



## TANISAL SİTOLOJİDE İMMUNOSİTOKİMYANIN YERİ

### THE ROLE OF IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN DIAGNOSTIC CYTOLOGY

Ali VERAL Deniz NART Özden GÜNEL

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

**Anahtar Sözcükler:** immünositokimya, sitoloji, immunohistokimya

**Key Words:** immunocytochemistry, cytology, immunohistochemistry

#### ÖZET

*Bu araştırmada immünositokimyasal uygulamanın tanısal güçlük yaşanan olgulardaki etkinliğini ve bu yönde uygulanan tekniklerin sonuçlar üzerine olan etkisini incelemek amacıyla 60 olguya ait 64 sitolojik materyale çeşitli primer antikorlardan oluşan immünositokimyasal boyamalar yapıldı.*

*Çalışmanın sonucunda immünositokimyasal bulguların immunhistokimyasal bulgularla uyumlu olduğu ve sitolojik tanıya katkısı olduğu saptandı. Ayrıca yöntemin dekolorize preparatlara uygulanmasının birçok olguda immünositokimyasal sonuçlara olumsuz etkisinin olmadığı görüldü.*

#### SUMMARY

*In this study, a wide variety of primary antibodies were applied on 64 cytological materials taken from 60 patients in order to investigate the effectiveness of immunocytochemical application in the problematic cases regarding diagnosis and effects of the technique on results.*

*The results of this study showed that immunocytochemical findings were compatible with immunohistochemical findings and have aided to cytologic diagnosis. In addition it has been proven that application of immunocytochemistry to decolorised slides has apparently no constructive effect on staining.*

#### GİRİŞ

Rutin tanısal sitolojide hücrelerin benign-malign doğasının ayırımı ve malign hücrenin kökeninin belirlenmesi sitoloji ile ilgilenen patoloğların sıklıkla karşılaştıkları bir durumdur. Genellikle sitomorfolojik kriterler ve klinikopatolojik korelasyonla elde edilen bilgilerle materyale tanısal bir yaklaşım sağlanmakta, ancak olguların %10-15' inde rutin yöntemlerle tümör tipinin belirlenmesi güç, hatta olanaksız olmaktadır (1). Bu gibi durumlarda yardımcı tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu yöntemlerin arasında

elektron mikroskobu, akım sitometri, immunfloresans ve immünositokimya (ISK) yer almaktadır.

Bu çalışmada sitolojik materyalde tanısal güçlük yaşanan olgularda immünositokimyasal yöntemin etkinliği, sonuçların immunohistokimyasal bulgular ile korelasyonu ve yeterli materyal sıkıntısı çekilen olgularda uygulanan dekolorizasyon tekniğinin boyanma kalitesine ve paternine olan etkisi araştırılmıştır.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanısal amaçlı sitolojik materyali incelenen 60 hasta alındı. Bu hastalara ait 64 materyale

Yazışma adresi: Ali Veral, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Makalenin geliş tarihi: 15.03.2001, kabul tarihi: 25.05.2001

prospektif olarak 157 immunositokimyasal inceleme uygulandı. Yeterli materyali bulunmayan olgularda H.E. ya da May-Grünwald Giemsa boyalı preparatlar %1 HCl+70<sup>0</sup> alkolde dekolorize edilerek elde edilen, diğer olgularda ise rutin işlemler sırasında tespitli-boyasız saklanan ya da gerek duyulduğunda materyalden tekrar hazırlanan preparatlar kullanıldı.

Immunositokimyasal incelemede çeşitli primer antikorlar (sitokeratin, EMA, vimentin, LCA, BerEP-4, CD-15, CEA, ER, PR, c-erbB2, Ki67, p53, tiroglobulin, CA-125, kromogranin, sinaptofizin,  $\alpha_1$ -antitripsin, CD3, CD43, CD79, lambda hafif zincir) ve peroksidaz-antiperoksidaz üniversal kit (DAKO<sup>®</sup>) kullanıldı.

Çalışmada immunositokimyasal inceleme sonuçlarının sitolojik tanıya katkısı yanı sıra dekolorize ve boyasız preparatlarda elde edilen boyanma paternleri ve olguların bir kısmında sitolojik materyal ile biopsi materyalindeki immunositokimyasal ve immunohistokimyasal inceleme sonuçlarının korelasyonu araştırıldı.

## BULGULAR

Rutin H.E. ya da May-Grünwald Giemsa boyalı preparatlardan elde edilen bulgular yanı sıra immunositokimyasal bulgular eşliğinde 64 materyalin 58'i (% 90.6) malign sitoloji, üçü (% 4.7) benign sitoloji, üçü (% 4.7) kuşku sitoloji tanısı almıştır.

Sitolojik materyal değerlendirilirken H.E. ve/veya May-Grünwald Giemsa boyalı preparatlardan elde edilen tanısal yaklaşımdan sonra uygulanan immunositokimyasal çalışma sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; ilk değerlendirmede malign-benign ayırımı yapılamayıp tümüyle immunositokimyasal bulgularla tanıya gidilen olgularda immunositokimyasal çalışma "**Tanı Koydurucu**," ilk değerlendirmede malignite ya da benignite yönünde elde edilen bulguları immunositokimyasal çalışma destekliyorsa "**Tanıya Katkılı**," desteklemiyorsa "**Tanıya Katkısız**" şeklinde değerlendirildi. Buna göre immunositokimyasal uygulama 64 materyalin 16'sında (% 25) "**Tanı Koydurucu**," 36'sında (% 56.2) "**Tanıya Katkılı**," 12'sinde (% 18.8) "**Tanıya Katkısız**" olarak değerlendirildi.

Dekolorizasyonun İSK boyanma sonuçlarına etkisini araştırmak amacıyla çalışmamızda 25 immunositokimyasal uygulamayı dekolorize ve boyasız-tespitli preparatlara aynı anda uyguladık. Bunlardan 14'ünde (% 56) her iki grup preparatta da aynı sonucu (pozitif / negatif) elde ederken, 11 olguda (% 44) iki grup preparat arasında farklı sonuçlar alındı. Bunlardan üçünde dekolorize preparatta, dördünde boyasız-tespitli preparatta pozitivite saptanırken, dört olguda her iki grup preparatta da pozitif

boyanma elde edilmesine karşın, pozitivite boyasız tespitli preparatta daha belirgindi (Şekil 1-2). Bunun dışında çalışmamızda yalnız dekolorize preparatlara uygulanan immunositokimyasal çalışmanın 50'sinde (+) sonuç elde edildi.



Şekil 1 Tespitli-boyasız preparatta belirgin CEA pozitivitesi (anti-CEA x 200).

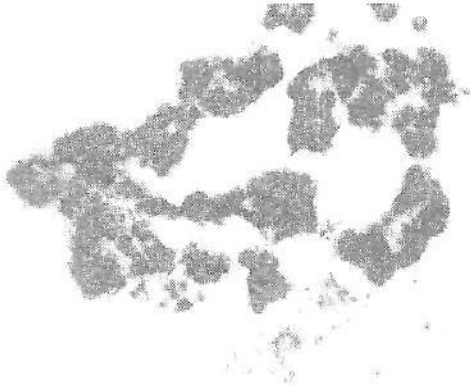


Şekil 2 Dekolorize preparatta CEA pozitivitesi (anti-CEA x 200).

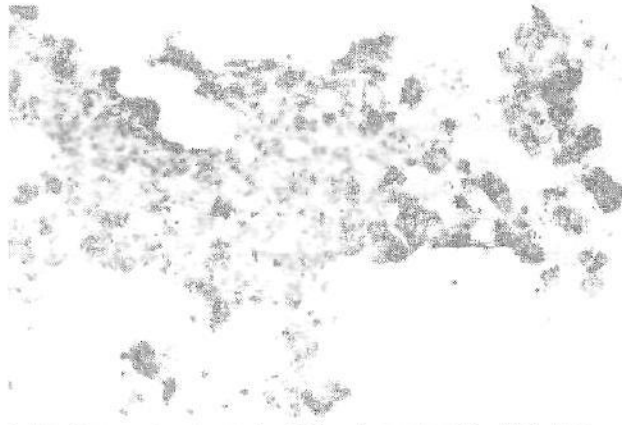
Sitolojik materyali değerlendirilen olgulardan 15'inin aynı anda biopsi ya da eksizyon materyaline immunohistokimyasal (IHK) olarak aynı antikorlar uygulanarak boyanma sonuçları ve paternleri karşılaştırıldı. Buna göre 33 uygulamanın 25'inde (% 75.8) İSK sonuçları IHK sonuçları ile uyumlu iken, sekizinde (% 24.2) uyumsuzdu. Uyumsuz grubun altısı bronkoskopik sitolojik materyal iken, yedisinde immunositokimyasal çalışma dekolorize preparatlara uygulanmıştı.

Çalışma grubumuzun büyük bir kısmını oluşturan (% 65.6) üç seröz boşluğa ait materyale uygulanan İSK sonuçlarını değerlendirdiğimizde; metatetik karsinom düşünülen olgularda CEA (17/20 - % 85) ve Ber-EP4 (10/11 - % 90) pozitif sonuç verdi (Şekil 3-4). Sitomorfolojik özellikleri malign mezotelyoma lehine olan olgularda ise Ber-EP4 tümüyle (-) iken (0/3), CEA dört olgunun yalnızca birinde

fokal boyanma gösterdi. Benign effüzyonlarda (iki olgu) reaktif mezotel hücreleri CEA ve Ber-EP4 ile (-) sonuç verdi.



Sekil 3 Plevra ponksiyonunda CEA pozitivitesi (anti-CEA x 200)



Sekil 4 Batın aspirasyonunda Ber-EP4 pozitivitesi (anti-Ber-EP4 x 100)

## TARTIŞMA

Tanısal sitolojide immunperoksidaz tekniklerin kullanımına ilişkin çalışmalar literatürde seksenli yılların başlarında yer almaya başlamıştır. Bu tarihte Nadji (2) eksfoliyatif sitoloji ve aspirasyon sitolojisinde uyguladığı immunositokimyasal tekniklerin sonuçlarını bildirmiştir. Daha sonra İSK'nin çeşitli sitolojik materyalde kullanımına ilişkin çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Çalışmaların çoğunluğu direkt yayma ya da sitosantrifüj materyali üzerine iken (3-6) hücre bloğu yöntemi daha az oranda kullanılmıştır (7,8). Bizim çalışmamızda da materyalin tümü direkt yayma ve sitosantrifüj materyalinden oluşmaktadır.

Yeterli materyal sıkıntısı çekilen olgularda önceden boyanmış preparatların dekolorize edilerek sitokimyasal ve immunositokimyasal tekniklerin uygulanması tanı güçlüğü yaşanan durumlarda sitopatoloğa bir açılım getirmektedir. Literatürde % 1'lik asit-alkolde dekolorize edilen preparatlara uygulanan immunositokimyasal çalışmaların,

boyasız preparatlara uygulananlar kadar başarılı olduğu bildirilmektedir (9-13). Bizim çalışmamızda da karşılaştırmalı grupta olguların yaklaşık % 60'ında dekolorize preparatların boyasız-tespitli preparatlar ile aynı sonucu verdiğini saptarken, olguların yalnız % 16'sında sadece boyasız-tespitli preparatlarda boyanma elde ettik. Bu grubu oluşturan materyalde kullanılan antikörlerin heterojen olması, boyanma başarısızlığının tümüyle dekolorizasyon işleminin antikora spesifik epitoplara etkilemesi sonucunda ortaya çıkmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte dört olguda da boyanmanın boyasız-tespitli preparatlarda daha fazla olması antijenik determinantların asit-alkolden az da olsa etkilendiği sonucunu ortaya koymaktadır.

İmunositokimyasal sonuçların aynı olguların doku kesitlerine uygulanan immunohistokimyasal sonuçlar ile korele edildiği çalışmalara ilişkin literatürde az sayıda yayın bulunmaktadır. Goukon ve ark. (14) özofagus kitlelerinden alınan biopsi ve fırçalama preparatlarına uyguladıkları p53 ile dokuda % 43, fırçalama % 53 pozitivite elde etmiştir. Flens ve ark. da (15) 64 olgulu çalışmada İSK ile İHK arasında olguların yalnız % 10'unda uyumsuzluk saptamıştır. Biz çalışmamızda olgularımızın yaklaşık % 25'inde İSK ile İHK arasında uyumsuzluk gözledik. Bunların büyük çoğunluğunun bronkoskopik materyal ve dekolorize preparatlar olması uyumsuzluğun yoğun mukus içeriği ve dekolorizasyona bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmaların bir çoğunda İSK'nin sitolojik tanıya ve hücre tipinin belirlenmesine değişik oranlarda katkıda bulunduğu saptanmıştır. Flens ve ark. nin çalışmasında (15) İSK, olguların % 50'sinde tanının temelini oluştururken, Mitteldorf'un çalışmasında (12) İSK, olguların % 82'inde sitolojik tanıya katkı sağlamıştır. Bizim çalışmamızda ise İSK olguların % 81,2'sinde sitolojik tanıya katkı sağlarken, % 25'inde tanı koydurucu idi.

Tanısal sitolojide efüzyonlar tanı güçlüğü en yoğun yaşandığı alanı oluşturmaktadır. Birçok olguda reaktif mezotel hücreleri-metastatik karsinom, reaktif mezotel-mezotelyoma ve metastatik karsinom-mezotelyoma ayırımında sitomorfolojik kriterler yetersiz kalmaktadır. Biopsi materyalinde olduğu gibi sitolojik materyalde de sitokeratin, vimentin, CEA ve EMA'dan oluşan panelin ayırıcı tanıda katkısı olabileceği ortaya konmuştur. Son zamanlarda bu panele Ber-EP4, CD15 (Leu-M1) ve kalretininin de eklendiği görülmektedir. Lidang ve ark. (16) 100 seröz efüzyonda EMA, CEA ve Ber-EP4 den oluşan paneli uyguladığı çalışmasının sonucunda materyali üç gruba ayırmıştır; a) Ber-EP4 ya da CEA (+) hücre içermeyen *benign profil*, b) Ber-EP4 ve kuvvetli EMA pozitivitesi gösteren epitelyal hücreler içeren *malign profil*, c) yalnız EMA ile kuvvetli (+) boyanma gösteren mezotelyal

hücreler içeren *malign profil*. Bizim çalışmamızda ise CEA, Ber-EP4 ve bazı olgularda EMA ve vimentinin de yer aldığı panelin olguların büyük çoğunluğunda ayrıncı tanıda yeterli olduğu saptandı.

Sonuç olarak uygun antikorlarla uygulanan ISK tanısal sitolojide tümör tiplendirmesinde bağımsız, objektif sonuçlar verebilir. ISK tümör tipinin belirlenmesinde daha etkili iken benign-malign ayırımında ya da prognostik faktörlerde daha sınırlı değere sahiptir.

#### KAYNAKLAR

1. Osborn M, Domagala W. Immunocytochemistry. Comprehensive Cytopathology Ed.: M Bibbo. WB Saunders Company, 1991; 1011-1051.
2. Nadji M. The potential value of immunoperoxidase techniques in diagnostic cytology. *Acta Cytol* 1980; 24:442-447.
3. Chess O, Hajdu SI. The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. *Acta Cytol* 1986; 30:1-7.
4. Coleman V, Ormerod MG. Immunoperoxidase staining in tumor marker distribution studies in cytologic specimens. *Acta Cytol* 1981; 25:205-206.
5. Gal R, Aronof A, Gertzmann H, Kessler E. The potential value of the demonstration of thyroglobulin by immunoperoxidase techniques in fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 1987; 31:713-716.
6. Keshgegian AA, Inverso K, Kline TS. Determination of estrogen receptor by monoclonal antireceptor antibody in aspiration biopsy cytology from breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1988; 89:24-29.
7. Davila RM, Bedrossian CWM, Silverberg AB. Immunocytochemistry of the thyroid in surgical and cytologic specimens. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112:51-56.
8. Heyderman E, Brown BME. Preparation of fine needle aspirates for immunocytochemical studies. *Lancet* 1986; 2:520-521.
9. Jorda M, Ganjei P, Nadji M. Retrospective c-erbB-2 immunostaining in aspiration cytology of breast cancer. *Diagn Cytopathol* 1994; 11: 262-265.
10. Travis WD, Wold LE. Immunoperoxidase staining of fine needle aspiration specimens previously stained by the Papanicolaou technique. *Acta Cytol* 1987; 31: 517-519.
11. Schulte MA, Ramzy I, Greenberg SD. Immunocytochemical characterization of large-cell carcinomas of the lung. *Acta Cytol* 1991; 35:175-180.
12. Mitteldorf CA, Alves VA, Kanamura CT, Carneiro PC. Immunocytochemistry applied to aspiration biopsy cytology. Diagnostic contribution in 100 cases of previously stained, routine specimens. *Acta Cytol* 1999; 43: 218-226.
13. Weintraub J, Redard M, Wenger D, Vassilakos P: The application of immunocytochemical techniques to routinely-fixed and stained cytologic specimens. An aid in the differential diagnosis of undifferentiated malignant neoplasms. *Pathol Res Pract* 1990; 186:658-665.
14. Goukon Y, Sasano H, Nishihira T, et al. p53 immunolocalization in cytology specimens: a study in human esophageal carcinoma. *Diagn Cytopathol* 1994; 11:113-118.
15. Flens MJ, van der Valk P, Tadema TM, et al. The contribution of immunocytochemistry in diagnostic cytology. Comparison and evaluation with immunohistology. *Cancer* 1990; 65: 2704-2711.
16. Lidang Jensen M, Johansen P: Immunocytochemical staining of serous effusions: an additional method in the routine cytology practice? *Cytopathology* 1994; 5:93-103.

\* Bu çalışma XV. Ulusal Patoloji Sempozyumunda (24-27 Mayıs 2000, Antalya) poster bildirisi olarak sunulmuştur.