

Primer Akciğer Kanserinde Histokimyasal ve Elektron Mikroskopik Sonuçların Çeşitliliği: 21 Olguluk Retrospektif Bir Çalışma

Diversity of Histochemical and Electron Microscopic Results in Primary Lung Cancer: A Retrospective Study of 21 Cases

Ranan Gülhan Aktaş¹, Ebru Demiralay², Şemsi Yıldız³

¹Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul

²Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji A.D., İstanbul.

³Başkent Üniversitesi İstanbul Hasktanesi, Patoloji A.D., İstanbul

İletişim: Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, Maltepe, İstanbul. E-posta: ranagulhan@gmail.com

ÖZET

Amaç: Akciğer adenokarsinom olguları; kanserler arasında son derece değişken bir grup oluşturmaktadır. Bu değişkenlik biyolojik ve klinik önemli farklılıklar ile ortaya çıkarmaktadır. Bu durum; patolojileri tanı aşamasında oldukça zorlamaktadır. Bu nedenle; adenokarsinoma vakalarının patolojik incelemeleri sırasında hastaların tanı ve tedavisi aşamasında daha çok bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; primer akciğer adenokarsinoma tanısı almış 21 hastanın patolojik örneklerinin histokimyasal ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Arşivdeki parafin bloklar histokimyasal ve ince yapısal özelliklerinin değerlendirilmesi amacı ile yeniden incelenmiştir. Periyodik asit-Schiff, musikarmin ve alsiyen mavisi ile hücrelerin glikojen ve farklı tiplerdeki musin içeriği araştırılmıştır. Doku örneklerinde saptanan alanlar yeniden işlemlendirilerek elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilmiştir.

Bulgular: Bu çalışma; 21 olgunun histokimyasal ve ince yapısal özelliklerini özetlemektedir. Adenokarsinoma hücrelerinin sekretuar granül yapısının ve sitoplazmik özelliklerinin büyük bir değişkenlik gösterebildiği görülmüştür.

Sonuçlar: Sonuçlar; sekretuar granüllerin içeriğinin histokimyasal ve elektron mikroskopik özelliklerinin çok değişken olabileceğini göstermiştir. Histokimyasal inceleme; tek başına hücrelerin salgısal özellikleri konusunda bilgi veremeyebilir. Bu aşamada; hücrelerin ince yapısal özelliklerinin elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilmesi oldukça faydalı olabilir. Akciğer adenokarsinoma vakalarının alt gruplara ayrılmasında; elektron mikroskopi çok önemli bilgiler sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, adenokarsinoma, histopatoloji, elektron mikroskopi.

ABSTRACT

Aim: Pulmonary adenocarcinomas represent an incredibly diverse group of human malignancies. This diversity has considerable biological and clinical significance. It poses many diagnostic challenges for pathologists. With this has come a need for more information from the pathological examination of adenocarcinoma samples in order to determine patient management.

The main aim of this study was to analyze histochemical and electron microscopic features of 21 primary human lung adenocarcinoma cases comparatively.

Materials And Methods: Archival blocks were re-analyzed to demonstrate their histochemical and ultrastructural features. Periodic acid-Schiff, mucicarmine and alcian blue were used for identification of the glycogen content and different types of mucins. Tissue specimens from the same regions were re-processed and re-examined under electron microscope.

Results: The study reports histochemical features and the ultrastructural characteristics of 21 primary lung adenocarcinoma cases. These results reveal that the secretory cells in adenocarcinoma specimens have tremendous diversity according to the structure of secretory granules and cytoplasmic content.

Conclusions: The data demonstrate not only the contents of the secretory granules according to their histochemical features, but also the differences in their electron microscopic appearance. Examination of the specimen at histochemical level may not be presenting its secretory nature and ultrastructural examination might be a useful tool for the observation of subcellular components. Electron microscopy might provide crucial information for subclassification of the lung adenocarcinoma cases.

Keywords: Lung, adenocarcinoma, histopathology, electron microscopy.

GİRİŞ

Akciğer tümörlerinin histopatolojik özelliklerine dayanan sınıflandırması; ışık mikroskopik düzeydeki özellikleri esas alınarak hazırlanmıştır. Patolojik incelemelerde gerek duyulduğunda immunohistokimyasal yöntemler uygulanmakta; elektron mikroskopik düzeyde incelemeler yapılmaktadır. Tamamı ile sadece bir histolojik paterne sahip hücreler içeren adenokarsinoma vakaları; tüm adenokarsinomlar içerisinde çok küçük bir kısmı oluşturmaktadır. Bu nedenle; adenokarsinom vakalarının son derece heterojen olması sonucunda alt sınıflamalarının yapılmasında büyük zorluklar çekilmektedir. Bu durum; histopatolojik incelemelerde oldukça önemli bir sorun teşkil etmektedir (1).

Hirsch ve ark. tarafından 1982-2007 yılları arasındaki tüm küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarını içeren araştırmalar incelenmiştir (2). Bu inceleme sonucunda; histolojik verilerin hastalığın tanısı ve hastanın prognozunu belirlemedeki önemi vurgulanmıştır. Gelecek çalışmalarla; histolojik tanı için kullanılacak parametrelerin daha da kesin ve tanımlayıcı olması gerektiği belirtilmiştir. Aynı zamanda; yapılacak çalışmaların histoloji subtiplemeleri oluşturulmasına destek olmasının da önemi vurgulanmıştır. Langer ve ark. tarafından hazırlanan bir başka derlemede de; kişiye özgü tedaviler düzenlenmesinde histolojik incelemenin önemi ortaya konulmuştur. Bu inceleme sonuçlarının bireysel tedavilerin güvenliği ve etkinliğinin saptanmasında kritik özellik taşıdığı vurgulanmıştır (3).

Histokimyasal teknikler farklı hastalıkların tanısında yaygın olarak başvurulan yöntemler arasındadır. Salgı yapan hücrelerin glikoprotein içeriğinin karakterizasyonunda başarı ile kullanılmaktadır. Hastalıkların patofizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde de bu bilgi çok değerlidir. Araştırmalarla normal ve patolojik durumlarda farklı tipteki epitelyal hücrelerde açığa çıkan değişiklikler ortaya konulmuştur. Hem histokimyasal hem de elektron mikroskopik düzeydeki bilimsel çalışmalarla farklı glikoprotein tiplerindeki değişim araştırılmıştır (4-12).

Histokimyasal bulgular; kanserli hastaya özgün gerek tanısız, gerekse prognoz açısından değerli veriler ortaya koyabilmektedir. Dokularda epitelyal tipteki hücrelerin mevcudiyeti invaziv adenokarsinoma tanısını desteklemektedir. Bağ dokuda hücre üretimi; non spesifik reaksiyonlarda artmakta; PAS'la boyanmamasına karşılık alsiyan mavisi ile boyanması ise değişen özellikler göstermektedir (13). Bu iki durumun birbirinden ayırt edilebilmesi çok önemlidir. Sülfatlı glikoproteinlerde azalma ve siyalomusinde artma kolon kanserlerinde malignansi öncesi değişikliklerin göstergesidir (13). Bu değişikliğin; neoplazi öncüsü olmaktan çok süregelen değişikliklerin sonucu olduğu da tartışılmaktadır (14).

Akciğerde salgı granüllerinin normal durumda ve kanserli hastalardaki ayırt edici özellikleri ile ilgili çok az bilgi vardır (15-18). Glikozaminoglikanların normal erişkin akciğerinden izole edilen endotel hücreleri tarafından salgılandığı bildirilmiştir (10). Glikozamin üretmeye devam eden endotel hücre

granülleri alsiyan mavisi ile pozitif boyanmaktadır. Ochiaive ark.; bronşial epitelyal hücre dizilerinde salgıda farklılaşma ve hücre tipinin tanımlanması üzerine araştırmalar yapmışlardır (16). St. George ve ark. ise trakeadaki submukozal bezlerin elektron mikroskopik özelliklerini ve salgı içeriğini araştırmıştır (18). Hoyt ve ark. İnsane akciğer tümörlerinde endokrin fenotipi belirlemede PAS- hematoksilen boyalarının kullanılabileceğini göstermişlerdir (19). Pelosi ve ark. tarafından yapılan bir başka araştırmada; iyi farklılaşmamış tümörlerde tanısız ve prognostik metodların geliştirilmesinin acil bir ihtiyaç olduğunu vurgulanmıştır (20). Kısıtlı miktardaki materyal ve çıkarılmayan lezyonlar bir diğer problemidir. Immunohistokimya ve moleküler düzeydeki ölçümler bu tür hastalarda çok önemli veriler sağlayabilir. Ocque ve ark. Da akciğer kanseri sınıflamasında histokimyasal ve immunohistokimyasal metodların önemini vurgulamıştır (21).

Tüm bu araştırmaların hemfikir olduğu konu; kesin histolojik tanıların yapılabilmesi için daha çok araştırmacının gerekli olduğudur. Histolojik subtiplemeyi sağlayacak bir analiz; hangi hastaların spesifik tedavi şekillerinden faydalanma ve histolojinin rolünü anlama açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada da; 21 akciğer adenokarsinoma vakasının histokimyasal özelliklerinin incelenmesi, hücresel düzeyde karbohidrat içeriklerinin belirlenmesi, adenokarsinoma hücrelerinin elektron mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Histokimyasal ve elektron mikroskopik özellikler arasındaki olası ilişki de incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada primer akciğer adenokarsinomu tanısı konulmuş 21 vaka yeniden incelenmiştir. Hastaların formaldehitte fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku örnekleri arşivden çıkarılarak periyodik asit-Schiff (PAS), alsiyan mavisi (pH:0.2) ve musikarmin ile boyanmıştır. Parafin bloklarının bu incelenen aynı bölgelerini yeniden işlemlendirilerek, %1 osmiyum-tetraoksit fikse edilmiş, Spurr'un resini içerisine gömülmüştür. Hazırlanan ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat boyaları ile boyanmıştır. Joel 100 CX elektron mikroskopu altında incelenmiştir.

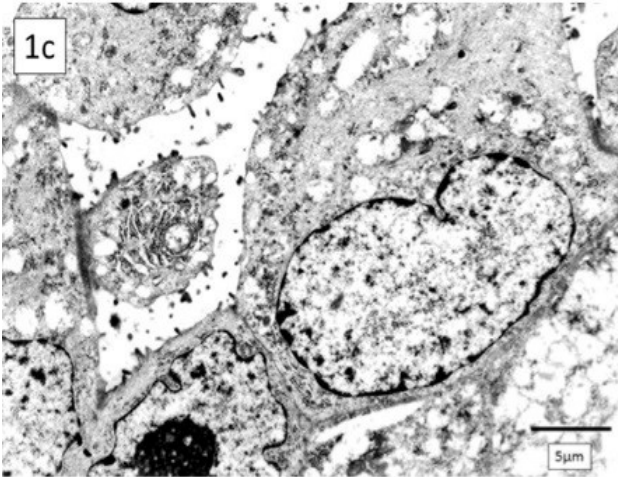
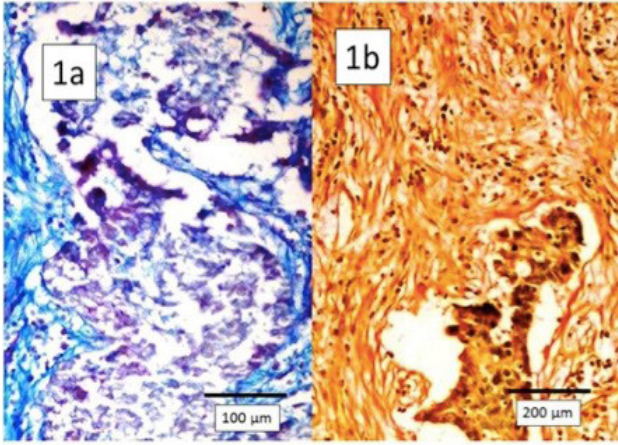
BULGULAR

21 vakadan 11'inde (%52.4) bahsedilen histokimyasal boyalardan en az biri ile reaksiyona rastlanmıştır. 7 örnek (%33.3) pAS pozitif bulunmuştur. Yine 7 örnek (%33.3) alsiyan mavisi ile boyanmıştır. 5 vaka ise (%23.8) musikarmin pozitif bulunmuştur. Vakalardan sadece birisi (4.8%) was tüm boyalarla reaksiyon göstermiştir. Tüm sonuçlar Tablo 1 'de özetlenmiştir.

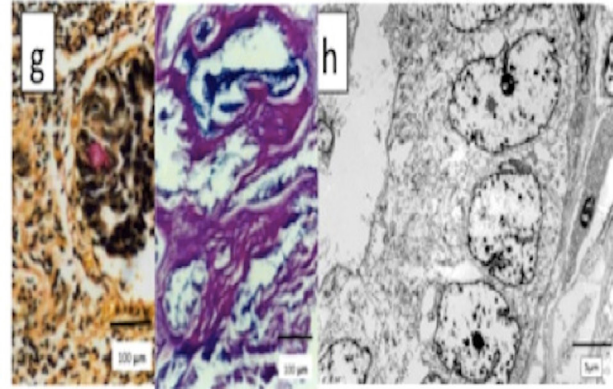
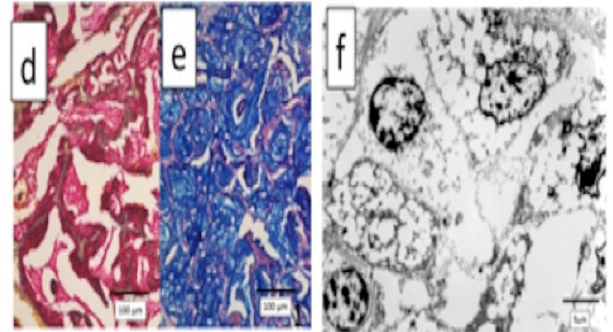
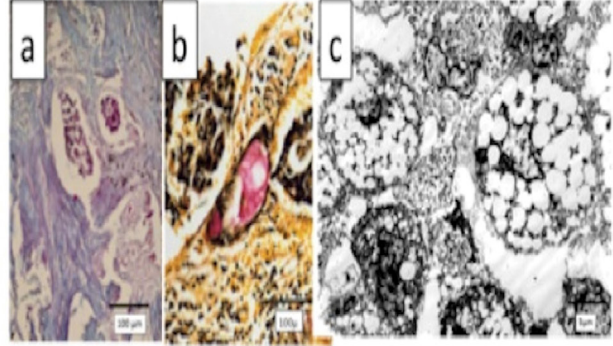
Histokimyasal Boyama Tekniği	Pozitif Vaka Sayısı (%)*	Negatif Vaka Sayısı (%)*
Sadece PAS	4/21(19.1)	17/21(80.9)
Sadece AB	0/21(0)	21/21(100)
Sadece MUCI-CARMINE	0/21(0)	21/21(100)
PAS+AB	2/21(9.5)	19/21(90.5)
PAS + MUCI-CARMINE	0/21(0)	21/21(100)
AB + MUCI-CARMINE	4/21(19.1)	17/21(80.9)
PAS+AB+MUCI-CARMINE**	1/21(4.8)	20/21(95.2)
PAS / AB / MUCI-CARMINE***	11/21(52.4)	10/21(47.6)

Tablo 1. Örneklerin boyanma paternleri. PAS: Periyodik asit-Schiff, AB: Alsiyan mavisi **Üç tekniğe de boyanan vaka sayısı özetlenmiştir. ***Üç tekniğe herhangi birisi ile boyanmış ve üç tekniğe hiçbiri ile boyanmamış vakalar özetlenmiştir.

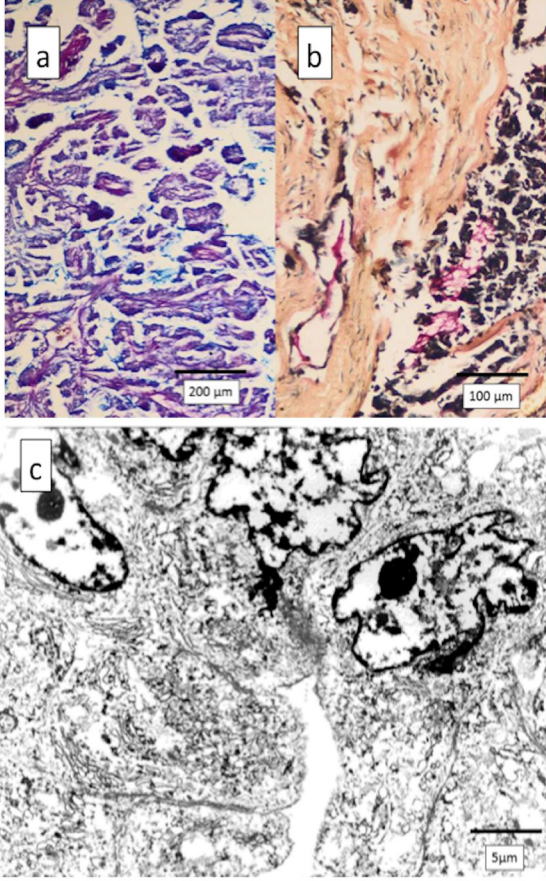
Histokimyasal boyanma paternlerine göre elektron mikroskopik incelemelerin karşılaştırmalı sonuçları aşağıda özetlenmiştir:



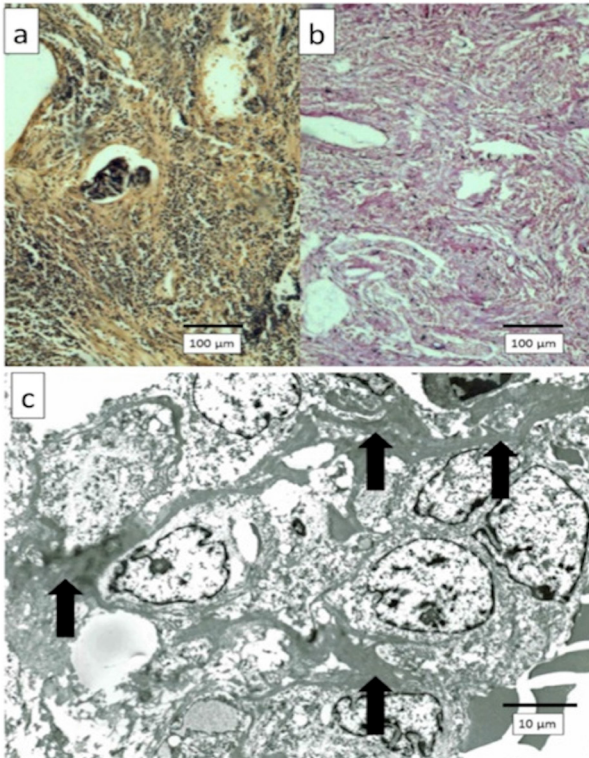
Resim 1. İki vaka (% 9.5) hem PAS, hem de alsiyan mavisi ile boyanmıştır. Bu vakalarda; hücrelerin ökromatik nükleusları, iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulumları, hücreleri çevreleyen mikrovillus formasyonu, hücreler arası sıkı bağlantılar dik-kati çekmiştir (Resim 1a, b, c).



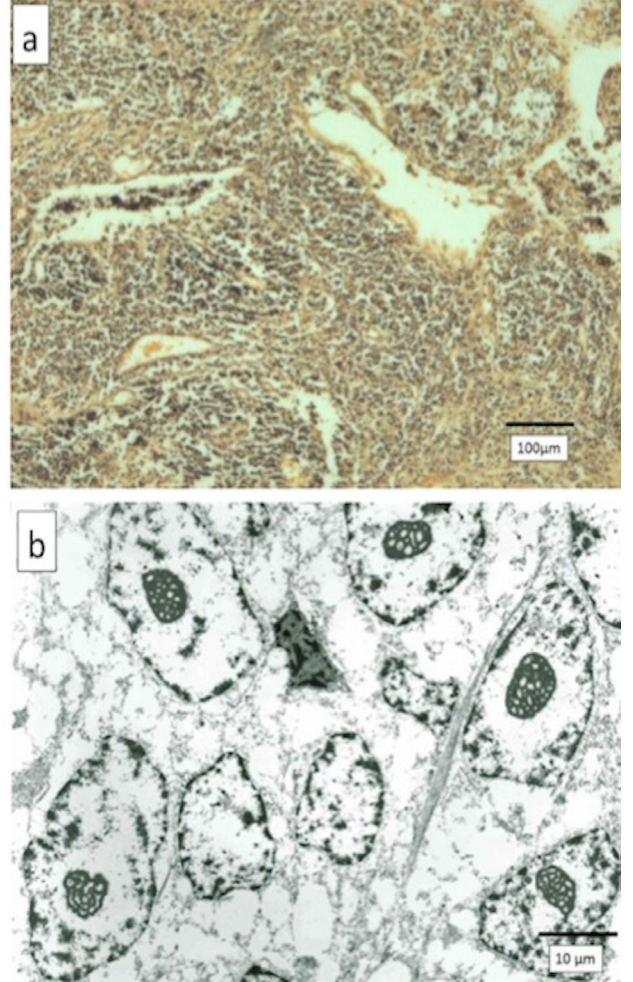
Resim 2. Dört vaka hem alsiyan mavisi, hem de musikarmin ile boyanmıştır. Burada hücrelerin elektron mikroskopik özelliklerinin son derece değişken olduğu görülmüştür (Resim 2 a,b, ve c). Bazı hücrelerin sitoplazmaları düşük electron densiteye sahip , sınırları belirgin lı granülleri ile doludur (Resim 2c). Diğerlerinde ise çok az sayıda ve daha küçük granüller gözlenmiştir (Resim 2 d,e, f). Bazı hücrelerin sitoplazması ile elektron yoğun granüllerin tam tersine boyanmamış granüllerle doludur (Resim 2 f). Bu iki vakanın tam tersine; üçüncü ve dördüncü vakalarda hücre sitoplazmasında sekretuar granule rastlanmamıştır (Resim 2 g ve h). Bu dört vakanın tek ortak özelliği; hücreler arası sıkı bağlantıların varlığıdır. Bu da; hücrelerin epitelyal orjinli olduğunun bir göstergesidir (Resim 2 c, f ve h).



Resim 3. Sadece bir vaka (%4.8) her üç boya ile de boyanmıştır. Bu vakada hücrelerin bir kısmı granül içerirken, salgı granülü içermeyen hücrelere de rastlanmıştır.



Resim 4. Dört hastadan alınan örnek (% 19.1) musikarmin ve alsyan mavi negatifti, PAS pozitif. Ultrastrüktürel incelemede çoğunlukla nispeten küçük sitoplazmik hacimleri olan hücreler izlenmiştir. (Şekil.4c). Sitoplazmada hiçbir vezikül / granül gözlenmemiştir. Bir vakada, elektron mikroskopisi muhtemelen periyodik asit-Schiff pozitif alanlarla korelasyon gösteren hücre dışı matriksin büyük bir birikimini gösterdi.



Resim 5. On örnek (%47.6%) bu boyama teknikleri ile negatif işaretlendi. Ancak; elektron mikroskopik incelemeler sırasında örneklerde salgı granüllerine rastlandı.

SONUÇ

Dokulardaki musin ya da glikoprotein tipini belirleyebilmek amacı ile bu çalışmada üç histokimyasal boyama tekniği kullanılmıştır: PAS, alsyan mavis (pH:0.2) ve musikarmin. PAS tekniği ile genel olarak hücre içindeki ve dokulardaki glikojen görüntülenir. Nötral musinler, siyalidaz labil musinler PAS ile pozitif boyanırlar. Zayıf sülfat bağları taşıyan musinlerin reaksiyonu değişir. Bağ dokudaki kuvvetli sülfat bağlarına sahip musinlerin ve hyaluronik ise reaksiyon vermez. Güçlü sülfat bağlarına sahip musinler 0.2 pH daki alsyan mavis ile reaksiyon verirler. Diğе musinler, özellikle hyaluronik asit, de güçlü şekilde boyanır. Güçlü sülfat bağlarına sahip musinlerin musikarminle reaksiyonu ise değişkendir.

Çalışmada yedi vaka PAS-positif (%33.3) boyanmıştır. Bu da; dokuların glikoprotein, nötralmusin ve siyalomusin içeriğinin bir göstergesidir. Bir diğer deyişle; dokularda bağ dokusu musinlerinin değil, epitelyal tipte muinlerin bulunduğunu ifade eder. Bu durum; adenokarsinoma vakalarının pitelyal orjinli olmasının bir diğer göstergesidir. Mariassy ve ark. (15) Clara hücreleri dışındaki tüm hücrelerin PAS pozitif olduğunu göstermiştir. Ochiai ve ark. (16) insane epitelya fetal bronkus hücrelerinin farklılaşmalarının uyarılarak Clara hücrelerine dönüşebildiğini göstermiştir. Bu PAS la çok güçlü bir şekilde boyanmışlardır. Alsiyan mavisini ile boyanma ise zayıf. Bir diğer araştırmalarında da insane orjinli bronkusa ait bir hücre dizisinin PAS-positif ve alsiyan mavisini negatif olduğunu göstermişlerdir (17). Bu nedenle; PAS pozitifliği tümöral hücrelerin Clara hücresi olmadığını destekleyen bir ipucu olarak kullanılabilir.

Alsiyan mavisini ve musikarminle boyanmanın birlikte pozitif olması (4/21(%19.1)); beraberinde PAS pozitifliği de varsa (1/21(%4.8)); müköz glikoproteinlerin güçlü ya da zayıf sülfatlı bağlara sahip olduğunun, ortamda siyalomusinlerin ve hiyaluronik asitin daha az bulunduğunun göstergesidir.

11 vaka (%52.) bu boyalardan en az birisi ile boyanmıştır. Ancak, 10 vaka (% 47.6%) tamamı ile negatiftir. Bu da adenokarsinoma vakalarının oldukça büyük bir kısmının glikoprotein içermediğini, musinleri sentezleyip salgılamadıklarını düşündürmektedir.

Elektron mikroskopik incelemeler sırasında gözlenen iyi gelişmiş endoplazmik retikulum,ökromatik çekirdekler, belirgin çekirdekçikler, hücre zarında microvillus formasyonu ; bu hücrelerin sekretuar özelliklerini gösteren ince yapısal bulgularlardır. Hücreler arasında gözlenen sıkı bapçlantılar da; vakaların epidermal orjininin göstergesidir.

Sekretuar hücrelerin sitoplazmik karakterlerinin son derece değişken olabileceği görülmüştür. Histokimyasal boyanma özellikleri ile ince yapısal özellikleri arasında kuvvetli bir ilişkiyi gösterecek herhangi bir bulgu saptanamamıştır. Bazı vakalar histokimyasal pozitif olarak gözlenirken, hücrelerin sitoplazmasında elektron mikroskopik düzeyde sekretuar granüller gözlenmemiştir. Çalışmada; histokimyasal boyama ile incelenen bölgelerle elektron mikroskop altında incelenen bölgelerin aynı alanlardan seçilmesine özellikle dikkat edilmiştir. Bu da; elektron mikroskopik incelemenin histokimyasal pozitif boyanma olan yerin dışındaki herhangi bir bölgeden olma olasılığını ortadan kaldırmıştır. Bu sonuçlar; bazı vakalarda sekresyonun granül oluşturmadan direk olarak salgılandığını göstermektedir. Bunun tam tersine; bazı örneklerde histokimyasal olarak boyanma saptanamazken elektron mikroskopik incelemelerinde hücrelerde sekretuar granüllere rastlanmıştır. Bu durum; kullanılan histokimyasal tekniklerle görüntülenemeyen lipoproteinlerin bu granüllerde bulunduğunu düşündürmüştür.

Tüm vakalar birlikte değerlendirildiğinde bir kez daha gerek histokimyasal, gerekse elektron mikroskopik özellikleri

açısından akciğer adenokarsinoma vakalarının ne kadar değişik olabileceği ortaya çıkmaktadır.

Adenokarsinoma vakalarının subtiplerinin sınıflandırılması örneklerin histolojik özelliklerine dayanmaktadır ve bu sınıflama özellikle prognoz belirlenmesinde kullanılmaktadır (22, 23). Bilim insanları, cerrahlar ve patoloğların bir kısmı bu alt sınıflamanın yeterli olmadığını düşünmektedirler , ek patolojik incelemelerle alt sınıflamanın yeniden düzenlenmesi gerektiğine inanmaktadırlar (24).

Bizim araştırmamız, elektron mikroskopik verilerin tanıda kısıtlı düzeyde yardımcı olabileceğini düşündürmüştür. İmmunohistokimyasal incelemeler çok önemli sonuçlar verebilmektedir. Dominguea-Malagon ve ark. Elektron mikroskopik incelemenin ayırıcı tanıdaki önemini vurgulamışlardır gnosıs (25). Tanıyı doğrulamak için özel vakalarda elektron mikroskopinin çok önemli desteği olacağını bildirmişlerdir.

Bu çalışma; histokimyasal metodların; akciğer kanserli hastaların örneklerini incelemede kolay, ucuz ve faydalı teknikler olduğunu göstermektedir. İmmunohistokimyasal yöntemlerin değeri ise son araştırmalarda elde edilen moleküler bilgiler neticesinde daha da artmıştır. Tümörün sınıflandırılmasında ciddi sıkıntılar yaşandığı durumlarda dikkatli ve uygun bölgeden yapılacak bir elektron mikroskopik inceleme çok faydalı olabilir. Histokimyasal ve elektron mikroskopik sonuçların birlikte değerlendirilerek yorumlanması her zaman kolay olmayabilir. Ancak bu tür çalışmaların; akciğer kanser alt tiplerinin uygun bir şekilde tanımlanabilmesi için önemi çok büyüktür.

TEŞEKKÜR

Öğrencimiz Elif Soysal'a makale hazırlanması sırasındaki destekleri nedeniyle teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Kerr KM. Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. Review 2009; 54: 12–27
2. Hirsch FR, Spreafico A, Novello S, Wood MD, Simms L, Papotti M. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review. *J Thorac Oncol* 2008; 3(12):1468-1481.
3. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC. The Evolving Role of Histology in the Management of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28 (36): 5311-5320.
4. Berg KK, Scheithauer, BW, Felix I, et al. Pituitary adenomas that produce adrenocorticotrophic hormone and alpha-subunit: clinicopathological, immunohistochemical, ultrastructural, and immunoelectron microscopic studies in nine cases. *Neurosurgery* 1990; 6 (3): 397-403.
5. Draper CE, Adeghate E, Lawrence PA, Pallot DJ, Garner A, Singh J.:Age related changes in morphology and secretory responses of male rat lacrimal gland. *J Auton Nerv Syst* 1998; 69 (2-3): 173-183.
6. Ikeda R, Aiyama S. Developmental changes in mucous cells of the early postnatal rat parotid gland: an ultrastructural and histochemical study. *Arch Histol Cytol* 1997; 60 (2): 185-93.
7. Kuo H, Ingram DK, Walker DC, Tian M, Hengemihle JM, Jucker M. Similarities in the age related hippocampal deposition of periodic acid-schiff-positive granules in the senescence-accelerated mouse P8 and C57BL/6 mouse strains. *Neuroscience* 1996;; 74 (3): 733-740.
8. Madrid JF, Hernandez F, Bellesta J. Characterization of glycoproteins in the epithelial cells of human and other mammalian gallbladder. A review. *Microsc Res Tech* 1997; 38 (6): 616-630.
9. Mitsuno S, Takahashi M, Gondo T, et al. Immunohistochemical, conventional and immunoelectron microscopic characteristics of periodic acid-Schiff-positive granules in the mouse brain. *Acta Neuropathol* 1999;; 98 (1): 31-38.
10. Parshley MS, Cerreta JM, Mandl I, Fierer JA, Turino GM. Characteristics of a clone of endothelial cells derived from a line of normal adult rat lung cells. *In Vitro* 1979; 5 (9): 709-722.
11. Suzuki S, Mifune H, Nishida T, et al. Fine structure of the parotid gland in three shrew (*Tupaia glis*). *Exp Anim* 1995; 44 (4): 267-273.
12. Wattel W, Geuze JJ, de Rooij DG.: Ultrastructural and carbohydrate histochemical studies on the differentiation and renewal of mucous cells in the rat gastric fundus. *Cell Tissue Res* 1997; 176 (4): 445-462.
13. Bancroft JD. , Cook HC. Carbohydrates. In *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. Edited by Bancroft JD and Cook HC, Churchill Livingstone; 1994; 131-173.
14. Filipe MI. The value of a study of the mucosubstances in rectal biopsies from patients with carcinoma of the rectum and lower sigmoid in the diagnosis of premalignant mucosa. *J Clin Pathol* 1972; 25(2):123-128.
15. Mariassy AT, St George JA, Nishio SJ, Plopper CG. Tracheobronchial epithelium of the sheep: III. Carbohydrate histochemical and cytochemical characterization of secretory epithelial cells. *Anat Rec* 1988; 221 (1): 540-549.
16. Ochiai A, Emura M, Riebe-Imre M, et al. Secretory differentiation and cell type identification of a human fetal bronchial epithelial cell line (HFBE). *Virchows Arch B Cell Pathol Inc Mol Pathol* 1991; 61 (3): 217-226.
17. Ochiai A, Emura M, Mohr U, Tahara E, Dungworth DL. Induction and characterization of secretory differentiation in human fetalbronchial epithelial cell line (HFBE) cultured on collagen gel in growth hormone and vitamin-A supplemented medium. *Exp Pathol* 1991; 41 (3): 157-168.
18. St George JA, Nishio SJ, Cranz DL, Plopper CG. Carbohydrate cytochemistry of rhesus monkey tracheal submucosal glands. *Anat Record* 1986; 216 (1): 60-67.
19. Hoyt RF Jr, Sorokin SP, McDowell EM, Trump BF. Periodic-acid-Schiff-lead hemaoylin as a marker for the endocrine phenotype in human lung tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110(10): 943-951.
20. Pelosi G, Sonzogni A, Viale G. The classification of lung carcinoma: time to change the morphology-based approach? *Int J Surg Pathol*, 2010; 18:161-172.
21. Ocque R, Tochigi N, Ohori NP, Dacic S. Usefulness of Immunohistochemical and Histochemical Studies in the Classification of Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma in Cytologic Specimens. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 81-87.