

AKCİĞER KANSERLERİNDE GENETİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER TANİ VE SINIFLANDIRMAYA KATKILARI

Doç. Dr. Dilek YILMAZBAYHAN (*)

GENETİK İNCELEMELER

Son yirmi yıl içerisinde moleküler biyolojideki çalışmalar tümör genetiği üzerinde yoğunlaşan düşüncelerde önemli gelişmelere yol açmıştır. Onkogenlerin, izleyerek tümör supressor genlerin birbiri ardından tanımlanması, çeşitli tümörlerde genetik anomalilerin ortaya konulması ve bunların immünohistokimyasal olarak gösterilebilir hale gelmesi, deneysel ve genetik yöntemlerin klinik patolojiye uygulanabilir olmasına doğru yol almaktadır.

Burada amaç, tümör gelişme riski yüksek olan grupları belirlemek, gelişimini önlemek, doğru tanı koymak, evrelemeye yardımcı olmak, tedavi cevabını belirlemek ve tedaviye yeni yöntemler geliştirmektir (1, 2, 3).

Akciğer karsinomlarında birçok genetik anomaliler, onkogen ve supressör genler ortaya konmuştur ve diğer tümörlerde olduğu gibi bu konuda da yeni birçok çalışma yapılmaktadır.

Akciğer karsinomları oldukça heterojen bir grup oluşturmaktadır ve birçok tümörde tanımlanan prekanseröz lezyonlar net bir biçimde ortaya konmuş değildir. En belli başlı gelişim şekli, skuamöz karsinomda bronşial mukozada hiperplazi-metaplazi, progressif displazi, karsinoma in situ, invazif karsinom ve metastaz biçimindedir (2). Sınıflamada çeşitli tipler olmakla birlikte, patogenezi histolojik özellikler ve klinik davranış bakımından küçük hücreli ve küçük hücreli dışı tümörler olmak üzere iki ana grup ortaya çıkmaktadır.

Tümör gelişim aşamasında genetik ya da kazanılmış birçok değişiklik yer almaktadır (2, 4).

1) Dominant, onkogenlerde aktivasyon/mutasyon biçiminde

2) Resessif, büyüme ve regülasyon genlerinde kayıp/inaktivasyon biçiminde.

3) Malign fenotipin ortaya çıkışında normal olmayan büyüme faktörleri salınımı ya da üretimi biçiminde.

• Akciğer karsinomlarında onkogenler:

Akciğer karsinomunda saptanan en belli başlı onkogenler şunlardır (2).

- myc ve ras onkogenleri.
- neu, myb, raf, bcl-1 genleri,
- Epidermal Growth Faktör (EGF) reseptör geni,
- Platelet derive büyüme faktörleri.

ras onkogenler

ras onkogenlerin iyi tanımlanmış 3 protoonkogeni vardır: H-ras, K-ras, N-ras. GTP bağlayan proteinlerdendir. En sık noktasal mutasyon ile aktive olur (2, 5). İnsan tümörlerinde sık görülür ve histolojik tipler arasında farklılık gösterir.

Mutasyonlar en çok kodon 12, 13 ve 61 de saptanmıştır (2, 5, 6).

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında sık görülür (2, 7, 8, 9). Adenokarsinomlarda daha sık olduğunu bildiren yazarlar vardır (7). K-ras in adenokarsinomda (6), H-ras in skuamöz karsinomda daha sık olduğu üzerinde çalışmalar mevcuttur (5).

* İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

Ana tümörde ve kültürlerde saptanmıştır (9).

Deneyisel olarak alkilize ajanlar başta olmak üzere spesifik mutagenlerle, metastatik fenotiple ve sitotoksik tedavi rezistansı ile birlikte tanımlanmıştır (10, 11, 12, 13, 14).

Küçük hücre dışı tümörlerde K-ras ve özellikle kodon 12 mutasyonu siktir (2, 9). Kodon 12 de guanozin-guanozin-timidin veya guanozin-guanozin-sitozin tipinde nukleotid dizisi vardır. Vakaların 2/3 ünde ekson 1 de guanozin-timidin transversiyonu şeklinde görülür (2, 9).

ras mutasyonu ile stage arasında ilişki kurulamamıştır (2).

Sonuç olarak: ras gen mutasyonu küçük hücreli dışı tümörlerde görülür ve negatif bir prognostik faktördür (2).

myc onkogenler:

myc protoonkogen ailesinde bellibaşlı üç protoonkogen vardır. c-myc, N-myc ve L-myc. c-myc kromozom 8, N-myc kromozom 2, L-myc kromozom 1 p üzerinde yer alır. Nukleer fosfoproteinleri kodlarlar. Aktivasyonu, gen amplifikasyonu, rearrangement veya noktasal mutasyonla oluşur.

Küçük hücreli karsinomda daha sık görülür ve genellikle gen amplifikasyonu biçimindedir. Double minute kromozomlar ve heterojen boyanma bölgeleri şeklinde görülür (15, 16).

Heterojen boyanma bölgeleri in vitro büyüme, morfolojik değişiklikler, nöroendokrin marker kaybı ve radyorezistans ile karakterizedir (15, 16). c-myc amplifikasyonu proliferatif indeksle paralellik gösterir (17).

Küçük hücreli karsinomun varyant hücre tipi ile birlikte görülür ve kötü prognoz, kısa yaşam süresine işaret eder. c-myc geninin klasik küçük hücreli tümör kültürlerine transfeksiyonu varyant tipe dönüşüme yol açar (1, 2).

N-myc ve L-myc amplifikasyon ve overekspresyonu da küçük hücreli karsinomda gösterilmiş olmakla birlikte morfolojik, klinik ve biyolojik özelliklerle bağlantısı kurulamamıştır (2).

Myc gen amplifikasyonu daha çok sitotoksik tedavi ile birlikte ve tedavisiz hücre kültürlerinde daha nadirdir (18, 19).

Küçük hücreli dışı tümörlerde myc gen amplifikasyonu pek görülmemiş, ancak anormal regülasyon ve overekspresyon pek araştırılmamıştır (2).

Her 2 /neu gen (c-erb B2):

Epidermal growth faktör (EGF) reseptör homologudur. Bazı küçük hücreli dışı tümörlerde orta derecede overekspresyonu (20) ve kötü prognozu gösterdiği (21) saptanmıştır.

c-erb B1 bazı çalışmalarda histolojik diferansiyasyonla ilişkili bulunmuştur (22).

Büyüme faktörleri ve reseptörleri

Küçük hücreli ve dışı akciğer tümörleri büyüme faktörü olarak fonksiyon gören birçok peptid sekrete eder (2). İnsülin-like büyüme faktörü (23, 24), transferrin-like (24) faktör gibi. Tümörlerde nikotin reseptörleri de saptanmıştır (4).

Ayrıca bu tümörlerde çok sayıda peptid hormon yapımı ya da sekresyonu görülmüştür (25, 26). Tek bir tümör genellikle birden fazla hatta çok sayıda hormon yapar. Bunların çoğu da ektopik hormonlardır. Örneğin: Gastrin Releasing Peptid (GRP) (26, 27, 28), arjinin, vasopressin, kalsitonin, ACTH, nörotensin. Skuamöz karsinomda EGFR sıklıkla

saptanır (29, 30, 31) ve amplifikasyon ya da overekspresyon biçimindedir. Transforming growth faktör alfa da küçük hücreli dışı tümörlerde otokrin büyüme faktörü olarak davranmaktadır (31, 32). Transforming growth faktör beta da küçük hücreli karsinomda saptanmıştır (33). Ektopik hormon üretiminin supressör gen kaybına bağlı olduğu üzerinde çalışmalar vardır (34).

• Tümör Supressör genler ve akciğer.kanseri:

Akciğer karsinomlarında en sık 3p, 13q, 17p delesyonu saptanmış (35, 36). Ayrıca 9p (4, 37, 38, 39), 1p, 1q, 5q, 11p, 16p (4, 24) tanımlanmıştır.

Retinoblastom geni (rb):

Nukleer fosfoproteinlerden birini kodlar. 13q 14.11 de lokalizedir.

Küçük hücreli karsinomda saptanmıştır (40). Kromozom 13 ün uzun kolunda delesyonla birlikte (35).

Küçük hücreli dışı tümörlerde nadiren (% 20) görülür (2).

Retinoblastomdakinden farklı olarak protein vardır ancak fosforilasyonu yetersizdir ya da onkoprotein bağlanmıştır (41). Akciğer kanserlerinde gen transfeksiyonunun tümör büyümesini durdurmadığı saptanmıştır.

p 53 geni:

Birçok tümörlerde saptanan bir genidir. Mutant p53 protein dominant bir onkogen gibi davranmaktadır. Son araştırmalarda yaban tip protein ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak saptanmasına dayalı antikolar geliştirilmektedir. Ancak bunun yeterli kadar duyarlı olup olmadığı tartışmalıdır (42, 43, 44).

P 53 mutasyonu küçük hücreli karsinomda hemen her zaman vardır (45). Küçük hücreli dışında daha az (% 42) görülür (46). Mutasyonun yaşla ilgisi açık değildir. Gençlerde (2) görüldüğünü ileri süren yayınlar yanısıra yaşla bağlantının saptanmadığı yayınlar mevcuttur (9, 47). Skuamöz karsinomda daha siktir (2, 48). Skuamöz karsinomlu hastalarda skuamöz metaplazi alanlarında da p 53 ekspresyonu görülmüş ve bu lezyonun prekanseröz niteliğine delil olarak gösterilmiştir (49). Metaplazi-displazi, insitu ve invazif karsinom aşamalarında da artan oranda saptanmıştır (50). Yaşam süresi üzerindeki etkisi tartışmalıdır (2, 9, 48).

Mutasyonlar birçok bölgede görülebilir. Ancak bazı hot spotlarda ve genellikle evölüsyonel olarak korunmuş bölgelerde veya onkoprotein bağlayan bölgelerde görülür (45, 46, 51). Küçük hücreli dışındaki tiplerde genellikle guanozin-timidin transversiyonu biçimindedir.

p53 gen mutasyonu karsinoid tümörde çok nadir saptanırken, atipik karsinoidde bulunma oranı tümörün iyi diferansiye nöroendokrin karsinom yorumu ile uyumludur (52). Tipik karsinoidden küçük hücreli karsinoma uzanan spektrumda tümör supressör gen görülme oranı da artmaktadır (53).

p 53 çevresel karsinogenezele de sık görülmüştür. Örneğin radon asosiyel akciğer ca da kodon 249 mutasyonu bulunmuştur (54). Atom bombasına maruz kalan popülasyonda da guanozin-sitozin'in adenozin-timidin'e dönüşümü biçiminde mutasyon saptanmıştır (55).

Kromozom 3 ve akciğer kanseri

Akciğer karsinomlarında ilk bulunan anomali 3 p deles-

yonudur (56). Küçük hücreli dışı tümörlerde de görülmüştür (36, 57). Aynı lokalizasyonda raf protoonkogen de saptanmıştır (58).

Geniş bir alanda görülür (p14-23) (14). Saptanan en küçük delesyon alanı 3p 21- 3p 24 arasındadır. 3p 14.2 den kırılma sık görülür ve bu kırılma sigara ile bağlantılı bulunmuştur (59). Heterozigozite kaybı sık görülür (60). Küçük hücreli ve dışında farklı bölgelerde kayıp saptanmıştır (60).

Genetik predispozisyon genleri

Bazı akciğer kanserlerinde Mendelian geçiş gösterilmiştir (61). p450 enzimlerinde mutasyonlar araştırılmaktadır (62). Bazı antihipertansif ilaç metabolitlerinin de akciğer karsinom riskini arttırdığı üzerinde durulmaktadır (63, 64).

Diferansiasyon genleri

Karsinoid tümörden küçük hücreli karsinoma kadar uzanan bir spektrumda yer alan tümörler bronş mukozasındaki nöroendokrin programlı hücrelerden çıkmaktadır (65). Bu nedenle bu grup tümörlerde birçok nöroendokrin marker saptanmıştır. Bunun yanısıra küçük hücreli dışı tümörlerde de bu markerlar görülür ve kemoterapi cevabı daha iyidir (2).

Skuamöz karsinomda yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinlerin yanısıra EGFR görülür (66).

Adenokarsinomlar ise heterojen tümörler olup tip II pnömosit veya Clara hücre özellikleri gösterebilirler (67).

İlaç rezistansını gösteren genler

Bu konuda birçok çalışma yapılmaktadır. Sitotoksik ilaçlara rezistansın genetik temeli üzerinde durulmaktadır. Gen MDR 1 (68,69) Topoizomera II (11) gibi genler üzerinde çalışmalar sürmektedir. Glutathione-S-transferaz ekspresyonu da ilaç cevabında etkili bulunmuştur (70).

P- glikoprotein'in yüksek olması da küçük hücreli karsinomda kemoterapi rezistansını gösterir (71).

AKCİĞER KARSİNOMLARINDA DNA ANALİZ SONUÇLARI

Akcığer kanserlerinde DNA ölçümleri ve proliferasyon markerlarının çeşitli yöntemlerle saptanması henüz geniş serilerde yapılmamıştır. Oldukça heterojen ve sınıflandırma ile ilgili sorunların olduğu bu grup tümörlerin bu yöntemlerin katkısı da henüz sınırlı görünmektedir. Ancak yöntemler geliştikçe ve yaygın olarak uygulandıkça beklenen yararın artacağı da bir gerçektir.

Çalışmalarda benign lezyonlarda diploidi (72), malign lezyonlarda anöploidi ve multiploidi (72, 73, 74, 75) saptanmıştır. Ancak Chiba (88-1993) çalışmasında malign lezyonlarda % 38 oranında diploidi saptamış ve bu lezyonlarda 5 yıllık yaşam süresini de daha uzun bulmuştur. Benzer biçimde Salvati (72) de diploid ve monoklonal lezyonlarda yaşam süresini uzun bulmuştur.

Histolojik tipler ploidisi arasında anlamlı bir fark dikkati çekmektedir (72, 73). Kimura (32) küçük hücreli karsinomlar içerisinde monoklonal olanların, poliklonal olanlara nazaran kemoterapi cevabını daha iyi, metastaz sıklığını daha az bulmuş ve periferik tiplerde daha heterojen dağılım saptamıştır. Sahin (77) skuamöz karsinomda ploidin önemli bir prognostik faktör olduğunu göstermiştir.

Onkogen amplifikasyonu anöploid ve multiploid vakalarda diploid olanlara göre daha sıktır (74). Fontanini'nin (78) çalışmasında p 53 ile proliferasyon markerları arasında ilişki görülmemiştir.

Proliferatif aktivite markerlarından Ki-67 ile yapılan çalışmalarda, diğer klinikopatolojik parametrelerden bağımsız olarak proliferasyon indeksi ile yaşam süresi arasında ters orantı saptanmıştır (32). Nöroendokrin tümörlerde de karsinoidden küçük hücreli tümöre doğru artan proliferatif aktivite görülmektedir (53).

İMMÜNHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Akcığer karsinomlarında immünohistokimyasal incelemeler histogeneze ilgili çalışmalarda, tümör hücre tipinin belirlenmesinde nöroendokrin diferansiasyonun saptanmasında, ayırıcı tanı ve prognoz belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Akcığer karsinomları oldukça heterojen bir gruptur ve 1981 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı sınıflamanın, son gelişmeler ışığında yeniden gözden geçirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır (5, 79, 80, 81). Hemen tüm çalışmalar akciğer karsinomunun endodermal kökenli olduğu görüşünde birleşmektedir (1, 79). Bunun yanısıra nöroendokrin özellikleri ön planda olan tümörler vardır ve diğer tiplerde de değişen oranlarda nöroendokrin diferansiasyon görülebilir (5, 79, 80).

Skuamöz karsinomda genellikle epidermal tip sitokeratin (CK) antikorları, yani yüksek molekül ağırlıklı keratin markerları, CK 5, 6, 8, 13, 17, 18, 19 ile boyanma saptanır (5, 82). Ancak bazı vakalarda CK 4, 14, 15 ile boyanma da saptanmıştır (5). Dezmozomal plak proteinleri ile de boyanma görülmüştür (5).

Adenokarsinomlarda düşük molekül ağırlıklı sitokeratin antikorları ile (CK 7,8,18, 19) boyanma görülür (5). Desmoplakin antikorları ile de boyanma saptanmıştır. Membran asosiyeli glikoprotein molekül (44-3A6) (83, 84), surfaktan apoprotein antikor (85) ile de boyanma bildirilmektedir. Bronkioloalveoler karsinomlarda yapılan sınırlı sayıda çalışmada düşük molekül ağırlıklı sitokeratinler (CK 8, 18, 19) saptanmıştır (5).

Büyük hücreli karsinomda çeşitli hücrelerde yüksek ve düşük molekül ağırlıklı sitokeratinler saptanmıştır. % 20-40 oranında da nöroendokrin özellikler görülmektedir (5). Bu bulgular tümörün ayrı bir histolojik grup olmayıp, diğer tümörlerin az diferansiye şekli olduğu görüşünü destekler niteliktedir (79).

Nöroendokrin tümörler, tumorlet, tipik karsinoid, atipik karsinoid (iyi diferansiye nöroendokrin karsinom), intermedyer tipte nöroendokrin karsinom ve küçük hücreli karsinom spektrumu içerisinde yer almaktadır (86). Bu gruptaki tümörler de çeşitli nöroendokrin peptid hormonlar sentezlenir ya da salgılanır. Tipler arasında bazı farklılıklar belirlenmiştir.

Tumorletlerde nöron spesifik enolaz (NSE), sinaptofizin, bombesin varlığı gösterilmiştir (5).

Karsinoid tümörlerde NSE, sinaptofizin, kromagranin, ayrıca serotonin, bombesin, kalsitonin, leu-enkefalin, ACTH, CRH gibi hormonlar, gastrin, somatostatin, substans P gibi nöropeptidler gösterilir (5, 86, 87, 88, 89, 90). Periferik karsinoidlerde GRP, santral tiplerde HMFG-2 ve alfa hCG ile boyanma görülmüştür. Düşük molekül ağırlıklı sitokeratinler ve desmoplakin ile de boyanma görülür (91).

İyi diferansiye nöroendokrin karsinomlarda, NSE ve sinaptofizin nadirdir. Serotonin, bombesin, kalsitonin, leu-

enkefalin gösterilebilir (5, 80, 92). ACTH karsinoiden daha sıktır (93, 94, 95, 96). Düşük molekül ağırlıklı sitokeratin-peptidleri, desmoplakin (91), nörofilament proteinleri (81) saptanabilir.

İntermedyer tip nöroendokrin karsinomda, NSE ve sinaptofizin görülme oranı yüksektir. Kromagranin daha az görülür. Nöropeptidler, bombesin, ACTH, kalsitonin, Leu-enkefalin ancak monoklonal antikorlarla saptanır. Düşük molekül ağırlıklı sitokeratin peptidleri ve desmosomal plak proteinleri, çok az nörofilament proteinleri vardır (5).

Küçük hücreli karsinomda, NSE ve sinaptofizin sık, kromagranin nadirdir (5). Nöropeptidler içerisinde en sık bombesin, daha az ACTH, kalsitonin, Leu-enkefalin, vazotaktif intestinal peptid, somatostatin görülür. Bazı vakalarda nörofilament proteinleri (97), CK 8, 18, 19 (91) saptanmıştır. Desmoplakin proteinleri çok nadirdir.

Diğer histolojik tiplerde de nöroendokrin diferansiasyon değişen oranlarda görülebilir. İmmünohistokimyasal olarak saptanması tedavi protokolünün belirlenmesi ve prognostik açıdan önemlidir.

Ayrıcı tanıda karsinosarkom, pulmoner blastom, malign mezotelyoma, lenfoma, metastatik tümörlerin saptanması, mezenkimal tümörlerin hücre tipinin belirlenmesinde kullanılır.

Karsinosarkomun fuziform hücreli skuamöz karsinomdan ayrımında, mezenkimal görünümlü alanlarda CK pozitifliği önem kazanır (98).

Pulmoner blastomda epitelyal alanlarda EMA ve sitokeratin ile, mezenkimal alanlarda vimentin ile boyanma görülür (99).

Malign mezotelyoma özellikle küçük biyopsilerde periferik adenokarsinomlarla önemli ölçüde karışma gösterir. İmmünohistokimyasal incelemelerde tek bir ayrıcı antikor yoktur ve bir panel uygulanmalıdır. Belli başlı markerler; CEA (Çoğunlukla), Leu M1, EMA, B 72.3, BEMA 120, My 4, BA 2, BER-EP4, HMFG-2, 44-3A6, Lectin karsinomda, vimentin mezotelyomada pozitifdir (83, 84, 100, 101, 102, 103, 104, 105). Pansitokeratin her iki tümörde saptanabilir.

Lenfoma küçük hücreli karsinom ayrımında LCA, monoklonalitenin gösterilmesi psödotümörlerin ayrımında kullanılabilir.

Metastatik tümörlerde primer tümöre yönelik immünohistokimyasal incelemeler, mezenkimal tümörlerde diğer kısımlardaki benzerlerine eşdeğer markerler kullanılır.

Akciğer karsinomlarının, küçük-gözden kaçabilecek, bölgesel lenf gangliyon ve kemik iliği metastazlarının saptanmasında da immünohistokimyasal tetkikler yararlı olabilir (107).

Prognozun belirlenmesinde immünohistokimyasal markerlar

Bu konudaki çalışmalar klinikte; serumda (108, 109, 110, 111, 112, 113, 114), bronkoalveoler lavaj sıvısında (110), plevra sıvısında (115) CEA, NSE, Cyfra 21-1, SCC, CA 125 gibi tümör markerlerinin saptanması biçiminde yoğunluk kazanmaktadır.

Doku kesitlerinde ise p 53 gibi supressör gen ürünlerinin, Ki-67 gibi proliferasyon markerlerinin immünohistokimyasal olarak saptanmasına dayanır.

Sonuç olarak, henüz çalışma aşamasında olan immünohistokimyasal ve genetik incelemelerin özellikle akciğer karsinomu gibi heterojen bir grupta, ne ölçüde yarar sağlayacağını söylemek için henüz çok erken, ancak geniş seriler-

de ve yöntemlerin sağlıklı uygulanması ile kesin sonuçlar elde edilebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Vinocour M, Minna JD. Cellular and molecular biology of lung cancer. In: Róth JA, Ruckdeschel JC, Weisenburger TH, editors. Thoracic Oncology. Philadelphia: Saunders, 1989: 38-51.
2. Gazdar AF. Molecular markers for the diagnosis and prognosis of lung cancer. Cancer suppl. 1992;69:1592-99.
3. Cagle PT. Molecular pathology of lung cancer and its clinical relevance. Mongr Pathol 1993;36:134-44.
4. Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. Chest 1993; 103:4495-4569.
5. Roth JA, Ruckdeschel JC, Weisenburger TH. Thoracic Oncology. W.B. Saunders Comp. Philadelphia. 1989.
6. Rosell R, Li S, Skacel Z et al. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. Oncogene 1993;8:2407-12.
7. Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ et al. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation of adenocarcinoma of the human lung. Cancer Res 1988;48:5738-41.
8. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene 1990;6:1353-62.
9. Johnson BE, Kelley MJ. Overview of genetic and molecular events in pathogenesis of lung cancer. Chest 1993;103 (1 Suppl): 15-35.
10. Barbacid M. ras genes. Annu Rev Biochem 1987; 56:779-827.
11. Greenberg AH, Egan SE, Wright JA. Oncogenes and metastatic progression. Invasion metastasis 1989;9:360-78.
12. Liotta LA. Oncogene induction of metastases. Ciba Foundation Symp 1988;141:94-108.
13. Ling CC, Endlich B. Radioresistance induced by oncogenic transformation. Radiat Res 1989; 120:267-79.
14. Sklar MD. The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. Science 1988;239:645-647.
15. Carney DN, Gazdar AF, Bepler G et al. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. Cancer Res 1985; 45:2913-23.
16. Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, Minna JD. Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological and growth properties. Cancer Res 1985;45:2924-30.
17. Rygaard JK, Vindelov LL, Spang-Thomsen M. Expression of myc family oncoproteins in small cell lung cancer lines and xenografts. Int J Cancer 1993;22:144-52.
18. Brennan J, O'Connor T, Makuch JW et al. myc family DNA amplification in 107 tumors tumor cell lines from patients with small cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. J Clin Invest 1991; 51:1708-12.
19. Johnson BE. Myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course. J Clin Invest 1987;79:1629.
20. Weiner DB, Nordberg J, Robinson R et al. Expression of the neogene encoded protein (P185 neu) in human non small cell carcinoma of lung. Cancer Res 1990;50:421-25.
21. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE et al. p 185 neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. Cancer Res 1990;50:5184-87.
22. Giatromalaki A, Gorgoulis V, Veslemse M et al. Expression and gene amplification of c-erb B-1 and C-erb B 2 in squamous cell lung carcinomas. Abstracts of international congress for lung cancer. Athens. 22-26 June 1994. s. 176.
23. Kaiser U, Schardt C, Brandscheidt D, Wollmer E, Havemann K. Expression of insulin like growth factor receptors I and II in normal human lung and in lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol 1993;119:665-8.
24. Cook RM, Miller YE, Bunn PA. Y chromosome loss and rearrangement in non small cell lung cancer. Int J Cancer 1993; 55 (3): 390-3.
25. Sorenson GD, Pettengill OS, Brinck-Johnsen T, Cate CC, Mauer LH. Hormone production by cultures of small cell carcinoma of the lung. Cancer 1981;47:1289-96.
26. Gazdar AF, Carney DN, Becker KL et al. Expression of peptides and other markers in lung cancer cell lines. Adv Cancer Res 1985;99:168-74.
27. Moody TV, Pert CB, Gazdar AF, Carney DN, Minna JD. High levels of intracellular bombesin characterize human small cell lung carcinoma. Science 1981;214:1246-48.
28. Minna JD, Cuttitta F, Battey JF et al. Gastrin releasing peptide and other autocrine growth factors in lung cancer: Pathogenetic and treatment

- implications. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Important advances in Oncology 1988. Philadelphia:JB Lippincott, 1988;55-64.
29. Hendler FJ, Ozanne BW. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest* 1984;74:647-51.
 30. Mulshine JL, Avis I, Trester AM et al. Clinical use of a monoclonal antibody to bombesin like peptide in patients with lung cancer. *Ann NY Acad Sci* 1988;307:12.
 31. Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, et al. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 1993; 53 (10 Suppl) 2379-85.
 32. Putnam EA, Yen N, Gallick GE et al. Autocrine growth stimulation by transforming growth factor alpha in human non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 1992; 1(1): 49-60.
 33. Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Skovgaard-Poulsen H. Expression of transforming growth factor beta (TGF beta) receptors and expression of TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3 in human small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1993; 67 (5): 1015-21.
 34. Bensch KG. The problem of classifying peripheral endocrine tumors. *Human Pathol* 1983;14 (5): 383-5.
 35. Yokota J, Wada M, Shimamoto Y, Terada M, Sugimura M. Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small cell carcinoma on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9252-56.
 36. Camping BG, Haworth C, Heather MB et al. Establishment and characterization of a panel of human lung cancer cell lines. *Cancer* 1992;69:2064-74.
 37. Merlo A, Gabrielson E, Askin F, Sidransky G. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:640-2.
 38. Diapode OI, Buchhagen DL, Malik K et al. Homozygous loss of the interferon genes defines the critical region on 9 p that is deleted in lung cancers. *Cancer Res* 1993;53 (10 suppl) 2410-5.
 39. Center R, Lukeis R, Dietzsch R, Gillespie M, Garson OM. Molecular deletion of 9 p sequences in non small cell lung cancer and malignant mesothelioma. *Genes Chromosome Cancer* 1993; 7:47-53.
 40. Harbour JW, Sali SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988;241:353-57.
 41. Kaye FJ, Kratzke RA, Gerster JL, Horowitz JM. A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective phosphorylation and oncoprotein binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5863,67.
 42. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990;335:675-9.
 43. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p 53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990;9:1595-1602.
 44. Lohmann DR, Fessler B, Putz B et al. Infrequent mutations of the p 53 gene in pulmonary carcinoma tumors. *Cancer Res* 1993;53:5797-801.
 45. Takahashi T, Nau MM, Chiba I et al. p 53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-494.
 46. Chiba I, Takahashi T, Nau MM et al. Mutations in p 53 gene are frequent in primary, resected non small cell lung cancer. *Oncogene* 1990;5:1603-10.
 47. Lohmann D, Putz B, Reich U, Böhm J, Prauer H, Höfler H. Mutational spectrum of the p 53 gene in human small cell lung cancer and relationship to clinicopathological data. *Am J Pathol* 1993; 142:907-15.
 48. Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T, Osaki T, Nakanishi R, Shirakusa T. Mutations of the p 53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:2018-23.
 49. Klein N, Vignaud JM, Sadmi M et al. Squamous metaplasia expression of proto-oncogenes and p 53 in lung cancer patients. *Lab Invest* 1993; 68:26-32.
 50. Bennett WP, Colby TV, Travis VT et al. p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 1993; 53:4817-22.
 51. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM et al. p 53 gene mutations occur in combination with allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50:7717-22.
 52. Roncalli M, Dogliani C, Springall DR et al. Abnormal p 53 expression in lung neuroendocrine tumors. *Diagn Mol Pathol* 1992;129:135.
 53. Barbareschi M, Giraldo S, Mauri FA et al. Tumour suppressor gene products, proliferation and differentiation markers in lung neuroendocrine neoplasms. *J of Pathol* 1992; 166:343-350.
 54. Taylor JA, Watson MA, Devereux TR et al. p53 mutation hotspot in radon associated lung cancer. *Lancet* 1994;343:86-7.
 55. Takeshima Y, Seyama T, Bennett WP et al. p 53 mutations in lung cancers from non smoking atomic bomb survivors. *Lancet* 1993;342:1520-1.
 56. Whang-Peng J, Kao-Shan CS, Lee EC et al. A specific chromosome defect associated with human small cell lung cancer. Deletion 3 p (14-23). *Science* 1982;215: 181-85.
 57. Kok K, Osinga J, Carritt B et al. Deletion of a DNA Sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature* 1987;330: 578-81.
 58. Sithanandam G, Dean M, Brennscheidt et al. Loss of heterozygosity at the c-rf locus in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1989;4:451-55.
 59. Kao Shan CS, Fine RL, Whang Peng J, Lee EC, Chabner BA. Increased fragile sites and sister chromatid exchanges in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smokers. *Cancer Res* 1987;47:6278-82.
 60. Brauch H, Troy K, Kotler F et al. Molecular mapping of chromosome 3p deletion sites in human lung cancer. *Genes Chrom Cancer* 1990;1:240-6.
 61. Sellers TA, Bailey-Wilson JE, Elston RC et al. Evidence for Mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1272-79.
 62. McLemore TL, Adelberg S, Czerwinski M et al. Altered regulation of the cytochrome p450A1 gene: Novel inducer independent gene expression in pulmonary carcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1787-94.
 63. Gough A, Niles J, Spurr N et al. Identification of the primary gene defect at the cytochrome p 450 CYP2D locus. *Nature* 1990;347:773-6.
 64. Gonzales FJ, Vilbois F, Hardwick JP et al. Human debrisoquine 4-hydroxylase (P45011D1): c DNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics* 1988;2:174-9.
 65. Becker KI, Gazdar AF. The Endocrine Lung in Health and Disease. Philadelphia : WB Saunders, 1984.
 66. Levitt ML, Gazdar AF, Oie HK, Schuller G, Thatcher SM. Cross linked envelope related markers for squamous differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50:120-128.
 67. Gazdar AF, Linnoila RI, Kurita Y et al. Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50:5481,87.
 68. Gottesan MM, Ohnishi T, Ueoka A, Kiura K, Kimura I. MDR 1 expression and treatment in small cell lung cancer. MDR 1 gene expression as an independent prognostic factor. *Acta Med Okayama* 1993;47:243-8.
 70. Nie KR, Li CH, Zhu YJ. Immunohistochemical investigation on the expression of glutathione S transferases (GSTs) in lung cancer. *Chung Hua Chieh Ho Ho HU Hsi Tsa Chih* 1993; 16:141-3.
 71. Segawa Y, Ohnoski T, Hiraki S et al. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein and carcinoembryonic antigen in small cell lung cancer with reference to predictability of response to chemotherapy. *Ata Med Okayama* 1993;47:181-9.
 72. Salvati F, Teodori L, Trince ML et al. The relevance of flow cytometric DNA content in the evaluation of lung cancer. *J Cancer Clin Res Oncol* 1994;120:233-9.
 73. Hofmann S, Klapper M, Knolle J et al. Flow and image DNA cytometry of lung cancer in correlation to typing and grading. Abstracts Book of International Congress For Lung Cancer. Athens. 22-26 June 1994. s. 179.
 74. Chiba W, Sawai S, Hanawa T et al. Correlation between DNA content and amplification of oncogenes (c-myc, L-myc, c-erb B2) and correlation with prognosis in 143 cases of resected lung cancer. *Gan To Kagak Ryoho* 1993; 20:824-7.
 75. Carey FA, Lamb D, Bird CC. Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer* 1990;65:2266-2269.
 76. Kimura T, Sato T, Onodera K. Clinical significance of DNA measurements in small cell lung cancer. *Cancer* 1993; 72: 3216-22.
 77. Sahin AA. Flow cytometric analysis of the DNA content of non small cell lung cancer. Ploidy as a significant prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1990;65:530.
 78. Fontanini G, Bigni D, Vignati S et al. p 53 expression in non small cell lung cancer. clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1993;13:737-42.
 79. Churg A. Tumors of the Lung. In: Thurlbeck WM ed. Pathology of the Lung. New York: Thieme Medical Publishers, 1988:311-423.
 80. Kameya T, Yamaguchi K. The endocrine lung. In: Kovacs K, Asa L, eds. Functional Endocrine Pathology. London: Blackwell Scientific Publications. 1991:478-492.
 81. Warren WH, Fabr P, Gould VE. Neuroendocrine neoplasms of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:321-32.
 82. Bruderman I, Cohen R, Leitner O, et al. Immunocytochemical characterization of lung tumors in fine needle aspiration. *Cancer* 1990; 66:1817-27.
 83. Radosevich JA, Ma Y, Lee I, et al. monoclonal antibody 44-3A6 as a probe for a novel antigen found on human lung carcinomas with glandular differentiation. *Cancer Res* 1985;45:5808-12.
 84. Spagnolo DV, Whitaker D, Carrello S, et al. The use of monoclonal antibody 44-3A6 in cell blocks in the diagnosis of lung carcinoma, carcinomas metastatic to lung and pleura, and pleural malignant mesothelioma.

- oma. *Am J Clin Pathol* 1991;95:322-29.
85. Espinoza CG, Saba SR, Shelley SA, et al. antibodies to surfactant apoprotein as a diagnostic tool for identifying carcinomas of the lung with alveolar cell differentiation. *lab Invest* 1983;46:
 86. Bonato M, Cerati M, pagani A. differential diagnostic patterns of lung neuroendocrine tumors. *Virchows Archiv A Pathol anat* 1992;420:201-11.
 87. Schteingart DE, Llyod RV, Akil H, et al. Cushing4s syndrome secondary to ectopic corticotropin releasing hormone adrenocorticotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:770-75.
 88. Asa SL, Kovacs K, vale W, et al. Immunohistologic localization of corticotropin releasing hormone in human tumors. *Am J Clin Pathol* 1987;87:327-33.
 89. Fekete PS, Cohen C, DeRose PB. Pulmonary spindle cell carcinoid. *Acta Cytol* 1990;34:50-56.
 90. Brambilla E, Veale D, Moro D, et al. Neuroendocrine phenotype in lung cancers. *Am J Clin Pathol* 1992; 98:88-97.
 91. Blobel GA, Gould Ve, MollR, et al. Coexpression of neuroendocrine markers and epithelial cytoskeletal proteins in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Lab Invest* 1985; 52:39-52.
 92. Sano T, Saito H, Yamasaki R, et al. Immunorctive somatostatin and calcitonin in pulmonary neuroendocrine tumor. *Cancer* 1986;57:64-68.
 93. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, et al. Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathol Annu* 1983;18:287-330.
 94. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, et al. neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias and neoplasms. *Lab Invest* 1983;59:519-37.
 95. Gould VE, Warren WH, Memoli VA. Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. In: Becker KL, Gazdar AF, eds. *The endocrine Lung*. Philadelphia:WB Saunders, 1984:406-45.
 96. Warren WH, Memoli VA, Gould VE. Immunohistochemical andultrastructural analysis of neuroendocrine neoplasms. II. Well differentiated neuroendocrine neoplasms. *Ultrastruct Pathol* 1984;74:185-199.
 97. Lehto VP, Stenman S, Miettinen M, et al. Expression of a neural type of intermediate filament as a distinguishing feature between oat cell carcinoma and other lung cancers. *Am J Pathol* 1983; 110:113-118.
 98. Cagle PT, Alpert LC, Carmona PA. Peripheral biphasic adenocarcinoma of the lung: Light microscopic and immunohistochemical findings. *Hum Pathol* 1992;23:197-200.
 99. Dienemann D, Hartmann CA, Minck C. Pulmonary blastomas. Immunohistochemical investigations of three cases. *Pathol Res Pract* 1989; 184 (3): 306-11.
 100. Sheibani K, esteban JM, Bailey A, battifora H, Weiss LM. Immunopathologic and molecular studies as an aid to the diagnosis of malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 1992;23:107-116.
 101. Nance KV, Silverman JF. Immunocytochemical panel for the identification of malignant cells in serous effusions. *am j Clin Pathol* 1991;95:867-74.
 102. Guzman J, Bross KJ, Würtemberger G, Costabel U. Immunocytology in malignant pleural mesothelioma. *Chest* 1989;95:590-5.
 103. Gaffey MJ, Mills SE, Swanson PE et al. Immunoreactivity for BERP 4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors an malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol* 1992;16 (6):593-99.
 104. Lee I, Radosevich JA, Chejfec G, et al. Malignant mesotheliomas. Improved differential diagnosis from lung adenocarcinomas using monoclonal antibodies 44-3A6 624a12. *Am J Pathol* 1986;123:497-507.
 105. Kawai T, Greenberg SD, Truong LD, et al. Differences in lectin binding of malignant pleural mesothelioma and adenocarcinoma of the lung. *am J Pathol* 1988;130:401-10.
 106. Frierson HF, Mills ME, Legier JF. Flow cytometric analysis of ploidy in immunohistochemically confirmed examples of malignant mesothelioma. *Am J Clin Pathol* 1988;90:240-43.
 107. Pantel K, Izbicki J, Angstwurm M, et al. Immunoytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993 53 (5): 1027-31.
 108. Duoix E, charlox A, Popin E, pauli G. Inability of neuron spesific enolase to predict disease extent in small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1993;29 A (16) 2248-50.
 109. Steiber P, Bodenmuller H, Banauch D, et al. Cytokeratin 19 fragments:a new marker for non small cell lung cancer. *clin Biochem* 1993;26 (4):301-4.
 110. Niklinski c, Chyozewska E, Frman M et al. Usefulness of a multipl bi-marker assay in bronchoalveolar lavage (BAL) and serum for the diagnosis of small cell lung cancer. *Neoplasma* 1993;40:305-8.
 111. Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U. et al. Comparison of cytokeratin fragment 19 (Cyfra 21-1), tissue polipeptde antigen 5TPA) and tissue polypeptide specific antigen (TPS) as tumour markers in lung cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993;31:689-94.
 112. Van der Beast A, Schenmakers CH, Kok TC et I. Evaluation of a new tumour marker in patients with non small cell lung cancer: Cyra 21.1.Br J Cancer 1994;69:525-8.
 113. zeng L. Clinical significance of serum SCC Ag in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih* 1993;31:13-5.
 114. Diez M, Torres A, Pullan M et al. Prognostic significance of serum CA 125 antigen in patients with non small cell lung cancer. *Cancer* 1994;73:1368-76.
 115. Menard O, Dousset B, Jacob C, Martinet Y. Improvement of the diagnosis of the cause of pleural effusions in patients in lung cancer by simultaneous quantification of carcinoembryonic antigen (CEA) and Neuron spesific enolase (NSE) peural levels. *Eur J Cancer* 993;29A (13): 1806-9.