

## Znaczenie reakcji immunohistochemicznych w różnicowaniu raka gruczołowego i płaskonabłonkowego płuca w małych wycinkach i w bloczkach parafinowych wykonanych z materiałów cytologicznych



The importance of immunohistochemistry for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in small samples and cytology specimens

Renata Langfort<sup>1</sup>, Małgorzata Szotkowska<sup>1</sup>, Ewa Szczepulska-Wójcik<sup>1</sup>, Naim Qandil<sup>1</sup>, Beata Maksymiuk<sup>1</sup>, Dorota Giedronowicz<sup>1</sup>, Piotr Rudziński<sup>2</sup>, Tadeusz M. Orłowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Patomorfologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

<sup>2</sup>Klinika Chirurgii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2012; 2: 202–209

### Streszczenie

**Wstęp:** Określenie podtypu zaawansowanych postaci niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. *non-small-cell lung cancer* – NSCLC), a przede wszystkim odróżnienie gruczolaka (ang. *adenocarcinoma* – ADC) od raka płaskonabłonkowego (ang. *squamous cell carcinoma* – SCC) często wymaga wykonania barwień dodatkowych i reakcji immunohistochemicznych (IHC).

**Metody:** W 53 przypadkach NSCLC, rozpoznanych w małych wycinkach i w materiale cytologicznym, wykonano panel przeciwciał zawierający markery charakterystyczne dla ADC (TTF-1, napsin A, CK7) i SCC (p63, CK5/6, CK34βE12) oraz barwienie mucykarminem w celu potwierdzenia obecności śluzu w komórkach raka. Wyniki porównywano z rozpoznaniem z materiału pooperacyjnego.

**Wyniki:** W 57% przypadków typ raka ustalono na podstawie barwienia hematoksyliną i eozyną (H+E). Barwienia dodatkowe zwiększyły prawidłowość rozpoznania o 22%. Dla SCC największą swoistość wykazywało przeciwciało p63, którego ekspresję stwierdzono w większości SCC, mniej skuteczne okazało się CK5/6. Dla ADC najbardziej przydatne były TTF-1 i napsin A, występujące w ok. 60% ADC. Charakteryzowały się wysoką swoistością, ale podobnie jak p63 małą czułością. Przeciwciała CK7 i CK34βE12 były najmniej swoiste i mało pomocne w diagnostyce różnicowej NSCLC. Barwienie na śluz, mimo niskiej czułości, okazało się przydatne w rozpoznaniu ADC TTF-1-negatywnych.

### Abstract

**Introduction:** In many cases typing of advanced lung non-small cell carcinoma (NSCLC), especially differentiation between adenocarcinoma (ADC) and squamous cell carcinoma (SCC), requires special stains, mainly immunohistochemistry (IHC).

**Methods:** 53 cases of NSCLC diagnosed on small biopsies and cell block samples were evaluated. The panel of IHC antibodies comprised markers characteristic for ADC (TTF-1, napsin A, CK7) and for SCC (p63, CK5/6, CK34βE12) in order to determine their value in diagnosis of NSCLC. Besides IHC, mucicarmine stain was tested. Results were correlated with the final diagnosis obtained from surgical specimens.

**Results:** In 57% of cases the subtype of NSCLC was established only by H+E stain. Using mucin stain and immunohistochemistry the accuracy of diagnosis increased by 22% to reach 79%. P63 turned out to be the most specific antibody, whose expression was seen in the vast majority of SQCC and in a squamous component of other types of NSCLC. CK5/6 exhibited similar specificity to p63 but was lower in sensitivity. TTF-1 and napsin A were the most useful antibodies for ADC and a positive reaction was seen in about 60% of ADC. Both markers were highly specific but, like p63, less sensitive. Since CK7 and CK34 proved less specific, their value in typing of NSCLC was limited. Mucin stain seemed to be a valuable marker but not very sensitive, although it was very helpful in diagnosis of TTF-1 negative ADC.

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Renata Langfort, Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa, tel. +48 22 431 22 57; faks +48 22 431 24 27, e-mail: r.langfort@igichp.edu.pl

**Wnioski:** Stosowanie reakcji IHC zwiększa możliwość ustalenia typu NSCLC. Najkorzystniejszym zestawem pozwalającym na różnicowanie ADC i SCC był panel złożony z TTF-1, p63 oraz mucykarminu.

**Słowa kluczowe:** niedrobnokomórkowy rak płuca, rak gruczolowy, rak płaskonabłonkowy, mucykarmin, immunohistochemia.

Pierwotny rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych i jednym z nowotworów złośliwych, którego częstość występowania stale wzrasta [1]. Ponad 70% raków płuca jest rozpoznawana w późnym etapie zaawansowania, gdy jedyną metodą leczenia jest chemio- lub radioterapia [1, 2].

Dotychczas najistotniejsze było odróżnienie raka drobnokomórkowego (ang. *small cell lung carcinoma* – SCLC) od niedrobnokomórkowego (ang. *non-small cell lung carcinoma* – NSCLC), natomiast określenie typu NSCLC w nieoperacyjnych postaciach nowotworu nie miało znaczenia, ze względu na podobny schemat stosowanego leczenia [1]. Wprowadzenie nowych metod terapii spowodowało radykalne zmiany w diagnostyce mikroskopowej zaawansowanych postaci NSCLC. Konieczne stało się nie tylko rozpoznanie SCLC i NSCLC, lecz także ustalenie podtypu NSCLC, a przede wszystkim różnicowanie pomiędzy rakiem gruczolowym (ang. *adenocarcinoma* – ADC) i płaskonabłonkowym (ang. *squamous cell carcinoma* – SCC) [1, 2].

Ponad 3/4 raków płuca jest rozpoznawana na podstawie małych wycinków uzyskanych w trakcie bronchofiberoskopii (ang. *bronchofiberoscopy* – BF) lub z materiału cytologicznego, w którym nie zawsze udaje się znaleźć cechy morfologiczne pozwalające na określenie typu raka. W tych przypadkach barwienia histochemiczne (HC), a przede wszystkim reakcje immunohistochemiczne (IHC) mogą być niezwykle pomocne [1, 2].

Celem pracy była ocena skuteczności barwienia wykrywającego śluz i wybranych reakcji IHC w rozpoznaniu typu NSCLC w małych wycinkach oraz w preparatach cytologicznych, pobranych w trakcie BF i biopsji aspiracyjnej przez ścianę klatki piersiowej, oraz porównanie z wynikami uzyskanymi w materiale pooperacyjnym.

## Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 53 przypadki raków niedrobnokomórkowych, nieneuroendokrynnych płuca rozpoznanych w Zakładzie Patomorfologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, a następnie zoperowanych w tutejszej Klinice Chirurgii w 2010 r. Część materiału uzyskano w trakcie BF. Obejmowała ona 22 wycinki z oskrzeli, 2 wydzieliny oskrzelowe i 2 biopsje przezoskrzelowe płuca (ang. *transbronchial lung biopsy* – TBLB). W 24 przypadkach materiał pobrano drogą nakłucia guza przez ścianę klatki piersiowej (ang. *transthoracic needle aspiration* – TTNA), w 3 przez ścianę oskrzela (ang. *transbronchial needle aspiration* – TBNA). Z materiału cytologicznego (TBNA, TTNA i wydzieliny oskrzelowej) wykonywano bloczki parafinowe (ang. *cell blocks*) i w dalszej diagnostyce przeprowadzano podobnie

**Conclusions:** IHC allows one to make a more accurate diagnosis than H+E stain alone. The most effective panel of IHC that facilitates subclassification of NSCLC in small samples and cell blocks comprised TTF-1, p63 and mucicarmine stain.

**Key words:** non-small cell lung carcinoma, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, mucicarmine, immunohistochemistry.

jak wycinki histologiczne. Pierwsze rozpoznanie przedoperacyjne ustalano na podstawie obrazu mikroskopowego preparatu barwionego hematoksyliną i eozyną (H+E). W następnym etapie z każdego przypadku wykonywano 7 barwień dodatkowych, w tym jedno z mucykarminem, oraz 6 reakcji IHC z przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko TTF-1 (ang. *thyroid transcription factor-1*, klon 8G7G3/1, Dako, 1 : 200), p63 (klon 7JUL, Leica, 1 : 50), napsinowi A (klon IP64, Leica, 1 : 300) oraz cytokeratynom 5/6 (klon D5/16 B4, Dako, 1 : 50), 7 (klon OV-TL12/30, Dako, 1 : 100) i 34 (klon 34bE12, Leica, 1 : 100). W reakcjach przeciwko TTF-1 i p63 za wynik dodatni uznawano barwną reakcję jądrową, przeciwko napsinowi A – gruboziarnistą reakcję cytoplazmatyczną, natomiast w reakcjach z cytokeratynami – cytoplazmatyczno-błonową. Po analizie wyników reakcji IHC ponownie ustalano rozpoznanie typu histologicznego raka, które porównywano z diagnozą postawioną na podstawie obrazu mikroskopowego guza w materiale pooperacyjnym. Oceny mikroskopowej dokonywano zgodnie z kryteriami klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization* – WHO) z 2004 r. [3].

## Wyniki

Analiza drobnych wycinków w korelacji z materiałem pooperacyjnym guzów pozwoliła na ocenę zgodności rozpoznania przed operacją i po zabiegu chirurgicznym oraz zasadności stosowania barwień dodatkowych. Wyniki porównujące rozpoznanie histologiczne uzyskane z małych wycinków przed wykonaniem i po wykonaniu reakcji IHC oraz z materiału pooperacyjnego przedstawiono w tabeli I.

**Tab. I.** Rozpoznania typów histologicznych raków płuca ustalone z małego materiału – bez barwień dodatkowych, po wykonaniu barwień oraz z dużego materiału pooperacyjnego.

Typ histologiczny raka	Materiał drobny – bez barwień	Materiał drobny – po barwieniach	Materiał pooperacyjny
ADC	12	17	17
ADSC	0	0	4
LCC	0	0	2
SCC	26	31	26
PC	0	0	4
NSCLC (NOS)	15	5	0

ADC – gruczolakorak (ang. *adenocarcinoma*), ADSC – rak gruczolowo-płaskonabłonkowy (ang. *adenosquamous carcinoma*), LCC – rak wielkokomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC – raka płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), PC – rak pleomorficzny (ang. *pleomorphic carcinoma*), NSCLC (NOS) – niedrobnokomórkowy rak płuca bez możliwości określenia podtypu (ang. *non-small cell carcinoma, not-otherwise type*)

Na podstawie samego barwienia H+E prawidłowe rozpoznanie ustalono w 57% przypadków. Rodzaje rozbieżności wyników pomiędzy drobnym materiałem ustalonym bez barwień dodatkowych a pooperacyjnym przedstawiono w tabeli II.

Najczęściej niezgodności wynikały z niejednoznacznego obrazu mikroskopowego raków niżej zróżnicowanych, rzadziej z powodu heterogennego utkania nowotworu, które nie ujawniło się w małym wycinku.

Zastosowanie barwień dodatkowych zwiększyło zgodność rozpoznania o 22%, pozwoliło ustalić typ histologiczny w 2/3 raków pierwotnie określonych jako raki niedrobnokomórkowe. W przypadkach, w których mimo wykonanych barwień dodatkowych nie ustalono prawidłowego rozpoznania, wycinki okazały się niereprezentatywne dla całego guza. Niezgodności oceny mikroskopowej pomiędzy małym materiałem po wykonaniu barwień dodatkowych a dużymi wycinkami pooperacyjnymi przedstawiono w tabeli III,

**Tab. II.** Rodzaje niezgodności między rozpoznaniem z małego materiału bez barwień dodatkowych a rozpoznaniem ostatecznym

Rozpoznanie z małego wycinka (bez barwień)	Liczba przypadków	Rozpoznanie ostateczne	Liczba przypadków
NSCLC	15	ADC	5
		ADSC	2
		LCC	1
		SCC	5
		PC	2
ADC	1	SCC	1
SCC	6	ADC	1
		ADSC	2
		LCC	1
		PC	2

ADC – gruczolakorak (ang. *adenocarcinoma*), ADSC – rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (ang. *adenosquamous carcinoma*), LCC – rak wielkokomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC – rak płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), PC – rak pleomorficzny (ang. *pleomorphic carcinoma*)

natomiast wyniki reakcji IHC i barwienia na śluz w przebadanych postaciach NSCLC zawarto w tabeli IV. Podsumowanie immunofenotypu oraz wyniki reakcji na obecność śluzu w komórkach nowotworowych obserwowane w poszczególnych podtypach NSCLC umieszczono w tabeli V. Z danych znajdujących się w tabelach IV i V wynika, że żadne z zastosowanych przeciwciał monoklonalnych nie jest w 100% czułe i swoiste dla określonego podtypu histologicznego raka. Największą swoistością charakteryzowało się przeciwciało przeciwko p63. Ekspresję p63 obserwowano w zdecydowanej większości SCC (84%) lub w rakach zawierających komponent o różnicowaniu płaskonabłonkowym, tj. gruczołowo-płaskonabłonkowym (ang. *adenosquamous carcinoma* – ADSC) i w pleomorficznych (ang. *pleomorphic carcinoma* – PC). Reakcja przeciwko p63 zwykle była wyraźna, jednoznaczna i występowała w zdecydowanej większości komórek nowotworowych.

Mniejszą, choć porównywalną swoistość w tej samej grupie nowotworów wykazało przeciwciało przeciwko CK5/6 (77%). Reakcja była rozlana, ale często słabsza i mniej wyraźna niż przeciwko p63.

**Tab. III.** Rodzaje niezgodności między rozpoznaniem z małego materiału po barwieniach dodatkowych a rozpoznaniem ostatecznym

Rozpoznanie z małego wycinka (po barwieniach)	Liczba przypadków	Rozpoznanie ostateczne	Liczba przypadków
ADC	1	ADSC	1
NSCLC (NOS)	5	ADC	1
		PC	2
		LCC	2
SCC	5	ADSC	3
		PC	2

ADC – gruczolakorak (ang. *adenocarcinoma*), ADSC – rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (ang. *adenosquamous carcinoma*), LCC – rak wielkokomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC – raka płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), PC – rak pleomorficzny (ang. *pleomorphic carcinoma*), NSCLC (NOS) – niedrobnokomórkowy rak płuca bez możliwości określenia podtypu (ang. *non-small cell carcinoma, not-otherwise type*)

**Tab. IV.** Wyniki barwień dodatkowych w zależności od typu histologicznego raka

Rozpoznanie ostateczne	Reakcja	Mucykarmin (%)	TTF-1 (%)	p63 (%)	Napsin (%)	CK5/6 (%)	CK34 (%)	CK7 (%)
ADC	ujemna	<b>9 (53)</b>	7 (41)	<b>17 (100)</b>	8 (47)	<b>17 (100)</b>	4 (24)	0 (0)
	dodatnia	8 (48)	<b>10 (59)</b>	0 (0)	<b>9 (53)</b>	0 (0)	<b>13 (77)</b>	<b>17 (100)</b>
ADSC	ujemna	<b>4 (100)</b>	<b>4 (100)</b>	1 (25)	<b>4 (100)</b>	<b>2 (50)</b>	0 (0)	1 (25)
	dodatnia	0 (0)	0 (0)	<b>3 (75)</b>	0 (0)	<b>2 (50)</b>	<b>4 (100)</b>	<b>3 (75)</b>
LCC	ujemna	<b>2 (100)</b>	<b>2 (100)</b>	<b>2 (100)</b>	<b>2 (100)</b>	<b>2 (100)</b>	<b>2 (100)</b>	0 (0)
	dodatnia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>2 (100)</b>
SCC	ujemna	<b>24 (92)</b>	<b>25 (96)</b>	4 (15)	<b>26 (100)</b>	6 (23)	0 (0)	<b>17 (65)</b>
	dodatnia	2 (8)	1 (4)	<b>22 (84)</b>	0 (0)	<b>20 (77)</b>	<b>26 (100)</b>	9 (34)
PC	ujemna	<b>4 (100)</b>	<b>4 (100)</b>	<b>2 (50)</b>	<b>4 (100)</b>	<b>2 (50)</b>	<b>2 (50)</b>	<b>2 (50)</b>
	dodatnia	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	<b>2 (50)</b>	<b>2 (50)</b>	<b>2 (50)</b>

ADC – gruczolakorak (ang. *adenocarcinoma*), ADSC – rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (ang. *adenosquamous carcinoma*), LCC – rak wielkokomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC – rak płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), PC – rak pleomorficzny (ang. *pleomorphic carcinoma*)

**Tab. V.** Podsumowanie najczęstszych immunofenotypów oraz wyników reakcji na obecność śluzu w komórkach nowotworowych w poszczególnych typach histologicznych raków

Typ histologiczny	Wyniki reakcji						
	śluz	TTF-1	p63	napsin	CK5/6	CK34	CK7
ADC	-/+	+/-	-	+/-	-	+/-	+
ADSC	-	-	+/-	-	+/-	+	+/-
LCC	-	-	-	-	-	-	+
SCC	-/+	-(+)	+/-	-	+/-	+	-/+
PC	-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-

ADC – gruczolakorak (ang. *adenocarcinoma*), ADSC – rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (ang. *adenosquamous carcinoma*), LCC – rak wielkokomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC – rak płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), PC – rak pleomorficzny (ang. *pleomorphic carcinoma*)

Przeciwciała przeciwko TTF-1 oraz napsinowi A okazały się mało czułe, ale wysoce swoiste dla ADC. Ich ekspresję wykryto w ok. 60% ADC. Reakcje przeciwko TTF-1 oraz napsinowi A zwykle były dobrze widoczne, ale na ogół występowały tylko ogniskowo. W jednym przypadku SCC w małym wycinku stwierdzono dodatnią reakcję z TTF-1 w niewielkiej grupie komórek, której nie potwierdzono w materiale pooperacyjnym. Natomiast reakcja z p63 była obecna w większości komórek raka, zarówno w materiale przed-, jak i pooperacyjnym. W badaniu ostatecznym rak został rozpoznany jako SCC z małej komórki, z czynnością neuroendokrynną.

Przeciwciała przeciwko CK7 i CK34 okazały się najbardziej czułe, ale najmniej swoiste. Wynik dodatni reakcji z CK34 uzyskano we wszystkich rakach SCC oraz w większości ADC (77%). Ekspresję CK7 wykazały wszystkie ADC i raki wielkokomórkowe (ang. *large cell carcinoma* – LCC), większość ADSC (75%) oraz część SCC (34%) i PC (50%). Zwracały uwagę różnice w intensywności reakcji: w SCC reakcja z CK34 dotyczyła większej liczby komórek niż w ADC, odwrotnie w przypadku CK7. Jednak w rutynowej diagnostyce te subtelne różnice wydają się mało przydatne.

Barwienie muckykarminem wykazało wysoką swoistość wobec ADC, chociaż również w 2 SCC stwierdzono występowanie śluzu wewnątrzkomórkowego w pojedynczych komórkach nowotworowych. Barwienie było mało czułe, gdyż wynik dodatni uzyskano w mniej niż w połowie ADC. Spośród 8 ADC z potwierdzonym śluzem, aż w 5 reakcja z TTF-1 była negatywna. Jeśli zsumować 10 przypadków ADC, w których występowała ekspresja TTF-1 wraz z gruczolakorakami TTF-1 (-), w których wykryto śluz, czułość badania wzrasta z 59% do 88%, chociaż swoistość spada z 91% [wartość obserwowana dla nowotworów TTF-1 (+)] do 83%.

## Dyskusja

Dotychczas obowiązujące kryteria różnicowania pierwotnych raków płuca przedstawione w klasyfikacji WHO z 1999 i 2004 r. dotyczyły przede wszystkim materiału pooperacyjnego i opierały się głównie na standardowym barwieniu H+E oraz na diagnostyce HC, mającej na celu wykrycie śluzu w komórkach raka. Reakcje IHC były zalecane w celu potwierdzenia czynności neuroendokrynej nowotworu, rozpoznania raków mięsakowatych płuca oraz w różnicowaniu raka płuca z międzybłoniakiem [3, 5]. Bra-

kowało standardów postępowania z małymi wycinkami i materiałem cytologicznym, w których nie zawsze można znaleźć cechy morfologiczne pozwalające na ustalenie typu NSCLC [1, 2]. W lutym 2011 r. ukazały się obszernie rekomendacje, w których przedstawiono zasady postępowania z niewielkim materiałem biopsyjnym i cytologicznym umożliwiające odróżnienie ADC od SCC. Rekomendacje podkreślają konieczność stosowania diagnostyki IHC w celu określenia postaci NSCLC oraz zabezpieczenia materiału do badań molekularnych, niezbędnych do podjęcia odpowiedniej terapii [1]. Niezwykle ważny stał się odpowiedni dobór jak najmniejszej liczby przeciwciał IHC, które przybliżyłyby rozpoznanie typu NSCLC.

Wśród wielu markerów IHC pozwalających na wykrycie różnicowania płaskonabłonkowego najczęściej są stosowane przeciwciała przeciwko cytokeratynom 5/6 (CK5/6), 34 oraz p63, S100A7, ostatnio również *desmocollin-3* (DSC-3). W ADC zwykle wykonuje się reakcję przeciwko TTF-1, napsinowi A, cytokeratynie 7 (CK7), SAP (ang. *surfactant apoproteiny*), PE10, MUC1 (ang. *mucin 1*), a także barwienia HC wykrywające śluz w komórkach nowotworowych (muckykarmin, PAS- *periodic acid Schiff* z diastazą, błękit alcjaju/PAS) [1, 4, 6–11]. Mimo możliwości wykorzystania tak wielu przeciwciał, nie ma jednoznacznych wytycznych, które z nich należy stosować w rutynowej diagnostyce.

W prezentowanej pracy spośród kilku analizowanych markerów gruczolowych i płaskonabłonkowych największą swoistością, sięgającą 100%, charakteryzowało się przeciwciało przeciwko p63, które okazało się najbardziej wartościowe dla rozpoznania SCC. W żadnym przypadku ADC nie stwierdzono ekspresji p63, natomiast w ADSC i PC reakcja pojawiała się tylko w komponencie płaskonabłonkowym.

W wielu pracach czułość p63 wynosiła od 75% do ponad 95%, a swoistość 70–100%, co podkreśla jego dużą wartość praktyczną [8, 10–14]. Terry i wsp. [10] uważają, że jest ono najlepszym pojedynczym przeciwciałem różnicującym SCC z ADC. Z kolei Righi i wsp. [14] wykryli ekspresję p63 w ponad 15% ADC, natomiast Ocque i wsp. [15] oraz Bishop i wsp. [16] w ok. 30%, a Tsuta i wsp. [11] w ponad 48%. Reakcja najczęściej była słaba i ogniskowa, niemniej jednak stosowanie wyłącznie p63 w diagnostyce różnicowej może być niewystraszające [11, 12, 15].

W ostatnim czasie stwierdzono dużą skuteczność przeciwciała p40 w rozpoznaniu SCC w małych wycinkach



i bloczkach parafinowych biopsji aspiracyjnych. P40, które odpowiada izoformie  $\Delta$ Np63-p40 przeciwciała p63, charakteryzuje się wysoką czułością, porównywalną z p63, ale wyższą swoistością (98%), przez co jest skuteczniejsze w rozpoznaniu SCC i może zastąpić p63 w rutynowej diagnostyce [16, 17].

Markerem o wysokiej czułości dla SCC (75–100%) i dużej swoistości (79–92%) jest CK5/6, szczególnie zalecane w przypadkach, w których reakcja z p63 jest negatywna bądź wątpliwa [8, 10–12, 15]. Ekspresję CK5/6 stwierdza się również w 2–8%, a wg niektórych autorów nawet w ponad 56% ADC [7, 11, 12, 15].

W materiale autorów niniejszej pracy CK5/6 charakteryzowało się porównywalną swoistością do p63, również w żadnym przypadku ADC nie stwierdzono ekspresji CK5/6, ale ocena mikroskopowa reakcji była trudniejsza. Dodatni odczyn, który pojawiał się w nabłonkach oskrzelowych, utrudniał różnicowanie pomiędzy prawidłowymi komórkami a naciekiem nowotworowym.

Innym markerem wykazującym wysoką czułość dla SCC (88–100%), ale mniejszą swoistość (40–90%) jest CK34, w praktyce mało przydatne, gdyż jego ekspresję stwierdza się w ok. 50% ADC [9–12]. Również w badaniu opisywanym w niniejszej pracy CK34 okazało się bardzo czułe, ale mało swoiste. Dodatnią reakcją z CK34 uzyskano we wszystkich SCC i aż w 77% ADC.

Wśród przeciwciał ułatwiających rozpoznanie ADC za najbardziej skuteczne jest uważane TTF-1, które wykazuje wysoką swoistość (97–100%), ale mniejszą czułość (54–75%) [9–11, 14]. W małym materiale biopsyjnym i cytologicznym ekspresję TTF-1 stwierdza się w 60–92% ADC, a w materiale pooperacyjnym w 70–85% przypadków [8, 15]. Różnice w ekspresji reakcji w małych wycinkach i w preparatach pooperacyjnych mogą być związane z heterogennością raków lub faktem, że część nowotworów rozpoznanych pierwotnie jako ADC w ostatecznej ocenie jest klasyfikowana jako raki wielkokomórkowe neuroendokrynne, LCC, ADSC lub PC z komponentem gruczołowym [9, 14, 18]. Dodatnią reakcją z TTF-1 częściej wykazują guzy zlokalizowane obwodowo, wywodzące się z komórek stanowiących składnik TRU (ang. *terminal respiratory unit*) [1, 9]. Wyjątkowo rzadko ekspresja TTF-1 pojawia się w SCC, zwykle jest wówczas słaba i ogniskowa [8, 9, 11, 12], chociaż istnieją doniesienia, w których autorzy uzyskali pozytywną reakcję przeciwko TTF-1 nawet w 21% SCC [12, 15]. Wysoki odsetek dodatnich reakcji dotyczył głównie przypadków biopsji cienkoigłowych obwodowych guzów płuca [12, 15]. Prawdopodobnie przyczyną była obecność w rozmazach pneumocytów, które również wykazują ekspresję TTF-1 [15]. Ponadto powodem mogły być również odmienne klony stosowanych przeciwciał [11].

W omawianym materiale tylko w jednym przypadku autorzy niniejszej pracy stwierdzili dodatnią reakcję przeciwko TTF-1, która nie potwierdziła się w materiale pooperacyjnym. Reakcja występowała ogniskowo i dotyczyła niewielkiej grupy komórek. W ostatecznym rozpoznaniu guz został zdiagnozowany jako SCC z małej komórki

z czynnością neuroendokrynną, z potwierdzoną ekspresją p63 i markerów neuroendokrynnych. Być może pozytywna reakcja TTF-1 dotyczyła jąder komórkowych pęcherzyków płucnych uwięzionych w nacieku nowotworowym.

Niekiedy ekspresja TTF-1 i p63 pojawia się w tych samych komórkach raka, przy braku cech morfologicznych charakterystycznych dla ADC lub SCC. Nowotwory te są uznawane za ADC, ze względu na częstsze występowanie dodatniej reakcji z p63 w ADC, natomiast wyjątkowo rzadką ekspresję TTF-1 w SCC [2, 12]. W naszym materiale w żadnym przypadku nie wystąpiła koekspresja TTF-1 i p63.

Według niektórych autorów markerem o podobnie wysokiej swoistości jak TTF-1, sięgającej 100% oraz porównywalnej czułości mieszczącej się pomiędzy 79% a 85% jest napsin A [10, 12, 14].

W prezentowanej pracy napsin A wykazywał równie wysoką swoistość, ale zdecydowanie mniejszą czułość (53%). Podobną czułość (58%), ale niższą swoistość (80%) uzyskali Mukhopadhyay i wsp. [12], uznając napsin za przeciwciało o mniejszej skuteczności niż TTF-1, natomiast przydatne w przypadkach, w których reakcja z TTF-1 jest niejednoznaczna lub negatywna.

Innym markerem stosowanym w diagnostyce ADC jest CK7, która charakteryzuje się wysoką czułością (93%), ale różną swoistością (57–94%) [7, 10, 12]. Ocque i wsp. [15] aż w 68% przypadków SCC uzyskali ekspresję CK7, co zmniejsza jego przydatność w rutynowej diagnostyce.

W ocenie autorów niniejszej pracy CK7 okazała się najbardziej czułym, ale najmniej swoistym markerem ADC. Ekspresję CK7 wykazywały wszystkie ADC, jak również raki, które w materiale pooperacyjnym zostały rozpoznane jako LCC, większość ADSC oraz część SCC i PC.

Poza reakcjami IHC, w różnicowaniu ADC z SCC bardzo pomocne są barwienia HC, pozwalające na wykrycie śluzu w komórkach raka, które wykazują wysoką swoistość, wg niektórych autorów dochodzącą nawet do 100%, ale bardzo małą czułość (23%) [8, 10, 15]. Dodatnia reakcja na śluz może pojawić się w komórkach innych raków, nie tylko gruczołowych [3, 9].

W prezentowanej pracy barwienie mucykarminem okazało się wysoce swoiste wobec ADC, ale mało czułe. Pozwoliło na wykrycie śluzu w mniej niż w połowie ADC. Nicholson i wsp. [9] stwierdzili śluz w nieco większej grupie – ok. 60% ADC, ale podkreślają dużą korzyść z łączenia barwień HC z reakcjami IHC, przede wszystkim z TTF-1. W ADC nieprodukujących śluzu, często można uzyskać ekspresję TTF-1, w przeciwieństwie do ADC wydzielających śluz [2, 8]. Kaufmann i Dietel [19] uzyskali dodatnią reakcję z TTF-1 w 75% ADC nieśluzowych, a tylko w 10% śluzowych, co potwierdza konieczność wykonywania barwienia na obecność śluzu, przede wszystkim w ADC TTF-1-negatywnych.

Stosowanie reakcji IHC zwiększa możliwość ustalenia typu NSCLC [8, 10, 13, 14, 20]. Nicholson i wsp. [9], wykonując IHC, zmniejszyli liczbę przypadków rozpoznawanych jako NSCLC, bez możliwości określenia podtypu, czyli tzw. NOS (ang. *not otherwise specified*) z 53% do 19%, natomiast Righi i wsp. [14] z 36% do 14%. Inni otrzymali jeszcze

bardziej spektakularne wyniki, od 7% nawet do 3% raków określonych jako NOS [2, 8, 13, 20].

W materiale autorów niniejszej pracy wykorzystanie IHC w małych wycinkach zwiększyło trafność rozpoznania o 22%, a liczba przypadków rozpoznanych jako NOS zmniejszyła się do 21%.

Żadne z badanych przeciwciał nie wykazuje jednoczesnej 100-procentowej swoistości i czułości, co jest powodem poszukiwania najbardziej korzystnego zestawu, który pozwoliłby zróżnicować ADC od SCC [4, 7–12, 14, 15, 17, 21] (tab. VI). Istotne jest używanie kombinacji jak najmniejszej liczby przeciwciał, aby zaoszczędzić materiał do dalszych badań molekularnych [1, 2, 8]. Travis i wsp. [2, 4] zalecają wykonanie maksymalnie 2 reakcji IHC, z markerem charakterystycznym dla ADC i dla SCC, ewentualnie w połączeniu z barwieniem na śluz, a w przypadkach, gdy materiał jest bardzo skąpy, tylko z jednym, najlepiej z TTF-1. Przez wielu autorów TTF-1 jest polecane jako najbardziej przydatne w rozpoznaniu ADC i stosowane we wszystkich proponowanych zestawach diagnostycznych, gdyż nie tylko sugeruje różnicowanie gruczolowego raka, lecz także jego pierwotnie płucne pochodzenie [2, 4, 8, 9, 14].

Spośród przeciwciał umożliwiających wykrycie różnicowania płaskonabłonkowego raka najczęściej jest polecane p63, nieco rzadziej CK5/6 [9–13]. Połączenie reakcji TTF-1 i p63 oraz barwienia na śluz pozwala na ustalenie rozpoznania w ponad 80% przypadków małych wycinków i przez wielu autorów jest uważane za najbardziej skuteczny minimalny panel diagnostyczny [2, 8, 9].

Próby znalezienia innych, skuteczniejszych metod diagnostycznych, m.in. technik molekularnych umożliwiających różnicowanie SCC z ADC, nie przyniosły spodziewanych rezultatów. Diagnostyka mikro-RNA okazała się kosztowna i trudniejsza do interpretacji mikroskopowej [22].

W naszych badaniach najkorzystniejszym zestawem markerów IHC pozwalających na różnicowanie pomiędzy ADC a SCC był panel złożony z TTF-1 i p63 oraz mucykarminu. Przeciwciała przeciwko cytokeratynom 7 i 34 ze względu na niską swoistość okazały się mniej przydatne. Wymienienie z p63 i TTF-1 mogłyby być stosowane CK5/6 i napsin A, ale ocena mikroskopowa ekspresji p63 i TTF-1 w małych wycinkach i w materiale cytologicznym jest łatwiejsza. Barwienie mucykarminem, mimo niskiej czułości, było szczególnie pomocne w ADC TTF-1-negatywnych.

Różnice w ocenie skuteczności stosowanych przeciwciał wynikają z odmiennych założeń interpretacji otrzymanych wyników. Niektórzy autorzy każdą reakcję traktowali jako pozytywną, inni przyjmowali dokładne kryteria jakościowe i ilościowe [10, 12, 18]. Poza tym tylko część autorów porównywała wyniki uzyskane w małym materiale biopsyjnym i cytologicznym z końcowym rozpoznaniem materiału pooperacyjnego [8, 12–14, 18, 21].

Trudności z ustaleniem typu NSCLC najczęściej wynikają z różnorodności budowy raków płuca, niskiego stopnia zróżnicowania nowotworu, pobrania zbyt małych wycinków lub z niewłaściwego miejsca, ubogokomórkowości rozmazów cytologicznych, nieprawidłowej interpretacji wyników

**Tab. VI.** Proponowane zestawy diagnostyczne umożliwiające różnicowanie ADC z SQCC w małych wycinkach i w materiale cytologicznym

Autorzy	Barwienie na śluz	Wybrane markery IHC
Camilo i wsp. [7]		P63, CK5/6, CK7, SAP
Travis i wsp. [4]	mucykarmin	TTF-1, p63
Terry i wsp. [10]	mucykarmin	p63, CK5/6, TTF-1, CK7, napsin A
Nicholson i wsp. [9]	diastaza/PAS	TTF-1, p63, CK5/6
Loo i wsp. [8]	AB/PAS	TTF-1, p63, CK5/6
Tsuta i wsp. [11]		CK5/6, TTF-1
Mukhopadhyay i wsp. [12]		TTF-1, napsin A, p63, CK5/6
Rekhtman i wsp. [21]		TTF-1, p63, (CK5/6)
Righi i wsp. [14]		TTF-1/DSC-3 vs p63/napsin A
Ocque i wsp. [15]		TTF-1, CK7, p63, CK5/6
Pelosi i wsp. [17]		p40, TTF-1

SAP – surfaktant apoproteiny (ang. *surfactant apoprotein*), AB/PAS – barwienie alcyanem niebieskim/metodą Schiffa kwasem nadjodowym (ang. *alcian blue/periodic acid Schiff*)

reakcji HC i IHC oraz metody uzyskania materiału [8–10, 18, 20]. Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (TTNA, TBNA) zwykle jest skuteczniejsza w rozpoznaniu niż złuszczeniowa (wydzielina, wymazy szczoteczkowe) [13]. Korzystne jest kojarzenie badania histologicznego z cytologicznym, zwłaszcza połączonym z wykonaniem tzw. bloczków parafinowych (ang. *cell blocks*), które pozwalają na wykonanie większej liczby barwień niż rozmazy cytologiczne [4, 13–15, 17, 20].

Stosowanie IHC stało się koniecznością, gdyż w wielu przypadkach pozwala na przybliżenie typu NSCLC, co jest niezbędne do podjęcia decyzji o wyborze leczenia [8, 9, 13, 20]. Obecnie nie mogą funkcjonować ośrodki zajmujące się diagnostyką raka płuca, które nie dysponują możliwością wykonywania reakcji IHC.

## Podsumowanie

W ok. 75% przypadków typ NSCLC udaje się ustalić wyłącznie na podstawie kryteriów morfologicznych widocznych w barwieniu H+E, w pozostałych 25% konieczne jest wykonanie barwień dodatkowych [8]. Zalecany zestaw diagnostyczny powinien obejmować markery różnicowania ADC i SCC i, ze względu na oszczędność materiału, być ograniczony do minimum. W materiale autorów niniejszej pracy barwienia dodatkowe zwiększyły prawidłowość rozpoznania o 22%, wzrastając do 79%. W przypadkach, w których nie udało się określić postaci NSCLC, wycinki okazały się niereprezentatywne dla całego guza. Uzyskane wyniki wykazały, że żadne z badanych przeciwciał nie było w 100% swoiste i czułe. Najkorzystniejszym panelem różnicującym ADC z SCC okazał się zestaw złożony z przeciwciał przeciw TTF-1, p63 oraz mucykarminu. Reakcje IHC należy traktować jako pomocnicze w określeniu typu NSCLC, pozwalające na ustalenie rozpoznania, zwłaszcza w przypadkach,

w których w standardowym barwieniu H+E nie stwierdzono charakterystycznych cech różnicowania gruczołowego lub płaskonabłonkowego.

## Piśmiennictwo

1. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 244-285.
2. Travis WD, Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. *Sem Respir Crit Care Med* 2011; 32: 22-31.
3. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and Genetics. Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press, Lyon, 2004.
4. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, Garg K, Hirsch FR, Noguchi M, Powell CA, Rusch VW, Scagliotti G, Yatabe Y. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 411-414.
5. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. Histological Typing of Lung and Pleural Tumors. Springer, Berlin 1999.
6. Wu M, Wang B, Gil J, Sabo E, Miller L, Gan L, Burstein DE. p63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 696-702.
7. Camilo R, Capelozzi VL, Siqueira SA, Del Carlo Bernardi F. Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 2006; 37: 542-546.
8. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 442-447.
9. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A, Popat S. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol* 2011; 5: 436-441.
10. Terry J, Leung S, Laskin J, Leslie KO, Gown AM, Ionescu DN. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1805-1811.
11. Tsuta K, Tanabe Y, Yoshida A, Takahashi F, Maeshima AM, Asamura H, Tsuda H. Utility of 10 immunohistochemical markers including novel markers (desmocollin-3, glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1190-1199.
12. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 15-25.
13. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, Friedlander MA, Riely GJ, Travis WD, Zakowski MF, Moreira AL. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 451-458.
14. Righi L, Graziano P, Fornari A, Rossi G, Barbareschi M, Cavazza A, Pelosi G, Scagliotti GV, Papotti M. Immunohistochemical subtyping of nonsmall cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation. *Cancer* 2011; 117: 3416-3423.
15. Ocque R, Tochigi N, Ohori NP, Dacic S. Usefulness of immunohistochemical and histochemical studies in the classification of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in cytologic specimens. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 81-87.
16. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (ΔNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012; 25: 405-415.
17. Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, Maisonneuve P, Rossi G, Barbareschi M, Graziano P, Cavazza A, Rekhtman N, Pastorino U, Scanagatta P, Papotti M. ΔNp63 (p40) and thyroid transcription factor-1 immunoreactivity on small biopsies or cellblocks for typing non-small cell lung cancer: a novel two-hit, sparing-material approach. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 281-290.
18. Pelosi G, Rossi G, Bianchi F, Maisonneuve P, Galetta D, Sonzogni A, Veronesi G, Spaggiari L, Papotti M, Barbareschi M, Graziano P, Decensi A, Cavazza A, Viale G. Immunohistochemistry by means of widely agreed-upon markers (cytokeratins 5/6 and 7, p63, thyroid transcription factor-1, and vimentin) on small biopsies of non-small cell lung cancer effectively parallels the corresponding profiling and eventual diagnoses on surgical specimens. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1039-1049.
19. Kaufmann O, Dietel M. Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathol* 2000; 36: 8-16.
20. Sigel CS, Moreira AL, Travis WD, Zakowski MF, Thornton RH, Riely GJ, Rekhtman N. Subtyping of non-small cell lung carcinoma: a comparison of small biopsy and cytology specimens. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1849-1856.
21. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 2011; 24: 1348-1359.
22. Del Vecovo V, Cantaloni C, Cucino A, Girlando S, Silvestri M, Bragantini E, Fasanella S, Cuorvo LV, Palma PD, Rossi G, Papotti M, Pelosi G, Graziano P, Cavazza A, Denti MA, Barbareschi M. miR-205 Expression levels in nonsmall cell lung cancer do not always distinguish adenocarcinomas from squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 268-275.