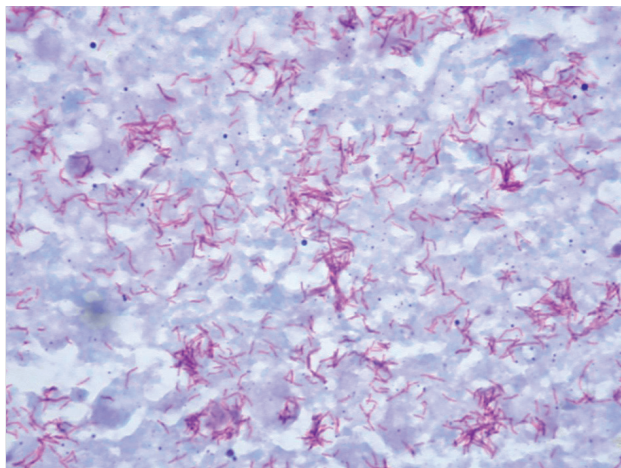


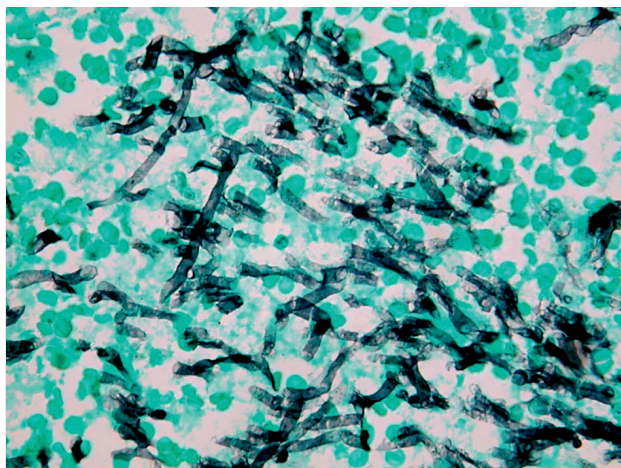
TECHNIKI SPECJALNE W DIAGNOSTYCE PATOMORFOLOGICZNEJ CHORÓB PŁUC

RENATA LANGFORT

Diagnostyka chorób płuc wymaga wykorzystania wielu technik dodatkowych. Barwienia histochemiczne i reakcje immunohistochemiczne (IHC) są wśród nich podstawą rozpoznania nie tylko chorób nowotworowych płuc, ale również nienowotworowych i powinny być stosowane w rutynowej diagnostyce histologicznej.



Rycina 1. Prątki kwasooporne. Barwienie Ziehl-Neelsena



Rycina 2. Strzępki grzybni kropidlaka. Barwienie metodą Grocott'a

1. Barwienia dodatkowe (histochemiczne) stosowane w diagnostyce mikroskopowej chorób płuc

Zastosowanie barwień histochemicznych w chorobach nienowotworowych umożliwia:

- wykrycie czynników zakaźnych:
 - bakterii (przede wszystkim *tuberculosis/mycobacteriosis*, malakoplakii, *actinomycosis*, *nocardiosis*) (ryc. 1.),
 - grzybów (m.in. *aspergillosis*, *cryptococcosis*, *candidiasis*, *coccidioidomycosis*, *histoplasmosis*, *zygomycosis*, *pneumocystosis*) (ryc. 2.),
 - pasożytów (*echinococcosis*);
- ocenę łożyska naczyniowego i opłucnej (zachowanie ciągłości błon sprężystych, pogrubienie błon naczyniowych, występowanie skrzeplin, obliteracji światła, cech morfologicznych nadciśnienia płucnego) (ryc. 3.);
- ocenę oskrzeli i oskrzelików (występowanie włóknienia, destrukcji, przebudowy);
- ocenę rozległości włóknienia i przebudowy przestrzeni powietrznych (ryc. 4.);
- określenie rodzaju materiału wypełniającego światło pęcherzyków płucnych i gromadzącego się w cytoplazmie makrofagów płucnych (proteinoza, krwawienie śródpęcherzykowe, hemosyderoza płucna, choroby spichrzeniowe, ciała azbestowe) (ryc. 5.);
- wykrycie nieprawidłowo występujących substancji chemicznych (amyloidoza) (ryc. 6.).

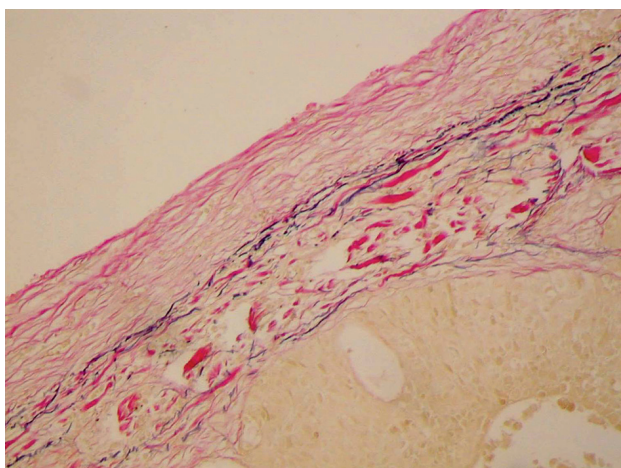
W diagnostyce chorób nowotworowych płuc barwienia histochemiczne pozwalają na:

- wykrycie śluzu śródcytoplazmatycznego w komórkach raka (ryc. 7.),
- ocenę zachowania ciągłości błony sprężystej wewnętrznej opłucnej, a tym samym stwierdzenie naciekania opłucnej przez raka płuca,
- ocenę zachowania błon sprężystych naczyń krwionośnych i wykrycie zatorów z komórek nowotworowych w świetle naczyń.

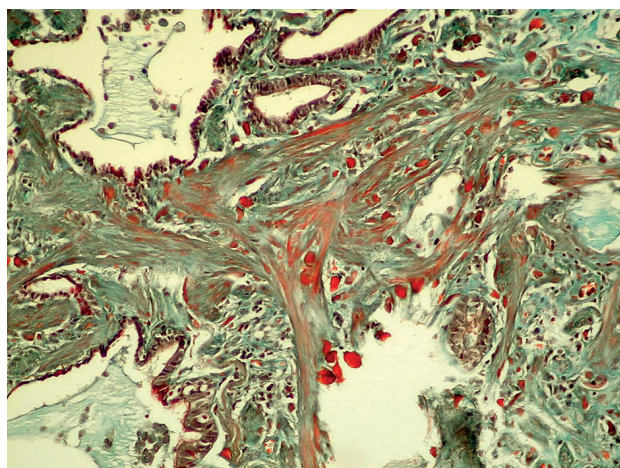
Najczęściej wykonywane barwienia i ich zastosowanie przedstawiono w tabeli I.

2. Diagnostyka immunohistochemiczna w chorobach płuc

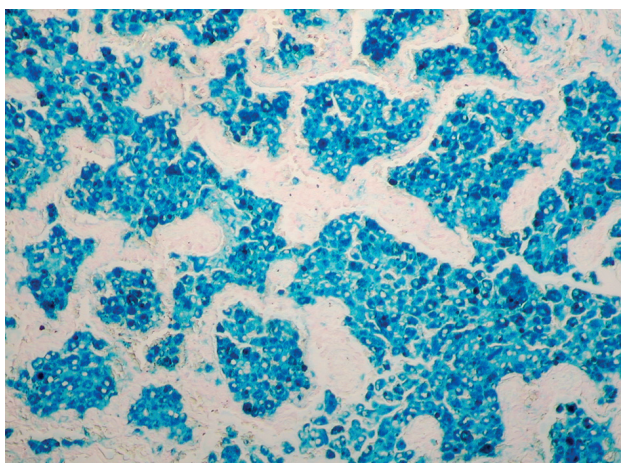
Diagnostyka immunohistochemiczna jest bardzo przydatna w rozpoznaniu niektórych chorób śródmiąższowych płuc, przede wszystkim histiocytozy z komórek



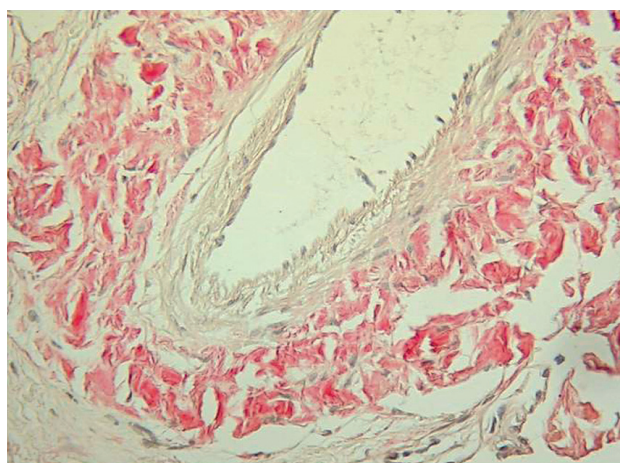
Rycina 3. Oplucna płucna, widoczne błony sprężyste (czarno wybarwione). Barwienie *elastin van Gieson* (EVG)



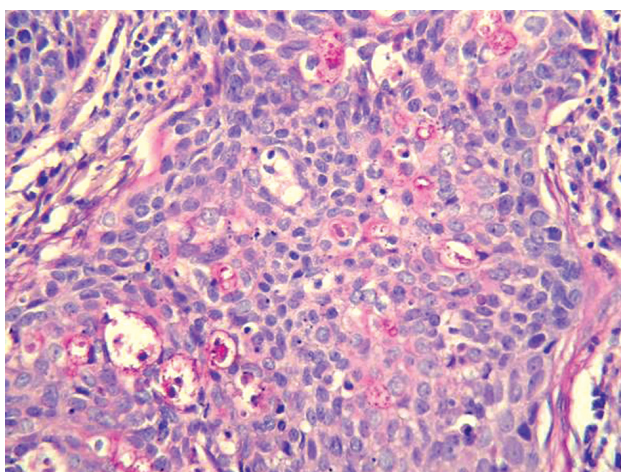
Rycina 4. Włókna mięśniowe i kolagenowe w przebudowanym mięszu płuca. Barwienie trichromem Massona



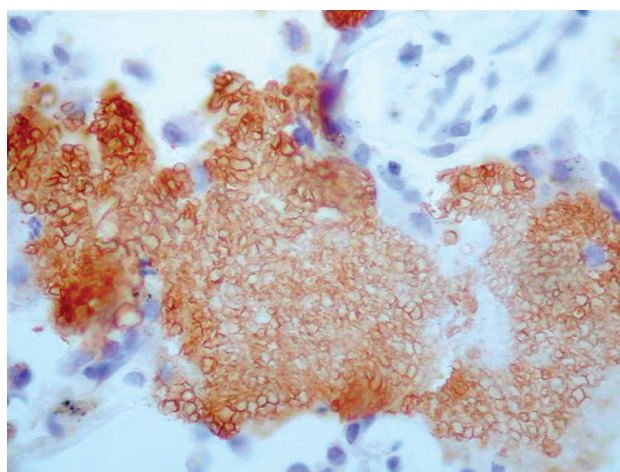
Rycina 5. Krwawienie śródpecherzykowe. Makrofagi zawierające ziarnistości żelaza. Barwienie na żelazo (błękit pruski)



Rycina 6. Złogi amyloidu. Barwienie czerwienią Kongo



Rycina 7. Rak gruczołowy płuca z widocznym śluzem śródcytoplazmatycznym. Barwienie mucykarminem



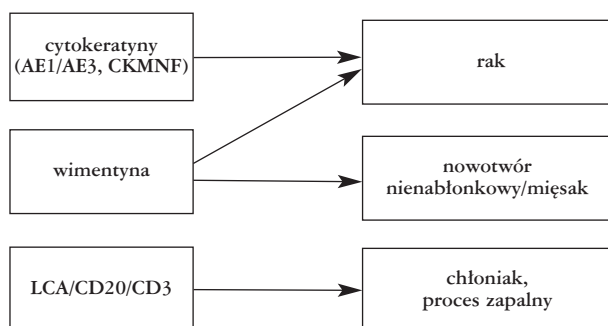
Rycina 8. Zakażenie *Pneumocystis jirovecii*. Reakcja IHC

Langerhansa, chorób o podłożu zakaźnym [najczęściej zakażenia cytomegalowirusem, *Pneumocystis pneumonia* – PCJ (ryc. 8.), HPV], rzadkich rozrostów, m.in. limfangioleiomiomatozy (LAM), limfangiomatozy, oraz w roz-

poznawaniu raka płuca, w różnicowaniu podtypów niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), przerzutów do płuc, w diagnostyce różnicowej pomiędzy rakiem płuca a międzybłoniakiem (tab. II).

Tabela I. Najczęściej stosowane barwienia dodatkowe w diagnostyce nienowotworowych i nowotworowych chorób płuc

BARWIENIE	CEL BARWIENIA	WSKAZANIA
Ziehl-Neelsen	prątki kwasooporne	• wykrywanie gruźlicy, mikobakterioz (ryc. 1.)
Grocott (srebrzenie metodą Gomoriego)	• grzyby • niektóre bakterie • pasożyty	• wykrywanie infekcji grzybiczych (PCJ, <i>aspergillosis</i> , <i>cryptococcosis</i> , <i>candidiasis</i> , <i>coccidioidomycosis</i> , <i>histoplasmosis</i>) (ryc. 2.) • niektórych bakteryjnych (<i>actinomycosis</i>) • pasożytniczych (<i>echinococcosis</i>)
<i>elastin van Gieson</i>	włókna kolagenowe, sprężyste	• ocena naczyń krwionośnych, stwierdzenie zatorów nowotworowych w świetle • ocena ciągłości błon sprężystych opłucnej (ocena naciekania opłucnej przez raka) (ryc. 3.) • ocena rozległości włóknienia miąższu płuca
błękit pruski	jony żelaza	• złogi hemosyderyny (krwawienie śród płuc) (ryc. 5.)
PAS (<i>periodic acid-Schiff</i>)	glikogen, inne związki	• proteinoza • promienica (<i>actinomycosis</i>) • choroby spichrzeniowe • ciała azbestowe • guzy jasnokomórkowe
mucykarmin	śluz obojętny	• <i>cryptococcosis</i> • raki gruczołowe (ryc. 7.)
PAS z diastazą	śluz obojętny	• raki gruczołowe
błękit alcjanu	kwaśne śluzowielocukrowce	• międzybłoniak
trichrom Massona	włókna tkanki łącznej, mięśniowej	• ocena włóknienia płuc (ryc. 4.)
czerwień Kongo	amyloid	• amyloidoza (ryc. 6.)



Rycina 9. Wstępna diagnostyka IHC stosowana w różnicowaniu zmian morfologicznych

- ustalenie pochodzenia raka:
 - pierwotny rak płuca,
 - rak przerzutowy;
- różnicowanie z międzybłoniakiem opłucnej.

2.1.1. Ustalenie typu histologicznego nowotworu

Wymaga zastosowania standardowych markerów immunohistochemicznych: cytokeratyny o szerokim spektrum, wimentyny i antygenu leukocytarnego (*leukocyte common antigen* – LCA). Dalszy sposób postępowania zależy od wyników reakcji (ryc. 9.).

W rakach wielkokomórkowych płuca, w niektórych postaciach niskozróżnicowanych raków z grupy pleomorficznych, olbrzymiokomórkowych może występować koekspresja cytokeratyn z wimentyną.

2.1.2. Ustalenie typu raka płuca

Rak drobnokomórkowy płuca

W diagnostyce mikroskopowej najistotniejsze jest różnicowanie pomiędzy rakiem drobnokomórkowym płuca (DRP) a NDRP.

Na ogół rozpoznanie DRP nie wymaga stosowania IHC, opiera się przede wszystkim na obrazie morfologicznym. Posłużenie się IHC jest konieczne w przypadkach znacznego uszkodzenia komórek raka lub całkowitego zgniecenia nacieku nowotworowego.

Najczęściej stosowany zestaw markerów immunohistochemicznych przydatny w rozpoznaniu DRP, w różni-

2.1. Wykorzystanie markerów immunohistochemicznych w diagnostyce i różnicowaniu raka płuca

Diagnostyka immunohistochemiczna w chorobach nowotworowych płuca ma na celu:

- ustalenie typu histologicznego nowotworu:
 - nabłonkowy (rak),
 - nienabłonkowy;
- ustalenie typu raka (drobnokomórkowy, niedrobnokomórkowy, podtyp niedrobnokomórkowego: neuroendokryny, z czynnością neuroendokrynną);

Tabela II. Najczęściej stosowane markery immunohistochemiczne w diagnostyce chorób płuc

PRZECIWCIAŁO	REAKTYWNOŚĆ
cytokeratyny CK-LMW, CK-HMW, CK7, CK20	<ul style="list-style-type: none"> • różnicowanie raków z innymi nowotworami złośliwymi pochodzenia nienabłonkowego • różnicowanie RGP (CK7+) z rakiem gruczołowym innego narządu, głównie z przewodu pokarmowego (CK20+)
CK5/6	<ul style="list-style-type: none"> • różnicowanie RGP(-) z DMM(+) • reakcja dodatnia w RPP
CEA (<i>carcinoembryonic antigen</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • różnicowanie RGP z DMM
S-100	<ul style="list-style-type: none"> • różnicowanie raka z czerniakiem • diagnostyka nowotworów pochodzenia nerwowego • wykrywanie histiocytozy z komórek Langerhansa
CD1a, langeryna	<ul style="list-style-type: none"> • histiocytoza z komórek Langerhansa
CD34	<ul style="list-style-type: none"> • różnicowanie zlokalizowanych guzów włóknistych z DMM mięsakiem i mięsakami
CD34, CD31, FVIII	<ul style="list-style-type: none"> • diagnostyka nowotworów pochodzenia naczyniowego • ułatwiają wykrycie zatorów nowotworowych w świetle naczyń krwionośnych
SMA, HMB45, melan A	<ul style="list-style-type: none"> • limfangioleiomiomatoza
LCA (<i>leucocyte common antigen</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • różnicowanie chłoniaków z rakami
CD20	<ul style="list-style-type: none"> • limfocyty B – diagnostyka rozrostów limfoproliferacyjnych
CD45RO, CD3	<ul style="list-style-type: none"> • limfocyty T – diagnostyka rozrostów limfoproliferacyjnych
CMV, PCJ, <i>Legionella</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> • diagnostyka zakażeń wywołanych przez: <i>cytomegalovirus</i>, <i>Pneumocystis jiroveci</i> i <i>Legionella</i>
SFA (<i>surfactant apoprotein</i>), napsin A	<ul style="list-style-type: none"> • diagnostyka raka gruczołowego płuca
TTF1	<ul style="list-style-type: none"> • diagnostyka raków płuca, głównie RGP i DRP (Dodatnią reakcją jest reakcja jądrowa!)
podoplanina, D2-40	<ul style="list-style-type: none"> • ocena naczyń limfatycznych • wykrywanie zatorów nowotworowych w naczyniach chłonnych
chromogranina A, synaptofizyna, NCAM/CD56	<ul style="list-style-type: none"> • diagnostyka rozrostów neuroendokrynych (DIPNECH, <i>tumorlet</i>, rakowiaki, RWP neuroendokryne, DRP, NDRP z czynnością neuroendokrynną, <i>blastoma</i> płuca)
p63	RPP

RPP – rak płaskonabłonkowy płuca, RWP – rak wielkokomórkowy płuca, RGP – rak gruczołowy płuca, DMM – międzybłoniak płucnej, DRP – drobnokomórkowy rak płuca, DIPNECH – rozlany, samoistny rozrost komórek neuroendokrynych, NDRP – niedrobnokomórkowy rak płuca

cowaniu z postacią RPP z małych komórek oraz bazaloidalną przedstawiono w tabeli III.

W DRP reakcje z cytokeratynami mają zwykle charakter tzw. reakcji „dot-like”. Około 90% DRP wykazuje silną ekspresję tarczycowego czynnika transkrypcyjnego 1 (*thyroid transcription factor 1* – TTF1) oraz markerów neuroendokrynych (MNE), natomiast 10% DRP nie reaguje z żadnym przeciwciałem.

Tarczycowy czynnik transkrypcyjny 1 charakteryzuje się dużą specyficznością i wysoką czułością w rozpoznaniu DRP.

Należy jednak pamiętać, że dodatnią reakcją stwierdza się także w rakach drobnokomórkowych wywodzących się z innych narządów, co może stanowić pewne ograniczenie w przypadkach różnicowania pomiędzy postacią pierwotną DRP a wtórną.

Tabela III. Charakterystyka immunohistochemiczna drobnokomórkowego raka płuca

	CK-LMW	CK-HMW (34βE12)	MNE	TTF1	P63
DRP „dot-like”	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)

MNE – markery neuroendokryne

Niedrobnokomórkowe raki płuca

W przypadkach, w których na podstawie kryteriów morfologicznych widocznych w barwieniu HE oraz w barwieniach histochemicznych nie udaje się określić podtypu NDRP, wskazane jest wykonanie reakcji IHC

Tabela IV. Diagnostyka immunohistochemiczna NDRP

Typ NDRP	TTF1	CK34βE12	p63	MNE	CK7	CK20
RGP (ryc. 10.)	(+)	(-)	(-)	(-)*	(+)	(-)
RGP śluzowy	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
RPP (ryc. 11.)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)/(+)	(-)
RWP	(+)**	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
RWNEP	(+)***	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
RWP bazaloidny	(-)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(-)

* ok. 30% RGP wykazuje czynność neuroendokrynną, ** ok. 50% RWP wykazuje dodatnią reakcję z TTF1, *** ok. 50% RWNEP wykazuje dodatnią reakcję z TTF1

Tabela V. Wykorzystanie markerów IHC w różnicowaniu przerzutów do płuc

OGNIKO PIERWOTNE	MARKERY IHC
• żołądek	• CK7(+), CK20(+), TTF1(-)
• jelito grube	• CK7(-), CK20(+), TTF1(-)
• piersi	• CK7(+), CK20(-), TTF1(-)
• endometrium	• CK7(+), CK20(-), TTF1(-)
• nerka	• CK7(-), CK20(-), TTF1(-)
• pęcherz moczowy	• CK7(+), CK20(+), TTF1(-)
• gruczoł krokowy	• CK7(-), CK20(-), TTF1(-)
• tarczyca:	• CK7(+), CK20(-), TTF1(+)
– pęcherzykowy	
– brodawkowy	CK19
– rdzeniasty	kalcytonina, MNE
• guzy z komórek rozrodczych	PLAP, AFP, D2-4 (podoplanina)

z wybranym zestawem markerów (tab. IV). Jednym z częściej wykorzystywanych markerów w rozpoznaniu pierwotnego NDRP, zwłaszcza gruczolowego jest TTF1 (ryc. 10.).

W NDRP wykazujących w badaniu morfologicznym cechy sugerujące różnicowanie neuroendokrynnie konieczne jest wykonanie reakcji immunohistochemicznej z użyciem markerów neuroendokrynnych (MNE). Powszechnie stosowane są NCAM/CD56, chromogranina A i synaptofizyna. Do potwierdzenia czynności neuroendokrynniej (NE) wystarcza dodatnia reakcja przynajmniej z jednym z markerów.

2.1.3. Rak pierwotny płuca a przerzut

Płuca są bardzo częstym miejscem przerzutów z innych narządów. Mogą się one pojawiać jako pojedyncza zmiana (3–9%) lub są wielogniskowe. Pojedyncze zmiany zwykle umiejscawiają się obwodowo, ale mogą również występować w postaci guza w ścianie oskrzela, imitując pierwotny nowotwór płuca. Przerzuty wewnątrzoskrzelowe są najczęściej związane z rakami jelita grubego, odbytu, nerki, piersi, rzadziej trzustki, gruczołu krokowego, pęcherza moczowego i szyjki macicy. Pojawiają się również w przebiegu nowotworów nienabłonkowych, m.in. czerniaka, mięsaków, głównie *leiomyosarcoma*, *sarcoma stromale* i *osteosarcoma*.

W wielu przypadkach diagnostyka IHC pozwala na różnicowanie pomiędzy pierwotnym RGP a przerzutem z innego narządu, natomiast w rakach płaskonabłonko-

wych zwykle nie ma takiej możliwości. Czasami pomocne są kryteria morfologiczne. Lokalizacja śródoskrzelowa guza lub znalezienie ognisk o typie raka *in situ* wskazują na pierwotnego raka płaskonabłonkowego płuca.

Za pierwotnym pochodzeniem raka gruczolowego przemawia naciekanie opłucnej, włóknienie z tworzeniem się pyliczej blizny w części centralnej guza oraz występowanie różnorodnego utkania histologicznego, zarówno struktur cewkowych, jak i brodawkowych, litych oraz przypominających RGOP.

Na ogół ustalenie, czy zmiana jest pierwotnym rakiem płuca czy przerzutem, wymaga zastosowania kilku markerów IHC (tab. V).

W diagnostyce zmian ogniskowych w płucach u chorych obciążonych wcześniejszymi zabiegami onkologicznymi istotne są informacje dotyczące rodzaju przebytego zabiegu chirurgicznego, zaawansowania nowotworu i rozpoznania histopatologicznego. Najkorzystniejsze jest porównanie z preparatami z wcześniej usuniętej zmiany, co często zaoszczędza czasu oczekiwania na wynik badania mikroskopowego, jak również nie wymaga stosowania wielu kosztownych barwień i reakcji koniecznych do ustalenia rozpoznania.

2.1.4. Różnicowanie raka płuca z międzybłoniakiem opłucnej

Jednym z trudniejszych problemów jest różnicowanie pomiędzy pierwotnym rakiem płuca a międzybłoniakiem opłucnej (*diffuse malignant mesothelioma* – DMM). Rozpoznanie wymaga wykonania barwień histochemicznych,

a przede wszystkim immunohistochemicznych, z użyciem kilku odpowiednio dobranych przeciwciał oraz umiejętnej ich interpretacji.

2.1.4.A. Diagnostyka histochemiczna rozlanego międzybłoniaka płucnej

W różnicowaniu DMM z rakami gruczołowymi wykorzystuje się barwienia wykazujące obecność śluzu śródcytoplazmatycznego w komórkach raka (mucykarmin) i podścieliskowych śluzowielocukrowców w DMM (PAS po trawieniu diastazą, błękit alcjanu po trawieniu hialuronidazą przy pH 2,5).

Barwienie mucykarminem wypada pozytywnie w ok. 5% DMM. Reakcja dodatnia pojawia się przeważnie tylko w pojedynczych komórkach nowotworowych.

Diagnostyka histochemiczna jest przydatna głównie w różnicowaniu DMM nabłonkowatokomórkowych, w innych postaciach DMM jej znaczenie jest mniejsze.

2.1.4.B. Diagnostyka immunohistochemiczna rozlanego międzybłoniaka płucnej

Dotychczas nie uzyskano pojedynczego przeciwciała, które pozwoliłoby na rozpoznanie nowotworowo zmienionego międzybłoniaka, odróżnienie DMM od rozrostu reaktywnego mezotelium i od przerzutów lub nacieku raka gruczołowego w płucnej. W diagnostyce IHC mię-

Tabela VI. Przeciwciała IHC stosowane w różnicowaniu DMM oplucnej i raków gruczołowych

RAK GRUCZOŁOWY	MIĘDZYBŁONIAK OPLUCNEJ
BerEp4	CK5/6
CEA	HBME1
B72.3	kalretynina
TTF1	mezotelina
MOC31	trombomodulina
E-kadheryna	kadheryna N
CA19-9	WT-1 (<i>Wilm's tumor gene</i>)
Leu-M1 (CD15)	D2-40 (podoplanina)
BG-8	ME-1
EMA (reakcja cytoplazmatyczno-błonowa)	EMA (reakcja błonowa)
	h-CALD (h-Caldesmon)

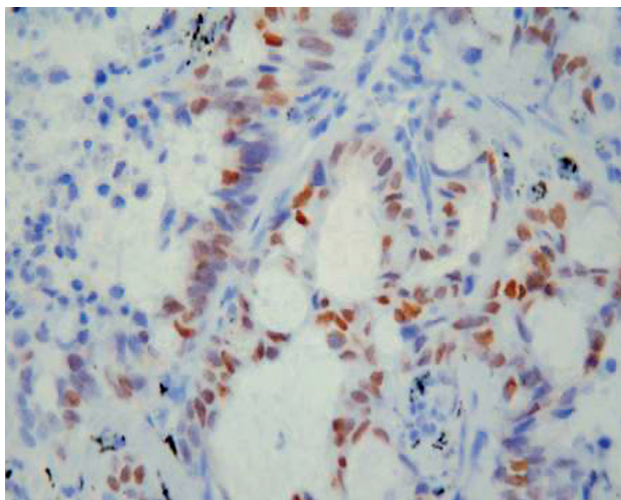
dzybłoniaka oplucnej zwykle wykorzystuje się kilka przeciwciał. W celu rozpoznania DMM konieczne jest zastosowanie co najmniej dwóch markerów charakterystycznych dla komórek mezotelium oraz dwóch dla raka gruczołowego. Poza wykorzystaniem odpowiednich

Tabela VII. Ocena reakcji IHC wybranych przeciwciał stosowanych w diagnostyce DMM oplucnej i raków gruczołowych naciekających oplucną

PRZECIWCIAŁO	MIĘDZYBŁONIAK	RAK GRUCZOŁOWY
cytokeratyny o szerokim spektrum	(+)	(+)
wimentyna	(+)	(-)
EMA	(+) błonowa	(+) cytoplazmatyczno-błonowa
HBME1	(+) błonowa rozlana	brak lub ogniskowa, cytoplazmatyczna
kalretynina	(+) jądrowa i cytoplazmatyczna	brak lub ogniskowa cytoplazmatyczna, słaba
CK5/6	(+) cytoplazmatyczna, ziarnista	(-)
TTF1	brak lub cytoplazmatyczna	(+) jądrowa
BerEp4	(-)	(+) błonowa, rozlana
CEA	(-)	(+)
WT-1	(+) jądrowa	(+) jądrowa, tylko w rakach nerki, tarczycy, jajnika, błony śluzowej trzonu macicy
podoplanina (D2-40)	(+) błonowa, zwłaszcza w DMM nabłonkowatokomórkowym (+) cytoplazmatyczna w DMM mięsakowym	(+) w śródbłonkach naczyń limfatycznych
MOC31	(-)	(+) błonowa
h-CALD (h-Caldesmon)	(+) cytoplazmatyczna	(-)

Tabela VIII. Międzybłoniak a rozrost reaktywny mezotelium

TYP ROZROSTU	EMA	p53	DESMINA
międzybłoniak	(+) reakcja błonowa	(+) reakcja jądrowa	(-)
rozrost reaktywny mezotelium	(-)	(-)	(+)



Rycina 10. Reakcja IHC na TTF1 w raku gruczołowym płuca

przeciwciał, których wybór zależy m.in. od typu histologicznego DMM, istotna jest właściwa interpretacja reakcji IHC, ocena nie tylko ekspresji barwienia, ale także jego lokalizacji w komórce nowotworowej. Najczęściej używane przeciwciała i wyniki reakcji IHC przedstawiono w tabelach VI i VII.

2.1.4.C Różnicowanie reaktywnego i nowotworowego rozrostu międzybłonka

Barwienia IHC nie pozwalają na jednoznaczne rozpoznanie odczynowego rozrostu międzybłonka i odróżnienie go od międzybłoniaka, zwłaszcza w małych wycinkach biopsyjnych. W różnicowaniu przydatne są reakcje IHC na EMA, P53 i desminę. Rozlana reakcja błonowa z przeciwciałem przeciwko EMA i dodatnia (jądrowa) na białko P53 przemawiają za rozrostem nowotworowym, natomiast dodatnia reakcja na desminę i brak

reakcji na EMA i P53, częściej występują w rozrostach odczynowych międzybłonka (tab. VIII).

W wielu przypadkach ustalenie rozpoznania międzybłoniaka złośliwego wymaga wspólnej decyzji patologa, radiologa i klinicysty.

3. Zastosowanie reakcji immunohistochemicznych w badaniach śródoperacyjnych

Diagnostyka IHC może być również wykorzystywana w badaniu śródoperacyjnym, głównie w przypadkach, w których konieczne jest ustalenie, czy zmiana jest pierwotnym rakiem płuca, czy przerzutem z innego narządu.

Spośród wielu markerów najbardziej przydatny jest TTF1, który może być stosowany w skrawkach pochodzących z mrożenia, jak również w materiale cytologicznym (tzw. preparatach odbitkowych).

Wady i ograniczenia zastosowania reakcji IHC w badaniu śródoperacyjnym:

- wydłuża czas oczekiwania na wynik badania,
- pozwala na różnicowanie głównie RGP, reakcja negatywna nie wyklucza rozpoznania pierwotnego raka płuca.

4. Zastosowanie reakcji immunohistochemicznych w badaniach cytologicznych

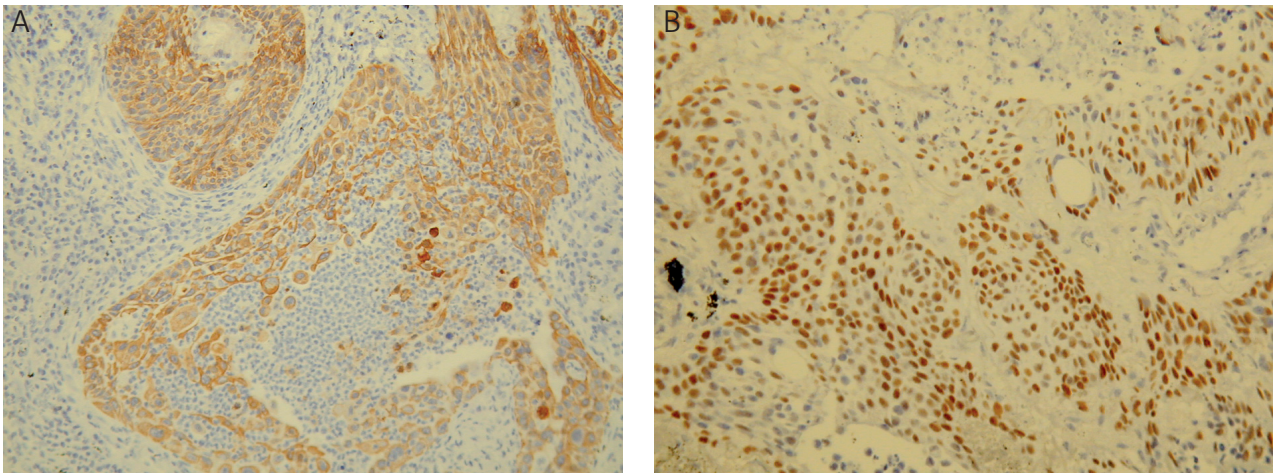
Diagnostyka cytologiczna jest niezwykle rozpowszechniona, pozwala na ustalanie rozpoznania raka płuca i ocenę stopnia zaawansowania choroby nowotworowej. Materiał cytologiczny jest jednym z częściej nadsyłanych do pracowni patomorfologicznych i coraz częściej jest wykorzystywany do IHC.

Rozmazy zabarwione HE mogą zostać „odbarwione” i następnie poddane procedurze IHC. Sposób ten jest

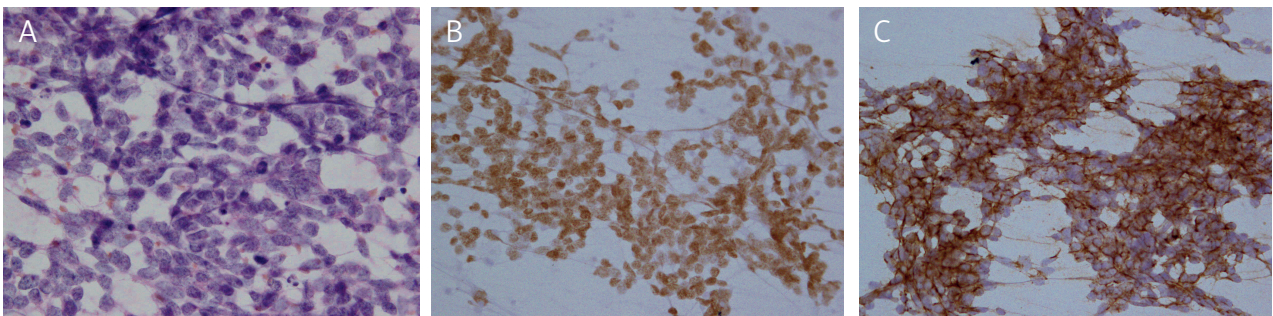
Tabela IX. Różnicowanie IHC zgnieczonego nacieku komórkowego w wycinkach BF

Zapalenie przewlekłe	LCA(+), CK(-), CD20(+), CD3(+), MiB1(+)
Chłoniak	LCA(+), CK(-), CD20(+), CD3(-), MiB1(++)(+++)
Drobnokomórkowy rak płuca	LCA(-), CK(+), reakcja „dot-like”, TTF1(+), MNE(+), MiB1(+++) UWAGA! Około 10% DRP nie wykazuje czynności NE, może być również negatywna dla markerów nabłonkowych.
RPP z małej komórki	LCA(-), CK(+), TTF1(-), CK34βE12(+), p63(+), CK5/6(+), MNE(-), MiB1(++ lub +++) >30%
RPP – postać podstawnokomórkowa	LCA(-), CK(+), TTF1(-), CK34βE12(+), p63(+), MNE(-), MiB1(+++)
RWP – postać podstawnokomórkowa	LCA(-), CK(+), TTF1(-), CK34βE12(+), p63(-), MNE(-); w 10% można stwierdzić czynność NE w <20% komórek guza, MiB1(+++)
RWNEP	LCA(-), CK(+), TTF1(+) ok.50% RWNEP, MNE(+) przynajmniej jeden z nich, CK34βE12(-), rzadko (+), MiB1(+++)
Rakowiak	LCA(-), CK(+), TTF1(-), MNE, MiB1(- lub +) <20%

MNE – markery neuroendokrynne (NCAM/CD56, chromogranina A, synaptofizyna), RPP – rak płaskonabłonkowy płuca, RWP – rak wielkokomórkowy płuca, RWNEP – rak wielkokomórkowy neuroendokrynny płuca



Rycina 11. Reakcje IHC na CK34βE12 (A) i p63 (B) w raku płaskonabłonkowym płuca



Rycina 12. Drobnokomórkowy rak płuca. Biopsja cienkoigłowa przezoskrzelowa z widocznymi komórkami raka. A – rozmaz cytologiczny barwiony HE. B – dodatnia reakcja IHC na TTF1. C – dodatnia reakcja IHC na NCAM/CD56

bardziej polecany niż wykonywanie reakcji z części zachowanych, niezabarwionych preparatów, gdyż pozwala na ocenę mikroskopową materiału, jego obfitości i rodzaju. Dla poprawienia jakości reakcji wskazane jest umieszczenie odbarwionych rozmazów w 4-procentowym roztworze zbuforowanej formaliny na ok. 15 min, a następnie postępowanie według standardowych zaleceń (ryc. 12.).

Materiałem uzupełniającym są tzw. cytobloczki (*cell blocks*), będące zawiesiną komórek zawartą w skrzepie. Materiał jest utrwalony i zatapiony w bloczkach parafinowych, dzięki czemu może być wykorzystywany do większej liczby barwień zarówno histochemicznych, jak i IHC, a także do oceny statusu genu *EGFR*.

5. Diagnostyka mikroskopowa wycinków zawierających zgnieciony naciek komórkowy

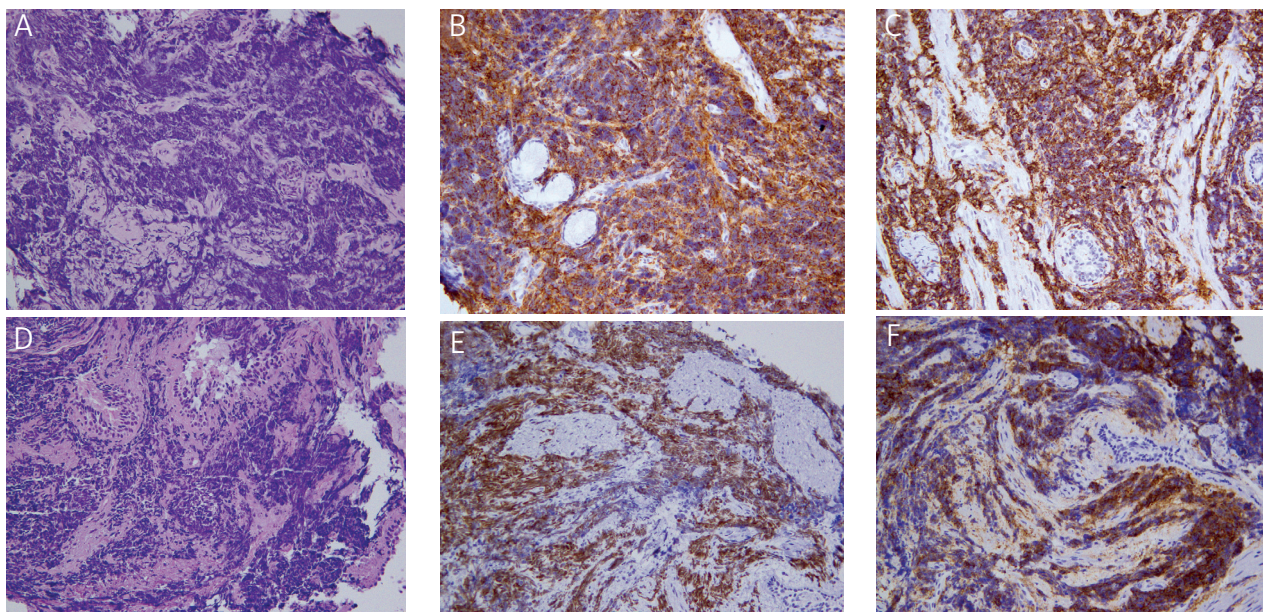
Ostrożnej interpretacji wymagają przypadki, w których w materiale biopsyjnym stwierdza się zgnieciony, hiperchromatyczny naciek komórkowy uniemożliwiający ocenę zarówno komórek, jak i jąder komórkowych. Do niedawna zmiany o tym charakterze uznawano za podstawową cechę DRP. W chwili obecnej, w dobie dostępności nowych technik diagnostycznych, ustalenie rozpoznania wymaga wykonania reakcji IHC, które pozwalają na zróżnicowanie charakteru komórek (ryc. 13.). W wyborze zestawu markerów

IHC należy uwzględnić antygeny różnicujące DRP, NDRP, najczęściej płaskonabłonkowego z tzw. małej komórki oraz postaci podstawnokomórkowe (bazaloidne) zarówno RPP, jak i RWP, RWNEP, rakowiaka, chłoniaka, a także przewlekły proces zapalny (tab. IX).

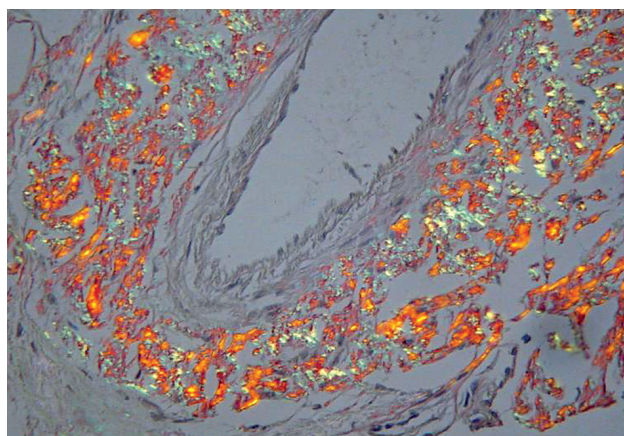
W przypadkach z wysokim indeksem proliferacyjnym ocenianym Ki67 (MiB1) (>50%), w których mimo wykonanych reakcji IHC stopień uszkodzenia komórek nowotworowych uniemożliwia odróżnienie RWNEP od DRP, rozpoznanie powinno zawierać informację „nisko zróżnicowany rak neuroendokrynnny, bez możliwości określenia podtypu”. W sytuacjach gdy współczynnik proliferacji wynosi <20%, zmianę należy natomiast określić jako „nowotwór neuroendokrynnny, z całkowicie zgniecionym naciekiem komórkowym, prawdopodobnie rakowiak”.

6. Dodatkowe techniki w diagnostyce mikroskopowej chorób płuc

Wśród dodatkowych technik specjalnych stosowanych w diagnostyce chorób płuc wyodrębnia się mikroskopię polaryzacyjną, elektronową, cytometrię przepływową, hybrydyzację *in situ*, reakcję łańcuchową polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). Metody te nie należą do standardowych i dostępne są wyłącznie w wyspecjalizowanych ośrodkach.



Rycina 13. Wycinki błony śluzowej oskrzela z całkowicie zgniecionym, hiperchromatycznym naciekiem komórkowym. A – rozlany nacieki chłoniaka, barwienie HE. B – dodatnia reakcja IHC na LCA. C – dodatnia reakcja IHC na CD20. D – rozlany nacieki DRP. E – dodatnia reakcja IHC na TTF1. F – dodatnia reakcja IHC na NCAM



Rycina 14. Złogi amyloidu w ścianie naczynia krwionośnego. Badanie w mikroskopie polaryzacyjnym

6.1. Mikroskopia polaryzacyjna

Mikroskopia polaryzacyjna wykorzystuje zjawisko istnienia w komórkach i tkankach struktur anizotropowych, nazywanych też substancjami dwójłomnymi, które mają różne współczynniki załamania światła, zależnie od osi, wzdłuż której to światło przebiega. Mikroskopia polaryzacyjna znajduje zastosowanie w wykrywaniu amyloidu w preparatach histologicznych, a także w diagnostyce niektórych odmian pylic, przede wszystkim talkowej i krzemowej (ryc. 14.).

6.2. Mikroskopia elektronowa

Przy obecnie dostępnych metodach, mikroskopia elektronowa rzadko jest wykorzystywana w rutynowej diagnostyce chorób płuc, głównie ze względu na wysokie koszty i małą dostępność. Dzisiaj jest stosowana przede wszystkim w przypadkach podejrzenia zespołu dyskinezy rzęsek.

6.3. Polimerazowa reakcja łańcuchowa

Badanie metodą PCR służy do wykrywania czynników infekcyjnych (przede wszystkim *M. tuberculosis*), do określenia klonów nacieków limfoidalnych w celu wykluczenia bądź potwierdzenia procesu limfoproliferacyjnego, w diagnostyce niektórych chorób nowotworowych.

6.4. Cytometria przepływowa

Metoda ta bada populacje pojedynczych komórek w zawieszynie. Mogą to być komórki znajdujące się w płynach tkankowych (BAL, płwocina indukowana, płyny z opłucnej), leukocyty krwi, zaaspirowane komórki węzła chłonnego, szpiku kostnego bądź komórki tkanek i narządów uwolnione z otaczającej je substancji międzykomórkowej. Stosuje się ją w ocenie cyklu komórkowego i ploidii w nowotworach, w diagnostyce i monitorowaniu leczenia białaczek i chłoniaków. Pozwala ona określić subpopulację limfocytów w chorobach płuc, stan układu immunologicznego, zwłaszcza u chorych w stanie immunosupresji, w niedoborach immunologicznych.

6.5. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Wśród dodatkowych metod morfologicznych wykorzystywanych w diagnostyce chorób płuc zastosowanie znalazły hybrydyzacja *in situ*, a ostatnio jej bardziej udoskonalone formy, przede wszystkim fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* – FISH), a także chromogeniczna hybrydyzacja *in situ* (*chromogenic in situ hybridization* – CISH) i SISH (*silver in situ hybridization*).

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* służy przede wszystkim do wykrywania ekspresji czynników wzrostu oraz genów związanych z nowotworami, przy użyciu specjalnych sond molekularnych znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Do badań może być wykorzystywany

materiał utrwalony i zatopiony w bloczkach parafinowych. Metoda jest stosowana w NDRP do oceny ekspresji białka EGFR, należącego do rodziny receptorów kinazy tyrozynowej ErbB (EGFR/ErbB1), w celu kwalifikacji chorych do tzw. terapii celowanej.

Ze względu na wysokie koszty metody badanie wykonywane jest w specjalistycznych ośrodkach referencyjnych.

Piśmiennictwo

- Addis B, Roche H. Problems in mesothelioma diagnosis. *Histopathology* 2009; 54: 55-68.
- Attanoos RL, Griffin A, Gibbs AR. 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. *Histopathology* 2003; 43: 231-238.
- Beasley MB. Immunohistochemistry of pulmonary and pleural neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1062-1072.
- Butnor KJ. Avoiding underdiagnosis, overdiagnosis, and misdiagnosis of lung carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1118-1132.
- Camilo R, Capelozzi VL, Aparecida S, et al. Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 2006; 37: 542-546.
- Corrin B, Nicholson AG (ed.). *Pathology of the lungs. Tumours*. Second edition. Churchill Livingstone Elsevier, 2006, 527-690.
- Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Non-small-cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 2008; 26: 983-993.
- Greenstreet P, Purslow MJ, Kini SR. Respiratory specimen types for cytologic diagnoses specimen procurement, collection methods, specimen submission, cytopreparation, and stain. In: Kini SR: *Color Atlas of Pulmonary Cytopathology*. Springer 2002: 6-26.
- Flieder DB, Hammar SP. Common-non-small-cell carcinomas and their variants. W: Tomaszewski J, Jr, Farver CF, Fraire AE (eds.). *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology. Volume II. Neoplastic lung disease*. Third edition. Springer 2008; 216-307.
- Hammar SP. Neuroendocrine tumors. W: Tomaszewski J, Jr, Farver CF, Fraire AE (eds.): *Dail and Hammar's pulmonary pathology. Volume II. Neoplastic lung disease*. Third edition. Springer 2008; 308-374.
- Ionescu DN, Treaba D, Gilks CB, et al. Nonsmall cell lung carcinoma with neuroendocrine differentiation-an entity of no clinical or prognostic significance. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 26-32.
- Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. Value of p63 and Cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 823-830.
- Kargi A, Gurel D, Tuna B. The diagnostic value of TTF-1, CK5/6 and p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 415-420.
- Kerr KM. Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology* 2009; 54: 12-27.
- Kowalczyk A, Szutowicz-Zielińska E, Dziadziuszko R, Jassem J. Znaczenie inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. *Onkol Prakt Klin* 2005; 1: 217-224.
- Marchevsky AM. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of malignant mesothelioma. *Arch Pathol Lab Med*, 2008; 132: 397-401.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin 5, and mesothelin in lung carcinomas of different types: an immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 150-158.
- Moran CA, Suster S. *Tumors and Tumor-like Conditions of the Lung and Pleura*. Sanders. 2010.
- Nakamura N, Miyagi E, Murata S, et al. Expression of Thyroid Transcription Factor-1 in normal and neoplastic lung tissues. *Mod Pathol* 2002; 15: 1058-1067.
- Ordóñez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2005; 36: 372-380.
- Ordóñez NG. What are the current best immunohistochemical markers for the diagnosis of epithelioid mesothelioma? A review and update. *Hum Pathol* 2007; 38: 1-16.
- Raab SS, Sturgis CD, Wick MR. Metastatic tumors in the lung: a practical approach to diagnosis. In: Leslie KO, Wick MR (eds.). *Practical Pulmonary Pathology*. Churchill Livingstone, Philadelphia 2005.
- Rossi G, Marchioni A, Milani M, et al. TTF-1, cytokeratin 7, 34beta12, and CD56/NCAM immunostaining in the subclassification of large cell carcinomas of the lung. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 884-893.
- Szczepulska-Wójcik E, Langfort R. Międzybłoniak złośliwy płucnej – klasyfikacja histopatologiczna, stopień zaawansowania i diagnostyka mikroskopowa. *Pneumonol Alergol Pol* 2005; 73: 285-291.
- Tan D, Zander DS. Techniques and applications to the diagnosis of lung diseases: immunohistochemistry. In: Zander DS, Farver CF (ed.): *Pulmonary pathology. A volume in the series Foundations in Diagnostic Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier 2008; 786-800.
- Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (ed.). *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon 2004; 9-124.
- Wallace WA. The challenge of classifying poorly differentiated tumours in the lung. *Histopathology* 2009; 54: 28-42.
- Wang BY, Gil J, Kauffman D, et al. P63 in pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms and Rother pulmonary tumors. *Hum Pathol* 2002; 33: 921-926.
- Wu M, Szporn AH, Zhang D i wsp. Cytology applications of p63 and TTF-1 immunostaining in differential diagnosis of lung cancers. *Diagn Cytopathol* 2005; 33: 223-227.
- Wu M, Wang BY, Gil J, et al. 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.
- Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 767-773.
- Yoo SB, Lee HJ, Park JO, et al. Reliability of chromogenic in situ hybridization for epidermal growth factor receptor gene copy number detection in non-small-cell lung carcinomas: A comparison with fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer* 2010; 67: 301-305.
- Zhang H, Liu J, Cagle PT, et al. Distinction of pulmonary small cell carcinoma from poorly differentiated squamous cell carcinoma: an immunohistochemical approach. *Mod Pathol* 2005; 18: 111-118.
- Aslan DL, Gulbahce HE, Pambuccian SE, et al. Ki-67 immunoreactivity in the differential diagnosis of pulmonary neuroendocrine neoplasms in specimens with extensive crush artifact. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 874-878.
- Du EZ, Goldstraw P, Zacharias J, et al. TTF-1 expression is specific for lung primary in typical and atypical carcinoids: TTF-1-positive carcinoids are predominantly in peripheral location. *Hum Pathol* 2004; 35: 825-831.
- Franks TJ, Galvin JR: Lung tumors with neuroendocrine morphology. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1055-1061.

- 37 Kargi A, Gurel D, Tuna B. The diagnostic value of TTF-1, CK5/6 and p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 415-420.
38. Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 179-187.
39. Rossi G, Papotti M, Barbareschi M, Pelosi G. Morphology and a limited number of immunohistochemical markers may efficiently subtype non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 28: e141-e142.
40. Sturm N, Rossi G, Lantuejoul S, et al. Expression of Thyroid Transcription Factor-1 in the spectrum of neuroendocrine cell lung proliferations with special interest in carcinoids. *Hum Pathol* 2002; 33: 175-182.