

# Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Vakalarında Mediastinoskopiyle N2 Saptanmayan Lenf Nodlarında İmmünohistokimyasal Boyamayla Mikrometastaz Araştırması ve Sağkalım Üzerindeki Etki

## *Evaluation of Micrometastasis in Lymph Nodes with no Established N2 with Mediastinoscopy in Non Small Cell Lung Cancer Cases with Immunohistochemical Examination and the Effect on Survival*

Naciye Mutlu, Murat Kıyık, Hüseyin Cem Tigin, Ebru Artan, Tunç Karadeli, Hayati Özyurt, Nur Ürer, Sadettin Çıkrıkçıoğlu

Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul

### ÖZET

**Amaç:** Küçük hücreli dışı akciğer kanserli (KHDAK) vakalarda mediastinoskopiyle N2 saptanmayan lenf nodlarında, immünohistokimyasal boyama ile mikrometastaz varlığını araştırdık.

**Gereç ve Yöntem:** Ocak 2001- Ağustos 2005 tarihleri arasında Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde tetkik edilen, sitolojik ve histolojik bulgularla küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tanısı alan 100 vaka çalışmaya alındı. Hastalar, fizik muayene, konvansiyonel radyoloji, toraks BT ve bronkoskopi ile değerlendirildikten sonra, klinik evre IA-IIIb akciğer kanseri olarak evrelendirildi. Bütün hastalara evreleme amaçlı mediastinoskopi yapıldı. Lenf nodu örneklerinde, immünohistokimyasal boyama yöntemiyle sitokeratin 8/18 kullanılarak mikrometastaz araştırıldı.

**Bulgular:** Vakalarımızın 95'i erkek, 5'i kadındı. Mediastinoskopiyle N2 saptanmayan 100 vakanın 17'sinde (%17) lenf nodlarında sitokeratin 8/18 ile pozitif boyanma saptandı. Literatürde mikrometastaz varlığı kötü prognostik faktör olarak belirtilmektedir.

**Sonuç:** Bizim 2 yıllık sağkalım takibimizde Kaplan Meier analizine göre istatistiksel anlamlılık saptanmadı (p=0.6).

**Anahtar sözcükler:** küçük hücreli dışı akciğer kanseri, lenf nodu, mikrometastaz, sağkalım

### ABSTRACT

**Aim:** We investigated micrometastasis in lymph nodes with immunohistochemical examination in cases that had no N2 in mediastinoscopy.

**Material and Methods:** We included in the study 100 non small cell lung cancer cases who were diagnosed cytologically or histologically in Yedikule Chest Diseases and Thoracic Surgery Hospital between January 2001 and August 2005 (95 of the cases were male and 5 female). We performed physical examination, conventional radiography, thorax CT and bronchoscopy in all patients and staged lung cancer as IA or IIIb. All patients underwent mediastinoscopy for staging and we investigated micrometastasis in lymph nodes with immunohistochemical examination, using cytokeratin 8/18.

**Result:** In 17 of 100 cases (17%) who had no N2 in mediastinoscopy we established positive reaction with cytokeratin 8/18. Micrometastasis is known as a poor prognostic factor in literature.

**Conclusion:** During the two years of survival follow-up, our results were not statistically significant according to Kaplan Meier analysis.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, lymph node, micrometastasis, survival

### GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, halen %12.8 ile, bütün dünyadaki kanserler arasında, bu hastalıktan ölümlerin %17.8'ini oluşturmaktadır. Opere edilebilen akciğer kanserinde sağkalım için en önemli faktörler evre ve performans durumu olmakla birlikte, tümör tanısı konulduğu zaman gizli (tespit edilememiş) tümör hücrelerinin sistemik olarak yayılıp yayılmadığı da önemli rol oynar.[1]

Erken metastazların “aydınlatılmamış bölümü” günümüz evrelendirme yöntemleriyle tanımlanamamaktadır ama kemik iliğinin ve mediastinal lenf nodlarının immünohistokimyasal çalışmalarının prognozu değerlendirmede yardımcı olduğu ileri sürülmektedir.[2,3,4]

Çeşitli çalışmalarda, gizli erken metastazları tanımlayabilmek için immünohistokimyasal ya da moleküler teknikler oluşturulmuştur (örn. kemik iliğinde ya da lenf nodunda).[2,5,6,7] Sitokeratinlere karşı monoklonal antikorların

**Alındığı tarih:** 13 Haziran 2007; **Revizyon sonrası alınma:** 16 Aralık 2008; **Kabul tarihi:** 31 Ocak 2009

**Yazışma adresi (Address for correspondence):** Uzm. Dr. Hüseyin Cem Tigin, Eksinar Sokak İdo Apt. No: 33 Daire 2 İstanbul, Tel: 0 (533) 425 45 64; E-posta: tigincem@yahoo.com

© 2009 Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği (TÜSAD)

Solunum 2009;11(1):18-21

Solunum Dergisi'ne www.solunum.org.tr adresinden ulaşabilirsiniz.

kullanımıyla (ki bunlar malign ve benign epitelyal hücre belirleyicisidirler) kemik iliği gibi mezankimal hücrelere yayılan kanser hücreleri, tek hücre düzeyinde bile tanımlanabilir.[8]

KHDAK nüks sık gözlemlenmektedir. Erken evre tümörde bile cerrahi tedavi sonrası 5 yıllık yaşam şansının %60'ta kalması, gizli erken metastazların varlığı ile açıklanabilir.[9]

Bu çalışmada operabl KHDAK olan vakalarda ameliyat öncesi mediastinoskopi ile N2 saptanmayan hastalarda sitokeratin 8/18 ile immünohistokimyasal inceleme yapılarak mikrometastaz araştırmayı hedefledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2001-Ağustos 2005 tarihleri arasında Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tetkik edilen histolojik ve sitolojik bulgularla KHDAK tanısı alan 100 vaka çalışmaya alındı. Hastalar fizik muayene, PA akciğer grafisi, toraks BT ve bronkoskopi ile değerlendirildikten sonra klinik evre IA-III B akciğer kanseri olarak evrelendirildi. Bütün hastalara evreleme amaçlı mediastinoskopi yapıldı. Mediastinoskopi sonucunda N2 ve/veya N3 tespit edilmeyen hastaların lenf nodu örneklerinde immünohistokimyasal boyama yöntemi ile sitokeratin 8/18 kullanılarak mikrometastaz araştırıldı.

Lenf nodları %10'luk formaldehidte 24 saatlik fiksasyon sonrası takibe alındı.

Histolojik materyaller 12 saatlik takip sonrasında parafin bloklar haline getirilip 3 mikronluk kesitler alındı. Her hastada birer preparat rutin olarak Hematoksin-Eosin ile boyanırken, diğer örnekler immünohistokimyasal çalışma yapıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılacak örnekler *superfrost plus* lamlara alınarak 37°C'de 24 saat deparafinize edildi. Ksilen ve azalan alkol konsantrasyonlu alkol serisinden geçirilerek, distile suyla yıkandı. Yüzde 3'lük hidroperoksid ile 20 dakika muamele edilip distile sudan geçirilip sodyum sitrat bafura (pH 7) iki kez 5'er dakika mikrodalga fırında *unmasking* işlemi yapıldı. Yirmi dakika soğuma sonrasında fosfat bafur tuzu (PBS, phosphate bafur saline) ile yıkayıp 10 dakika blok solüsyonu, oda sıcaklığında 60 dakika primer antikor sitokeratin 8/18 (NovoCasta, New Castle, UK) tutuldu. PBS ile yıkama sonrası biotin 15 dakika, PBS yıkama, streptavidin 15 dakika, PBS yıkama, 10 dakika kromagen sonrası distile sudan geçirilerek 2 dakika zıt boyama

(hematoksin) yapıp, usule uygun halde kapatıldı. Kontrol boyama amaçlı akciğer skuamöz hücreli ve adenokarsinom kullanıldı.

Verilerin değerlendirilmesinde, SPSS for Windows 11.5 istatistik paket programından yararlanıldı.

Sağkalım analizinde Kaplan Meier ve long sıra testi kullanıldı.  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

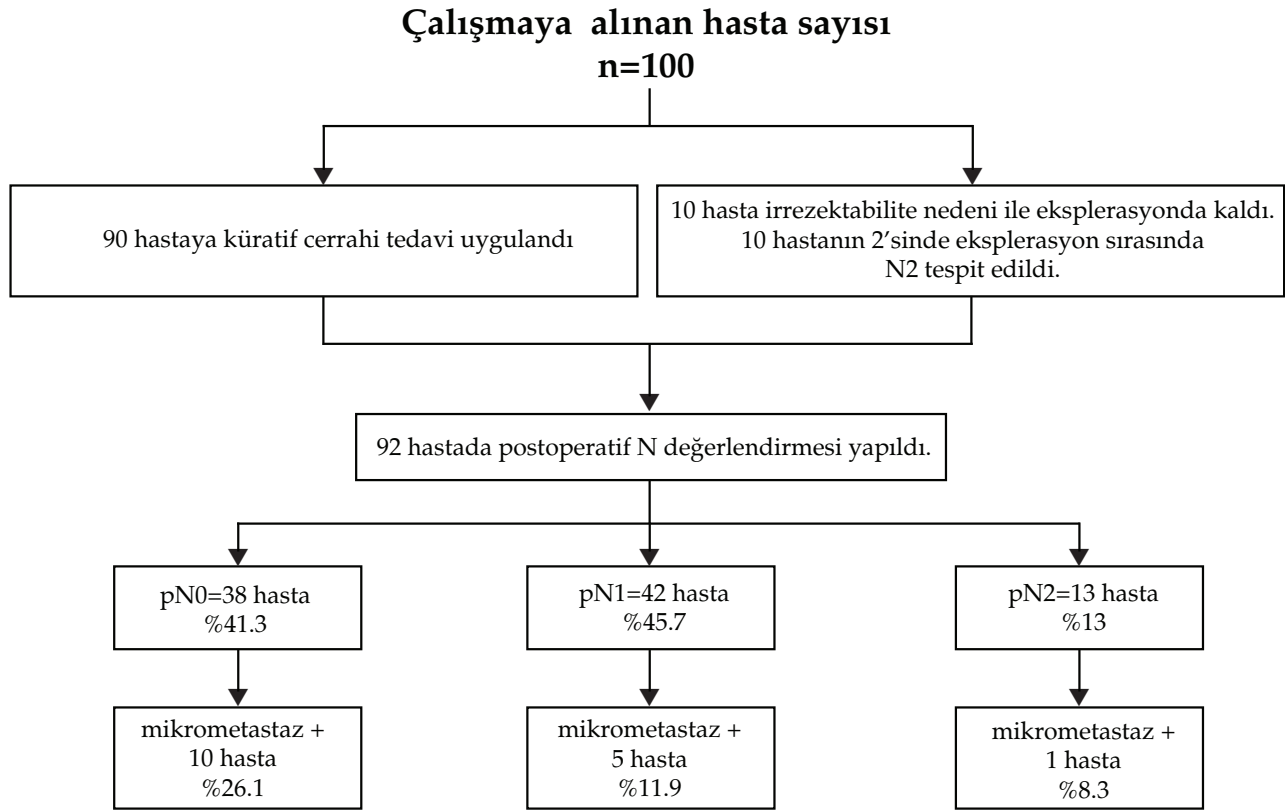
Çalışmaya alınan vakaların %95'i erkek %5'i kadın hasta idi. Vakalarımızın 69'u skuamöz hücreli, 22'si adenokarsinom, 7'si büyük hücreli, 2'si ise hücre tipi saptanmayan küçük hücreli dışı karsinom olarak belirlendi. Mediastinoskopi ile N2 saptanmayan 100 vakanın, lenf nodlarında sitokeratin 8/18 ile %17 oranında mikrometastaz bulundu. Yüz vakanın 90'ına (%90) torakotomi uygulandı, kalan 10 vaka ise ekplorasyon sırasında evre III B olduğu tespit edilip irrezektabl kabul edildi ve cerrahi tedavi uygulanmadı. Ekplorasyonda kalan 10 hastanın ikisinde de örneklenen lenf nodlarında N2 saptandı, böylece 92 hastada postoperatif lenf nodu değerlendirilmesi yapılmış oldu. Bu 92 hastadan 38'inde (%41.3) pN<sub>0</sub>, 42 hastada (%45.7) pN<sub>1</sub> ve 12 hastada (%13) pN<sub>2</sub> tespit edildi. PN<sub>0</sub> olan 38 hastanın 10'unda (%26.31) mediastinoskopi örneklerinde CK 8/18 immünohistokimyasal boyama ile mikrometastaz saptandı. PN<sub>1</sub> saptanan 42 hastanın 5'inde (%11.9) mikrometastaz bulundu. PN<sub>2</sub> saptanan 12 hastadan sadece birinde (%8.3) mikrometastaz vardı (TABLO I). Mikrometastazla pN varlığı arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ( $p=0.1$ ).

Mikrometastaz varlığının sağkalıma etkisini araştırmak için ulaşılabilen hasta sayısı 77 (%77) idi. PN<sub>0</sub> saptanan 38 hastadan 27'sine (%71.1) ulaşıldı. Bu 27 hastadan mikrometastaz negatif olanların sayısı 19 (%70.4), pozitif olanların sayısı ise 8 (%29.6) idi. Takip edilen bu 27 hastanın 6'sı (%22.2) Evre IA, 15'i (%55.5) Evre IB, 5'i (%18.51) Evre IIB, 1'i (% 0.03 ) Evre III B idi.

Mikrometastaz negatif olan 19 hastanın ise 3'ü (%15.78) evre IA, 12'si (% 63.15) Evre IB, 3'ü (%15.78) Evre IIB ve 1 hasta (%5.26) Evre III B idi. Pozitif 8 hastanın 3'ü (%37.5) Evre IA, 3'ü (%37.5) Evre IB, 2'si (%25) de Evre IIB idi. Hücre tipi değerlendirildiğinde bu 27 hastanın 18'i (%66.7) epidermoid karsinom, 8'i (%29.6) adenokarsinom ve 1'i (%3.7) büyük hücreli karsinom idi. Mikrometastaz negatif

**Tablo I.** Sürvi analizi için ulaşılabilen 27 hastanın değerlendirilmesi

	sağ	eksitus	ortalama sağkalım süresi	toplam hasta
mikrometastaz pozitif	13 %68.42	6 %31.58	40 ay	19 %70.4
mikrometastaz negatif	6 %75	2 %25	46 ay	8 %29.6
toplam hasta	19 %70.4	8 %29.6		



Şekil 1.

olan 19 hastanın 10'u epidermoid karsinom, 8'i adenokarsinom ve 1'i büyük hücreli karsinom idi. Mikrometastaz pozitif olan 8 hastanın tamamı da epidermoid karsinom idi. Mikrometastaz saptanmayan 19 hastanın 6'sı (%31.57) eksitus oldu, 13 hasta (%68.42) hayattaydı. Ortalama sağkalım süresi 40 ay olarak belirlendi. Mikrometastaz saptanan 8 hastadan 2'si (%25) eksitus oldu, 6 hasta (%75) hayattaydı. Ortalama sağkalım süresi 46 ay olarak belirlendi (ŞEKİL 1). Medyan takip süresi 21 ay (9-57 ay), takip edilenlerin yaş ortalaması  $56.81 \pm 9.69$  (36 - 79), 26'sı erkek 1'i kadın idi.

## TARTIŞMA

Rezeke edilebilir KHDAK'de erken metastaz varlığı kötü prognoz işaretidir. Bugünkü evrelendirme sistemi ile bazı hastalarda tümör hücrelerinin yayılımı yetersiz değerlendirilmektedir.[1]

İmmünohistokimyasal veya immünohistokimyasal olarak epitele yönelik monoklonal antikorların kullanımıyla artık, kanser hücrelerinin lenf nodu ya da kemik iliğine erken yayılımı gösterilebilmektedir.[2,3,4]

Kötü prognoza sahip olabilecek hastaların daha net olarak ortaya çıkarılmasında, immünohistokimyasal olarak lenf nodlarında veya kemik iliğindeki tümör hücrelerinin saptanması yardımcı olabilir.

Maligen hücrelerin uzak organlara lenfatik veya hematogen yayılımı, primer tümörün büyümesinin erken safhasında görülebilmekte ve şu anki klinik ve patolojik evreleme

yollarıyla yetersiz değerlendirilmektedir.[10] Örneğin operasyon öncesi ve sonrası metastaz bulgusu saptanmayan ve cerrahi rezeksiyon uygulanan pT1-2NoMo KHDAK hastalarının yaklaşık %40'unda ameliyattan 24 ay sonra relaps görülmüştür.[11] Bu aynı zamanda 5 yıllık yaşam süresini %60 kötüleştirmekte ve gizli tümör yükü, akciğer kanserinde cerrahi sonrası mortaliteyi artıran majör neden olmaktadır.[12]

Passlick'in değerlendirmeye aldığı 125 vakadan, pN<sub>0</sub> tespit edilen 70 vakanın lenf nodlarına monoklonal antikor Ber-Ep4 ile immünohistokimyasal boyama uygulanmış ve bunların 11'inde (%15.7) izole tümör hücresi saptanmıştır. Bu hastalarda, 64 aylık inceleme sonunda, 2.5 kez artmış oranda yaşam süresi kısalması ve 2.7 kez artmış tümör relaps riski saptanmıştır.[13]

Pantel ve arkadaşlarının 139 vaka ile yaptıkları bir çalışmada CK-18 immünboyama ile pN<sub>0</sub> olan 53 hastadan 8'inin lenf nodlarında mikrometastaz saptanmıştır. Daha sonraki takiplerinde bu 8 vakanın 2'sinde uzak metastaz, 4'ünde lokal nüks gözlenmiştir, 2 vakada nüks olmamıştır.[5]

Tezel ve arkadaşları, cEvre I ve II toplam 21 hastanın lenf nodlarına epitelyal spesifik antijen Ab9 ve keratin Pan Ab-1 ile immünohistokimyasal boyama uygulamışlardır. Boyama ile 4 (%19.04) hastanın lenf nodlarında pozitif tutulum gözlenmiştir. pN<sub>0</sub> olarak tanı alan 13 hastanın biri pN<sub>1</sub>, diğeri pN<sub>2</sub>; pN<sub>1</sub> olarak tanı alan 8 hastanın 2'sinde pN<sub>2</sub> hastalık bulunmuştur. Toplam 4 vakanın 3'ünde takip süresince uzak metastaz veya lokal nüks görülmüş ve pN<sub>0</sub> ile karşılaştırıldı-

ğında hastaliksız sağkalım süreleri arasında ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır.[14]

Osaki ve arkadaşlarının Evre I KHD AK 115 vaka ile yaptıkları bir çalışmada, pN<sub>0</sub> olarak belirlenen 32 (%27.8) hastada hiler ve mediastinal lenf nodlarının immünohistokimyasal boyanması ile CK<sup>+</sup> hücreler saptanmıştır. CK<sup>+</sup> hücreler T<sub>1</sub> hastalık ile karşılaştırıldığında T<sub>2</sub> hastalıkta belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur.[15] Muhtemelen torakotomi sırasında mediastinal lenf bezleri ile birlikte hiler ve peribronşial lenf nodları da değerlendirmeye alındığından, bu oran daha yüksek çıkmıştır.

Yasumoto ve arkadaşları, pEvre I-KHD AK 216 hastanın hiler ve mediastinal lenf nodları için anti CK AE<sub>1</sub>/AE<sub>3</sub> kullanmışlardır. İki yüz on altı hastanın 34'ünde (%15.7) lenf nodlarında CK<sup>+</sup> hücreler saptanmışlardır. Yaptıkları analizler sonucunda da, lenf nodlarında CK<sup>+</sup> hücreler bulunan hastaların prognozlarının daha kötü olduğunu belirtmişlerdir.[16]

Maruyama ve arkadaşlarının p Evre I 44 hasta ile yaptıkları bir çalışmada, anti-sitokeratin olarak CAM-5.2 kullanılmıştır. Sonuçlarında 31 (%70.5) hastada hiler ve mediastinal lenf nodlarında CK<sup>+</sup> hücre bulmuş ve takiplerinde 13 hastada rekürrens saptanmışlardır (2 hastada bölgesel lenf nodlarında, diğerlerinde uzak organ tutulumu). Mikrometastaz tespit edilen hastalarda da hastaliksız sağkalım süresinin belirgin olarak kısaldığı gözlenmiştir.[17]

Çalışmamız, vaka sayısının mikrometastazın sağkalıma etkisini değerlendirmek için yetersiz olması nedeniyle literatürdeki bulguları desteklememiş olabilir. Ancak patolojik N durumu değerlendirilebilen 92 hasta, patolojik olarak N<sub>0</sub> saptanan hastalarda bile N<sub>1</sub> ve N<sub>2</sub> saptanan hastalara benzer şekilde %26.3 gibi yüksek oranda mikrometastaz bulunduğunu göstermiştir. Bu da, mikrometastaz sağkalım üzerine etkili ise, bugün kullandığımız evreleme sisteminin sağkalımı belirlemede yetersiz kalacağını açıkça ortaya koymaktadır.

İmmünohistokimyasal boyama ile mikrometastaz tespitinin hastaliksız sağkalım süresi bakımından kötü prognostik faktör olduğu belirtilmektedir.

Bizim çalışmamızda da, mikrometastaz negatif olanlarda ortalama sağkalımın 20 ay olmasına karşılık mikrometastaz pozitif olanlarda ortalama sağkalım 16 ay idi, ancak vaka sayımızın azlığı nedeniyle istatistiksel analizde anlamlılık tespit edilmedi (p=0.09).

Sonuç olarak literatürdeki çalışmalarda, N<sub>0</sub> olarak evrelendirilen vakaların lenf bezi immünohistokimyasal boyanması ile mikrometastaz varlığı gösterilenlerde sağkalım süresinin anlamlı olarak kısaldığı aşikârdır. Bu çalışmalara göre evrelendirmede bu durumun da göz önüne alınması, belki de yapılacak çalışmalara göre bu vakalara adjuvan tedavilerin uygulanması düşünülecektir. Ne var ki bizim çalışmamızda gerek vaka sayımızın azlığı, gerekse sağkalım süresi takiplerimizin kısalığı nedeniyle, mikrometastaz saptanan vakalarda sağkalım süresinin daha kısa olduğu gösterildi ama istatistiksel anlamlılık saptanamadı.

## KAYNAKLAR

1. Minna JD, Pass H, Glatstein E, et al. Cancer of the lung. In: De Vita VTY, Hellmann S, Rosenberg SA, eds. Cancer: principles & practice of oncology. Philadelphia: Lippincott, 1989; 591-705.
2. Riethmüller G, Pantel K, Funke I, et al. Micrometastasis of epithelial tumors. In: K.Messmer and H.Stein, eds. Pathways in applied immunology. Berlin: Springer Verlag, 1991;103-107.
3. Cote RY, Beattie EJ, Chaiwun B, et al. Detection of occult bone marrow micrometastases in patient with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 1995;222:415-425.
4. Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, et al. Detection of disseminated lung cancer cells in lymph nodes: Impact on staging and prognosis. *Ann Thoracs Surg* 1996;61:177-183.
5. Pantel K, Izbicki JR, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells detected in bone marrow of nonsmall cell lung cancer patient without overt metastases. *Lancet* 1996;347:649-653.
6. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmaier H, et al. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected eosophageal cancer *N Eng J Med* 1997;337:1188-1194.
7. Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, et al. Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patient with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1994;12: 1827-1832.
8. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti 17-1A monoklonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987;84:8672-8676.
9. Martini N, Boins MS, Burt MZ, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:120-129.
10. Pantel K, Riethmüller G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;213:1-18.
11. Mountain CF. Revisions in the international staging system for lung cancer. *Chest* 1997;111: 710-717.
12. Passlick B, Pantel K. Prognostic factors in Stage I nonsmall cell lung cancer. *Zentralbl Chir* 1996;121:851-860.
13. B. Passlick. *Lung Cancer* 2001;34:25-29.
14. Çağatay T ve ark. Erken evre akciğer kanserinde immünohistokimyasal yöntemlerle saptanan lenf nodu tutulumunun evrelere ve prognoz üzerine etkisi, 1. Ulusal Torasik Onkoloji Kongresi Final Program ve Bildiri Özetleri Sözel Bildiri No: 26, s. 28.
15. Osaki T, Oyama T, et al. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow in Stage I NSCLC. *J Clin Oncol* 2002;20:2930-2936.
16. Yasumoto K. Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:197-202.
17. Riichiroh T. Relationship between early recurrence and micrometastases in the lymph nodes of patients with stage I NSCLC. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:535-543.