

# Seröz efüzyonlarda malign mezotelyoma, reaktif mezotelyal proliferasyon ve adenokarsinom ayırımında E-kaderin, Kalretinin ve GLUT-1 ekspresyonunun değeri

The value of the expressions of E-cadherin, Calretinin and GLUT-1 in the differential diagnosis of malignant mesothelioma, reactive mesothelial proliferation and adenocarcinoma in serous effusions

Sevcihan MUTLU,<sup>1</sup> Semra DÖLEK GÜLER,<sup>1</sup> Vakur OLGAC,<sup>2</sup> Canan ALATLI<sup>1</sup>

*İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, <sup>1</sup>Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı, <sup>2</sup>Tümör Patolojisi Bilim Dalı, İstanbul*

## AMAÇ

Bu çalışmada, seröz efüzyonlarda malign mezotelyoma, reaktif mezotelyal proliferasyon ve adenokarsinom ayırımında E-kaderin, Kalretinin ve GLUT-1 antikorlarının immüno-sitokimyasal yöntemle ekspresyonu araştırıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grubunu herbir gruptan 20, toplamda 60 hastadan elde edilen hücre bloğu materyali oluşturdu. Seçilen uygun olgulardan elde edilen hücre bloğu materyalinden hazırlanan kesitlere immüno-sitokimyasal boyama yöntemi uygulandı.

## BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, E-kaderin antikorunun adenokarsinomda, Kalretinin antikorunun mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonunda, GLUT-1 antikorunun ise mezotelyoma ve adenokarsinomda güçlü ekspresyonu saptandı.

## SONUÇ

Bulgular sonucunda E-kaderin antikorunun adenokarsinomun mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonundan ayrılmasında; Kalretinin antikorunun mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonunun adenokarsinomdan ayrılmasında; GLUT-1 antikorunun ise adenokarsinom ve mezotelyomanın reaktif mezotel hücre proliferasyonundan ayrılmasında kullanılabilir markerler olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Adenokarsinom; E-kaderin; GLUT-1; Kalretinin; mezotelyoma; reaktif mezotelyal proliferasyon.

## OBJECTIVES

The aim of the study was to establish the value of E-cadherin, Calretinin and GLUT-1 antibodies in serous effusions in the differential diagnosis of malignant mesothelioma, reactive mesothelial proliferation and adenocarcinoma using immunocytochemical method.

## METHODS

The study group consisted of the cell blocks from 60 patients, with 20 in each of the three groups. Immunocytochemistry staining method was applied to the sections prepared from the cell blocks of the selected cases.

## RESULTS

In this study, strong expression of E-cadherin antibody in adenocarcinoma, strong expression of Calretinin antibody in mesothelioma and reactive mesothelial proliferation, and strong expression of GLUT-1 antibody in mesothelioma and adenocarcinoma were established.

## CONCLUSION

The results of the present study revealed that E-cadherin antibody can be successfully used as a marker for the differentiation of adenocarcinoma from mesothelioma and reactive mesothelial proliferation, Calretinin antibody can be used for the differentiation of mesothelioma and reactive mesothelial proliferation from adenocarcinoma, and GLUT-1 antibody can be used for the differentiation of adenocarcinoma and mesothelioma from reactive mesothelial proliferation.

**Key words:** Adenocarcinoma; E-cadherin; GLUT-1; Calretinin; mesothelioma; reactive mesothelial proliferation.

Malign mezotelyoma plevra, periton ve perikard gibi seröz yüzeylerden çıkan bir tümördür ve asbest maruziyetiyle yakından ilişkilidir.<sup>[1,2]</sup> Bu tümör tunica vaginalis'te de tarif edilmiştir.<sup>[2]</sup> Malign mezotelyoma dünya çapında artış göstermektedir.<sup>[3]</sup> Oldukça ölümcül bir kanser türüdür. Medikal ve cerrahi tedavideki son gelişmeler sağkalımda ilerlemeler sağlasa da tedavi oldukça toksik kalmaktadır ve bu tedaviler için uygun hasta seçimi zordur.<sup>[4]</sup> Malign mezotelyomanın sitomorfolojik özelliklerinden dolayı reaktif mezotelyal proliferasyon ve metastatik karsinomdan ayırımı zordur.<sup>[2,5,6]</sup> İmmünsitokimya bu ayırımın yapılmasında oldukça fayda sağlamaktadır.<sup>[7]</sup>

Çalışmamızın amacı, seröz efüzyonlarda malign mezotelyoma, reaktif mezotel hücre proliferasyonu ve adenokarsinom arasındaki sitopatolojik ayırimda E-kaderin, Kalretinin ve GLUT-1 antikörlerinin immünsitokimyasal yöntemle ekspresyonunun araştırılmasıdır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı arşivi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bilim Dalı arşivi, Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı arşivinde 1995-2008 yılları arasında seröz efüzyonlarda reaktif mezotel hücre proliferasyonu, malign mezotelyoma ve adenokarsinom tanısı konmuş olgulardan, her bir gruptan 20 adet, toplamda 60 hastadan elde edilen hücre bloğu materyali kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan malign mezotelyoma tanısı almış 20 hücre bloğu materyalinin 20'si de plevra sıvısıydı. Sitopatolojik olarak sınıflandırıldığında, malign mezotelyoma olgularının 19'u epiteloid tipte, 1'i bifazik tipteydi. Reaktif mezotel hücre proliferasyonu tanısı almış 20 hücre bloğu materyalinin 15'i plevra sıvısı, 5'i periton sıvısıydı. Adenokarsinom tanısı almış 20 hücre bloğu materyalinin 7'si plevra sıvısı, 12'si periton sıvısı, 1'i perikard sıvısıydı.

Seçilen uygun vakalardan elde edilen hücre bloğu materyalinden hazırlanan kesitlere immünsitokimyasal boyama yöntemi uygulandı. Rutin formol-parafin takibinden geçen hücre bloğu ma-

teryalinin parafin bloklarından pozitif şarjlı lamalara yaklaşık 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin lam üzerine tam olarak yapışmaları ve deparafinizasyonu için lamalar bir gece boyunca 56°C sıcaklıkta etüvde bekletildi. Boyama işlemine başlamadan önce lamalar sırasıyla ksilol'de 30 dakika, 99°'lik alkolde 15 dakika, 96°'lik alkolde 15 dakika bekletilerek distile suya alındı. Daha sonra kesitlere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Formalin fiksasyonu ile oluşan gizlenmiş antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacıyla Antijen Retrieval Reagent solüsyonları ile ön muamele yapıldı. Bu amaçla Kalretinin antikoru için EDTA buffer, E-kaderin ve GLUT-1 antikörleri için Citrate Buffer solüsyonu kullanıldı. Antijen retrieval işlemi mikrodalga fırında 5 dakikadan 4 kez uygulandı ve daha sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğuyan lamalar distile suya alındı, kesitlerin etrafı pappen kalemi ile çizilerek 5 dakika Fosfat Buffer Solüsyonu'nda (PBS) bekletildi.

2. Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksitle inkübe edildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı; 5 dakika PBS'te bekletildi.

3. Non-spesifik zemin boyanmasını önlemek için kesitler 15 dakika blokaj solüsyonu (Pre-blocking solution, Life Science Division, 110 ml.) ile inkübe edildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkanmadan, silkelenerek bir sonraki aşamaya geçildi.

4. Primer antikörler damlatıldı. Kalretinin antikoru (Zymed, Mouse, Monoklonal, Clone Z11-E3) için 120 dakika, E-kaderin antikoru (Invitrogen, Mouse, Monoklonal, Clone 4A2C7) için 120 dakika ve GLUT-1 antikoru (Abcam, Mouse, Monoklonal, Clone SPM498) için gece inkübasyonu uygulandı. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı; 5 dakika PBS'te bekletildi.

5. Sekonder antikör solüsyonu (Second Antibody, Life Science Division, 110 ml.) damlatıldı ve 25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı; 5 dakika PBS'te bekletildi.

6. Peroksidaz-streptavidin (Peroxidase - strepta-

vidin, Life Science Division, 110 ml.) damlatıldı; 25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı; 5 dakika PBS'te bekletildi.

7. Kesitler AEC kromojen (AEC substrate buffer (x20), AEC kromojen (x20), hydrogen peroxide (x20)) ile 20 dakika inkübe edildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı.

8. Lamalar 3 dakika Mayer Hematoksilen'de bekletildikten sonra musluk suyu ile yıkandı. Daha sonra 15 saniye amonyaklı suda bekletilerek distile suya alındı. Tüm preparatlar su bazlı kapatma malzemesiyle kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

E-kaderin, Kalretinin ve GLUT-1 ile boyanan preparatlarda tüm tümör hücrelerinden;

%0-10 arasında boyanma gösterenler negatif (-),

%11-30 arasında boyanma gösterenler 1 pozitif (+),

%31-60 arasında boyanma gösterenler 2 pozitif (++) ,

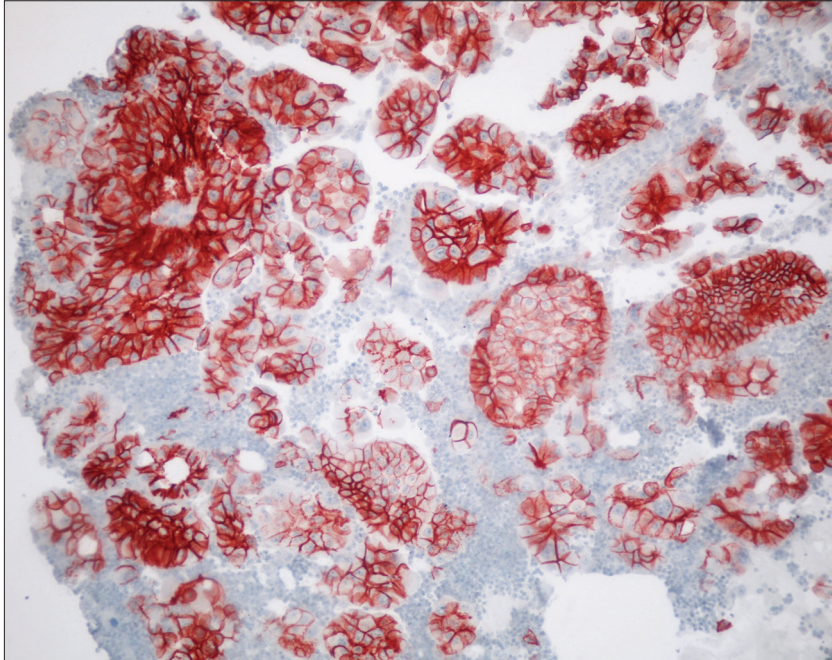
%61-100 arasında boyanma gösterenler 3 pozitif (+++) olarak değerlendirildi.

Hasta gruplarının dağılımı E-kaderin, Kalretinin ve GLUT-1 antikollarının boyanma dereceleri ki-kare testleri ile karşılaştırıldı. Anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  kabul edildi. Hesaplamalar Graph Pad Instat Version 2.02 programı ile yapıldı. Gruplar arasındaki yaş dağılımı karşılaştırılması Anova testi ile yapıldı.

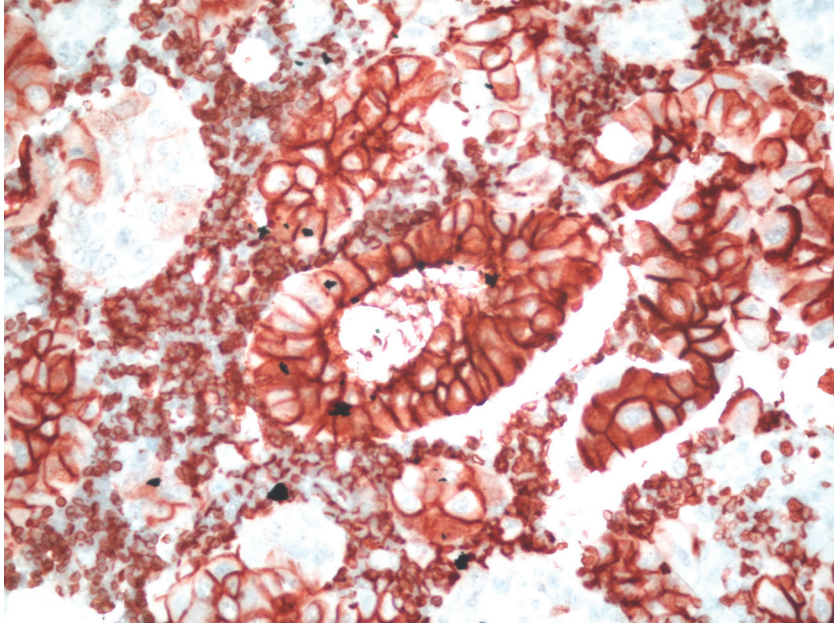
## BULGULAR

Cinsiyet grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda (malign mezotelyoma erkek: 11, kadın: 9; reaktif mezotel hücre proliferasyonu erkek: 13, kadın: 7; adenokarsinom erkek: 8, kadın: 12) anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ( $p=0.28$ ).

Malign mezotelyoma olgularında yaş aralığı 36-78, medyan değeri 55, standart sapma  $\pm 12.25$ , ortalama 55.45; reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularında yaş aralığı 11-87, medyan değeri 58.5, standart sapma  $\pm 16.16$ , ortalama 56.95; adenokarsinom olgularında yaş aralığı 41-82, medyan değeri 60, standart sapma  $\pm 10.33$ , ortalama 60.41 bulunmuştur. Üç grup arasında yaş dağılımları arasında yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ( $p=0.52$ ).



Şekil 1. Adenokarsinom hücrelerinde E-kaderin pozitifliği (x200).



Renkli şekiller derginin online sayısında görülebilir (www.onkder.org)

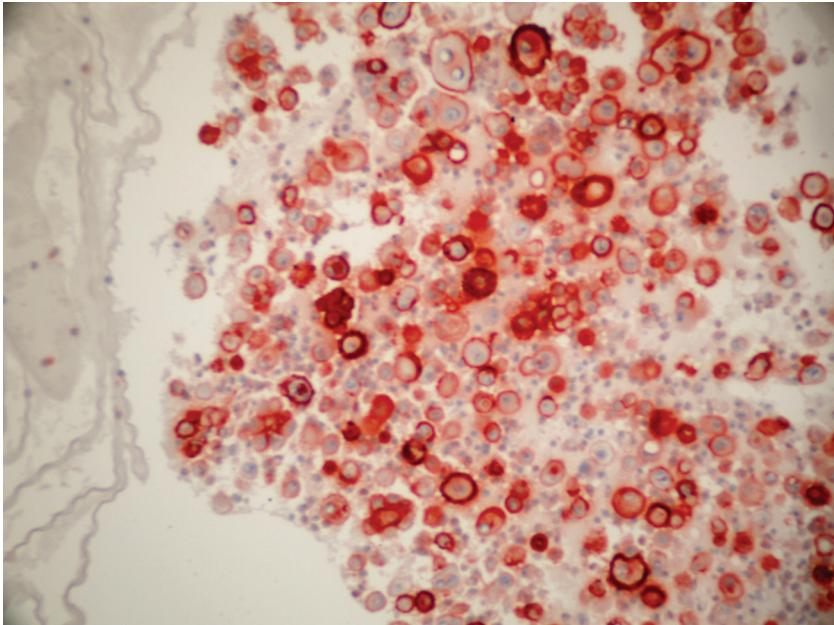
Şekil 2. Adenokarsinom hücrelerinde GLUT-1 pozitifliği (x400).

Çalışmamızda E-kaderin ve GLUT-1 membranöz boyanma (Şekil 1, 2, 3), Kalretinin sitoplazmik ve nükleer boyanma (Şekil 4, 5) göstermiştir.

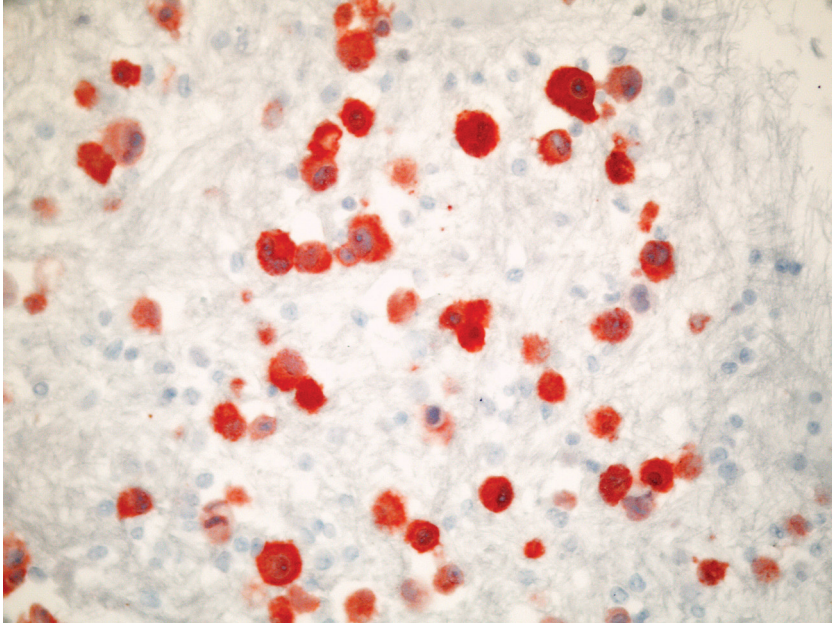
Olguların tanı gruplarına göre immünohistokimyasal boyanma derecelerinin istatistiksel incelenmesinin yapılabilmesi için boyanma dereceleri iki grupta toplanmıştır. Buna göre negatif (-) ve 1 po-

zitif (+) boyanan olgular negatif (-) grubunu, 2 pozitif (++) ve 3 pozitif (+++) boyanan olgular pozitif (+) grubunu oluşturmuştur.

E-kaderin antikoru ile malign mezotelyoma olgularının 19'u negatif (-), 1'i pozitif (+); reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularının 19'u negatif (-), 1'i pozitif (+); adenokarsinom olguları-



Şekil 3. Malign mezotelyoma hücrelerinde GLUT-1 pozitifliği (x200).

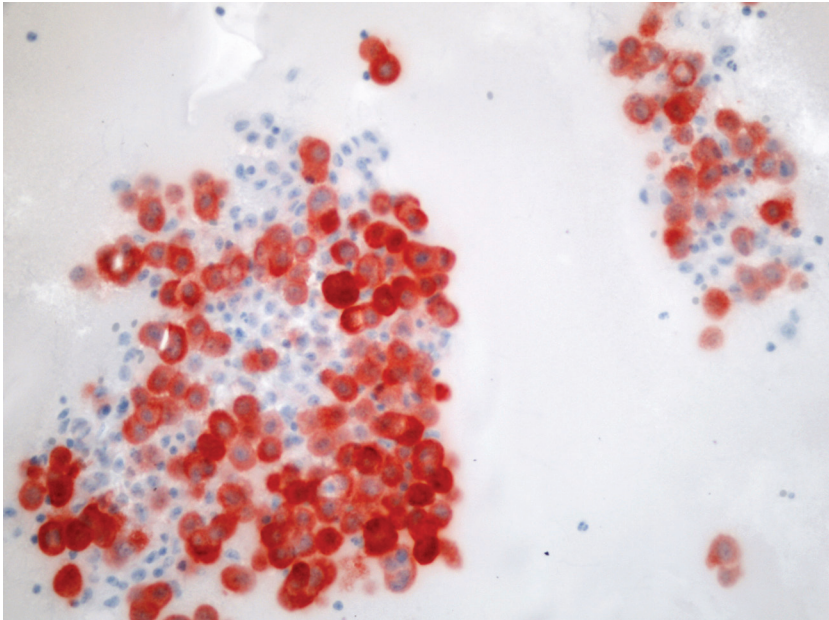


Renkli şekiller derginin online sayısında görülebilir (www.onkder.org)

Şekil 4. Malign mezotelyoma hücrelerinde kalretinin pozitifliği (x400).

nın 1'i negatif (-), 19'u pozitif (+) boyanma göstermiştir. E-kaderin ekspresyonunun tanı gruplarına göre yapılan istatistiksel incelemesinde, bu antikorun malign mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularına oranla adenokarsinom olgularında anlamlı derecede fazla boyanma gösterdiği saptanmıştır ( $p < 0.001$ ).

Kalretinin antikoruna ile malign mezotelyoma olgularının 20'si pozitif (+), reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularının 9'u negatif (-) 11'i pozitif (+); adenokarsinom olgularının 19'u negatif (-), 1'i pozitif (+) boyanma göstermiştir. Kalretinin ekspresyonunun tanı gruplarına göre yapılan istatistiksel incelemesinde bu antikorun adenokarsinom ol-



Şekil 5. Reaktif mezotel hücrelerinde kalretinin pozitifliği (x400).

gularına oranla, malign mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularında anlamlı derecede fazla boyandığı saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

GLUT-1 antikoruna ile malign mezotelyoma olgularının 2'si negatif (-), 18'i pozitif (+); reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularının 19'u negatif (-), 1'i pozitif (+); adenokarsinom olgularının 1'i negatif (-), 19'u pozitif (+) boyanma göstermiştir. GLUT-1 ekspresyonunun tanı gruplarına göre yapılan istatistiksel incelemesinde, bu antikorun reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularına oranla, malign mezotelyoma ve adenokarsinom olgularında anlamlı derecede fazla boyanma gösterdiği saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

## TARTIŞMA

Efüzyon örneklerinde sitomorfolojik özelliklerinden dolayı malign mezotelyoma, metastatik adenokarsinom ve reaktif mezotel hücre proliferasyonu hücrelerinin ayırımının zor olması sitolojinin temel sorunlarından biridir.

Wang ve ark.<sup>[8]</sup> 1979 yılında epiteloid plevral mezotelyoma ve pulmoner adenokarsinom arasındaki ayırmada ilk kez immünohistokimyasal boyama yöntemini kullanmışlardır.

Kalretinin EF-el yapısına sahip 29 kDa kalsiyum bağımlı bir proteindir. S-100 proteini de EF-el yapısına sahip protein ailesi içinde yer almaktadır.<sup>[9,10]</sup> Periferik ve santral sinir dokularında ekspresyonunun yanı sıra mezotelyal hücrelerde de ekspresyonu vardır.<sup>[11]</sup> Bazı çalışmalarda Kalretinin'in mezotelyoma için pozitif bir marker olduğu gösterilmiştir.<sup>[12-14]</sup>

Dogliani ve ark.<sup>[13]</sup> yaptıkları çalışmada 44 mezotelyoma olgusunun 44'ünde (%100) Kalretinin pozitifliği saptanırken, 294 adenokarsinom olgusunun ise sadece 28'inde (%9.5) fokal boyanma gözlenmiştir.

King ve ark.<sup>[15]</sup> çalışmasında Kalretinin sensitivitesi 885 epiteloid mezotelyomalı doku örneğinde %82, 912 pulmoner adenokarsinom olgusunda ise %15 bulunmuştur. Diğer benzer çalışmalarda da mezotelyoma ve reaktif mezotel hücreleri için Kalretinin pozitifliği %92-100 arasında bulunmuştur.<sup>[7,16,17]</sup>

GLUT-1 glukoz transport ailesinin bir üyesidir ve hücre içine glikoz girişini kolaylaştırır. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda GLUT-1 normal epitel dokusunda ve benign epitelial tümörlerde tespit edilememiştir fakat çeşitli tümörlerde ekspresyon olmaktadır. GLUT-1 ekspresyonu malign lezyonlardan benign lezyonların ayrılmasında kullanılabilir bir marker olarak gösterilmektedir.<sup>[18]</sup>

Kato ve ark.<sup>[18,19]</sup> çalışmalarında GLUT-1 pozitifliği plevral mezotelyoma olgularında %100 ve akciğer adenokarsinomu olgularında %95.2-%96.5 arasında bulunmuştur. Reaktif mezotel hücre proliferasyonu olgularının hiçbirinde GLUT-1 ile pozitiflik tespit edilememiştir.

Kaderinler hücre-hücre bağlantısını sağlamada önemli bir rol oynamaktadır. E-kaderin kalsiyum bağımlı epitel hücrelerinde ekspresyon intersellüler adezyon molekülüdür.<sup>[11]</sup>

Peralta ve ark.<sup>[20]</sup> yaptıkları çalışmada pulmoner adenokarsinomdan epiteloid mezotelyomanın ayrılmasında E-kaderinin kullanılabilir bir marker olduğunu keşfetmişlerdir. Bu çalışmada 16 akciğer adenokarsinom olgusunun 16'sında (%100) boyanma saptanırken, 19 mezotelyoma olgusunun 8'inde (%42) birkaç tümör hücresinde pozitiflik gözlenmiştir. Su ve ark.<sup>[21]</sup> çalışmasında E-kaderin sensitivitesi %86.7, spesifitesi %98.1 bulunmuştur.

Sonuç olarak, Kalretinin antikorunun mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonunda, E-kaderin antikorunun adenokarsinomda, GLUT-1'in mezotelyoma ve adenokarsinomda anlamlı derecede ekspresyonu gösterilmiştir. Bu bulgular sonucunda Kalretinin antikorunun malign mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonundan adenokarsinomun ayırımında; E-kaderin antikorunun adenokarsinomdan, malign mezotelyoma ve reaktif mezotel hücre proliferasyonunun ayırımında, GLUT-1 antikorunun ise reaktif mezotel hücre proliferasyonundan adenokarsinom ve malign mezotelyomanın ayırımında kullanılabilir bir marker olduğu gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Haber SE, Haber JM. Malignant mesothelioma: a clinical study of 238 cases. *Ind Health* 2011;49(2):166-72.

2. Weinstein LJ, Cibas ES. Effusions (Pleural, pericardial and peritoneal) and peritoneal washing cytopathology. In: Atkinson BF, editor. Atlas of diagnostic cytopathology. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2004. p. 114.
3. Munkholm-Larsen S, Cao CQ, Yan TD. Malignant peritoneal mesothelioma. *World J Gastrointest Surg* 2009;1(1):38-48.
4. Kumar P, Kratzke RA. Molecular prognostic markers in malignant mesothelioma. *Lung Cancer* 2005;49 Suppl 1:S53-60. Epub 2005 Apr 7.
5. Su XY, Li GD, Liu HB, Jiang LL. Significance of combining detection of E-cadherin, carcinoembryonic antigen, and calretinin in cytological differential diagnosis of serous effusion. [Article in Chinese] *Ai Zheng* 2004;23(10):1185-9. [Abstract]
6. Mckee GT. *Cytopathology*. Barcelona, Spain: Mosby-Wolfe; 1997. p. 309.
7. Shield PW, Koivurinne K. The value of calretinin and cytokeratin 5/6 as markers for mesothelioma in cell block preparations of serous effusions. *Cytopathology* 2008;19(4):218-23.
8. Wang NS, Huang SN, Gold P. Absence of carcinoembryonic antigen-like material in mesothelioma: an immunohistochemical differentiation from other lung cancers. *Cancer* 1979;44(3):937-43.
9. Andressen C, Blümcke I, Celio MR. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 1993;271(2):181-208.
10. 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(2):137-47.
11. Simsir A, Fetsch P, Mehta D, Zakowski M, Abati A. E-cadherin, N-cadherin, and calretinin in pleural effusions: the good, the bad, the worthless. *Diagn Cytopathol* 1999;20(3):125-30.
12. Comin CE, Novelli L, Boddi V, Paglierani M, Dini S. Calretinin, thrombomodulin, CEA, and CD15: a useful combination of immunohistochemical markers for differentiating pleural epithelial mesothelioma from peripheral pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2001;32(5):529-36.
13. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Iuzzolino P, Chiarelli C, Celio MR, et al. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 1996;20(9):1037-46.
14. Ordóñez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27(8):1031-51.
15. King JE, Thatcher N, Pickering CA, 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(3):223-32.
16. Aydiner F, Yerci Ö. Immunohistochemical analysis of the differential diagnosis of malignant mesothelioma and primary lung adenocarcinoma. *The Turkish Journal of Pathology* 2004;20(3-4):60-5.
17. Kamei T, Okamura H, Sakuma N, Shibuta H, Aoe K, Murakami T. Immunocytochemistry with ten commercially available antibodies in adenocarcinoma cells, malignant or reactive mesothelial cells in serous effusions. Abstracts of the 8th International Mesothelioma Interest Group 2006. p. 58.
18. Kato Y, Tsuta K, Seki K, Maeshima AM, Watanabe S, Suzuki K, et al. Immunohistochemical detection of GLUT-1 can discriminate between reactive mesothelium and malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 2007;20(2):215-20.
19. Kato Y, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y. Diagnostic utility of GLUT-1 expression in the differential diagnosis between reactive mesothelium and malignant mesothelioma. Abstracts of the 8th International Mesothelioma Interest Group 2006. p. 58.
20. Peralta Soler A, Knudsen KA, Jaurand MC, Johnson KR, Wheelock MJ, Klein-Szanto AJ, et al. The differential expression of N-cadherin and E-cadherin distinguishes pleural mesotheliomas from lung adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995;26(12):1363-9.
21. Su XY, Li GD, Liu WP, Xie B, Jiang YH. Cytological differential diagnosis among adenocarcinoma, epithelial mesothelioma, and reactive mesothelial cells in serous effusions by immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol* 2011;39(12):900-8.