

Ewa Szczepulska-Wójcik¹, Renata Langfort¹, Kazimierz Roszkowski-Śliż²

¹Zakład Patomorfologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
 P.o. kierownika: dr n. med. R. Langfort

²III Klinika Chorób Płuc Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
 Kierownik: prof. dr hab. med. K. Roszkowski-Śliż

Ocena przydatności reakcji immunohistochemicznych w różnicowaniu międzybłoniaka złośliwego opłucnej z rakami niedrobnokomórkowymi naciekającymi opłucną i odczynowym rozrostem międzybłonia

A comparative evaluation of immunohistochemical markers for the differential diagnosis between malignant mesothelioma, non-small cell carcinoma involving the pleura, and benign reactive mesothelial cell proliferation

Abstract

Introduction: Histopathological diagnosis of malignant mesothelioma (MM) and differentiating it from tumors infiltrating the pleura is very difficult. Distinguishing benign reactive mesothelial cell proliferation from MM also presents problems.

The objective of this study was to evaluate the significance of selected immunohistochemical stains in differentiating MM from non-small cell lung cancers infiltrating the pleura and from benign reactive mesothelial cell proliferation.

Material and methods: The material encompassed 86 cases of MM, 54 cases of NSCLC infiltrating the pleura, and 43 cases of benign reactive mesothelial cell proliferation. The MM cases were reclassified according to the WHO criteria (2004): epithelioid, 61 cases (71%), including well-differentiated papillomatous, 3 cases; sarcomatous, 6 cases (6.8%); fibrous, 4 cases (4.7%); biphasic, 15 cases (17.5%).

A panel of immunohistochemical stains was used in this study. It included broad-spectrum antibodies to cytokeratins (CKAE1/AE3, CKMN116), vimentin, epithelial membrane antigen (EMA), mesothelial cells (HBME1, CK5/6, calretinin), adenocarcinoma cells (BerEp4, B72.3, CEA, TTF1), antibodies enabling the assessment of proliferation (Mib1) and cell-cycle regulating proteins (p53).

Results: Coexpression of cytokeratins and vimentin was found in 63.9% of MM cases and cell-membrane reactions with EMA were seen in 58.9%. Positive staining for HBME1, CK5/6, calretinin, BerEp4, B72.3, CEA and p53 was obtained in 76.7%, 51.2%, 66.7%, 1.2%, 6.2%, 1.2% and 51% of the cases, respectively. None of the MM cases stained for TTF1. *MM by WHO subgroups:* Coexpression of cytokeratins and vimentin occurred in 55.7% cases of epithelioid MM, 93.3% of biphasic MM, 66.6% of sarcomatous MM, and in 100% of fibrous MM cases. Positive staining for HBME1, CK5/6, and calretinin was seen only in the epithelioid and mixed subtypes of MM; the respective percentages of positive reactions were: HBME1, 90.2% and 73.3%; CK5/6 58.2% and 53.3%; calretinin, 72% and 75%. *Non-small cell lung cancers infiltrating the pleura:* Coexpression of cytokeratin and vimentin was found in 17.6% of the cases, positive staining of membranes for EMA, in 13% cases. Positive staining for HBME1 was observed in 22.6% of the cases, for CK5/6, in 9.3%, for calretinin, in 2%, for BerEp4, in 72.2%, for B72.3, in 64.1%, for CEA, in 58.5%, and for TTF1, in 43.8%. *Benign reactive mesothelial cell proliferation:* Protein p53 was present in 9.3% of cases, whereas no positive staining for EMA was found. *Differentiation of MM from non-small cell carcinomas:* Among the antibodies used in the study, anti-HBME1 had the highest sensitivity (76.7%) but lowest specificity (77.4%). Staining for calretinin showed high specificity (99.8%), as did CEA and TTF1 (98.8% and 100%), with moderate sensitivity (66.7%, 58.5% and 43.8%, respectively). BerEp4 showed the highest sensitivity (72.2%) and specificity (98.8%).

Adres do korespondencji: Ewa Szczepulska-Wójcik, Zakład Patomorfologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa, tel.: (022) 431 22 57; faks: (022) 431 24 27, e-mail: e.szczepulska@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 6.12.2006 r.
 Copyright © 2007 Via Medica
 ISSN 0867-7077

Conclusion: In diagnosing mesothelioma it is necessary to use a panel of immunohistochemical stains, which should contain antibodies to markers for adenocarcinoma and mesothelioma. Due to the high costs of such a study, a two-stage method is advantageous. The best combination of sensitivity and specificity was found for BerEp4, CEA, and TTF1 and for calretinin and HBME1. In the diagnosis of spindle-cell pleural tumors and the fibrous form of MM and benign reactive mesothelial cell proliferation, markers of mesothelial cells are noncontributory. Immunohistochemical staining fails to identify a reactive process, but a diffuse, positive stain for EMA and the presence of protein p53 support the diagnosis of MM.

Key words: malignant mesothelioma, pleura, non-small cell carcinoma, mesothelial proliferation, immunohistochemical stains
Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 57–69

Streszczenie

Wstęp: Rozpoznanie histopatologiczne międzybłoniaka złośliwego (MM), różnicowanie z nowotworami naciekającymi opłucną nastręcza duże trudności. Również odróżnienie rozrostu odczynowego mezotelium od MM nie jest łatwe. Celem pracy była ocena przydatności wybranych przeciwciał immunohistochemicznych w różnicowaniu MM z rakami niedrobnokomórkowymi naciekającymi opłucną i rozrostem odczynowym międzybłonka.

Materiał i metody: Materiał obejmował 86 przypadków międzybłoniaka złośliwego opłucnej (MM), 54 przypadki raków niedrobnokomórkowych naciekających opłucną oraz grupę rozrostów odczynowych międzybłonka (43 przypadki). Przypadki MM sklasyfikowano według klasyfikacji WHO z 2004 roku: nabłonkowatokomórkowy — 61 przypadków (71%), w tym brodawkowaty dobrze zróżnicowany — 3 przypadki, mięsakowy — 6 przypadków (6,8%), włóknisty — 4 przypadki (4,7%), mieszany — 15 przypadków (17,5%).

W badaniach wykorzystano panel przeciwciał immunohistochemicznych obejmujący cytokeratyny o szerokim spektrum (CKAE1/AE3, CKMN116), wimentynę, antygen błonowo-nabłonkowy (EMA), przeciwko komórkom międzybłonka (HBME1, CK 5/6, kalretynina), przeciwko komórkom raka gruczołowego (BerEp4, B72.3, CEA, TTF1), przeciwciała pozwalające na ocenę proliferacji (MIB1) oraz białko regulujące cykl komórkowy (p53).

Wyniki: MM — koekspresję cytokeratyny i wimentyny uzyskano w 63,9% przypadków, reakcję błonową z przeciwciałem EMA obserwowano w 58,9% przypadków. Dodatkowo reakcje z przeciwciałami HBME1, CK5/6, kalretyniną, BerEp4, T73.2, CEA i p53 uzyskano odpowiednio w 76,7%, 51,2%, 66,7%, 1,2%, 6,2%, 1,2% i 51% przypadków. Reakcje z przeciwciałem TTF1 we wszystkich przypadkach MM były ujemne. MM według podtypów WHO — koekspresja cytokeratyny i wimentyny występowała w 55,7% MM nabłonkowatokomórkowego, 93,3% MM mieszanego, w 66% MM mięsakowego oraz w 100% typu włóknistego MM. Dodatkowo reakcje z przeciwciałami HBME1, CK5/6, kalretyniną uzyskano tylko w postaciach nabłonkowatokomórkowej i mieszanej MM; dla obu tych typów odpowiednio: HBME1 — 90,2% i 73,3%, CK5/6 — 58,2% i 53,3%, kalretynina — 72% i 75%. Raki niedrobnokomórkowe naciekające opłucną — koekspresja cytokeratyny i wimentyny występowała w 17,6% przypadków, reakcja błonowa z przeciwciałem EMA — w 13% przypadków. Dodatkowo reakcje obserwowano dla przeciwciała HBME1 w 22,6% przypadków, CK5/6 w 9,3% przypadków, kalretyniny w 2% przypadków, BerEp4 w 72,2% przypadków, B72.3 w 64,1% przypadków, CEA w 58,5% przypadków i TTF1 w 43,8% przypadków. Odczynowy rozrost międzybłonka — obecność białka p53 występowała w 9,3% przypadków, zaś reakcja błonowa z przeciwciałem EMA była negatywna w 100%. Różnicowanie między MM a rakami niedrobnokomórkowymi — spośród przedstawionych przeciwciał największą czułość (76,7%) wykazało HBME1, przy jednocześnie najniższej swoistości (77,4%). Wysoką swoistość wykazywała kalretynina (99,8%) oraz CEA i TTF1 (98,8% i 100%), przy średniej czułości (odpowiednio 66,7%, 58,5% i 43,8%). Najwyższą czułością (72,2%) i swoistością (98,8%) charakteryzowało się BerEp4.

Wnioski: W rozpoznawaniu międzybłoniaka konieczne jest stosowanie panelu przeciwciał immunohistochemicznych, który powinien zawierać markery raka gruczołowego i międzybłonka. Ze względu na duże koszty takiego badania, korzystne jest wykonywanie badań w dwóch turach. Najkorzystniejszą kombinację czułości i swoistości wykazują BerEp4, CEA i TTF1 oraz kalretynina i HBME1. W rozpoznawaniu nowotworów wrzecionowatokomórkowych opłucnej oraz postaci włóknistej MM i odczynowego włóknienia opłucnej (*pleuritis fibrosa*) nie mają zastosowania markery komórek międzybłonka. Barwienia immunohistochemiczne nie pozwalają na jednoznaczne rozpoznanie procesu odczynowego, jednak w przypadku uzyskania rozlanej, dodatniej reakcji błonowej z przeciwciałem EMA i wykazaniu obecności białka p53 przemawiają za rozpoznaniem MM.

Słowa kluczowe: międzybłoniak złośliwy, opłucna, rak niedrobnokomórkowy, rozrost międzybłonka, barwienia immunohistochemiczne

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 57–69

Wstęp

Międzybłoniak złośliwy (MM, *mesothelioma malignum*) jest rzadkim nowotworem wywodzącym się z komórek wyściółki opłucnej, osierdzia i otrzewnej. Najczęściej rozwija się w opłucnej i stanowi 1–3% wszystkich złośliwych guzów o tej lokalizacji [1, 2].

W ostatnich latach częstość jego występowania wyraźnie wzrasta. Najprawdopodobniej wiąże się to z wieloletnim stosowaniem w przemyśle azbestu, uznanego za najistotniejszy czynnik patogenetyczny w rozwoju choroby.

Międzybłoniak złośliwy jest nowotworem o złym rokowaniu [2, 3]. Większość pacjentów umiera w pierwszym roku od rozpoznania choroby.

Średnie przeżycie wynosi 6–18 miesięcy, chociaż zdarzają się również przypadki długoletnich przeżyć [1, 4]. Istotne znaczenie ma wykluczenie innych nowotworów zajmujących opłucną, charakteryzujących się lepszym rokowaniem, a przede wszystkim dających większe i skuteczniejsze możliwości leczenia.

Rozpoznanie MM wymaga diagnostyki histopatologicznej, często bardzo trudnej, co wynika z różnorodności obrazów morfologicznych MM, które mogą przypominać inne procesy nowotworowe i nienowotworowe opłucnej. Z kolei wtórne zajęcie opłucnej przez raki pierwotne płuca i przerzutowe może imitować MM. Również odróżnienie odczynowego rozrostu mezotelium od nowotworowego nie zawsze jest łatwe. W związku z tym, mimo ustalenia ścisłych kryteriów morfologicznych rozpoznawania MM, zwykle niezbędne jest wykonanie barwień immunohistochemicznych pobranych wycinków, najlepiej drogą wideotorakoskopii. Pozwalają one na ustalenie właściwego rozpoznania w 70–90% przypadków. Natomiast badania cytologiczne płynu z jamy opłucnowej i wycinków z biopsji igłowej opłucnej nie zawsze umożliwiają ostateczną diagnozę, ze względu na ograniczone możliwości wykonania pełnej diagnostyki immunohistochemicznej.

Celem pracy była ocena przydatności reakcji immunohistochemicznych w różnicowaniu MM z rakami naciekającymi opłucną oraz MM z rozrostem odczynowym międzybłonia na podstawie wybranych przeciwciał monoklonalnych.

Materiał

Materiał obejmował 86 przypadków międzybłoniaka złośliwego opłucnej (MM) rozpoznanych w latach 1991–2003 w Zakładzie Patomorfologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, 54 przypadki raków niedrobnokomórkowych naciekających opłucną oraz 43 przypadki rozrostów odczynowych międzybłonia.

Grupę 86 przypadków MM stanowiły 32 kobiety i 54 mężczyzn. Mediana wieku dla całej grupy wynosiła 56 lat, dla kobiet — 52 lata, dla mężczyzn — 57 lat. Materiał do badania pochodził z biopsji opłucnej, torakoskopii, torakotomii, w trakcie których pobierano wycinki (19 przyp.), dekompletacji (51 przyp.) lub pneumonektomii (15 przyp.).

Wśród 54 przypadków raków niedrobnokomórkowych naciekających opłucną było 17 kobiet i 37 mężczyzn. Mediana wieku całej grupy wynosiła 64 lata, kobiet — 66 lat, natomiast mężczyzn — 57 lat. W badanej grupie 41 guzów stanowił rak gruczołowy płuca, 11 przypadków — rak niedrobnokomórkowy bez oceny podtypu, 2 przypadki — przerzuty raka spoza płuca.

Grupę 43 przypadków odczynowego rozrostu międzybłonia stanowiło 15 kobiet i 28 mężczyzn. Wycinki do badania mikroskopowego pobierano z powodu utrzymującego się płynu w opłucnej (5 przyp.), odmy (25 przyp.), rozedmy (3 przyp.), nowotworu płuca (7 przyp.), z innych powodów (3 przyp.).

Przypadki MM sklasyfikowano według klasyfikacji WHO z 2004 roku:

- nabłonkowatokomórkowy — 61 przypadków (71%), w tym brodawkowaty dobrze zróżnicowany — 3 przypadki;
- mięsakowy — 6 przypadków (6,8%);
- włóknisty — 4 przypadki (4,7%);
- mieszany — 15 przypadków (17,5%).

Metody

W zbadanych przypadkach MM i raków naciekających opłucną zastosowano panel przeciwciał immunohistochemicznych obejmujący trzy grupy przeciwciał:

- przeciwko filamentom pośrednim (cytokeratyna o szerokim spektrum: CKAE1/AE3, CKMNF116, wimentyna) oraz przeciwko antygenom błony komórkowej komórek nabłonkowych (EMA);
- przeciwko komórkom międzybłonia (HBME1, CK5/6, kalretynina) — markery dodatnie w MM;
- przeciwko komórkom raka gruczołowego (BerEp4, B72.3, CEA, TTF1) — markery ujemne w MM;
- przeciwciała pozwalające na ocenę białek regulujących cykl komórkowy (p53).

Reakcje immunohistochemiczne

Do badania immunohistochemicznego wybierano bloczek parafinowy zawierający dostateczną ilość reprezentatywnego materiału: bez zmian martwiczych, w postaciach mieszanych MM zawierających różne utkania.

Reakcje immunohistochemiczne z wszystkimi przeciwciałami wykonywano ściśle według zaleceń producenta. Stosowane rozcieńczenia i metodę odsłaniania antygenów dla poszczególnych przeciwciał przedstawiono w tabeli 1. Kontrolę dodatnią dla przeciwciał: cytokeratyn o szerokim spektrum, wimentyny, EMA, TTF1, HBME1, kalretyniny i CK5/6 stanowiły występujące w preparatach prawidłowe tkanki (komórki międzybłonia, utkanie gruczołowe płuca, podścielisko łącznotkankowe). Kontrolę dodatnią dla przeciwciał BerEp4, B72.3, CEA stanowiły wycinki zawierające utkanie raka gruczołowego oraz dla białka p53 — nisko zróżnicowane postaci MM. Kontrolę negatywną dla wszystkich przeciwciał stanowiły skrawki bar-

Tabela 1. Warunki reakcji immunohistochemicznych w odniesieniu do zastosowanych przeciwciał

Table 1. Details of immunohistochemical reactions according to different antibodies

Przeciwciała <i>Antibodies</i>	Producent <i>Producer</i>	Typ przeciwciała <i>Type of antibody</i>	Odstanianie antygenów <i>Antigen retrieval</i>	Rozcieńczenie <i>Dilution</i>
Cytokeratyna AE1/AE3 <i>Cytokeratin AE1/AE3</i>	DAKO	Koktail dwóch monoklonalnych przeciwciał AE1 i AE3 <i>Coctail of two monoclonal antibodies AE1 and AE3</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:50
Cytokeratyna MNF116 <i>Cytokeratin MNF116</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:100
Wimentyna <i>Vimentin</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:100
HBME-1 <i>HBME-1</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Nie wymaga <i>Unnecessary</i>	1:50
Cytokeratyna 5/6 <i>Cytokeratin 5/6</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:50
Kalretynina <i>Calretinin</i>	Novocastra	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:100
Ber-EP4 <i>Ber-EP4</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:50
B72.3 <i>B72.3</i>	Bio-Genex	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Nie wymaga <i>Unnecessary</i>	1:100
CEA (antygen rakowo-łzodowy) <i>CEA (carcinoembryonic antigen)</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:30
TTF1 <i>TTF1</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:200
EMA (antygen błonowy komórek nabłonkowych) <i>EMA (epithelial membrane antigen)</i>	DAKO	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:50
Białko p53 <i>p53 protein</i>	Novocastra	Przeciwciało monoklonalne <i>Monoclonal antibody</i>	Kuchenka mikrofalowa <i>Microwave</i>	1:50

wione według tej samej metody z zastosowaniem surowicy cielęcej zamiast właściwego przeciwciała.

Ocena reakcji immunohistochemicznych

Ekspresję antygenów oceniano w mikroskopie świetlnym, uznając za dodatni wynik obecność brązowego zabarwienia we właściwej dla danego antygeny lokalizacji (reakcja błonowa, jądrowa lub cytoplazmatyczna). Dla przeciwciał TTF1 i kalretyniny za reakcję dodatnią uznawano tylko zabarwienie jądrowe, natomiast w przypadku HBME1 i BerEp4 — tylko odczyn błonowy.

W reakcji z przeciwciałem EMA oceniano sposób zabarwienia komórki — cytoplazmatyczny (c) lub błonowy (b).

Do analizy wyników użyto testów statystycznych Pearsona χ^2 (Pchi) i największego prawdopodobieństwa chi-kwadrat (MLchi), Kołmogorowa-

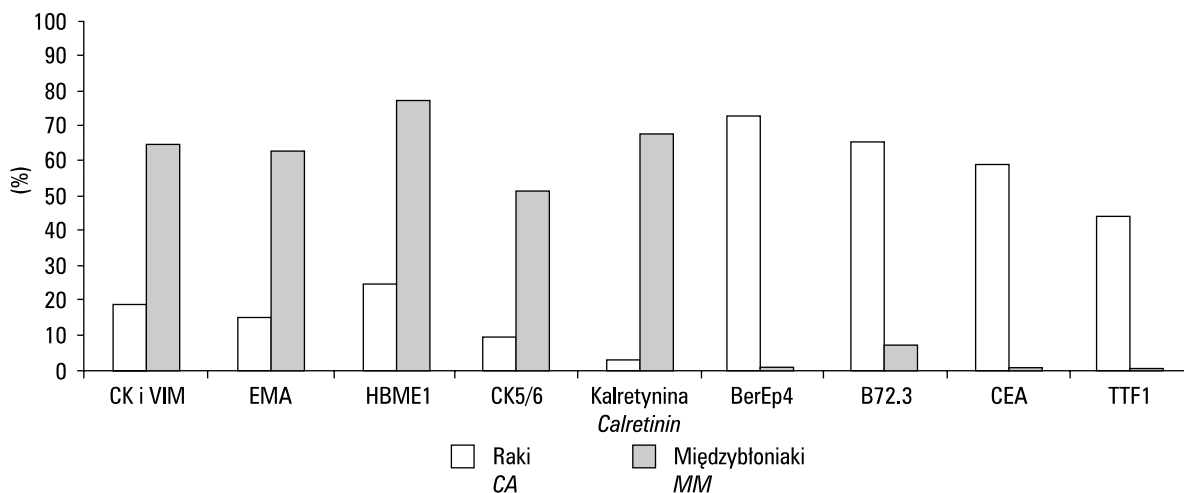
-Smirnowa (K-S) oraz Shapiro-Wilka (S-W), a także metod statystycznych, analizy dyskryminacyjnej oraz regresji logistycznej.

Czułość badanych markerów przedstawiono jako prawdopodobieństwo dodatniej reakcji, jeżeli guz należy do wybranej kategorii. Natomiast swoistość oceniano jako prawdopodobieństwo wyniku ujemnego, jeżeli guz nie należy do wybranej kategorii.

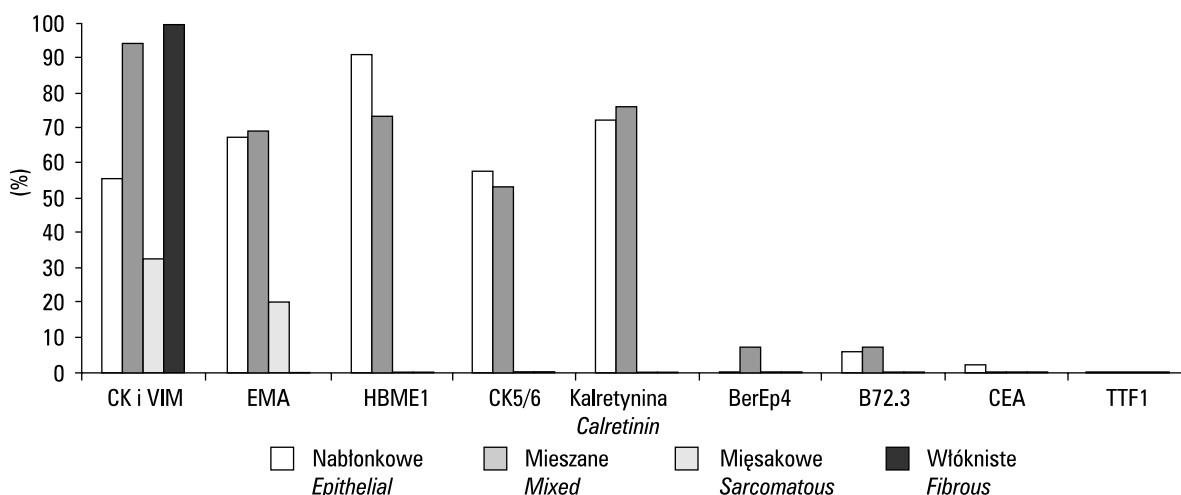
Wyniki

Międzybłoniak złośliwy (MM) (ryc. 1)

Spośród 86 przebadanych MM ekspresję cytokeratyny stwierdzono w 98% przypadków, wimentyny w 69,8%, a koekspresję cytokeratyny i wimentyny uzyskano w 63,9% przypadków, reakcję błonową z przeciwciałem EMA stwierdzono zaś w 58,9% przypadków. Dodatkowo reakcje



Rycina 1. Wyniki reakcji immunohistochemicznych w grupach międzybłoniaków (MM) i raków niedrobnokomórkowych (CA) naciekających opłucną
Figure 1. Results of immunohistochemical staining in the groups of malignant mesothelioma and non-small cell carcinomas infiltrating the pleura



Rycina 2. Wyniki reakcji immunohistochemicznych w poszczególnych podgrupach międzybłoniaków
Figure 2. Immunohistochemical expression of markers by histological subtype of malignant mesothelioma

z przeciwciałami HBME1, CK5/6 i kalretyniną wystąpiły odpowiednio w 76,7%, 51,2% i 66,7% przypadków. Pozytywne wyniki z markerami raka gruczołowego — BerEp4, B72.3 i CEA — uzyskano w 1,2%, 6,2% i 1,2% przypadków. Natomiast z przeciwciałem TTF1 reakcje we wszystkich przypadkach MM były ujemne. Obecność białka p53 wykazano w 51% MM.

Międzybłoniak złośliwy — poszczególne typy według WHO (ryc. 2)

Koekspresję cytokeratyny i wimentyny stwierdzono w 55,7% MM nabłonkowatokomórkowego, 93,3% MM mieszanego, w 2/3 przypadków MM mięsakowego oraz we wszystkich przypadkach MM typu włóknistego. Dodatnie reakcje z marke-

rami komórek mezotelialnych uzyskano w postaciach nabłonkowatokomórkowej i mieszanej MM, dla obu tych typów odpowiednio: HBME1 — 90,2% i 73,3%, CK5/6 — 58,2% i 53,3%, kalretynina — 72% i 75%. Natomiast we wszystkich przypadkach MM mięsakowego i włóknistego reakcje z przeciwciałami z grupy dodatnich w międzybłoniakach oraz grupy dodatnich w rakach gruczołowych wypadły ujemnie. Dla przeciwciał dodatnich w rakach gruczołowych uzyskano pozytywne wyniki w pojedynczych przypadkach MM typu nabłonkowatokomórkowego i mieszanego; po jednym przypadku dodatniej reakcji z BerEp4 i B72.3 w MM mieszanym oraz jeden przypadek dodatniego CEA i 4 pozytywne reakcje z B72.3 w MM nabłonkowatokomórkowym.

Tabela 2. Ocena czułości i swoistości badanych przeciwciał dla grupy międzybłoniaków (MM) oraz dla grupy raków niedrobnokomórkowych (CA) naciekających opłucną**Table 2. Sensitivities and specificities of different monoclonal antibodies in malignant mesothelioma and carcinoma detection**

Przeciwciała <i>Antibodies</i>		Czułość (%) <i>Sensitivity</i>		Swoistość (%) <i>Specificity</i>	
		Międzybłoniaki/MM	Raki/CA	Międzybłoniaki/MM	Raki/CA
Przeciwciała dodatnie w MM i rakach <i>Antibodies positive in MM and CA</i>	Koekspresja cytokeratyny i wimentyny <i>Co-expression of cytokeratin and vimentin</i>	63,9	17,6	82,4	36,1
	EMA — reakcja błonowa <i>EMA – membranous reaction</i>	62,3	13,3	86,7	37,7
Grupa markerów MM <i>Markers for MM</i>	HBME1	76,7	22,6	77,4	23,3
	CK5/6	51,2	9,3	90,7	48,8
	Kalretynina <i>Calretinin</i>	66,7	2	99,8	33,3
Grupa markerów raków gruczołowych <i>Markers for adenocarcinomas</i>	BerEp4	1,2	72,2	27,8	98,8
	B72.3	6,2	64,1	35,9	93,8
	CEA	1,2	58,5	41,5	98,8
	TTF1	0	43,8	56,2	100

Raki niedrobnokomórkowe naciekające opłucną (ryc. 1)

W grupie raków niedrobnokomórkowych naciekających opłucną koekspresję cytokeratyny i wimentyny stwierdzono w 17,6%, a reakcję błonową z przeciwciałem EMA — w 13% przypadków. W grupie markerów MM dodatnie reakcje dla przeciwciała HBME1 uzyskano w 22,6%, dla CK5/6 w 9,3%, a dla kalretyniny w 2% przypadków. Reakcje dodatnie z przeciwciałami BerEp4, B72.3, CEA i TTF1 stwierdzono odpowiednio w: 72,2%, 64,1%, 58,5%, 43,8% przypadków.

Odczynowy rozrost międzybłonka

W grupie rozrostów odczynowych międzybłonka wykazano obecność białka p53 w 9,3% przypadków. Natomiast w żadnym przypadku nie uzyskano reakcji błonowej z przeciwciałem EMA, w około 35% przypadków wystąpiła dodatnia, słaba reakcja cytoplazmatyczna. Barwienia te nie pozwalają na jednoznaczne rozpoznanie procesu odczynowego, jednak w przypadku uzyskania rozlanej, dodatniej reakcji błonowej z przeciwciałem EMA i wykazaniu obecności białka p53 przemawiają za rozpoznaniem MM.

Ocena czułości i swoistości badanych przeciwciał dla grupy MM i raków niedrobnokomórkowych naciekających opłucną (tab. 2)

Dla wszystkich wykorzystanych w przedstawianej pracy przeciwciał uzyskane różnice między

grupą MM a rakami niedrobnokomórkowymi naciekającymi opłucną były istotne statystycznie. Stwierdzono różnice między obydwooma grupami w swoistości i czułości poszczególnych przeciwciał. W grupie przeciwciał dodatnich w MM największą czułość (76,7%) wykazało HBME1, przy jednocześnie najniższej swoistości (77,4%). Natomiast największą swoistością cechowała się kalretynina (99,8%), przy średniej czułości (66,7%).

W identyfikacji MM koekspresja cytokeratyny i wimentyny oraz błonowa reakcja z przeciwciałem EMA wykazały średnią swoistość i czułość (odpowiednio 82,4% i 86,7% oraz 63,9% i 62,3%).

W grupie przeciwciał dodatnich w rakach gruczołowych najwyższą czułością (72,2%) i swoistością (98,8%) charakteryzowało się BerEp4. Natomiast B72.3, CEA i TTF1 wykazały wysoką swoistość (93,8%, 98,8% i 100%), przy średniej czułości (64,1%, 58,5% i 43,8%).

Wyniki

1. W celu rozpoznania MM opłucnej najkorzystniejsze jest stosowanie kilku przeciwciał immunohistochemicznych. Przydatność pojedynczych markerów jest ograniczona, zwłaszcza w diagnostyce postaci MM o niższym stopniu dojrzałości.
2. Panel przeciwciał powinien zawierać markery raka gruczołowego, jak również międzybłoniaka.

3. Najkorzystniejszą kombinację czułości i swoistości wykazują przeciwciała BerEp4, CEA i TTF1 z grupy dodatnich w rakach gruczołowych oraz kalretynina i HBME1 spośród markerów pozytywnych w międzybłoniakach.
4. Na podstawie analizy dyskryminacyjnej najlepszy wynik uzyskuje się, stosując wszystkie badane przeciwciała. Jednak ze względu na duże koszty zalecane jest wykonywanie reakcji immunohistochemicznych w dwóch turach. W pierwszej zalecane jest stosowanie czterech przeciwciał: kalretyniny, HBME1, Ber-Ep4, CEA lub w przypadku podejrzenia przerzutu raka płuca TTF1. Dopiero w sytuacjach, w których nie ustalono rozpoznania, należy wykonać barwienia immunohistochemiczne z pozostałymi przeciwciałami — cytokeratyną o szerokim spektrum, wimentyną, CK5/6, B72.3, TTF1 lub CEA (w zależności od przeciwciał użytych w pierwszym badaniu) oraz EMA.
5. Przydatność przeciwciał immunohistochemicznych w diagnostyce różnicowej MM typu mięsakowego, w tym również podtypu włóknistego, jest ograniczona.
6. W różnicowaniu postaci włóknistej MM i odczynowego włóknienia opłucnej reakcje immunohistochemiczne, zarówno z markerami komórek międzybłonka, jak również EMA i p53, nie mają większego zastosowania. W obu rozrostach dodatnie reakcje uzyskuje się tylko z przeciwciałami przeciwko cytokeratynie i wimentynie.
7. W różnicowaniu między odczynowymi a nowotworowymi rozrostami międzybłonka przydatne są reakcje immunohistochemiczne z przeciwciałami przeciwko EMA i p53.

Omówienie

Rozpoznanie histopatologiczne MM często następuje duże trudności ze względu na różnorodność obrazów morfologicznych nowotworu. Obok trzech podstawowych typów histologicznych wyodrębnionych w ostatniej klasyfikacji *World Health Organization/International Association for the Study of Lung Cancer* (WHO/IASLC) (postaci nabłonkowatokomórkowej, mięsakowej, dwufazowej: mięsakowo-nabłonkowatokomórkowej), istnieje wiele form o zróżnicowanym obrazie mikroskopowym, które mogą imitować inne rozrosty nowotworowe [2, 5, 6]. Ponadto w obrębie tego samego guza pojawiają się różne rodzaje utkania, podtypy, wymieszane ze sobą. Również odróżnienie rozrostu

odczynowego mezotelium od nowotworowego może okazać się niełatwe [7–9].

Od 1979 roku, kiedy po raz pierwszy wykorzystano barwienia immunohistochemiczne w diagnostyce MM, ciągle pojawiają się doniesienia o kolejnych przeciwciałach przydatnych w rozpoznaniu tego nowotworu. Dotychczas nie został opracowany jeden specyficzny marker dla MM, w związku z czym wykorzystuje się panel wielu przeciwciał, które różnią się między sobą zarówno czułością, jak i swoistością reakcji z komórkami międzybłoniaka złośliwego oraz z komórkami raków gruczołowych zajmujących opłucną. Rozbieżność wyników w publikowanych pracach wynika ze stosowania wielu klonów przeciwciał, a także z niejednolitego sposobu interpretacji reakcji [10, 11].

Wśród markerów reagujących z komórkami MM najczęściej stosowane są: kalretynina, CK 5/6, WT-1 (*Wlms tumor gene*), thrombomodulina (CD 141), mesothelin, HBME1, N-cadherin i niedawno wprowadzone D2-40 oraz podoplanin, natomiast z komórkami raka gruczołowego: CEA, BerEp4, B72.3, Leu-M1 (CD15), MOC-31, E-cadherin, BG-8, TTF1 [2, 6, 8, 12–22]. Zwykle w diagnostyce histopatologicznej stosuje się zestaw przeciwciał reagujących z komórkami MM oraz będących markerami raków gruczołowych.

Problemem jest również różnicowanie między odczynowym a nowotworowym rozrostem międzybłonka, gdyż dotychczas nie ma specyficznych przeciwciał immunohistochemicznych pozwalających na ich odróżnienie. Podejmowane są próby wykorzystania przeciwciał przeciwko różnym typom antygenów: MOC-1, EMA, B72.3, CEA oraz markerom biologicznym cyklu komórkowego: p53, p27, TGF- α , EGFR, ocena ploiddii DNA, jednak wyniki nadal są niesatysfakcjonujące [7–9, 23].

Właściwa interpretacja wyników immunohistochemicznych ma istotne znaczenie dla rozpoznania MM. Ważne jest nie tylko wystąpienie samej reakcji, jej intensywność, odsetek zabarwionych komórek nowotworowych, ale przede wszystkim wybarwienie odpowiednich struktur komórkowych [11, 22, 24].

Za dodatni wynik dla przeciwciał TTF1 i kalretyniny uznaje się wyłącznie zabarwienie jąder komórkowych. Natomiast dla przeciwciał HBME1 i BerEp4 jedynie linijne zabarwienie błony komórkowej występujące na powierzchni szczytowej większości komórek nowotworowych traktuje się jako pozytywne. Intensywna reakcja błonowa komórek nowotworowych wywołana przeciwciałem EMA przemawia za rozrostem MM, natomiast rozlana, cytoplazmatyczna występuje głównie w rakach gruczołowych [12, 22, 25].

Markery wykorzystywane w diagnostyce MM można podzielić na trzy grupy: dodatnie w komórkach MM, ujemne w komórkach MM, ale dodatnie w rakach gruczołowych oraz mieszane, w których reakcja może być dodatnia zarówno w komórkach MM, jak i raków, a ocena opiera się na charakterystycznym umiejscowieniu zabarwienia i liczbie dodatnich komórek [11, 22, 24].

Kalretynina, HBME1, CK5/6 należą do przeciwciał dodatnich w komórkach międzybłonna, natomiast BerEp4, B72.3, TTF1, CEA do dodatnich w komórkach raków gruczołowych, ujemnych w MM. W grupie mieszanych markerów, wywołujących pozytywną reakcję w obu typach nowotworów, znajdują się cytokeratyny, wimentyna oraz antygen błony komórkowej komórek nabłonkowych EMA.

Przeciwciałem charakteryzującym się wysoką czułością i swoistością w różnicowaniu MM z rakami naciekającymi opłucną jest kalretynina [2, 5, 16, 22, 26]. W zależności od stosowanego klonu, reakcję dodatnią opisywano w 42–100% rozrostów MM, natomiast w rakach gruczołowych pozytywny wynik stwierdzono w kilku do nawet 28% przypadków. Przedstawiano również prace, w których nie uzyskano reakcji dodatniej w żadnym z badanych raków [12, 13, 16]. Występująca rozbieżność wyników wiąże się z różnymi stosowanymi klonami przeciwciała, jak również z brakiem jednolitej oceny reakcji.

Na podstawie obecnie stosowanych klonów przeciwciał, za dodatnią uznano wyłącznie reakcję jądrową komórek. Podbarwienie cytoplazmy pojawiające się w niektórych rakach gruczołowych traktuje się jako wynik ujemny [15, 22].

Ordonez, używając przeciwciała przeciwko ludzkiej kalretynie, uzyskał dodatni wynik w 100% MM typu nabłonkowatokomórkowego oraz ogniskową, słabą reakcję w około 9% raków gruczołowych. W związku z tym uznał kalretyninę za najbardziej czułe przeciwciało z grupy dodatnich w komórkach MM, zalecając stosowanie tego klonu w rutynowej diagnostyce MM [10, 24]. Podobnie Wick w swoich badaniach podkreślił wartość kalretyniny, jako najlepszego przeciwciała w różnicowaniu MM z rakami naciekającymi opłucną [26].

W niniejszej pracy przy zastosowaniu wspomnianego klonu przeciwciała otrzymano podobne wyniki. Dodatnią reakcję stwierdzono w około 67% przypadków MM, w tym w typie nabłonkowatokomórkowym w 72%, mieszanym w 75%. Natomiast w żadnym przypadku mięsakowego MM nie uzyskano reakcji dodatniej, co ogranicza wykorzystanie tego przeciwciała w różnicowaniu postaci wrzecionowatokomórkowych międzybłoniaków.

W grupie raków naciekających opłucną dodatnia reakcja pojawiła się tylko w 2% przypadków.

Wśród markerów wykorzystanych w prezentowanych badaniach, dodatnich w komórkach MM, kalretynina cechowała się największą swoistością (99,8%), przy średniej czułości (66,7%), co niewątpliwie stawia ją w grupie niezwykle przydatnych przeciwciał w diagnostyce różnicowej MM z rakami naciekającymi opłucną.

Dodatnią reakcję z HBME1 opisuje się w większości MM, jak również w niektórych przypadkach raków gruczołowych, ale różni się ona sposobem zabarwienia. W licznych pracach przedstawiających wyniki reakcji HBME1 w MM i rakach gruczołowych zajmujących opłucną obserwuje się dużą ich rozbieżność, która wynosi 57–100% reakcji dodatnich w MM oraz 9–100% dodatnich wyników w rakach gruczołowych [13, 18]. Ordonez uzyskał 85% dodatnich reakcji w MM i aż 68% w rakach gruczołowych [24]. Ponadto stwierdził dodatnią ekspresję HBME1 w niektórych rakach brodawkowatych płuca, co w połączeniu z wysokim procentem przypadków pozytywnych w grupie raków gruczołowych spowodowało wykluczenie tego przeciwciała ze stosowanego przez niego panelu przeciwciał [10]. Różnice te w dużej mierze zależą od interpretacji uzyskanych zabarwień [11, 24]. W związku z tym, oceniając ekspresję HBME1, należy zwracać uwagę nie tylko na samą jej obecność, ale także na sposób i miejsce jej wystąpienia [12]. W MM za dodatnią uznaje się jedynie reakcję błonową, zaś w rakach gruczołowych — cytoplazmatyczną [11].

Riera i wsp., stosując ściśle kryteria oceny zachodzącej reakcji immunohistochemicznej, otrzymali aż 78,9% dodatnich wyników w MM, a tylko 6,1% w rakach gruczołowych [11]. W związku z tym, zdaniem autorów, HBME1 można uznać za przydatne przeciwciało, o ile odpowiednio interpretuje się uzyskane barwienia.

Przeciwciało HBME1 charakteryzuje się wysoką czułością, jednak ze względu na to, że wypada także niespecyficycznie dodatnio w rakach płuca, zwłaszcza gruczołowych, jak również w rakach nerki, tarczycy, narządu rodnego, ogranicza to jego możliwości różnicowania między MM a przerzutami raków do opłucnej. W przypadkach tych zdecydowanie korzystniejsza wydaje się kalretynina [11, 27].

Wykonane badania potwierdzają dużą czułość HBME1 i jego małą swoistość. Dodatnią reakcję z HBME1 uzyskano w około 77% przypadków MM, w tym w podtypie nabłonkowatokomórkowym w około 90%, mieszanym w 73%. W podtypie mięsakowym nie stwierdzono dodatniej reakcji, co

niestety ogranicza przydatność tego przeciwciała w różnicowaniu nowotworów wrzecionowatokomórkowych opłucnej. W grupie raków naciekających opłucną pozytywne zabarwienie wystąpiło w około 23% przypadków.

Do przeciwciał o dużej swoistości, ale małej czułości, należy cytokeratyna 5/6 (CK5/6). Ordonez otrzymał dodatnią ekspresję z CK5/6 w około 40 zbadanych przypadkach MM, natomiast we wszystkich 30 badanych rakach gruczołowych płuca reakcja była negatywna. Ponadto stwierdził również ogniskową, pozytywną reakcję w około 15% raków gruczołowych pozapłucnych, co jego zdaniem ogranicza zastosowanie CK5/6 w diagnostyce różnicowej między MM a przerzutami raków o pozapłucnej lokalizacji [28]. W innych doniesieniach stwierdzono 92% dodatnich reakcji z komórkami MM, a tylko 14% w przerzutach raków do opłucnej, co stawia CK5/6 wśród przydatnych markerów immunohistochemicznych w różnicowaniu MM [15]. Clover i wsp. również ocenili CK5/6 jako niezwykle korzystne przeciwciało w diagnostyce różnicowej MM. Uzyskali dodatnie reakcje w 100% MM nabłonkowatokomórkowych i jedynie w 19% raków gruczołowych, w których odczyn był słaby i ogniskowy. Zbliżone wyniki przedstawili inni autorzy, którzy otrzymali pozytywne wyniki w 92–100% przypadków MM i tylko w 2% raków gruczołowych [14]. Dodatnią ekspresję z CK5/6 opisano również w rakach płaskonabłonkowych i z nabłonka przejściowego, co może ograniczać jej skuteczność w różnicowaniu MM z przerzutami tych raków do opłucnej [5, 10, 15, 29].

W prezentowanej pracy dodatnią reakcją z CK 5/6 stwierdzono w 51% przypadków MM. W podtypie nabłonkowatokomórkowym w 58%, w mieszanym w 53%, natomiast w żadnym z przypadków mięsakowego MM nie uzyskano pozytywnego wyniku.

W rakach niedrobnokomórkowych naciekających opłucną dodatnia ekspresja wystąpiła w 9% przypadków. Większy odsetek pozytywnych wyników w prezentowanej grupie raków niż w przytaczanych pracach może wynikać z innych kryteriów doboru badanych grup, którymi objęto różne typy raków niedrobnokomórkowych naciekających opłucną, a nie tylko raki gruczołowe.

Wśród markerów stosowanych w diagnostyce różnicowej MM, ujemnych w komórkach MM, dodatnich w komórkach raków gruczołowych, znajduje się BerEp4, monoklonalne przeciwciało, które wiąże się z epitopem glikoproteiny występującej w większości nabłonków, a nieobecnej w komórkach międzybłonka. Reakcję pozytywną opisuje się w 64–99% raków gruczołowych. W MM ob-

serwuje się większą rozbieżność wyników, od braku reakcji do 35% odczynów pozytywnych [12, 13]. Rozbieżność ta zależy od sposobu interpretacji zabarwienia w komórkach nowotworowych. Tylko zabarwienie błonowe uznaje się za reakcję pozytywną, zaś cytoplazmatyczne lub występujące w nielicznych komórkach — za ujemne. Odsetek reakcji dodatnich w rakach gruczołowych o pozapłucnym punkcie wyjścia jest niższy niż w rakach gruczołowych płuca. Reakcja z przeciwciałem BerEp4 w rakach gruczołowych jest silnie dodatnia i rozlana, w przeciwieństwie do MM, w których, jeśli wystąpi, zwykle jest ogniskowa i dotyczy nielicznych komórek.

Ordonez uzyskał pozytywny wynik w 18% MM, z czego we wszystkich przypadkach zabarwienie było słabe i ogniskowe, oraz w 100% raków gruczołowych, w których reakcja była silna, rozlana, zarówno błonowa, jak i cytoplazmatyczna [22, 24]. Riera i wsp. uznali BerEp4 za najlepsze po CEA przeciwciało wśród stosowanych w rozpoznawaniu MM [11].

Przy ścisłych kryteriach interpretacji reakcji, BerEp4 jest bardzo dobrze ocenianym markerem w różnicowaniu MM z rakami gruczołowymi naciekającymi opłucną o różnym punkcie wyjścia [12, 13, 17].

W prezentowanej pracy BerEp4 również okazało się jednym z najlepszych przeciwciał. Wśród MM wynik pozytywny stwierdzono tylko w 1% przypadków, głównie w podtypie mieszanym. W rakach naciekających opłucną reakcją dodatnią uzyskano w 72% przypadków. W zbadanych grupach nowotworów BerEp4 jest najbardziej czułym i swoistym przeciwciałem spośród ujemnych w MM.

Obok BerEp4, markerem dodatnim w komórkach raków gruczołowych zarówno płuca, jak i innych narządów jest B72.3.

Ordonez wykazał dodatnią ekspresję B72.3 tylko w rakach gruczołowych (84%), natomiast wszystkie MM były ujemne [24]. W kolejnej pracy zebrał wyniki z dwóch dużych opracowań dotyczących różnicowania MM opłucnej i raków gruczołowych płuca. Odsetek dodatnich reakcji w MM wynosił 2–5%, a w rakach gruczołowych 81–83% [10]. Podobnie Riera i wsp. stwierdzili 80,5% dodatnich reakcji w rakach gruczołowych, natomiast tylko 2 dodatnie przypadki w grupie MM [11].

Ze względu na wysoką swoistość i czułość B72.3 Ordonez uznał je za najlepszy marker w grupie przeciwciał ujemnych w komórkach MM, zaś Riera i wsp. ocenili je mniej entuzjastycznie, uznając za lepsze BerEp4 [11].

W różnicowaniu z przerzutami raków do opłucnej, zwłaszcza nerki, kory nadnerczy, tarczycy,

wątroby, B72.3 ma ograniczone zastosowanie, gdyż wymienione nowotwory nie reagują z tym przeciwciałem. W tych przypadkach większą wartość przedstawia BerEp4, które wykazuje dodatnią ekspresję z większością raków gruczołowych płucnych i pozapłucnych [26].

W niniejszej pracy dodatnią reakcją z B72.3 uzyskano w około 6% przypadków MM, w podtypach nabłonkowatokomórkowym i mieszanym, natomiast nie stwierdzono jej w żadnym przypadku mięsakowego MM. W grupie raków naciekających opłucną pozytywne zabarwienie wystąpiło w 64% przypadków.

Otrzymane wyniki wskazują na wysoką swoistość i czułość B72.3, chociaż niższą w stosunku do BerEp4. Zastosowanie B72.3 pozwala na rozpoznanie tylko 2/3 raków gruczołowych.

W ostatnim czasie ogromnego znaczenia nabiera przeciwciało TTF1, które jest tkankowo specyficznym czynnikiem transkrypcyjnym występującym w komórkach tarczycy, pneumocytach typu II i komórkach Clara nabłonka oskrzelowego [20]. Ekspresję TTF1 stwierdza się w ponad 75% raków gruczołowych płuca, 50% wielkokomórkowych neuroendokrynych oraz w ponad 90% drobnokomórkowych [6, 21]. W rakach wywodzących się z innych narządów niż płuco i tarczyca oraz w komórkach międzybłonka reakcja jest ujemna [12, 21].

Ordenez stwierdził dodatnią reakcję w 74–75% raków gruczołowych płuca oraz w żadnym przypadku MM i raków gruczołowych pochodzenia pozapłucnego [10, 21, 24]. Przeciwciało TTF1 jest przeciwciałem o dużej swoistości, niezwykle przydatnym w różnicowaniu między MM a rakami płuca naciekającymi opłucną, zwłaszcza postaciami obwodowymi, szerzącymi się wzdłuż opłucnej, bez kontaktu z drzewem oskrzelowym, które często swoim przebiegiem i obrazem radiologicznym imitują MM [10, 21, 24, 30].

W niniejszej pracy we wszystkich MM reakcja z TTF1 wypadła ujemnie. W rakach naciekających opłucną dodatni wynik uzyskano w 43,8% przypadków, z czego w 50% w rakach gruczołowych bez rozgraniczenia na guzy pierwotne i przerzutowe. Rozbieżność między wynikami w przedstawionych publikacjach a uzyskanymi w prezentowanej pracy wiąże się najprawdopodobniej z większym zróżnicowaniem badanej grupy, do której włączono różne raki niedrobnokomórkowe naciekające opłucną, nie tylko gruczołowe, bez podziału na pierwotne płuca i przerzutowe.

Antygen rakowo-płodowy CEA jest powszechnie akceptowany jako marker użyteczny w różnicowaniu MM i raków gruczołowych. Wykazuje ekspresję w rakach gruczołowych różnych narządów,

w tym również płuca. W publikowanych pracach obserwuje się dużą rozbieżność wyników (25–100%) dodatnich reakcji w rakach gruczołowych płuca. Różnice te wynikają ze stosowania wielu klonów tego przeciwciała [13]. W najnowszych badaniach reakcje dodatnie stwierdzono w ponad 80% raków gruczołowych płuca, piersi i przewodu pokarmowego. W MM reakcje w większości przypadków były ujemne [12, 13, 22, 26].

Riera i wsp. otrzymali wyniki dodatnie w około 83% przypadków raków gruczołowych, w tym w rakach jajnika reakcja dodatnia występowała w 45%, w 79% przypadków raka piersi i w 100% raków jelita grubego [11].

Ordenez uzyskał dodatnią reakcję w 88% raków gruczołowych i w żadnym z badanych przypadków MM. Autorzy ci uznali antygen rakowo-płodowy za jeden z lepszych markerów w różnicowaniu MM i raków gruczołowych [10, 11, 24].

W niniejszej pracy w grupie MM dodatnią reakcję z CEA stwierdzono w jednym przypadku, w podtypie nabłonkowatokomórkowym, natomiast w MM mieszanym i mięsakowym nie stwierdzono pozytywnych reakcji. W grupie raków niedrobnokomórkowych naciekających opłucną dodatnie zabarwienie wystąpiło w 58,5% przypadków.

Przeciwciało CEA charakteryzuje się wysoką swoistością, ale średnią czułością, co pozwoliło na rozpoznanie niewiele ponad połowę badanych raków. Różnice między rezultatami uzyskanymi przez autorów przytaczanych prac a przedstawianymi w niniejszej pracy wynikają z nieco odmiennego doboru badanych grup. W cytowanych publikacjach składały się one wyłącznie z raków gruczołowych, natomiast analizowana grupa była bardziej heterogenna, zawierała raki niedrobnokomórkowe naciekające opłucną o różnorodnej budowie histologicznej, zarówno pierwotne płuca, jak i przerzutowe. W grupie raków rozpoznanych jako gruczołowe, pierwotne lub przerzutowe dodatnia reakcja z CEA wzrosła do 72,1%.

Zastosowanie najbardziej rozpowszechnionych markerów, do których należą cytokeratyny i wimentyna, ma ograniczone możliwości w diagnostyce różnicowej MM.

Cytokeratyny wykazują bowiem ekspresję zarówno w komórkach raków gruczołowych, jak i komórkach MM. Jednak nie można nie docenić ich przydatności w różnicowaniu między postacią sarkomatyczną MM, w której reakcja wypadła dodatnio, a mięsakami wrzecionowatokomórkowymi zajmującymi opłucną, zlokalizowanymi guzami włóknistymi opłucnej, które nie dają pozytywnego zabarwienia z cytokeratynami.

Natomiast wimentynę uważa się za specyficzny i czuły marker dla międzybłoniaka, wywołujący pozytywną reakcję w 55% (zakres 26–86%) przypadków MM, chociaż 16% (zakres 0–45%) raków gruczołowych również wykazuje dodatnią ekspresję z wimentyną [17]. Riera i wsp. na podstawie wyników dużego opracowania stwierdzili pozytywną reakcję z wimentyną w 81% nabłonkowatych MM oraz w 31% raków gruczołowych, przy czym w MM odczyn był intensywniejszy i obejmował większą liczbę komórek niż w przypadku raków [11]. Natomiast Ordonez uzyskał dodatnią reakcję z wimentyną w 55% MM i aż w 38% raków gruczołowych płuca [24]. Garcia-Prats i wsp. wykazali dodatnią reakcję z wimentyną aż w 87% MM, a tylko w 4% raków gruczołowych, co skłoniło autorów do rekomendowania tego przeciwciała jako ciągle niezwykle przydatnego w diagnostyce różnicowej między MM a rakami gruczołowymi, zwłaszcza jeśli jest stosowane wraz z innymi przeciwciałami [17].

Podkreśla się częstą koekspresję cytokeratyn z wimentyną w komórkach MM, w odróżnieniu do raków gruczołowych. W badaniach linii komórkowych uzyskanych z MM opłucnej i otrzewnej koekspresję obydwu markerów stwierdzono we wszystkich przypadkach [27].

W prezentowanej pracy reakcję dodatnią z CK o szerokim spektrum uzyskano w 95,3% przypadków MM oraz w 98% raków naciekających opłucną. Świadczy to o braku przydatności tego przeciwciała użytego samodzielnie w diagnostyce różnicowej MM z rakami.

Natomiast dodatnią reakcję z wimentyną stwierdzono w około 69,8% przypadków MM i tylko w 17,6% raków niedrobnokomórkowych.

Koekspresję CK i wimentyny wykazano w 63,9% MM, w tym aż w 93% przypadków podtypu mieszanego i w 17,6% raków. Koekspresja obydwu przeciwciał częściej występowała w komponentie wrzecionowatokomórkowym MM, natomiast w nabłonkowatokomórkowym była rzadsza, dotyczyła jedynie 16% przypadków. Dodatnia reakcja cytokeratyny z wimentyną wydaje się szczególnie przydatna w rozpoznawaniu postaci sarkomatycznych, wrzecionowatokomórkowych MM, w których inne przeciwciała, specyficzne dla komórek międzybłoniaka, nie wykazują ekspresji.

Zastosowanie w diagnostyce MM przeciwciała EMA jest kontrowersyjne. Reakcja dodatnia występuje zarówno w MM (42–100%), jak i w rakach gruczołowych (32–100%), różniąc się sposobem zabarwienia komórki. W MM stwierdza się silną reakcję błonową, zaś w rakach gruczołowych głównie cytoplazmatyczną [23].

Zdaniem Ordoneza, który otrzymał dodatnią reakcję, bez rozróżnienia na sposób zabarwienia w 93% MM i w 100% raków gruczołowych płuca, przydatność EMA w różnicowaniu MM i raków gruczołowych jest wątpliwa, zwłaszcza że w niektórych przypadkach obydwa typy reakcji występują obok siebie. Ponadto, wyraźna reakcja błonowa, charakterystyczna dla MM, pojawia się także w grupie raków brodawkowatych płuca [10, 24]. Z kolei Riera i wsp. oraz Brockstedt i wsp. uznali dodatnią, błonową reakcję z EMA za bardzo dobry wskaźnik różnicowania mezotelialnego nowotworu [11, 13]. Natomiast w badaniach przeprowadzonych na liniach komórkowych uzyskanych z MM opłucnej i otrzewnej dodatnia reakcja z EMA występowała tylko w 2 z 30 badanych przypadków [27].

W prezentowanej pracy reakcja błonowa wystąpiła w 62% przypadków MM oraz w 13% przypadków raków naciekających opłucną. W postaciach wysoko dojrzałych MM, nabłonkowatokomórkowych dodatnią reakcję błonową uzyskano w 87% przypadków. Zaobserwowano również występowanie reakcji mieszanej, cytoplazmatyczno-błonowej, w 19% MM i 22% raków, co — podobnie jak w opinii Ordoneza — ogranicza przydatność tego przeciwciała w diagnostyce różnicowej MM z rakami niedrobnokomórkowymi naciekającymi opłucną.

Zdaniem niektórych autorów koekspresja cytokeratyny i wimentyny oraz silna błonowa reakcja z EMA zasługują na uwagę, gdyż pozwalają na ustalenie diagnozy w około 70% przypadków [11]. Ponadto należą do trwałych antygenów, trudno ulegających rozkładowi, dają wyraziste i łatwe w interpretacji reakcje [10, 11].

Dotychczas nie opracowano jednolitego panelu przeciwciał immunohistochemicznych zalecanych w diagnostyce różnicowej MM. Na pewno nie można opierać się na pojedynczych markerach, niezbędne jest wykorzystanie zestawu składającego się z kilku, obejmujących przeciwciała przeciwko komórkom MM oraz komórkom raka. Tylko ten sposób pozwala na ustalenie wiarygodnego rozpoznania. Często ze względów ekonomicznych wskazane jest przeprowadzenie diagnostyki immunohistochemicznej w dwóch turach.

Na podstawie oceny swoistości i czułości badanych markerów zastosowanych w niniejszej pracy, w pierwszym etapie korzystne jest wykonanie reakcji z kalretyniną, HBME1, BerEp4, CEA, a w przypadkach podejrzenia zajęcia opłucnej przez raka płuca dodatkowo TTF1. Ten zestaw markerów pozwala na ustalenie rozpoznania w około 69–80% przypadków. Pozostałe przeciwciała mają zastosowanie jedynie w wybranej grupie trudnych

przypadków, gdy nie udało się wcześniej ustalić diagnozy.

W piśmiennictwie proponowane są różne zestawy przeciwciał. Ordonez oraz Riera i wsp. zalecają używanie kalretyniny i CK 5/6 jako markerów dodatnich w MM oraz CEA i B72.3 lub BerEp4 jako markerów ujemnych w MM [10, 22, 24]. Riera i wsp. proponują zastosowanie CEA, Bg8 i BerEp4, które pozwalają na rozpoznanie MM w około 70% przypadków [11]. Brockstedt i wsp. ze względów ekonomicznych zaproponowali również wykonywanie dwóch tur badań. W pierwszej turze proponują wykorzystanie przeciwciała przeciwko CEA i kalretyninie, co zdaniem autorów umożliwi rozpoznanie w 44% przypadków lub zestaw czterech przeciwciał: CEA, kalretyniny, CD15 (Leu-M1), EMA, zwiększający możliwości ustalenia diagnozy do 66% [13]. Abutaily i wsp. także proponują wykonanie badań w dwóch etapach: w pierwszym z przeciwciałami TTF1 i E-cadheryną, pozwalającymi na rozpoznanie około 70% przypadków [12].

Dotychczas nie uzyskano zestawu, który umożliwiłby ustalenie rozpoznania w 100% przypadków.

Przydatność stosowanych barwień immunohistochemicznych ma swoje ograniczenia, związane przede wszystkim z podtypem histologicznym MM. Wymienione panele przeciwciał najlepiej sprawdzają się w przypadkach rozrostów nabłonkowatokomórkowych, natomiast mają ograniczoną przydatność w MM mięsakovym i włóknistym. Obydwa podtypy MM nastrożają bardzo duże trudności w diagnostyce histopatologicznej. Zdarza się, zwłaszcza w przypadku oceny małych wycinków pochodzących z biopsji opłucnej, że nie można jednoznacznie postawić rozpoznania, bowiem w większości MM wrzecionowatokomórkowych reakcje immunohistochemiczne wypadają negatywnie. Zastosowanie mają jedynie cytokeratyny i wimentyna wykazujące koekspresję w komórkach MM. Niekiedy, zwłaszcza w typie mięsakovym, stwierdza się również negatywną reakcję z cytokeratyną, a dodatnią wyłącznie z wimentyną, co powoduje duże problemy z ustaleniem właściwej diagnozy.

Odrębnym problemem, ale niezwykle istotnym, jest różnicowanie między MM i odczynowym rozrostem międzybłonka. Często jest to bardzo trudne, zwłaszcza w przypadkach, gdy rozpoznanie należy ustalić na podstawie oceny małych wycinków z opłucnej. Mimo wyraźnie określonych cech morfologicznych różnicujących obydwie procesy, nierzadko zachodzi konieczność posłużenia się reakcjami immunohistochemicznymi, chociaż mają one zdecydowanie mniejsze znaczenie niż w różnicowaniu między MM i innymi nowotwo-

rami, ponieważ przeciwciała dodatnie w MM są również dodatnie w komórkach międzybłonka. Spośród wielu badanych markerów immunohistochemicznych najczęściej wykorzystuje się EMA i p53 [2, 7, 21, 23]. W licznych pracach reakcje z przeciwciałem p53 były ujemne we wszystkich rozrostach odczynowych międzybłonka. Jedynie Churg i wsp. zaobserwowali dodatnie wyniki w reaktywnie zmienionym międzybłonku [9].

W prezentowanej pracy obecność białka p53 wykazano w około 9% badanych łagodnych rozrostów mezotelium oraz w 51% MM. W żadnym z przypadków odczynowego rozrostu międzybłonka nie uzyskano reakcji błonowej z przeciwciałem EMA, która jest charakterystyczna dla MM.

Otrzymane dane wskazują na przydatność przeciwciała EMA i białka p53 w różnicowaniu między łagodnymi i złośliwymi rozrostami międzybłonka, zwłaszcza przy właściwej interpretacji zachodzących reakcji.

Szczególnej uwagi wymaga odróżnienie postaci włóknistej MM z odczynowym włóknieniem opłucnej (*pleuritis fibrosa*). W obydwu zmianach reakcje immunohistochemiczne nie mają większego zastosowania, gdyż wszystkie markery mezotelialne wypadają negatywnie, stwierdza się jedynie koekspresję CK i wimentyny. Zróżnicowanie tych procesów wymaga przede wszystkim uważnej oceny morfologicznej wycinków mikroskopowych w korelacji z danymi klinicznymi i obrazem radiologicznym.

Rozpoznanie MM jest bardzo trudne, często niemożliwe do ustalenia wyłącznie na podstawie badania histologicznego obejmującego rutynowe barwienie. Zawsze konieczne jest wykonanie barwień dodatkowych, z użyciem kilku, odpowiednio dobranych przeciwciał immunohistochemicznych i umiejętnej ich ocena. Jednak zarówno w grupie MM, jak i niedrobnokomórkowych raków płuc występują przypadki o niejednoznacznym fenotypie immunohistochemicznym, w których mimo wykorzystania wielu dodatkowych markerów nie udaje się ustalić stuprocentowego rozpoznania. Dlatego w celu ustalenia właściwej diagnozy niezwykle istotne jest nie tylko doświadczenie patologa oceniającego wycinki, ale również współpraca z klinicystą i radiologiem, pozwalająca na korelację obrazu histopatologicznego z przebiegiem choroby.

Piśmiennictwo

1. Astoul P. Malignant mesothelioma. W: Light R., Lee G. Textbook of Pleural Diseases. Arnold Publishers, London 2003; 435–444.
2. Szczepulska-Wójcik E., Langfort R. Międzybłonniak złośliwy opłucnej — klasyfikacja histopatologiczna, stopień zaawansowa-

- nia i diagnostyka mikroskopowa. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2005; 73: 285–291.
3. Baldi A., Santini D., Vasaturo F. i wsp. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) and expression of cell cycle inhibitors p21 and p27 in human pleural malignant mesothelioma. *Thorax* 2004; 59: 428–433.
 4. Fijolek J., Wiatr E., Langfort R. i wsp. Nawracające odmy płucnowe jako jedyna manifestacja międzybłoniaka płucnej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2005; 73: 381–386.
 5. Attanos R.L., Webb R., Dojcinov S.D., Gibbs A.R. Malignant epithelioid mesothelioma: anti-mesothelial marker expression with histological pattern. *Histopathol.* 2001; 39: 584–588.
 6. Travis W., Brambilla E., Müller-Hermelink H., Harris C. Pathology and genetics of tumours of lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon 2004; 125–144.
 7. Attanos R.L., Griffin A., Gibbs A.R. The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothelium. A novel use for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and Bcl-2. *Histopathol.* 2003; 43: 231–238.
 8. Cagle P.T., Churg A. Differential diagnosis of benign and malignant mesothelial proliferations on pleural biopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005; 129: 1421–1427.
 9. Churg A., Colby T., Cagle P. i wsp. The separation of benign and malignant mesothelial proliferations. *Am. J. Surg. Pathol.* 2000; 24: 1183–1200.
 10. Ordonez N. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers. *Hum. Pathol.* 2002; 33: 953–967.
 11. Riera J., Astengo-Osuna C., Longmate J. i wsp. The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1997; 21: 1409–1419.
 12. Abutaily A., Addis B., Roche W. Immunohistochemistry in the distinction between malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma: a critical evaluation of new antibodies. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55: 662–668.
 13. Brockstedt U., Gulyas M., Dobra K. i wsp. An optimised battery of eight antibodies that can distinguish most cases of epithelial mesothelioma from adenocarcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114: 203–209.
 14. Clover J., Oates J., Edwards C. Anti-cytokeratin 5/6: A positive marker for epithelioid mesothelioma. *Histopathology* 1997; 31: 140–143.
 15. Curry P., Buther D., Fisher C. i wsp. Value of the mesothelium-associated antibodies Thrombomodulin, Cytokeratin 5/6, Calretinin, and CD44 in distinguishing epithelioid pleural mesothelioma from adenocarcinoma metastatic to the pleura. *Mod. Pathol.* 2000; 13: 107–112.
 16. Doglioni C., Dei Tos A., Laurino L. i wsp. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20: 1037–1046.
 17. Garcia-Prats M.D., Ballestin C., Sotelo T., Lopez-Encuentra A., Myordomo J.I. A comparative evaluation of immunohistochemical markers for differential diagnosis of malignant pleural tumors. *Histopathology* 1998; 462–472.
 18. Gonzalez-Lois C., Ballestin C., Sotelo M.T., Lopez-Rios F., Garcia-Prats M.D., Villena V. Combined use of novel epithelial (MOC-31) and mesothelial (HBME-1) immunohistochemical markers for optimal first line diagnostic distinction between mesothelioma and metastatic carcinoma in pleura. *Histopathology* 2001; 38: 528–534.
 19. Gotzos V., Vogt P., Celio M. The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of epithelial type. *Path. Res. Pract.* 1996; 192: 137–147.
 20. Nakamura N., Miyagi E., Murata S. i wsp. Expression of Thyroid Transcription Factor-1 in normal and neoplastic lung tissues. *Mod. Pathol.* 2002; 15: 1058–1067.
 21. Ordonez N. Value of Thyroid Transcription Factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2000; 24: 598–606.
 22. Ordonez N.G. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma. An update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005; 129: 1407–1414.
 23. Wick M., Moran C., Millis S. i wsp. Immunohistochemical differential diagnosis of pleural effusions, with emphasis on malignant mesothelioma. *Cur. Opin. Pulm. Med.* 2001; 7: 187–192.
 24. Ordonez N. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003; 27: 1031–1051.
 25. Tang P., Vatsia S., Teichberg S. i wsp. Pulmonary adenocarcinoma simulating malignant mesothelioma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2001; 125: 1598–1600.
 26. Wick M. Pleural cytology, tumor markers and immunohistochemistry. W: Light R., Lee Y. *Textbook of Pleural Diseases*. Arnold Publishers, London 2003; 256–281.
 27. Zeng L., Fleury-Feith J., Monnet I. i wsp. Immunocytochemical characterization of cell lines from human malignant mesothelioma: characterisation of human mesothelioma cell lines by immunocytochemistry with a panel of monoclonal antibodies. *Hum. Pathol.* 1994; 25: 227–234.
 28. Ordonez N.G. Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22: 1215–1221.
 29. Chu P., Weiss L. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod. Pathol.* 2002; 15: 6–10.
 30. Wick M.R., Moran C.A., Ritter J.H., Mills S.E. Malignant and borderline mesothelial tumors of the pleura. W: Leslie K.O., Wick R.M. (red.). *Practical pulmonary pathology. A diagnostic approach*. Churchill Livingstone 2005; 733–744.