

Rola immunohistochemii w patologicznej ocenie raków głowy i szyi – uwagi praktyczne dla chirurga głowy i szyi

The role of immunohistochemistry in pathological diagnostics of head and neck tumors – practical remarks for head and neck surgeon

Paweł Kosikowski¹, Michalina Staśkiewicz², Andrzej Kluk¹, Aldona Woźniak¹

¹Zakład Patomorfologii Klinicznej, Katedra i Zakład Patomorfologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Katedra i Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Badania immunohistochemiczne są złotym standardem we współczesnej diagnostyce i badaniach naukowych dotyczących zmian patologicznych we wszystkich narządach ciała, w tym w tkankach okolic głowy i szyi. Praca ma na celu przedstawienie najczęściej stosowanych skal oceny immunohistochemicznej stosowanych w diagnostyce, przedstawienie stosowanych obecnie powszechnie w badaniach naukowych technologii mikro- i makromacierzy oraz znaczenie współpracy na linii patolog-chirurg w zakresie zabezpieczenia i oceny materiału tkankowego do badań diagnostycznych i naukowych.

Słowa kluczowe: immunohistochemia, ocena immunohistochemiczna, barwienie, przeciwciała, skala oceny, nowotwór, mikromacierz, makromacierz, skala IRS, PD-L1.

Abstract

Immunohistochemical stain is a golden standard of both modern routine diagnostics and scientific study of pathological changes in all bodily organs, including tissues of head and neck. This review presents the most commonly used immunohistochemical scoring systems applied in diagnostics, the microarray and macroarray technology and in scientific studies. The paper stresses also the significance of cooperation between pathologist and surgeon in terms of securing and assessment of tissue material for routine diagnostics and scientific study.

Key words: immunohistochemistry, immunohistochemical examination, staining, antibodies, scoring system, neoplasm, microarray, macroarray, IRS scale, PD-L1.

(Postępy w Chirurgii Głowy i Szyi 2021; 2: 22–28)

Wprowadzenie

Badania immunohistochemiczne materiału tkankowego są obecnie jednym z podstawowych elementów diagnostyki patomorfologicznej w chorobach zarówno nowotworowych, jak i nienowotworowych. Zastosowanie paneli badań immunohistochemicznych pozwala na uściślenie diagnozy (a niekiedy jest jej niezbędnym warunkiem), określenie czynników predykcyjnych oraz

kwalifikację według schematów leczenia. Są one również istotnym elementem prac badawczych.

Rodzaj materiału do badań immunohistochemicznych

Badania immunohistochemiczne wykonywane są na różnych rodzajach materiału zarówno histologicznego (tj. zawierającego tkankę), jak i cytologicznego. Mate-



riał histologiczny umożliwia uzyskanie bloczka parafinowego, z którego można uzyskać od kilku do kilkudziesięciu preparatów histologicznych, pozwalających na wykonanie panelu oznaczeń wielu markerów na tym samym fragmencie tkanki [1–3]. Materiał cytologiczny, jeśli nie jest przygotowany metodą cytobloku, jest pod tym względem ograniczony [1, 4]. Jeden rozmaz umożliwia przeprowadzenie jednego oznaczenia immunohistochemicznego (ewentualnie kilku w przypadku zestawów wielokolorowych [4], które jednak nie są w powszechnym użyciu) (ryc. 1).

Tradycyjnie odczyn immunohistochemiczne oceniane są przez patologów jakościowo (pozytywny lub negatywny) lub półilościowo (różne skale i sposoby oceny). Ocena ta jednak obciążona jest dużą dozą subiektywności, co może się przekładać na słabą powtarzalność wyników (*inter-observer variability*, *intra-observer variability*). Rozwiązaniem – przynajmniej częściowym – tego problemu było opracowanie różnych półilościowych skal oceny odczynów histochemicznych [5, 6]. Nie eliminują one całkowicie czynnika subiektywnego, jednak pozwalają na jego ograniczenie. Taka skala powinna posiadać własną definicję, dawać powtarzalne i użyteczne wyniki [7]. Do klasycznych skal oceny należą: *Immunoreactive Score (IRS)*, *Allred Score*, *HER-2 score*, *H-Score*.

Przygotowanie materiału do badań

Warto podkreślić, że na ostateczny wynik badania immunohistochemicznego i jego zmienność składa się wiele czynników, takich jak rodzaj materiału, stan tkanki w momencie pobrania wycinka, szybkość i jakość utrwalenia, zastosowane procedury laboratoryjne, zastosowane przeciwciała. Mogą one prowadzić do błędnych wyników – fałszywie ujemnych, fałszywie dodatnich, silnego odczynu tła utrudniającego znacznie ocenę [1–4]. Większość z tych czynników leży po stronie zakładów patologicznych i ich omówienie wykracza poza ramy tego artykułu. Jest jednak jeden główny czynnik, za który odpowiada w większości przypadków lekarz klinicysta – prawidłowe zabezpieczenie i utrwalenie materiału. Standardowym medium utrwalającym jest formalina buforowana o stężeniu 10% (co odpowiada roztworowi formaldehydu o stężeniu 4%) [1, 2]. Zadaniem osoby lub zespołu pobierającego materiał tkankowy jest niezwłoczne umieszczenie go w takim roztworze, prawidłowe oznaczenie próbki i możliwie szybkie przekazanie do zakładu patomorfologii. Duże materiały tkankowe mogą wymagać nacięcia lub nastrzyknięcia formaliną, ze względu na ograniczoną szybkość, z jaką substancja ta przenika w głąb tkanek. Według autorów tego artykułu optymalnym rozwiązaniem jest szybkie dostarczenie materiału do zakładu patomorfologii, gdzie patolog podejmuje decyzję o ewentualnym

rozcięciu lub nastrzyknięciu materiału w celu lepszego utrwalenia.

Skale oceny barwień immunohistochemicznych

Wynik badania immunohistochemicznego otrzymywany z zakładu patomorfologii często zawiera uproszczoną informację „reakcja lub brak reakcji”. Za tym wynikiem kryje się jednak więcej elementów, które choć nie zawsze trafiają do ostatecznego wyniku, biorą udział w ocenie barwienia.

Ocena barwienia immunohistochemicznego zawiera w sobie następujące elementy:

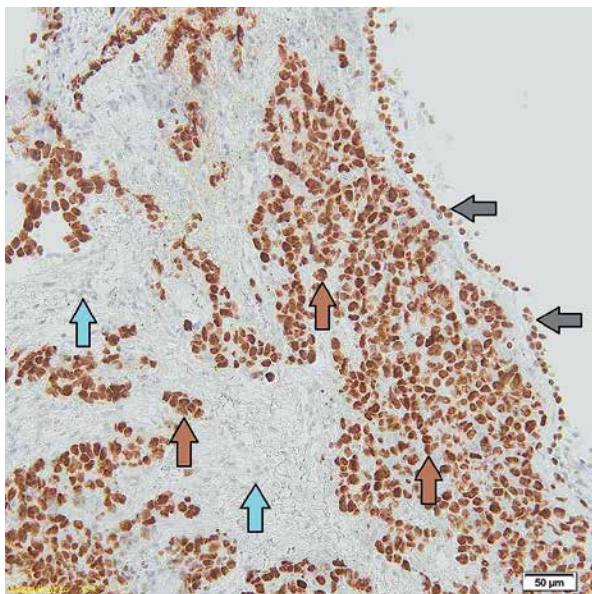
1. Ocena intensywności zabarwienia. W większości przypadków do oceny intensywności zabarwienia (standardowo struktury, w których obecny jest badany marker, wybarwiają się na kolor brązowy; pozostałe struktury są bladoniebieskie) używa się arbitralnej czteropunktowej skali, gdzie 0 oznacza brak reakcji, 1 – słabą reakcję, 3 – silny odczyn, a 2 – stopień pośredni pomiędzy 1 a 3 [6, 7].
2. Ocena liczby wybarwionych komórek (ocena frakcji). Przeważnie dokonuje się oceny liczby wybarwionych komórek badanych w stosunku do wszystkich ocenianych komórek, określając procent wybarwionych komórek. Należy zaznaczyć, że konieczne jest wy-



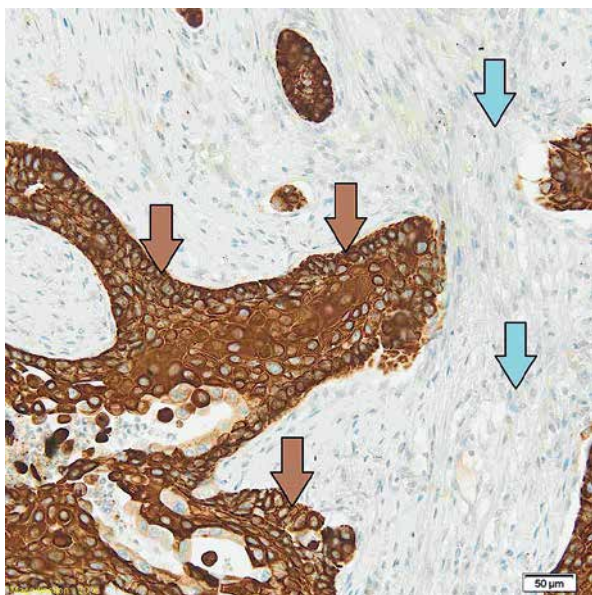
Rycina 1. Przykłady preparatów wybarwionych immunohistochemicznie. Od lewej do prawej: preparat cytologiczny (rozmaz cytologiczny; zawiera rozproszone pojedyncze komórki i grupy komórek, pozwala na ich ocenę cytologiczną i wykonanie zwykle jednego barwienia immunohistochemicznego); preparat z biopsji gruboigłowej (*core biopsy*), waleczek tkankowy, oprócz oceny morfologii komórek pozwala na ocenę struktury badanej tkanki, jednak niewielka ilość dostępnego materiału może ograniczać reprezentatywność próbki i liczbę możliwych do wykonania barwień immunohistochemicznych); standardowy preparat histologiczny z materiału pooperacyjnego (fragment tkankowy; umożliwia pełną ocenę histologiczną i immunohistochemiczną)



odrębnienie w preparacie histologicznym populacji komórek podlegających i niepodlegających ocenie [6]. Na przykład w ocenie guzów nowotworowych



Rycina 2. Przykład reakcji jądrowej (marker p40) w raku płaskonabłonkowym. Wycinek przedstawia naciek nowotworowy pod błoną śluzową. Strzałki brązowe – reakcja jądrowa w komórkach nowotworowych; strzałki niebieskie – komórki podścieliska niewykazujące reakcji z przeciwciałem. W badanym wycinku obecny jest również nabłonek błony śluzowej wykazujący metaplastazę płaskonabłonkową – komórki tego nabłonka również wykazały reakcję z przeciwciałem p40 – strzałki szare



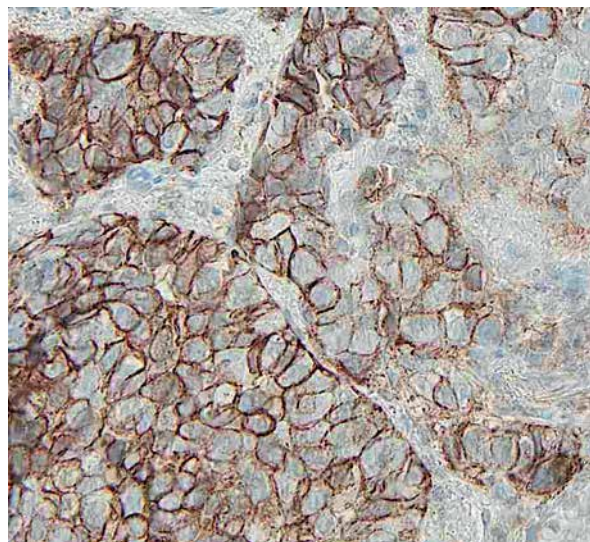
Rycina 3. Przykład reakcji cytoplazmatycznej (marker CK5/6) w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej. Wycinek pochodzący z wnętrza guza. Strzałki brązowe – reakcja cytoplazmatyczna w komórkach nowotworowych; widoczne jest brązowe wybarwienie cytoplazmy oraz brak reakcji w centralnie położonych jądrach komórkowych. Strzałki niebieskie – komórki podścieliska niewykazujące reakcji z przeciwciałem

konieczne jest odróżnienie komórek nowotworowych od nienowotworowych (komórek podścieliska, pozostałości tkanek nieobjętych naciekiem, komórek odczynu zapalnego) – jedynie komórki nowotworowe będą podlegały ocenie ekspresji danego biomarkera (z pewnymi znaczącymi wyjątkami jak chociażby ocena markera PDL-1). W niektórych klasyfikacjach i systemach oceny za warunek miarodajnej oceny przyjmowana jest określona minimalna liczba komórek badanych, poniżej której badany materiał uznawany jest za niediagnostyczny.

3. Rodzaj (lokalizacja) odczynu – bardzo istotne jest określenie nie tylko intensywności lub frakcji wybarwionych komórek, lecz także określenie struktur komórkowych, które ulegają wybarwieniu. Dany biomarker może wykazywać ekspresję jądrową, cytoplazmatyczną, błonową, reakcję typu *dot* (punktowa ekspresja w cytoplazmie) lub typu *dim* (słaba rozproszona reakcja). Tylko ekspresja biomarkera we właściwej dla niego strukturze może być uznana za wynik dodatni. Dla przykładu, markery, takie jak Ki67 (MIB1) lub p40, wykazują ekspresję jądrową – wybarwienie cytoplazmy czy błony komórkowej nie będzie w takim przypadku uznane za reakcję pozytywną.
4. Sposób wybarwienia populacji komórek badanych (gdy frakcja nie jest równa zero lub bliska 100%) – punktowy, rozlany, grupowy (ryc. 2–5).

Przykłady najczęściej stosowanych skal oceny badań immunohistochemicznych

Skala IRS (tab. 1) ocenia zarówno odsetek wybarwionych komórek, jak i dominującą intensywność



Rycina 4. Przykład reakcji błonowej (marker PD-L1) w raku płaskonabłonkowym. Wycinek pochodzący z wnętrza guza. Widoczne jest wybarwienie jedynie błon komórkowych (kolor brązowy), podczas gdy cytoplazma i jądra komórkowe są niewybarwione (kolor błononiebieski)



barwienia. Procentowi wybarwionych komórek przypisywany jest następnie jeden z pięciu progów. Ocena intensywności jest czterostopniowa. Punkty uzyskane za frakcję i intensywność mnoży się, uzyskując maksymalnie 12 punktów, a na ich podstawie klasyfikuje do czterech ostatecznych kategorii [8, 9].

Allred score stosowany jest w ocenie obecności receptorów hormonalnych w rakach piersi. Opiera się na podobnych zasadach – oceniana jest intensywność (0–3) oraz frakcja wykazujących barwienie komórek (0–5). Uzyskane punkty są następnie dodawane, a nie mnożone jak w skali IRS [10, 11].

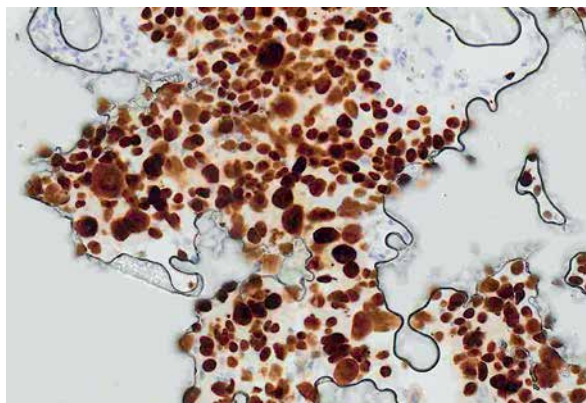
H-score, pierwotnie opracowany również w nowotworach piersi, ma dwa warianty: prostszy, oceniający tylko intensywność (0–3) oraz bardziej złożony, oceniający odsetek komórek wybarwionych z określoną intensywnością i nadający im osobny mnożnik [12, 13]. Daje on rezultat w zakresie od 0 do 300 punktów: $[1 \times (\% \text{ komórek } 1+) + 2 \times (\% \text{ komórek } 2+) + 3 \times (\% \text{ komórek } 3+)]$.

System oceny HER-2 jest przykładem skali oceny ściśle zależnej od barwionej struktury. Opiera się na wybarwieniu błony komórkowej i tylko taki odczyn jest brany pod uwagę [9]. Wybarwienie błon poniżej 10% komórek oznacza wynik negatywny „0”; słaby i częściowy odczyn błonowy w ponad 10% komórek określany jest jako „+1”, ale nadal uznawany za negatywny; słaby do umiarkowanego, ale kompletny odczyn błonowy (cały obwód komórki jest wybarwiony), określany jest jako „+2” – wynik graniczny; silny i kompletny odczyn błonowy w ponad 30% komórek oznacza wynik pozytywny „+3”.

Innym przykładem jest ocena markera PD-L1. Układ PD1/PD-L1 (*programmable death protein 1* – PD1, *PD-ligand 1* – PD-L1) bierze udział w mechanizmie ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego organizmu. Modyfikacja szlaku PD1/PD-L1 jest podstawą terapii immunologicznej stosowanej w niektórych nowotworach [14]. Terapia ta jest zasadna tylko u tych pacjentów, u których stwierdza się ekspresję PD-L1 w obrębie nowotworu, dlatego też badanie immunohistochemiczne tego markera jest niezbędnym elementem kwalifikacji do leczenia.

Sposób oceny tego markera może się różnić w zależności od przyjętego protokołu i narządu, jakiego dotyczy badanie [15, 16]. Przytaczamy ten przykład, ponieważ znajduje coraz szersze zastosowanie w diagnostyce raków głowy i szyi.

W przypadku raka niedrobnokomórkowego płuc oceniana jest proporcja komórek nowotworowych z kompletnym wybarwieniem błony komórkowej w stosunku do wszystkich komórek dostępnych w badaniu (*tumor proportion score* – TPS). Stosowane są trzy przedziały: ekspresja poniżej 1% komórek, ekspresja w zakresie 1–49% komórek oraz ekspresja w zakresie 50% i więcej [15, 16]. Ma to znaczenie w kwalifikacji



Rycina 5. Przykład reakcji jądrowej (marker p40) w preparacie cytologicznym. Rozmaz pochodzi z biopsji cienkoigłowej raka jamy ustnej. Widoczne jest wybarwienie jąder komórek nowotworowych (kolor brązowy), w materiale obecne są również nieliczne komórki zapalne, niewykazujące reakcji (kolor bładoniebieski)

Tabela 1. Skala IRS (Immunoreactive score) – Remmele, Stegner

A – Odsetek komórek wybarwionych	B – Intensywność barwienia
0: brak komórek wybarwionych	0: brak reakcji
1: < 10% komórek wybarwionych	1: reakcja słaba
2: 10–50% komórek wybarwionych	2: reakcja umiarkowana
3: 51–80% komórek wybarwionych	3: silna reakcja
4: > 80% komórek wybarwionych	
Wynik IRS (A × B): 0–12	

IRS – punkty/klasifikacja: 0–1 – 0 = negatywny, 2–3 – 1 = pozytywny, słaba ekspresja, 4–8 – 2 = pozytywny, umiarkowana ekspresja, 9–12 – 3 = pozytywny, silna ekspresja.

do leczenia – przykładowo pembrolizumab jest wdrażany do leczenia, gdy ekspresja PD-L1 jest wysoka (trzeci przedział). Bardzo istotna jest też reprezentatywność próbki – opisaną powyżej ocenę immunohistochemiczną można przeprowadzić tylko na materiale zawierającym minimum 100 żywych komórek guza. Ogranicza to możliwość użycia do tej oceny niektórych materiałów (drobne materiały biopsyjne, biopsja gruboigłowa, wycinki z guza objętego masywną martwicą, cytologia), gdzie materiał był wystarczający do potwierdzenia nowotworu złośliwego, ale może nie spełniać kryteriów do oceny pod kątem PD-L1. Materiał drobny może ulec też zużyciu w kostce parafinowej. Pierwsze skrawki (na podstawie których wykonano standardowe barwienie oraz podstawowe barwienia immunohistochemiczne) mogą zawierać większą liczbę komórek nowotworowych niż kolejne skrojenia przeznaczone do oceny PD-L1.

W przypadku raka szyjki macicy oraz raka połączenia żołądkowo-przełykowego w ocenie PD-L1 używany jest inny schemat CPS (*combined positive score*) uwzględniający w zliczaniu komórek dodatnich również



komórki biorące udział w odpowiedzi immunologicznej – limfocyty i makrofagi obecne w tym samym polu widzenia przy powiększeniu 20x. Uzyskaną liczbę komórek dodatnich dzieli się przez całkowitą liczbę znalezionych komórek guza i mnoży przez 100. Otrzymany wynik może być mniejszy niż 1 (CPS < 1) (co przyjmuje się za brak ekspresji) lub równy albo większy niż 1 (CPS ≥ 1) (przyjmuje się za obecność ekspresji) [15, 16].

W przypadku raków płaskonabłonkowych w obrębie głowy i szyi stosowany jest podobny schemat jak opisany powyżej CPS (*combined positive score*), tyle że z wyodrębnieniem trzech przedziałów (CPS < 1; CPS ≥ 1; CPS ≥ 20; przy czym już przedział drugi kwalifikuje do terapii) [15, 16] (ryc. 6, 7).

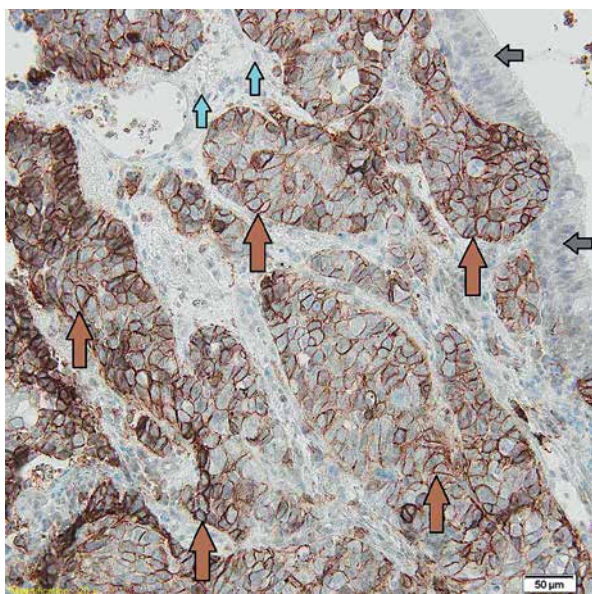
Ocena wybarwienia markera p16, używanego powszechnie jako substytut oceny zakażenia HPV [17, 18], uwzględnia nie tylko sposób wybarwienia komórek, lecz także rozmieszczenie wybarwionych komórek. Za wynik pozytywny uznaje się silną i jednolitą reakcję jądro-cytoplazmatyczną, obejmującą komórki podstawne i przypodstawne nabłonka płaskiego; reakcja niejednolita, słaba i/lub wyłącznie cytoplazmatyczna, uznawana jest za ujemną [19].

Mikromacierze i makromacierze

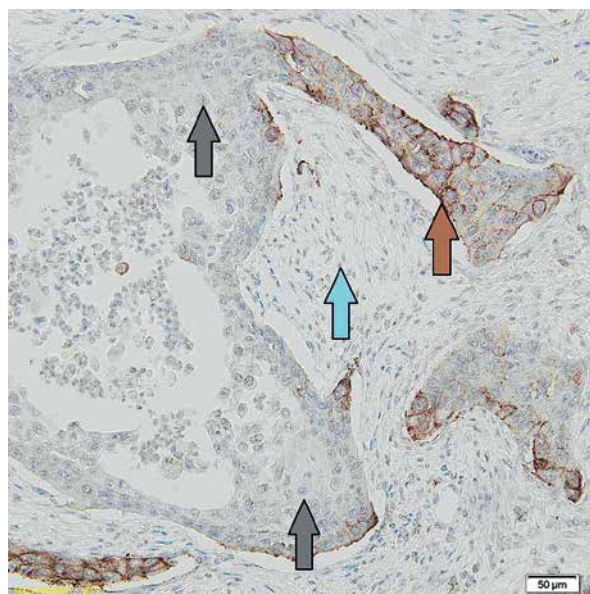
Poniżej przedstawiamy technikę mikro- i makromacierzy. Są one rozwinięciem metody immunohistochemicznej, które umożliwiają ocenę dużej liczby

wycinków tkankowych przy redukcji kosztów i czasu potrzebnego na ich wykonanie [20–23]. Tradycyjne barwienie immunohistochemiczne oznacza, że na jednym szkiełku znajduje się jeden fragment tkankowy. W technice mikro- lub makromacierzy na jednym szkiełku umieszczanych jest wiele wycinków tkankowych, jednocześnie barwionych. Pozwala to zaoszczędzić czas oraz pracę personelu, czynniki zużyte do barwienia oraz materiał tkankowy (którego pozostała część może być wykorzystana do innych badań). Zapewnia jednolitość środowiska barwienia w badanych wycinkach, co sprzyja bardziej miarodajnej ocenie, jednak mniejszy rozmiar badanych próbek może rzutować na wyniki w przypadku oceny heterogennych guzów. Mikro- i makromacierze znajdują obecnie zastosowanie głównie w badaniach naukowych, gdzie konieczna jest ocena wielu przypadków jednocześnie za pomocą tych samych markerów.

Technologia mikromacierzy tkankowych polega na umieszczeniu na jednym preparacie przeznaczonym do barwienia wielu reprezentatywnych wycinków tkankowych z licznych badanych przypadków (dziesiątek czy nawet setek). Materiał pozyskiwany jest przez wycięcie cylindra tkankowego ze standardowego bloczka parafinowego [22, 23]. Do jej zalet należą oszczędność materiału i odczynników, jednolite środowisko reakcji minimalizujące błąd metody. Głównymi minusami są mały rozmiar próbki badanej tkanki, przez co heterogenność badanej zmiany może mieć wpływ na uzyskany wy-

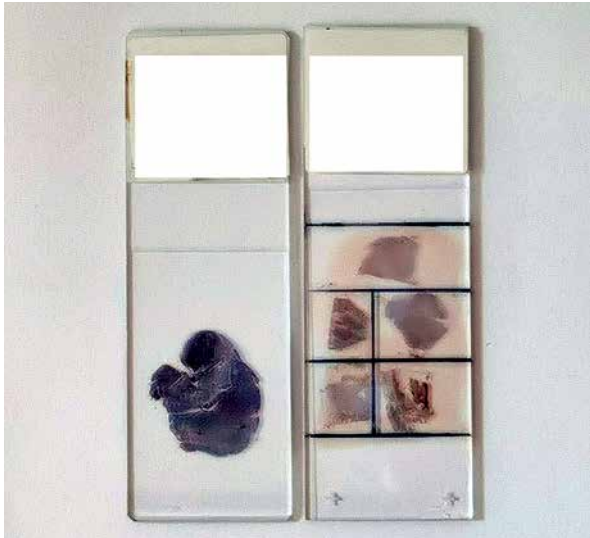


Rycina 6. Przykład reakcji PD-L1 w raku płaskonabłonkowym płuca – frakcję wykazujących reakcję komórek nowotworowych (TPS) oceniono na 90%. Wycinek pochodzący z wnętrza guza. Strzałki brązowe – reakcja błonowa w komórkach nowotworowych; strzałki niebieskie – komórki nienowotworowego podścieliska niewykazujące reakcji z przeciwciałem. W badanym wycinku obecny jest również nabłonek walcowaty błony śluzowej dróg oddechowych (strzałki szare), niewykazujący reakcji



Rycina 7. Przykład reakcji PD-L1 w raku płaskonabłonkowym płuca – frakcję wykazujących reakcję komórek nowotworowych (TPS) oceniono na 20%. Wycinek pochodzący z wnętrza guza. Strzałka brązowa – reakcja błonowa w komórkach nowotworowych; strzałki szare – komórki nowotworowe niewykazujące reakcji; strzałki niebieskie – komórki podścieliska, również niewykazujące reakcji z przeciwciałem





Rycina 8. Porównanie standardowego preparatu histologicznego wybarwionego immunohistochemicznie (po lewej) oraz prostej makromacierzy zawierającej pięć różnych wycinków, wybarwionych jednym przeciwciałem (po prawej)

nik, oraz brak standardów w tworzeniu mikromacierzy. Próbkę tkankową makromacierzy mają zwykle rozmiar od 0,6 do 2,0 mm.

Technologia makromacierzy tkankowych jest podobna do technologii mikromacierzy. Główną różnicą jest rozmiar próbek umieszczanych na makromacierzy – 4 mm lub więcej. Próbkę mogą zostać pozyskane z wykonanych wcześniej do innych celów (np. diagnostyki) standardowych blozków parafinowych lub mogą zostać pobrane z materiału pooperacyjnego konkretnie w celu badania na makromacierzach [20, 21]. Makromacierze mają tę przewagę nad mikromacierzami, że zapewniają znacznie lepszą, bardziej reprezentatywną próbę heterogennych guzów i są łatwiejsze technicznie do wykonania. Minusem w porównaniu z mikromacierzami jest mniejsza liczba badanych jednocześnie próbek (od kilku do 20 próbek na jedną makromacierz).

Mikro- i makromacierze stanowią materiał histologiczny i podlegają ocenie za pomocą skal stosowanych w immunohistochemii, opisanych powyżej (ryc. 8).

Podsumowanie

Badania immunohistochemiczne są prężnie rozwijającym się działem patologii o znaczących implikacjach terapeutycznych. Bez tych metod nie można dokonać prawidłowej diagnostyki ani wdrażyć leczenia celowanego w dużej grupie pacjentów z chorobami nowotworowymi. Dlatego też ważną jest współpraca pomiędzy patologami i klinicystami (w szczególności chirurgami) oraz przybliżenie technik i zasad ceny preparatów za pomocą technik immunohistochemicznych.

Piśmiennictwo

- Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 2017; 1641: 115-28.
- O'Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A, et al. Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol* 2014; 8: 783-98.
- Comanescu M, Arsene D, Ardeleanu C, Bussolati G. The mandate for a proper preservation in histopathological tissues. *Rom J Morphol Embryol* 2012; 53: 233-42.
- Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun* 2020; 40: 135-53.
- Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicol Pathol* 2004; 32: 126-31.
- Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol* 2012; 7: 42.
- McCarty KS, Szabo E, Flowers JL, et al. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res* 1986; 46: 4244s-8s.
- Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8: 138-40.
- Kaemmerer DP, Lupp L, Schulz A, et al. Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5: 187-94.
- Elledge RM, Green S, Pugh R, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 2000; 89: 111-7.
- Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ. Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 16-20.
- Detre S, Saccani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Clin Pathol* 1995; 48: 876-8.
- Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol* 2014; 9: 221.
- Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol* 2016; 7: 550.
- Dako: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx
- Agilent: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual, NSCLC
- Lewis JS Jr, Thorstad WL, Chernock RD, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1088-96.
- Nasierowska-Guttmeier A, Kędzia W, Rokita W, et al. Polish recommendations regarding diagnostics and treatment of cervical squamous intraepithelial lesions according to the CAP/ASCCP guidelines. *Ginekolog Pol* 2016; 87: 670-6.
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al.; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 1266-97. Erratum in: *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 738.
- Wang L, Deavers MT, Malpica A, et al. Tissue microarray: a simple and cost-effective method for high-throughput studies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003; 11: 174-6.
- Dias E, Picciani BLS, Dos Santos V, Cunha KS. A simple technique to construct tissue microarrays. *J Clin Pathol* 2018; 71: 890-4.



22. Jawhar NM. Tissue microarray: a rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med* 2009; 29: 123-7.
23. Vogel U. Overview on techniques to construct tissue arrays with special emphasis on tissue microarrays. *Microarrays* 2014; 3: 103-36.

Adres do korespondencji:

Paweł Kosikowski
Zakład Patomorfologii Klinicznej
Katedra i Zakład Patomorfologii i Immunologii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w
Poznaniu
ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań
e-mail: kosikowski.pawel@gmail.com

