

Diagnostic value of immunohistochemistry in lesions of the endocrine system

Stanisław Sporny, Katarzyna Taran

Department of Dental Pathology Medical University of Lodz

Head of the Department: Stanisław Sporny, M.D., Ph.D., Associate Professor

Abstract

The aim of immunohistochemistry and immunocytochemistry is to reveal specific antigens in cells and tissue samples. Those techniques are based on an antigen-antibody reaction and visualization of its product in microscopic examination. The precursor of this new diagnostic procedure was an immunofluorescent reaction in frozen tissue samples performed by Albert Coons in 1940. Then the immunohistochemical techniques were perfected to increase sensitivity and specificity. Currently it is hard to imagine a modern pathological examination without immunohistochemistry. At the end of XXth century it was believed that 75% of cases is possible to be diagnosed due to immunohistochemical stains.

Microscopic examination of endocrine glands tissue samples is extremely difficult because of coexistence of the presence of neoplasms and endocrine dysfunction. It is necessary to establish the type of hormones in the cells of the endocrine system lesions to make a proper diagnosis. Thanks to the use of antibodies against hormones and its precursors it becomes possible. At present most of the antigens are easily detected in both: formalin fixed paraffin embedded tissues samples and ethanol fixed cytological smears so immunohistochemical and immunocytochemical stains can be a part of routine diagnostic procedures in pathology. However most of

the biologically active substances are revealed in many organs and tissues and it is necessary to perform a satisfactory immunohistochemical panel to be sure the diagnosis. It is important to notice that there is no need to make a wide panel of antibodies in all of the cases and the economical aspect of examination is also important. Of course immunohistochemistry sometimes is the guarantee of proper diagnosis but in some cases too wide panel of antibodies can be a loss for the patient and for medical department.

We discussed the proper diagnostic procedures and immunohistochemical profile in pathological lesions of endocrine system (thyroid and adrenal gland, adenohypophysis, neuroendocrine tumours and some hormones-secreting tumours of gonads).

Key words: *pathology, immunohistochemistry, tumours, endocrine system*



Department of Dental Pathology
Medical University of Lodz,
Czechosłowacka 8/10 str.,
92-916 Lodz, Poland

ph.: (48)(42) 6757635; ph./fax (48)(42) 679 01 91

Znaczenie badań immunohistochemicznych w diagnostyce zmian układu dokrewnego

Stanisław Sporny, Katarzyna Taran

Zakład Patomorfologii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

Kierownik Zakładu: dr hab. med. Stanisław Sporny

Streszczenie

Immunohistochemia i immunocytochemia to technika badawcza, której celem jest ujawnienie swoistych antygenów w komórkach i tkankach na zasadzie wywoływania reakcji antygen-przeciwciała i uwidocznienie tego zjawiska w preparatach mikroskopowych. Za prekursora tej metody diagnostycznej uważa się Alberta Coonsa, który w 1940r. zastosował technikę immunofluorescencji do wykrywania antygenów w mrożonych skrawkach. Później stopniowo udoskonalano te procedury w celu zwiększenia ich czułości i swoistości. Obecnie trudno wyobrazić sobie nowoczesną diagnostykę patomorfologiczną bez tego sposobu badań. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia szacowano, iż zastosowanie odczynów immunocytochemicznych stwarza szansę precyzyjnego rozpoznania w prawie I przypadków.

Patologia mikroskopowa narządów wewnętrznych, w których procesy nowotworowe mogą współistnieć ze zmianami czynnościowymi należy do szczególnie trudnych działów histopatologii. Do bezbłędnego rozpoznawania procesów patologicznych gruczołów dokrewnych istotne wydaje się być ustalenie, jakie hormony zawierają komórki zmiany. Osiągnąć to można poprzez wykorzystywanie przeciwciał skierowanych przeciwko hormonom i ich prekursorom. Większość tych antygenów można poszukiwać w materiale tkankowym utrwalonym w formalinie zatopionym w parafinie albo rozmazach cytologicznych utrwalonych w alkoholu etylowym. Otwiera to drogę do stosowania badań immunohistochemicznych i immunocytochemicznych w ramach rutynowej

diagnostyki patomorfologicznej. Jednak znaczna część biologicznie czynnych substancji obecna jest w różnych narządach i tkankach. Oznacza to, że nie można poprzestać na wykonaniu jednego odczynu, aby być pewnym słuszności sformułowanego rozpoznania. Im więcej przeprowadzi się takich reakcji, tym bliżej prawdy absolutnej znajdzie się wynik badania. W tej grze z naturą należy liczyć się jednak z aspektem ekonomicznym, gdyż podwyższając niepotrzebnie koszt procedury diagnostycznej przynosi się niekiedy w sumie więcej szkody niż korzyści zarówno choremu, jak i placówce medycznej.

Problemy diagnostyki immunohistochemicznej omówione zostaną na przykładzie zmian patologicznych

gruczołu tarczowego, przytarczyc, aparatu wyspowego trzustki, nadnerczy, przysadki mózgowej oraz nowotworów neuroendokrynnych i niektórych hormonalnie czynnych guzów gonad.

Słowa kluczowe: *patomorfologia, immunohistochemia, nowotwory, układ dokrewny*



Zakład Patomorfologii Stomatologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Ul. Czechosłowacka 8/10
92-916 Łódź, tel. (48)(42) 6757635
tel./fax (48)(42) 679 01 91

Immunohistochemia i immunocytochemia to technika badawcza, której celem jest ujawnienie swoistych antygenów w komórkach i tkankach na zasadzie wywoływania reakcji antygen-przeciwciała i uwidocznienie tego zjawiska w preparatach mikroskopowych. Za prekursora tej metody diagnostycznej uważa się Alberta Coonsa, który w 1940r. zastosował technikę immunofluorescencji do wykrywania antygenów w mrożonych skrawkach [1]. Później stopniowo udoskonalano tę procedurę w celu zwiększenia ich czułości i swoistości. Obecnie trudno wyobrazić sobie nowoczesną diagnostykę patomorfologiczną bez tego sposobu badań. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia szacowano, iż zastosowanie odczynów immunocytochemicznych stwarza szansę precyzyjnego rozpoznania w prawie I przypadków [2,3].

Badania immunohistochemiczne i immunocytochemiczne przeprowadza się w celu: określenia kierunku różnicowania komórek nowotworowych cechujących się podobnym wyglądem w preparatach mikroskopowych zabarwionych przeglądowo; ustalenia histogenezy nienowotworowych komórek, nietypowych dla badanego narządu; określenia lokalizacji guza pierwotnego po ujawnieniu przerzutu; immunofenotypowania komórek układu krwiotwórczego i chłonnego w celu odróżnienia rozrostów nienowotworowych od nowotworowych oraz identyfikacji typów nowotworów; wykazania naciekania naczyń przez komórki nowotworowe; ustalenia markerów biologicznych o znaczeniu rokowniczym; identyfikacji pozakomórkowych złogów w tkankach i narządach.

Patologia mikroskopowa narządów wewnętrznych, w których procesy nowotworowe mogą współistnieć ze zmianami czynnościowymi należy do szczególnie trudnych działów histopatologii [4,5]. Kryteria stosowane w diagnostyce mikroskopowej muszą uwzględniać takie odrębności jak np.: niski indeks mitotyczny i małą aktywność proliferacyjną w komórkach zróżnicowanych raków niektórych gruczołów dokrewnych (np. tarczycy), czy polimorfizm jąder komórkowych

w różnych stanach nienowotworowej dysfunkcji narządu. Jednym z podstawowych celów wprowadzenia badań immunohistochemicznych stała się zatem także obiektywizacja rozpoznania histopatologicznych i tym samym ich uwierzytelnienia [6].

Do bezbłędnego rozpoznawania procesów patologicznych gruczołów dokrewnych istotne wydaje się być ustalenie, jakie hormony zawierają komórki zmiany. Osiągnąć to można poprzez wykorzystywanie przeciwciał skierowanych przeciwko hormonom i ich prekursorom [1]. Większość tych antygenów można poszukiwać w materiale tkankowym utrwalonym w formalinie zatopionym w parafinie albo rozmazach cytologicznych utrwalonych w alkoholu etylowym. Otwiera to drogę do stosowania badań immunohistochemicznych i immunocytochemicznych w ramach rutynowej diagnostyki patomorfologicznej. Jednak znaczna część biologicznie czynnych substancji obecna jest w różnych narządach i tkankach. Oznacza to, że nie można poprzestać na wykonaniu jednego odczynu, aby być pewnym słuszności sformułowanego rozpoznania. Im więcej przeprowadzi się takich reakcji, tym bliżej prawdy absolutnej znajdzie się wynik badania. W tej grze z naturą należy liczyć się jednak z aspektem ekonomicznym, gdyż podwyższając niepotrzebnie koszt procedury diagnostycznej przynosi się niekiedy w sumie więcej szkody niż korzyści zarówno choremu, jak i placówce medycznej.

Utrzymuje się nadal w niektórych placówkach na terenie naszego kraju mylne wyobrażenia na temat istoty badań immunohistochemicznych:

- istnieją antygeny swoiste dla określonego typu komórki
- efekt barwny po wizualizacji reakcji immunologicznej jednoznacznie dowodzi obecności poszukiwanego antygeny
- można próbować przeprowadzać badania immunohistochemiczne bez odczynów kontrolnych
- dostępne surowice z przeciwciałami zawsze gwarantują adekwatny rezultat diagnostyczny

- badania immunohistochemiczne warto przeprowadzać we wszystkich tych pracowniach, których personel widzi potrzebę udoskonalenia prowadzonej diagnostyki.

Problemy diagnostyki immunohistochemicznej omówione zostaną na przykładzie zmian patologicznych: tarczycy, przytarczyc, aparatu wyspowego trzustki, nadnerczy oraz rakowiaków, ziarniszcza i nowotworów przysadki mózgowej. Nasze opracowanie nie należy traktować jako systematyczny wykład o immunohistochemii zmian patologicznych gruczołów dokrewnych, lecz raczej jako refleksje na temat tej techniki badawczej, które rodzą się u osób w praktyce zajmujących się tym problemem.

W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia wydawało się, że dobrze zostały poznane zasady rządzące diagnostyką immunohistochemiczną zmian patologicznych tarczycy [1]. Sądono, że oznaczenie podstawowych antygenów zagwarantuje bezbłędne rozpoznanie diagnozowanego procesu.

Później okazało się, że diagnostyka immunohistochemiczna musi być dalej udoskonalana, gdyż w wielu przypadkach przeprowadzenie jednego czy dwóch odczynów nie jest w stanie zapewnić rozwiązania zagadek budowy mikroskopowej zmian nowotworowych i rzekomonowotworowych. W 2003 roku w Poznaniu wygłoszony został ciekawy referat, w którym zostało postawione kardynalne pytanie. „Badania immunohistochemiczne w guzach tarczycy. Czy to już standard?” (D. Lange, B. Nikiel). Odpowiedź mogła być tylko jedna – twierdząca. Wiadomo dziś, że badania

immunohistochemiczne w patologii tarczycy pomagają w diagnostyce: rozrostu komórek C, raka rdzeniastego, raka brodawkowego, guzów pęcherzykowych, szczególnych form gruczolaków, nietypowych pierwotnych raków, raka wyspowego, raka niezróżnicowanego, pierwotnego chłoniaka złośliwego, nowotworów przerzutowych [6].

Preparaty mikroskopowe zabarwione przegładowo hematoksyliną i eozyną nie pozwalają na rozpoznanie, a niekiedy nawet nie uwidaczniają rozrostów komórek C w tarczycy. Odczyny immunohistochemiczne służą diagnostyce tego procesu. Rozrost komórek C rozpoznaje się wówczas, gdy uwidoczniemy w cytoplazmie następujące antygeny: kalcytoninę (+), chromograninę (+), czasem CEA (+) [7]. Badanie immunohistochemiczne na obecność kalcytoniny powinny być rutynowo wykonywane w materiale tkankowym po profilaktycznej tyreoidektomii u osób z wykrytą mutacją protoonkogenu RET [6]. Rozrost komórek C trzeba jednak różnicować z litymi gniazdami komórkowymi [5]. Lite gniazda komórkowe mają następujący profil antygenowy: galektyna 3 (+) w całej zmianie; komórki główne: CEA (+), keratyny LMW i HMW (+), somatostatyna (+); komórki C: kalcytonina (+), CGRP (+), chromogranina (+) [8].

Lite gniazda komórkowe są pozostałościami ciałek ultimobronchialnych. Ich obecność w tarczycy uważa się za zjawisko fizjologiczne. Znajomość tych struktur przydaje się podczas oceny mikroskopowej gruczołu tarczowego, gdyż należy je różnicować z: ogniskami metaplastji płaskonabłonkowej, przerzutem raka płaskonabłonkowego, mikro-rakiem brodawkowym, pozostałościami przewodu tarczowo-językowego i rozrostem komórek C [5].

Tabela I. Podstawowe antygeny odgrywające istotną rolę w rozpoznawaniu zmian patologicznych tarczycy.

Antygen	Charakterystyka	Zmiany patologiczne
tyreoglobulina	marker różnicowania pęcherzykowego komórek	gruczolak pęcherzykowy; rak pęcherzykowy; nowotwory z komórek Hürthla; rak brodawkowy; rak wyspowy; tarczycza ektopowa; odszczepy tarczycy
kalcytonina	marker komórek C	rak rdzeniasty; nienowotworowy rozrost komórek C; lite gniazda komórkowe
antygen karcinoembrionalny (CEA)	antygen tkanek zarodkowych i nowotworów pochodzenia ekto- i endodermalnego	rak rdzeniasty; rozrost komórek C (czasem)
chromogranina	marker neuroendokrynnny	rak rdzeniasty; przyzwojak niechromochłonny
cytokeratyna	marker nabłonkowy	gruczolak pęcherzykowy; rak brodawkowy; rak pęcherzykowy; rak wyspowy; rak anaplastyczny (50%); rak rdzeniasty
wspólny antygen leukocytny (LCA)	marker krwinek białych	chłoniak złośliwy
białko S-100	marker m.in. komórek Schwanna	nowotwory z komórek Hürthla; różna ekspresja w pozostałych nowotworach nabłonkowych; przyzwojak niechromochłonny; rak rdzeniasty; przyzwojak niechromochłonny

Obecnie w dobie komputeryzacji życia naukowego nieocenionym źródłem danych na temat trendów w diagnostyce immunohistochemicznej stał się Internet [9]. Można znaleźć tam informacje o aktualnie prowadzonych pracach badawczych, ich skali i uzyskiwanych wynikach. W naszym ośrodku korzystamy w praktyce z Immunohistochemistry Literature Database System. Oczywiście do zawartych tam informacji należy niekiedy podchodzić z pewną rezerwą, gdyż nierzadko wyniki analizy kilku antygenów pochodzą z jednej, pionierskiej publikacji i nie zostały jeszcze zweryfikowane. Tym niemniej uważamy za celowe zapoznanie Czytelników z wybranymi danymi na temat immunohistochemii guzów gruczołów wydzielania wewnętrznego, które uzyskaliśmy również z Internetu. W tabeli II przedstawione zostały wyniki badań immunohistochemicznych raka rdzeniastego tarczycy [10]. Zwraca uwagę fakt, że wbrew wcześniejszym informacjom z piśmiennictwa obecnie zawsze ujawnia się w komórkach tego nowotworu kalcytoninę [5].

Tabela II. Rak rdzeniasty tarczycy – typowe antygeny.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
CGRP (calcitonin gene related protein)	100%	33
chromogranina B	100%	16
Keratyna 7	100%	16
NSE	100%	10
sekretogranina II	100%	16
synaptofizyna	100%	5
kalcytonina	100%	328
TTF-1	98%	43
chromogranina A	97%	56
wimentyna	60%	22
PRb	50%	6
galektyna 3	45%	18
tyreoglobulina	6%	123
CD 117	0%	7
EMA	0%	1

Najczęstszym pierwotnym nowotworem złośliwym gruczołu tarczowego jest rak brodawkowaty. Niektóre jego typy mikroskopowo sprawiają poważne trudności w diagnostyce mikroskopowej, stąd wykorzystanie techniki immunohistochemicznej staje się niekiedy oczywistą koniecznością. W tabeli III zestawione zostały aktualne dane na temat tych analiz. Zwraca uwagę fakt, że antygeny tak typowe dla nowotworów wywodzących się z komórek nabłonka pęcherzyków tarczycy nie są obecne we wszystkich przypadkach raka brodawkowego gruczołu tarczowego [11]. Szczególnie ważną sprawą w diagnostyce immunohistochemicznej raka tarczycy jest dobór właściwej metody wizualizacji, jak również stosowanie

odpowiedniego systemu kontroli jakości badań. Niektóre nowotwory tarczycy zawierają duże ilości endogennej biotyny, co praktycznie ogranicza, albo wręcz wyklucza stosowanie ich w diagnostyce szeroko rozpowszechnionych metod opartych na powinowactwie awidyny do biotyny. Przykładem nowotworu bogatego w endogenną biotynę może być rak brodawkowaty tarczycy, który zarówno w formie pierwotnej, jak i przerzutowej daje silną reakcję ze streptawidyną. Istnieje oczywiście sposób na zablokowanie endogennej biotyny, ale jest to kolejny, dodatkowy etap i tak już czasochłonnej i dość kosztownej metodzie oznaczeń.

Tabela III. Rak brodawkowaty tarczycy – typowe antygeny.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
AE1-AE3	100%	5
CAM 5.2	100%	?
CA 15-3	100%	14
CD 117	100%	9
CD 57	100%	23
Keratyny: 7, 8, 17, 18	100%	3-13
Keratyny HMW	100%	20
pankeratyna	100%	18
wimentyna	100%	13
TTF-1	96%	23
galektyna 3	94%	283
VEGF	90%	10
tyreoglobulina	90%	92
cyklina E	87%	59
Keratyna 19	87%	398 - tylko reakcja błonowa
EMA	83%	57
CA 19-9	81%	57
PRb	0%	23

Bardzo przydatnym w rozpoznawaniu zwłaszcza pęcherzykowej postaci raka brodawkowego tarczycy jest analiza ekspresji keratyny 19 obecnej bardzo często w komórkach tego guza [4]. Nie jest to jednak antygen swoisty tylko dla tego raka. Keratyna 19 jest też stwierdzana w: ogniskach metaplastji płaskonabłonkowej, nienowotworowych komórkach pęcherzykowych ulegających zmianom wstecznym, nabłonku pęcherzyków w przewlekłym zapaleniu tarczycy [1]. Podobnie, zbliżoną ekspresję p63 stwierdza się w raku brodawkowym tarczycy i przewlekłym zapaleniu tarczycy. Być może dowodzi to związku patogenetycznego obu procesów [12]. Natomiast warto wspomnieć, że ekspresja c-met jest silna w typie wysokokomórkowym raka brodawkowego tarczycy, formy bardziej inwazyjnej aniżeli klasyczny typ tego guza [13].

Nie zawsze ujawnienie tyreoglobuliny dowodzi, że komórki zawierające ten antygen wywodzą się z nabłonka pęcherzyków tarczycy. Tyreoglobulina jest też obecna w histiocytach węzłów chłonnych

szy z towarzyszącym rakiem tarczycy [14]. W tym przypadku rozpoznanie przerzutu raka musi być poparte wynikami innych obserwacji, w tym oceny histopatologicznej preparatów mikroskopowych i oznaczeń antygenów typowych dla histiocytów (np. CD 68)

Dla guzów pęcherzykowych tarczycy typowe są antygeny zestawione w tabeli IV. Pod pojęciem guz pęcherzykowy kryją się trzy różniące się biologią procesy rozrostowe: nienowotworowe guzki w wolu, łagodne nowotwory - gruczolaki pęcherzykowe i złośliwe nowotwory - raki pęcherzykowe.

Tabela IV. Guz pęcherzykowy tarczycy – typowe antygeny.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
AE1-AE3	100%	2
CA 15-3	100%	5
Keratyny: 7, 8, 18	100%	20-29
pankeratyna	100%	25
wimentyna	100%	28
TTF-1	98%	35
tyreoperoksydaza	95%	20
VEGF	90%	10
tyreoglobulina	90%	106
CD 117	85%	13
cyklina E	83%	57
keratyna 19	50%	155
CD 57	48%	40
galektyna 3	39%	254
CA 19-9	11%	57
Keratyny HMW	0%	8

Diagnostyka mikroskopowa rozrostów pęcherzykowych należy do najtrudniejszych zadań dla histopatologa zajmującego się patologią tarczycy [15]. Jedynym antygenem, którego ekspresja różnicuje niezłośliwe procesy od raka jest białko retinoblastoma [9]. Przestrzegalibyśmy jednak przed bezkrytycznym przyjmowaniem tego faktu jako uniwersalnego klucza (tabela V).

Tabela V. Łagodny guz tarczycy – najistotniejsze antygeny.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
pRb	100%	32
wimentyna	100%	14
cyklina E	83%	57
EMA	46%	22
keratyna 19	42%	174
CA 19-9	21%	29
galektyna 3	16%	237
CD 117	0%	3
keratyny HMW	0%	5

Szczególną formą gruczolaka pęcherzykowego tarczycy jest gruczolak beleczkowy szkliwiejący. W obrazie cytologicznym (biopsja cienkoigłowa) poprzez obecność bruzd jądrowych i wakuol śródjądrowych w komórkach ludzko przypomina raka brodawkowatego, w obrazie histopatologicznym jest podobny do raka rdzeniastego i przyzwojaka niechromochłonnego. Badania immunohistochemiczne w jego przypadku mają wartość rozstrzygającą [6]. Gruczolaka beleczkowego szkliwiejącego cechują bowiem: tyreoglobulina (+), EMA (+), błonowa ekspresja Ki-67 (+), galektyna 3 (+), w 86% przypadków (odczyn cytoplazmatyczny).

Trudności w diagnostyce mikroskopowej przysparzają też niekiedy rozrosty onkocytów w tarczycy. Badania immunohistochemiczne mogą i w tych przypadkach pomóc podjąć właściwą decyzję diagnostyczną [16].

Guzy onkocytarne cechują następujące antygeny: tyreoglobulina (+), CEA (+), S-100 (+), TTF-1 (+) (tylko 20%), keratyny (-) 5/6, 10, 16, 17, 19.

W tabeli VI przedstawiona została ekspresja keratyn w komórkach raka pęcherzykowego i brodawkowatego tarczycy [17]. Porównanie to uwidacznia, jak trudne może okazać się do odróżnienia postaci pęcherzykowej raka brodawkowatego tarczycy od raka pęcherzykowego tego gruczołu. Największą wartość diagnostyczną wydaje się mieć analiza ekspresji keratyn 5 i 6.

Tabela VI. Ekspresja cytokeratyn w rakach brodawkowatych i pęcherzykowych tarczycy.

Typ cytokeratyn	Rak brodawkowaty (%)	Rak pęcherzykowy (%)
8	100	100
18	100	100
7	100	100
19	98	84
1, 5, 10, 11/14	97	22
5, 6	68	8
17	40	15
20	26	12

Trzeba jednak zaznaczyć, iż część zdefiniowanych przez morfologię jąder komórkowych raków brodawkowatych wykazuje cechy wzrostu i inwazji charakterystyczne dla raków pęcherzykowych. Ponadto guzy tego typu zawierają w utkaniu pola komórek z mniejszymi jądrami z charakterystyczną dla raków pęcherzykowych gruboziarnistą chromatyną. Są to tzw. raki hybrydowe tarczycy [18].

Raka hybrydowego tarczycy cechują zatem: część jąder o cechach raka brodawkowatego, część jąder z rysunkiem chromatyny jak w raku pęcherzykowym, charakter naciekania i rozsiewu jak w raku pęcherzykowym, heterogenna ekspresja: keratyny 5, 6, 19, galektyna 3, HBME-1, Ret/PTC immuno-

histochemicznie (+) ogniskowo, gdzie cechy cytologiczne typowe dla raka brodawkowatego [6].

Diagnostyka mikroskopowa nieodróżnicowanego raka tarczycy jest czasem bardzo trudna poprzez dużą zmienność wyglądu niedojrzałych w istocie komórek nowotworowych. W tabeli VII zostały zestawione najistotniejsze fakty z zakresu immunohistochemii tego bardzo inwazyjnego nowotworu [1,6].

Tabela VII. Nieodróżnicowany rak tarczycy – typowe antygeny.

Antygen	Wyniki odczynów
keratyny LMW	75%
AE1-AE3	75%
wimentyna	50-100%
tyreoglobulina	zmienna, raczej słaba reakcja (30% we wrzecionowatokomórkowym)
VEGF	silna reakcja w pobliżu pól martwicy
p53	silna reakcja
Ki-67	silna reakcja
CD 34	0%
TTF-1	0% (mało obserwacji)

Bardzo inwazyjnym, pierwotnym nowotworem tarczycy jest też rzadko rozpoznawany rak wyspowy. Cechuje się on nieco lepszym rokowaniem aniżeli rak nieodróżnicowany. Podstawowym antygenem różnicującym oba te guzy jest tyreoglobulina. W raku wyspowym tarczycy stwierdza się zawsze silną ekspresję tyreoglobuliny [4].

Klasycznym pierwotnym nienabłonkowym nowotworem tarczycy jest chłoniak. Wyróżnia się jego cztery formy: rozlany wielkokomórkowy chłoniak B, chłoniak typu MALT, chłoniak gruczolowy, ziarnica złośliwa [6]. Ich diagnostyka immunohistochemiczna odbywa się w myśl identycznych zasad, jakie obowiązują w rozpoznawaniu nowotworów węzłów chłonnych [1].

Procesem rozrostowym sporadycznie odnotowywanym w mięszu tarczycy, który w biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej bywa mylony z rakiem brodawkowatym gruczołu tarczowego jest histiocytoza z komórek Langerhansa [7]. Jądra komórek w histiocytozie zawierają wyraźne bruzdy, które sugestywnie imitują analogiczne zjawisko obserwowane w jądrach komórek raka.

Histiocytózę z komórek Langerhansa charakteryzują następujące antygeny: S-100 (+), CD1a (+), lizozym (+), KP-1 (+), CD 68 (+) w towarzyszących histiocytach [5,7].

Badania immunohistochemiczne w diagnostyce guzów tarczycy stosowane rutynowo pozwalają zatem: rozpoznać rozrosty komórek C tarczycy, potwierdzić rozpoznania raków rdzeniastych, anaplastycznych i wyspowych, potwierdzić rozpoznania rzadkich pierwotnych nowotworów tarczycy i przerzutów nowotworowych, przeprowadzić

typizację chłoniaków tarczycy, potwierdzić rozpoznanie gruczolaka beleczkowego szklawiejącego [6].

Badania immunohistochemiczne nie ograniczają się jedynie do zmian patologicznych tarczycy, choć wykonuje się je w przypadku tego gruczołu w praktyce diagnostycznej najczęściej. Mają one duże znaczenie również w rozpoznawaniu procesów chorobowych w położonych w pobliżu przytarczycach. Pierwotny rozrost komórek głównych przytarczyc rozpoznaje się immunohistochemicznie oznaczając: pankeratynę (+), chromograninę (+), parathormon (+) (słaby odczyn) – mała zawartość hormonu w komórce, słabsza reakcja niż w niezmienionym gruczole, S-100 (+), ogniskowo, kalcytoninę/CGRP (+) (ujawniono w 10 na 12 przypadków), cyklinę D1 (indeks 61%) [1,7].

Rozrost komórek oksyfilnych przytarczyc cechują natomiast immunohistochemicznie: pankeratyna (+), chromogranina (+), parathormon (-) prawie zawsze, CD 4 (-) [1].

Gruczolaka przytarczyc w badaniach immunohistochemicznych charakteryzują: keratyny (+) 8, 18, 19; parathormon: odczyn niepewny, słabszy niż w pierwotnym rozroście; chromogranina (+), odczyn słabszy niż w rozroście; neurofilamenty (+), 33%; tyreoglobulina (-), p27 (indeks: 56%); cyklina D1 (indeks: 39%); MIB-1 (niski indeks); pRb (+), 100% [19].

Diagnostyka immunohistochemiczna raka przytarczyc jest trudna i opiera się na następujących ustaleniach: parathormon (+), keratyny (+) 8, 18, 19, MIB-1, Ki-67 (wysokie indeksy), cyklina D1 (indeks: 91%), p27 (indeks: 14%), inne markery cyklu komórkowego (wysokie indeksy), pRb: brak przekonujących danych. Warto pamiętać, że p53 nie różnicuje raka od gruczolaka.

Nowotwory wysp trzustkowych poddawane są również analizie immunohistochemicznej. Ich rozpoznawanie jest skomplikowane, a ustalenie złośliwości biologicznej guza stanowi niekiedy prawdziwe wyzwanie dla patomorfologa. Nowotwory wysp trzustkowych (czynne i nieczynne hormonalnie) wyróżniają się następującym profilem antygenowym: pankeratyna (+), chromogranina (+), synaptofizyna (+), NSE (+), Leu-7 (+), PGP 9.5 (+), HISL (+), większość guzów (+) w odczynach na więcej niż jeden hormon (insulina, glukagon, somatostatyna, VIP, polipeptyd trzustkowy), trypsina (-), amylaza (-), lipaza (-), wimentyna (-), TTF-1 (-), CA 19-9 (-) [1].

W uzupełniającej diagnostyce immunohistochemicznej insulinoma uwzględnia się następujące fakty: insulina (+), preinsulina (+), czasem (+) glukagon, somatostatyna, PP, gastryna, kalcytonina, ACTH. Komórki glukagonoma zawierają następujące antygeny: glicentyna (+), peptyd zbliżony do glukagonu (+), czasem (+) somatostatyna, insulina [7].

W uzupełniającej diagnostyce PP-oma należy kierować się następującymi zasadami: PP (+), czasem

(+) inne peptydy endokrynne. Jest to guz najczęściej nieczynny hormonalnie, rzadko zespół WDHA.

Uzupełniająca diagnostyka hormonalna gastrinoma: gastryna (+), ale nie zawsze, przeciwciała przeciw -C i -N końcom cząsteczki gastryny (+), często (+) glukagon, PP, insulina, somatostatyna, serotonina, ACTH [1].

Uzupełniająca diagnostyka immunohistochemiczna VIP-oma opiera się na oznaczeniach: VIP (+), GRH (+) 50%, PP (+) 53%. Uwaga guz często klinicznie współistnieje z zespołem WDHA (20). Immunohistochemiczne różnicowanie niezłośliwych i złośliwych nowotworów wysp trzustkowych jest trudne. Pomagają w tym następujące odczyny: α podjednostka hCG przemawia za łagodnością procesu (?? – sprzeczne dane w piśmiennictwie), guzy z indeksem PCNA > 5% szerzą się poza trzustkę, wysoki indeks Ki-67 przemawia za biologiczną złośliwością guza [1,4].

Diagnostyka immunohistochemiczna nesidioblastosis opiera się na następujących cechach zmiany: chromogranina (+), synaptofizyna (+), NSE (+), w postaci ogniskowej (+) insulina, glukagon, somatostatyna, PP; wyraźna dominacja komórek insulinopozytywnych; w postaci rozlanej: brak dominacji komórek insulinopozytywnych [7].

W trzustce obok nowotworów wywodzących się z klasycznych komórek wysp trzustkowych zdarzają się inne guzy neuroendokrynne. Spośród nich na uwagę zasługują rakowiaki. Klucz diagnostyczny w rakowiaku trzustki to: serotonina (+), 5-hydroksytryptofan (+), z reguły duży guz, często złośliwy przebieg (w 68-88% przypadków). W tabeli VIII zebrane zostały najważniejsze informacje na temat aktualnego stanu badań nad profilem antygenowym rakowiaków [9].

Tabela VIII. Typowe antygeny rakowiaków.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
chromogranina B	100%	3
keratyny LMW	99%	62
synaptofizyna	96%	217
chromogranina A	92%	635
AE1-AE3	79%	132
NSE	78%	1094
CEA-P	40%	394
NFP	0%	72

Rakowiaki u ludzi występują w różnych narządach: żołądkowo-jelitowe 74%, płucne 25%, o innym umiejscowieniu 1% [4].

Rakowiaki jajnika przyjmują cztery formy histokliniczne: wyspowy, beleczkowy, związany z wollem jajnika, przerzutowy. Różnią się one profilem antygenowym. Wyniki odczynów immunohistochemicznych w rakowiakach przewodu pokarmowego zależą także od ich umiejscowienia [1].

W różnicowaniu folliculoma w jajniku z rakowiakami najważniejszą wartość diagnostyczną wydają się mieć odczyny na wimentynie i inhibinę (tabela IX) [9].

Tabela IX. Ziarniszcak jajnika – typowe antygeny.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
wimentyna	100%	241
kalretynina	100%	80
inhibina	98%	279
SMA	90%	60
WT-1	62%	21
CAM 5.2	44%	160
S-100	42%	112
AE1-AE3	37%	122
pankeratyna	18%	154
desmina	17%	95 – tylko postać młodzieńcza
EMA	1%	164
AFP	0%	41

Istnieją też mieszane guzy zewnątrzwydzielnicze/zrazikowe i endokrynne trzustki. Ich diagnostyka immunohistochemiczna polega na poszukiwaniu: markerów nabłonka zrazików (+) - trypsyna, lipaza, chymotrypsyna, keratyny; markerów endokrynnych (+) [7].

Jednym z zasadniczych problemów w diagnostyce guzów kory nadnercza jest ich różnicowanie z: przerzutem raka wątrobowokomórkowego, naciekiem lub przerzutem raka nerki, niektórymi przypadkami barwiaka chromochłonnego, przerzutami raków gruczołowych przewodu pokarmowego [1].

Za najbardziej przydatne diagnostycznie antygeny w raku kory nadnercza uważa się obecnie: Melan A (MART-1) – przeciwciała A103 (+), przeciwciała D 11 (+), odczyn jądrowy (cytoplazmatyczny: raki nerki, wątroby, płuc), inhibina alfa (+), (odczyn negatywny: raki nerki, wątroby), wimentyna (+), chromogranina (-), CEA (-), alfa-fetoproteina (-), S-100 raczej (-), EMA (-) [9].

W tabeli X zebrano najnowsze dane na temat aktualnego stanu badań nad immunohistochemia phaeochromocytoma [9].

Za złośliwością phaeochromocytoma przemawiają: nadekspresja p53, wysoki indeks MIB-1, wysoki indeks bcl-2, brak ekspresji S-100 (wiąże się z dużymi rozmiarami guza) [21].

Diagnostyka immunohistochemiczna neuroblastoma rdzenia nadnercza to w sumie odrębny problem [22]. Nowotwór ten charakteryzuje się: NSE (+) 85 – 100%, synaptofizyna (+) zazwyczaj, PGP 9.5 (+) 90% (protein gen product), Leu-7 (+) dość często, chromogranina A (+) 52%, chromogranina B (+) 45%, NFP (+) 80%, NB 84 (+) 99% (często ekspresja w innych typach guzów), wimentyna (+) 30%, neuropeptyd Y (+) 10%, pankeratyna (-), CD

Tabela X. Barwiak chromochłonny rdzenia nadnercza – typowe antygeny.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
BFGF -Basic fibroblastic growth factor	100%	33
B- tubulina	100%	18
Katepsyna B	100%	33
Katepsyna D	100%	33
CD 68	100%	5
c-met	100%	33
Kolagenaza IV	100%	33
Chromogranina A	99%	137
Synaptofizyna	99%	122
NFP	92%	69
CD 56	91%	77
bcl-2	71%	58
S-100	67%	127
Wimentyna	40%	63
Pankratyna	13%	149
Somatostatyna	13%	104
Serotonina	7%	76
EMA	0%	1
TTF-1	0%	1

99 (-) ważny antygen dla diagnostyki różnicowej, HSN 1.2 (+) i HLA epitop W6/32 w skrawkach mrożonych [7].

Pierwotny czerniak rdzenia nadnercza zazwyczaj nie sprawia dużych trudności w diagnostyce immunohistochemicznej, bowiem w jego komórkach stwierdza się: HMB 45 (+), S-100 (+), wimentyna (+) [5]. Podobnie, rzadki pierwotny adenomatoid tumor rdzenia nadnercza ma ściśle sprezygowany profil antygenowy: pankratyna (+), EMA (+), wimentyna (+), chromogranina (-), markery międzybłonka (+) [7].

Diagnostyka guzów przysadki mózgowej jest trudna, co wynika zarówno z ich lokalizacji i związanej z nią symptomatologii klinicznej, różnorodności form histopatologicznych i czynnościowych oraz trudnych do jednoznacznego zdefiniowania wykładników złośliwości biologicznej [23]. Praktycznie użyteczny podział guzów przysadki mózgowej zawarty został w tabeli XI.

Tabela XI. Mikroskopowa klasyfikacja guzów przysadki mózgowej.

A. Gruczolak
1. Typowy
2. Atypowy (polimorfizm komórkowy, wysoki indeks MIB-1)
Jeśli można ustalić charakter wzrostu:
1. Rozprężający
2. Naciekający w obrazie mikroskopowym (kość, nerwy, naczynia, etc.)
B. Rak (przerzuty albo naciekanie mózgu)
C. Nie – gruczolak
1. Pierwotne lub wtórne guzy pozaprzysadkowe
2. Pierwotny rozrost imitujący gruczolaka

Ogólne zasady diagnostyki immunohistochemicznej gruczolaków przysadki mózgowej ilustruje tabela XII.

Tabela XII. Gruczolaki przysadki – analiza immunohistochemiczna niezależnie od aktywności hormonalnej.

Antygen	Wynik pozytywny	Liczba opublikowanych przypadków
Pankratyna	100%	4
chromogranina	100%	32
CAM 5.2	94%	32
synaptofizyna	92%	35
NSE	80%	39
keratyna 7	10%	32
S-100	0%	36
TTF-1	0%	20
GFAP	0%	3
Desmina	0%	4
Wimentyna	0%	?

Za inwazyjnością pierwotnego nowotworu przysadki mózgowej przemawiają: silna ekspresja p53 i indeks MIB-1 powyżej 3% [24].

Aktualny podział gruczolaków przysadki mózgowej uwzględniający ich czynność endokrynną uwidacznia, jakie uzupełniające odczyny na produkty białkowe komórek nowotworowych należy, w sytuacji potrzeb diagnostycznych, zaplanować [24]. Podajemy anglojęzyczną wersję tego podziału ze względu na brak obowiązujących ustaleń w zakresie polskiego mianownictwa.

1. Growth hormone cell adenoma
2. Prolactin cell adenoma
3. Mixed growth hormone cell and prolactin cell adenoma
4. Acidophil stem cell adenoma
5. Mammosomatotroph cell adenoma
6. Corticotroph cell adenoma (functioning, non-functioning)
7. Thyrotroph cell adenoma
8. Gonadotroph cell adenoma
9. Non-functioning adenoma (non-oncogenic, oncogenic)
10. Plurihormonal adenoma

Warto zaznaczyć, przy okazji, że: w gruczolaku wytwarzającym prolaktynę: chromogranina A(-), chromogranina B (+), synaptofizyna (-); w gruczolaku z kwasochłonnych komórek macierzystych: GH (+), PRL (+); w nieczynnym hormonalnie gruczolaku kortykotropowym nieliczne komórki: GH (+), PRL (+); w gruczolaku wielohormonalnym reakcja immunohistochemiczna (+) na więcej niż jeden hormon [7].

Diagnostyka immunohistochemiczna przerzutów w przysadce mózgowej jest przydatna w rozpoznawaniu: kobiety, w I rzędzie: markery raka sutka, płuca, żołądka; mężczyźni, w I rzędzie: markery

raka płuca, gruczołu krokowego, żołądka; bez związku z płcią, markery rozrostów układu krwiotwórczego i chłonnego [4].

Dokładny przegląd, z konieczności bardzo pobieżny i wybiórczy, aktualnych możliwości diagnostycznych płynących z zastosowania odczynów immunohistochemicznych w patologii endokrynologicznej dowodzi, iż metoda ta głęboko zakorzeniła się w praktyce medycznej i stanowi niezbędny oręż w ujawnianiu rzeczywistego charakteru wielu procesów chorobowych toczących się w gruczołach wydzielania wewnętrznego.

neuroendocrine profile of pancreatic VIPomas and extrapancreatic, VIP producing neurogenic tumors. *Ann NY Acad Sci* 1988; 527: 508-517.

21. DeKrijger RR, van der Harst E, van der Ham F. Prognostic value of p53, bcl-2 and c-erb-2 protein expression in pheochromocytomas. *J Pathol* 1999; 188: 51-55.
22. Cohn SL. Diagnosis and classification of the small round-cell tumors of childhood. *Am J Pathol* 1999; 155: 11-15.
23. Kovacs K, Scheithauer BW, Horvath E, Lloyd RV. The WHO classification on adenohypophyseal neoplasms. A proposed five-tier scheme. *Cancer* 1996; 78: 502-510.
24. Ironside JW, Moss TH, Louis DN et al. Diagnostic pathology of nervous system tumours. Churchill Livingstone, London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 2002.

Piśmiennictwo

1. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia, 2002.
2. Lai CR, Pan CC. Contribution immunocytochemistry in routine diagnostic cytology. *Diagn Cytopathol* 1996; 14: 221-225.
3. Shield PW, Perkins G, Wright RG. Immunocytochemical staining of cytologic specimens. How helpful is it? *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 157-162.
4. LiVolsi VA, Asa SL. Endocrine pathology. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia, 2002.
5. Sporny S. Cytodiagnostyka chorób tarczycy. Studio Graficzne Sobiepański-Trocha s.c., Łódź, 1999.
6. Lange D, Nikiel B, Niżyński J. Badania immunohistochemiczne w raku tarczycy. Czy to już standard? W druku.
7. Wenig BM, Heffes CS, Adair CF. Atlas of endocrine pathology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 1997.
8. Faggiano A, Talbot M, Baudin E et al. Differential expression of galectin in solid cell nests and C cells of human thyroid. *J Clin Pathol* 2003; 56: 142-143.
9. <http://www.immunoquery.com>
10. Katoh R, Miyagi E, Nakamura N et al. Expression of thyroid transcription factor (TTF-1) in human C cells and medullary thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 2000; 31: 386-393.
11. Srodon M, Westra WH. Immunohistochemical staining for thyroid transcription factor-1: a helpful aid in discerning primary site of tumor origin in patients with brain metastases. *Hum Pathol* 2002; 33: 642-645.
12. Unger P, Ewart M, Wang BZ et al. Expression of p63 in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis: a pathobiologic link? *Hum Pathol* 2003; 34: 764-769.
13. Nardone HC, Ziober AF, LiVolsi VA et al. C- met expression in tall cell variant papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer* 2003; 98: 1386-1393.
14. Venkatraman L, Maxwell P, McCluggage WG. Thyroglobulin immunoreactivity in lymph node histiocytes: a potential diagnostic pitfall. *J Clin Pathol* 2002; 118: 165-166.
15. Baloch ZW, LiVolsi V. The quest for a magic tumor marker. Continuing saga in the diagnosis of the follicular lesions of thyroid. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 165-166.
16. Gaffney RL, Carney JA, Sebo TJ et al. Galectin-3 expression in hyalinizing trabecular tumors of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 494-498.
17. Lam KY, Lui MC, Lo CY. Cytokeratin expression profiles in thyroid carcinomas. *EJSO* 2001; 118: 631-635.
18. Mai KT, Bokhary R, Yazdi HM, Thomas J. Hybrid thyroid carcinoma with a coarse chromatin pattern and nuclear features of papillary thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 253-260.
19. Stojadinovic A, Hoos A, Nissan A et al. Parathyroid neoplasms: clinical, histopathological and tissue microarray-based molecular analysis. *Hum Pathol* 2003; 34: 54-64.
20. Solcia E, Capella C, Riva C. The morphology and