

# Immunhistokemiske markører ved kolorektal cancer

Overlæge Jan Lindebjerg

Vejle Sygehus, Patologisk Afdeling

Immunhistokemi er en histologisk metode, hvor man ved hjælp af specifik antistofbinding er i stand til at påvise lokaliseringen af bestemte proteinstrukturer i vævssnit. Metoden udføres rutinemæssigt på alle landets patologiafdelinger. I lysmikroskopet viser en positiv reaktion sig typisk ved en brunlig farve på det sted, hvor den specifikke antistofbinding finder sted (**Figur 1**). Selv om princippet i metoden er enkelt, er der en lang række faktorer, som har indflydelse på det endelige resultat (**Tabel 1**). I takt med, at der opnås stigende indsigt i molekylærbiologiske faktorer vedrørende kolorektal cancer, øges også muligheden for praktisk anvendelse af immunhistokemi med henblik på fastlæggelse af kontrol- og behandlingsrelevante tumorkarakteristika. I det følgende beskrives nogle anvendelsesmuligheder for immunhistokemi i forbindelse med kolorektal cancer.

## Tumorklassifikation

De maligne kolorektale tumorer kan principielt inddeles i epiteliale tumorer, mesenkymale tumorer og lymfomer.

## Epiteliale tumorer

De fleste epiteliale tumorer kan klassificeres uden brug af immunhistokemi. Undertiden er immunhistokemi nødvendig, for at man kan skelne mellem meget lavt differentierede karcinomer og f.eks. lymfomer eller sarkomer. De forskellige cellyper i kroppen indeholder karakteristiske proteinstrukturer, og disse bevares ofte i de maligne tumorer, som udgår fra dem. Epiteliale celler indeholder proteinstrukturer i deres cytoskelet, som benævnes cytokeratiner. Cytokeratinerne inddeles på basis af deres molekylstørrelse og ladning i forskellige typer. Epitelcellerne i colon og rectum indeholder typisk cytokeratin (CK) 20. Andre relevante kolorektale epitelmarkører er membranproteinet CEA, det børstesomsrelaterede villin og differentieringsfaktoren CDX2. Neuroendokrin uddifferentiering kan påvises immunhistokemisk ved farvning for f.eks. chromogranin og synaptofysin. Især i forbindelse med metastaseudredning har kendskab til de immunhistokemiske karakteristika i kolorektalt karcinom relevans. I praksis benytter man et panel af antistoffer, og immunprofilen (sammenholdt med morfologien) giver et mere eller mindre entydigt svar på, hvor primærtumoren er lokaliseret. En adenokarcinommetastase med eksempelvis

positiv immunhistokemisk reaktion for CK 20, villin samt CDX2 og negativ reaktion for CK 7 samt TTF1 udgår med stor sandsynlighed fra colon eller rectum. En adenokarcinommetastase med positiv reaktion for CK 7 samt TTF1 og negativ reaktion for CK 20, villin samt CDX2 udgår med stor sandsynlighed fra lungerne.

## Mesenkymale tumorer

Disse tumorer er sjældne. Det er vigtigt at klassificere den gastrointestinale stromale tumor (GIST) korrekt, idet der findes medikamentel behandling rettet specifikt mod denne. Den mest sensitive og specifikke markør for denne tumor er CD117. CD34 er også hyppigt positiv i GIST. Vigtige differentialdiagnoser over for GIST er glatmuskelcelletumorer, som immunhistokemisk bl.a. udtrykker desmin, og schwannom, som bl.a. udtrykker S100.

## Lymfomer

Lymfomer kan subklassificeres vha. immunhistokemisk farvning for differentieringsantigener, som er lokaliseret på tumorcellernes overflade. En vigtig markør er CD45, som også betegnes *leucocyt common antigen*. T-celle-derivede lymfomer udtrykker CD3, og B-celle-derivede lymfomer udtrykker CD20. Lymfomerne kan yderligere subklassificeres vha. immunhistokemisk farvning for differentieringsantigener svarende til de forskellige stadier i lymfocytmodningen. En potentiel faldgrube er det storcellede anaplastiske lymfom, som fokalt kan udtrykke den generelle epitelmarkør KL1, og mangle ekspresion af CD45. Den kan således ligne et lavt dif-



Figur 1. Immunhistokemisk farvning for MLH1. Der ses manglende ekspresion i et intestinalt adenokarcinom og bevaret ekspresion i den tilgrænsende normale colon samt prolifererende ikkeneoplastiske celler i stromaet.

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

ferentieret carcinom. Immunhistokemisk kan dette lymfom dog diagnosticeres ved immunhistokemisk positiv reaktion for CD30.

### DNA-mismatchrepair-proteiner

Defekt DNA-*mismatch repair* (mrr) kan påvises i omkring 15% af alle kolorektale cancere [1]. Dette kan skyldes mutationer i gener, som koder for mrr-proteiner, eller blokeret transkription af disse. Defekter kan påvises ved DNA-undersøgelse for mikrosatellitinstabilitet (MSI) eller ved immunhistokemisk farvning for mrr-proteiner. Det er karakteristisk, at karcinomerne fra patienter med arvelig non-polypøs kolorektal cancer (HNPCC) har mutation i et af DNA-mrr-proteinerne. Disse tumorer har en bedre prognose end de øvrige [2], men betydningen mht. effekt af 5-fluorouracil (5-FU)-baseret kemoterapi er endnu uafklaret [3, 4]. Formålet med at udføre immunhistokemisk farvning for mrr-proteiner er at finde frem til mulige HNPCC-patienter. Der findes kommercielt tilgængelige antistoffer, der er rettet mod mrr-proteinerne MLH1, MSH2, MSH6 og PMS2. Ca. 90% af de mrr-defekte tumorer udviser manglende immunhistokemisk ekspresion af MLH1 eller MSH2. Manglende ekspresion af MLH1 ledsages som regel af manglende ekspresion af PMS2. Dette hænger sammen med, at PMS2 normalt stabiliseres ved kompleksbinding til MLH1. Tilsvarende ledsages manglende ekspresion af MSH2 ofte af manglende ekspresion af MSH6. Isolerede negative farvninger for PMS2 eller MSH6 kan skyldes primær inaktivering af disse. En anden mulighed er muteret inaktivt MLH1- hhv. MSH2-protein med bevaret immunhistokemisk reaktivitet [5]. I den seneste udgave af retningslinjer for diagnostik og behandling af kolorektal cancer anbefales det, at der udføres immunhistokemiske farvninger for mrr-proteiner på alle tumorer [6]. Det er den negative reaktion, som her giver det diagnostiske udsagn, at der er tale om en tumor med defekt mrr. For at undgå fejltolkning af en eventuel negativ reaktion er det vigtigt at sørge for, at der bliver farvet på et snit med indbygget positiv kontrol. Positiv kontrol kan f.eks. være tilgrænsende normal colonslimhinde (Figur 1). Hvis et sådan snit ikke er til rådighed kan prolifererende stromale celler eller tumorinfiltrerende lymfocytter ofte anvendes i stedet. Indimellem ses en lidt heterogen farveregning med intensitetsvariation eller vekslende positive og negative tumorceller. Det er fristende at opfatte dette som udtryk for en nedsat ekspresion af mrr-proteiner. I et nyligt publiceret arbejde om tumorer fra patienter, der var under mistanke for at have HNPCC, blev der påvist defekt mrr ved mikrosatellitundersøgelse i en række tilfælde med immunhistokemisk heterogen reaktion [7]. Imidlertid var der også heterogen reaktion i tumorer med intakt mrr. Man kunne forestille sig, at den heterogene reaktion afspejler uensartet proliferation, eller at ukendte præparations tekniske faktorer spiller en rolle. Der er ikke entydige data, som understøtter, at en nedsat immunhistoke-

**Tabel 1.** Faktorer af betydning for kvaliteten af immunhistokemiske farvninger.

Type af fiksativ
Fikseringstid
Paraffinklodsens alder
Tidsrum fra snitskæring til farvning
Valg af antistof
Demaskeringsteknik
Antistofkoncentration
Inkubationstid
Visualiseringsteknik

misk ekspresion af mrr-proteiner indebærer en øget sandsynlighed for, at MSI-H er til stede, i forhold til tumorer med normal ekspresion. På nordisk plan er der lavet en sammenligning mellem kvaliteten af immunfarvninger for MLH1 og MSH2 udført på hhv. 25 og 26 patologi afdelinger. Resultatet heraf er offentliggjort på Nordiqcs hjemmeside [8].

### Individualiseret behandling

I tilfælde af avanceret sygdom kan behandling med kemoterapi komme på tale. I øjeblikket er 5-FU-baseret kemoterapi det, som anbefales, men en række andre stoffer er under afprøvning, og resultaterne heraf er offentliggjort [9]. I takt med stigende indsigt i molekylærbiologiske forhold og udvikling af præparater, der er rettet specifikt mod disse, må man forvente, at nye behandlingsmuligheder vil komme til. En del patienter vil ikke respondere på behandlingen, men kun opleve bivirkninger. Af denne grund er det ønskeligt med parametre, som kan prædiktere effekten. Her har immunhistokemien en mulig rolle, om end den ikke er fuldt ud klarlagt. I det følgende beskrives nogle af de muligheder, som tegner sig.

### Thymidylatsynthase

Thymidylatsynthase (TS) er et enzym, som indgår i syntesen af thymin og dermed er nødvendig for DNA-syntesen. 5-FU metaboliseres, og metabolitterne har tre forskellige virkninger: 1) blokering af TS, 2) inkorporering i DNA og 3) inkorporering i RNA. Det er formentlig TS-blokeringen, som er den vigtigste af disse mekanismer. Det er derfor en plausibel teori, at jo højere TS-niveauet er i tumor, desto mindre følsom er tumoren for 5-FU. I studier over prædiktiv værdi af immunhistokemisk ekspresion af TS er der fundet lidt divergerende resultater, men i hovedparten fandt man, at lavere ekspresion var forbundet med bedre respons. Der er forskellige måder at kvantificere reaktionerne på, og det kan være en del af forklaringen. En undersøgelse har vist, at det immunhistokemiske reaktionsmønster til en vis grad afspejler molekylærbiologiske forhold [10].

### Andre

I øjeblikket er der fokus på behandling af kolorektalt adenocarcinom med stoffer rettet mod *epidermal growth factor receptor* (EGFR) og *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Der findes kommercielt tilgængelige antistoffer rettet mod disse,

men det er endnu uafklaret, hvilken rolle immunhistokemien vil komme til at spille i selektion af patienter til disse former for behandling.

Korrespondance: Jan Lindebjerg, Patologisk Afdeling, Vejle Sygehus, DK-7100 Vejle. E-mail: janlin@vgs.vejleamt.dk

Antaget: 13. juli 2005  
Interessekonflikter: Ingen angivet

Artiklen bygger på en større litteraturgennemgang. En fuldstændig litteraturliste kan fås ved henvendelse til forfatteren.

#### Litteratur

1. Umar A, Boland R, Terdiman JP et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.
2. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609-18.
3. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
4. Elsaleh H, Iacopetta B. Microsatellite instability is a predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy in a population-based series of stage III colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2001;1:104-9.
5. Ruzskiewicz AR, Jass JR. Microsatellite instability in colorectal cancer. What, how, when and why. *Pathol Case Rev* 2004;9:163-72.
6. Fenger C. Patoanatomisk vurdering og stadiinddeling. I: Bülow S, red. Retningslinier for diagnostik og behandling af kolorektal cancer. 3. Udgave. København: DCCG og Dansk kirurgisk selskab, 2005:23-30.
7. Shia J, Klimstra DS, Nafa K et al. Value of immunohistochemical testing of DNA mismatchrepair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005;29:96-104.
8. www.nordiqc.org /marts 2005.
9. Diaz-Rubio E. New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal and gastric cancers *The Oncologist* 2004;9:282-94.
10. Lindebjerg J, Nielsen JN, Hoeffding LD et al. Expression of thymidylate synthase in primary colorectal adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005 (i trykken).

## Kvalitetskrav til patoanatomisk undersøgelse ved kolorektalt karcinom

Overlæge Peter Stubbe Teglbjærg & professor Claus Fenger

Aalborg Sygehus, Patologisk Institut, og  
Odense Universitetshospital, Patologisk Institut

Patoanatomisk undersøgelse af resektatet ved operation for kolorektalt karcinom er fortsat den vigtigste metode til vurdering af en tumors histologiske og molekylærbiologiske type, grad og stadie, og samtidig opnås der værdifulde informationer om operationens kvalitet og radikalitet. Tilsammen giver disse observationer mulighed for at vurdere patientens prognose. Undersøgelsen bidrager endvidere til beslutningsgrundlaget for eventuel adjuverende terapi og kan være vejledende ved mistanke om arvelig cancer. Endelig kan de patoanatomiske data anvendes ved kvalitetssikring af præoperativ billeddiagnostik [1].

Der er derfor gjort store bestræbelser for at fastlægge internationale regler [2-5], og fra dansk side publiceres opdaterede udgaver af disse i »Retningslinier for diagnostik og behandling af kolorektal cancer«. Data anføres på et særligt registrerings-skema, udarbejdet af Dansk Selskab for Patologisk Anatomi og Cytologi (DSPAC) [6].

### Forudsætninger for en optimal patoanatomisk undersøgelse

For at opnå det fulde udbytte af den patoanatomiske undersøgelse skal en række forudsætninger være opfyldt fra kirurgens side. Disse består i en fyldestgørende udfyldelse af den

ledsagende rekvisition, en række afmærkninger på det fremsendte resektat og en hensigtsmæssig fremsendelse af operationspræparatet.

På det ledsagende skema skal det anføres, om der er mistanke om arvelig cancer i familien, så relevante undersøgelser umiddelbart kan iværksættes, og om patienten tidligere har haft malign sygdom, så eventuelle metastaser kan klassificeres korrekt. Endelig skal det anføres, om der er givet præoperativ strålebehandling og/eller kemoterapi, da dette ofte vil påvirke det patoanatomiske udseende.

Stapling bør foretages mindst 1 cm fra den endelige resektionsrand, således at selve resektionsranden er intakt til mikroskopisk undersøgelse. Dette gælder specielt, hvis afstanden fra tumor til resektionsranden peroperativt vurderes til at være <3 cm. Metastasesuspekterede områder uden for selve resektatet bør biopteres og fremsendes særskilt.

Identifikation af de patoanatomiske forhold er ikke altid lige så let postoperativt som peroperativt. Der skal derfor foreligge præcise oplysninger om tumors lokalisation, da denne definerer de regionale og nonregionale lymfeknuder, som er afgørende for en korrekt TNM-klassificering [3]. Såvel den orale resektionsrand som den tumordrænerende karresektionsrand skal afmærkes med suturer. Små perforationer, adhærencer og områder, som der er mistanke om repræsenterer gennemvækst af tumor skal ligeledes afmærkes, og markeringerne forklares på den ledsagende rekvisition. En kopi af operationsbeskrivelsen skal fremsendes hurtigst muligt efter operationens afslutning.

Hvorledes præparatet fremsendes til patologiafdelingen