

Diplomarbeit

**Verwendung immunhistochemischer Mitochondrien-
Färbungen in der histopathologischen Klassifizierung
follikulärer Schilddrüsentumore**

eingereicht von

Anna Marochkin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Drⁱⁿ. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Diagnostik & Forschungs- (D&F) Institut für Pathologie

unter der Anleitung von

Univ. FA Priv.-Doz. Dr. med. univ. Oleksiy Tsybrovskyy

Univ. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. univ. Barbara Obermayer-Pietsch

Graz, 22. Mai 2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 22. Mai 2024

Anna Marochkin eh.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Priv.-Doz. Dr. med. univ. Oleksiy Tsybrovskyy bedanken, der mir bei der wissenschaftlichen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und geduldig die ersten Entwürfe korrigierte.

Auch dem Team des Diagnostik- und Forschungsinstituts der Pathologie, das daran beteiligt war die hier verwendeten Schnitte und Färbungen durchzuführen, möchte ich auf diesem Wege danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern, Svetlana und Evgeni, ohne deren emotionale und finanzielle Unterstützung dieses Studium nicht möglich gewesen wäre und meinem Bruder, Anton, der mich regelmäßig daran erinnert, das Leben etwas leichter zu nehmen.

Zusammenfassung

Einleitung

Onkozytäre Schilddrüsentumore sind in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung anhand ihrer geschwollenen, fein-granulierten und eosinophilen Zellen zu erkennen. Diese Merkmale sind einer enormen Anreicherung an Mitochondrien mit defekter OXPHOS-Kette zuzuschreiben.

Onkozytäre Veränderungen werden in der Routinediagnostik nicht zuverlässig als solche erkannt, weshalb es immunhistochemischer mitochondrialer Färbungen bedarf.

Mittels eines pan-mitochondrialen Markers (Prohibitin) wurde in der Vorstudie (1) nicht nur die Erkennung von onkozytären Veränderungen verbessert, sondern auch die Existenz von „mitochondrion-rich-non-oncocytic“ (MRNO) Tumoren beschrieben. In einer späteren Studie wurde Prohibitin um NDUFS4 als Marker der intakten OXPHOS-Kette, ergänzt und die neue Markerkombination erfolgreich zur Detektion von onkozytären Veränderungen an papillären Schilddrüsentumoren angewandt (2). An follikulären Tumoren wurde das Marker-Duo bisher noch nicht verwendet.

Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es das immunhistochemische Duo Prohibitin/NDUFS4 auf seinen praktischen Nutzwert in der Detektion von mitochondrialen Veränderungen zu prüfen und im Zuge dessen das Konzept der „MRNO“-Tumore zu validieren.

Methoden

Das Material umfasste alle Fälle der follikulären und onkozytären Schilddrüsenkarzinome der Jahre 1986-2006 aus dem Archiv des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Pathologie in Graz. Die Tumore wurden reevaluiert und re-staged. Aus den repräsentativen Tumorböcken wurden Tissue Microarrays konstruiert. Die Schnitte wurden entsprechend gefärbt, digitalisiert und in Microsoft Access ausgewertet.

Ergebnisse

Das Prohibitin/NDUFS4 Duo hat sich in der Detektion onkozytärer Veränderungen als zuverlässig erwiesen. In der H&E-Färbung konnten nur 74% der onkozytären Tumore als solche erkannt werden (Sensitivität), während die Spezifität bei 98% lag.

Die nicht-onkozytären Läsionen ließen sich anhand der Mitochondrienakkumulation und deren Funktionstüchtigkeit in vier Kategorien aufteilen: „non-specific-type“ (NST), „mitochondrion-rich-non-oncocytic“ (MRNO), „heteroplasmisch“ und „mitochondrion-defective-non-oncocytic“ (MDNO).

„MRNO“-Tumore zeigten eine wesentlich höhere Malignitätsrate (71%) als Tumore ohne Anreicherung von Mitochondrien (28% für „NST“- und „MDNO“-Gruppen gemeinsam).

Schlussfolgerung

Onkozytäre Veränderungen in Schilddrüsentumoren werden in der routinemäßigen H&E-Färbung oft übersehen. Das immunhistochemische Prohibitin/NDUFS4 Duo ist hilfreich, um dieses Manko zu beheben, und erlaubt zudem, diverse mitochondriale Signaturen in nicht-onkozytären Tumoren zu bestimmen. Auf diese Weise konnte das in der Vorstudie aufgestellte Konzept der „MRNO“-Tumore bestätigt werden, insbesondere hinsichtlich ihres hohen Malignitätspotentials. Das unterstreicht die Vermutung, dass biologisch aggressivere Schilddrüsentumore auf das Vorhandensein von biochemisch funktionstüchtigen Mitochondrien angewiesen sind. Dieses Phänomen muss in weiteren Studien geklärt werden.

Abstract

Introduction

Oncocytic thyroid tumors can be recognized in hematoxylin-eosin staining by their swollen, finely granular and eosinophilic cells. These features result from an enormous accumulation of mitochondria with a defective OXPHOS chain.

Oncocytic change is not reliably recognized as such in routine diagnostics, hence immunohistochemical staining is required for diagnosis.

In the previous study from 2009 (1), the existence of mitochondrion-rich non-oncocytic (MRNO) tumors was described but confirmed using only a pan-mitochondrial marker (Prohibitin). In a second study from 2021 (2) Prohibitin was supplemented by NDUFS4, as a marker of the intact OXPHOS chain, and this combination was successfully used to detect oncocytic change in papillary thyroid tumors. The marker duo has not yet been used on follicular tumors.

Objective

The aim of this work was to test the immunohistochemical duo Prohibitin/NDUFS4 for its practical value in the detection of mitochondrial changes and to validate the concept of "MRNO" tumors.

Methods

The study encompassed all cases of follicular and oncocytic thyroid carcinomas from the archive of the Diagnostic and Research Institute of Pathology in Graz between 1986 to 2006. The tumors were re-evaluated and re-staged. Tissue microarrays were constructed from the representative tumor blocks. The sections were stained, digitized and evaluated in Microsoft Access.

Results

The Prohibitin/NDUFS4 duo proved to be reliable in the detection of oncocytic change. Without this marker combination, only 74% of oncocytic tumors could be detected as such (sensitivity), while the specificity was 98%.

The non-oncocytic lesions could be divided into four categories based on mitochondrial accumulation and their functionality: "non-specific-type" (NST), "mitochondrion-rich-non-

oncocytic" (MRNO), "heteroplasmic" and "mitochondrion-defective-non-oncocytic" (MDNO).

Notably, "MRNO" tumors showed a significantly higher malignancy rate (71%) than tumors without mitochondrial accumulation (28% for both "NST"- and "MDNO"-groups).

Conclusion

Oncocytic changes are often overlooked in routine H&E-staining. The immunohistochemical Prohibitin/NDUFS4 duo is useful in remedying this deficiency and allows to determine various mitochondrial signatures in non-oncocytic tumors. This way the concept of "MRNO" tumors established in the previous study was confirmed, particularly regarding their high malignant potential. This underlines the assumption that biologically aggressive thyroid tumors are dependent on the presence of biochemically functional mitochondria. This phenomenon needs to be clarified in further studies.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und deren Erklärung.....	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1 Anatomie der Schilddrüse	4
1.2 Histologie und Funktion der Schilddrüse	4
1.3 Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom	6
1.3.1 Epidemiologie.....	6
1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren	6
1.3.3 Makroskopie und Klinik.....	7
1.3.4 Histologie	7
1.3.5 Therapie und Prognose	9
1.4 Onkozytäre Tumore.....	10
1.4.1 Histologie	11
1.4.2 Biochemische Veränderungen.....	14
1.4.3 Therapie und Prognose	15
1.5 Immunhistochemie	16
1.5.1 Prinzip.....	16
1.5.2 Verwendete immunhistochemische Marker	18
2. Fragestellung und Ziele	20
3. Materialien und Methoden.....	21
3.1 Recherche	21
3.2 Datenerhebung.....	21
3.3 Tissue Microarrays, H&E-Färbungen und Immunhistochemie	22
3.4 Statistische Auswertung	28
4. Ergebnisse.....	29
4.1 Zuverlässigkeit der mitochondrialen Marker	29
4.2 Die Markerkombination ergibt fünf Tumorgruppen mit distinkten mitochondrialen Signaturen.....	31
4.3 Schwierigkeiten in der Erkennung von onkozytären Veränderungen im H&E-Schnitt	38
4.4 Nicht-onkozytäre mitochondriale Signaturen kann man in der H&E-Färbung nicht voneinander unterscheiden	40
4.5 Korrelation der mitochondrialen Signaturen mit der Dignität.....	41
5. Diskussion	44
5.1 Beantwortung der Forschungsfragen.....	44
5.2 Kritische Reflexion.....	45
5.3 Implikationen für Theorie und Praxis.....	46
5.4 Ausblick und Anregungen für weiterführende Arbeiten	47
5.5 Schlussfolgerungen.....	48
Literaturverzeichnis	49

Abkürzungen und deren Erklärung

H&E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
CD31	Cluster of Differentiation 31, auch bekannt als Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
ATP	Adenosintriphosphat
MT-ND1	mitochondrial kodierte Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH)-Ubichinon-Oxidoreduktase-Kernuntereinheit 1
I131	Radioisotop von Jod
pH	Potential des Wasserstoffs, <i>lat.</i> pondus hydrogenii
NDUFS4	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Untereinheit S4
MRNO	mitochondrion-rich-non-oncocyctic
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
TNM-Klassifikation	Tumor, node, metastasis classification
TMA	Tissue Microarray
Tris-EDTA	wässrige Lösung von Trometamol (Tris) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
NST	Non-specific-type
MDNO	Mitochondrion-defective-non-oncocyctic

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Histologie der Schilddrüse</i>	5
<i>Abbildung 2: H&E Färbung einer Gefäßinvasion eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms</i>	8
<i>Abbildung 3: Immunhistochemische CD31 Färbung, des in Abb. 2 dargestellten Schnitts, zum Nachweis einer Gefäßinvasion</i>	8
<i>Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Onkozyten</i>	12
<i>Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Nahaufnahme der Mitochondrien und anderer Organellen</i>	12
<i>Abbildung 6: H&E-Färbung eines onkozytären Karzinoms</i>	13
<i>Abbildung 7: Zytologie mit Onkozyten</i>	13
<i>Abbildung 8: Prohibitin Färbungen unterschiedlicher Clustergrößen</i>	24
<i>Abbildung 9: Histologische und immunhistochemische Darstellung einer normalen Schilddrüse</i>	26
<i>Abbildung 10: Interne Positivkontrolle in der NDUFS4-Färbung</i>	27
<i>Abbildung 11: Falsch-negative NDUFS4-Färbung</i>	27
<i>Abbildung 12: Histologische und immunhistochemische Darstellung einer falsch-positiven NDUFS4 Färbung.</i>	30
<i>Abbildung 13: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines NST-Tumors.</i>	33
<i>Abbildung 14: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines „MRNO“- Tumors.</i>	34
<i>Abbildung 15: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines heteroplasmischen Tumors.</i>	35
<i>Abbildung 16: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines „MDNO“- Tumors.</i>	36
<i>Abbildung 17: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines onkozytären Tumors.</i>	37
<i>Abbildung 18: Balkendiagramm Dignitätsverteilung innerhalb der immunhistochemisch „nicht-onkozytären“ Gruppe</i>	43

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Kategorieneinteilung nach der Immunhistochemie.....</i>	32
<i>Tabelle 2: Kreuztabelle Mitochondriale Signatur und H&E-Schnitt.....</i>	38
<i>Tabelle 3: Kreuztabelle mitochondriale Akkumulation gegen H&E-Schnitt</i>	40
<i>Tabelle 4: Kreuztabelle H&E-Schnitt gegen Dignität.....</i>	41
<i>Tabelle 5: Kreuztabelle Immunhistologie gegen Dignität.....</i>	41
<i>Tabelle 6: Kreuztabelle Dignität versus Immunhistologie der nicht-onkozytären Tumoren</i>	42

1. Einleitung

Zunächst erfolgt eine kurze Zusammenfassung der Grundlagen, sowie eine Hinführung zum Thema der onkozytären Schilddrüsenkarzinome und warum es wichtig ist sie korrekt zu erkennen.

1.1 Anatomie der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist ein endokrines Organ, bestehend aus zwei Schilddrüsenlappen, die über einen Isthmus verbunden sind. Es hat eine Länge von etwa 4cm, eine Breite von 1,5 – 2cm und eine Dicke von 2 – 4cm, wodurch sich für Erwachsene ein durchschnittliches Gewicht von 15-25g ergibt. Die Schilddrüse ist bedeckt von einer dünnen, fibrösen Kapsel.

Das Organ befindet sich ventral und lateral des oberen Abschnitts der Trachea, sowie des Larynx. Auf der dorsolateralen Seite der Schilddrüse liegt die Arteria carotis communis und ventrolateral wird sie bedeckt von den Musculi sternothyroidei, sternohyoidei und sternocleidomastoidei. (3)

1.2 Histologie und Funktion der Schilddrüse

Die Organkapsel, die die Schilddrüse umgibt, besteht aus zwei Blättern. Zwischen diesen Blättern befinden sich dorsal die Nebenschilddrüsen, sowie die versorgenden Blutgefäße. Das innere Blatt bildet Septen, die die Drüse in Läppchen unterteilen. Innerhalb der Läppchen finden sich runde, in der Größe variierende Follikel, die von einem einschichtigen Epithel begrenzt und mit Kolloid gefüllt sind. Die Follikel besitzen je eine eigene Basalmembran und Kapillarnetze. Innerhalb einer solchen Follikel-Basalmembran befinden sich vereinzelte, das Hormon Calcitonin produzierende, C-Zellen, die allerdings keinen Kontakt zum Follikellumen haben. Das Epithel erscheint in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (im folgenden H&E-Färbung genannt) rötlich-rosa und damit eosinophil (siehe Abbildung 1)(4).

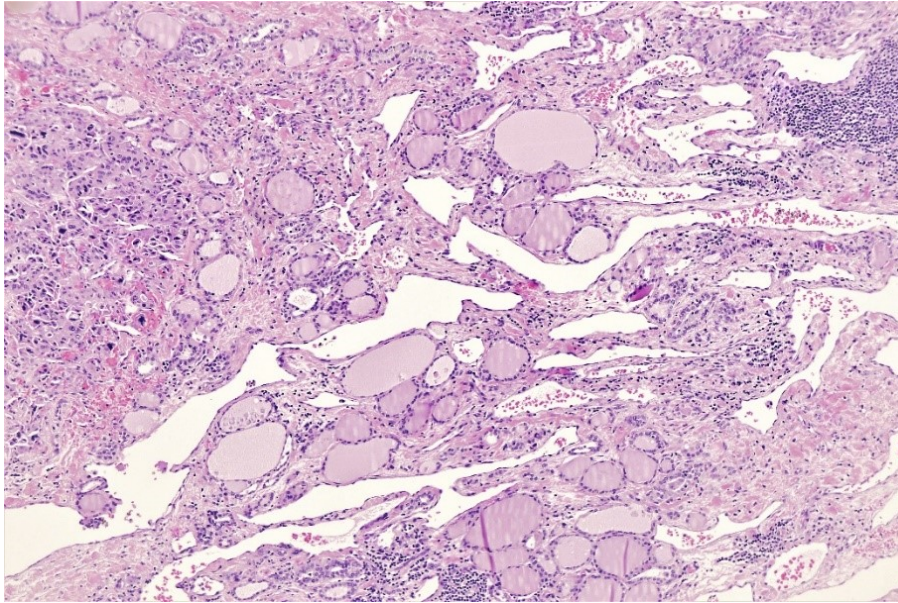


Abbildung 1: Histologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist verantwortlich für die Produktion der Hormone Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3). Zunächst erfolgt jedoch die Bildung des tyrosinreichen Proteins Thyreoglobulin in den Follikel­epithel­zellen, den sogenannten Thyreozyten. Ebenso wird über die Nahrung aufgenommenes Jod über einen Natrium-Jod-Symporter aus dem Blut in die Thyreozyten aufgenommen und oxidiert. Dieses Thyreoglobulin wird gemeinsam mit dem oxidierten Jod in das Follikellumen gebracht, wo die Tyrosylreste des Globulins jodiert und anschließend gekoppelt werden, gefördert durch das Enzym Thyreoperoxidase. Hierdurch sind die Hormone Thyroxin und Trijodthyronin entstanden, allerdings sind sie noch an das Speicherprotein Thyreoglobulin gekoppelt. Kommt es nun zu einer Stimulation durch das Thyroidea-stimulierende-Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen wird das Speicherprotein durch Endozytose vom Kolloid wieder in die Thyreozyten aufgenommen. Dort kommt es zu einer Fusion mit Lysosomen und zur Abspaltung und Dejodierung der Hormone und schließlich zur Abgabe ins Blut, wo sie gebunden an Transportproteine zu ihren Zielorganen gebracht werden, als Liganden für Transkriptionsfaktoren (4,5). Die Höhe des Epithels variiert nach Aktivitätszustand, so ist es flach bei geringer Schilddrüsenaktivität und hoch bei vermehrter Aktivität (4).

1.3 Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom

Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom ist ein maligner Tumor der Schilddrüse mit einer follikulären Differenzierung, der häufig eine Invasion der umgebenden Kapsel und Gefäße aufweist und circa 10% aller Schilddrüsenkarzinome ausmacht (6).

1.3.1 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz der follikulären Schilddrüsenkarzinome blieb in den letzten Jahrzehnten weitgehend konstant. Die Inzidenz ist bei Frauen allerdings höher als bei Männern (7). Die Mortalität hat bei beiden Geschlechtern über die letzten Jahrzehnte aufgrund besserer Diagnostik, vor allem in der Histologie, verbesserter Therapien und einer Reduktion der Jod-Mängel Zustände, die einen großen Risikofaktor darstellen, durch die Zugabe von Jod zu Nahrungsmitteln, abgenommen (7,8).

Die Überlebensrate ist sehr variabel mit 46-97%, abhängig vom Zeitpunkt der Erstdiagnose, dem Metastasierungsstand zum Diagnosezeitpunkt, sowie Beginn und Art der Therapie (9).

1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Jod-Mangel galt als einer der häufigsten Risikofaktoren für Schilddrüsenkarzinome. Dabei kommt es zu einer kompensatorischen Aktivitätserhöhung der Schilddrüse, um mehr Jod aufnehmen zu können, wobei die chronische Überstimulation in einer Erhöhung der Prävalenz von toxischen Strumaknoten resultiert, welche wiederum das Risiko für follikuläre Karzinome erhöhen. Seit der Zuführung von Jod in Nahrungsmitteln und Speisesalz ist die Ratio an Jod-Defizit-bedingten Schilddrüsenknoten zurückgegangen (10). Ionisierende Strahlung, insbesondere im Kindesalter, wird eher mit der Entstehung von papillären Schilddrüsenkarzinomen assoziiert (11). Gerade Frauen haben ein erhöhtes Risiko an einem Schilddrüsenkarzinom zu erkranken, wenn sie bereits benigne Knoten oder Adenome in der Schilddrüse aufweisen oder, wie bereits zuvor erwähnt, Jod-Mangel bedingt an einem Kropf leiden (11,12).

1.3.3 Makroskopie und Klinik

Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom kann überall in der Schilddrüse auftreten und zeigt sich makroskopisch sehr unterschiedlich. Das Karzinom kann sich als dick bekapselter, solider Tumor präsentieren oder einem follikulären Adenom ähneln, mit dünnerer Kapsel und brauner, kolloider Schnittfläche. Kapselinvasionen sind makroskopisch selten zu sehen, häufiger finden sich Gefäßeinbrüche beispielsweise als Tumorthromben in großen umgebenden Venen. Ist der Tumor grob invasiv erkennt man makroskopisch bereits die destruierende Ausbreitung in die Schilddrüsenumgebung (6).

Gefäßeinbrüche führen zu früher hämatogener Metastasierung, weshalb Metastasen, vor allem in Knochen und Lunge, oft vor dem eigentlichen Schilddrüsenkarzinom gefunden werden. In den übrigen Fällen äußert sich ein follikuläres Schilddrüsenkarzinom als schmerzloser Knoten. Die Größe des Primärtumors variiert von <1cm bis hin zu mehreren Zentimetern und kann bei starkem Wachstum zu Dyspnoe führen, durch Kompression der Trachea, oder gar zu Schluckstörungen. Das Karzinom ist meist ein singulärer Tumor und kommt selten multifokal vor (6,13).

1.3.4 Histologie

Zur Differenzierung eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms von einem follikulären Adenom ist die Invasion der umgebenden Kapsel und/oder die Gefäßinvasion im histologischen Präparat ausschlaggebend.

Das Karzinom lässt sich unterteilen in

- 1.) minimal invasiv, wobei nur die Kapsel, häufig pilz-förmig, durchbrochen wird,
- 2.) angioinvasiv mit Veneneinbrüchen innerhalb oder außerhalb der Tumorkapsel (siehe Abbildung 2),
- 3.) grob invasiv, durch große, schilddrüsenferne Gefäßeinbrüche und Invasion des gesunden Schilddrüsengewebes, sowie des umliegenden Weichgewebes.

Letztere sind häufig in großen Tumoren zu finden (6,14). Um eine Gefäßinvasion sicher feststellen zu können, empfiehlt sich eine immunhistochemische Färbung mit CD31, die die Endothelzellen der Gefäße sichtbar macht (15) und somit die Entscheidung, ob das Tumorgewebe sich innerhalb eines Gefäßes befindet, erleichtert (siehe Abbildung 3). Eine

Invasion der Lymphgefäße und der Lymphknoten wird, im Gegensatz zum papillären Schilddrüsenkarzinom, kaum beobachtet (15).

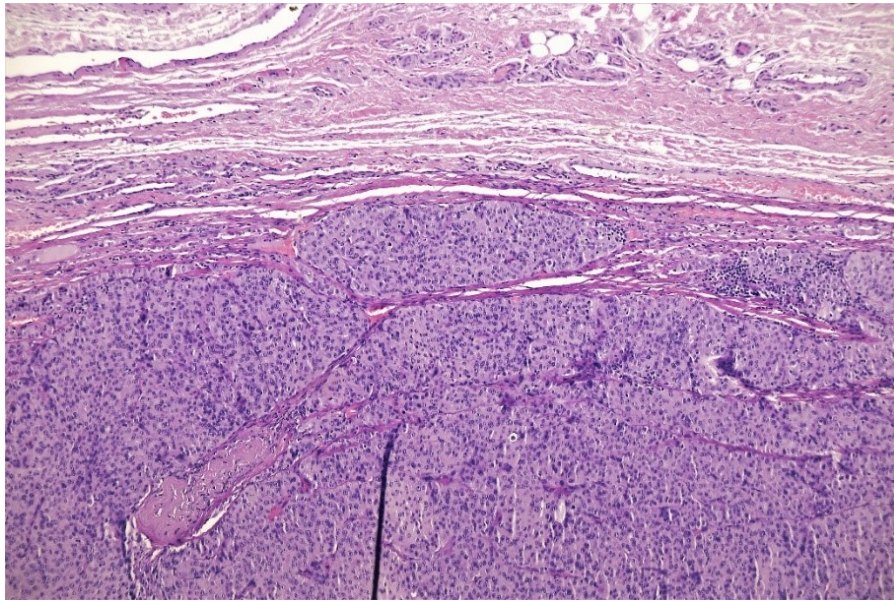


Abbildung 2: H&E Färbung einer Gefäßinvasion eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms

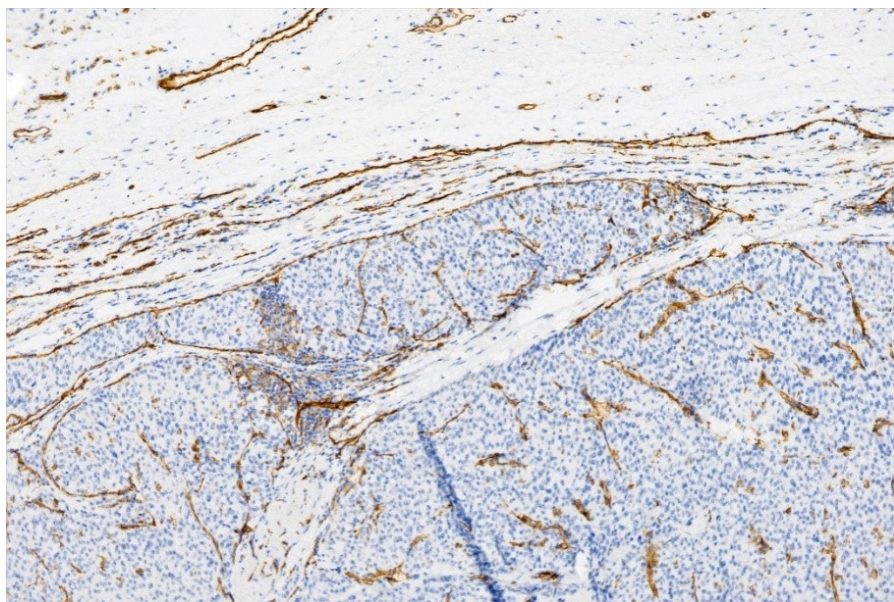


Abbildung 3: Immunohistochemische CD31 Färbung, des in Abb. 2 dargestellten Schnitts, zum Nachweis einer Gefäßinvasion

Histologisch präsentiert sich das Karzinom sehr variabel und kann eine solide, trabekuläre, kribriforme, mikro-, normo- oder makrofollikuläre Form aufweisen. Kernatypien finden sich seltener und sind nicht entscheidend für die Diagnosestellung (16).

Die häufig durchgeführte zytologische Untersuchung einer Feinnadelaspiration ist nicht ausreichend zur Diagnostik, da anhand dieser keine Kapsel- oder Gefäßinvasion festgestellt

werden kann. Die Histologie ist notwendig, um ein follikuläres Schilddrüsenkarzinom sicher zu diagnostizieren, denn das Ausmaß der Invasion ist prognostisch relevant (17).

1.3.5 Therapie und Prognose

Die derzeitige Therapie setzt sich zusammen aus der chirurgischen Teilresektion der Schilddrüse oder einer Thyreodektomie und der anschließenden Radiojodtherapie mit I131. Ist der Primärtumor größer als vier Zentimeter, grob invasiv oder angioinvasiv mit klinisch auffälligen Metastasen, empfehlen die Guidelines (18) eine nahezu-vollständige oder vollständige Thyreodektomie damit anschließend eine Radiojodtherapie durchgeführt werden kann. Für Primärtumore, die eine Größe zwischen einem und vier Zentimetern haben und nicht angioinvasiv sind, wird hingegen eine bilaterale Thyreodektomie oder eine Lobektomie empfohlen, jedenfalls keine Radiotherapie (18). Die Prognose ist gut, wenn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Gefäßinvasion nachgewiesen wurde. Je mehr Veneneinbrüche gefunden werden, desto höher ist das Risiko, dass der Tumor bereits hämatogen metastasiert hat und desto schlechter ist die Prognose (19). Häufig werden die Fernmetastasen vor dem Primärtumor festgestellt, insbesondere in Lunge, Knochen und Leber (20).

In den American Thyroid Association Management Guidelines (18) wurden außerdem Risikogruppen für das Wiederauftreten des Tumors nach initial erfolgter Therapie festgelegt. Es wird unterschieden zwischen „high-risk“, „intermediate-risk“ und „low-risk“. Diese Gruppen werden weltweit mehrheitlich zur Risikoeinschätzung genutzt, so auch in Europa (21).

- „Low-risk“ Patienten*innen weisen weder vaskuläre noch extrathyroidale Invasionen auf und alle Metastasen sind erfolgreich entfernt worden.
- Zu den „intermediate-risk“ Patienten*innen gehören jene mit mikroskopischer Invasion des umgebenden Weichgewebes, sowie Radio-Jod sensiblen lokalen Metastasen und mäßiger Angioinvasion.
- „High-risk“ Patienten*innen zeichnen sich aus durch makroskopische Tumorinvasion, massive Gefäßeinbrüche mit Fernmetastasen und dem Überbleiben von unvollständig resezierten Tumoren (18).

1.4 Onkozytäre Tumore

Onkozytäre Tumore wurden vor der aktuellen WHO – Klassifikation 2022 noch als Hürthle-Zell-Tumore bezeichnet und davor galten sie als eine onkozytäre Variante des follikulären Schilddrüsenkarzinoms (22). Sie bestehen überwiegend aus Onkozyten: großen, aufgrund einer Akkumulation defekter Mitochondrien, geschwollenen Zellen (23,24). Die Schnittstelle, ab wann ein Tumor als onkozytär bezeichnet wird, liegt bei >75% Onkozyten, wobei dieser Cut-Off arbiträr gewählt wurde (6,22). Es wird zwischen nicht invasiven onkozytären Adenomen und invasiven onkozytären Karzinomen unterschieden, ähnlich den Unterscheidungskriterien der follikulären Schilddrüsentumore (6,24).

Die Ätiologie dieser Tumore ist noch unbekannt. Das Mutationsprinzip ähnelt dem des follikulären Schilddrüsenkarzinoms, zusätzlich finden sich beim onkozytären Karzinom massive Kopienzahlvarianten und mitochondriale DNA-Mutationen, die zu Defekten im Komplex 1 führen und für die charakteristischen Veränderungen verantwortlich sind (25).

Onkozytäre Tumore können in jedem Teil der Schilddrüse auftreten und äußern sich zu Beginn als schmerzlose Schwellung von mehr als zwei Zentimetern, selten kleiner (6).

Derzeit wird vermutet, dass das onkozytäre Karzinom vor allem Männer und Patienten*innen mittleren Alters von etwa 57 Jahren betrifft. Ebenso wird davon ausgegangen, dass die onkozytären Karzinompatienten*innen größere Tumore und schlechtere Überlebenschancen haben im Vergleich zu nicht-onkozytären Karzinompatienten*innen (26).

Hierbei ist anzumerken, dass Onkozyten beziehungsweise onkozytäre Veränderungen auch eine Alterserscheinung sein können oder bei Entzündungen und Hyperplasien auftreten, nicht nur im Rahmen von Tumoren (23).

1.4.1 Histologie

Onkozyten sind große Zellen mit fein granulärem, eosinophilem Zytoplasma und zentral lokalisiertem Zellkern, in den meisten Fällen mit einem prominenten Nukleolus (6,24,27). Im Zytoplasma befinden sich zahlreiche defekte Mitochondrien, die in der gesamten Zelle große Cluster bilden und dadurch zum Verlust der physiologischen Polarität der Organellen führen. Stattdessen entsteht oft eine aberrante Polarität mit basaler Akkumulation der defekten Mitochondrien und einer apikalen Verschiebung der endoplasmatischen Retikula und der Zellkerne. Dies ist nicht nur im Elektronenmikroskop sichtbar (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5), sondern häufig auch lichtmikroskopisch am H&E-Schnitt (siehe Abbildung 6) erkennbar (1,28). Zytologisch sind Onkozyten aufgrund ihrer Größe und fein granulärem Zytoplasma ebenfalls leicht zu unterscheiden (siehe Abbildung 7) (29).

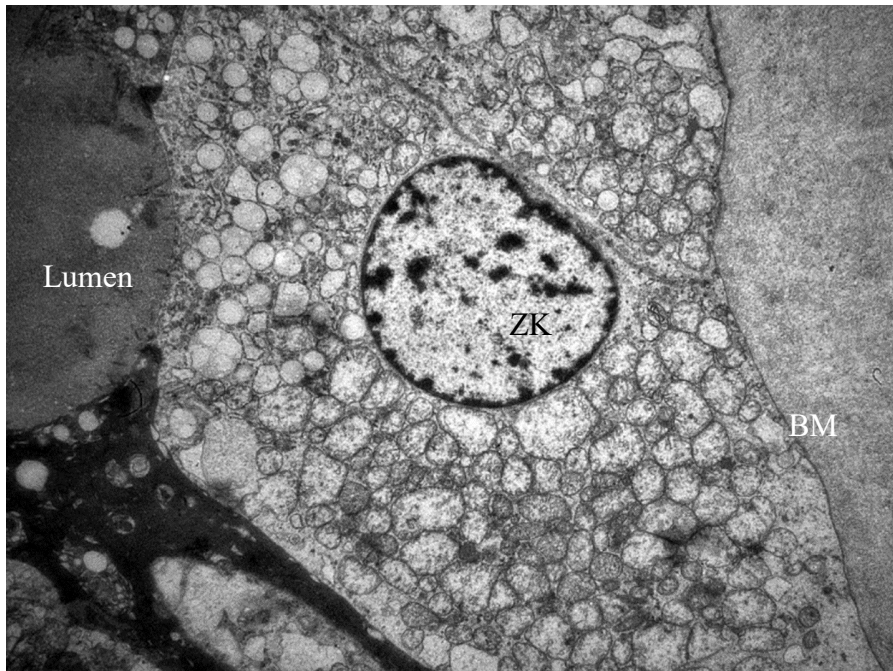


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Onkozyten

Die Mitochondrien liegen dicht gepackt im basalen Teil - näher zur Basalmembran (BM) - des Zytoplasmas, während im apikalen Bereich - näher zum Follikellumen - kaum Mitochondrien zu sehen sind, stattdessen befinden sich hier vor allem Endoplasmatische Retikula und Lysosomen. Im Zentrum des Onkozyten befindet sich der Zellkern (ZK).

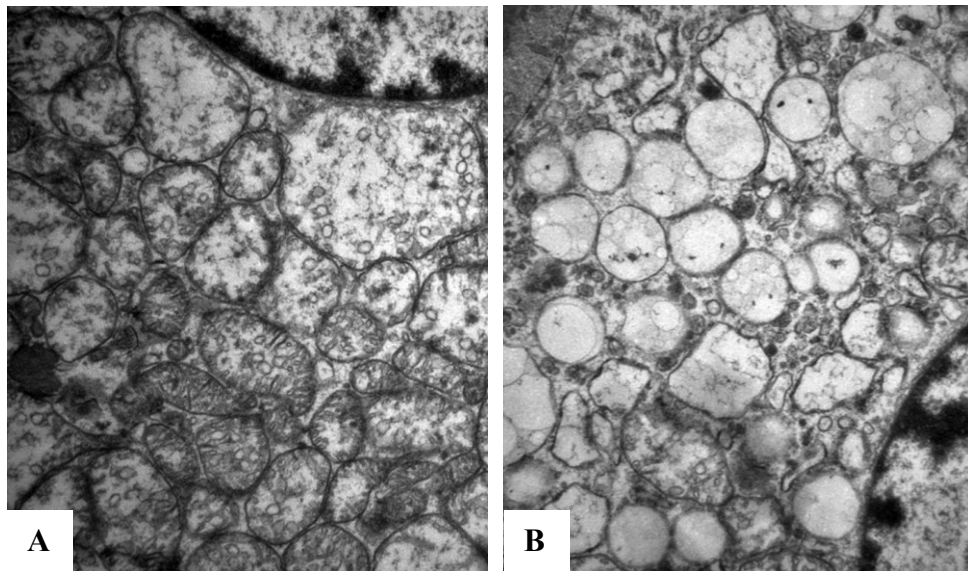


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Nahaufnahme der Mitochondrien und anderer Organellen

A: Nahaufnahme der basal liegenden Mitochondrien, B: Nahaufnahme der restlichen, apikal liegenden Organellen

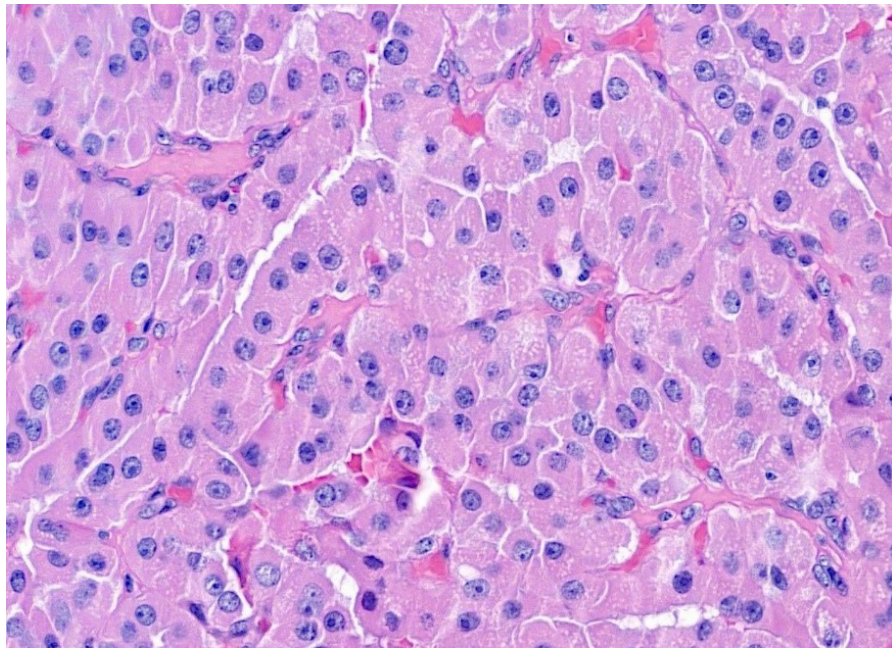


Abbildung 6: H&E-Färbung eines onkozytären Karzinoms

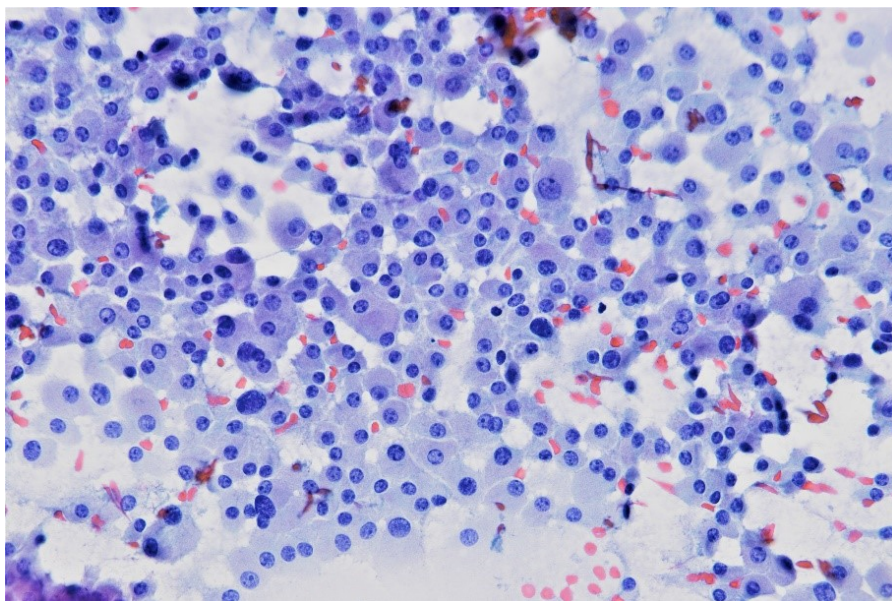


Abbildung 7: Zytologie mit Onkozyten

Zu unterscheiden sind die „mitochondrien-reichen“ Zellen, die auch vermehrt Mitochondrien im Zytoplasma aufweisen, jedoch weniger als Onkozyten, dabei aber keinen Verlust der Zell-Polarität haben und weniger dicht gedrängt im Zytoplasma liegen. Diese Differenzierung lässt sich besonders gut im Elektronenmikroskop bestätigen, jedoch auch histologisch mithilfe der immunhistochemischen Mitochondrienfärbungen unterscheiden (1,30).

Onkozytäre Adenome präsentieren sich häufig follikulär oder trabekulär ohne Invasionen, während Karzinome invasiv sind und sich auch solide oder pseudopapillär zeigen können.

In beiden Fällen sind die Tumore bekapselt (6,24,31). Die Kernmorphologie ist hilfreich, um sie von der onkozytären Variante des papillären Karzinoms zu unterscheiden (31).

Die Metastasierung der onkozytären Karzinome unterscheidet sich kaum zum follikulären Karzinom. Es wird davon ausgegangen, dass onkozytäre Karzinome überwiegend hämatogen metastasieren, indem sich aus intravenösen Tumorzapfen lokale Weichteilmetastasen bilden, die keinerlei lymphatisches Gewebe enthalten. Lymphknoten-Metastasen sind selten und beispielsweise bei gleichzeitig auftretenden anaplastischen Herden zu finden (32,33).

1.4.2 Biochemische Veränderungen

In gesunden Zellen wird Energie vorrangig durch oxidative Phosphorylierung (im weiteren als OXPHOS bezeichnet) in Mitochondrien gewonnen. Das heißt Glukose wird im Krebs-Zyklus aerob, also unter Sauerstoffzufuhr, zu Kohlenstoffdioxid und Wasser verbrannt. Kommt es in der Zelle zu hypoxischen Zuständen, wie beispielsweise durch eine Ischämie, kann alternativ die Glykolyse aktiviert werden. Die Glykolyse ist die anaerobe Verarbeitung von Glukose zu Pyruvat und weiters zu Laktat im Zytoplasma (34).

Otto Warburg beschrieb einen Effekt (35), der besonders in Tumorzellen auftritt, der besagt, dass Krebszellen selbst unter Normoxie, also bei ausreichend vorhandenem Sauerstoff, trotzdem die OXPHOS-Kette ausschalten und stattdessen die Glykolyse zur Energiegewinnung nutzen (36,37). Dieses Phänomen lässt sich darauf zurückführen, dass die OXPHOS-Kette aufgrund ihrer hohen Komplexität sehr fehleranfällig ist und bei geringen Schädigungen, unter anderem durch Mutationen, schnell ausfällt (38). Die Glykolyse ist im Vergleich deutlich einfacher und damit ausfallsicherer (37).

Die anfälligste Stelle der OXPHOS-Kette ist die Kopplung der Oxidation mit den Protonenpumpen auf der mitochondrialen Membran, wodurch ein Membranpotential entsteht, das später für die eigentliche Adenosintri-phosphat-Produktion genutzt wird. Diese Kopplung erfolgt hauptsächlich über den Komplex I der Kette (38,39). Ist dieser Komplex I defekt, funktioniert lediglich die Kopplung nicht mehr, das heißt es wird im Folgenden auch keine Energie gewonnen, der Krebszyklus per se funktioniert jedoch noch.

Die Onkozyten weisen nun einen Vorgang auf, den man als „Anti-Warburg-Effekt“ bezeichnen könnte. Sie sind nicht in der Lage auf die Glykolyse umzuschalten, da in Onkozyten die für die Glykolyse benötigte Laktat-Dehydrogenase fehlt. Das bedeutet sie

sind nach wie vor auf Mitochondrien angewiesen und um den energetischen Mangel auszugleichen kommt es zu einer massiven Anreicherung an Mitochondrien, die große Mengen an Glukose verbrennen (40).

Die häufigsten mitochondrialen DNA (im Folgenden als mtDNA bezeichnet) Mutationen in Onkozyten sind die der MT-ND1 Gene, die für das ND1-Protein kodieren. Dieses Protein ist eine Untereinheit des Komplex I, dem größten der fünf Komplexe, die sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet und an der OXPHOS-Kette beteiligt ist. Es ist dafür zuständig den Komplex I an der Mitochondrienmembran zu befestigen. Ist es mutiert findet der Anbau an die Membran nicht statt. Durch den Verlust des Komplex I wird die OXPHOS-Kette gestört, was zu einer gesteigerten Glykolyse führen würde, im Fall der Onkozyten kommt es jedoch kompensatorisch zu einer Anreicherung defekter Mitochondrien (2,30,40,41).

1.4.3 Therapie und Prognose

Nicht invasive und minimal invasive onkozytäre Tumore zeigen sich nahezu benigne und nicht wiederkehrend (42,43). Handelt es sich jedoch um ein onkozytäres Karzinom hängt die weitere Prognose von dem Ausmaß der Gefäßinvasion ab, wobei vermehrte vaskuläre Einbrüche mit einem aggressiveren Tumor assoziiert sind, (42,44) ähnlich dem follikulären Karzinom.

Da onkozytäre Tumore nicht auf Radiojodtherapien ansprechen, sind die Therapiemöglichkeiten sehr eingeschränkt (42). Deshalb wird meistens eine Thyreodektomie mit lokaler Therapie von entstandenen Metastasen durchgeführt (45,46). Da die Radiojodtherapie nicht anschlägt, präsentieren sich Patienten*innen oft einige Jahre nach erfolgter Therapie mit distalen Metastasen, da das onkozytäre Karzinom bereits hämatogen gestreut hat und durch Radiojodtherapie nicht am weiteren Wachstum gehindert wurde. Dies könnte einer der Gründe sein, warum onkozytäre Tumore als äußerst aggressiv gelten (32,45,47) und mit einer höheren Mortalität verbunden werden als nicht-onkozytäre Tumore (26).

1.5 Immunhistochemie

1.5.1 Prinzip

Die Immunhistochemie ist ein diagnostisches Verfahren zur Visualisierung bestimmter Gewebsanteile, auch Epitope genannt, mittels Epitop-spezifischen Antikörpern. Epitope können beispielsweise Proteine oder Oligosaccharidketten sein (48). Die mono- oder polyklonalen Antikörper werden mit einem Detektionssystem verbunden, das anschließend den gesuchten Gewebeabschnitt mikroskopisch sichtbar macht (48,49).

Zur Sichtbarmachung werden meist Enzyme verwendet, die an die Antikörper gekoppelt werden. Peroxidase und alkalische Phosphatase werden zu diesem Zweck besonders häufig genutzt. Die Enzyme reagieren mit einer Lösung, die ihre entsprechenden chromogenen, also farbgebenden, Substrate enthält, und produziert so eine Farbe, die dann die gewünschten Gewebeanteile hervorhebt (50,51).

Vorbereitung des Gewebes

Bei der Vorbereitung des Gewebes für eine immunhistochemische Färbung, ist es wichtig die Zeit von der Entnahme des Gewebes, zum Beispiel im Rahmen einer Operation, bis zur Fixation kurz zu halten, da es nach der Entnahme aus dem Gewebeverband sofort zur Autolyse der Zellen kommt. Das Ziel ist es mittels Fixation die Degeneration zu stoppen und die originale Gewebestruktur mit all ihren Epitopen zu erhalten (51,52). Zur Fixation wird entweder eine Formalin -oder Alkohollösung verwendet oder eine Mischung aus beidem.

Als nächstes werden die Gewebeproben eingebettet, indem sie durch eine Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration entwässert werden und anschließend wird mit Xylol der Alkohol wieder entzogen und das vorbereitete Gewebe mit Paraffin aufgefüllt. Sobald das Paraffin abgekühlt ist, entsteht ein harter Block, der nun einfach gelagert und geschnitten werden kann (53).

Für immunhistochemische Färbungen werden Schnitte mit einer Dicke von 3-5µm angefertigt (51). Die fertigen Schnitte werden in ein Wasserbad gelegt und anschließend auf ein Deckglas aufgezogen. Danach muss das Paraffin wieder aus dem Schnitt entfernt werden, damit die Antikörper das Gewebe gut durchdringen und an ihre entsprechenden Epitope binden können. Dies wird erreicht, indem man den zuvor beschriebenen Prozess wieder rückwärts durchläuft, das heißt erst in Xylol, zur Entfernung des Paraffins, einbringen und dann mit der absteigenden Alkoholreihe wieder hydrieren (49,53).

Allein in diesen präanalytischen Schritten können viele Abweichungen zwischen unterschiedlichen Einrichtungen entstehen, wie beispielsweise die Dauer der Entwässerung und Konzentration des Alkohols, die die spätere Qualität der Färbung und die Verallgemeinerbarkeit beeinflussen (54,55). Daher ist eine Standardisierung dieser Schritte besonders wichtig.

Antigendemaskierung

Durch die Vorbereitung des Gewebes kann es zu Schädigung des Antigens kommen und damit zu einer Störung der Immunreaktivität. Mit der Antigendemaskierung kann die Reaktivität wiederhergestellt werden. Hierfür gibt es verschiedene Methoden.

Eine Methode ist das sogenannte „heat induced epitope retrieval“ (kurz HIER) (56). Dabei wird meist ein alkalischer Puffer mit pH 9 oder seltener ein Citrat Puffer mit pH 6 auf über 100°C erwärmt und der Gewebeschnitt darin 10-20 Minuten inkubiert, wobei beachtet werden muss, dass je nach Antigen Anpassungen des pH-Werts und der Inkubationsdauer durchgeführt werden müssen. Die Hitzebehandlung kann in einem Autoklav, einem Mikrowellenofen oder einem Wasserbad durchgeführt werden (51,56).

Eine zweite Methode ist das sogenannte „proteolytic induced epitope retrieval“ (kurz PIER). Hier werden Protein verdauende Enzyme eingesetzt, um die Vernetzung von Proteinen mit den Antigenen aufzulösen. Diese Methode wird jedoch nur selten bei bestimmten Antigenen angewandt (49,57).

Färbung

Nach der Wahl des passenden Antikörpers kann mit der eigentlichen Färbung begonnen werden, meistens handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper (49), da bei polyklonalen Antikörpern das Risiko für Kreuzreaktionen mit mehreren Proteinen erhöht ist (51).

Qualitative Färbungen geben lediglich Information darüber, ob das Präparat positiv oder negativ auf den Antikörper reagiert. Semiquantitative Färbungen ermöglichen anhand der Intensität der Färbung eine Aussage über die Menge der positiven Zellen zu treffen, durch Zuordnung eines Scores für jede Intensitätsstufe (51). Für beide Arten der Färbung sollten immer auf demselben Deckglas Positiv-Kontrollen aufgezogen werden von Gewebeproben, dessen immunhistochemische Reaktion bereits bekannt ist (49,58).

Bei der direkten Färbemethode bindet ein mit einem Enzym markierter Antikörper direkt an das Ziel-Antigen im Gewebe. Dadurch läuft die Färbung zwar schneller ab, aber die Intensität der Färbung ist gering (58).

Die indirekte Färbemethode hingegen nutzt einen primären Antikörper, der direkt an das Antigen bindet und einen sekundären markierten Antikörper, der an den primären Antikörper bindet. Da mehrere sekundäre an den primären Antikörper binden können kommt es zu einer Signalverstärkung. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass es zu verstärkter Hintergrundfärbung kommt, weil es auch vermehrt zu unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers kommt (58).

1.5.2 Verwendete immunhistochemische Marker

Prohibitin

In den Mitochondrien findet sich ein Prohibitin-Komplex, bestehend aus Prohibitin 1 und 2, der an der inneren Mitochondrienmembran befestigt ist. Dem Prohibitin-Komplex werden verschiedene Funktionen zugeordnet, darunter die Aufrechterhaltung der mtDNA, der Aufbau des OXPHOS-Systems und die Proteinsynthese (59).

Bei mitochondrialem Stress reagieren die Mitochondrien mit einer Vermehrung von Prohibitin als Reaktion auf beispielsweise Veränderungen im Stoffwechsel oder erhöhte Proliferation im Rahmen von einer Tumorgenese (60). Es ist ein spezieübergreifendes hochkonserviertes Protein, weswegen es sehr stabil und zuverlässig auf der mitochondrialen Membran exprimiert ist (61). Dies macht Prohibitin zum idealen pan-mitochondrialen Marker, da es nicht nur die vorhandenen Mitochondrien markiert, sondern auch quantitativ eine Vermehrung der Mitochondrien detektiert. Darüber hinaus ist dieser Marker mittels Korrelation zwischen der Intensität der immunhistochemischen Färbung und der tatsächlichen, elektronenmikroskopisch ermittelten Menge der Mitochondrien in der Studie von PD Dr. Tsybrovskyy 2009 validiert worden (1).

NDUFS4

NDUFS4 ist eine instabile strukturelle Untereinheit des Komplex I der OXPHOS-Kette. Kommt es zu einem Verlust oder Störungen des Komplex I, fällt auch NDUFS4 entsprechend aus, was es zu einem idealen, polyklonalen Marker für Mitochondrien mit intakter OXPHOS-Funktion macht (41). In der immunhistochemischen Färbung wird also

ein Verlust von NDUF54 die defekten Mitochondrien „markieren“ und ermöglicht somit eine qualitative Bewertung der Mitochondrienfunktion.

2. Fragestellung und Ziele

Onkozytäre Veränderungen in der Zelle entstehen durch Ansammlung von Mitochondrien mit defekter OXPHOS-Kette. Das hat Auswirkungen auf die Zellbiologie und ist auch klinisch relevant, da onkozytäre Schilddrüsenkarzinome schlechter auf die übliche Radiojodtherapie und TSH-Suppression reagieren. Folglich bedürfen onkozytäre Tumore angepasster Behandlungsstrategien, angefangen mit einer möglichst frühen, kompletten chirurgischen Resektion.

Des Weiteren wurden von Priv. Doz. Dr. med. univ. Tsybrovskyy 2009 sogenannte „mitochondrien-reiche-nicht-onkozytäre“ Tumore der Schilddrüse (im Folgenden MRNO) beschrieben (1), die ebenfalls eine Anreicherung an Mitochondrien aufweisen, jedoch in geringerem Ausmaß als in Onkozyten und mit erhaltener Zell-Polarität. Unter diesen „MRNO“-Tumoren kommen vorrangig Karzinome vor, die biologisch aggressiver scheinen, beziehungsweise prognostisch ungünstiger als die konventionellen Varianten. Aus diesem Grund ist es wichtig, die mitochondrialen Veränderungen in Schilddrüsentumoren korrekt zu erkennen und zu unterscheiden.

Auf routinemäßigen H&E-Schnitten ist die Abschätzung der Menge und Verteilung der Mitochondrien und deren funktionelle Kapazität oft schwierig und somit unzuverlässig. Daher sind zur Differenzierung immunhistochemische Marker empfohlen, insbesondere das Prohibitin/NDUFS4 Duo, wie es zuletzt für die papillären Schilddrüsenkarzinome beschrieben wurde (2).

Diese Markerkombination ermöglicht die separate Detektion von Mitochondrien, sowohl mit als auch ohne OXPHOS-Defekt und damit die Unterscheidung onkozytärer von mitochondrien-reichen Tumoren. Allerdings ist diese Markerkombination auf follikulären Schilddrüsentumoren noch nicht systematisch getestet worden.

Im Rahmen der Diplomarbeit soll nun der praktische Nutzwert dieser Markerkombination bestimmt werden und mit ihrer Hilfe das Konzept der „MRNO“-Tumore validiert werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Recherche

In der Einleitung der Diplomarbeit wurden die Grundlagen des Schilddrüsenaufbaus und die Funktion kurz zusammengefasst. Ebenso gibt sie einen Überblick über die Eigenschaften des follikulären Schilddrüsenkarzinoms, insbesondere über die histologischen und therapeutischen Besonderheiten. Weiters erfolgte eine genaue Beschreibung der onkozytären Tumore: ihrer histologischen Merkmale, der biochemischen Veränderungen und ihrer Therapie. Die Prinzipien der Immunhistochemie und die Eigenschaften der verwendeten immunhistochemischen Marker sind abschließend erläutert worden.

Diese Informationen wurden im Sinne einer systematischen Literaturrecherche zusammengetragen. Dafür wurden sowohl Kapitel aus Lehrbüchern herangezogen als auch aktuelle Studien und Paper aus verschiedenen wissenschaftlichen Datenbanken, insbesondere Medline, verwendet.

3.2 Datenerhebung

Für die Diplomarbeit wurde dasselbe Material herangezogen, wie in der 2009 publizierten Studie von PD Dr. Oleksiy Tsybrovskyy (1). Dieses umfasst alle Fälle der follikulären (konventionellen und onkozytären) Schilddrüsenkarzinome der Jahrgänge 1986 bis 2006 aus dem Archiv des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Pathologie Graz, sowie zufällig gewählte follikuläre (konventionelle und onkozytäre) Schilddrüsenadenome im etwa gleichen Ausmaß. Hinsichtlich der follikulären Karzinome handelt es sich somit um eine populationsbasierte Studie bezogen auf die Steiermark, mit Ausnahme der Obersteiermark, im genannten Zeitraum.

Die Datenerhebung erfolgte Patienten*innenbezogen, wobei die Patienten*innen Daten durch Codierung pseudonymisiert wurden, und umfasste sämtliche relevante klinisch-pathologische Variablen zum Moment der Erstbehandlung, darunter Alter, Geschlecht, TNM-Stadium, Ausmaß der Invasion und onkozytäre Veränderungen im H&E-Schnitt. Die Fälle wurden zu Beginn der Arbeit bei Bedarf nach aktuellem Stand der WHO-Tumorklassifikation und der TNM-Klassifikation reklassifiziert und re-staged. Weiters sind die studienbezogenen Parameter enthalten, konkret die Unterteilung der mitochondrialen

Veränderungen in den Tumoren auf Basis der Färbungen mittels des Prohibitin/NDUFS4-Duos.

Zusätzlich gab es zu jeder Tumorprobe auch entsprechende Kontrollen aus dem zugehörigen Normalgewebe oder aus nicht tumorösen Knoten der Patienten*innen.

Insgesamt wurden 946 Proben von 459 Patienten*innen eingangs nach den oben genannten Kriterien eingeschlossen. Die darin enthaltenen 400 Kontrollen wurden für die endgültige Auswertung ausgeschlossen.

3.3 Tissue Microarrays, H&E-Färbungen und Immunhistochemie

Zwecks Kosten- und Ressourceneffizienz wurden für jeden Fall repräsentative Gewebeproben in Paraffinblöcken ausgesucht, aus denen Tissue Microarrays (im Folgenden als TMA bezeichnet) konstruiert wurden. Mit einer 0,6mm hohlen Probeentnahmenadel wurden mit einem manuellen Tissue Arrayer MTA 1 (Firma Beecher Instruments Inc., USA) Gewebstanzen entnommen und in leere Paraffinblöcke eingesetzt. Von jedem*er Patienten*in wurden drei bis vier Stanzen aus dem Tumor entnommen, sowie zwei bis drei Stanzen von nicht neoplastischem Gewebe. Aus Tumoren mit uneinheitlicher Architektur, beziehungsweise gemischten soliden und follikulären Arealen, wurden bis zu zehn Gewebeproben extrahiert, um die Struktur des Tumors besser zu repräsentieren. In Tumoren mit onkozytären Arealen wurden diese extra gestanzt und aufgetragen.

Insgesamt ergaben sich neun TMA-Blöcke mit 2712 Stanzen. Als zusätzliche Kontrolle enthielten alle TMA-Blöcke Stanzen aus einem medullären und zwei papillären Karzinomen.

Jeder zehnte Schnitt wurde mit H&E gefärbt, um sicherzustellen, dass die Gewebestanzen bis in die Tiefe vollständig nachweisbar waren. Die Gewebeproben wurden anhand der H&E-Schnitte drei Gruppen zugeordnet: den nicht-onkozytären Läsionen, den fraglich onkozytären Läsionen und den onkozytären Läsionen.

Die immunhistochemischen Färbungen, die für diese Arbeit benötigt wurden, erfolgten an unterschiedlichen Geräten und somit auch mit verschiedenen Färbeprotokollen.

Prohibitin Färbungen erfolgten am Gerät Benchmark Ultra (Firma Ventana/Roche, Schweiz). Um die Zielstruktur zu markieren, verwendete man einen monoklonalen Antikörper MA5-12858 der Firma Invitrogen, mit einer Verdünnung von 1:100. Die

Vorbehandlung wurde mit der Cell Conditioning solution 1 (kurz CC1), einem Tris-EDTA basierten Puffer mit einem pH von 7,8 für 32 Minuten bei 97°C durchgeführt. Anschließend wurde für weitere 32 Minuten mit dem Antikörper inkubiert und das Ergebnis mit dem OptiView DAB ICH Detection Kit visualisiert.

NDUFS4 hingegen wurde am DAKO OMNIS Gerät (Firma Agilent, USA) gefärbt. Die Vorbehandlung beinhaltete eine 30-minütige Session in einem basischen Puffer bei 97°C. Darauf folgte die Inkubation mit dem Antikörper.

Der Antikörper HPA 003884 von der Firma Sigma Aldrich wurde 1:500 verdünnt und 20 Minuten lang inkubiert. Zur Signalverstärkung wurde der sekundäre Antikörper, einschließlich eines Mouse Linkers, zur Verstärkung des Signals für zehn Minuten hinzugefügt. Das Ergebnis wurde mittels OMNIS Flex DAB Kit visualisiert.

Die gefärbten Stenzen wurden mit einem PANNORAMIC 1000 Slide Scanner der Firma 3DHISTECH digitalisiert. Die so entstandenen „whole slide“ Bilder wurden mithilfe der Software QuPath (62) in einzelne Bilder für die jeweiligen Stenzen zerschnitten und letztlich in eine Microsoft Access Datenbank für die Auswertung eingespielt.

Die Prohibitin Färbung wurde zweistufig ausgewertet: „Akkumulation“ und „fehlende Akkumulation“ der Mitochondrien. Zusätzlich wurde das zytoplasmatische Färbemuster der Prohibitin-Färbung notiert, und zwar in Hinblick auf die Ausbildung von mitochondrialen Clustern (0 = keine Cluster, 1 = kleine Cluster, 2 = mittelgroße Cluster, 3 = große Cluster) (siehe Abbildung 8). Die Ergebnisse der Vorstudie zeigten nämlich, dass derartige Clusterbildung, im Gegensatz zu bloßer Vermehrung der Mitochondrien, ein ganz charakteristisches und verlässliches Merkmal der onkozytären Transformation darstellt (1).

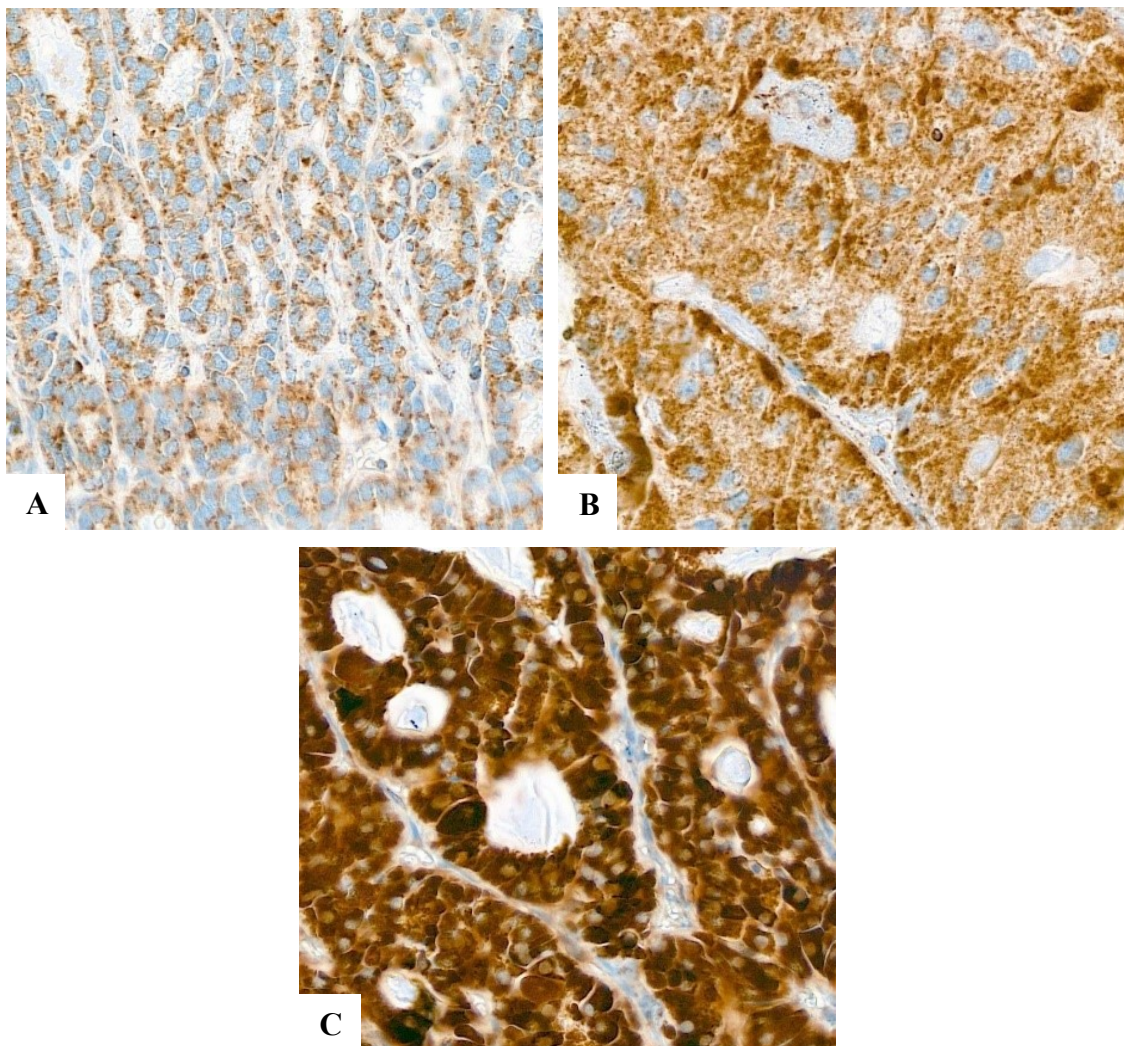


Abbildung 8: Prohibitin Färbungen unterschiedlicher Clustergrößen

A: keine Cluster, B: kleine bis mittelgroße Cluster, C: große Cluster

Bei NDUFS4 unterschied man zwischen „kein Verlust“, „partieller Verlust“ und „kompletter Verlust“, wobei ein partieller Verlust als eine im Vergleich zu Prohibitin deutlich abgeschwächte, aber nicht negative Färbung definiert wurde.

Heterogene Fälle, das heißt Fälle, bei denen onkozytäre Veränderungen nur in einem Teil der Läsionen nachweisbar waren, wurden anhand des von der WHO vorgegebenen Cut-Offs von 75% Onkozyten (6) aufgeteilt, wobei alle Fälle, die unter dem Cut-Off lagen, als nicht onkozytär eingestuft und anhand des nicht onkozytären Anteils den entsprechenden Unterkategorien zugeordnet wurden, wie auch die übrigen nicht-onkozytären Tumore.

Die Qualität der Färbeergebnisse wurde stets anhand der internen und externen Positivkontrollen geprüft. Als externe Positivkontrolle diente das, für jeden Fall separat gestanzte, normale Schilddrüsengewebe (siehe Abbildung 9).

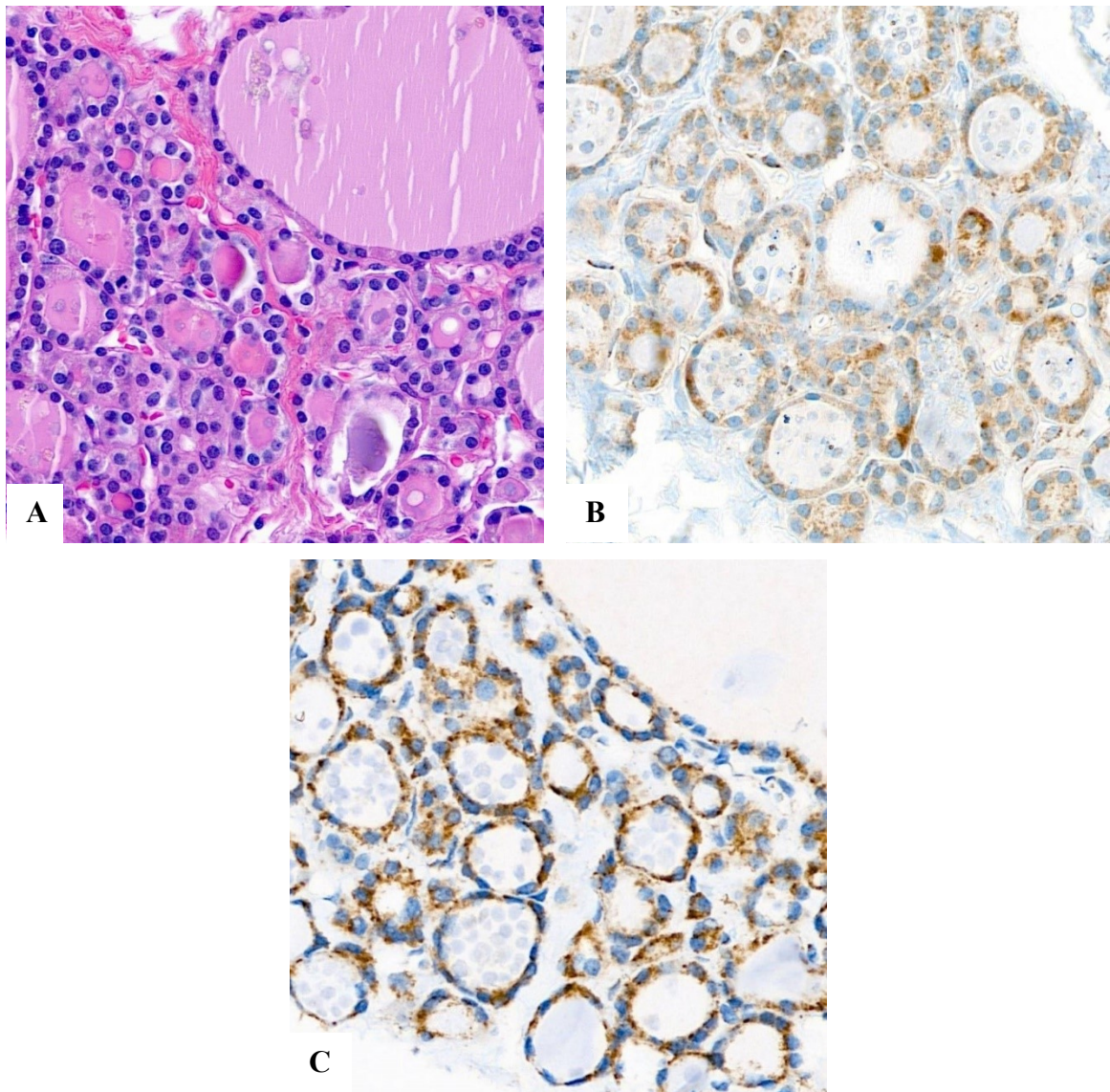


Abbildung 9: Histologische und immunhistochemische Darstellung einer normalen Schilddrüse

A: H&E Färbung, B: Prohibitin Färbung, C: NDUF54 Färbung

Als interne Positivkontrolle dienten die intratumoralen Gefäßendothelien, die bei einer gelungenen NDUFS4-Färbung positiv sein sollten. Dies war bei NDUFS4 besonders wichtig, um einen echten Ausfall der Positivität (siehe Abbildung 10), als Indikator für einen Defekt in der OXPHOS-Kette, von einem falsch-negativen Ergebnis zu unterscheiden (siehe Abbildung 11), dessen Gefäßendothelien ebenfalls einen Ausfall zeigten.

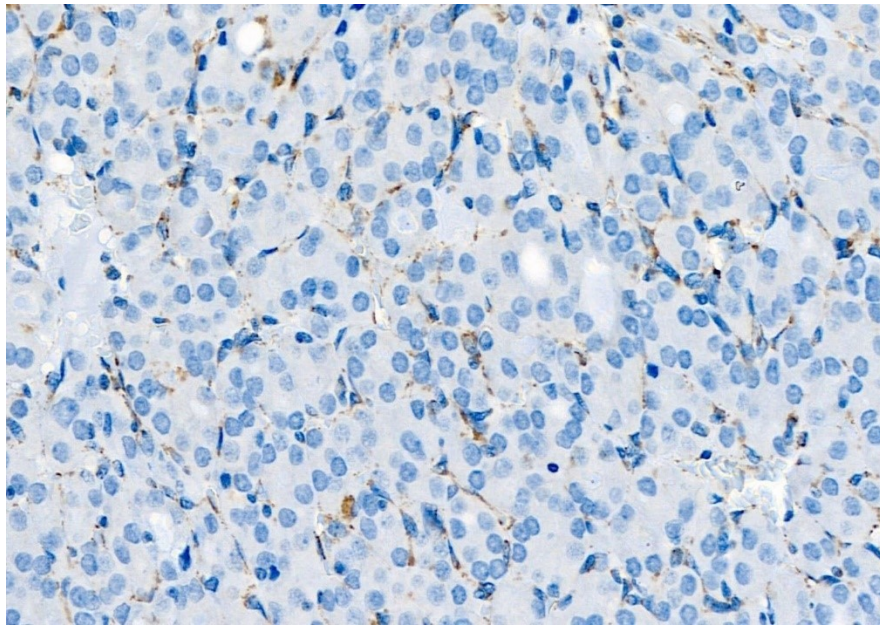


Abbildung 10: Interne Positivkontrolle in der NDUFS4-Färbung

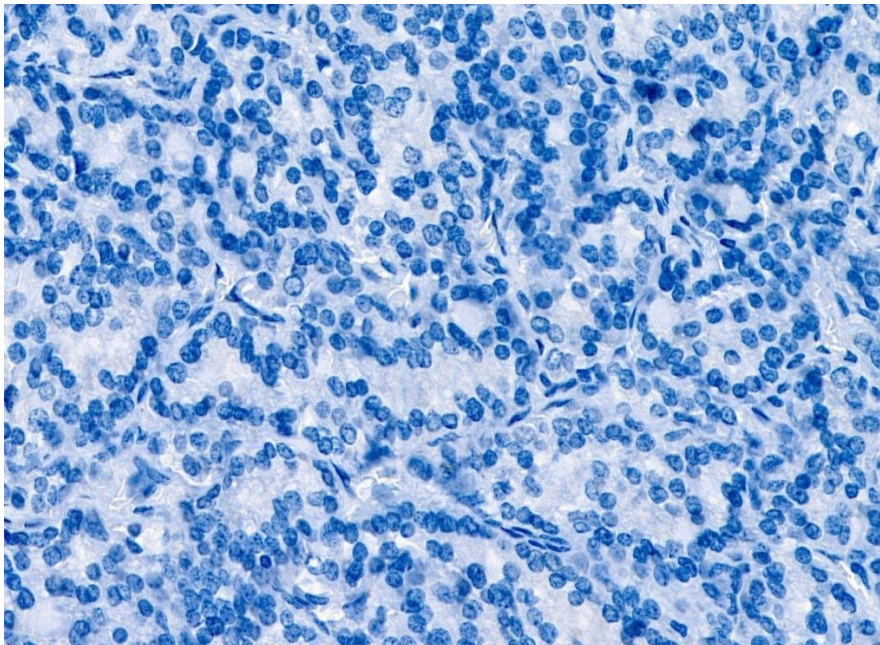


Abbildung 11: Falsch-negative NDUFS4-Färbung

3.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics 29 verwendet. Die Zusammenhänge zwischen den Studienvariablen wurden mittels Kreuztabellen und entsprechender Signifikanztests wie Chi-Quadrat-Test, Fisher's-Exakt-Test und McNemar-Test untersucht. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Zuverlässigkeit der mitochondrialen Marker

Nach erfolgter Sichtung aller Daten und Schnitte wurden unter Berücksichtigung folgender Kriterien bestimmte Färbungen wiederholt, beziehungsweise einzelne Fälle ausgeschlossen, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

Wiederholungskriterien

H&E-Färbungen wurden wiederholt, wenn bei vorliegender Heterogenität das Verhältnis der Anteile nicht eindeutig zu bestimmen war. Hierfür wurden Färbungen am ursprünglichen Block durchgeführt und erneut mikroskopiert. Weitere Wiederholungsgründe waren zu schwache immunhistochemische Färbungen, was de facto nur mit NDUFS4 der Fall war.

Nach diesen Kriterien konnten 17 Proben (3,4%) wiederholt und anschließend genau ausgewertet und zugeordnet werden.

Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden jene Stenzen, die im TMA verrutscht oder vollständig abgeschwommen waren und somit nicht ausgewertet werden konnten. Unbrauchbare Proben, die beispielsweise nur Blut oder nur Normalgewebe statt Tumor enthielten, wurden ebenfalls nicht ausgewertet. NDUFS4 Färbungen erwiesen sich häufig als zu schwach zum Auswerten und die entsprechenden Proben der Patienten*innen wurden, wenn sie nach wiederholter Färbung noch immer nicht auswertbar waren, ebenfalls ausgeschlossen.

In toto wurden 49 Proben (9,8%) nach Prüfung der Ausschlusskriterien ausgeschlossen, davon sieben (1,4%) wegen falsch-negativer Färbeergebnisse für NDUFS4.

Prohibitin lieferte sehr gute, stabile Ergebnisse, unabhängig vom Alter des verwendeten Materials, sodass keine Wiederholungen wegen diesem Marker notwendig waren. Unter den NDUFS4 Färbungen kam es in 17 Fällen (3,4%) aufgrund einer zu schwachen Färbung oder starken Differenzen zwischen H&E-Färbung und Immunhistochemie zu Zuordnungsschwierigkeiten in die jeweiligen Gruppen, weshalb sie wiederholt wurden. Schwache Färbungen ließen sich häufig auf das hohe Alter des Materials zurückführen.

Zwei Fälle fielen durch falsch-positive Färbeergebnisse für NDUFS4 auf (siehe Abbildung 12). Sie präsentierten sich zwar in der H&E (A)- und Prohibitin (B)-Färbung eindeutig onkozytär, zeigten aber in NDUFS4 (C) keinen Ausfall des Markers. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der Defekt nicht im Komplex I oder III lokalisiert war, wo es zu einem Verlust von NDUFS4 gekommen wäre, sondern zum Beispiel im Komplex IV oder V, mit denen NDUFS4 nicht verbunden ist und entsprechend keinen Ausfall zeigen würde. Das heißt der NDUFS4 Marker war in 0,4% nicht geeignet zur Detektion von Mitochondriendefekten.

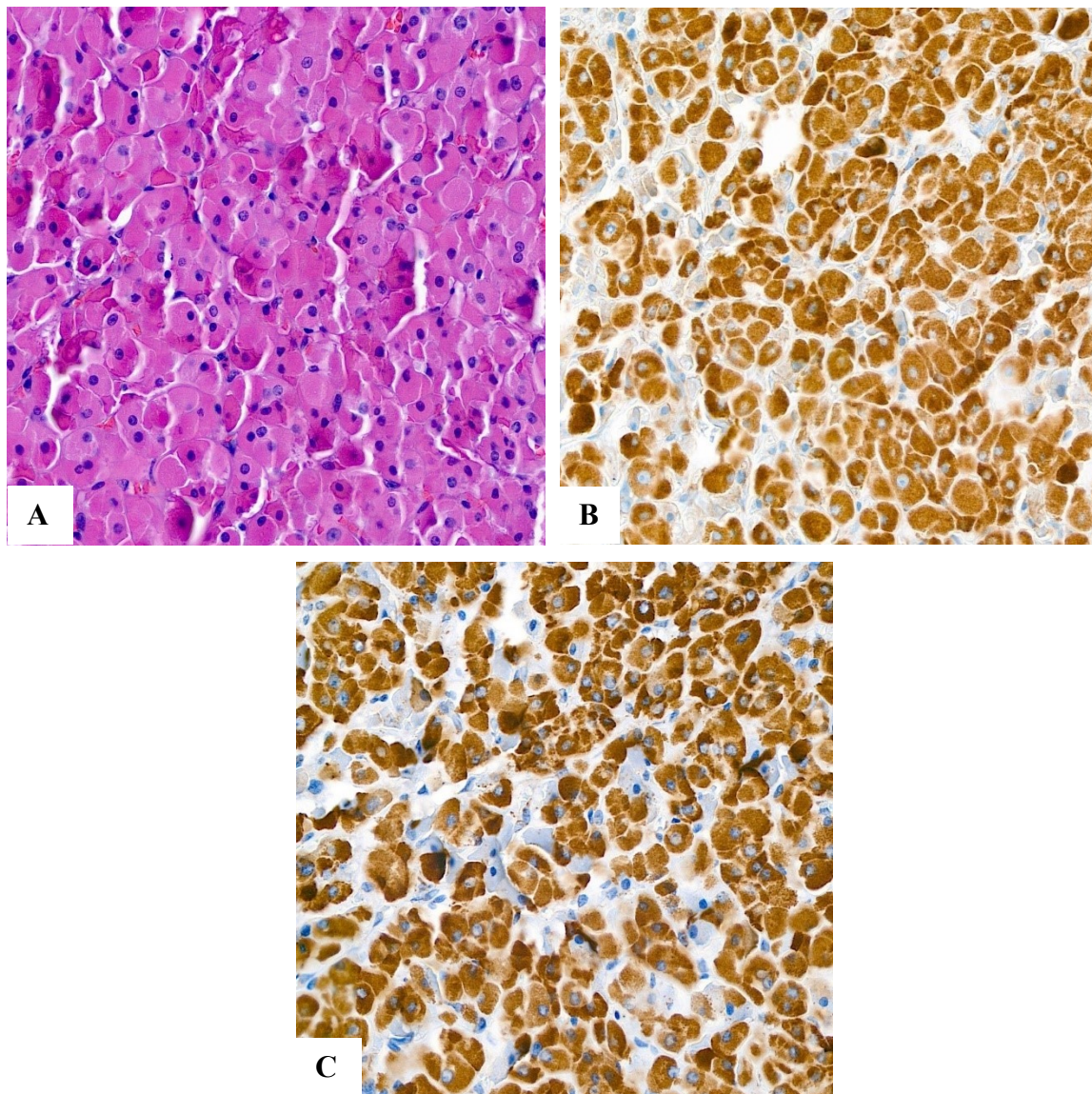


Abbildung 12: Histologische und immunhistochemische Darstellung einer falsch-positiven NDUFS4 Färbung.

A: H&E-Färbung, B: Prohibitin Färbung, C: NDUFS4 Färbung

4.2 Die Markerkombination ergibt fünf Tumorgruppen mit distinkten mitochondrialen Signaturen

Die Kombination aus beiden Markern ergab fünf unterschiedliche Kategorien (siehe Tabelle 1).

1. Gewebe, in denen sich weder eine Akkumulation von Mitochondrien noch ein Ausfall von NDUSFS4 zeigte, wurden als „non-specific-type“ (im Folgenden NST) kodiert (siehe Abbildung 13). Neben einem Teil der Tumore gehörte dazu stets das normale Schilddrüsenparenchym.
2. Mitochondrienakkumulation ohne Verlust von NDUF54 wurde als „MRNO“, also „mitochondrion-rich-non-oncocytic“, bezeichnet in Anlehnung an die Einteilung von PD Dr. Tsybrovskyy im Jahre 2009 (1) (siehe Abbildung 14).
3. Wenn es zu Mitochondrienanreicherung mit gleichzeitigem partiellem Verlust von NDUF54 kam, wurde das als „heteroplasmisch“ bezeichnet (siehe Abbildung 15). Das bedeutet, jede Tumorzelle in einem solchen Knoten hatte offensichtlich eine gemischte Population aus teils normalen, teils defekten Mitochondrien. Diese Populationen von Mitochondrien ließen sich nicht scharf voneinander abgrenzen, wie es bei einem heterogenen Tumor der Fall gewesen wäre.
4. Ein kompletter Verlust von NDUF54 bei fehlender Mitochondrienakkumulation wurde als „mitochondrial-defective-non-oncocytic“ (im Folgenden MDNO) bezeichnet (siehe Abbildung 16). Das heißt, die Anzahl der Mitochondrien war noch nicht ausreichend, um die Läsion onkozytär zu nennen, dennoch hatten diese Fälle bereits einen eindeutigen Ausfall an NDUF54, der sonst bei Onkozyten zu finden ist.
5. Die letzte Kategorie bildeten die onkozytären Läsionen, die sowohl eine starke Mitochondrien Anreicherung mit massiver Clusterbildung als auch einen kompletten NDUF54 Ausfall hatten (siehe Abbildung 17).

Anzumerken ist, dass die sechste theoretisch mögliche Markerkombination – keine Anreicherung der Mitochondrien und partieller Verlust des NDUF54 de facto nicht vorgekommen ist.

In drei Fällen wurde, nach wiederholter Färbung, entschieden diese als „MDNO“ zu klassifizieren, obwohl sie eine Mitochondrienanreicherung und einen kompletten Verlust von NDUFS4 hatten. Der ausschlaggebende Grund für die Zuordnung zur „MDNO“-Gruppe anstatt zur onkozytären Gruppe, wie es nach der zuvor genannten Einteilung sein müsste, war, dass diese Fälle kaum bis keine Clusterbildung aufwiesen, wie es für onkozytäre Tumore eigentlich unumgänglich gewesen wäre.

Tabelle 1: Kategorieinteilung nach der Immunhistochemie

		NDUFS4		
		Kein Verlust	Partieller Verlust	Kompletter Verlust
Prohibitin	Keine Akkumulation	NST codiert als 1	/	MDNO codiert als 4
	Anzahl	122	/	43
	Akkumulation	MRNO codiert als 2	Heteroplasmisch codiert als 3	Onkozytär codiert als 5
	Anzahl	49	20	263

Im Folgenden sollen die einzelnen Kategorien anhand von Abbildungen der folliculären Schilddrüsenkarzinome verdeutlicht werden.

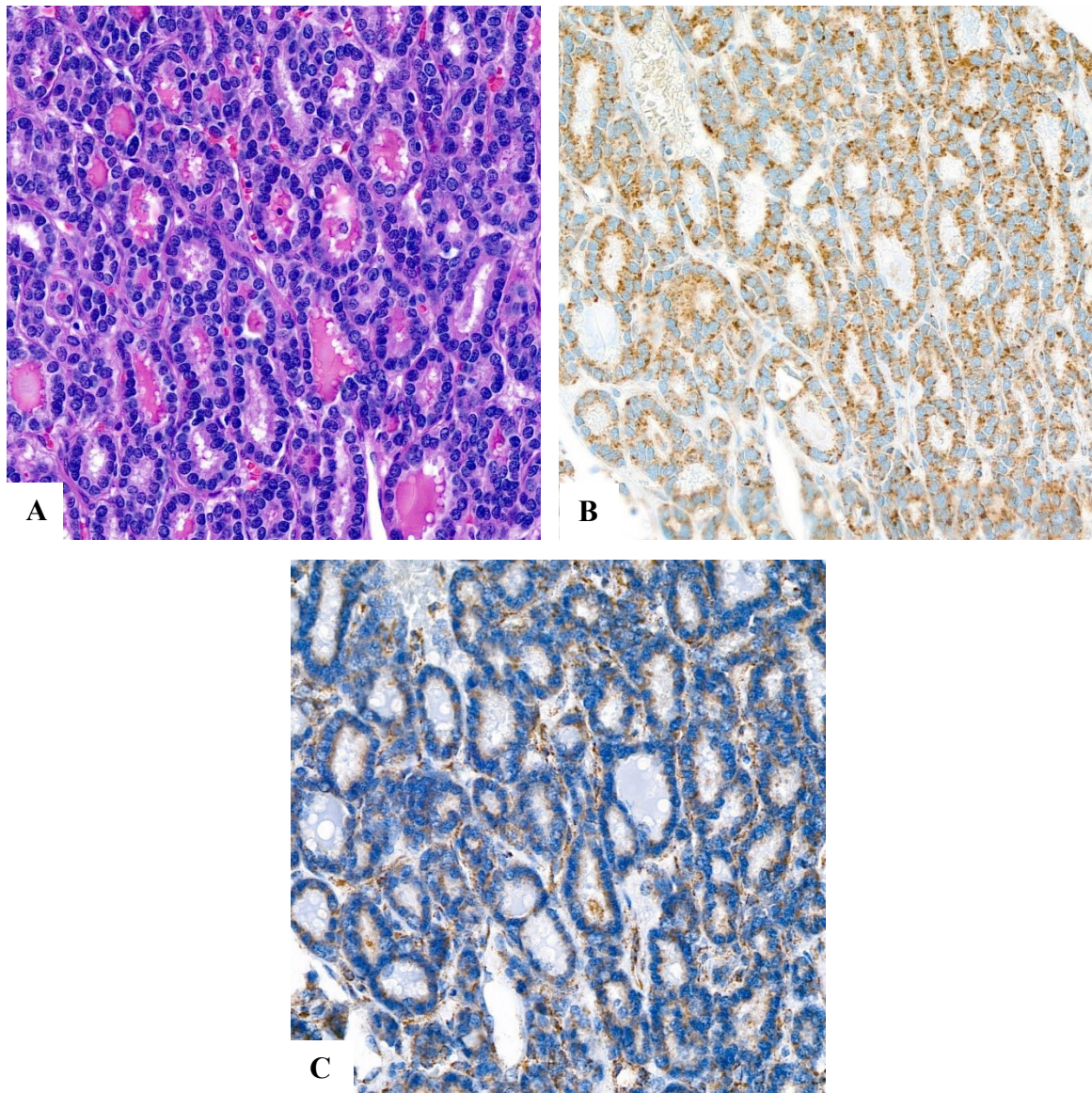


Abbildung 13: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines NST-Tumors.

A: H&E-Färbung, B: Prohibitin Färbung, C: NDUFS4 Färbung

Die NST-Tumore oder Gewebe zeigen in der H&E-Färbung (A) in der Regel keinerlei Hinweise auf onkozytäre Veränderungen. Immunhistochemisch war ein NST-Muster gekennzeichnet durch verhältnismäßig wenig Mitochondrien (B) und intakte Expression von NDUFS4 (C). In der NDUFS4 Färbung (C) wurden die Mitochondrien des Blutgefäßendothels, als auch die der Thyreozyten, ausreichend angefärbt. Bei stärkerer Vergrößerung erkannte man auch in den Tumorzellen einzelne Granula, die in ihrer Anzahl in etwa den mit Prohibitin angefärbten Mitochondrien entsprachen.

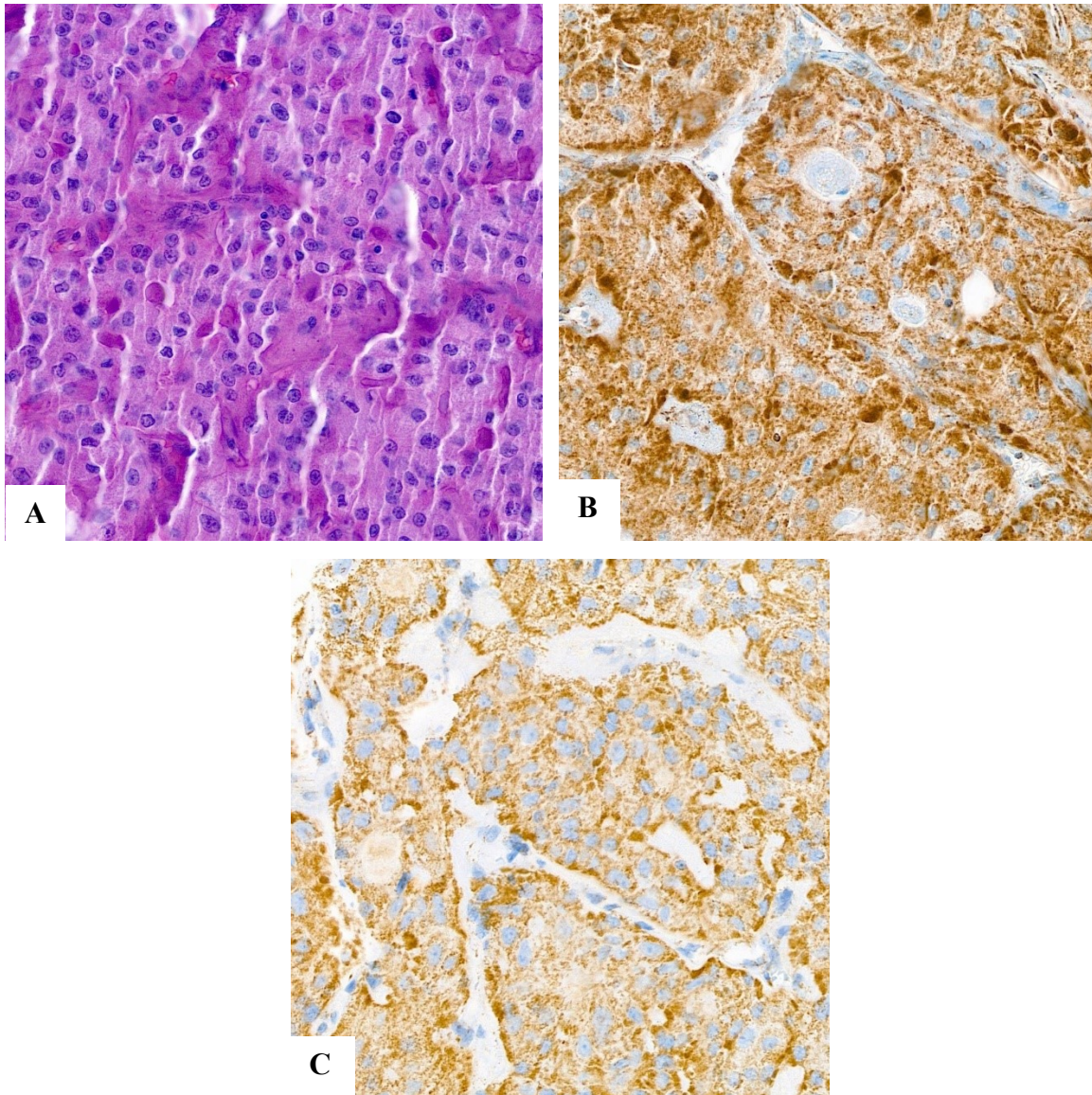


Abbildung 14: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines „MRNO“-Tumors.

A: H&E-Färbung, B: Prohibitin Färbung, C: NDUFS4 Färbung

„MRNO“-Tumore präsentierten sich im H&E-Schnitt (A) als nicht- oder allenfalls fraglich onkozytär. In der Prohibitin Färbung (B) sah man dann eine deutliche Anreicherung von Mitochondrien, im Vergleich zum NST, aber ohne signifikante Clusterbildung (Clustergröße 0 oder 1). Die NDUFS4 Färbung (C) zeigte anschaulich, dass definitiv kein Verlust der Mitochondrienfunktion vorlag. Die granuläre Verteilung der Mitochondrien war mit NDUFS4 sehr gut erkennbar.

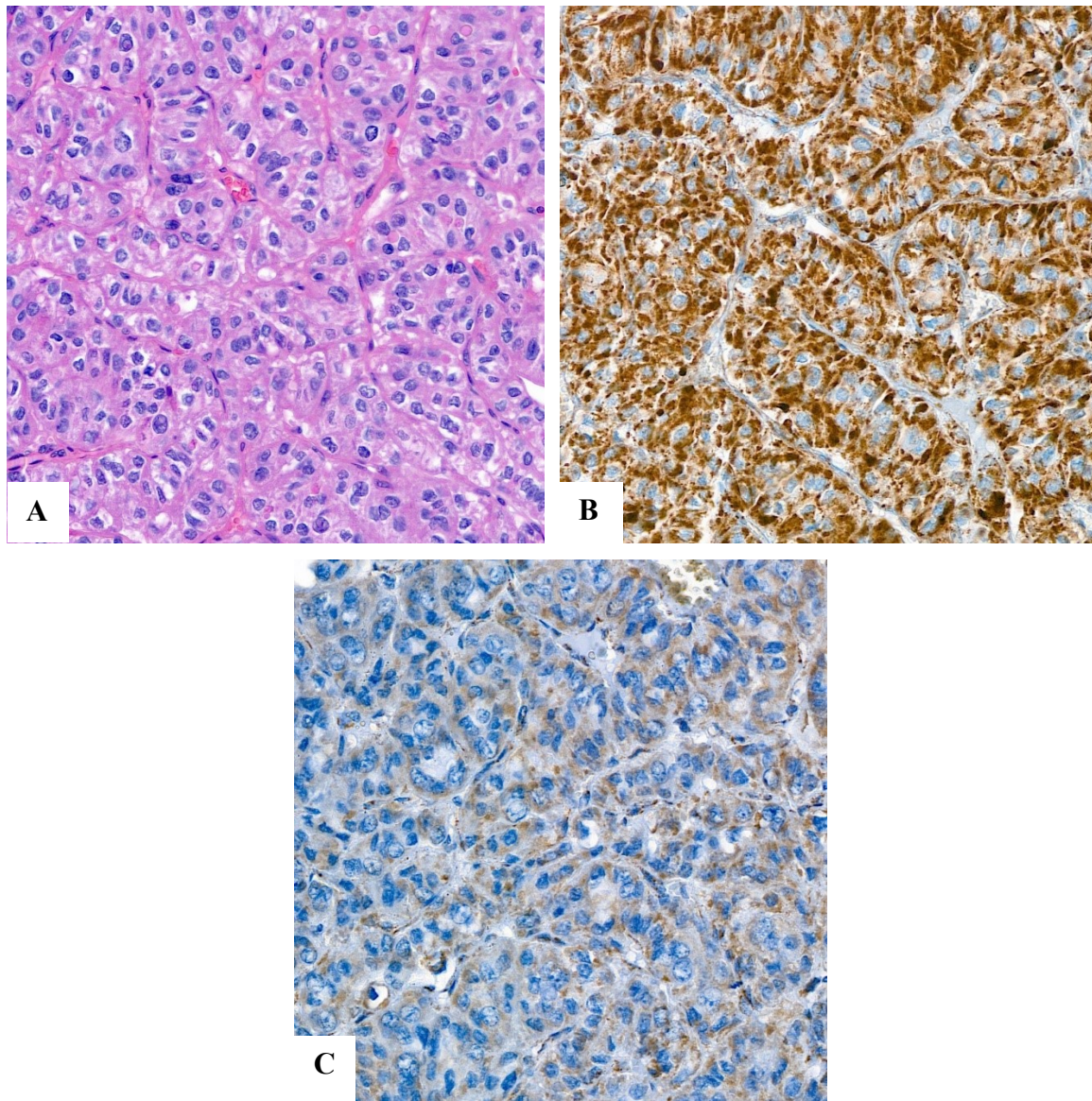


Abbildung 15: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines heteroplasmischen Tumors.

A: H&E-Färbung, B: Prohibitin Färbung, C: NDUFS4 Färbung

Heteroplasmische Tumore zeigen eine Anreicherung von Mitochondrien in der Prohibitin Färbung (B), welche aber, im Unterschied zu „MRNO“-Tumoren, nicht durch gleichzeitige Verstärkung der NDUFS4 Färbung begleitet wurde (C). Andererseits war die NDUFS4 Färbung zwar deutlich schwächer, als Prohibitin, jedoch nicht komplett negativ, wie es bei „MDNO“ oder onkozytären Läsionen der Fall war (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Offensichtlich entsprach dieses Färbeprofil dem Phänomen der mitochondrialen Heteroplasmie, bei dem jede Tumorzelle über gemischte Populationen von Mitochondrien mit intakter und defekter OXPHOS-Kette verfügt (63).

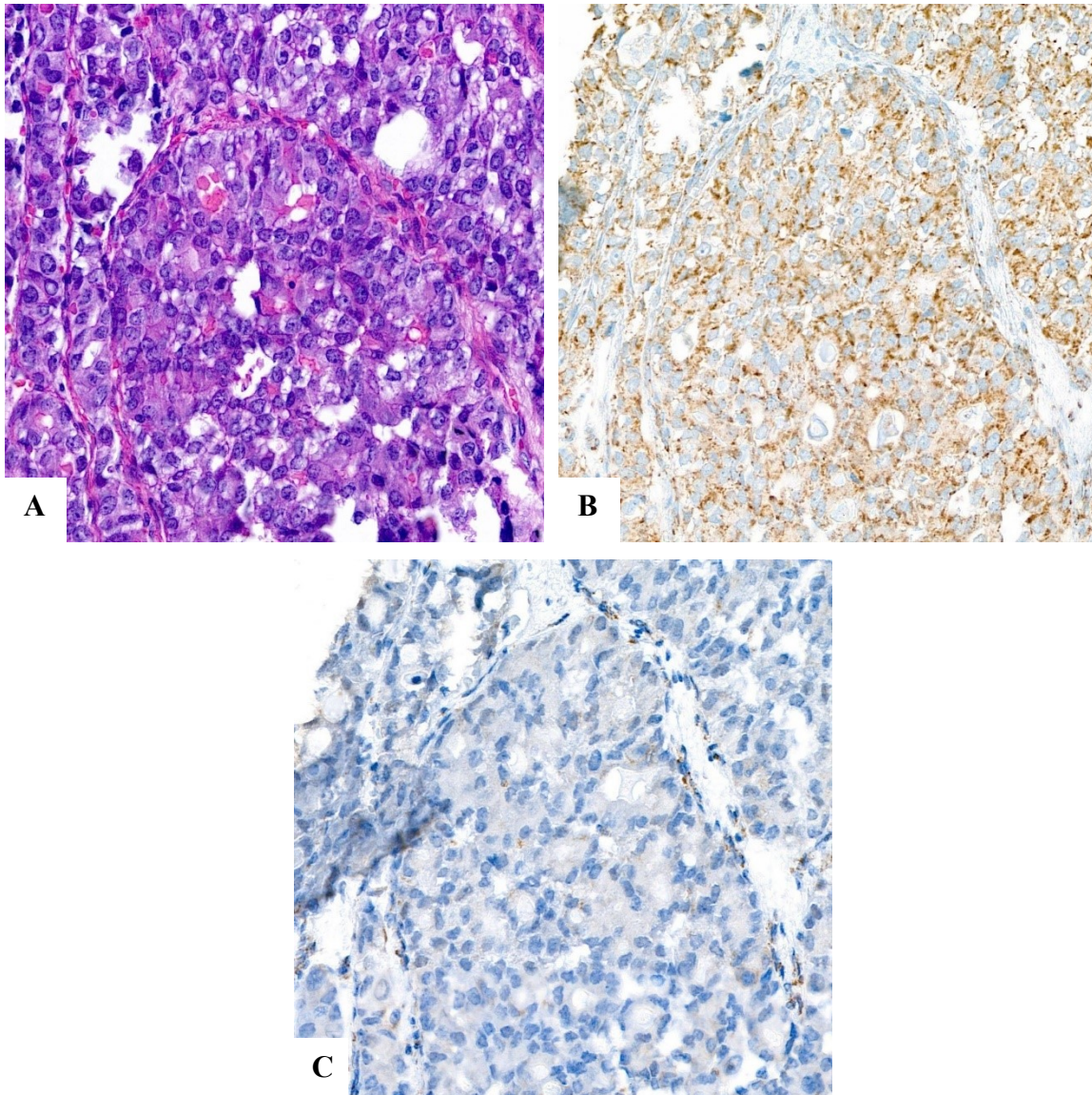


Abbildung 16: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines „MDNO“-Tumors.

A: H&E-Färbung, B: Prohibitin Färbung, C: NDUFS4 Färbung

In Fall von „MDNO“ gab es im H&E-Schnitt (A) und in der Prohibitin Färbung (B) keine Anhaltspunkte für onkozytäre Veränderungen beziehungsweise mitochondriale Akkumulation. Die Zellen zeigten keine Onkozyten-typischen Zeichen und nur eine geringe, quasi normale, Anzahl an Mitochondrien. Die Besonderheit bestand darin, dass die wenigen Mitochondrien alle einen vollständigen Defekt der OXPHOS-Kette aufwiesen. In der NDUFS4 Färbung (C) war der Verlust klar erkennbar, besonders im Vergleich zur internen Positivkontrolle, den Blutgefäßen, die eine sichtbare Granulierung durch die einzelnen Mitochondrien hatten. Somit musste eine neue, bisher in der Literatur nicht beschriebene Kategorie für Tumore mit defekten Mitochondrien, aber ohne onkozytäre Veränderungen festgelegt werden, nämlich „MDNO“ (mitochondrion-defective-non-oncocytic).

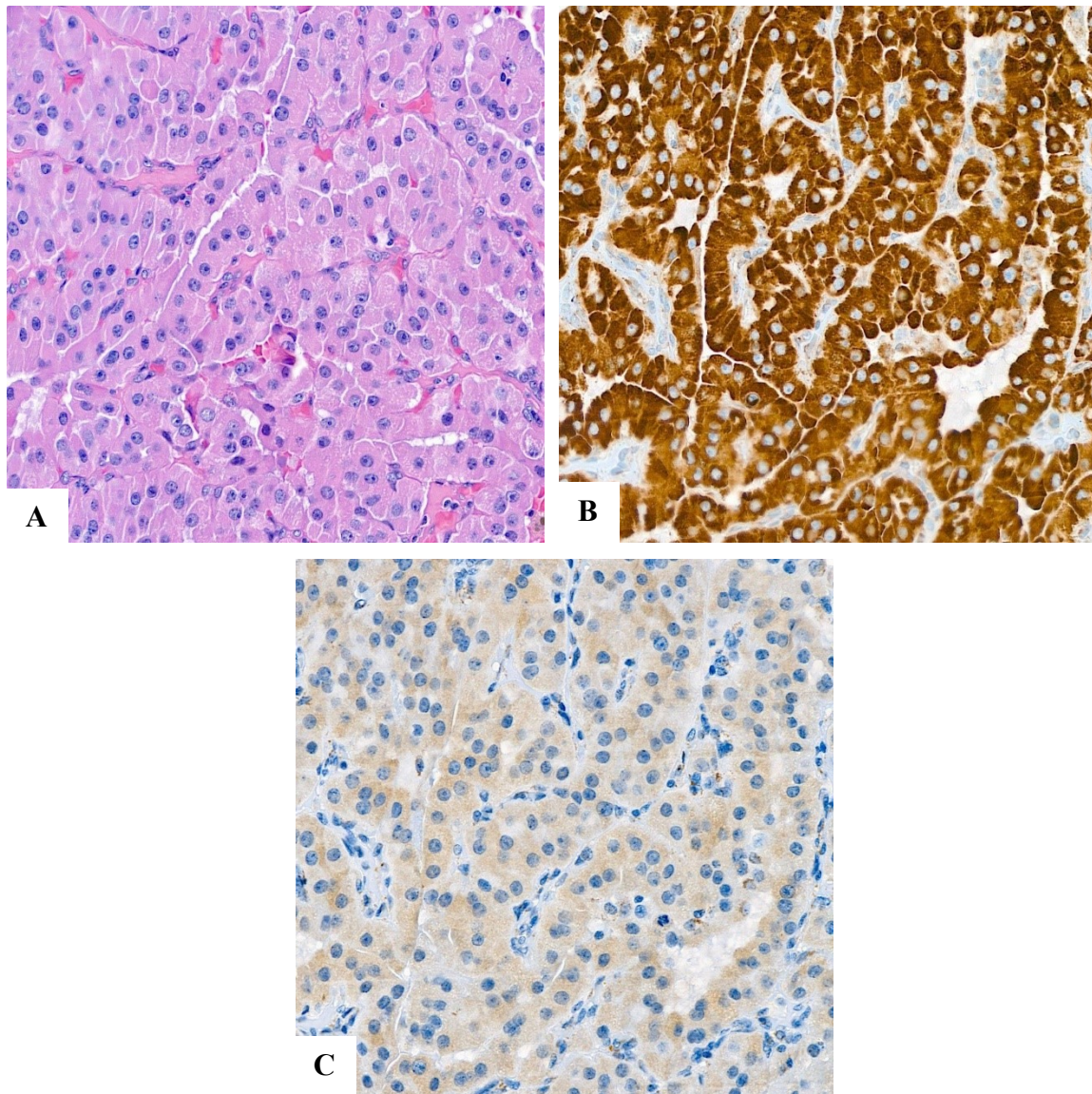


Abbildung 17: Histologische und immunhistochemische Darstellung eines onkozytären Tumors.

A: H&E-Färbung, B: Prohibitin Färbung, C: NDUFS4 Färbung

Onkozytäre Tumore waren häufig bereits am H&E-Schnitt (A) zuordenbar, wie in diesem Beispiel. Die Zellen hatten ein fein granuläres, eosinophiles Zytoplasma, einen zentral liegenden Zellkern und prominente Nukleolen. Prohibitin (B) bekräftigte dies, da sich eine massive Anreicherung an Mitochondrien und große Clusterbildung zeigten. Es kam stets zu einem kompletten Verlust der NDUFS4-Expression (C), gemäß einem durchgehenden OXPHOS-Defekt in der gesamten Mitochondrienpopulation. Häufig war bei Ausfall der NDUFS4-Expression eine zytoplasmatische Hintergrundfärbung sichtbar (C), die im Unterschied zur echten, spezifischen mitochondrialen Färbung nicht granulär, sondern komplett verwaschen, beziehungsweise homogen war und somit als unspezifisch bewertet wurde. Dies führte aber nur selten zu Interpretationsschwierigkeiten (siehe Abbildung 12).

4.3 Schwierigkeiten in der Erkennung von onkozytären Veränderungen im H&E-Schnitt

Im ersten Schritt der statistischen Auswertung soll die allgemeine Verteilung der H&E-Färbungen im Zusammenhang mit den immunhistochemischen Färbungen anhand einer Kreuztabelle betrachtet werden. Zuvor wurden die 200 Kontrollfälle mit Proben von gesunden Schilddrüsen ausgefiltert.

Tabelle 2: Kreuztabelle Mitochondriale Signatur und H&E-Schnitt

			H&E Schnitt						Gesamt	
			Nicht onkozytär		Vielleicht onkozytär		Onkozytär			
			Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%
Mitochondriale Signatur	NST	Anzahl	109	89%	13	11%	0	0%	122	100%
		%	49%		17%		0%		25%	
	MRNO	Anzahl	38	78%	10	20%	1	2%	49	100%
		%	17%		13%		0,5%		10%	
	Heteropl.	Anzahl	13	65%	7	35%	0	0%	20	100%
		%	6%		9%		0%		4%	
	MDNO	Anzahl	31	72%	9	21%	3	7%	43	100%
		%	14%		12%		2%		9%	
	Onkozytär	Anzahl	32	12%	36	14%	195	74%	263	100%
		%	14%		48%		98%		53%	
	Gesamt	Anzahl	223	45%	75	15%	199	40%	497	100%
		%	100%		100%		100%		100%	

Von insgesamt 497 Fällen wurden 199 im H&E-Schnitt als onkozytär eingestuft (siehe Tabelle 2). Davon erwiesen sich 195 nach der immunhistochemischen Färbung tatsächlich als onkozytär, was einer Spezifität von 98% entsprach. Das heißt in der H&E-Färbung ließen sich eindeutig onkozytäre Tumore zuverlässig erkennen.

In 75 Fällen (15%) lagen unklare, beziehungsweise nur fragliche, onkozytäre Veränderungen vor, weswegen diese Fälle im H&E-Schnitt als „vielleicht onkozytär“ klassifiziert wurden. Außerdem kann man entnehmen, dass die Verteilung dieser fraglich

onkozytären Fälle in der Immunhistochemie etwa 50:50 war, genauer gesagt 36 Fälle (48%) wurden als onkozytär klassifiziert und 39 Fälle (52%) als nicht-onkozytär.

Bemerkenswert ist, dass in 32 Fällen (12%) die onkozytären Veränderungen im H&E-Schnitt gar nicht erkannt und die Tumore als „nicht onkozytär“ eingestuft wurden.

Insgesamt wurden somit in der H&E-Färbung 68 von 263 onkozytären Tumoren (26%) nicht als solche wahrgenommen, was einer Sensitivität von 74% entspricht.

Der Anteil der onkozytären Tumore im H&E-Schnitt lag bei 40% und nach der immunhistochemischen Färbung stieg dieser auf 53% an. Der Anstieg um 13% erwies sich nach dem McNemar Test als signifikant ($<0,001$), was bestätigte, dass die Detektionsrate von onkozytären Veränderungen mithilfe der Immunhistochemie wesentlich verbessert wird.

4.4 Nicht-onkozytäre mitochondriale Signaturen kann man in der H&E-Färbung nicht voneinander unterscheiden

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob zumindest eine bloße numerische Akkumulation von Mitochondrien, unabhängig davon, ob ein Defekt der OXPHOS-Kette vorliegt oder nicht, mit dem onkozytären Zellbild im H&E-Schnitt korreliert. Zu diesem Zweck wurden die Kategorien „NST“ und „MDNO“ in der Gruppe „keine Akkumulation von Mitochondrien“ zusammengefasst und die Kategorien „MRNO“ und „heteroplasmisch“ in der Gruppe „Akkumulation von Mitochondrien“. Die immunhistochemische Kategorie der onkozytären Tumore wurden hier ausgeschlossen.

Insgesamt blieben noch 234 Fälle, 165 davon ohne Mitochondrienanreicherung und 69 mit Anreicherung (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Kreuztabelle mitochondriale Akkumulation gegen H&E-Schnitt

			H&E Schnitt			Gesamt
			Nicht onkozytär	Vielleicht onkozytär	Onkozytär	
Mitochondriale Akkumulation	Keine Akk.	Anzahl	140	22	3	165
		%	85%	13%	2%	100%
	Akk.	Anzahl	51	17	1	69
		%	74%	25%	1%	100%
Gesamt	Anzahl	191	39	4	234	
	%	82%	17%	2%	100%	

Der Chi-Quadrat Test ergab einen p-Wert von 0,09 und war somit nicht signifikant bei $\alpha=0,05$.

Das erklärt sich dadurch, dass nur 25% aller Fälle mit Mitochondrienakkumulation im H&E-Schnitt durch gewisse zytoplasmatische Vergrößerung und Eosinophilie begleitet und daher als „fraglich onkozytär“ gewertet wurden. In den meisten Fällen konnte man hingegen eine Mitochondrienanreicherung in einer H&E-Färbung kaum als solche erkennen, abgesehen von tatsächlichen Onkozyten. Für die Praxis bedeutet das, dass eine Abschätzung der Menge von Mitochondrien in den nicht-onkozytären Läsionen nur mithilfe eines pan-mitochondrialen Markers (wie zum Beispiel Prohibitin) möglich ist.

4.5 Korrelation der mitochondrialen Signaturen mit der Dignität

Im Folgenden wurde die Dignitätsverteilung der onkozytären versus der nicht-onkozytären Tumore zunächst im Zusammenhang mit der H&E-Färbung (siehe Tabelle 4) und anschließend mit der Immunhistochemie (siehe Tabelle 5) betrachtet, erneut mit allen 497 Fällen.

Tabelle 4: Kreuztabelle H&E-Schnitt gegen Dignität

			Dignität		Gesamt
			Benigne	Maligne	
H&E Schnitt	Nicht onkozytär	Anzahl	183	115	298
		%	62%	58%	60%
	onkozytär	Anzahl	114	85	199
		%	38%	43%	40%
Gesamt	Anzahl	297	200	497	
	%	100%	100%	100%	

Tabelle 5: Kreuztabelle Immunhistologie gegen Dignität

			Dignität		Gesamt
			Benigne	Maligne	
Immunhistologie	Nicht onkozytär	Anzahl	142	92	234
		%	48%	46%	47%
	onkozytär	Anzahl	155	108	263
		%	52%	54%	53%
Gesamt	Anzahl	297	200	497	
	%	100%	100%	100%	

Insgesamt gab es 297 benigne und 200 maligne Tumore (siehe Tabelle 5).

Der Fisher's Exakt Test war sowohl für Tabelle 4 ($p=0,4$) als auch für Tabelle 5 ($p=0,7$) nicht signifikant. Dies bedeutet, dass die mitochondriale Immunhistochemie nicht mit der Dignität interferiert, das heißt, die im Abschnitt 4.3 beschriebene Verbesserung der Erkennung von onkozytären Veränderungen mithilfe der immunhistochemische Färbungen funktioniert gleich gut bei Adenomen und Karzinomen.

Aufgrund des Studiendesigns – populationsbasiert für Karzinome und stichprobenartig für Adenome, wobei die Größe beider Adenom-Untergruppen, nämlich konventionelle und onkozytäre, an die Größe der jeweiligen Karzinomgruppen angepasst wurde – besteht in der untersuchten Kohorte ein Selektionsbias. Deswegen ist es nicht möglich die Malignitätsraten

in den onkozytären versus nicht-onkozytären Tumoren miteinander zu vergleichen. Für die vier Untergruppen der nicht onkozytären Tumore (NST, MRNO, heteroplasmisch und MDNO) bestand hingegen kein Selektionsbias, weil einerseits die Existenz dieser Gruppen zum Moment der Selektion nicht bekannt war und andererseits, wie im Abschnitt 4.4. dargelegt, der Mitochondriengehalt in den nicht-onkozytären Tumoren nicht mit der H&E-Morphologie korrelierte.

Deshalb wurden im nächsten Schritt die „nicht-onkozytären“ Unterkategorien genauer betrachtet, um zu analysieren, ob signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Malignität bestehen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Kreuztabelle Dignität versus Immunhistologie der nicht-onkozytären Tumoren

			Dignität		Gesamt
			Benigne	Maligne	
Immunhistologie	NST	Anzahl	89	33	122
		%	73%	27%	100%
	MRNO	Anzahl	14	35	49
		%	29%	71%	100%
	Heteropl.	Anzahl	10	10	20
		%	50%	50%	100%
	MDNO	Anzahl	29	14	43
		%	67%	33%	100%
	Gesamt	Anzahl	142	92	234
		%	61%	39%	100%

Die durchschnittliche Malignitätsrate über alle vier nicht-onkozytäre Kategorien lag bei 39%. Mit einem Wert von $p < 0,001$ waren die Unterschiede in den Malignitätsraten zwischen den mitochondrialen Signaturen in der Tabelle 6 nach dem Chi-Quadrat Test hoch signifikant.

Die „NST“-Läsionen waren mit 73% der benignen Fälle die Indolentesten. Eine ähnliche Situation (67% benigne Fälle) wurde auch bei den „MDNO“-Tumoren beobachtet. Die Malignitätsrate in beiden „NST“- und „MDNO“-Kategorien gemeinsam (das heißt in Tumoren ohne Anreicherung von Mitochondrien) lag somit bei 28% (47 von 165 Fällen). Die „MRNO“-Tumore waren hingegen mit 71% der Fälle überdurchschnittlich oft maligne (71%). Der Unterschied zu der oben genannten 28%-igen Malignitätsrate in den Tumoren ohne Mitochondrienakkumulation war im Fisher's Exakt Test hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die „heteroplasmischen“ Fälle lagen mit einer 50%-igen Malignitätsrate dazwischen, jedoch über dem Durchschnitt von 39% und somit näher zur „MRNO“-Gruppe, wobei aufgrund der geringen Zahl solcher Tumore das Ergebnis unter Umständen nicht zuverlässig ist.

Diese Zusammenhänge wurden im nachfolgenden Balkendiagramm noch einmal graphisch dargestellt (siehe Abbildung 18). Hier erkennt man die Verteilung der benignen und malignen Tumore auf die immunhistochemischen, „nicht-onkozytären“ Kategorien auf einen Blick. Während NST-Tumore und auch MDNO-Tumore deutlich auf der benignen Seite waren, überwogen bei der Gruppe der „mitochondrien-reichen“ Tumore maligne Läsionen.

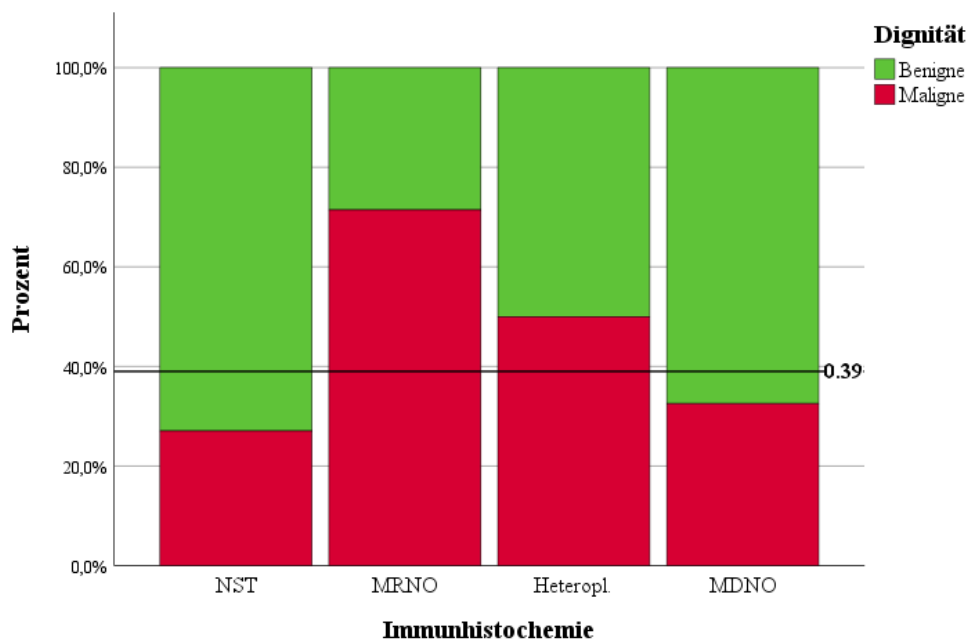


Abbildung 18: Balkendiagramm Dignitätsverteilung innerhalb der immunhistochemisch „nicht-onkozytären“ Gruppe

5. Diskussion

5.1 Beantwortung der Forschungsfragen

Die zu Beginn gestellten Forschungsziele lauteten einerseits den praktischen Nutzwert der Markerkombination Prohibitin/NDUFS4 nachzuweisen und andererseits die Existenz der „MRNO“-Tumore zu validieren.

Anhand der Ergebnisse ließ sich der Nutzen des Marker-Duos eindrücklich nachweisen. In erster Linie war die Sensitivität, bei Erkennung onkozytärer Tumore nur mittels eines H&E-Schnitts, mit 74% recht niedrig. Dies macht den Bedarf an immunhistochemischen Färbungen zur Detektion von onkozytären Veränderungen deutlich. Unter Verwendung des Prohibitin/NDUFS4 Duos ließen sich nicht nur die onkozytären Tumore signifikant besser zuordnen, sondern es wurden vier weitere Unterkategorien unterschieden (NST, MRNO, heteroplasmische und MDNO), die rein durch Beurteilung der H&E-Färbung nicht erkennbar waren. Die Unterschiede sind im H&E-Schnitt nur sehr dezent oder gar nicht auszumachen.

Das Prohibitin/NDUFS4 Duo ermöglichte in den meisten Fällen eine sicherere Zuordnung zu den jeweiligen Kategorien. Ausfälle gab es einerseits in Form der zwei falsch positiven NDUFS4 Ergebnisse und andererseits in sieben falsch negativen NDUFS4 Färbeergebnissen, die aufgrund dessen ausgeschlossen wurden. Eine adäquate Auswertung war somit in 98% der untersuchten Fälle möglich, was angesichts des Alters der Proben (17 bis 37 Jahre) eine beachtlich gute Performance für die Praxis bedeutet.

Wie bereits erwähnt fand sich in den immunhistochemischen Unterkategorien auch die Gruppe der „MRNO“-Tumoren wieder. In dieser Arbeit bestätigte sich auch das Ergebnis der Studie aus dem Jahre 2009 (1), dass Tumore mit einer Anreicherung an gesunden Mitochondrien eher maligne sind, im Vergleich zu denen, die keine Mitochondrienakkumulation hatten. Damit heben sich die „MRNO“-Tumore ab und könnten in weiterführenden Studien als eigene Untergruppe der Tumore genauer charakterisiert werden.

Eine neue Beobachtung stellten die „MDNO“-Tumore dar, die trotz einer geringen Anreicherung an Mitochondrien einen kompletten Ausfall von NDUFS4 aufwiesen und damit einen Defekt im Komplex I der OXPHOS-Kette. Konkordant mit der obigen Erkenntnis zur Malignität, erwiesen sich die „MDNO“-Tumore mit 67% benignen Fällen als indolenter im Vergleich zu „MRNO“-Tumoren.

5.2 Kritische Reflexion

Im Verlauf der Erstellung der Arbeit kam es immer wieder zu Schwierigkeiten, die hier genauer beschriebenen werden sollen und bei der Verwendung der immunhistochemischen Färbungen und deren Vorbereitung vermieden werden sollen.

Die immunhistochemischen Färbungen schwankten ihrer Qualität, abhängig von der Verdünnung des Antikörpers, sowie von den verwendeten Gerät-Protokollen, weshalb Positiv-Kontrollen zum Monitoring der Färbequalität genutzt wurden (64).

Aufgrund der großen Anzahl der auszuwertenden Fälle, insgesamt 459 mit 946 Proben, wurden TMAs genutzt, um alle Fälle auf möglichst wenige Paraffinblöcke, insgesamt neun, zu verteilen und dann diese mit den entsprechenden Antikörpern zu färben. Dabei ging es vor allem um Kosten-, Ressourcen- und letztlich auch Zeiteinsparung. Dies ist auch einer der Hauptvorteile bei der Verwendung von TMAs (65,66).

Ein Nachteil bei der Verwendung von TMAs ist, dass nur Bruchstücke des gesamten Tumors betrachtet werden können. Dem wird entgegengewirkt, indem man aus einem Tumor mehrere kleine Stenzen aus verschiedenen, makroskopisch unterschiedlichen, Bereichen entnimmt. Dadurch erhält man eine gute Repräsentation des gesamten Tumors (65,67).

Ein Problem, das bei der Auswertung auftrat, war die Schwierigkeit heterogene Tumore zu klassifizieren, da diese laut der aktuellen WHO bei einem Cut-off von 75% Onkozyten (6) zu einem onkozytären Tumor erklärt werden müssten. In solchen Fällen, und auch bei nicht eindeutigen heteroplasmischen Tumoren, wurde der ursprüngliche Paraffinblock aus dem Archiv genommen und die Färbungen am Block wiederholt und erneut ausgewertet.

Dennoch erwiesen sich dünne Stenzen, mit einer 0,6mm Nadel, aus archivierten Präparaten als besonders effektiv (65), da sie klein genug waren, um das Gewebe nicht zu schädigen, sodass bei Nachfärbungen am Block die Tumorknoten und ihre Heterogenität noch erkennbar waren. Jedoch konnte aufgrund der dünnen Nadel nicht immer ausreichend repräsentatives Gewebe entnommen werden.

Durch die große Anzahl der Stenzen pro Paraffinblock kam es vor, dass die randständigen Stanzanschnitte beim Aufziehen auf den Objektträger verloren gingen oder zerrissen. Wenn nicht genügend Gewebeproben von einem Tumor übrig waren, wurden die Schnitte und Färbungen zunächst an dem Paraffinblock, der die TMA-Stenzen enthielt, wiederholt.

Um die verschiedenen Färbungen gleichzeitig beurteilen zu können, wurden die Objektträger mit den TMAs mithilfe des PANORAMIC 1000 Slide Scanner der Firma 3DHISTECH digitalisiert. Die Scans erwiesen sich teilweise als unscharf und mussten separat auf den Schnitten beurteilt werden. Außerdem waren die eingescannten Bilder im Vergleich zu den physischen Schnitten sehr kontrastreich und übersättigt. Das war vor allem bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen irreführend, weshalb immer das entsprechende gesunde Gewebe zur Kontrolle betrachtet werden sollte, um die tatsächliche „Stärke“ von Prohibitin und NDUFS4 einschätzen zu können.

In der Praxis empfiehlt es sich die Färbungen unter dem Mikroskop anzuschauen für eine optimale Qualität.

Weiters kam es in zwei Fällen zu einem falsch-positiven Ergebnis von NDUFS4, dabei handelte es sich um eindeutig onkozytäre Tumore, sowohl in der H&E- als auch in der Prohibitin Färbung, die aber keinen Ausfall von NDUFS4 hatten. Eine Erklärung dafür wäre, dass nicht der Komplex I eine Störung hat, sondern ein anderer Komplex, zum Beispiel IV oder V, der nicht zum Ausfall von NDUFS4 führen würde. Jedoch handelte es sich hierbei mit 0,4% um sehr wenige Ausnahmen.

Letztlich muss erwähnt werden, dass aufgrund des teilweisen erheblichen Alters der Präparate die Färbeergebnisse häufig schlechter ausfielen, als es bei frischen Präparaten der Fall gewesen wäre. Dies könnte auf eine mögliche Austrocknung oder sonstige Alterung, wie Oxidation, des Materials über die Jahre zurückzuführen sein. Dementsprechend war es notwendig in 3,8% der Fälle die Färbungen am Block zu wiederholen und 1,4% der Fälle mussten aufgrund der unzufriedenstellenden Färbeergebnissen ausgeschlossen werden. In der laufenden Routinepraxis dürften derartige Schwierigkeiten jedenfalls kaum auftreten.

5.3 Implikationen für Theorie und Praxis

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung der mitochondrialen Signaturen mittels Immunhistochemie in der Praxis sehr empfehlenswert ist.

Die Verwendung der Markerkombination Prohibitin und NDUFS4 empfiehlt sich vor allem bei follikulären Schilddrüsenadenomen und -karzinomen, die in der H&E-Färbung nicht eindeutig als onkozytär zu identifizieren sind (1,2,41). Häufig fehlten die typischen granulären, eosinophilen und zentralkernigen Merkmale der Onkozyten. In 12% der Tumore waren im H&E-Schnitt keinerlei Anzeichen für onkozytäre Veränderungen zu finden und in

weiteren 14% waren sie nur fraglich. In Summe waren 26% der onkozytären Tumore im H&E-Schnitt nicht als solche detektierbar, was eine eher schlechte Sensitivität von 74% ergab. Die Erkennung der onkozytären Veränderungen ist aber insbesondere bei Karzinomen wichtig, um zum Beispiel die Resistenz der Tumore gegenüber der Radiotherapie vorauszusagen (68,69).

In dieser Studie wurde nicht nur die Existenz von sogenannten „MRNO“ Tumoren, sondern auch die bereits in der Vorstudie (1) beobachtete Korrelation der mitochondrialen Akkumulation mit der Malignität bestätigt. Dies hat wichtige theoretische Implikationen, da die Rolle der Mitochondrien in der Tumorbilogie einerseits zunehmend erkannt wird, andererseits nach wie vor unzureichend erforscht bleibt (70).

5.4 Ausblick und Anregungen für weiterführende Arbeiten

Im Hinblick auf die hier erarbeiteten Ergebnisse könnte eine Folgestudie angeschlossen werden, die ein Follow-Up der hier verwendeten Fälle einbezieht, im Sinne einer klinisch-pathologischen Korrelation. Die Fälle könnten aufbereitet werden, indem man die Patienten*innen Daten darauf prüft, welche Therapien verwendet wurden, ob sie angeschlagen haben und ob die Patienten*innen danach tumorfrei waren. Anschließend könnte man die Follow-Up Daten in Beziehung zu den in dieser Arbeit definierten Unterkategorien setzen und die prognostische Relevanz der Untergruppen feststellen. Besonders interessant wäre es die prognostische Relevanz der „MRNO“-Tumore anhand der Daten festlegen zu können. Genauso könnte man prüfen, ob onkozytäre Tumore in ihrem Verlauf tatsächlich so ungünstig sind, wie häufig angenommen (32,45,47), oder ob sie sich aufgrund des Mitochondriendefekts auf lange Zeit womöglich indolenter verhalten als bisher angenommen. In diesem Kontext ist auch eine bessere Charakterisierung der „MDNO“-Gruppe interessant, denn das verhältnismäßige geringe maligne Potential dieser Tumore lässt die Involvierung Mitochondriendefekts vermuten.

5.5 Schlussfolgerungen

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Verwendung der immunhistochemischen Färbungen Prohibitin und NDUFS4 bei der Erkennung onkozytärer Tumore gegenüber der ausschließlichen Diagnostik an der H&E-Färbung einen entscheidenden Vorteil bringt.

Auch das Konzept der „MRNO“ Tumore ließ sich bestätigen. Somit ist die Bestimmung der mitochondrialen Signaturen von Schilddrüsentumoren mithilfe der obigen Marker sowohl für die Praxis als auch für die weitere Forschung empfehlenswert.

Literaturverzeichnis

1. Tsybrovskyy O, Rößmann-Tsybrovskyy M. Oncocytic versus mitochondrion-rich follicular thyroid tumours: should we make a difference? *Histopathology* [Internet]. 2009 Dec [cited 2023 Feb 12];55(6):665–82. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/20002768/>
2. Tsybrovskyy O, De Luise M, de Biase D, Caporali L, Fiorini C, Gasparre G, et al. Papillary thyroid carcinoma tall cell variant shares accumulation of mitochondria, mitochondrial DNA mutations, and loss of oxidative phosphorylation complex I integrity with oncocytic tumors. *J Pathol Clin Res*. 2022 Mar;8(2):155–68.
3. Mohebbati A, Shaha AR. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. *Clin Anat* [Internet]. 2012 Jan [cited 2023 Feb 26];25(1):19–31. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5jb0237.han.medunigraz.at/21800365/>
4. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. Taschenlehrbuch Histologie. 2019 Feb 22;432–5.
5. Silbernagl S, Lang F. Taschenatlas Pathophysiologie. 6th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2020. 318–319 p.
6. Lloyd R V., Osamura RY, Klöppel G, Rosai J. World Health Organization Classification of Tumours of Endocrine Organs, 4th Edition. Lloyd R V., Osamura RY, Klöppel G, Rosai J, editors. 2017;92–9.
7. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, Garavello W, Bertuccio P, Levi F, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2023 Feb 13];136(9):2187–95. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5lx0006.han.medunigraz.at/25284703/>
8. LiVolsi VA, Asa SL. The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* [Internet]. 1994 [cited 2023 Feb 13];4(2):233–6. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5lx0006.han.medunigraz.at/7920009/>
9. Cipriani NA, Nagar S, Kaplan SP, White MG, Antic T, Sadow PM, et al. Follicular Thyroid Carcinoma: How Have Histologic Diagnoses Changed in the Last Half-Century and What Are the Prognostic Implications? *Thyroid* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Feb 13];25(11):1209–16. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5lx0006.han.medunigraz.at/26440366/>
10. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Apr;3(4):286–95.
11. Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, Malakhova I, Shibata Y, Khrouch V, et al. Risk of thyroid cancer after exposure to 131I in childhood. *J Natl Cancer Inst*. 2005 May 18;97(10):724–32.
12. Bosetti C, Negri E, Kolonel L, Ron E, Franceschi S, Preston-Martin S, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. VII. Cruciferous and other vegetables (International). *Cancer Causes Control*. 2002 Oct;13(8):765–75.
13. Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T. Follicular thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2011 Apr;24 Suppl 2:S10-8.
14. Collini P, Sampietro G, Rosai J, Pilotti S. Minimally invasive (encapsulated) follicular carcinoma of the thyroid gland is the low-risk counterpart of widely invasive follicular carcinoma but not of insular carcinoma. *Virchows Archiv*. 2003 Jan;442(1):71–6.
15. Lin X, Zhu B, Liu Y, Silverman JF. Follicular thyroid carcinoma invades venous rather than lymphatic vessels. *Diagn Pathol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Feb

- 13];5(1). Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b51x0006.han.medunigraz.at/20205756/>
16. Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T. Follicular thyroid carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2011 [cited 2023 Feb 13];24 Suppl 2:S10–8. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b51x0006.han.medunigraz.at/21455197/>
 17. Maruta J, Hashimoto H, Suehisa Y, Yamashita H, Noguchi S, Aratake Y, et al. Improving the diagnostic accuracy of thyroid follicular neoplasms: cytological features in fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2023 Feb 13];39(1):28–34. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b51x0006.han.medunigraz.at/20091899/>
 18. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1–133.
 19. Lin JD, Chao TC. Follicular thyroid carcinoma: From diagnosis to treatment. *Endocr J*. 2006 Aug;53(4):441–8.
 20. Zhao Z, Shen GH, Liu B, Kuang AR. Unusual Adrenal and Brain Metastases From Follicular Thyroid Carcinoma Revealed by 131I SPECT/CT. *Clin Nucl Med* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Feb 13];41(1):e53–5. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b51x0006.han.medunigraz.at/26018699/>
 21. Pacini F, Fuhrer D, Elisei R, Handkiewicz-Junak D, Leboulleux S, Luster M, et al. 2022 ETA Consensus Statement: What are the indications for post-surgical radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer? *Eur Thyroid J*. 2022 Feb 1;11(1).
 22. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022 Mar;33(1):27–63.
 23. Tallini G. Oncocytic tumours. *Virchows Arch* [Internet]. 1998 [cited 2023 Feb 15];433(1):5–12. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b54h03a8.han.medunigraz.at/9692819/>
 24. Asa SL. My approach to oncocytic tumours of the thyroid. *J Clin Pathol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2023 Feb 15];57(3):225–32. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b54h03a8.han.medunigraz.at/14990587/>
 25. Gasparre G, Porcelli AM, Bonora E, Pennisi LF, Toller M, Iommarini L, et al. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 May 22 [cited 2023 Feb 12];104(21):9001–6. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5sj001c.han.medunigraz.at/17517629/>
 26. Goffredo P, Roman SA, Sosa JA. Hurthle cell carcinoma: a population-level analysis of 3311 patients. *Cancer* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2023 Feb 12];119(3):504–11. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/22893587/>
 27. Matsuura D, Yuan A, Wang L, Ranganath R, Adilbay D, Harries V, et al. Follicular and Hurthle Cell Carcinoma: Comparison of Clinicopathological Features and Clinical Outcomes. *Thyroid*. 2022 Mar;32(3):245–54.
 28. Máximo V, Sobrinho-Simões M. Hürthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch*

- [Internet]. 2000 [cited 2023 Feb 12];437(2):107–15. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/10993269/>
29. Nasuti JF, Benedict C, Hurford M, Bibbo M. Differential diagnosis of oncocytic lesions of the breast and thyroid utilizing a semiquantitative approach. *Acta Cytol* [Internet]. 1999 [cited 2023 Feb 12];43(4):544–51. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/10432873/>
 30. Máximo V, Lima J, Soares P, Sobrinho-Simões M. Mitochondria and cancer. *Virchows Arch*. 2009 May;454(5):481–95.
 31. Máximo V, Lima J, Prazeres H, Soares P, Sobrinho-Simões M. The biology and the genetics of Hurthle cell tumors of the thyroid. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2012 Aug [cited 2023 Feb 12];19(4). Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5sj001c.han.medunigraz.at/22514109/>
 32. Bishop JA, Wu G, Tufano RP, Westra WH. Histological patterns of locoregional recurrence in Hürthle cell carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2023 Feb 12];22(7):690–4. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/22524498/>
 33. Chiapponi C, Hartmann MJM, Schmidt M, Faust M, Bruns CJ, Schultheis AM, et al. Hürthle Cell Carcinoma: Single Center Analysis and Considerations for Surgical Management Based on the Recent Literature. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jun 29;13.
 34. Horn F. *Biochemie des Menschen*. Horn F, editor. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2021.
 35. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309–14.
 36. Zhou D, Duan Z, Li Z, Ge F, Wei R, Kong L. The significance of glycolysis in tumor progression and its relationship with the tumor microenvironment. *Front Pharmacol*. 2022 Dec 14;13.
 37. Liberti M V, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211–8.
 38. Cooper JM, Mann VM, Krige D, Schapira AH. Human mitochondrial complex I dysfunction. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Jul 17;1101(2):198–203.
 39. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol*. 2020 Oct;37:101674.
 40. Bonora E, Porcelli AM, Gasparre G, Biondi A, Ghelli A, Carelli V, et al. Defective oxidative phosphorylation in thyroid oncocytic carcinoma is associated with pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting complexes I and III. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2023 Feb 15];66(12):6087–96. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b54h03a8.han.medunigraz.at/16778181/>
 41. Zimmermann FA, Mayr JA, Neureiter D, Feichtinger R, Alinger B, Jones ND, et al. Lack of complex I is associated with oncocytic thyroid tumours. *Br J Cancer* [Internet]. 2009 May 5 [cited 2023 Feb 15];100(9):1434–7. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b54h03a8.han.medunigraz.at/19352385/>
 42. Chindris AM, Casler JD, Bernet VJ, Rivera M, Thomas C, Kachergus JM, et al. Clinical and molecular features of Hürthle cell carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2023 Feb 12];100(1):55–62.

- Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5sj001c.han.medunigraz.at/25259908/>
43. Erickson LA, Jin L, Goellner JR, Lohse C, Pankratz VS, Zukerberg LR, et al. Pathologic features, proliferative activity, and cyclin D1 expression in Hurthle cell neoplasms of the thyroid. *Mod Pathol* [Internet]. 2000 [cited 2023 Feb 12];13(2):186–92. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/10697277/>
 44. Ghossein RA, Hiltzik DH, Carlson DL, Patel S, Shaha A, Shah JP, et al. Prognostic factors of recurrence in encapsulated Hurthle cell carcinoma of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 50 cases. *Cancer* [Internet]. 2006 May 15 [cited 2023 Feb 12];106(8):1669–76. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5sj001c.han.medunigraz.at/16534796/>
 45. Haq M, Harmer C. Differentiated thyroid carcinoma with distant metastases at presentation: prognostic factors and outcome. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2005 Jul [cited 2023 Feb 12];63(1):87–93. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/15963067/>
 46. Gundry SR, Burney RE, Thompson NW, Lloyd R. Total thyroidectomy for Hürthle cell neoplasm of the thyroid. *Arch Surg* [Internet]. 1983 [cited 2023 Feb 12];118(5):529–32. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/6838358/>
 47. Samulski TD, Bai S, Livolsi VA, Montone K, Baloch Z. Malignant potential of small oncocytic follicular carcinoma/Hürthle cell carcinoma: an institutional experience. *Histopathology* [Internet]. 2013 Oct [cited 2023 Feb 12];63(4):568–73. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b586016a.han.medunigraz.at/23952654/>
 48. Lang G. Immunohistochemie. In: *Histotechnik*. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 269–304.
 49. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. In 2019. p. 289–98.
 50. Scanziani E. Immunohistochemical Staining of Fixed Tissues. In: *Mycoplasma Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 1998. p. 133–40.
 51. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*. 2016 Nov 15;50(6):411–8.
 52. Kumar G, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining methods*. 5th ed. Glostrup, Denmark: Dako North America, Inc. Carpinteria, USA and Dako Denmark A/S; 2009.
 53. Taylor CR, Rudbeck L, editors. *Immunohistochemical Staining Methods - IHC Guidebook*. 6th ed. USA: Agilent Technologies, Inc. 1999-2021; 2021.
 54. Williams JH, Mephram BL, Wright DH. Tissue preparation for immunocytochemistry. *J Clin Pathol*. 1997 May 1;50(5):422–8.
 55. Engel KB, Moore HM. Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 May 1;135(5):537–43.
 56. Shi SR, Shi Y, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2011 Jan 23;59(1):13–32.
 57. D’Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods*. 2009 Feb;341(1–2):1–18.
 58. O’Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A, Li B, Kampf C, Pontén F, et al. Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol*. 2014 Jun;8(4):783–98.

59. Hernando-Rodríguez B, Artal-Sanz M. Mitochondrial Quality Control Mechanisms and the PHB (Prohibitin) Complex. *Cells* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Feb 15];7(12). Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b54h03a8.han.medunigraz.at/30501123/>
60. Coates PJ, Nenutil R, McGregor A, Picksley SM, Crouch DH, Hall PA, et al. Mammalian Prohibitin Proteins Respond to Mitochondrial Stress and Decrease during Cellular Senescence. *Exp Cell Res*. 2001 May;265(2):262–73.
61. Hernando-Rodríguez B, Artal-Sanz M. Mitochondrial Quality Control Mechanisms and the PHB (Prohibitin) Complex. *Cells*. 2018 Nov 29;7(12):238.
62. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017 Dec 4;7(1):16878.
63. STEFANO GB, KREAM RM. Mitochondrial DNA heteroplasmy in human health and disease. *Biomed Rep*. 2016 Mar;4(3):259–62.
64. Hardy LB, Fitzgibbons PL, Goldsmith JD, Eisen RN, Beasley MB, Souers RJ, et al. Immunohistochemistry Validation Procedures and Practices: A College of American Pathologists Survey of 727 Laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Jan;137(1):19–25.
65. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue Microarray Profiling of Cancer Specimens and Cell Lines: Opportunities and Limitations. *Laboratory Investigation*. 2001 Oct;81(10):1331–8.
66. Ștefan AE, Gologan D, Leavitt MO, Mușat S, Pleșea IE, Stan LGR, et al. Tissue microarrays – brief history, techniques and clinical future. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2021 Jul 1;61(4):1077–83.
67. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DHY, et al. Validation of Tissue Microarrays for Immunohistochemical Profiling of Cancer Specimens Using the Example of Human Fibroblastic Tumors. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1245–51.
68. Bischoff LA, Ganly I, Fugazzola L, Buczek E, Faquin WC, Haugen BR, et al. Molecular Alterations and Comprehensive Clinical Management of Oncocytic Thyroid Carcinoma. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2024 Mar 1;150(3):265.
69. Liu Y, Wang J, Hu X, Pan Z, Xu T, Xu J, et al. Radioiodine therapy in advanced differentiated thyroid cancer: Resistance and overcoming strategy. *Drug Resistance Updates*. 2023 May;68:100939.
70. Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMBS, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res*. 2018 Mar 8;28(3):265–80.