

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PODOPLANİN VE D2-40'İN MALİGN MEZOTELYOMALAR İLE
AKCİĞERİN PRİMER ADENOKARSİNOMLARI VE PLEVRANIN
METASTATİK KARSİNOMLARINDAN AYIRIMINDAKİ YERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Seda Gün

SAMSUN-2008

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PODOPLANİN VE D2-40'IN MALİGN MEZOTELYOMALAR İLE
AKCİĞERİN PRİMER ADENOKARSİNOMLARI VE PLEVRANIN
METASTATİK KARSİNOMLARINDAN AYIRIMINDAKİ YERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Seda Gün

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Bedri KANDEMİR

SAMSUN-2008

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm, yetişmemde katkıları olan değerli hocalarıma, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, tüm patoloji bölümü çalışanlarına, istatistiksel analiz aşamasında yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı'nda görev yapan asistan arkadaşlarıma ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİGİLER	2
GEREÇ VE YÖNTEM	19
BULGULAR	22
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR	38
KAYNAKLAR	39

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo I. Plevra tümörlerinin histolojik sınıflandırılması (WHO 2004)	4
Tablo II. Malign mezotelyoma ve akciğerin primer adenokarsinomlarında histokimyasal boyanma özellikleri	10
Tablo III. Malign Mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomu ayırıcı tanısında immünohistokimyasal boyanma özellikleri	11
Tablo IV. Malign Mezotelyoma ile karışan tümörler	12
Tablo V. İmmünohistokimyasal sonuçlar	26
Tablo VI. D2-40, Podoplanin, Kalretinin, CK 5/6 ifade skorları için mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomları karşılaştırıldığında elde edilen p değerleri	28
Tablo VII. Malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomlarını ayırt etmede D2-40 ve podoplaninin boyanma yüzdelerinin diğer pozitif mezotelyal belirleyicilerle karşılaştırılmasında elde edilen p değerleri	31
Tablo VIII. Malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomlarının ayırt edilmesinde pozitif mezotelyal belirleyicilerin özgüllüğü ve duyarlılığı	31

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Malign mezotelyoma	7
Şekil 2. Primer akciğer adenokarsinomu	13
Şekil 3. Bronkoalveolar karsinom	14
Şekil 4. Malign mezotelyomada D2-40 ifadesi	22
Şekil 5. Mezotelyal proliferasyon	23
Şekil 6. Mezotelyal proliferasyonda D2-40 ifadesi	24
Şekil 7. Malign mezotelyomada podoplanin ifadesi	25
Şekil 8. Mezotelyal proliferasyonda podoplanin ifadesi	28
Şekil 9. Primer akciğer adenokarsinomunda CEA ifadesi	29
Şekil 10. Bronkoalveolar karsinomda MOC-31 ifadesi	30

ÖZET

Amaç: En son pozitif mezotelyal belirleyici olarak tanımlanan podoplanin ve D2-40' in malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomu ve plevraya metastaz yapan adenokarsinomlar arasındaki ayırıcı tanıda taşıdığı değeri araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında 1988-2008 yılları arasında malign mezotelyoma tanısı almış 11 olgu ve buna eş sayıda 11 primer akciğer adenokarsinomu, 11 bronkioloalveoler karsinom, 11 plevranın metastatik karsinomu ve 11 mezotelyal proliferasyon tanısı almış toplam 55 olguya ait kesitler retrospektif olarak incelendi. Uygun bloklar seçilerek D2-40, podoplanin, kalretinin, sitokeratin (CK) 5/6, karsinoembriyonik antijen, epitelyal spesifik antijen (MOC-31) ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Boyanma yaygınlığı 1+ ile 4+ arasında derecelendirildi.

Bulgular: D2-40 ile 11 mezotelyoma olgusunun 7'si (%63,6), mezotelyal proliferasyon olgusunun 10'u (%90,9) pozitif boyanırken primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomu olgularının hiç birinde pozitiflik görülmedi. Podoplanin ile mezotelyoma olgularının 9'u (%81,8), mezotelyal proliferasyon olgularının 10'u (%90,9) pozitif boyanırken primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomu olgularının hiçbirinde pozitiflik görülmedi. Podoplanin ve D2-40 boyanmasının malign mezotelyoma ile diğer malignensi gruplarında ifade skorlarının ikili karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Malign mezotelyoma ile mezotelyal proliferasyon arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı. Mezotelyoma tanısı alan vakalarda podoplanin, D2-40, kalretinin boyanma yaygınlığının ikili karşılaştırılmasında anlamlı bir boyanma farkı elde edilmedi. Podoplanin ve CK5/6 ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Mezotelyoma için podoplanin, D2-40, kalretinin ve CK 5/6 'nın özgüllükleri %100 bulundu. Duyarlılıkları ise sırasıyla %,81,8, %63,6, %81,8, %54,5. Mezotelyoma için en yüksek, % 100 duyarlılık podoplanin, D2-40, kalretinin kombinasyonu kullanıldığında saptandı.

Sonuçlar: Podoplanin ve D2-40'ın malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomları, bronkoalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomlarının

ayırımında etkin olduğu ancak kesin sonuçlar vermediği bu nedenle bu belirleyicilerinde içinde yer aldığı pozitif ve negatif mezotelyal belirleyicilerle bir panel oluşturulmasının daha doğru sonuçlara ulaştırabileceği kanısına vardık.

Anahtar Sözcükler: Malign mezotelyoma, akciğer adenokarsinomu, plevranın metastatik karsinomu, podoplanin, D2-40

ABSTRACT

Objective: To assess the role of podoplanin and D2-40, which have been defined as the latest positive mesothelial markers, in the differentiate diagnosis between malignant mesothelioma and primary lung adenocarcinoma or metastatic adenocarcinomas of the pleura.

Materials and Method: Tissue section from biopsies of 11 patients with malignant mesothelioma, 11 patients with primary lung adenocarcinoma, 11 patients with bronchoalveolar carcinoma, 11 patients with pleural metastatic carcinoma and 11 patients with reactive mesothelial proliferation were evaluated retrospectively. All 55 patients had been diagnosed in Ondokuz Mayıs University, Faculty of Medicine, Department of Pathology between 1988-2008. Selecting the appropriate blocks, immunohistochemical studies were performed with D2-40, podoplanin, kalretinin, keratin (CK) 5/6, carcinoembryonic antigen and epithelial specific antigen (MOC-31). Extensiveness of staining was graded from 1 and 4.

Results: With D2-40, 7 of the 11 mesothelioma cases (63,6 %) and 10 of 11 reactive mesothelial proliferations (90,9 %) stained positively. No positive staining was observed in patients with primary lung adenocarcinoma, bronchoalveolar carcinoma or metastatic carcinoma of the pleura. With podoplanin 9 of the mesothelioma cases (81.8 %) and 10 of the mesothelial proliferation cases (90,9 %) stained positively. No positive staining was observed in patients primary lung adenocarcinoma, bronchoalveolar carcinoma or metastatic carcinoma of the pleura. The comparison of the expression scores of the podoplanin and D2-40 staining in malignant mesothelioma and other malignancy groups revealed significant difference. But there was no significant difference between malignant mesothelioma and mesothelial proliferation. In the comparison of the staining extensiveness of podoplanin , D2-40 and calretinin in patients with mesothelioma, no significant staining difference was found. Comparison the staining extensiveness of podoplanin and CK5/6 , significant difference was detected. For mesothelioma the specificities of podoplanin, D2-40, calretinin, CK 5/6 were 100 %, respectively, and their sensitivities were 81,8 %, 63,6 %, 81,8 %, 54,5 %. The immunohistochemical panel with podoplanin, D2-40, calretinin showed higher sensitivity.

Conclusion: We found that podoplanin and D2-40 were effective in the distinction of malignant mesothelioma from primary lung adenocarcinoma, bronchoalveolar carcinoma or metastatic carcinoma of the pleura, but since both markers stained, only a proportion of the mesothelioma, their use as decisive agents is restricted. Therefore, they should be used in combination as a panel with other positive and negative mesothelial markers to give higher sensitivity.

Key Words: Malignant mesothelioma, lung adenocarcinoma, metastatic carcinoma of the pleura, podoplanin, D2-40.

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Malign mezotelyoma, başta plevra olmak üzere serozal yüzeylerdeki mezotelyal hücrelerden gelişen primer bir tümördür. Mezotelyoma ilk kez 1960 yılında, asbestle ilişkili olarak Wagner ve arkadaşları tarafından Güney Afrika'da tanımlanmıştır (1). Görülme sıklığı endüstride asbest kullanımının artması ile 20. yüzyılın başlarında artış göstermiştir (2).

Malign mezotelyoma, geniş ve çeşitli sitomorfolojik ve histolojik tiplere sahiptir. Mezotelyomaların, plevrayı tutan akciğer adenokarsinomları ve plevraya metastaz yapan diğer karsinomlar ile makroskopik ve mikroskopik olarak benzer yapıya sahip olmalarından dolayı ayırıcı tanı problemleri yaşanmaktadır (3). Klinik, radyolojik ve histomorfolojik bulgular ayırıcı tanıda yeterli olmadığında, histokimya, immünohistokimya ve elektron mikroskopik yöntemlere başvurulmaktadır (3).

Günümüzde mezotelyoma için spesifik bir belirleyici tanımlanmamıştır (4). Bu yüzden mezotelyomanın immünohistokimyasal tanısı büyük oranda mezotelyomada sıkça sentezlenen belirleyiciler ile (pozitif mezotelyoma belirleyicileri), karsinomlarda yaygın olarak sentezlenen belirleyicilerin (negatif mezotelyoma belirleyicileri) kombine edildiği panellerle yapılmaktadır (4,5,6).

Bu çalışmamızda pozitif mezotelyal belirleyicilerden, kalretinin, sitokeratin (CK) 5/6 , negatif mezotelyal belirleyicilerden, karsinoembriyonik antijen (CEA), MOC-31 ile en son pozitif mezotelyal belirleyici olarak tanımlanan podoplanin ve D2-40'ı kombine ederek podoplanin ve D2-40'ın malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomu ve plevraya metastaz yapan diğer adenokarsinomlar arasındaki ayırıcı tanıda taşıdığı değeri araştırmayı amaçladık.

2- GENEL BİLGİLER

2.1- Plevra anatomisi ve histolojisi

Plevra, göğüs kafesi, diafragma, mediasten ve akciğer parankimini örten ince seröz bir zarıdır. Bu yapı parietal ve visseral plevra olarak ikiye ayrılır. Visseral yaprak akciğerlerin dış yüzü ve loblar arasındaki fissürleri sararken, parietal yaprak da toraks boşluğunun iç yüzünü örter. Astarladığı intratorasik yüzeylere göre kostal, mediastinal ve diafragmatik plevra olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Her iki yaprak akciğer hiluslarında birleşir (7).

Normalde parietal ve visseral plevrallar arasında az miktarda (0,1–0,2 ml/kg) plevra sıvısı bulunur. Sıvının bulunduğu alana plevra boşluğu veya pleval kavite denir. Berrak, renksiz görünümde olan bu sıvıda 1,5 g/dL'den az protein, çoğunlukla monosit, az miktarda da lenfosit, makrofaj, mezotel hücresi, polimorfonükleer lökosit olmak üzere yaklaşık 1500 hücre/ μ L mevcut olup eritrosit yoktur (7). Her iki pleval yüzey alanı, visseral plevranın interlober fissürleri ve pariyetal plevranın kostofrenik köşeleri de dahil edilirse, yaklaşık olarak eşit olup, 70 kg bir erkekte 2000 cm³, civarındadır (8). Plevranın ana görevi solunum sırasında toraks içinde sürtünmesiz yüzey oluşturmaktır (7, 8).

Kaburga ve interkostal alanlar üzerindeki parietal plevra, düzensiz yumuşak bir bağ dokusu ve üzerindeki mezotelden ibarettir. Bağ dokusunda kan damarları, özellikle kapillerler ve lenfatik lakünler görülür. Parietal plevranın kalınlığı canlı türlerine göre farklılıklar gösterebilir. Bu 20–25 μ m arasındadır (9).

Visseral plevra, anatomik olarak parietal plevradan belirgin olarak farklıdır. Yine türlere göre farklılıklar gösterir. Kedi, köpek, maymun ince, insan, koyun, domuz, at ise kalın bir plevraya sahiptir. Visseral plevranın ince ve kalın olması ile akciğerler arasındaki fizyolojik ilişki önemlidir. Zira kan akımı ihtiyacı plevra kalınlığı ile doğrudan ilişkilidir. Kalın plevralarda kanın başlıca kaynağı sistemik dolaşım iken, ince plevralarda kaynak pulmoner dolaşımdır (9).

Histolojik olarak kalın visseral plevra mezotel ve bağ dokusu olarak iki bölümden oluşur. Kan ve lenf damarları ile sinirler bağ dokusundadır. Kalın visseral plevrada iyi gelişmiş bir bağ dokusu görülür. Bu bağ dokusu iki önemli fonksiyona sahiptir. İlki hava ile şişen akciğerlerin sönmesini ve diğeri aşırı şişmesine engel

olmaktır. Visseral plevrada ayrıca elastik ve kollajen lifler birbirleriyle anostomozlaşarak yoğun bir ağ oluştururlar (8).

Hem parietal hem de visseral plevra yüzeyi tek tabakalı yassı mezotel hücreleri ile kaplıdır. Mezotel hücreleri pleomorfiktir ve büyük olasılıkla alttaki submezotelyal dokunun gerilme derecesine göre yassıdan küboid veya kolumnar şekle kadar değişiklikler gösterebilir. Morfolojilerindeki farklılıklara rağmen bütün alanlarda tek sıralıdırlar. Mezotel hücrelerinin kalınlıkları 1–4 µm ve yüzey çapları ise 16–40 µm'dur. Elektron mikroskobunda plevra yüzeyi düz veya bombeli görülür (8). Bombeli yüzler visseral plevranın çoğu bölgesinde ve parietal plevranın kosta altına rastlayan bölgeleri ile baskıya maruz kalarak yapısının zayıfladığı bölgelerde görülürler. Bu hücrelerde bol mikrovilli vardır. Her hücre yaklaşık 300 mikrovilli içerir. Mikrovillil parietal plevranın inferior kısmında daha fazladır, boyları 0,5–3 µm, çapları 0,1µm civarındadır. Mikrovilli fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte, plevra sıvısını emerek visseral plevranın kapasitesini arttırmak veya özellikle toraks alt alanlarında sürtünmeyi azaltmak için göğüs duvarı ve akciğer arasında hyaluridik asitten zengin glikoprotein ağı örmektir (8).

Mezotel hücreleri aktif hücrelerdir. Çeşitli uyaranlara cevap verirler ve hassastırlar (10). Kültürde; tip I, II ve IV kollajen, elastin, fibronektin ve laminin ürettikleri gösterilmiştir (11). Ayrıca tipik olarak hem fibroblast hem epitelyal hücrelerin intermedier filamentlerini ifade ederler. Mezotel hücreleri ayrıca hücre yüzeyinde faktör VII bağlayan bir doku faktöründen dolayı prokoagülan aktivite de taşırlar. Nitrik oksit ve farklılaştırıcı büyüme faktörü beta -1 (TGF β-1) de üretirler (10, 11).

Mezotel tabakası çok kırılmalıdır. Plevral hastalığı olmayan hastalara torakotomi uygulandığında bile mezotel hücrelerinin döküldüğü, soyulduğu görülür. Bu alanlar mezotel hücrelerinin migrasyonu ve mitozu ile tamir edilir. Yüzeyden ayrıldıklarında plevra sıvısı içinde serbest kalırlar. Bu zamanda şekilleri oval veya yuvarlaktır. Sitoplazmaları organelden yana zengindir. Bu halleriyle fagositoz yetenekleri kazanarak makrofajlara dönüşürler. Bu değişmiş hallerinde sitoplazmalarında vakuoller görülür. Plevra sıvısındaki tüm makrofajlar mezotel hücrelerinden köken almaz. Bir kısmı periferik kan mononükleer hücrelerinden bir kısmı da alveoler makrofajlardan

köken alabilirler. Mezotel hücrelerinden köken alan makrofajların immünolojik role sahip oldukları da belirtilmiştir (10, 11).

2.2- Plevra tümörleri

Plevra tümörleri 2004 Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflamasında mezotelyal tümörler, lenfoproliferatif hastalıklar, mezankimal tümörler olmak üzere 3 ana başlık altında incelenmektedir (12).

Tablo.1 Plevra tümörlerinin histolojik sınıflandırılması WHO 2004

I- Mezotelyal tümörler

- 1- Diffüz malign mezotelyoma
 - a- Epiteloid mezotelyoma
 - b- Sarkomatoid mezotelyoma
 - c- Desmoplastik mezotelyoma
 - d- Bifazik mezotelyoma
- 2- Lokalize malign mezotelyoma
- 3- Mezotel kökenli diğer tümörler
 - a- İyi differansiye papiller tümör
 - b- Adenomatoid tümör

II- Lenfoproliferatif hastalıklar

- 1- Primer effüzyon lenfoması
- 2- Piyotoraksla ilişkili lenfoma

III- Mezankimal tümörler

- 1-Epiteloid hemanjiyotelyoma
 - Anjiyosarkom
- 2-Sinovyal sarkom
 - a- Monofazik
 - b- Bifazik
- 3- Soliter fibröz tümör
- 4- Plevranın kalsifiye tümörü
- 5- Desmoplastik yuvarlak hücreli tümör

2.2.1- Diffüz Malign Mezotelyoma

Diffüz Malign Mezotelyoma plevradaki mezotelyal hücrelerden kaynaklanan ve plevral yüzeyden dışa doğru diffüz ilerleyen malign tümördür. Plevranın en sık görülen primer malign tümörüdür (12).

2.2.1.1- Epidemiyoloji

Plevral mezotelyoma genelde 60 yaş üstü hastalarda daha sık görülür fakat yaş dağılımı geniştir ve nadiren çocuklarda da görülür. Epidemiyolojik çalışmalar, insidansın son 20 yıldır artmakta olduğunu göstermektedir. Erkeklerde daha fazladır. (Erkek/Kadın: 3/1). Kuzey Amerikada erkek/ kadın oranı 9/1 iken, diğer ülkelerde bu oran düşüktür (3, 12).

Plevral mezotelyomanın mortalitesi % 100'dür. Erken evredeki tümörlerde 3'lü tedavi yöntemiyle kür sağlanabilir. Ekstraplevral pnömektomi, kemoterapi, radyoterapi kombinasyonu kullanılır, ama çok az durumda buna başvurulur (12).

2.2.1.2- Etiyoloji ve Patogenezi

Mezotelyoma genellikle inhalasyon yoluyla asbeste maruz kalma sonucunda oluşmaktadır. Ortalama 30–40 yıllık latent dönemden sonra ortaya çıkar. Mezotelyomaya neden olan farklı asbest fibril tipleri vardır. Amfibol (amozit ve krokidolit) tipi krisotil fibrillerinden daha etkilidir ve krokidolit amozitten daha tehlikelidir. Rölatif risk için fibrile maruz kalma oranı 500:100:1 (krokidolit: amfibol: krisotil) olarak rapor edilmiştir (12, 13).

Asbest lifi olmayan erionit (yalnız Kapodakya bölgesinde görülür), tüberküloz tedavisi gibi plevral skara yol açan sebepler ve radyasyon da mezotelyoma sebepleri arasında sayılabilir (12).

Sitogenetik çalışmalar ile 1p, 3p, 6q, 9p, 22q delesyonları yüksek oranda saptanmıştır (14). Latent *Simian Virus (SV 40)* enfeksiyonu ile p53 mutasyonunun da mezotelyoma ile ilişkili olduğu bilinmektedir (12, 14).

Asbest, sitokinler ve aktive makrofajlar tarafından yönetilen kronik bir inflamasyon ve fibrozis ile sonuçlanan bir reaksiyona neden olur (15). C-cis (Platelet kökenli büyüme faktörünün beta zinciri) gibi protoonkogenlerin fibrotik akciğer

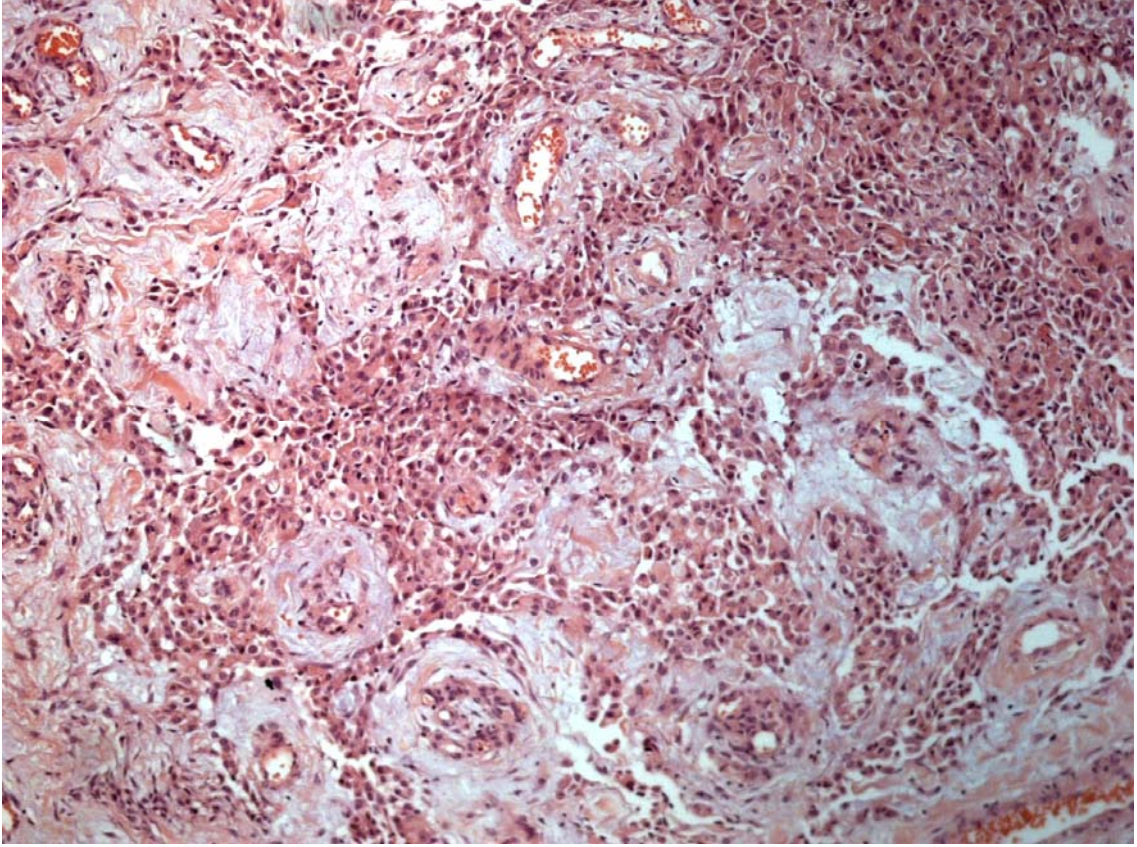
içindeki alveoler makrofajlarda yoğun olarak eksprese edildiği izlenir. Bu da mezotel hücrelerinin aşırı proliferasyonuna neden olur. Ayrıca asbestin kendisinin hücre DNA'larını doğrudan değişime uğrattığı gösterilmiştir (15). Asbest liflerinin, doku kültüründe hücrelerde c-fos ve c-jun gibi onkogenlerin oluşumuna neden olduğu saptanmıştır (16). Ayrıca, Dhaene ve arkadaşları¹⁷, mezotelyomada, telomeraz aktivitesinin artmış olduğunu, bunun da karsinogenezde bir rolü olabileceğini bildirmiştir. Bu bulgularla araştırmacılar, asbest liflerinin neden olduğu oksidatif stresin (serbest oksijen radikallerinin aşırı oluşumu), meydana gelen sitotoksitenin, DNA hasarı, mutasyon ve onkogen ekspresyonun karsinogenezde rol oynadığını belirtmişlerdir (12, 15, 16, 17).

2.2.1.3- Makroskopik Bulgular

Plevra kalınlaşır ve sert, gri-beyaz renk alır. Erken evrelerde, mezotelyoma parietal, bazen de visseral plevrada çok sayıda küçük nodüller olarak görülür. İleri dönemlerde nodüller birleşir, visseral ve pariyetal plevra yapışarak akciğerde çekilmelere neden olur. Tümör yoğunluğu jelatinöz ve solid arasında olup kalınlığı birkaç santimetreye ulaşabilir. Tümör içinde loküle sıvı koleksiyonları olabilir. İnterlobar fissürler boyunca, akciğer alt loblarına, diafragma, toraks duvarı, mediasten ve perikarda yayılır. Mezotelyoma, pulmoner parankime, hiler ve mediastinal lenf nodlarına metastaz yapabilir (3, 12, 18).

2.2.1.4- Mikroskopik Bulgular

Malign mezotelyoma baskın malign elementin mikroskopik görünümüne göre dört alt tipe ayrılır; epiteloid, sarkomatoid, desmoplastik, bifazik (12). Malign mezotelyomalarda büyüme şekli ve hücre kompozisyonu oldukça fazla çeşitlilik göstermektedir (12) (Şekil 1).



Şekil 1. Malign mezotelyoma (HE, X100).

2.2.1.4.1- Epiteloid mezotelyoma

En sık görülen tiptir. Epiteloid mezotelyoma epiteloid sitomorfoloji gösterir. Çoğunlukla tek düzedir, ama nadiren anaplastik şekilleri görülür. Epiteloid mezotelyoma morfolojik açıdan çok çeşitlidir. Çoğu tümörde hücreler soluk nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalıdır. Mitoz seyrek görülür. Kötü differansiye formlarında, nükleus belirgin nükleole sahiptir, mitoz sıktır ve multinükleer tümör dev hücreleri görülür (3, 12, 18).

Epiteloid mezotelyomanın çeşitli histolojik tipleri vardır (19). En yaygın olanları, sitolojik olarak mezotelyal hücreleri andıran iyi differansiye hücrelerden oluşan tübülöpapiller, adenomatoid (mikroglandüler) ve solid tipleridir. Daha az görülen epitelyal, şeffaf, desiduoid ve küçük hücre tipleridir. Birkaç farklı morfolojik tip aynı tümör içinde görülebilir veya tek tip baskındır. (19).

-Tübülöpapiller Tip

Tübülöpapiller tip, en yaygın histolojik tiplerinden biridir. Plevraya metastaz yapmış pimer akciğer adenokarsinomundan ayırt edilmesi gerekir. Genellikle uniform, yassı, küboidal veya poligonal hücreler ile döşeli trabekül, yarık, fibrovasküler merkezlere sahip papiller yapılar ve tübüllerin karışımından oluşur. Psammom cisimcikleri nadiren gözlenir (19).

-Adenomatoid (Mikroglandüler) Tip

İnce yassı-küboid hücreler, salgı bezi benzeri küçük yapılar oluştururlar. Diğer tiplerle birlikte görülür (19).

-Solid İyi-Diferansiye Tip

Neoplastik hücreler, kümeler, şeritler veya tabakalar halinde oluşur ve reaktif mezotelyal hücrelerini çok andırır. Belirgin çekirdekçiği olan yuvarlak, veziküler çekirdekleri ve yoğun bir sitoplazması olan hücrelerdir. Mitoz genelde belirgin değildir (19).

-Solid Az-Diferansiye Tip

Uniform nükleuslara sahip ve çoğunlukla tekdüze tabakalar halinde dizilmiş poligonal-yuvarlak hücrelerden oluşur. Lenfoma ve büyük hücreli karsinoma ile ayırıcı tanısının yapılması gerekir (19).

-Asiner (glandüler) Tip

Asiner ya da salgı bezi benzeri yapılarla karakterizedir. Lümenler uzayabilir veya dallanabilir ve genelde tek tip olan kümeleşmiş küboidal hücrelerle çevrenir (19).

-Şeffaf Hücreli Tip

Şeffaf sitoplazmaya sahip tümör hücreleriyle karakterizedir. Renal hücreli karsinom, akciğerin şeffaf hücreli karsinomları, şeffaf hücreli melanom gibi diğer şeffaf hücreli neoplazmalardan ayırt edilmesi gerekir (19).

-Desiduoid Tip

İlk önceleri, kız çocukları ve genç kadınlarda ortaya çıkan iyi prognozlu peritoneal bir tümör olarak tanımlanan desiduoid mezotelyoma, daha yaşlı erkek ve kadınlarda plevrada tanımlanmıştır. Günümüzde prognostik bir öneme sahip olmadığı düşünülmektedir. Keskin sınırları, yoğun camsı eozinofilik sitoplazması ve belirgin nükleoluslu yuvarlak veziküler çekirdekleri olan büyük, yuvarlak-poligonal hücre

proliferasyonuyla karakterizedir ve desidual reaksiyonu anımsatır. Mitoz sık görülmez (19).

-Adenoid Kistik Tip

Kribriiform ve tübüler yapılar, değişken sayıda kronik inflamatuvar hücre içeren fibröz bir stomayla ayrılır (19).

-Taşlı Yüzük (lipitden zengin) Tip

Tümör hücreleri kümeler ya da tabakalar halinde bulunur ve sitoplazmik vakuoller içerirler (19).

-Küçük Hücreli Tip

Tümör hücreleri yuvarlak nükleusları olan ve nükleus-sitoplazma oranı yüksek olan uniform küçük, yuvarlak hücrelerdir. Bunlar, primer olan ya da plevraya metastaz yapmış diğer küçük hücreli karsinomlardan ayırt edilmelidir (19).

2.2.1.4.2- Sarkomatoid Mezotelyoma

Plevral mezotelyomanın sarkomatoid şekli, gelişigüzel dağılan veya fasiküller yapmış iğsi hücrelerden oluşmaktadır. Bu patern çoğu zaman fibrosarkoma benzer fakat şiddetli anaplazi ve bizar multinükleer tümör hücrelerinin varlığında, malign fibröz histiyositomu taklit edebilir. Olguların küçük bir oranında osteosarkom, kondrosarkom ve diğer sarkomlara benzeyen alanlar bulunabilir (3, 12, 19).

Sarkomatoid mezotelyoma sitokeratinle pozitif boyanabilir ama bazı durumlarda boyanmanın olmadığı gözlenebilir. Kondrosarkomatöz ve osteosarkomatöz diferansiyasyon gösteren alanlar sitokeratin ile negatif boyanır. Sarkomatoid mezotelyoma vimentin, aktin, desmin veya S100 pozitif boyanabilir. Bazı durumlarda kalretininlede boyandığı gösterilmiştir (3, 12, 18, 19).

2.2.1.4.3- Desmoplastik Mezotelyoma

Desmoplastik mezotelyomada tümörün en az %50'sinde yoğun kollajen dokusuyla ayrılmış girdapsı veya gelişi güzel yerleşen atipik hücreler bulunur. Bu tümörler kolaylıkla, küçük biyopsi örneklerinde benign plöritle karışabilir. Malignite için şüphelendiren tanı kriterleri vardır (12). Bunlar, sarkomatoid alanlar, nekroz, adipöz doku iskelet kası veya akciğer invazyonu ve uzak metastazları içerir. Sitokeratin

boyanması, adipöz doku, iskelet kası veya akciğer içine keratin pozitif iğsi hücrelerin invazyonunun gösterilmesinde büyük yarar sağlayabilir (3,12).

2.2.1.4- Bifazik Mezotelyoma

Mezotelyomalar %30 oranında hem epiteloid, hem de sarkomatoid tipleri birlikte içerir. Tümörü bifazik olarak adlandırmak için her bir tipin tümörün en az %10'unu oluşturması gerekir. Bifazik olarak sınıflandırılan tümörlerin görülme yüzdesi iyi tümör örnekleme ile artar (12, 19).

2.2.1.5- Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal bulgular

Mezotelyoma tanısında ve özellikle tümörün primer akciğer adenokarsinomundan ayırt edilmesinde özel boyalar yararlı olmaktadır (3). Mezotelyomalarda Alcian mavisi veya koloidal demir boyası ile pozitif boyanan ve daha sonra hiyalüronidaz ile boyanma özelliğini yitiren hiyalüronik asit üretilir ve bir çok tümör hücresinin sitoplazmasında PAS için pozitif olan ve diastaz sindirimine duyarlı glikojen granülleri görülür (3). İntrasitoplazmik müsikarmen pozitifliği sık olmamakla birlikte görülür. Özellikle malign mezotelyoma ve akciğerin primer adenokarsinomunun ayırımında önem taşıyan histokimyasal boyalar Tablo 2 de özetlenmiştir (3, 12).

Tablo. 2 Malign mezotelyoma ve akciğerin primer adenokarsinomlarında histokimyasal boyanma özellikleri

	Malign Mezotelyoma	Primer Akciğer Adenokarsinomu
PAS	+	+
Diastazlı PAS	-	+
Alcian mavisi	+	+
Alcian mavisi+hiyalüridaz	-	+
Müsikarmen	+/-	+

Histokimyasal boyaların malign mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomunun ayırt edilmesinde duyarlılık ve özgüllük eksikliğinden dolayı

mezotelyoma tanısı için immünohistokimyasal boyama şarttır (3, 4, 5, 6, 12). Malign mezotelyoma için spesifik bir belirleyici bulunamamıştır, bu yüzden malign mezotelyomanın diğer neoplazmlardan özellikle de primer akciğer adenokarsinomundan ayırt edilmesi için antikor paneli kullanılmaktadır. Bu konuyla ilgili, farklı antikor panellerinin öne sürüldüğü çok sayıda çalışma vardır (4, 5, 6, 20, 21). 1990'ların ortalarına kadar antikor panellerinin çoğu daha çok primer akciğer adenokarsinomlarında sentezlenen ama malign mezotelyomalarda çok nadir sentezlenen, CEA, CD15, B72.3, Ber-Ep4, Bg8, E-cadherin ve MOC 31' i içeren antikorlardan oluşmaktaydı (3). Bu yıllardan sonra, kalretinin, WT-1, podoplanin, D2-40, mezotelin, sitokeratin 5/6, trombomodulin, OC-125 ve HBME-1'i içeren ve mezotelyomalarda yaygın olarak pozitif boyanan ama primer akciğer adenokarsinomlarında pozitif boyanmayan antikorlar elde edilmeye başlanmıştır (22,23,24). Ordonez⁴ tarafından bildirildiği gibi panellerin hem pozitif hemde negatif mezotelyoma belirleyicilerinden oluşması gerektiğine yönelik genel bir kabul vardır, ama optimal bir panel üzerine fikir birliği yoktur (3, 5, 6) (Tablo3).

Tablo.3 Malign Mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomu ayırıcı tanısında immünohistokimyasal boyanma özellikleri

	Malign Mezotelyoma	Primer akciğer Adenokarsinomu
Vimentin	+	+ %50'sinde
Sitokeratin	+	+
EMA	+(membranöz)	+(sitoplazmik)
CEA	-	+
CD15	-	+
Ber-EP4	+ %25'inde	+
B72.3	-	+
MOC31	-	+
CK 5/6	+	-
Calretinin	+	-
TTF-1	-	+

2.2.1.6 Ayırıcı Tanı

Diffüz malign mezotelyoma ile en çok karışan tümörler plevral yüzeyi kaplayan metastatik ve lokal invaziv tümörlerdir. Mezotelyoma ile ayırıcı tanısının yapılması gereken tümörler Tablo 4' de özetlenmiştir (12).

Tablo.4 Malign Mezotelyoma ile karışan tümörler

Plevraya metastazlar

- Karsinomlar
- Sarkomlar
- Lenfoma
- Malign Melanom

Primer diffüz plevral sarkom

- Anjiosarkom
- Epiteloid hemanjiyotelyoma
- Sinovyal sarkom
- Diğer sarkomlar

Timik tümörler (primer veya metastatik)

Desmoplastik yuvarlak hücreli tümör ve Ewing sarkom

Lokalize primer plevral tümörler ve lezyonlar

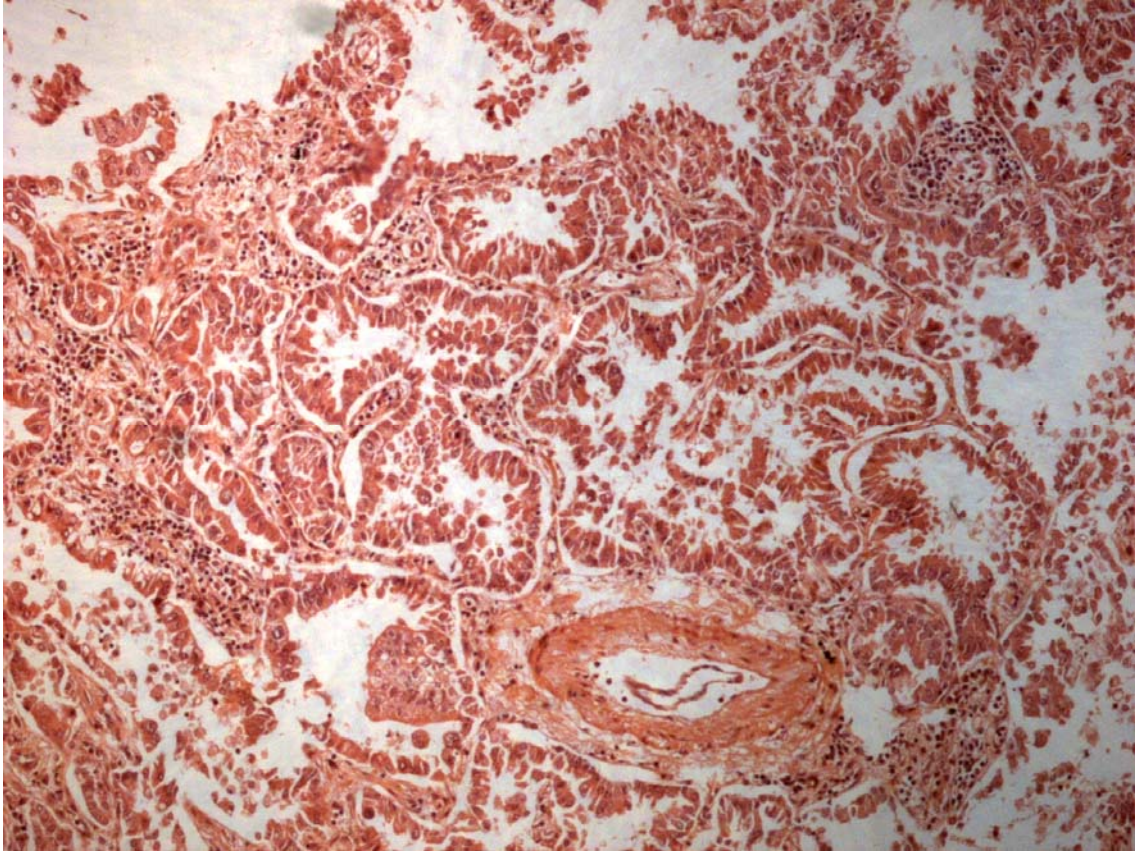
- Lokalize malign mezotelyoma
- Soliter fibröz tümör
- Sarkomlar
- İyi differansiye papiller mezotelyoma
- Kalsifiye fibröz pseudotümör
- Plevral plak

Yakın komşuluğundan dolayı plevraya en sık metastaz yapan tümörler arasında başta akciğer tümörleri gelmektedir. Akciğer tümörleri 2004 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan sınıflamada malign epitelyal tümörler, benign epitelyal tümörler, lenfoproliferatif tümörler, diğer tümörler ve metastatik tümörler olmak üzere 5 ana gruba ayrılmıştır (25). Plevraya sıkça metastaz yapan akciğerin malign epitelyal tümörleri içinde yer alan primer akciğer adenokarsinomları, müsin içeren asiner,

papiller, bronkoalveoler ya da solid büyüme tipi veya bu tiplerin karışımını sergileyen, glandüler diferansiasyonu olan tümörlerdir (25) (Şekil 2).

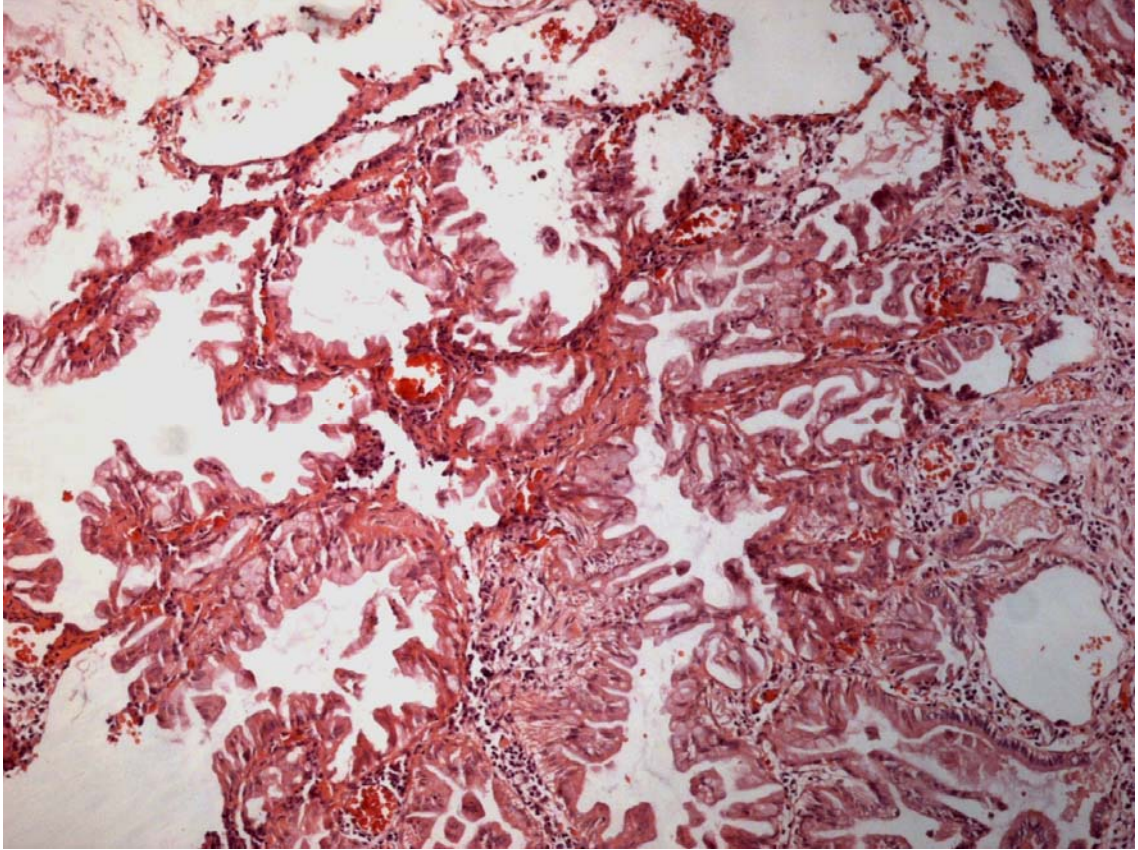
Primer akciğer adenokarsinomları birçok ülkede akciğer kanserinin en yaygın histolojik tipi olan skuamöz hücreli karsinomundan daha fazla görülür. Vakaların çoğu sigara tiryakilerinde görüldüğü halde, hiç sigara içmemiş olanlarda da diğer histolojik tiplerden daha sık görülür. Erkeklerde ve kadınlarda görülme sıklığı eşittir (25).

Primer akciğer adenokarsinomları tek ya da çok odaklı ve sıklıkla boyutları 4 cm'den küçük periferel nodüllerdir. Periferde yerleşmeleri nedeniyle primer akciğer adenokarsinomları kaynaklandığı alan açısından, histomorfolojisinde adenoid yapılar oluşturan malign mezotelyomalar ile ayırıcı tanı güçlükleri yaşanmasına sebep olmaktadır (25).



Şekil 2. Primer akciğer adenokarsinomu (HE, X100).

Primer akciğer adenokarsinomlarının immunohistokimyasal özellikleri, alt tipe ve diferansiyasyon derecesine göre değişir. Epitelyal belirleyicilerle (AE1/AE3, CAM 5,2, epitelyal membran antijen ve karsinoembriyonik antijen) tipik olarak pozitiftir. CK7, CK20'den daha çok sentezlenir. Genelde iyi diferansiye tümörlerde TTF-1 boyanması bulunur. Müsinöz tümörler, özellikle müsinöz bronkioloalveoler karsinom TTF-1 negatif, CK7 ve CK20 pozitiftir (25) (Şekil 3).



Şekil 3. Bronkioloalveoler karsinom (HE, X100).

Primer akciğer adenokarsinomlarının ayırıcı tanısında; metastatik adenokarsinom, mezotelyoma, atipik adenomatöz hiperplazi, reaktif pnömonosit atipisi yer alır. Metastatik adenokarsinomu olan hastalarda genelde primer karsinom hikayesi vardır ve akciğerdeki lezyonlar çok sayıdadır. Akciğerdeki lezyon tek ise, primer ve metastatik karsinom arasında ayırım yapmak zordur. Histolojik alt tiplerin bir arada bulunabilmesi akciğer adenokarsinomu için karakteristiktir ve metastatik

adenokarsinomdan ayırımında yardımcıdır. Metastatik adenokarsinomlar homojen olma eğilimindedir (25).

Primer akciğer adenokarsinomlarının %60 kadarı surfaktan proteinlerini sentezler. Akciğer surfaktan proteinlerinin spesifik sentezinde önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörü olan tiroid transkripsiyon faktör 1 (TTF-1), pulmoner adenokarsinomların %75'inde sentezlenir. Tiroid kökenli karsinomlar ve akciğer adenokarsinomları dışındaki adenokarsinomlar genellikle TTF-1 negatiftir. CK7 ve CK20 primer ve metastatik adenokarsinom ayırımında kullanılabilir. Akciğer adenokarsinomlarının çoğunda CK7 pozitif, CK20 negatiftir. Müsinöz bronkoalveoler karsinomda CK20 pozitif ve TTF-1 negatiftir (25).

Primer akciğer adenokarsinomu ile epiteleoid mezotelyoma ayırımında immunohistokimyasal, elektron mikroskopik, klinik, makroskopik bulgular önemlidir. Ayırımında müsin histokimyası, pan sitokeratin ve en az iki genel adenokarsinom belirleyicisi (örneğin; CEA, CD15, MOC 31), spesifik bir akciğer adenokarsinom belirleyicisi (TTF-1) ve 2 mezotelyoma belirleyicisi (Kalretinin, sitokeratin 5/6) yer almalıdır (4, 20, 25).

2.3- İmmünohistokimyasal Belirleyiciler

2.3.1- D240

D2-40, yeni geliştirilmiş olan ve fetal germ (kök) hücrelerinde ve germ hücre tümörlerindeki 40-kd antijeni (daha çok onkofetal M2A antijeni olarak biliniyor) ile tepkimeye giren monoklonal bir antikordur (26). Bu antikorun tanıdığı antijen, seçici olarak lenfatik endotelde sentezlendiği için, hem lenfatik kaynaklı tümörlerin teşhisinde hem de tümörlerin lenfatik invazyonunun belirlenmesinde yararlı olduğu gösterilmiştir (27, 28). Son araştırmalar, antikorun epiteloid mezotelyomalarda da sentezlenmesinden dolayı primer akciğer adenokarsinomları ve malign mezotelyoma arasında ayırım yapmada yararlı olabileceğini göstermiştir (23, 29, 30). Chu ve arkadaşları²⁹ 2005 yılında, D2-40'ın bir mezotelyoma belirleyicisi olarak önemini araştırmışlardır. Bu çalışmada, 16 bifazik mezotelyomanın 15'inin epiteloid bileşenlerinde (%94) ve 33 epiteloid mezotelyomanın 33'ünde (%100) güçlü membranöz reaktivite rapor edilmiştir (29). Ayrıca, 26 seröz karsinomanın 17 tanesinde (%65) fokal, zayıf, membranöz bir pozitiflik de saptanmıştır ama diğer

araştırılan karsinomaların hiçbirinde membranöz bir boyanma görülmemiştir (29). Ordenez²² D2-40'ın epitelioid mezotelyomanın teşhisinde en özgül ve duyarlı belirleyicilerden biri olduğunu ileri sürmüştür (22).

2.3.2- Podoplanin

Podoplanin yoğun O-glikolizasyon içeren ve sialik asit içeriği yüksek olan 38kD'luk musin tipinde bir transmembran glikoproteinidir (22). İlk defa Wetterewald³¹ tarafından 1996'da E11 antijeni kullanılarak, endotelial hücreler, koroid pleksusun endotelial hücreleri, alveolar tip 1 hücreleri, osteoblastlar ve peritoneal mezotelial hücrelerde rapor edilmiştir. Bu protein daha sonra glomerüler epitelyal hücrelerin (podositler) yüzeyinde saptanmıştır ve puromisin etkisi ile oluşturulan nefropatide ayaksı çıkıntılarının yassılaşıma sürecinde yer aldığı için podoplanin ismi verilmiştir. Podoplanin lenfatik endotel kaynaklı tümörlerin tanısında ve tümörlerin lenfatik invazyonunun belirlenmesinde oldukça yararlı olduğu gösterilmiş yüksek oranda duyarlı ve özgül bir lenfatik endotelial belirleyicidir (32). Normal ve neoplastik mezotelial hücrelerde yüksek düzeyde sentezlendiği için, podoplanin özellikle epitelioid plevral mezotelyomalar ile primer akciğer adenokarsinomları arasında ayırıcı tanıda yararlı bir immünohistokimyasal belirleyicidir (22). Son bilgiler podoplaninin bazı germ hücre tümörlerinin; özellikle seminomların tanısında ve hemanjiyoblastomlar ile metastatik renal hücreli karsinomların ayırımında yararlı olduğunu göstermektedir (22, 32, 33).

2.3.3- Kalretinin

S-100 proteinin de ait olduğu kalsiyum bağlayan proteinlerin EF-hand ailesinin bir üyesi olan kalretinin 29 kDa'luk bir proteindir (33). Merkezi ve periferik sinir dokularında özellikle retinada ve duyu yollarının nöronlarında yoğun olarak sentezlenmektedir (24, 33). Kalretinin mezotelyoma teşhisinde immünohistokimyasal bir belirleyici olarak yararlı olduğunu gösteren ilk çalışmalar 1996'da Doglioni³⁴ ve Gotzos³⁵ tarafından ayrı ayrı yayınlanmıştır. Günümüzde, kalretinin, pozitif mezotelyoma belirleyicilerinin en özgül ve en duyarlı olanlardan biri olarak görülmektedir (24, 33). Epitelioid mezotelyomada sentezlenen ama sarkomatoid mezotelyomada sentezlenmeyen mezotelin, D2-40, podoplanin ve keratin 5/6 gibi

diğer yüksek düzeyde sensitif mezotelyoma işaretleyicilerinin aksine kalretinin, mezotelyomanın tüm histolojik tiplerinde sıkça sentezlenmektedir (33). Epiteloid mezotelyomada kalretinin boyanma şekli tipik olarak güçlü ve diffüzdür. Hem nükleus hem de sitoplazmada boyanma gözlenir. Bunun aksine primer akciğer adenokarsinomlarındaki boyanma genelde küçük odaklar şeklindedir. Bununla birlikte, nadir durumlarda primer akciğer adenokarsinomlarında diffüz boyanma oluşabilir (33). Ek olarak, farklı karsinom tipleri arasında kalretinin sentezi yönünden farklılıklar vardır. Son araştırmalarda kalretinin pozitiflik yüzdesi, akciğer karsinomlarında (4, 36) %6–10, seröz karsinomlarda (29, 37) %31–38 ve renal hücre karsinomlarında (38) %0–4 arasında değişmektedir. Akciğerin skuamöz hücreli karsinomları da %23-39’u bu belirleyiciyi sentezlemektedir (33, 38).

2.3.4- Sitokeratin 5/6 (CK 5/6)

Sitokeratinler, mezotel, epitel ve bu dokulardan kaynaklanan tümörlerde sentezlenen intrasitoplazmik ara filamenttir (33). Geniş spektrumlu ve düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinler hem mezotelyomada hem de primer akciğer adenokarsinomunda sentezlenmektedir (33). Literatürde bu belirleyiciyi kullanılarak yapılan çalışmalarda, keratin 5/6 sentez yüzdesi, epiteloid mezotelyomalarda %64–100 (4, 6), akciğer adenokarsinomlarında %0–19 (4, 6) ve seröz karsinomalarda %22-35’tir (29). Hemen hemen bütün mezotelyomalar keratin 5/6 sentezler; bunun yanında boyanma fokal olduğu için, küçük bir biyopsi örneğinde immünboyama yapıldığında yalancı-negatif bir sonucun elde edilebileceği unutulmamalıdır. Primer akciğer adenokarsinomlarında CK 5/6 pozitifliği yaygın değildir ve olduğunda da genelde tümörün fokal bir alanında ya da birkaç izole hücrede gözlenir (29, 33). Bu bulgunun muhtemelen, akciğer adenokarsinomlarında olduğu bilinen skuamöz bir farklılaşmanın varlığına bağlı olduğu yorumu yapılmıştır (22, 33). Seröz karsinomların üçte biri CK 5/6 sentezlediği için bu belirleyici ile ilgili immünboyama, bu tümörlerin mezotelyomalardan ayırt edilmesinde pratik bir yarar taşımaz. Skuamöz akciğer karsinomları genelde keratin 5/6 sentezler ve çoğu durumda boyanma güçlü ve diffüzdür; bu nedenle, bu belirleyici bu tümörlerin mezotelyomalardan ayrılmasında faydalı değildir (22, 33).

2.3.5- Karsinoembriyonik Antijen (CEA)

CEA ilk önce Gold ve Freeman³⁹ tarafından tanımlanan bir onkofetal glikoproteindir. Mezotelyal hücreler normalde CEA sentezlemez, daha çok akciğer kaynaklı adenokarsinomlar tarafından yaygın olarak sentezlenir. Tanısal immünohistokimyanın gelmesiyle birlikte, CEA mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomu arasında ayırım yapma yeteneği açısından ilk çalışılan belirleyicilerden biri olmuştur (33). İlk çalışmalarda, nonspesifik çapraz-reaksiyon veren antijenlere bağlı olarak mezotelyomada yanlış pozitif sonuçlar verebilen poliklonal CEA kullanılmıştır. Monoklonal CEA'nın keşfi bunun diagnostik duyarlılığını ve özgüllüğünü arttırmıştır ve en güçlü ve yararlı antikordardan biri olarak kabul edilmiştir (4, 5, 6, 20, 22, 33).

2.3.6- Epitelyal Spesifik Antijen (MOC 31)

MOC-31, insan pankarsinom ile ilişkili epitelyal glikoprotein-2 (EGP-2) olarak da bilinen epitelyal hücre adezyon molekülünü (Ep-CAM) tanıyan monoklonal bir antikordur. Bu belirleyici, birçok karsinomda sentezlendiği ve epitelioid mezotelyomalarda nadiren ya da düzensiz olarak sentezlendiği için, günümüzde epitelioid mezotelyomalar ile primer akciğer adenokarsinomları arasında ayırım yapmak için kullanılan ve negatif mezotelyoma belirleyicileri arasında en duyarlı ve özgül olanlarından biri olduğu düşünülmektedir (22, 24, 33). Neredeyse bütün primer akciğer adenokarsinomları ve overin seröz karsinomları bu işaretleyici ile tepki verir ve boyanma modeli genelde güçlü ve diffüzdür . Bunun aksine, epitelioid mezotelyomaların sadece %5-10'unda fokal bölgelerde veya dağınık hücrelerde pozitif reaksiyonlar rapor edilmiştir (4, 5, 6, 22, 24, 33).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 1988–2008 yılları arası mezotelyoma tanısı almış 11 olgu ve gruplardaki vaka sayılarının benzer olması için, primer akciğer adenokarsinomu tanısı almış 11, bronkioloalveoler karsinom tanısı almış 11, mezotelyal proliferasyon tanısı almış 11 ve plevranın metastatik karsinomu tanısı almış 11 olgunun kesitleri çalışmaya alındı. Hastalar 37–75 yaşları arasındaydı. Çalışmaya alınan olguların kesitleri yeniden gözden geçirildi ve tanıları doğrulandı. Tümörün en iyi temsil edildiği, nekroz içermeyen bloklar seçilerek, bu bloklardan itinalı bir şekilde hazırlanan kesitlere; podoplanin, D2–40, kalretinin, CK 5/6, CEA, MOC 31 ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı.

3.1- İmmünohistokimya

Dokuların tümü, %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonunda 24 saat fikse edilmiş ve parafinde bloklanmıştı. İncelenen kesitlerden, tümörü en iyi temsil eden, kanama ve nekroz içermeyen birer blok seçildi. Seçilen bloklardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak podoplanin (18H5, sc-59347, Santa Cruz, California, USA), D2–40 (monoclonal mouse, clone D2–40, DAKO, Carpinteria, USA), CEA (Karsinoembriyonik Antijen) (monoclonal mouse, CD66e Ab–3, Thermo Scientific, CA, USA), epithelial spesifik antigen Ab–7 (monoclonal mouse, clone MOC 31, Thermo Scientific, CA, USA), calretinin (rabbit, clone SP13, Thermo Scientific, CA, USA), keratin 5/6 Ab–2 (monoclonal mouse, clone D5/16 B4, Labvision, CA, USA) primer antikorlarıyla, streptavidin biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Podoplanin için timusdaki epitelyal hücreler, D2–40 için tonsildeki germinal merkez lenfositleri, CEA ve MOC 31 için kolonik adenokarsinom, kalretinin ve CK 5/6 için plevral doku kesiti pozitif kontrol olarak kullanıldı. MOC 31, CEA, kalretinin kullanıma hazır antikorlardı. Podoplanin, D2–40, CK 5/6 için çeşitli denemelerle en iyi dilüsyon oranları saptandı. Podoplanin 1/50, D2–40 1/100, CK 5/6 1/20 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Deparafinize edilen kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilerek giderildi. Bundan sonra CK 5/6 hariç tüm antikorlar için kesitler sitrat

tamponu içerisinde 35 dakika kaynatılıp oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. CK 5/6 için kesitler, tripsinde 15 dakika inkübe edildi. Kesitlere 5'er dakika blok antikör, sonrada 1'er saat MOC 31, CEA, kalretinin, CK 5/6, 2 saat D2-40, 18 saat podoplanin primer antikörleri uygulandı. Biotinli anti-immünglobulin ve streptavidin-peroksidaz konjugat ile 10'ar dakika inkübe edildi. Renklendirici ajan olarak 3,3'-diamino benzidin (DAB) içeren kit (DAKO, Carpinteria, USA) kullanıldı. Son olarak kesitler Mayer hematoksilen ile 60 saniye boyandı. Kesitler DAB uygulamasına kadar tüm aşamalarda pH 7,6 fosfat tamponu ile, DAB uygulamasından sonra ise distile su ile yıkandı. İşlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Sonuçlar Leica HMLB45 (Leica, Germany, 2000) ışık mikroskobu ile podoplanin, D2-40 ve MOC 31 için hücre membranı, CEA için sitoplazmik ve luminal membran, kalretinin ve CK 5/6 için sitoplazmik boyanma dikkate alınarak değerlendirildi. Seçilen her bir bloktaki tümörlü alanlarda boyanma yaygınlığının değerlendirilmesi semikantitatif olarak yapıldı. Boyanma yaygınlığı, mikroskopta tüm alanlarda, tümör hücrelerinin boyanma yüzdeleri 5 ve 5'in katları üzerinden değerlendirilerek aşağıdaki kategorilere ayrıldı; tümör hücrelerinin hiç birisinde boyanma yoksa 0, %1-25'inde boyanma varsa 1+, %26-50'sinde boyanma varsa 2+, %51-75'inde boyanma varsa 3+, %76-100'ünde boyanma varsa 4+ olarak skorlandı. Boyanma yüzdeleri ve ifade skorları ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi.

3.2- İstatistiksel yöntemler

İstatistiksel değerlendirmeler bilgisayar ortamında " SPSS 12,0 for Windows " programıyla yapıldı. Gruplardaki olgu sayısının 30'dan küçük olması, verilerin normal dağılım göstermemesi üzerine parametrik olmayan istatistiksel yöntem seçildi. Podoplanin ve D2-40 boyanmasının malign mezotelyoma ile malignensi gruplarında ifade skorlarının ikili karşılaştırılması için " Mann-Whitney-U " testi kullanıldı. Mezotelyoma tanısı alan vakalarda podoplanin, D2-40, kalretinin, CK 5/6 boyanma yaygınlığının ikili karşılaştırılmasında " Wilcoxon Signed Ranks " testi kullanıldı. Değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Her pozitif mezotelyal belirleyici için, malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomlarının ayrt edilmesindeki duyarlılık ve özgüllük hesaplandı.

Duyarlılık = $\frac{\text{Yeni testin saptadığı hastalar (doğru pozitifler)}}{\text{Toplam hasta sayısı (geçerli teste göre)}}$

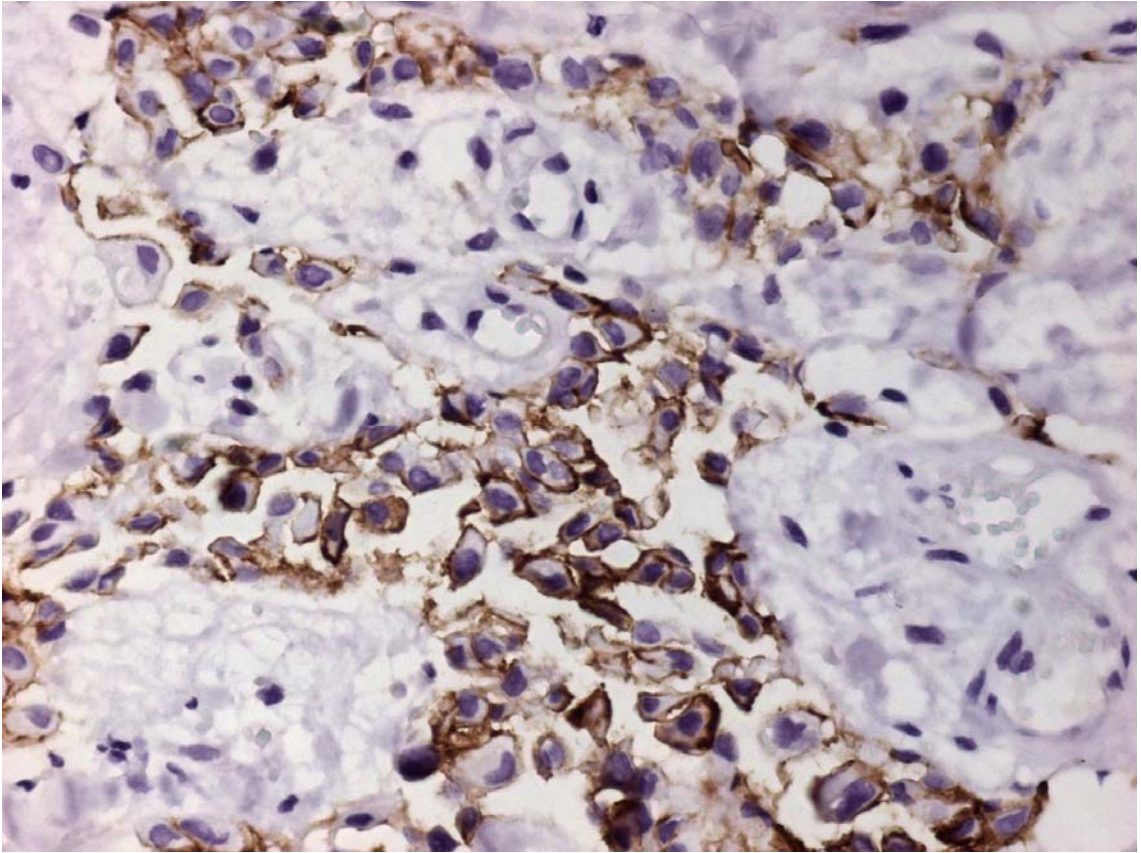
Özgüllük = $\frac{\text{Yeni testin saptadığı sağlamlar (doğru negatifler)}}{\text{Toplam sağlam sayısı (geçerli teste göre)}}$

Geçerli test: Altın standart, morfolojik olarak mezotelyoma tanısı.

Yeni test: Podoplanin ve D2-40 immünohistokimyasal belirleyicileri.

4- BULGULAR

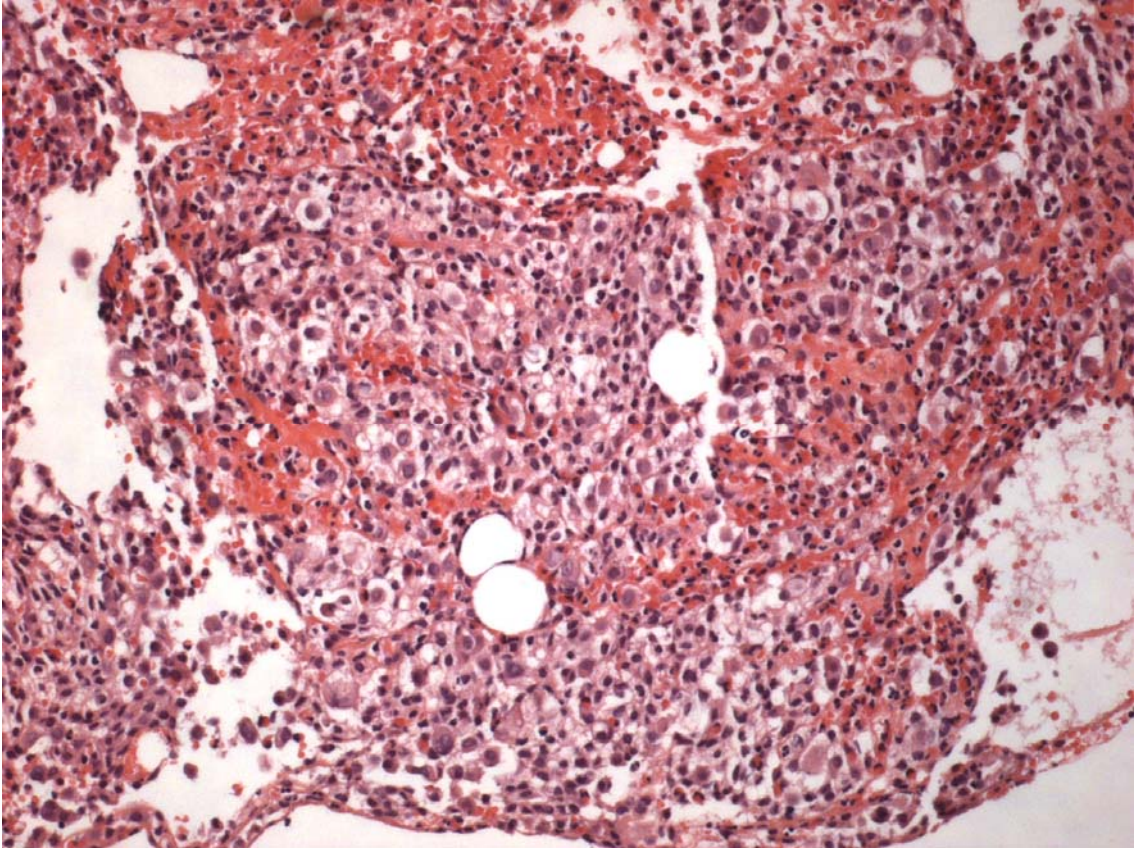
Çalışmaya 66 olgu alındı. Malign mezotelyoma tanısı almış 11 adet, primer akciğer adenokarsinomu tanısı almış 11 adet, bronkioloalveoler karsinom tanısı almış 11 adet, plevranın metastatik karsinomu tanısı almış 11 adet ve mezotelyal proliferasyon tanısı almış 11 adet olguya D2-40, podoplanin, kalretinin, CK 5/6, CEA, MOC-31 ile yapılan immünohistokimyasal çalışmanın sonuçları Tablo 5’de özetlendi.



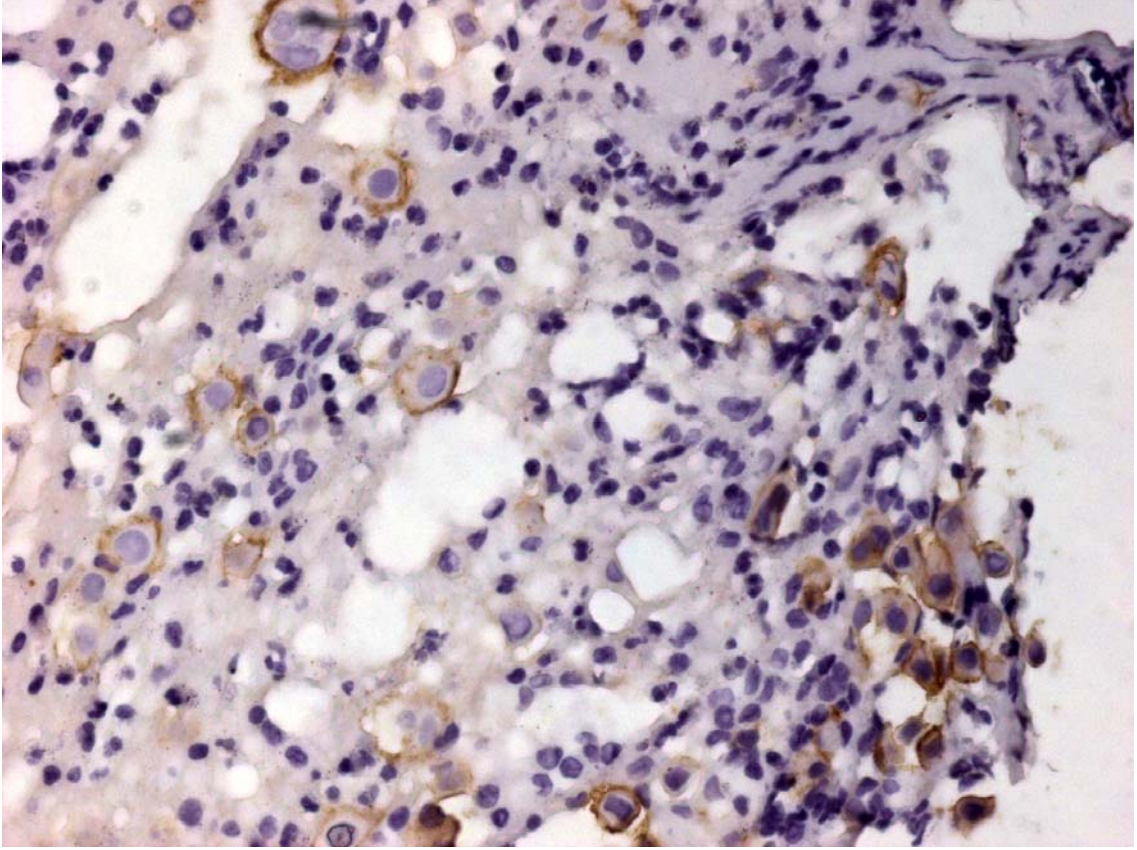
Şekil 4. Malign mezotelyomada D2-40 ifadesi (DAB, X400).

Onbir malign mezotelyoma olgusunun 7’si (%63,6) D2-40 için pozitif. Bu olguların 2’sinde boyanma 4+, 1’inde 3+, 1’inde 2+, 3’ünde 1+ olarak skorlandı. Genellikle membran boyunca devam eden sürekli ve apikal membranöz boyanma, nadiren intrasitoplazmik boyanma görüldü (Şekil 4). Primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevranın metastatik karsinomu olgularının hiç birinde

pozitiflik görülmedi. Mezotelyal proliferasyon olgularının 10'u (%90,9) pozitif. Bunların 3'ünde boyanma 4+, 2'sinde 3+, 5'inde 2+ olarak skorlandı (Şekil 5, 6). Boyanma niteliği mezotelyoma ile benzerdi. İstatistiksel olarak mezotelyoma olgularında D2-40 pozitifliği, primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomu olgularıyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 6). Mezotelyal proliferasyon olgularıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

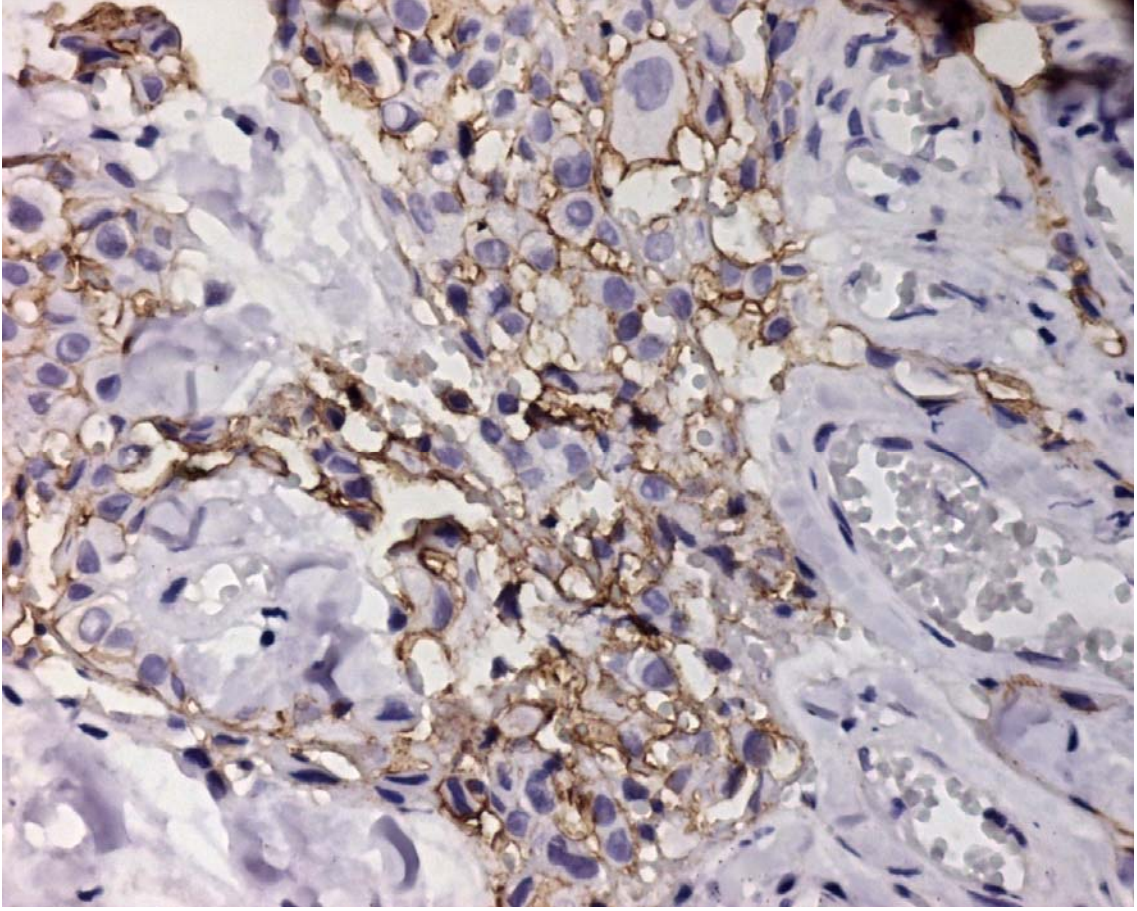


Şekil 5. Mezotelyal proliferasyon (HE, X200).



Şekil 6. Mezotelyal proliferasyonda D2-40 ifadesi (DAB, X400).

Onbir malign mezotelyoma olgusunun 9'u (%81,8) podoplanin için pozitif. Bu olguların 1'inde boyanma 4+, 5'inde 3+, 1'inde 2+, 2'sinde 1+ olarak skorlandı. Genellikle membran boyunca devam eden sürekli ve apikal membranöz boyanma görüldü. Nadiren sitoplazmik ve nükleer boyanma görüldü (Şekil 7). Primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevranın metastatik karsinomu olgularının hiçbirinde pozitiflik görülmedi. Podoplanin mezotelyal proliferasyon olgularının 10'u (%90,9) pozitif. Bunların 3'ünde boyanma 4+, 2'sinde 3+, 5'inde 2+ olarak skorlandı (Şekil 8). Boyanma niteliği mezotelyoma ile benzerdi. İstatistiksel olarak malign mezotelyoma olgularında podoplanin boyanması primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomu olgularıyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 6). Mezotelyal proliferasyon olgularıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).



Şekil 7. Malign mezotelyomada podoplanin ifadesi (DAB, X400).

Onbir mezotelyoma olgusunun 9'u (%81,8) Kalretinin için pozitif. Bu olguların 5'inde boyanma 4+, 1'inde 3+, 3'ünde 1+ olarak skorlandı. Tüm vakalarda hem nükleer hemde sitoplazmik boyanma görüldü. Primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevranın metastatik karsinomu olgularının hiç birinde pozitiflik görülmedi. Mezotelyal proliferasyon olgularının 10'u (%90,9) pozitif. Bunların 1'inde boyanma 4+, 4'ünde 3+, 4'ünde 2+, 1'inde 1+ olarak skorlandı. Boyanma niteliği mezotelyoma ile benzerdi. İstatistiksel olarak mezotelyomalarda kalretinin pozitifliği primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomu olgularıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). Mezotelyal proliferasyon olgularıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 5: İmmünohistokimyasal sonuçlar

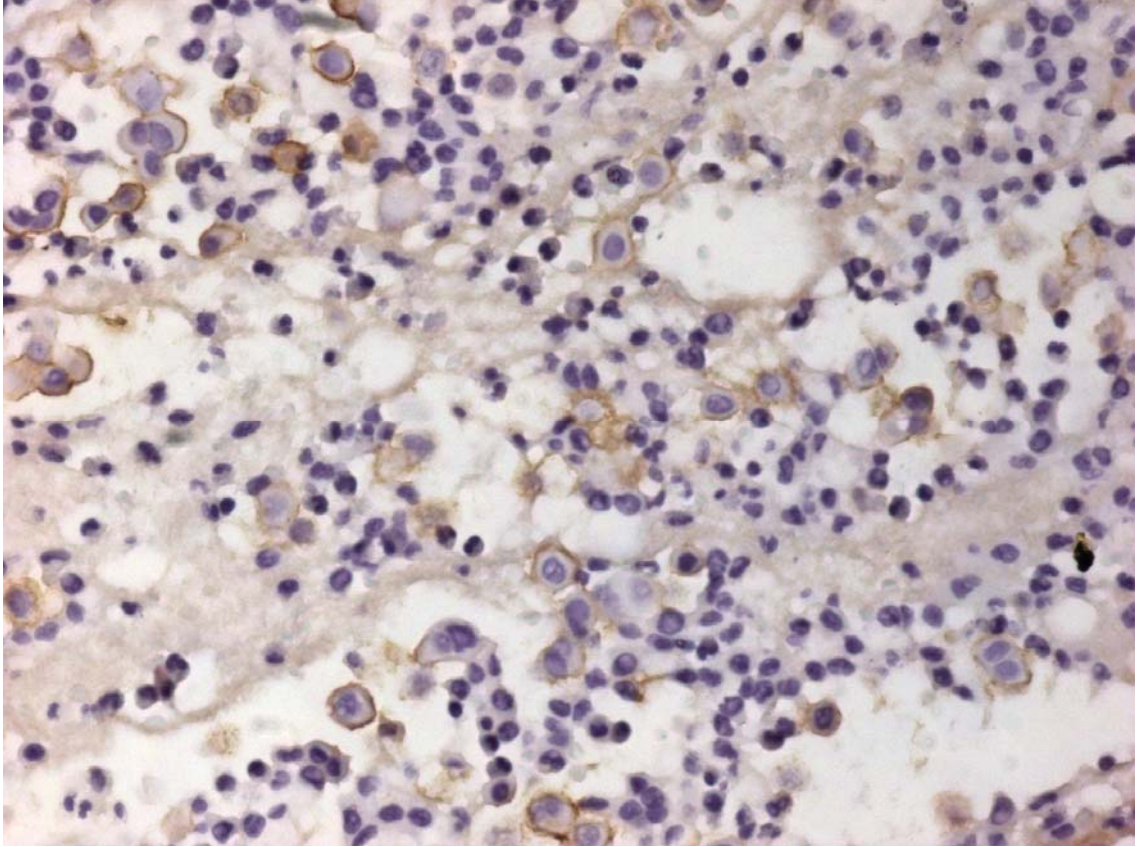
İşaretleyiciler	Olgular	Skorlar				
	n (%)	0	1+	2+	3+	4+
Mezotelyoma						
D2-40	7/11(63,6)	4	3	1	1	2
Podoplanin	9/11(81,8)	2	2	1	5	1
Kalretinin	9/11(81,8)	2	3	0	1	5
CK 5/6	6/11(54,5)	5	4	0	2	0
CEA	1/11(9)	10	0	1	0	0
MOC-31	1/11(9)	10	1	0	0	0
Primer akciğer adenokarsinomu						
D2-40	0/11(0)	11	0	0	0	0
Podoplanin	0/11(0)	11	0	0	0	0
Kalretinin	0/11(0)	11	0	0	0	0
CK 5/6	0/11(0)	11	0	0	0	0
CEA	10/11(90,9)	1	0	2	3	5
MOC-31	8/11(72,7)	2	2	2	1	3
Bronkioloalveoler karsinom						
D2-40	0/11(0)	11	0	0	0	0
Podoplanin	0/11(0)	11	0	0	0	0
Kalretinin	0/11(0)	11	0	0	0	0
CK 5/6	0/11(0)	11	0	0	0	0
CEA	9/11(81,8)	2	3	2	0	4
MOC-31	7/11(63,6)	4	5	1	0	1

İşaretleyiciler	Olgular n (%)	Skorlar				
		0	1+	2+	3+	4+
Plevranın metastatik karsinomu						
D2-40	0/11(0)	11	0	0	0	0
Podoplanin	0/11(0)	11	0	0	0	0
Kalretinin	0/11(0)	11	0	0	0	0
CK 5/6	0/11(0)	11	0	0	0	0
CEA	8/11(72,7)	3	2	1	1	4
MOC-31	8/11(72,7)	3	1	2	3	2
Mezotelyal proliferasyon						
D2-40	10/11(90,9)	1	0	5	2	3
Podoplanin	10/11(90,9)	1	0	5	2	3
Kalretinin	10/11(90,9)	1	1	4	4	1
CK 5/6	9/11(81,8)	2	8	1	0	0
CEA	0/11(0)	11	0	0	0	0
MOC-31	0/11(0)	11	0	0	0	0

Onbir mezotelyoma olgusunun 6'sı (%54,5) CK 5/6 için pozitif. Bu vakaların 2'sinde boyanma 3+, 4'ünde 1+ olarak skorlandı. Tüm vakalarda sitoplazmik boyanma görüldü. Primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevranın metastatik karsinomu olgularının hiç birinde pozitiflik görülmedi. Mezotelyal proliferasyon olgularının 9'u (%81,8) pozitif. Bunların 1'inde boyanma 2+, 8'inde 1+ olarak skorlandı. Boyanma niteliği mezotelyoma ile benzerdi. İstatistiksel olarak boyanma bulguları; malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevranın metastatik karsinomu olguları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 6). Mezotelyal proliferasyon olgularıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 6: D2-40, Podoplanin, Kalretinin, CK 5/6 ifade skorları için mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomları karşılaştırıldığında elde edilen p değerleri

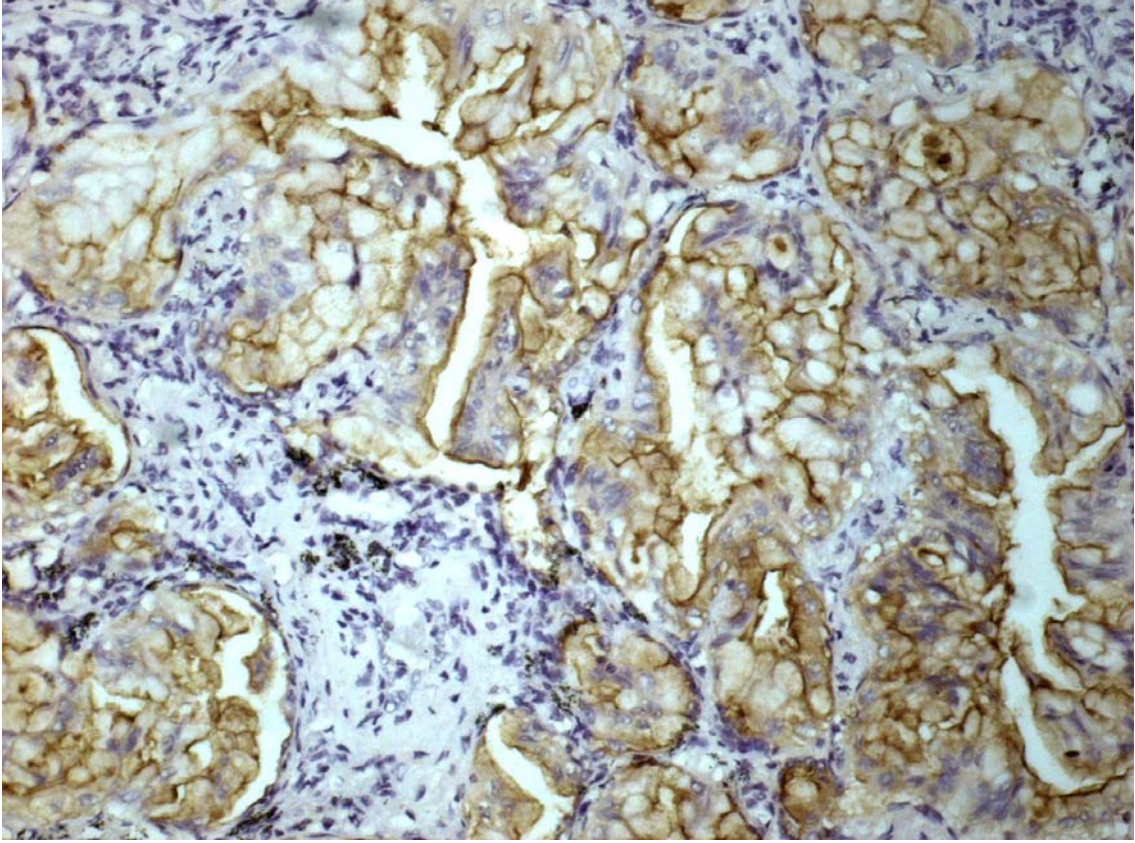
	D2-40	Podoplanin	Kalretinin	CK 5/6
p değeri	0,002	0,000	0,000	0,006



Şekil 8. Mezotelyal proliferasyonda podoplanin ifadesi (DAB, X400).

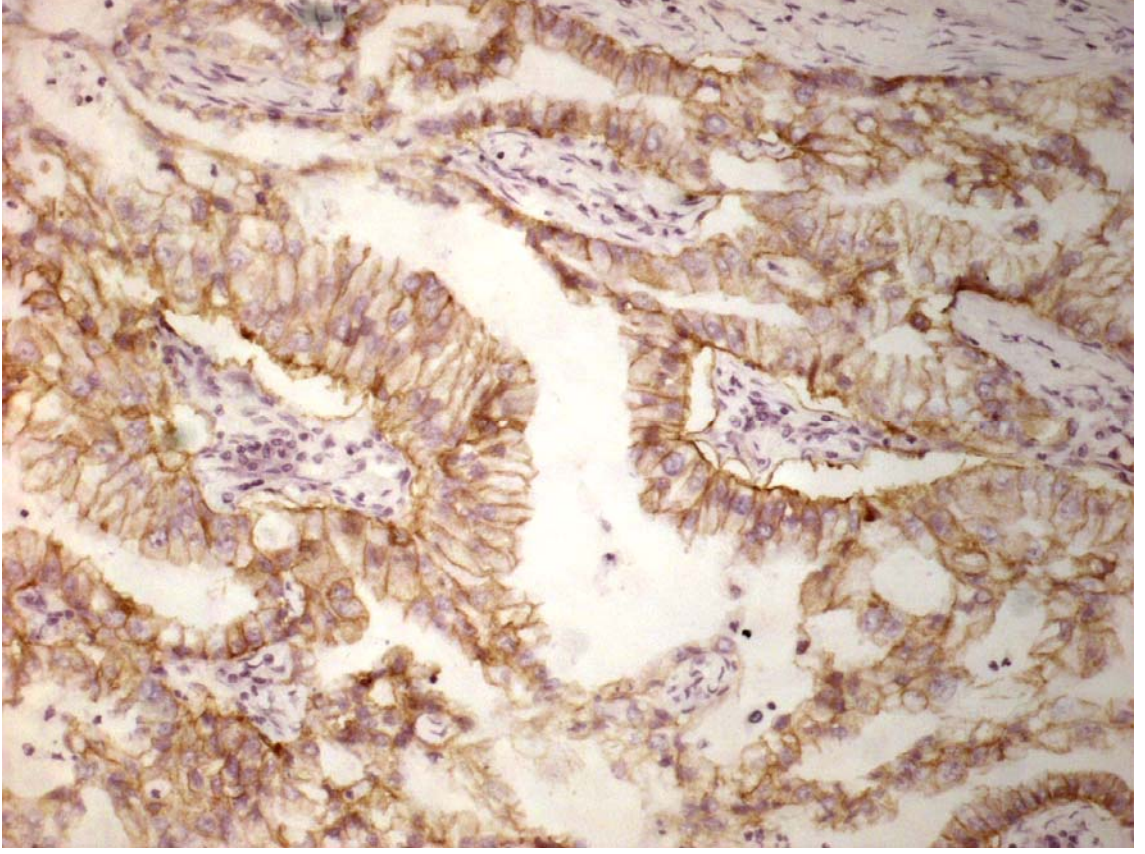
Primer akciğer adenokarsinom olgularının 10'u (%90,9) CEA için pozitif. Bu olguların 5'inde boyanma 4+, 3'ünde 3+, 2'sinde 2+ olarak skorlandı. Genellikle sitoplazmik ve luminal membran boyanması görüldü (Şekil 9). Bronkioloalveoler karsinom vakalarının 9'u (%81,8) pozitif. Bunların 4'ünde boyanma 4+, 2'sinde 2+, 3'ünde 1+ olarak skorlandı. Boyanma niteliği adenokarsinom ile benzerdi. Plevranın metastatik karsinomu olgularının 8'i (%72,7) pozitif. Vakaların 4'ünde boyanma 4+, 1'inde 3+, 1'inde 2+, 2'sinde 1+ olarak skorlandı. Mezotelyoma olgularının 1'i (%9)

pozitif ve boyanma 2+ olarak skorlandı. Mezotelyal proliferasyon olgularının hiçbiri CEA için pozitif değildi.



Şekil 9. Primer akciğer adenokarsinounda CEA ifadesi (DAB, X400).

Primer akciğer adenokarsinom olgularının 8'i (%72,7) MOC-31 için pozitif. Bu olguların 3'ünde boyanma 4+, 1'inde 3+, 2'sinde 2+, 2'sinde 1+ olarak skorlandı. Genellikle hücre membranı boyunca boyanma görüldü. Bronkioloalveoler karsinom olgularının 7'si (%63,6) pozitif. Bunların 1'inde boyanma 4+, 1'inde 2+, 5'inde 1+ olarak skorlandı (Şekil 10). Plevranın metastatik karsinomu olgularının 8'i (%72,7) pozitif. Vakaların 2'sinde boyanma 4+, 3'ünde 3+, 2'sinde 2+, 1'inde 1+ olarak skorlandı. Boyanma nitelikleri adenokarsinom ile benzerdi. Mezotelyoma olgularının 1'i (%9) pozitif ve boyanma 1+ olarak skorlandı. Mezotelyal proliferasyon olgularının hiçbiri MOC-31 için pozitif değildi.



Şekil 10. Bronkoalveoler karsinomda MOC-31 ifadesi (DAB, X400).

Mezotelyoma olguları için D2-40 ve podoplanin boyanma yaygınlıkları birbirleriyle ve pozitif mezotelyal işaretleyicisi olarak kabul edilen kalretinin ile ikili karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir boyanma farkı bulunmadı ($p>0,05$). CK 5/6 ile podoplanin karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edildi. Ortalamalarına bakıldığında podoplaninin mezotelyomalarda daha fazla boyanma yaygınlığı gösterdiği bulundu (Tablo 7).

Tablo 7: Malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomlarını ayırt etmede D2-40 ve podoplaninin boyanma yüzdelerinin diğer pozitif mezotelyal belirleyicilerle karşılaştırılmasında elde edilen p değerleri

Mezotelyoma	Podoplanin-D2-40	Podoplanin-Kalretinin	Podoplanin-CK 5/6	D2-40-Kalretinin	D2-40-CK 5/6
p değeri	0,214	0,609	0,033	0,068	0,336

Her bir pozitif mezotelyal belirleyici için mezotelyal proliferasyon grup dışı bırakıldığında özgüllüğü ve duyarlılığı hesaplandı ve Tablo 8’de gösterildi. Tüm mezotelyal belirleyiciler için özgüllük % 100 hesaplanırken mezotelyal proliferasyon grubu eklendiğinde %77,3 bulundu. Mezotelyoma için en yüksek duyarlılık podoplanin, D2-40, kalretinin kombinasyonu ve podoplanin, D2-40, CK 5/6, kalretinin kombinasyonu kullanıldığında saptandı.

Tablo 8: Malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomlarının ayırt edilmesinde pozitif mezotelyal belirleyicilerin özgüllüğü ve duyarlılığı

	Duyarlılık	Özgüllük
D2-40	% 63,6	% 100
Podoplanin	% 81,8	% 100
Kalretinin	% 81,8	% 100
CK 5/6	% 54,5	% 100

5- TARTIŞMA

Mezotelyoma ilk kez 1960 yılında asbestle ilişkili olarak Wagner ve arkadaşları tarafından Güney Afrika'da tanımlanmıştır (1). Endüstrileşmiş ülkelerde asbestin kullanımına paralel olarak görülme sıklığı hızla yükselmektedir (2).

Günümüze kadar primer akciğer adenokarsinomlarından malign mezotelyomanın ayırımında çok sayıda belirleyici kullanılmıştır (4, 5, 6, 20, 22, 33, 36). Ayırıcı tanı, akciğerin adenokarsinom hücrelerinde pozitif olan belirleyicilerin, mezotelyal hücrelerde negatif olma esasına dayandırılmıştır. Bu amaçla kullanılan primer belirleyiciler; CEA, CD 15 (Leu M1), B72.3, Ber-Ep4, Bg 8, E- kadherin ve MOC-31'dir (3, 4, 5, 6, 22, 24). Son yıllarda malign mezotelyomalarda yaygın olarak sentezlenip primer akciğer adenokarsinomlarında sentezlenmeyen belirleyiciler tanımlanmıştır. Bunların bazıları kalretinin, CK5/6, WT-1, mezotelin, HBME-1, OC-125, trombomodulin, podoplanin ve D2-40'dır (22, 23, 24).

Mezotelyoma için spesifik bir belirleyici henüz bulunamamıştır (22, 24, 33). Bu yüzden mezotelyomanın primer akciğer adenokarsinomundan ve plevraya metastaz yapan diğer adenokarsinomlardan ayırt edilmesi için immünohistokimyasal panel kullanılmaktadır. Bu immünohistokimyasal panellerin hem pozitif hem de negatif mezotelyoma belirleyicilerinden oluşması gerektiğine yönelik genel bir kabul vardır (4, 21, 22, 24, 33). Ancak mutlak bir immünohistokimyasal panel üzerinde fikir birliği yoktur (22, 24, 33).

Son zamanlarda mezotelyoma tanısında immünohistokimyasal bir işaretleyici olarak podoplaninin değeri ile ilgili araştırmalar yayınlanmıştır (23, 29, 30). Bu çalışmaların sonuçları, podoplaninin epitelioid mezotelyomalarda sıkça sentezlendiği, sarkomatoid mezotelyomalarda genelde sentezlenmediğini göstermektedir (23, 30). Epitelioid mezotelyomalarda rapor edilen pozitiflik yüzdesi %86–100 (22) arasında değişmektedir; boyanma niteliğinin hücrelerin apikal yüzeyi boyunca oluştuğu ve membranöz karakterde olduğu tanımlanmıştır (29, 30). Kimura ve arkadaşları⁴⁰, 5 epitelioid mezotelyomanın beşinde de podoplanin sentezlendiğini ama değişik kaynaklı 93 adenokarsinomun hiçbirinde sentezlenmediğini rapor etmiş ve bu belirleyicilerin mezotelyoma ve adenokarsinomları ayırmada yararlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Birkaç farklı araştırma grubu, akciğer adenokarsinomlarının hemen hemen hepsinde podoplaninin negatif

olduğunu, bu yüzden bu belirleyicinin bu maligniteler ile epitelioid mezotelyomalar arasında ayırım yapma konusunda çok yararlı olabileceğini göstermişlerdir (23, 29, 30, 40). Bununla birlikte podoplanin, seröz karsinomlar ile skuamöz akciğer karsinomlarında da sentezlenebileceği için, bunlar ile epitelioid mezotelyomalar arasında ayırım yapmada değerinin çok sınırlı olduğunu belirten çalışmalar da vardır (29, 30). Ordonez son iki çalışmada 30 akciğer skuamöz karsinomunun %50'sinde(41) ve 45 seröz karsinomun %15'inde (42) podoplanin sentezi saptamıştır (41,42).

Son araştırmalar, D2-40'nin epitelioid mezotelyomalarda sıkça sentezlenmesinden dolayı primer akciğer adenokarsinomu ile mezotelyoma arasında ayırım yapmada yararlı olabileceğini göstermiştir (23, 29, 30, 33, 42). Chu ve arkadaşları²⁹ 2005 yılında, D2-40'nin bir mezotelyoma işaretleyicisi olarak önemini araştırmışlardır. Bu çalışmada, 16 bifazik mezotelyomanın 15'inin epitelioid bileşenlerinde (%94) ve 33 epitelioid mezotelyomanın 33'ünde (%100) güçlü membranöz boyanma rapor edilmiştir (29). Ayrıca, 26 seröz karsinomun 17 tanesinde (%65) fokal, zayıf, membranöz bir pozitiflik saptanmış, diğer araştırılan karsinomların hiçbirinde membranöz bir boyanma görülmemiştir (29). Ordonez²³ farklı mezotelyoma gruplarının kullanıldığı iki ayrı çalışmada, 40 epitelioid mezotelyomanın 37'sinde (%93) ve 29 epitelioid mezotelyomanın 25'inde (%86) membranöz D2-40 pozitifliğinin olduğunu saptamıştır (23). Olguların büyük çoğunluğunda, boyanma diffüz ve primer olarak hücrelerin apikal yüzeyi boyunca olduğu belirtilmiştir. Araştırılan farklı karsinom tipleri arasında, seröz karsinomların sadece %15'inde izlenmiş olan pozitifliğin, epitelioid mezotelyomaların aksine fokal olma eğiliminde olduğu vurgulanmıştır. Diğer karsinomların hiçbirinde D2-40 pozitifliği saptamamıştır (23). Ordonez²³ bu bulgularla, D2-40'nin epitelioid mezotelyomanın tanısında en duyarlı ve özgül belirleyicilerden biri olduğunu öne sürmüştür.

Çalışmamızda, malign mezotelyomalardaki podoplanin ve D2-40 boyanma yaygınlığı ile primer akciğer adenokarsinomlarında, bronkioloalveoler karsinomlarda ve plevraya metastatik adenokarsinomlarda elde edilen boyanma yaygınlığı arasında istatistiksel olarak fark görülmüştür. Bu bulgumuz literatüre paralel olarak, podoplanin ve D2-40'nin malign mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomunun ayırıcı tanısında önem kazandığını göstermiştir.

Ordonez ve arkadaşları^{23,42} iki karşılaştırmalı çalışmada, podoplaninin mezotelyoma teşhisinde D2-40'a benzer duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini belirlemişlerdir. Biz de

çalışmamızda, malign mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomlarını ayırımında podoplanin ve D2-40 arasında istatistiksel olarak fark olmadığını ve benzer duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduklarını belirledik.

Kalretinin, mezotelyoma tanısında kullanışlı olduğu bulunan ilk pozitif mezotelyal belirleyicilerden biridir (22, 33). 1996'da Doglioni ve arkadaşları³⁴ 36 epitelioid mezotelyomada güçlü kalretinin pozitifliği rapor etmişler ama 294 adenokarsinomun sadece 28'inde (%10) fokal reaktivite gözlemişlerdir (33, 34). Bu gözlemlere dayanarak araştırmacılar, kalretinin mezotelyoma tanısına yardımcı olabilecek yararlı bir immunhistokimyasal belirleyici olabileceğini bildirmişlerdir (33). Daha sonrasında bu belirleyicinin değeri ile ilgili raporlar yayınlanmıştır ve bazıları Doglioni ve arkadaşlarının gözlemlerini doğruladığı halde (33, 35, 43) bazıları da kalretinin boyanmasının mezotelyomaları adenokarsinomlardan ayırmada bir değeri olmadığını (33, 44) ifade etmişlerdir. 1998'de biri anti-kobay kalretinini, diğeri anti-insan rekombinant kalretinin olan iki poliklonal antikor kullanılarak yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, farklı araştırmacılar tarafından gözlenen sonuç uyumsuzluğunun nedeninin çalışmalarda kullanılan antikor tiplerinin farklı olmasından kaynaklandığı saptanmıştır (45). Sadece insan rekombinant kalretinine yönelik belirleyiciler mezotelyoma tanısında yararlı olarak bulunmuştur (4). Kalretinin son zamanlarda pozitif mezotelyoma belirleyicilerinin en özgüllerinden biri ve en duyarlısı olanı olarak gösterilmektedir (22, 24, 33). Bu nedenle, günümüzde mezotelyoma tanısında kullanılan çeşitli panellerde primer işaretleyicilerden biri olarak önerilmektedir (24).

Çalışmamızda mezotelyoma olguları kalretinin ile pozitif boyanırken primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevranın metastatik adenokarsinomu olgularının hiç birinde pozitiflik görülmemesi literatürle uyumlu olarak, kalretinin'in bu tümörlerin ayırıcı tanısında kullanılabilir pozitif mezotelyal bir belirleyici olduğunu teyid etmiştir. Bu çalışmada, kalretinin özgüllüğü ve duyarlılığı, podoplanin ile aynı bulundu. D2-40 'ın kalretinin ile özgüllüğü benzerken, duyarlılığı daha düşük bulunmuştur.

CK 5/6'nın akciğer adenokarsinomalarını mezotelyomalardan ayırmada yararlı olabileceğini gösteren ilk çalışma Blobel ve arkadaşları⁴⁶ tarafından 1985'te yapılmıştır. Bu işaretleyicilerle ilgili literatürlerde rapor edilen pozitiflik yüzdesi, epitelioid mezotelyomalarda %64-100 (4, 6, 47), akciğer adenokarsinomlarında %0-19 (4, 6, 36, 47)

ve seröz karsinomlarda %25–35 arasında değişmektedir (33). Akciğer adenokarsinomlarında keratin 5/6 sentezi yaygın değildir ve olduğunda da oluşan reaksiyon genelde küçük fokal alanlarda ya da dağınık hücrelerde olmaktadır (22, 24, 33). Bu bulgunun en olası sebebi akciğer adenokarsinomlarında olduğu bilinen skuamöz farklılaşmanın varlığıdır (33).

Bizim çalışmamızda mezotelyoma vakalarının %54,5 CK5/6 ile pozitif boyanırken primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevranın metastatik karsinomu olgularının hiç birinde pozitiflik görmememiz, bu tümörlerin ayırımı için oluşturulacak immünohistokimyasal panelde kullanılabilir bir belirleyici olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, podoplanin, D2–40 ve kalretinin arasında mezotelyoma tanısı için istatistiksel olarak fark olmadığını, podoplaninin mezotelyomalarda boyanma yaygınlığının CK5/6'dan daha yüksek olduğunu gördük (Tablo 7). Çalışmamızda kullanılan pozitif mezotelyal belirleyicilerin (Podoplanin, D2-40, Kalretinin, CK5/6) özgüllükleri mezotelyal proliferasyon hariç tutulduğunda %100 hesaplanırken, mezotelyal proliferasyon grubu eklendiğinde %77,3 bulundu ve duyarlılığı en yüksek belirleyici olarak podoplanin ve kalretinin öne çıktı. D2-40'ın duyarlılığı CK 5/6'dan daha yüksek bulundu (Tablo 8). Bulgular daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik gösteriyordu (23, 29).

CEA epitelioid mezotelyomalar ile akciğer adenokarsinomları arasında ayırım yapmada kullanılmak üzere genel olarak kabul görmüş ilk immunhistokimyasal belirleyicidir (48). En son araştırmalara göre, mezotelyomalar hemen hemen hep negatifken (4, 49), akciğer adenokarsinomlarının %50-90'ının CEA sentezlemektedir (4, 6, 20, 49). Yüksek duyarlılık ve özgüllüklerinden dolayı CEA hala bu iki tümör arasında ayırım yapmak için en iyi immunhistokimyasal belirleyici olarak kabul edilmektedir (33).

Son çalışmalara göre MOC–31, primer akciğer adenokarsinomlarının %90-100'ü (4, 21), akciğer skuamöz karsinomların %87'si (41), overin ve peritoneumun seröz karsinomlarının %98'i bu antikoriyle güçlü bir şekilde boyanmaktadır (33, 22). Aksine mezotelyomaların sadece %2-10'unda küçük fokal bölgelerde veya dağınık tümör hücrelerinde pozitif olduğu rapor edilmiştir (42, 36, 4, 21). Yüksek duyarlılık ve özgüllüğünden dolayı, MOC–31, günümüzde plevral mezotelyomalar ile hem akciğer adenokarsinomları hem de akciğer skuamöz karsinomları ve peritoneal mezotelyomalar

ile seröz karsinomlar arasında ayırım yapmada kullanılabilir en iyi negatif mezotelyoma belirleyicisi olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (33, 22).

Çalışmamızda mezotelyomaların %9(1 tanesi)'u CEA ve MOC- 31 ile pozitif boyanmıştır. Boyanma yaygınlığının primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomları ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunması ve fokal boyanma göstermesi, literatür ile paralellik göstermektedir.

Günümüzde malign mezotelyomaların tanısında kullanılabilir yüksek oranda özgül ve duyarlı çeşitli belirleyiciler vardır (3, 4, 5, 6, 24, 33). Ancak önceden de ifade edildiği gibi mezotelyomalar için mutlak özgül ve duyarlı belirleyici tanımlanmamıştır (3, 4, 5, 6). Bu nedenle çok sayıda belirleyiciyi içeren immünohistokimyasal paneller oluşturulmuştur (22, 24, 33). Uygulamalı bir bakış açısına göre, genellikle 4 belirleyicili; 2 pozitif ve 2 negatif mezotelyal belirleyici içeren bir panel malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomunu ayırt etmeye olanak sağlayabilir (3, 4, 5, 6, 22, 24, 33).

Çalışmamızda pozitif mezotelyoma belirleyicisi olarak D2-40 tek başına kullanıldığında 11 mezotelyomanın 7 tanesini (%63,6) pozitif boyarken, podoplaninin tek başına 9(%81,8) olguda pozitif boyandığını saptadık. D2-40, podoplanin kombinasyonu ve D2-40, podoplanin, CK5/6 kombinasyonları ayrı ayrı kullanıldığında 11 olgunun 10 tanesinde (%90,9) pozitif sonuç alındı. D2-40, podoplanin ve kalretinin kombinasyonu ve D2-40, podoplanin, CK5/6, kalretinin kombinasyonu kullanıldığında mezotelyoma olgularının tamamı (%100) boyandı ve en yüksek duyarlılığı elde etmemizi sağladı.

Çalışmamızda mezotelyal proliferasyon olguları D2-40 ve podoplanin ile %90,9(10 tanesi) pozitif boyandı ve bu bulgu kalretinin boyanması ile benzerdi. Normal ve neoplastik mezotelyal hücrelerde, yüksek düzeyde boyanma gösterdiği için podoplanin ve D2-40'ın malign mezotelyomalar ile primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom ve plevranın metastatik karsinomları arasında ayırıcı tanı yapılmasında yararlı olduklarını, ancak benign mezotelyal lezyonlar ile malign mezotelyomayı ayırt etmede fayda sağlamadığını saptadık. Literatürde benign mezotelyal proliferasyon ile malign mezotelyomanın ayırımında bu belirleyicilerin her iki durumda da eş değer boyanmaları nedeniyle bir başarı elde edilememiştir. Bizim çalışmamızda aynı sonucun ortaya çıkması bu görüşü desteklemiştir (29, 40).

Literatürden elde ettiğimiz bulgular ile çalışmamızda elde edilen bulgular harmanlandığında mezotelyomalar ile akciğer adenokarsinomlarını, bronkioloalveoler karsinomu ve plevraya metastaz yapan karsinomları ayırmak için tek bir belirleyicinin yeterli olmayacağı, pozitif ve negatif boyanan mezotelyal belirleyicilerle bir panel oluşturulmasının zorunlu olduğu kanısına vardık. Bu panel içerisine pozitif mezotelyal belirleyici olarak; podoplanin, D2-40, kalretinin, CK 5/6, yanısıra negatif mezotelyal belirleyici olarak; CEA, MOC-31'in katılmasının diğer alternatiflere göre daha avantajlı olabileceğini düşündük. Bununla birlikte podoplanin ve D2-40'ın rutin tanısal çalışmadaki yararlarının tam olarak belirlenmemiş olduğu ve diğer pozitif mezotelyal işaretleyicilerden maliyetlerinin yüksek olduğu gerçeği de göz önünde bulundurulmalıdır.

6- SONUÇLAR

1- Malign mezotelyoma ile primer akciğer adenokarsinomu, bronkioloalveoler karsinom, plevral adenokarsinom metastazı ayırımında podoplanin, D2-40, kalretinin, CK5/6 pozitif boyanması mezotelyoma lehine anlamlıdır.

2- Malign mezotelyoma ve primer akciğer adenokarsinomlarının ayırt edilmesinde podoplanin, D2-40, kalretinin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Podoplaninin mezotelyomalarda boyanma yaygınlığı, CK5/6'dan daha yüksektir.

3- Podoplanin, D2-40 normal ve neoplastik hücrelerde eş değer boyanma gösterdiklerinden mezotelyoma ve mezotelyal proliferasyonun ayırımında yardımcı belirleyiciler değildir.

4- Mezotelyoma için podoplanin, D2-40, kalretinin, CK 5/6 duyarlılıkları sırasıyla, %81,8, %63,6, %81,8, %54,5 bulundu. Mezotelyoma için en yüksek duyarlılık podoplanin, D2-40, kalretinin kombinasyonu ve podoplanin, D2-40, CK 5/6, kalretinin kombinasyonu kullanıldığında saptandı.

5- Mezotelyoma için Podoplanin, D2-40, Kalretinin, CK 5/6 özgüllükleri mezotelyal proliferasyon hariç bırakılarak hesaplandığında %100, mezotelyal proliferasyon dahil edilerek hesaplandığında %77,3 hesaplandı.

7- KAYNAKLAR

- 1- Wagner JC, Sleebs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Med* 1960; 17: 260.
- 2- Burdorf A, Jarvholm B, Englund A. Explaining differences in incidence rates of pleural mesothelioma between Sweden and the Netherlands. *Int J Cancer* 2005; 113: 298.
- 3- Weiss SW, Goldblum JR. Mesothelioma. In: Weiss SW, Goldblum JR. (ed) *Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors*. 5th ed. St Louis. Mosby; 2008; 789-823.
- 4- Ordonez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1031- 51.
- 5- King J E, Thatcher N, Pickering C AC, Hasleton PS. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology* 2006; 48: 223–232.
- 6- Abutaily AS, Addis BJ, Roche WR. Immunohistochemistry in the distinction between malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma: a critical evaluation of new antibodies *J Clin Pathol* 2002; 55: 662–668.
- 7- Light RW. Anatomy of the Pleura in: *Pleural Diseases*. Lipincott, Williams and Wilkins. 2001; 1-8.
- 8- Sahn SA. The pleura. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 184-234.
- 9- Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Roos PJ. Structure, blood, supply and lymphatic vessels of the sheep's visceral pleura. *Am J Anat* 1982; 165: 277-294.

- 10- Anthony VB, Sahn SA, Mossman B. Pleural cell biology in health and disease. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1236-1239.
- 11- Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L. Surface morphology of the human pleura: A scanning electron microscopic study. *Chest* 1998; 92: 149-153
- 12- Travis WD, Brambilla E, Hermelink HKM, Haris CC. Tumours of the pleura. Mesothelioma. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics Tumours of the Lung, Thymus and Heart, IARC. Pres Lyon(France) 2004;* 125-144.
- 13- Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg* 2000; 44: 565-601.
- 14- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *The Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philedelphia, Elsevier Saunders. 2004;* 712-772.
- 15- Rom WN, Travis WD, Brody AR. Cellular and molecular basis of the asbestos related diseases. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 408.
- 16- Heintz NH, Janssen YM, Mossman BT. Persistent induction of c-fox and c-jun expression by asbestos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3299.
- 17- Dhaene K, Van Marck E, Kumar-Singh S, et al. Telomerase activity in human pleural mesothelioma. *Thorax* 1998; 53: 915.
- 18- Rosai J. Respiratory tract. In: Rosai J.(ed) *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed., Edinburg, Mosby. 2004;* 361-364.
- 19- Allen TC, Recognition of Histopathologic Patterns of Diffuse Malignant Mesothelioma in Differential Diagnosis of Pleural Biopsies *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129: 1415–1420 .

- 20- Comin CE, Novelli L, Boddi V, et al. Calretinin, thrombomodulin, CEA, and CD15: a useful combination of immunohistochemical markers for differentiating pleural epithelial mesothelioma from peripheral pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 529- 36.
- 21- Oates J, Edwards C. HBME-1, MOC-31, WT-1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. *Histopathology* 2000; 36: 341.
- 22- Ordonez NG. Immunohistochemical Diagnosis of Epithelioid Mesothelioma An Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129: 1407–1414.
- 23- Ordonez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2005; 36: 372- 80.
- 24- Ordonez NG. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers. *Hum Pathol* 2002; 33: 953.
- 25- Travis WD, Brambilla E, Hermelink HKM, Haris CC. Tumours of the lung. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics Tumours of the Lung, Thymus and Heart, IARC. Pres Lyon(France) 2004; 9-122.
- 26- Marks A, Sutherland DR, Bailey D, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 1999; 80: 569–578.
- 27- Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002; 15: 434–440.

- 28- Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002; 82: 1255–1257.
- 29- Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 2005; 18: 105–110.
- 30- Sienko A, Zander DS, Killen D, et al. D2-40 is a novel new marker of malignant mesothelioma (MM): tissue microarray study of 45 MM versus 409 lung carcinomas and primary non-mesothelial neoplasms of the pleura and chest wall. *Mod Pathol* 2005; 18: 318.
- 31- Wetterwald A, Hofstetter W, Cecchini MG, et al. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* 1996; 18: 125–132.
- 32- Ordonez NG. Podoplanin: A Novel Diagnostic Immunohistochemical Marker *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 83–88.
- 33- Ordonez NG, What are the current best immunohistochemical markers for the diagnosis of epithelioid mesothelioma? A review and update. *Hum Pathol* 2007; 38: 1–16.
- 34- Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, et al. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1037–1046.
- 35- Gotzos V, Vogt P, Celio MR. The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of the epithelial type. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 137–147.

- 36- Carella R, Deleonardi G, D'Errico A, et al. Immunohistochemical panels for differentiating epithelial malignant mesothelioma from lung adenocarcinoma: a study with logistic regression analysis. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 43–50.
- 37- Cathro HP, Stoler MH. The utility of calretinin, inhibin, and WT1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of ovarian tumors. *Hum Pathol* 2005; 36: 195–201.
- 38- Lugli A, Forster Y, Haas P, et al. Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples. *Hum Pathol* 2003; 34: 994–1000.
- 39- Gold P, Freeman S. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467–481.
- 40- Kimura N, Kimura I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int* 2005; 55: 83 - 6.
- 41- Ordonez NG. The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epithelioid mesotheliomas and squamous carcinomas of the lung: a comparative study. *Mod Pathol* 2006; 19: 417- 28.
- 42- Ordonez NG. The diagnostic utility of immunohistochemistry and electron microscopy in distinguishing between peritoneal mesotheliomas and serous carcinomas: a comparative study. *Mod Pathol* 2006; 19: 34 - 48.
- 43- Barberis MCP, Faleri M, Veronese S, et al. Calretinin: a selective marker of normal and neoplastic mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 1997; 41: 1757- 61.
- 44- Riera JR, Astengo-Osuna C, Longmate JA, et al. The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma. A reevaluation after heat-induced epitope retrieval. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 1409- 19.

- 45- Ordonez NG. Value of calretinin immunostaining in differentiating epithelial mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11: 929- 33.
- 46- Blobel GA, Moll R, Franke WW, et al. The intermediate filament cytoskeleton of malignant mesotheliomas and its diagnostic significance. *Am J Pathol* 1985; 121: 235-47.
- 47- Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol* 2002; 15: 6- 10.
- 48- Wang NS, Huang SN, Gold P. Absence of carcinoembryonic antigen-like material in mesothelioma. An immunohistochemical differentiation from other lung cancers. *Cancer* 1979; 44: 937 – 43.
- 49- Roberts F, Harper CM, Downie I, et al. Immunohistochemical analysis still has a limited role in the diagnosis of malignant mesothelioma: a study of thirteen antibodies. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 253- 62.