

Akciğer tümörlerinde keratin, nöron-spesifikenolaz karsinoembriyonik antijen ekspresyonu ve heterojenitenin ilişkisi: 48 olgunun değerlendirilmesi

Serpil DİZBAY SAK, Esra ERDEN, Ayşe SERTÇELİK, Arzu ENSARİ, Zişan ÖZGÜLER

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD, ANKARA

Bu çalışmada AÜTF Patoloji Anabilim Dalında incelenen 48 primer akciğer karsinomu olgusu Hematoksilen-Eozin, Mayer müsikarmen ve alcian blue boyaları ile değerlendirilmiş ve bunlarda %31 oranında heterojenite tesbit edilmiştir. On olgu (%20.8) yassı hücreli karsinom, 14 olgu (%29.1) adenokarsinom, sekiz olgu (% 16.6) küçük hücreli karsinom ve bir olgu (%2) büyük hücreli karsinom olarak tanı almıştır. Bu seride primer akciğer karsinomlarının %70'inde keratin, %81'inde CEA ve %64'unda NSE pozitifliği izlenmiştir. Tek bir histolojik tipe sahip olan tümörler dikkate alındığında, keratin ekspresyonu en yüksek oranda (%90) yassı hücreli karsinoma grubunda, CEA varlığı en yüksek oranda (%92.8) adenokarsinom grubunda ve NSE'da en yüksek oranda (%87.5) küçük hücreli tümörlerde izlenmiştir. Ancak bu antijenlerin ekspresyonu herhangi bir histolojik tip için spesifik olmaktan uzaktır. Gerek rutin boyalarla saptanan heterojenite, gerekse immun-histokimyasal çalışma sonucunda saptanan özellikler tüm primer akciğer karsinomlarının aynı ana hücreden kaynaklandığı görüşünü destekler niteliktedir. [Türk Tıp Araştırma 1992, 10(4): 221-226]

Anahtar Kelimeler: Akciğer karsinomu, Heterojenite, İmmunhistokimya

İnsan vücudunun en sık görülen malignitelerinden biri olan akciğerin primer karsinomları, Dünya Sağlık Örgüsü (WHO) sınıflamasına göre yassı hücreli karsinom, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere dört ana grupta değerlendirilir (1). Akciğer karsinomlarının önemli bir bölümünün bu ana histopatolojik tiplerin kombinasyonlarını gösterebildiği bilinmektedir (2,3,4,5). Histopatolojik düzeyde zaman zaman önemli tanı güçlüklerine yol açabilen bu tümörler heterojen akciğer tümörleri adıyla anılmaktadır (3).

Bu çalışmada anabilim dalımızda incelenen 48 primer akciğer karsinomunda rutin Hematoksilen-Eozin boyamasına ek olarak Mayer'in müsikarmen boyası ve alcian blue boyamaları ile heterojenite varlığı araştırılmış, ayrıca heterojen özellikteki tümörler başta olmak üzere akciğer tümörlerinde Keratin, Karsinoembriyonik Antijen (CEA) ve Nöron-spesifik Enolaz (NSE)'in histolojik tiplere göre ekspresyon özellikleri incelenmiştir.

Geliş Tarihi: 7.5.1992

Kabul Tarihi: 5.6.1992

Yazışma Adresi: Serpil DİZBAY SAK
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji ABD, Morfoloji Binası 06100
Sıhhiye, ANKARA

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada AÜTF Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı konan 48 primer akciğer karsinomu olgusu incelenmiştir. Bu tümörlerin 11 tanesi daha önce tarafımızdan yapılmış başka bir çalışmada da yer alan olgulardır ve bunların tümü lobektomi ile elde edilmiştir. Çalışmaya yeni olarak eklenen 37 vaka ise lobektomi ve tanı amacıyla yapılmış torakotomiler ile elde edilen biopsi örneklerinden oluşmaktadır.

Materyal %10'luk formalin ile tesbit edilmiş ve biopsilerde materyalin tümü, lobektomilerde ise tümörün tümü ya da beş parçası takibe alınmak sureti ile her olgu için tümörü temsil eden bir ile beş arasında değişen sayıda örnek alınmıştır. Bunlardan hazırlanan parafin bloklardan elde edilen kesitler Hematoksilen-Eozin (HE), Mayer'in müsikarmen boyası ve pH 2.5'da alcian blue ile boyanmıştır.

HE ve histokimyasal boyamalar sonucu her tümör WHO sınıflaması kriterleri uyarınca tanılandırılmıştır. Buna göre tek bir diferansiyasyon gösteren tümörler yassı epitel karsinomu, adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom kategorilerinden biri içinde değerlendirilmiş, birden fazla histolojik tip içeren tümörler heterojen tümör olarak sınıflandırılmıştır.

Histolojik tip tayinini takiben her tümörün, tümörü en iyi temsil ettiği düşünülen bir ya da iki bölümden hazırlanan kesitler immunhistokimyasal yöntem ile ke-

ratın, CEA ve NSE varlığı açısından incelenmiştir. Bu araştırmada Dako Papkit sistemleri (Kod no: K 528, K 506, K 545) kullanılmış ve üreticinin önerdiği işlem basamakları uygulanmıştır. Çalışmada negatif kontrol amacıyla nonimmun serumlar ve pozitif kontrol olarak da, epidermis, kolon adenokarsinomu ve normal pankreas dokusuna ait kesitler kullanılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada incelenen 48 tümörün 41'i erkek, yedi tanesi ise kadın hastalara aittir. En genç hasta 28, en yaşlı hasta 70 yaşında olup ortalama yaş 55.5 olarak saptanmıştır. Hastaların histolojik tiplere göre yaş ve cins dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Kırksekiz olgunun 33 tanesinde tek bir histolojik tip izlenmiştir. Bu olguların 10 tanesinde (%20.8) keratinizasyon ile birlikte ya da keratinizasyon izlenmeksizin intersellüler köprüler izlenerek yassı hücreli karsinom tanısı verilmiştir.

Ondört olguda (%29.1) tübüler, asiner ya da papiller gelişimler izlenmesi ya da histokimyasal yöntemlerle intrasitoplazmik müsin gözlenmesi üzerine adenokarsinom tanısı verilmiştir. Adenokarsinoma olgularının dokuz tanesinde, glandüler yapıları oluşturan hücrelerin sitoplazmasında ve gland lümenlerinde hem müsikarmen hem de alcian blue ile boyanan müsin varlığı izlenmiştir. Bu olguların birinde alcian blue ile izlenen boyanmanın müsikarmen boyanmasına göre daha yaygın ve şiddetli olduğu dikkati çekmiştir. Üç olguda glandüler yapıların varlığına rağmen, her iki boyama ile müsin varlığı saptanamamıştır. İki olguda ise sadece alcian blue ile glandüler yapılarda boyanma saptanmış, müsikarmen bu boyanmayı göstermemiştir (Tablo 2). Alcian blue boyamasında pek çok olguda, tümör stromasında müsin dışı maddelere bağlı olduğu düşünülen fokal ya da yaygın pozitif boyanma saptanmış, bu sahalarda değerlendirilmede dikkate alınmamıştır.

Sekiz olgu (%16.6) küçük hücreli karsinom olarak değerlendirilmiş ve yalnızca bir olguya (%2) büyük hücreli karsinom tanısı verilmiştir.

Onbeş olguda (%31.2) heterojen görünüm izlenmiştir. Bu 15 olgunun 12 tanesi yassı hücreli karsinom-adenokarsinom kombinasyonu göstermekte ve bunların 10 tanesinde yassı hücre komponenti, ikisinde ise adenokarsinom komponenti hakim görünmektedir (Şekil 1). Kalan üç heterojen tümörün ikisinde küçük hücreli karsinom, yassı hücreli karsinom ve adenokarsinom şeklinde üç ayrı diferansiyasyon örneği izlenmektedir

(Şekil 2,3). Bir tümör ise küçük hücreli karsinom ve adenokarsinom kombinasyonu göstermektedir. Heterojen karsinom grubunda iki olguda glandüler yapıların varlığına karşın alcian blue ya da müsikarmen ile boyanma gözlenmemiştir. Altı olguda ise intrasitoplazmik müsin varlığı yalnız alcian blue boyaması ile gösterilebilmiştir (Tablo 2).

Serimizi oluşturan 48 primer akciğer tümörünün immunhistokimyasal incelenmesi sonucu aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4). Histolojik gruplardaki olgu adedi az olduğundan istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. Keratin için yapılan incelemede 10 yassı epitel karsinomunun dokuzunda (%90), 14 adenokarsinomun 10 tanesinde (%71.4) ve 15 heterojen akciğer tümörünün tümünde olmak üzere toplam 34 olguda (%70.8) keratin varlığı saptanmıştır. Küçük hücreli karsinomaya ait serimizdeki tek örneğin anti-keratin ile immünreaksiyon göstermediği izlenmiştir. CEA için yapılan incelemede 10 yassı epitel karsinomunun yedisinde (%70), 14 adenokarsinomunun 13 tanesinde (%92.8) (Şekil 5), sekiz küçük hücreli karsinomun beşinde (%62.5) ve heterojen gruptaki 15 karsinomun 14 tanesinde (%93.3) olmak üzere tüm olguların %81.2'sinde boyanma saptanmıştır. Büyük hücreli karsinom olgusu anti-CEA ile reaksiyon vermemiştir. Anti-NSE ile yapılan incelemede yassı hücreli karsinomların altı adedinde (%60), adenokarsinomların 10'unda (%71) (Şekil 6), küçük hücreli karsinomların yedisinde (%87.5) ve heterojen gruptaki tümörlerin sekizinde immünreaksiyon izlenmiştir (%53.3). Böylece tümörlerin tümü dikkate alındığında %64.5 olguda değişik yaygınlık ve şiddette NSE varlığı izlenmiştir. HE ile tipik bir küçük hücreli karsinom görünümündeki bir olgunun NSE ile boyanma göstermemesi dikkat çekici olmuştur.

Immunhistokimyasal incelemelerde reaksiyon şiddeti ve yaygınlığı konusunda objektif bir değerlendirmeye gidilmemiş olmakla birlikte, keratin ekspresyonunun genellikle yassı hücreli tümörlerde, CEA ekspresyonunun ise adenokarsinomlarda daha belirgin olduğu gözlenmiştir. NSE ekspresyonu küçük hücreli tümörler dışındaki karsinomlarda oldukça fokal hafif şiddetli olarak izlenmiştir.

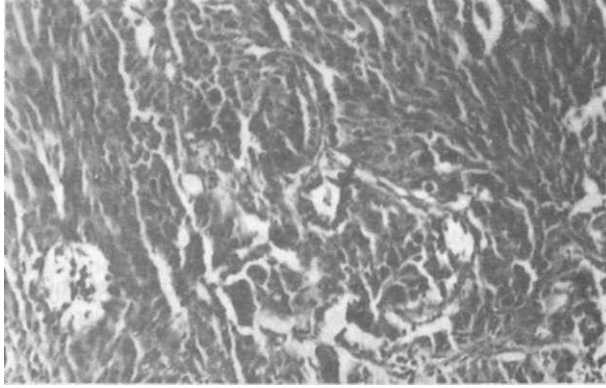
Heterojen tümörlerde immunhistokimyasal belirleyicilerin reaksiyon verdikleri sahalarda incelendiğinde histolojik görünüm ile kullanılan markerlerin ekspresyonu arasında hiçbir korelasyon bulunmadığı dikkati çekmiştir. Örneğin aynı tümörün hem yassı hücreli, hem glandüler diferansiyasyon gösteren sahalalarında keratin varlığı saptanmış, benzer şekilde CEA glandüler saha-

Tablo 1. Histolojik tiplere göre olguların yaş-cins özellikleri

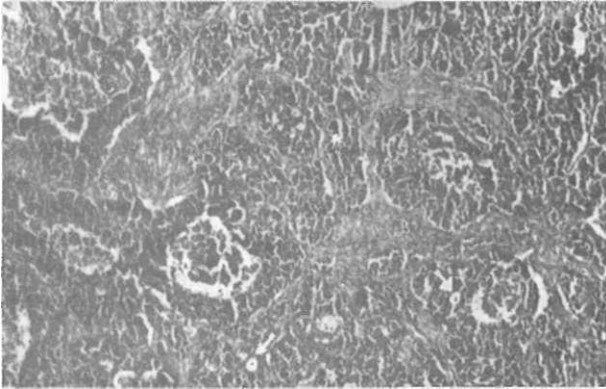
	Yassı H.	Adeno	Küçük H.	Büyük H.	Heterojen
Sayı, Cins	10E	10E, 4K	7E, 1K	1E	13E, 2K
%	20.8	29.1	16.6	2	31.2
Yaş (küçük, büyük ort.)	44-60 53.6	28-62 48.8	35-70 56.6	69 69	41-70 55.5

Tablo 2. Adenokarsinomlar ve heterojen tümörlerde mûsin özellikleri

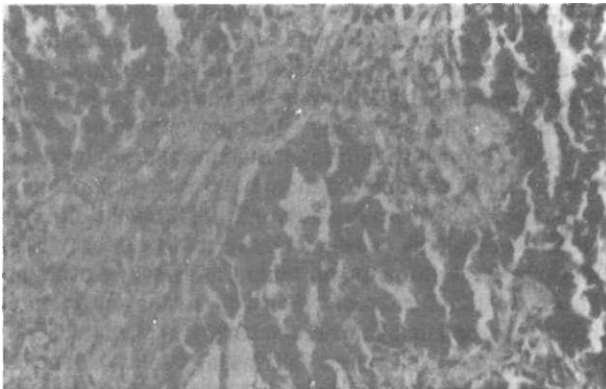
	Adeno	Heterojen
Mûsikarmen	9/14	7/15
Alcian blue	11/14	13/15



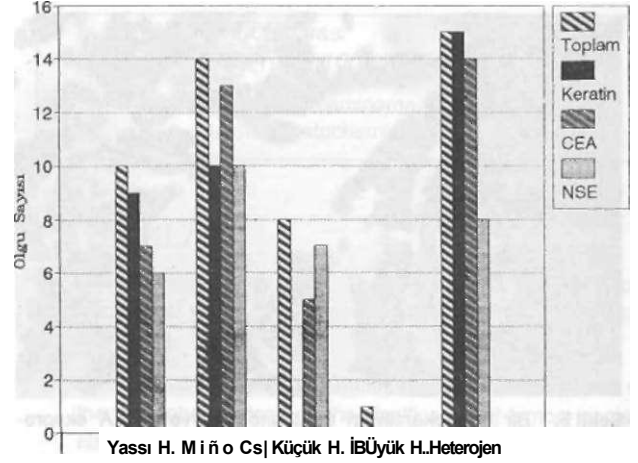
Şekil 1. Yassı epitel adaları içerisinde ve komşuluğunda gland yapıları (x100, HE).



Şekil 2. Geniş sahalar da tipik bir küçük hücreli karsinom görünümündeki bir olguda adalar içerisinde gland yapıları. Aynı olguda farklı sahalarda yassı hücre diferansiasyonu da izlenmiştir (x40, HE).



Şekil 3. Şekil 4'de izlenen olgudaki gland yapıları (x200, Alcian blue).

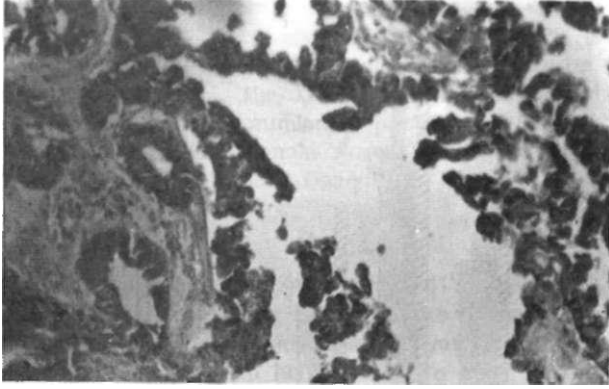


Şekil 4. Kırksekiz primer akciğer karsinomunda immunhistokimyasal özellikler.

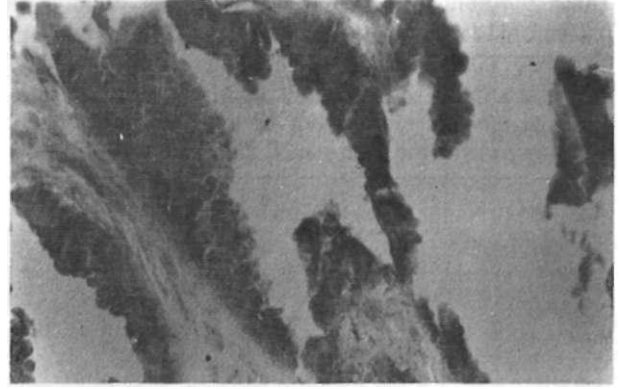
lar kadar yassı epitel sahalarında da gözlenmiştir. NSE ekspresyonu da küçük hücreli sahalarda sınırlı olmayıp, fokal ve hafif şiddetli olsa da diğer alanlarda da izlenmiştir.

TARTIŞMA

Akciğerin primer karsinomlarının aynı tümör içerisinde birden fazla histolojik görünüm sergileyebildikleri eskiden beri dikkati çekmiş olan bir konudur. Çeşitli serilerde %33'den %77'ye dek değişen (2,3,4,5) farklı oranlarda izlendiği bildirilen bu heterojen görünüme bizim de daha önceki bir çalışmamızda %26 oranında rastlanmıştır (6). Önceki çalışmamızdan farklı olarak biopsi materyalini de dahil ederek oluşturduğumuz bu yeni seride bu oran %31'e çıkmaktadır. Tümörü temsil eden ortalama parça sayısının bu seride daha düşük olmasına karşın heterojeniteye rastlama sıklığının artmış olması, eski seriden bu çalışmaya aktarılan 11 tümörün beş tanesinin heterojen görünümde olması ile ilişkili olabilir. Ancak bir başka muhtemel etken ise bu çalışmada mûsinin demonstrasyonu için PAS yerine daha farklı bir mûsin spektrumunu açığa çıkaran mûsikarmen ve alcian blue boyalarının kullanılmış olmasıdır. Bu çalışmada özellikle alcian blue boyasının değerlendirilmesi sırasında, HE boyalı kesitlerde dikkati çekmeyen bazı glandüler yapıların ortaya çıktığı ya da bunların daha belirgin olarak izlendiği dikkatimizi çekmiş ve bir kısım olgularda bu sayede heterojen görünüm ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada alcian blue boyamasında hiyalüronidazın uygulanmamış olması nedeniyle bir kısım boyanmanın hiyalüronik aside bağlı olduğu düşünülebilmektedir. Ayrıca aksatiflerde hiyalüronik asit aktivitesinin düşmesi (7) ve ayrıca en azından bir kısım olgularda aynı lokalizasyonda daha zayıf olarak mûsikarmenofilinin de bulunması nedeniyle bu olasılık akıldan uzaklaşmaktadır. Ayrıca akciğerde rastlanabilecek ve hiyalüronik asit içeriğinden dolayı alcian blue pozitif madde bulundurarak karışıklığa sebep olabilecek epitelyal mezotelyomalarda, bizim serimizdeki heterojen tümörlerde



Şekil 5. Bir adenokarsinom olgusunda kuvvetli CEA ekspresyonu (x100).



Şekil 6. Şekil 5'te izlenen olguda bir sahada oldukça şiddetli NSE varlığı (x200).

olduğu gibi bir yassı hücreli karsinom komponenti olmayacağından bu olasılık da ortadan kalkmaktadır. Bazı olgularda müsikarmenin alcian blue boyasına oranla daha zayıf olarak izlenmesi ya da hiç izlenmemesinin, pH 2.5'da uygulanan alcian blue boyasının müsikarmene oranla daha düşük pH'daki müsineri gösterebilmesi (8) ile ilişkili olduğu düşüncesindeyiz.

Keratin, CEA ve NSE antikoru kullanarak yapılmış olduğumuz immünohistokimyasal çalışmada elde ettiğimiz bulgular, bu konuda daha önce yapılmış çalışmalar ile genellikle iyi bir korelasyon göstermiştir (5,9,10,11). Bu çalışmada, küçük hücreli karsinom grubu ve serimizdeki tek büyük hücreli karsinom örneği hariç, diğer gruplarda yüksek oranda keratin varlığı izlenmiştir. Ancak yassı hücreli karsinomlarda ya da yassı epitel komponenti bulunan karsinomlarda keratin ekspresyonu daha yüksek oranda ve daha şiddetli olarak izlenmiştir. Kullandığımız anti-keratin oldukça geniş spektrumlu bir keratin antikoru olduğundan değişik tipteki karsinomlarda keratin pozitifliği izlenmesi şaşırtıcı değildir. Saba ve arkadaşlarının çalışmalarında, ayrıca Gusterson ve arkadaşlarının araştırmalarında bizim sonuçlarımıza benzer şekilde ve ek olarak küçük ve büyük hücreli tümörler de dahil olmak üzere tüm akciğer karsinomlarında keratin varlığı izlenmiştir (5,9). Said ve arkadaşlarının keratin pozitifliğinin hemen tamamen yassı hücreli karsinoma özgü olduğuna ilişkin bulguları (12), muhtemelen kullanılan antikorun daha dar spektrumlu olmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim aynı yazarın başka bir çalışmasında adenokarsinomlarda düşük molekül ağırlıklı keratinler için pozitif boyanmadan sözedilmektedir (13).

İlk ortaya konduğu yıllarda fetal kolona ve gastrointestinal adenokarsinoma özgü bir antijen olduğu düşünülen CEA'nın (14,15) daha sonra çok farklı dokulardan kaynaklanan karsinomlarda da mevcut olabileceği ortaya çıkmıştır (16,17). Bu çalışmada da küçük hücreli karsinomlar da dahil olmak üzere, serimizdeki tek büyük hücreli akciğer karsinomu örneği hariç, tüm gruplarda CEA varlığı izlenmiştir ancak bu antijene rastlama sıklığı adenokarsinomlarda daha fazladır. Bu

bulgularımız adenokarsinomların %90'ında, yassı hücreli karsinomların %100'ünde, küçük ve büyük hücreli karsinomların az bir bölümünde CEA varlığı saptayan ve boyanmanın yassı hücreli grupta zayıf, adenokarsinom grubunda şiddetli olduğunu belirten Okamura ve arkadaşlarının bulguları ile oldukça büyük benzerlik göstermektedir (11). Benzer şekilde Harach ve arkadaşları da histolojik görünüm ile korelasyon göstermeksizin, akciğer karsinomlarının %70 kadarında CEA varlığı saptamışlardır (10).

Bu çalışmada da heterojen tümörlerde keratin ve CEA'nın saptandığı sahalar histolojik görünüm ile hemen hiç korelasyon göstermemektedir. Örneğin bazı tümörlerde, bir kısım yassı epitel adalarında belirgin keratin varlığı izlenirken diğer bazı adalarda CEA ekspresyonu daha belirgin olarak yer almakta, aynı şekilde glandüler yapılar hem keratin hem CEA için reaksiyon gösterebilmektedir.

Küçük hücreli olgularımızda şiddetli ve yaygın şekilde bulunduğunu izlediğimiz NSE enzimi yalnızca nöronlarda değil değişik organlardaki nöroendokrin hücrelerde ve bunların tümörlerinde de izlenen bir enzimdir (18). Bu çalışmada küçük hücreli karsinomlar dışındaki akciğer karsinomlarında da oldukça önemli sayılabilecek oranda NSE ekspresyonu izlenmiştir. Küçük hücreli tümörlere oranla oldukça fokal ve düşük şiddette de olsa, histolojik görünümleri ile kendi gruplarındaki NSE içermeyen diğer tümörlerden hiçbir fark göstermeyen bir kısım karsinomlarda böyle bir bulgunun varlığı dikkati çekicidir. Hem yassı hücreli karsinomlarda hem de, adenokarsinomlarda rastlanan bu özellik kullandığımız antikora özgü bir kros reaksiyona bağlı olabileceği gibi, NSE'nin gerçek ekspresyonunu da ifade edebilir. Bilindiği gibi özellikle gastrointestinal yerleşimli bazı adenokarsinomlarda da nöroendokrin diferansiasyon gösteren hücrelere rastlanabilmektedir (19,20). Ayrıca akciğerin gerek yassı hücreli karsinomların da gerekse adenokarsinomlarında immünohistokimyasal olarak nöroflaman ekspresyonuna rastlandığı (21) ve yassı hücreli karsinomlarda %30 oranında nörosekretuar granüller bulun-

AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE KERATİN, NSE, CEA EKSPRESYONU VE HETEROJENİTE

duğu saptanmıştır (4). Bu bulgular, tipik yassı hücreli karsinom ya da adenokarsinom özelliği taşıyan bazı karsinomlarda az sayıda da olsa bir nöroendokrin hücre popülasyonunun mevcut olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada tipik bir küçük hücreli karsinom olgusunda rastlanılan NSE için immünreaksiyon yokluğunun ise muhtemelen fazla fiksasyon nedeniyle antijenite kaybına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada incelenen vakaların %31'inin rutin yöntemlerle saptanabilen heterojen görünüm gösterdiği izlenmiştir. Bu özelliğin değerlendirilmesinde glandüler diferansiyasyonun saptanabilmesi konusunda müsikarmen ve aldan blue boyalarının yardımcı olduğu dikkati çekmiştir. İmmünohistokimyasal inceleme sonucu akciğer karsinomlarının histolojik diferansiyasyondan bağımsız olarak keratin ve CEA varlığı gösterdikleri gözlenmiştir. Ayrıca küçük hücreli karsinomlar dışındaki akciğer karsinomlarında da bazı nöroendokrin özellikler gösteren bir hücre popülasyonunun mevcut olabileceği düşünülmüştür. Bu bulgular tüm akciğer karsinomlarının aynı hücreden köken aldıkları yolundaki görüşleri (3,4) destekler niteliktedir.

TEŞEKKÜR: Çalışmamızı oluşturan olguların kesitlerinin hazırlanmasında, rutin histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaların yapılmasında, titiz ve özverili çalışmalarından dolayı laboratuvarımız sorumlu teknisyenlerinden Sayın Bekir SEL'e teşekkür ederiz.

The relationship between keratin, NSE, CEA expressions and heterogeneity in pulmonary neoplasms

In this study 31 per cent of the 48 primary pulmonary neoplasms, which were examined by Hematoxylin-eosin, Mayer's mucicarmen and alcian blue stains, appeared to be heterogeneous. Ten cases (20.8%) were squamous cell carcinomas, 14 cases (29.1%) were adenocarcinomas, eight cases (16.6%) were small cell carcinomas and only one tumor (2%) was diagnosed as large cell carcinoma. In the present series, 70, 81 and 64 percent of the primary pulmonary carcinomas showed keratin, CEA and NSE positivity respectively. When the pulmonary tumors showing only one histologic differentiation were examined, keratin expression was more prominent in squamous cell carcinomas (90%). CEA and NSE positivity was noted at highest percentages in adenocarcinomas (92.8%) and small cell carcinomas (87.5%), respectively. However, none of the antigens was restricted to a specific histologic group. We concluded that, the results obtained both by routine stains and by immunohistochemical studies, provide evidence for a common histogenesis

in pulmonary carcinomas.

[*Turk J Med Res 1992, 10(4): 221-226*]

Key Words: Pulmonary carcinoma, Heterogeneity, Immunohistochemistry

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. The World Health Organization histological typing of lung tumours. Am J Clin Pathol 1982; 77:123-36. j.
2. Olcott CT. Cell types and histologic patterns in carcinoma of the lung: observations on the significance of tumors containing more than one type of cell. Am J Pathol 1955; 31:975-81.
3. Roggli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGravran MH, Spjut HJ, Yesner R. Lung cancer heterogeneity: A blinded and randomized study of 100 consecutive cases. Hum Pathol 1985; 16:569-79.
4. Müller KM, Fisseler-Eckhoff A. What's new in lung tumor heterogeneity? Path Res Pract 1989; 184:108-15.
5. Saba S, Espinoza CG, Richman AV, Azara HE. Carcinomas of the lung: An ultrastructural and immunocytochemical study. AJCP 1983; 80:6-13.
6. Sak SD, Sertçelik A, Ensari A, Erden E, Özgüler Z, Bulay O. Heterogeneity in lung tumors: A histopathological study on 50 cases. J Ankara Medical School 1991; 13:239-44.
7. Kannerstein M, Churg J, Magner D. Histochemical studies in the diagnosis of mesotelioma. In: Bogovski P, Gilson JG, Timbrell V, Wagner JC, eds. Biological effects of asbestos: Lyon: International agency for research on cancer, 1973:62-4.
8. Thompson SW. Microscopic histochemical methods for the demonstration of carbohydrates. In: Thompson SW, Hunt RD, eds. Selected histochemical and histopathological methods: Illinois: Charles C Thomas, 1966:370-576.
9. Gusterson B, Mitchell D, Warburton M. Immunohistochemical localization of keratin in human lung tumors. Virchows Arch [A] 1982; 394:269-75.
10. Harach HR, Skinner M, Gibbs AR. Biological markers in human lung carcinoma; An immunohistopathological study six antigens. Thorax 1983; 38:937-46.
11. Okamura A, Ohkawa J, Fujisawa H. Clinicopathological study on the relationship between serum-CEA and tissue-CEA of resected lung cancer cases. Acta Pathol Jpn 1984; 34:1209-19.
12. Said JW, Nash G, Tepper G, Bank-Schlegel S. Keratin proteins and carcinoembryonic antigen in lung carcinoma. Hum Pathol 1983; 14:70-6.
13. Said JW, Nash G, Banks-Schlegel S. Keratin in human lung tumors. Patterns of localization of different-molecular-weight keratin proteins. Am J Pathol 1983; 113:27-32.

14. Gold P, Gold M, Freedman SO. Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Cancer Res* 1968; 28:1131-4.
15. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122:467-81.
16. Cohen C, Shulman G, Budgeon LR. Endocervical and endometrial adenocarcinoma. An immunoperoxidase and histochemical study. *Am J Surg Pathol* 1982; 6:151-7.
17. DeLellis RA, Rule AH, Spiler I, Nathanson L, Tashjian AH, Wolfe H. Calcitonin and carcinoembryonic antigen as tumor markers in medullary thyroid carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1978; 70:585-94.
18. Carlei F, Polak JM. Antibodies to neuron-specific enolase for the delineation of the entire diffuse neuroendocrine system in health and disease. *Semin Diagn Pathol* 1984; 1:59-71.
19. Tahara E, Ito H, Nakagami K, Shimamoto F, Yamamoto M, Sumii K. Schirrous argyrophyl cell carcinoma of the stomach with multiple production of polypeptide hormones, amine, CEA, lysozyme, and HCG. *Cancer* 1982; 49:1904-15.
20. Kubo T, Watanabe H. Neoplastic argentaffin cells in gastric and intestinal carcinomas. *Cancer* 1971; 27:447-54.
21. Gatter KC, Dunhill MS, Van Muijen GNP, Mason DY. Human lung tumours may co-express different classes of intermediate filaments. *J Clin Pathol* 1986; 39:950-4.