm	0,82 mm	0	0
<i>Safra duktusu</i>	0	354	0	0	0,008 mm	0,07 mm
<i>Hepatik ven</i>	16	105	0,15 mm	1,1 mm	0,07 mm	0,60 mm

Toplam 344 adet portal alanda, 350 adet portal ven, 354 adet safra duktusu ve 350 adet hepatik arter izlenmiştir. Kesitlerde 121 adet hepatik ven (vena centralis hepatis) görülmüştür. Bu alanlara h-CD immünohistokimyasal belirteci tekli olarak uygulanmış olup, boyanan ve boyanmayan yapılar damar çapları ile kaydedilmiştir (Tablo 6).

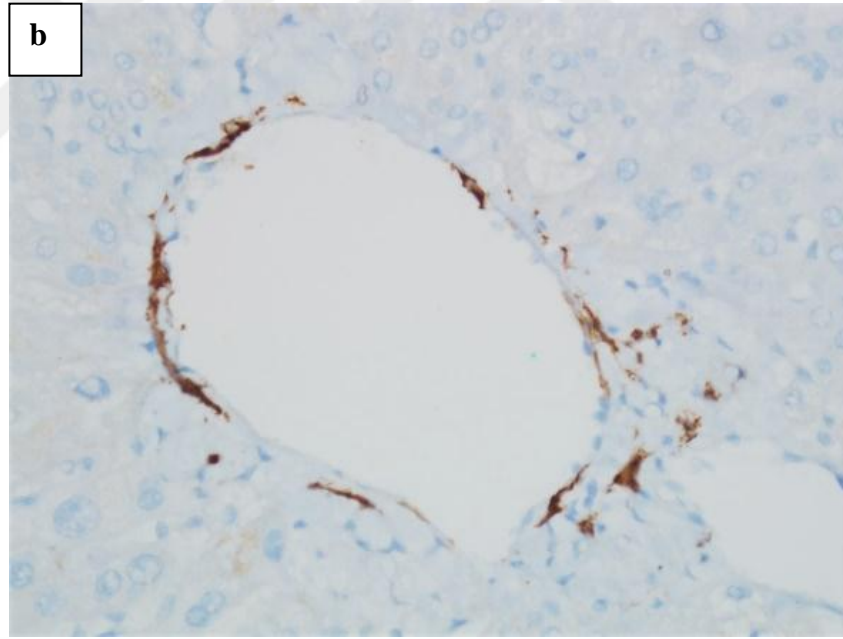
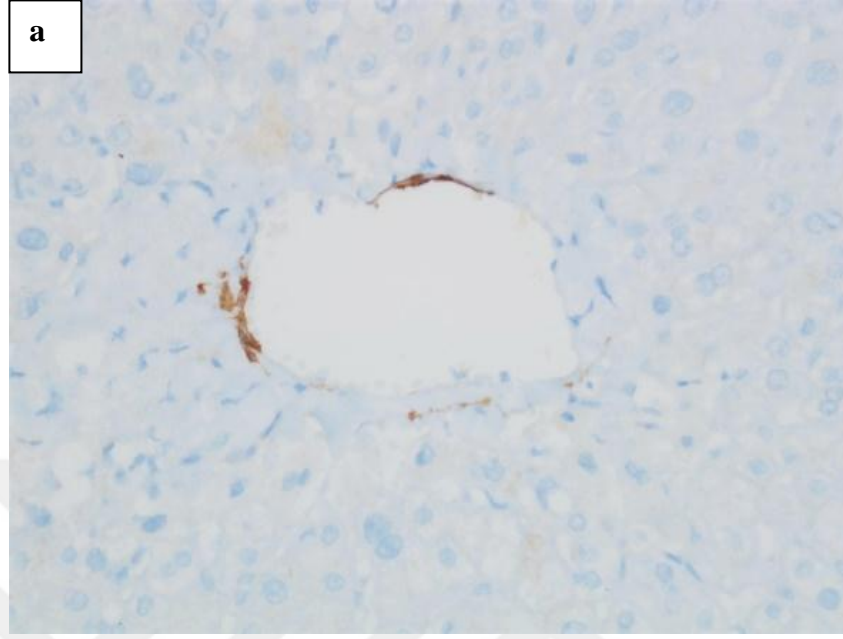
Bu inceleme sonrası safra duktuslarının hiçbirinde h-CD ile boyanma saptanmamıştır. Boyanma izlenmeyen en düşük safra duktusu çapı 0,008 mm olup boyanma görülmeyen en büyük safra duktusu çapı 0,07 mm'dir. Hepatik arterlerin



tamamında h-CD ile boyanma mevcuttur. Boyanma görülen en küçük hepatik arter çapı 0,01 mm, boyanma görülen en büyük hepatik arter çapı 0,82 mm'dir. Portal venlerin tamamında h-CD ile boyanma görülmüştür. Boyanma görülen en küçük portal ven çapı 0,02 mm, boyanma görülen en büyük portal ven çapı 2,57 mm'dir. Bir portal alandaki vasküler elemanlar ve safra duktusunun h-CD ile boyanma paterni Resim 18'de gösterilmiştir.

Normal karaciğer dokularından hazırlanan kesitlerde izlenen toplam 121 adet hepatik venin 16'sında h-CD ile boyanma gözlenirken, 105'inde boyanma saptanmamıştır. Boyanma görülen en düşük hepatik ven çapı 0,15 mm, boyanma görülen en büyük hepatik ven çapı 1,1 mm'dir. Boyanma izlenmeyen en düşük hepatik ven çapı 0,07 mm olup boyanma görülmeyen en büyük hepatik ven çapı 0,60 mm'dir. Boyanma görülen ve boyanma görülmeyen hepatik ven kesitlerine örnekler Resim 19 ve Resim 20'de verilmiştir.

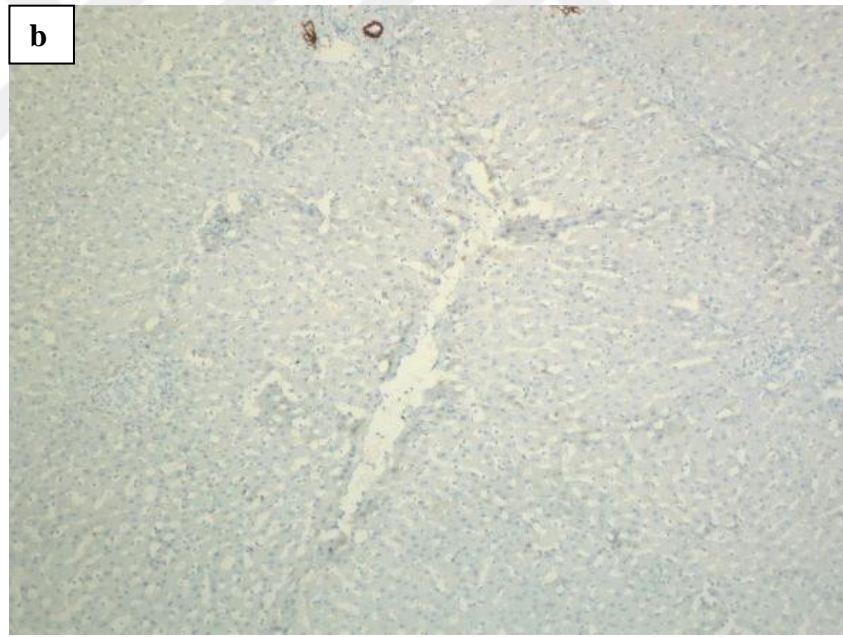
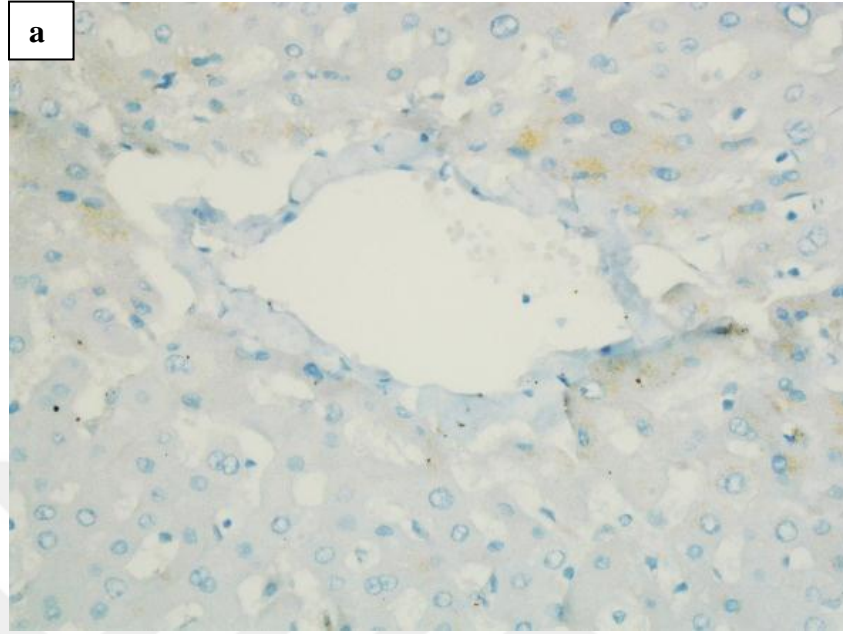




Resim 19: Hepatik venlerde izlenen h-CD boyanma örnekleri.

a) Vasküler duvarda fokal boyanma örneği. Çap: 0,15 mm, h-CDx400

b) Vasküler duvarın tamamen boyandığı bir örnek. Çap: 0,21 mm, h-CDx400



Resim 20: Hepatik venlerde izlenen h-CD boyanma örnekleri.

c) Vasküler duvarda boyanma izlenmeyen damar yapısı. Çap: 0,18 mm, h-CDx400

d) Vasküler duvarda boyanma izlenmeyen damar yapısı. Çap: 0,7 mm, h-CDx100

4.4. İkili İHK Uygulaması Sonrası Vasküler İnvazyon Değerlendirmesi ve Evrelerde İzlenen Değişiklikler

Yukarıda belirtilen kriterlere göre seçilen hastaların ilk patoloji raporlarına Gazi Üniversitesi Hastane Bilgi Yönetim Sistemi'nden ulaşılmış ve ilk bilgiler kaydedilmiştir. Vasküler invazyon varlıkları ikili İHK kullanımı ile tespit edilmiş ve ilk olarak vakaların rapor edildiği tarihte kullanımda olan 7. AJCC'ye göre evrelendirmeler yapılmıştır. Daha sonra şu an kullanılmakta olan 8. AJCC'ye göre evrelendirmeler yapılarak elde edilen veriler kaydedilmiştir. Bu veriler Tablo 3'te sunulmuştur.

Vakaların raporlandığı tarihte 21 adet hastanın 11'inde vasküler invazyon varlığı rapor edilmişken ikili İHK kullanımı sonrası bu sayı 19'a çıkmıştır. İlk raporlamada 4 adet hastada vasküler invazyon varlığı olmadığı belirtilmiş, ikili İHK kullanımı sonrası bu sayı 2'ye düşmüştür. İlk raporlamada vasküler invazyon varlığı belirtilmeyen 6 adet vakanın 5'inde ikili İHK kullanımı sonrası vasküler invazyon varlığı görülmüş olup 1 tanesinde vasküler invazyon saptanmamıştır.

Evrelemedeki değişiklikler incelendiğinde, histolojik evrede pT1 olan 3 adet hastanın 3'ünde de ilk raporlamada vasküler invazyon saptanmamıştır. Bu olgulardan bir tanesine ilk raporlama öncesi yardımcı teknik de uygulanmış (CD34 ve D2-40) fakat vasküler invazyon saptanamamıştır. Bu 3 olgunun 2'sinde ikili İHK çalışma sonrası vasküler invazyon saptanmıştır. Vasküler invazyon görülen bu 2 adet vakanın histolojik evreleri pT1'den pT2'ye yükselmiştir. 1 adet olguda ikili İHK çalışma sonrası da vasküler invazyon görülmemiş olup evresi pT1 olarak kalmıştır. İlk raporlamada histolojik evresi pT2 olarak belirlenen 8

adet olgunun 8'i de pT2 olarak kalmıştır. Fakat bu olgulardan 7 tanesi lenf nodu metastazı varlığı nedeniyle 7.AJCC'de IVA olarak evrelenmişken, 8.AJCC'de değişen kriterler ışığında 7'si de IIIB olarak değişmiştir. 8 adet pT2 olgudan 1 tanesinin prognostik evresi ilk raporlamada da II olup, değişmemiştir. Bu 8 olgudan 3'ünde ilk raporlamada lenfovasküler invazyon belirtilmemiş olup 2 tanesinde ikili İHK uygulanması sonucu vasküler invazyon saptanmıştır. 1 tanesinde vasküler invazyon görülmemiştir. 5 tanesinde ise ikili İHK uygulaması öncesi de vasküler invazyon varlığı rapor edilmiştir. İlk raporlamada pT3 olarak evrelenen 5 adet hastanın 3'ü yeni evreleme sisteminde komşu ekstrahepatik yapılara tümör invazyonunun pT4 olarak kabul edilmesi gerektiği belirtildiğinden pT4 olarak değişmiş, 2 tanesi ise visseral periton infiltrasyonunun pT3 olarak kabulü devam ettiğinden pT3 olarak kalmıştır. Bu olguların 2 tanesi lenf nodu metastazı varlığı nedeniyle 7.AJCC'de IVA olarak evrelenmişken, 8.AJCC'de değişen kriterler ışığında IIIB olarak değişmiştir. Diğer 3 olgu ilk sistemde evre III olarak belirtilmişken, değişen sistemde 2 tanesi IIIA ve 1 tanesi IIIB olarak değiştirilmiştir. Histolojik evresi pT3 olan bu hastaların 2'sinde ilk raporlamada vasküler invazyon varlığı belirtilmemiş olup ikili İHK uygulama sonrası vasküler invazyon varlığı gösterilmiştir. 3'ünde ise ilk raporlamada vasküler invazyon varlığı rapor edilmiştir. İlk raporlamada periduktal tümör invazyonu varlığı nedeniyle pT4 olarak evrelenen 5 adet hastanın 3 tanesi 8.AJCC'de bu kriterin ortadan kalkması nedeniyle pT2 olarak evrelenmiştir. 1 adet olgu visseral periton infiltrasyonu varlığı nedeniyle pT3 olarak evrelenmiş olup 1 tanesi de periduktal tümör invazyonu varlığına ek olarak ekstrahepatik organ infiltrasyonu varlığı

nedeniyle pT4 olarak kabul edilmiştir. Bu hastaların tamamı ilk raporlama sistemine göre evre IVA olup, 2 tanesi evre II, 1 tanesi evre IIIA ve 2 tanesi evre IIIB olarak değişmiştir. Histolojik evresi pT4 olan bu hastaların 1'inde ilk raporlamada vasküler invazyon varlığı belirtilmemiş olup ikili İHK uygulama sonrası vasküler invazyon varlığı gösterilmiştir. 1'inde ilk raporlamada yardımcı teknik (Elastin) kullanılmasına rağmen vasküler invazyon görülmemiş, ikili İHK sonrası vasküler invazyon varlığı görülmüştür. 3 tanesinde ise ilk raporlamada vasküler invazyon varlığı rapor edilmiş olup ikili İHK ile bu veri doğrulanmıştır.

4.4. İkili İHK Uygulaması Sonrası Vasküler İnvazyon Saptanan Odak Tipleri

İlk raporlamada vasküler invazyonun negatif (-) olarak belirtildiği, pozitif (+) olarak belirtildiği ve vasküler invazyonun belirtilmediği toplam vaka sayıları ve bu vakaların ikili İHK uygulama sonrası vasküler invazyon durumlarındaki değişiklikler Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: İkili İHK uygulaması sonrası vaka bazında vasküler invazyon durumlarında ilk raporlamaya göre görülen değişiklikler

		İKİLİ İHK SONRASI		
		(-)	(+)	<i>Toplam</i>
		<i>Sayı (%)</i>	<i>Sayı (%)</i>	<i>Sayı (%)</i>
İLK RAPORLAMA	(-)	1 (%25)	3 (%75)	4 (%100)
	(+)	0 (%0)	11 (%100)	11 (%100)
	<i>Belirtilmemiş</i>	1 (%16,6)	5 (%83,4)	6 (%100)

İkili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyonun görüldüğü odak tiplerinin sayısı ve oranları ilk raporlama dönemi ile kıyaslanarak Tablo 8’de özetlenmiştir.

Tablo 8: İkili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyonun görüldüğü odak tiplerinin sayı ve oranlarında ilk raporlamaya göre görülen değişiklikler

		İKİLİ İHK SONRASI (+)				<i>Ki-kare değeri</i>	<i>P-değeri</i>
		<i>Tip1 Sayı (%)</i>	<i>Tip2 Sayı (%)</i>	<i>Tip3 Sayı (%)</i>	<i>Toplam Sayı (%)</i>		
İLK RAPORLAMA	(-)	5 (8,9)	14 (25,0)	37 (66,1)	56	20,997	<0,001
	(+)	31 (25,8)	53 (44,2)	36 (30,0)	120		
	<i>Belirtilmemiş</i>	8 (16,0)	22 (44,0)	20 (40,0)	50		

Veriler sayı ve (yüzde) olarak verilmiştir.

İlk raporlama durumuna göre ikili İHK sonrası pozitif sonuç veren odakların odak tipine göre farklılık gösterip göstermediği Ki-kare testi ile araştırılmış ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($\chi^2=20,997$; $P<0,001$). Farklılığın hangi odak tipi ya da odak tipleri arasında olduğunu incelemek için Marascuilo yöntemi (post-hoc test) uygulanmış ve Tip3'ün diğer tiplerden anlamlı olarak daha fazla yer aldığı saptanmıştır ($p<0.05$).

İlk raporlamada vasküler invazyonun görülmediği 4 adet vaka ikili immünohistokimyasal boyama sonrası yeniden incelenmiş ve vasküler invazyon görülen bloklar ve bu bloklardaki odak tipleri kaydedilmiştir. Bu 4 vakanın 1'inde (%25) ikili İHK uygulaması sonrası da vasküler invazyon görülmemiş olup, 3'ünde (%75) vasküler invazyon varlığı saptanmıştır (Tablo 7). İkinci inceleme sonrası 56 adet odakta vasküler invazyon varlığı görülmüş olup bu odakların 37'si (%66,1) "Tip 3", 14'ü (%25) "Tip 2" ve 5'i (%8,9) "Tip 1" odak tipindedir (Tablo 8).

İlk raporlamada vasküler invazyon varlığı belirtilmemiş olan 6 adet vaka ikili İHK boyama sonrası yeniden incelenmiş ve vasküler invazyon görülen bloklar ve bu bloklardaki odak tipleri kaydedilmiştir. Bu 6 adet vakanın 1'inde (%16,6) vasküler invazyon görülmemiş olup, 5'inde (%83,4) vasküler invazyon varlığı saptanmıştır (Tablo 7). İkinci inceleme sonrası 50 adet odakta vasküler invazyon görülmüş olup bu odakların 20'si (%40,0) "Tip3", 22'si (%44,0) "Tip 2" ve 8'i (%16,0) "Tip 1" odak tipindedir (Tablo 8).

İlk raporlamada vasküler invazyonun görüldüğü ve bu şekilde raporlandığı 11 adet vaka ikili immünohistokimyasal boyama sonrası yeniden incelenmiş ve

vasküler invazyon görülen bloklar ve bu bloklardaki odak tipleri kaydedilmiştir. Bu 11 vakanın 11'inde de (%100) ikili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyon varlığı saptanmıştır (Tablo 7). İkinci inceleme sonrası 120 adet odakta vasküler invazyon varlığı görülmüş olup bu odakların 36'sı (%30) "Tip 3", 53'ü (%44,2) "Tip 2" ve 31'i (%25,8) "Tip 1" odak tipindedir (Tablo 8).



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada İKK'lerde prognostik açıdan ve evreleme açısından büyük önem taşıyan damar invazyonunun h-CD ve CK19 ikili İHKsı ile daha kolay fark edilmesi amaçlanmış olup, bu yöntemin kullanışlı bulunması sonucunda rutin pratiğe dâhil olması öngörülmüştür. Damar invazyonu değerlendirilirken düz kas belirteçlerinin kullanılmasının tanıyı kolaylaştıracağı ve tanı doğruluğunu arttıracığı düşünülmektedir³. Tümörlerde en önemli prognostik kriter TNM evrelemesi olsa da damar invazyonunun tüm tümörlerde prognostik önem taşıdığı bilinmektedir. İKK tanılı hastaların prognozunda en önemli faktörler lenf nodu metastazı, pozitif cerrahi sınır, perinöral invazyon ve vasküler invazyon olarak literatürde yer almaktadır^{24,25}. Bağımsız bir faktör olarak İKK tanılı hastalarda vasküler invazyon varlığının daha kötü prognostik gidiş ile birlikte olduğu bilinmektedir²⁰. Bu gibi nedenlerle vasküler invazyonun varlığının belirtilmesi hasta açısından önemli olup, CAP kanser raporlama protokolünün zorunlu bir parçasıdır²⁶.

İKK'ler klasik bilgiler ışığında nadir görülen tümörler olarak bilinmelerine rağmen, görülme sıklığı ve mortalite oranları son yıllarda giderek artmaktadır⁷⁻¹². Prognozu kötü olduğu için kanser ilişkili ölümlerde önemli bir yer tutmaktadır. İKK'lerin klinik özellikleri değişkendir; genellikle ileri evrelerde tanı alırlar ve bu nedenle çoğunlukla en önemli tedavi seçeneği olan cerrahi rezeksiyon şanslarını kaybederler. Fakat karaciğer rezeksiyonu sonrasında bile nüks oranı sıktır^{23,41-43}. Yeni görüntüleme tekniklerinin kullanıma girmesi sonrasında erken evre İKK'ler de tanı almakta ve tam cerrahi rezeksiyon ile 5 yıllık sağkalımlar %22-%40 oranlarına ulaşmaktadır^{25,44}.

Son yıllarda, İKK tanılı vakaların artması ile bu konuda klinik merak ve yapılan çalışmalarda artış gözlenmiştir⁴⁵. Buna bir örnek olarak AJCC/UICC'nin 6. baskısında HSK ve İKK'nin histolojik evrelemesi aynı başlık altında toplanmasına rağmen, 7.baskıda İKK evrelemesinin tamamen ayrı bir başlık ve ayrı kriterler altında ele alınması verilebilir⁴⁶. Bu konuda yapılan çalışmalar devam etmiş ve 7. baskıda yer alan periduktal tümör invazyonu varlığının evreyi pT4'e yükseltmesi gereksiz abartılı bulunarak bu ibare 8. baskıda tamamen kaldırılmıştır. Ayrıca bu süreçte yapılan çalışmalarda tümör çapının önemi de fark edilmiş olup 7. baskıda bu konudan söz edilmemesine rağmen 8. baskıda evre 1 tümörler 5 cm'den küçük ve büyük olmalarına göre iki gruba ayrılmıştır^{15,47}. Bu baskıda da önemini koruyan vasküler invazyon varlığı, diğer faktörlerden bağımsız olarak evreyi pT2'ye yükseltmektedir.

Literatür taraması yapıldığında, vasküler invazyonun tek başına bir çalışmada araştırılmadığı görülmüş olup, birkaç faktörün vasküler invazyon ile birlikteliğinin araştırıldığı ve bu birlikteliklerin prognoza etkilerinin incelendiği dikkati çekmiştir. Spolverato ve arkadaşları⁴⁸ yaptıkları bir çalışmada, kötü prognoz ile giden tümör boyutu artışının mikroskopik ve makroskopik vasküler invazyon görülme oranını da artırdığını belirtmişlerdir. Daha önce HSK'ler ile yapılan bir çalışmada Pawlik ve arkadaşları⁴⁹, 5 cm'den küçük HSK'lerde 5 cm'den büyük HSK tümörlerine göre daha fazla mikroskopik vasküler invazyon görüldüğünü ve bu durumun prognozu kötüleştirdiğini saptamışlardır. Spolverato ve arkadaşlarının dediğine göre⁴⁸, literatürde İKK'ler ile ilgili böyle bir çalışma daha önce yapılmamış olup, kendi çalışmalarında HSK'lerde yapılan çalışma

sonuçları ile korelasyon bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada⁴⁸, orta derecede diferansiye ve az diferansiye İKK'lerde daha fazla mikroskopik vasküler invazyon görüldüğü ve bunun da kötü prognoz ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Perinöral invazyon ve lenf nodu metastazı varlığının da bağımsız birer faktör olarak vasküler invazyon varlığında daha fazla görüldüğü bulunmuş ve prognostik açıdan anlamlı görülmüştür. Bununla birlikte Ribero ve arkadaşlarının⁵⁰ yaptığı çok merkezli bir çalışmada vasküler invazyon varlığı, lenf nodu metastazı, birden çok tümör odağı varlığı ve artmış CA 19-9 seviyelerinin her biri bağımsız olarak kötü prognostik gidiş ile birlikte görülürken, tümör boyutunun tek başına kötü prognoz ile ilişkisinin olmadığı belirtilmiştir. Ribero ve arkadaşlarına⁵⁰ göre tümör boyutunun artması; metastatik lenf nodu sayısında artış, vasküler invazyon varlığı ve birden çok tümör odağı görülme riskini artırmasına rağmen tek başına kötü prognoz ile ilişkili değildir. Suzuki ve arkadaşları⁵¹, İKK tanılı ve hepatektomi uygulanan 19 adet hastada yaptıkları bir çalışmada, portal vena tümör invazyonu görülen hastaların 5 yıllık sağkalımlarının %0 olduğunu, bununla birlikte portal ven invazyonu görülmeyen hastalarda 5 yıllık sağkalımın %44 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Guglielmi ve arkadaşlarının yaptıkları 52 adet İKK tanısı ile cerrahi rezeksiyona giden hastanın katıldığı bir çalışmada da⁵², vasküler invazyonu olan hastalarda 5 yıllık sağkalımın %0 olduğu, vasküler invazyonu görülmeyen hastalarda ise 5 yıllık sağkalımın %25 oranında olduğu tespit edilmiştir (p = 0.01). Hyder ve arkadaşları⁵³, İKK'de kötü giden prognozu bir "nomogram" modeli üzerinden tahmin etmeyi sağlayan bir öneri ortaya koymuş ve bu amaçla 514 hastadan oluşan çok merkezli bir çalışma yapmışlardır.

Bu çalışmada, prognozu etkileyen en önemli faktörler olarak belirlenen 6 adet değişken üzerinden bir “nomogram” modeli oluşturulmuştur. Bu 6 değişken, hasta yaşı, tümör boyutu, lezyonun sayısı, lenf nodu metastaz durumu, vasküler invazyon (makroskopik/mikroskopik) ve zeminde siroz varlığıdır. Bu değişkenlerden hasta yaşı, tümör boyutu, lezyonun sayısı, lenf nodu metastaz durumu ve makroskopik vasküler invazyon bağımsız olarak doğrudan mortalite ile ilişkili bulunurken (tamamı $p < .05$), siroz varlığı sadece kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur ($p = .08$).

Ekinci ve arkadaşlarının 27 gastrik, 35 pankreatik ve 30 kolorektal karsinom materyali üzerinde yaptıkları bir çalışmada³, vasküler invazyon görülen tüm odakların sadece H&E boyası ile rahatlıkla görülemeyebileceği ve bu odakların vasküler duvarı işaretleyen h-CD gibi düz kas belirteçleri ile daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğinden bahsedilmiştir.

Çalışmamızda H&E boyalı preparatlar taranmış ve vasküler invazyondan şüphelenilen odaklara, belirlediğimiz immünohistokimyasal belirteçler, ikili olarak (“double-stain”) uygulanmıştır. Bu uygulama sonrası sadece şüphelenilen odakların değil, H&E boyasında fark edilemeyen yahut mevcut kriterlerle öngörüleemeyebilen bazı odaklarda da boyanma görülmüştür (Tip 3 odakları). Bu odaklara H&E boyalı preparatlarda tekrar yakından bakıldığında, “Tip 3” olarak sınıflandırılan odakların bir kısmının H&E boyalı preparatlarda hiçbir şekilde fark edilemediği, bir kısmının vasküler alanlar belirgin olmasına karşın içlerinde tümör hücresi içermediği düşünüldüğünden (ancak ikili İHK boyamasında tümörün CK19 ile pozitif boyanması ile fark edilen) vasküler invazyon olarak

değerlendirilmediği, bir kısmının ise “çevre dokudan mesafeli bir sınırla ayrılması (distant circumscribed stroma)” odağı bulgusu taşıdığı görülmüştür. Bu odaklar, Ekinci ve arkadaşlarının çalışması³ ile benzer olarak, H&E boyasında ayırt edilemediği için özel boyama yöntemleri olmadan gözden kaçırılmaktadır.

Vasküler invazyon odaklarına bakıldığında çalışmamızda en çok saptanan odak tipi “Tip 3”tür (%41,3). Bu odakları saptanma miktarına göre sırasıyla “Tip 2”(%39,3) ve “Tip 1” odaklar (%19,4) takip etmektedir. Bu durum İKK’lerde vasküler invazyon odaklarının büyük kısmının H&E boyalı lamlarda yardımcı bir teknik olmadan görülemeyebileceğini göstermektedir.

İlk raporlamada vasküler invazyon olmadığı belirtilen 4 adet vakanın 3’ünde (%75) ikili h-CD ve CK19 İHK uygulaması ile vasküler invazyon varlığı saptanmıştır. İlk raporlamada vasküler invazyon olmadığı belirtilen 4 vakanın 1 tanesinde ilk raporlama öncesinde CD34 ve D2-40 immünohistokimyasal belirteçleri uygulanmış olup bu uygulamaya rağmen vasküler invazyon varlığı gösterilememiştir. Bu bulgu da göstermektedir ki, h-CD gibi bir düz kas belirteci, CD34 ve D2-40 gibi endotel belirteçlerinden daha spesifik olarak vasküler duvarı boyamakta ve vasküler invazyonun saptanmasına yardımcı olabilmektedir. İlk raporlamada vasküler invazyon olmadığı belirtilen 4 adet vakanın sadece 1’inde (%25) ikili İHK uygulaması sonrasında da vasküler invazyon olmadığı görülmüştür.

İlk raporlamada vasküler invazyon olmadığı raporlanan, ikili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyon varlığı saptanan vakalardaki odak tipleri

incelenmiş olup bu odakların en fazla “Tip 3” odaklardan (%66,1) oluştuğu saptanmıştır. Bu oranları sırasıyla “Tip 2”(%25,0) ve “Tip 1” odakları (%8,9) takip etmektedir. “Tip 1” odakları, çalışmamızda tümör odağının bir damar lümeninde olduğunu yüksek olasılıkla düşündüren odaklar olarak tanımlanmış olup, yardımcı bir tekniğe gerek kalmadan, sadece H&E boyası ile görülebilecek vasküler invazyon odaklarını ifade etmektedir. İlk raporlamada vasküler invazyonun görülmediği fakat ikili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyon saptanan olgulardaki en az görülen odak tipinin “Tip 1” olması, İKK tanılı hastalarda yardımcı teknik kullanılmadan vasküler invazyon görülebilme imkânının az olduğunu göstermektedir. “Tip 3” odaklar tarafımızdan, H&E kesitlerde vasküler invazyondan şüphelenilmeyen, H-CD ve CK19 ikili İHK uygulaması sonrası tesadüfen fark edilen odaklar olarak tanımlanmıştır. Bu odaklar ikili İHK uygulaması sonrası H&E kesitlere dönülüp tekrar incelendiğinde, tümör odağının etrafındaki stroma ile bunun daha dışındaki stroma arasında seçilebilen bir sınırın olduğu odaklar; “çevre dokudan mesafeli bir sınırla ayrılma (distant circumscribed stroma)” izlenmiş olup, bir kısmının ise damar olduğu düşünülen alan fark edilmiş fakat damar yapısı içinde ilk kesitlerde tümör hücresi görülmediği dikkati çekmiştir. Bu nedenle, vasküler yapıyı işaretleyen yardımcı bir teknik olmadan “Tip 3” olarak tanımladığımız vasküler invazyon odaklarının fark edilmesi neredeyse imkânsızdır. “Tip 2” odakların tanımında ise tümör odağının etrafında, damar duvarı olduğundan şüphelenilen, tümör odağını “manşonvari örüntüde tamamıyla veya kısmen sarmalayan”, fakat boş lümen veya eritrosit varlığının görülmediği odaklardan bahsedilmiştir.

Çalışmamızda, ilk raporlamada vasküler invazyonun görülmediği vakalarda, ikili İHK uygulaması sonrası en çok izlenen odak tiplerinin “Tip 3” ve bunu takiben “Tip 2” olması odak tanımlamalarımızın doğruluğunu kanıtlar nitelikte olup, raporlanan ilk tarihte yardımcı teknik kullanılmadığı için bu odakların gözden kaçmasının muhtemel olduğu düşüncemizi desteklemektedir.

Vasküler invazyon odakları, karaciğerde yerleşim yerlerine göre sınıflandırıldığında, tüm odakların en fazla intrahepatik yerleşim gösterdiği görülmüştür (%63,7). Ayrıca odak tiplerine göre bakılacak olursa, “Tip 3” odakların istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla intrahepatik yerleşim gösterdiği dikkati çekmiştir. İKK tanılı hastalarda vasküler invazyon odaklarının yerleşim yerlerine göre incelenmesi ile ilgili bir çalışma İngilizce literatürde mevcut değil iken kolon karsinomlarında görülen vasküler invazyonun intramural / ektramural yerleşimi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Kolon karsinomları ile ilgili yapılan birçok çalışmada ektramural venöz invazyonun bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterilmiş olmasına karşın⁵⁴⁻⁵⁸, intramural venöz invazyonun prognostik önemi olduğunu ortaya koyan 1 çalışma vardır⁵⁹. İKK tanılı hastalarda vasküler invazyonun daha fazla intrahepatik yerleşim göstermesinin prognostik açıdan önemi bilinmemekte olup, patoloğlar için vasküler invazyonun araştırılması gereken bölgenin belirlenmesi açısından belirleyici olabilir. Bu konuda prognoz ile ilişkilendirilen yeni çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

AJCC/UICC evrelendirme sistemine göre vasküler invazyon varlığı, İKK tanılı hastalarda pT evresini pT1’den pT2’ye yükseltmekte ve bu da hastaların

prognozu açısından önem arz etmektedir⁶⁰. Çalışmamızda belirtilen amaca yönelik yapılan incelemede İKK tanılı 21 adet hastanın karaciğer rezeksiyonları yeniden değerlendirilmiş ve pT evrelemeleri, görülen yeni vasküler invazyon varlığı bilgileri ile yeniden düzenlenmiştir. Bunun sonucunda, ilk raporlamada evresi pT1 olan 3 adet vakanın 2 tanesinin (%66) evresi pT2'ye yükselmiştir. Çalışmamızda yer alan hasta sayısının az olması nedeniyle sayısal olarak az görülen bu değer, oran olarak bakıldığında fazla ve önemlidir. Bu vakaların pT2 olması, ilk raporlamada sadece H&E boyası ile fark edilmeyen vasküler invazyon varlığının ikili İHK uygulaması sonrası görülmesi nedeniyle gerçekleşmiştir. Bu açıdan, daha geniş vaka sayıları ile yeni çalışmalar yapılmasının gerekliliği ön plana çıkmaktadır.

Çalışmamızda incelenen vakaların tamamının AJCC/UICC kanser evreleme sistemine göre evrelendirilmiş olması ve çalışmanın yapıldığı tarihte 8.AJCC/UICC kanser evreleme sisteminin yayımlanmış olması nedeniyle, çalışmaya dâhil edilen tüm vakalar yenilenen sisteme göre yeniden evrelendirilmiştir. Bu yeni sisteme göre, çalışmamızda yer alan ve ilk raporlamada pT2a ve pT2b olarak raporlanan toplam 8 adet vakanın 8'i de yeni evreleme sisteminde pT2 olarak kalmıştır. pT3 olarak raporlanan 5 adet vakanın 2 tanesi pT3, 3 tanesi pT4 olmuştur. Önceki sisteme göre pT3 olarak değerlendirilen lokal ekstrahepatik yapılara direkt invazyon, yeni evreleme sistemine göre evreyi pT4 olarak değiştirmektedir. Çalışmamıza dâhil edilen vakalardan pT3 olan 5'inin evresi bu nedenle pT4 olarak değişmiştir. Evresi pT3 olarak kalan 2 vaka ise karaciğer kapsül invazyonunun yeni sistemde de aynı tanımı içermesi nedeniyle

gerçekleşmiştir. Önceki evreleme sistemine göre en büyük değişiklik pT4 evrelemede olmuştur. AJCC/UICC'nin yedinci baskısı üzerinde yapılan çalışmalarda^{15,22} periduktal invazyonun prognostik açıdan öneminin olmadığı görülmüş ve bu nedenle periduktal invazyon varlığının evreyi tek başına pT4 olarak belirlemesinden vazgeçilmiştir. Çalışmamızda, ilk raporlamada periduktal invazyon varlığı nedeniyle pT4 olarak raporlanan 5 adet vakanın 3'ü pT2 olarak değişmiştir. Periduktal invazyona ek olarak, viseral periton perforasyonu içeren 1 vaka pT3 olmuş, çevre dokulara lokal invazyon içeren 1 adet vaka pT4 olarak kalmıştır. Çalışmamızda hastaların prognostik gidişleri ile ilgili veri elde edilemediği için bu konuda bir kıyaslama yapılamamış fakat bu konuda yapılan çalışmalar literatürden araştırılmıştır. Spolverato ve arkadaşlarının²² 7. ve 8. AJCC evreleme sistemlerini karşılaştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, histolojik evrelere bakıldığında, 8. AJCC'ye göre yapılan evrelemede pT1b evresindeki hastaların (%36.7) pT2 hastalara göre (%29.3) daha iyi bir 5 yıllık sağkalım gösterdikleri görülmüştür. Ama paradoksal olarak pT3 evresindeki hastaların (%45.8) pT1b ve pT2 evresindeki hastalara göre daha iyi bir 5 yıllık sağkalım gösterdikleri izlenmiştir. Bununla birlikte, 7. AJCC'ye göre yapılan evrelemede de benzer olarak pT3 hastalarının (%42.5) pT2b (%20.9) ve pT2a (%35.7) ile kıyaslandığında daha iyi bir 5 yıllık sağkalım gösterdiği görülmüştür. 7. ve 8. AJCC'de pT3 hastaları pT1 ile karşılaştırıldığında pT3 hastalarında daha fazla ölüm oranı saptanmış (AJCC 8th ed. T3 vs. T1,HR 1.6595%CI, 1.22-2.24 P = 0.001), fakat pT1b ve pT2 hastalarından daha düşük ölüm oranı kaydedilmiştir. Bu veriler, histolojik evreyi pT3 olarak belirleyen visseral periton

perforasyonunun, prognozu vasküler invazyon varlığı kadar kötü etkilemediğini göstermektedir.

İlk raporlamada vasküler invazyonun görülmemesi nedeniyle, prognostik evre (TNM) açısından evre I olarak değerlendirilen 3 adet vakanın 2'si, çalışmamızda uygulanan ikili İHK uygulaması sonrası evre II olarak değişmiştir. Bu 2 hastanın prognostik evresinin yükselmesi ilk raporlamada vasküler invazyon varlığının görülmesinin önemini göstermektedir. AJCC'nin prognostik evre gruplarındaki değişiklikler açısından vakalar incelendiğinde, ilk raporlamada evre II ve evre III olarak değerlendirilen toplam 4 adet vakanın evresinde bir değişiklik olmamış, evre IVA olarak değerlendirilen vakalarda değişiklikler izlenmiştir. Önceki evrelendirme sistemine göre, T evresinin T4 olması ve T evresi kaç olursa olsun lenf nodu metastazı varlığı prognostik evreyi IVA olarak değiştiriyorken, yeni evreleme sisteminde bu tanımlama değişmiş, T evresinin T4 olması ve T evresi kaç olursa olsun lenf nodu metastazı varlığının evreyi IIIB olarak belirlemesi uygun görülmüştür¹⁵. Çalışmamıza dâhil edilen vakalardan 11'i lenf nodu metastazı varlığı nedeniyle ilk raporlamada evre IVA iken, yeni evreleme sistemine göre evre IIIB olarak değişmiştir. 2 vaka periduktal invazyon varlığı nedeniyle ilk evreleme sistemine göre evre IVA olarak evrelenmişken, değişen evreleme sistemine göre evre II olarak değişmiştir. 1 adet vakanın ise periduktal invazyon varlığına ek olarak viseral periton perforasyonu içermesi nedeniyle histolojik evresi T4'ten T3'e değişmiş, prognostik evresi de IIIA olarak yenilenmiştir. Spolverato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada²², 8. AJCC'ye göre, prognostik evre arttıkça 5 yıllık sağkalım genellikle düşmektedir. Fakat evre IIIA

hastalardaki 5 yıllık sağkalım evre IA hastalar ile çok yakın bulunmuştur. Bu bulgu 7. AJCC ile benzerdir. Ölüm oranlarına bakılacak olursa, evre IIIA hastalar evre I hastalara göre 8. AJCC'ye göre sınıflandırıldığında daha fazla bir oran göstermektedir fakat bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu veriler ışığında, 8. AJCC ölüm riskini belirlemede T3 ve evre IIIA hastalar açısından daha başarılıdır fakat prognostik açıdan 7.AJCC'ye göre bir üstünlüğü bulunmamaktadır. İKK tanılı hastaların T evrelemelerinde ve prognostik evrelemelerinde yeni çalışmalara ve yeni sistem araştırmalarına ihtiyaç vardır²².

Lenf nodu metastazı ve perinöral invazyon varlığı, İKK tanılı hastalarda kötü prognoz ile ilişkili parametrelerdir^{24,25}. Spolverato ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, lenf nodu metastazı varlığı ve perinöral invazyon varlığı bağımsız parametreler olarak, 5 cm'den büyük çaplı İKK'lerde vasküler invazyon görülme olasılığını artırmaktadır⁴⁸. Çalışmamızda, Spolverato ve arkadaşlarının çalışmasını destekler nitelikte, perinöral invazyon görülen olguların %93.4'ünde vasküler invazyon saptanmıştır. Prognostik önemi ve klinisyene vereceği mesaj açısından perinöral invazyon varlığının veya yokluğunun raporlarda belirtilmesi çok önemlidir.

Lenf nodu metastazı, T evresinden bağımsız olarak İKK tanılı hastaların prognostik evrelerini yükseltmekte ve tedavi protokolünü değiştirmektedir¹⁵. Bu nedenle lenf nodu diseksiyonunun seçilen İKK tanılı hastalarda yapılması önerilmektedir²³. Çalışmamızda hastane bilgi yönetim sisteminden elde ettiğimiz veriler ışığında, 21 adet hastanın 16'sında lenf nodu diseksiyonu yapılmış, bu

hastaların 11'inde lenf nodu metastazı saptanmıştır. 5 tanesinde ise lenf nodu diseksiyon bilgisine ulaşılammıştır. Lenf nodu metastazı varlığının evrelendirmeyi ve tedavi protokolünü değiştiriyor olması nedeniyle, lenf nodu diseksiyonunun yapılması ve değerlendirilmesi çok önemlidir.

Literatüre bakıldığında, İKK etyolojisi hâlâ net olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, etyolojide ön planda viral hepatitler (özellikle hepatit C ve hepatit B) ⁶¹⁻⁶³, obezite ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı bulunmaktadır¹⁷. Viral hepatitler ve İKK ilişkisinin aydınlatılması amacıyla günümüze kadar çok sayıda çalışma yapılmış fakat ilişki varlığı açısından kesin bir sonuca varılmamıştır. Çalışmaların bir kısmında hepatit C ile İKK ilişkisi belirtilirken⁶²⁻⁶⁶, bir kısmında ise hepatit B ve İKK ilişkisi ön plana çıkmaktadır⁶⁷⁻⁶⁹. Hastane bilgi yönetim sisteminden elde ettiğimiz veriler ışığında, çalışmamıza dâhil edilen 21 adet hastanın 16'sında (%76,1) viral hepatit varlığı mevcut değil iken, 4'ünün Hepatit B (%19) ve 1'inin Hepatit C hastası (%4,9) olduğu görülmüştür. Çalışmamızdaki viral hepatit varlığı görülen hastalarda İKK'ye zemin hazırlanmış olabileceği düşünölmekle birlikte, viral hepatit görölmeyen İKK hastalarının çoğunlukta olması, literatür verileri ile uyumlu bulunmamıştır.

Çalışmamızda h-CD immünohistokimyasal belirtecinin duyarlılığını araştırmak amacıyla ayrıca, tümörsüz karaciğer dokularından incelemeler yapılmıştır. Bu dokularda yapılan boyama sonucunda, h-CD boyası ile portal ven ve hepatic arterlerin tamamıyla pozitif boyandığı dikkati çekmiştir. Safra duktuslarının hiçbirinde h-CD ile boyanma saptanmamıştır. Bu bulgular ile portal

vende görülmesi muhtemel bir vasküler invazyonun, damarın çapı kaç cm olursa olsun h-CD boyası ile gözden kaçmayacağı gösterilmiş olmaktadır. Safra duktuslarında boyanma olmaması ile h-CD ile portal alanda vasküler yapıdan başka bir lümenli alanda boyanma olmadığı ve bu belirtecin vasküler invazyonu gösterme açısından ne kadar duyarlı olduğu ortaya koyulmuştur. Hepatik venlere bakıldığında ise durumun bu şekilde olmadığı izlenmiştir. Karaciğer dokularından hazırlanan kesitlerde izlenen hepatik venlerin sadece %13,2'sinde h-CD ile fokal ya da diffüz boyanma izlenmiş, %86,8'inde hiç boyanma görülmemiştir. Hepatik venlerde boyanma izlenen en küçük damar lümeninin çapı 0,15 mm olup bu çapın altındaki hepatik venlerde bir pozitiflik saptanmamıştır. Bu bulgular ile hepatik venlerde araştırılan bir vasküler invazyonun ancak 0,15 mm'ye kadar h-CD belirteci ile gösterilebileceği, daha küçük çaplarda yeterli oranda yardımcı olamayacağı anlaşılmıştır.

6. SONUÇLAR

1. Tümöre ait kesitler incelendiğinde, H&E boyalı lamlarda gözden kaçırılabilir, çalışmamızda ancak yardımcı teknikler ile ortaya çıkarılabildiğini gösterdiğimiz damar invazyonu odakları mevcuttur. Bu odaklar “Tip 3” olarak adlandırılmıştır.

2. Vasküler invazyon odaklarına bakıldığında en çok saptanan odak tipinin Tip 3 ve bunu takiben Tip 2 olması, İKK’lerde vasküler invazyon odaklarının büyük kısmının H&E boyalı lamlarda yardımcı bir teknik olmadan görülemeyebileceğini göstermektedir.

3. H&E boyalı lamlarda ilk raporlamada fark edilmeyen, ikili İHK uygulaması ile vasküler invazyon varlığının gösterildiği, bunun sonucunda histolojik ve prognostik evrenin yükseltildiği hastalar mevcuttur.

4. İlk raporlamada saptanamayan vasküler invazyonun ikili İHK kullanımı sonrası fark edilip histolojik ve prognostik evrenin yükseltildiği hastalarda en fazla görülen odak tipi “Tip 3”tür.

5. İkili İHK ile fark edilen “Tip 3” odaklar H&E boyalı lamlara dönülüp tekrar bakıldığında, bu odakların bir kısmının, etrafındaki stroma ile bunun daha dışındaki stroma arasında seçilebilen bir sınırının olduğu görülmüş ve bu görünüm “çevre dokudan mesafeli bir sınırla ayrılma (distant circumscribed stroma)” olarak isimlendirilmiştir.

6. Vasküler invazyon odakları, karaciğerde yerleşim yerlerine göre sınıflandırıldığında, tüm odaklar en fazla intrahepatik yerleşim göstermektedir. “Tip 3” odaklar diğer odak tiplerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede

daha fazla intrahepatik yerleşim göstermektedir. İKK tanılı hastalarda vasküler invazyonun daha fazla intrahepatik yerleşim göstermesinin prognostik açıdan önemi bilinmemekte olup, patoloğlar için vasküler invazyonun araştırılması gereken bölgenin belirlenmesi açısından belirleyici olabilir.

7. h-CD portal ven ve hepatik arterin tüm dallarında pozitif boyanırken, hepatik ven dallarında aynı etkiyi göstermemektedir. h-CD, hepatik venlerde aranan vasküler invazyon için uygun bir belirteç olmadığı düşünölmüştür.

8. h-CD safra duktuslarını hiçbir şekilde boyamamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-1474. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
2. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol*. 2003;16(4):376-388. doi:10.1097/01.MP.0000062859.46942.93
3. Ekinci Ö, Öğüt B, Çelik B, Dursun A. Compared With Elastin Stains, h-Caldesmon and Desmin Offer Superior Detection of Vessel Invasion in Gastric, Pancreatic, and Colorectal Adenocarcinomas. *Int J Surg Pathol*. 2018. doi:10.1177/1066896917752442
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
5. Blechacz B. Cholangiocarcinoma: Current knowledge and new developments. *Gut Liver*. 2017;11(1):13-26. doi:10.5009/gnl15568
6. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical Diagnosis and Staging of Cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;8(9):512-522. doi:10.1038/nrgastro.2011.131.Clinical
7. Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*. 2008;10(2):77-82. doi:10.1080/13651820801992641
8. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin*

Liver Dis. 2004;24(2):115-125. doi:10.1055/s-2004-828889

9. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology.* 2001;33(6):1353-1357. doi:10.1053/jhep.2001.25087
10. Patel T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer.* 2002;2. doi:10.1186/1471-2407-2-10
11. Poultsides G a, Zhu AX, Choti M a, Pawlik TM. Intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Clin North Am.* 2010;90(4):817-837. doi:10.1016/j.suc.2010.04.011
12. Aljiffry M, Abdulelah A, Walsh M, Peltekian K, Alwayn I, Molinari M. Evidence-Based Approach to Cholangiocarcinoma: A Systematic Review of the Current Literature. *J Am Coll Surg.* 2009;208(1):134-147. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.09.007
13. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, et al. Cholangiocarcinoma: Thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg.* 2007;245(5):755-762. doi:10.1097/01.sla.0000251366.62632.d3
14. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet.* 2014;383(9935):2168-2179. doi:10.1016/S0140-6736(13)61903-0
15. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK W, MK. *AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition.* New York, NY: Springer; 2017.
16. Hirohashi K, Uenishi T, Kubo S, et al. Macroscopic types of intrahepatic cholangiocarcinoma: Clinicopathologic features and surgical outcomes. *Hepatogastroenterology.* 2002;49(44):326-329.

17. Lafaro KJ, Cosgrove D, Geschwind JFH, Kamel I, Herman JM, Pawlik TM. Multidisciplinary care of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: Updates in management. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/860861
18. Park J, Kim MH, Kim KP, et al. Natural history and prognostic factors of advanced cholangiocarcinoma without surgery, chemotherapy, or radiotherapy: A large-scale observational study. *Gut Liver.* 2009;3(4):298-305. doi:10.5009/gnl.2009.3.4.298
19. Farley DR, Weaver AL, Nagorney DM. "Natural History" of Unresected Cholangiocarcinoma: Patient Outcome After Noncurative Intervention. *Mayo Clin Proc.* 1995;70(5):425-429. doi:10.4065/70.5.425
20. de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment. *J Clin Oncol.* 2011;29(23):3140-3145. doi:10.1200/JCO.2011.35.6519
21. Moeini A, Sia D, Bardeesy N, Mazzaferro V, Llovet JM. Molecular Pathogenesis and Targeted Therapies for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(2):291-300. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3296
22. Spolverato G, Bagante F, Weiss M, et al. Comparative performances of the 7th and the 8th editions of the American Joint Committee on Cancer staging systems for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2017;115(6):696-703. doi:10.1002/jso.24569

23. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2014;60(6):1268-1289. doi:10.1016/j.jhep.2014.01.021
24. Kokudo N, Makuuchi M. Extent of resection and outcome after curative resection for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2002;11(4):969-983. doi:10.1016/S1055-3207(02)00040-6
25. Tabrizian P, Jibara G, Hechtman JF, et al. Outcomes following resection of intrahepatic cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*. 2015;17(4):344-351. doi:10.1111/hpb.12359
26. Washington MK, Berlin J, Branton P, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(10):1539-1551. doi:10.1043/1543-2165-133.10.1539
27. Sobue K, Tanaka T, Kanda K, Ashino N, Kakiuchi S. Purification and characterization of caldesmon77: a calmodulin-binding protein that interacts with actin filaments from bovine adrenal medulla. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(15):5025-5029. doi:10.1073/pnas.82.15.5025
28. Sobue K, Muramoto Y, Fujita M, Kakiuchi S. Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(9):5652-5655.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=348816&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
29. Watanabe K, Kusakabe T, Hoshi N, Saito A, Suzuki T. h-Caldesmon in

leiomyosarcoma and tumors with smooth muscle cell-like differentiation:
Its specific expression in the smooth muscle cell tumor. *Hum Pathol.*
1999;30(4):392-396. doi:10.1016/S0046-8177(99)90113-2

30. Stewart CJR, Hillery S, Platell C. Caldesmon is useful in demonstrating extramural venous invasion in colorectal carcinomas showing mucinous differentiation. *Pathology.* 2012;44(1):48-51.
doi:10.1097/PAT.0b013e32834e426d
31. Roberts JA, Waters L, Ro JY, Zhai QJ. Smoothelin and caldesmon are reliable markers for distinguishing muscularis propria from desmoplasia: A critical distinction for accurate staging colorectal adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(2):792-796.
32. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 2004;37(7):529-540.
doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.009
33. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry 4th Edition.*; 2014.
doi:10.1017/CBO9781107415324.004
34. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002;40(5):403-439. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x
35. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL.
Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 2001;14(4):338-342. doi:10.1038/modpathol.3880312
36. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, et al. Cytokeratin 19 expression in

- hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci.* 2003;94(10):851-857. doi:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01366.x
37. Durnez A, Verslype C, Nevens F, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology.* 2006;49(2):138-151. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02468.x
 38. Miettinen M. Keratin immunohistochemistry: update of applications and pitfalls. *Pathol Annu.* 1993;Pt 2:113-143.
 39. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene.* 2006;25(27):3818-3822.
doi:10.1038/sj.onc.1209558
 40. Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy International Student Edition.* Second. (Gardner JN, ed.). Baltimore, MD 21202, U.S.A.: Williams&Wilkins; 1985.
 41. Njei B. Changing pattern of epidemiology in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2014;60(3):1107-1108.
doi:10.1002/hep.26958
 42. Lubezky N, Facciuto M, Harimoto N, Schwartz ME, Florman SS. Surgical treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma in the USA. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2015;22(2):124-130. doi:10.1002/jhbp.157
 43. Yamamoto M, Ariizumi S. Surgical outcomes of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Today.* 2011;41(7):896-902.
doi:10.1007/s00595-011-4517-z

44. Spolverato G, Kim Y, Alexandrescu S, et al. Management and Outcomes of Patients with Recurrent Intrahepatic Cholangiocarcinoma Following Previous Curative-Intent Surgical Resection. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(1):235-243. doi:10.1245/s10434-015-4642-9
45. Tsai S, Nathan H, Pawlik TM. Primary liver cancer: Intrahepatic cholangiocarcinoma emerges from the shadows. *Updates Surg*. 2010;62(1):5-9. doi:10.1007/s13304-010-0011-1
46. Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual, 7th Edition*. Springer. doi:10.1007/978-1-4757-3656-4
47. Hwang S, Lee YJ, Song GW, et al. Prognostic Impact of Tumor Growth Type on 7th AJCC Staging System for Intrahepatic Cholangiocarcinoma: a Single-Center Experience of 659 Cases. *J Gastrointest Surg*. 2015;19(7):1291-1304. doi:10.1007/s11605-015-2803-6
48. Spolverato G, Ejaz A, Kim Y, et al. Tumor Size Predicts Vascular Invasion and Histologic Grade Among Patients Undergoing Resection of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2014;18(7):1284-1291. doi:10.1007/s11605-014-2533-1
49. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant*. 2005;11(9):1086-1092. doi:10.1002/lt.20472
50. Ribero D, Pinna AD, Guglielmi A, et al. Surgical Approach for Long-term

Survival of Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multi-institutional Analysis of 434 Patients. *Arch Surg*. 2012;147(12):1107-1113. doi:10.1001/archsurg.2012.1962

51. Suzuki S, Sakaguchi T, Yokoi Y, et al. Clinicopathological prognostic factors and impact of surgical treatment of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg*. 2002;26(6):687-693. doi:10.1007/s00268-001-0291-1
52. Guglielmi A, Ruzzenente A, Campagnaro T, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: Prognostic factors after surgical resection. *World J Surg*. 2009;33(6):1247-1254. doi:10.1007/s00268-009-9970-0
53. Hyder O, Marques H, Pulitano C, et al. A nomogram to predict long-term survival after resection for intrahepatic cholangiocarcinoma : An Eastern and Western experience. *JAMA Surg*. 2014;149(5):432-438. doi:10.1001/jamasurg.2013.5168
54. Freedman LS, Macaskill P, Smith AN. MULTIVARIATE ANALYSIS OF PROGNOSTIC FACTORS FOR OPERABLE RECTAL CANCER. *Lancet*. 2018;324(8405):733-736. doi:10.1016/S0140-6736(84)92636-9
55. D. HS, A. S, S. BJ, J. B, C. S, O. E. Prognostic factors and survival of patients aged less than 45 years with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2005;81(5):685-688. doi:10.1002/bjs.1800810519
56. Harrison JC, Dean PJ, El-zeky F, Vander Zwaag R. From dukes through jass: Pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol*. 1994;25(5):498-505. doi:10.1016/0046-8177(94)90122-8

57. Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. Influence of local peritoneal involvement on pelvic recurrence and prognosis in rectal cancer. *J Clin Pathol.* 1995;48(9):849-855. doi:10.1136/jcp.48.9.849
58. Maughan NJ, Morris E, Forman D, Quirke P. The validity of the Royal College of Pathologists' colorectal cancer minimum dataset within a population. *Br J Cancer.* 2007;97(10):1393-1398. doi:10.1038/sj.bjc.6604036
59. Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut.* 2002;51(1):65-69. doi:10.1136/gut.51.1.65
60. Benson AB 3rd, Abrams TA, Ben-Josef E, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: hepatobiliary cancers. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7(4):350-391.
61. Li M, Li J, Li P, et al. Hepatitis B virus infection increases the risk of cholangiocarcinoma: A meta-analysis and systematic review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(10):1561-1568. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07207.x
62. Shaib YH, El-Serag HB, Nooka AK, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A hospital-based case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(5):1016-1021. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01104.x
63. Welzel TM, Graubard BI, El-Serag HB, et al. Risk Factors for Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinoma in the United States: A Population-

Based Case-Control Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(10):1221-1228. doi:10.1016/j.cgh.2007.05.020

64. Tomimatsu M, Ishiguro N, Taniai M, et al. Hepatitis C virus antibody in patients with primary liver cancer (hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and combined hepatocellular-cholangiocarcinoma) in Japan. *Cancer*. 1993;72(3):683-688. doi:10.1002/1097-0142(19930801)72:3<683::AID-CNCR2820720310>3.0.CO;2-C
65. Shin HR, Lee CU, Park HJ, et al. Hepatitis B and C virus, Clonorchis sinensis for the risk of liver cancer: a case-control study in Pusan, Korea. *Int J Epidemiol*. 1996;25(5):933-940. doi:10.1093/ije/25.5.933
66. Kobayashi M, Ikeda K, Saitoh S, et al. Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with Hepatitis C virus-related cirrhosis. *Cancer*. 2000;88(11):2471-2477. doi:10.1002/1097-0142(20000601)88:11<2471::AID-CNCR7>3.0.CO;2-T
67. Peng N, Li L, Qin X, et al. Evaluation of Risk Factors and Clinicopathologic Features for Intrahepatic Cholangiocarcinoma in Southern China: A Possible Role of Hepatitis B Virus. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(5):1258-1266. doi:10.1245/s10434-010-1458-5
68. Zhou H, Wang H, Zhou D, et al. Hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma may hold common disease process for carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2010;46(6):1056-1061. doi:10.1016/j.ejca.2010.02.005
69. Zhou Y-M, Yin Z-F, Yang J-M, et al. Risk factors for intrahepatic

cholangiocarcinoma: a case-control study in China. *World J Gastroenterol.*

2008;14(4):632-635. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02149.x



8. ÖZET

İNTRAHEPATİK KOLANJİOKARSİNOMLARDA DAMAR İNVAZYONUNUN H-CALDESMON VE SİTOKERATİN 19 İKİLİ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Malign tümörlerde damar invazyonu varlığı, prognostik öneminin olması yanısıra adjuvan KT ve/veya RT kararını yönlendirmesi açısından da oldukça önemlidir.

Bu çalışmada intrahepatik kolanjiokarsinomlarda prognostik açıdan ve evreleme açısından büyük önem arz eden damar invazyonunun h-CD ve CK19 ikili immünohistokimyası ile daha kolay fark edilmesi amaçlanmış olup, bu yöntemin kullanışlı bulunması sonucunda rutin pratiğe dâhil olması öngörülmüştür.

Gazi Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, 2009-2018 yılları arasında intrahepatik kolanjiokarsinom tanısı alan 21 hastanın 23 parsiyel hepatektomi materyaline ait 82 blokta bulunan 226 odak ele alınmıştır. Yirmi bir hastaya ait yaş, cinsiyet, tümör yerleşim yeri, tümör çapı, tanının ilk raporlandığı tarihte görülen vasküler invazyon, perinöral invazyon ve lenf nodu metastazı varlığı, T, N, M değerleri ve zemindeki viral hepatit varlığı incelenmiştir. Olası vasküler invazyon odaklarının hepatektomi materyalindeki lokalizasyonu, histolojik özellikleri gözden geçirilmiş ve bu odaklar 3 tipe ayrılmıştır: **Tip 1**, tümörün bir damar lümeninde olduğunu yüksek olasılıkla düşündüren odaklar, **Tip 2**, tümör odağının etrafında, damar duvarı olduğundan şüphelenilen, tümör odağını “manşonvari örüntüde tamamıyla veya kısmen sarmalayan”, fakat boş

lümen veya eritrosit varlığının görülmediği odaklar, **Tip3**, uygulanan immünohistokimyasal yöntem sonrası ortaya çıkan odaklar. Ayrıca h-CD'nin spesifitesini araştırma amacıyla tümör dışı karaciğer dokularından hazırlanan kesitlere, h-CD tekli olarak boyanmış olup bu kesitlerdeki vasküler elemanların ve safra duktuslarının boyanma durumları değerlendirilmiştir. Saptanan odakların çapları mikroskopik olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

Çalışmamızda 226 odağın %41,3' Tip 3, %39,3' Tip 2 ve %19,4' Tip 1 odak tipindedir. Odakların çoğu (%63,7) intrahepatik yerleşimlidir. İkili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyonun görüldüğü vaka sayısı toplam 14 olup, bunların 3' ilk raporlamada vasküler invazyon varlığı görülmemiş vakalardır. İlk raporlamada vasküler invazyon grlmeyen vakalarda ikili İHK uygulaması sonrası vasküler invazyonun görüldüğü odak tipleri incelenmiş, bu odakların %66,1'inin Tip 3, %25'inin Tip 2 ve %8,9'unun Tip 1 tipinde oldukları saptanmıştır. İlk raporlamada vasküler invazyon görülmemesi nedeniyle histolojik evresi pT1 ve prognostik evresi I olan 3 olgunun 2'sinde uygulama sonrası vasküler invazyon saptanması nedeniyle histolojik evreleri pT2'ye, prognostik evreleri ise II'ye yükselmiştir.

h-CD'nin tekli olarak boyandığı tümör dışı normal karaciğer dokusunda görülen safra duktuslarının hiçbirinde h-CD ile boyanma saptanmamıştır. Hepatik arterlerin ve portal venlerin tamamında h-CD ile boyanma mevcuttur. Hepatik venlerin %13,2'sinde h-CD ile boyanma gözlenirken, %86,8'inde boyanma saptanmamıştır.

Çalışmamızın sonucunda, H&E boyalı lamlarda kuşkulanamayacak, ancak yardımcı teknikler ile ortaya çıkarılabildiğini gösterdiğimiz damar invazyonu odakları fark edilmiştir. H&E boyalı lamlarda ilk raporlamada fark edilmeyen, ikili İHK uygulaması ile vasküler invazyon varlığının gösterildiği, bunun sonucunda histolojik ve prognostik evrenin yükseltildiği hastalar mevcuttur. Vasküler invazyonun ikili İHK kullanımı sonrası fark edilip histolojik ve prognostik evrenin yükseltildiği hastalarda en fazla görülen odak tipi “Tip 3” tür. İkili İHK ile fark edilen “Tip 3” odaklar H&E boyalı lamlara dönülüp tekrar bakıldığında, bu odakların bir kısmının, tümör grubu çevresinde eozinofilik bir sınır bulundurduğu izlenmiş olup bu alan “çevre dokudan mesafeli bir sınırla ayrılma (distant circumscribed stroma)” olarak isimlendirilmiştir. h-CD portal ven ve hepatik arterin tüm dallarında pozitif boyanırken, hepatik ven dallarında aynı etkiyi göstermemektedir. h-CD, hepatik venlerde aranan vasküler invazyon için uygun bir belirteç olmadığı düşünülmüştür. h-CD safra duktuslarını hiçbir şekilde boyamamaktadır.

Anahtar kelimeler: Vasküler invazyon, h-Caldesmon, intrahepatik kolanjiokarsinom

9. SUMMARY

EVALUATION OF VASCULAR INVASION IN INTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA WITH H-CALDESMON AND CYTOKERATIN 19 DOUBLE IMMUNOHISTOCHEMICAL STAIN

The presence of vascular invasion in malignant tumors is very important in directing the decision of adjuvant chemotherapy and / or radiotherapy besides being a prognostic precursor.

It was aimed to make the vascular invasion, which is a great prognostically and staging aspect of intrahepatic cholangiocarcinomas, easier to recognize with h-CD and CK19 dual immunohistochemistry and it is guessed that this method will be included in routine practice as a result of its usefulness in this study.

Eighty-two slides from 21 patients' 23 partial hepatectomy specimens which are diagnosed intrahepatic cholangiocarcinoma, diagnosed from 2009 to 2018 at the Pathology Department of Gazi University, were reviewed and examined which revealed 226 probable vascular invasion foci. Age, gender, tumor site, tumor diameter, TNM stage, vascular invasion, perineural invasion and metastatic lymph nodes at the first report date and the viral hepatitis condition for these 21 patients were obtained. Additionally, anatomic site and histologic features of vascular invasion foci were reviewed and divided into 3 types: **Type 1**, foci that would likely suggest that the tumor focus is in a vessel lumen, **Type 2**,

foci in which there is an outer wall that can not be foreseeable without an ancillary technique suspected of having a vessel wall around the tumor center, and, **Type 3**, a focus which could be detected only with the immunohistochemical procedures mentioned. In addition, to investigate the specificity of h-CD, h-CD was stained in sections of non-tumor liver tissue, and the staining status of vascular elements and bile ducts in these sections were evaluated. Diameters of the detected foci were measured and recorded microscopically.

In our study, out of 226 foci, 41,3% were type 3, 39,3% were type 2 and 19,4% were type 1. 79,6% of Type 3 foci, and 63,6% of Type 1 foci are intrahepatic. Of the type 2 foci, 47,2% are intrahepatic. The number of cases in which vascular invasion has been observed after double IHC is 14, of which 3 have no vascular invasion in the first report. All of the 11 cases which vascular invasion was noted in the first report, the presence of vascular invasion after double IHC was confirmed. When the focus types in which vascular invasion is observed after double IHC stain, 66.1% of these foci were found to be Type 3, 25% were Type 2 and 8.9% were Type 1. Two cases which their histologic stages were pT1 and prognostic stage I, were histologically evolved pT2 because of presence of vascular invasion after dual immunohistochemistry.

No h-CD staining was detected in any of the bile ducts seen in the non-tumoral liver tissue when h-CD stained singly. All of the hepatic arteries and portal veins are stained with h-CD. h-CD staining was observed in 13,2% of the hepatic venules, whereas 86,8% staining was not observed.

As a result of our study, we have noticed foci of vessel invasion that can not be suspected in H&E painted slides but which can be revealed by ancillary techniques. There are patients in which the histological and prognostic stage are elevated by demonstrating the presence of vascular invasion with dual IHC stain. Type 3 is the most common type of vascular invasion foci seen in patients with histologic and prognostic elevation after dual IHC. When we turn back to H&E stained slides for "Type 3" foci recognized by dual IHC, some of these foci were observed to have an eosinophilic border around the tumor group, and this area was named "distant circumscribed stroma". While h-CD is positive in all branches of portal vein and hepatic artery, it does not show the same effect in hepatic vein branches. h-CD is thought not to be a suitable marker for vascular invasion in hepatic venules. h-CD is not positive in bile ducts any way.

Key words: Vascular invasion, h-Caldesmon, intrahepatic cholangiocarcinoma