

## Κεφάλαιο 15

# Ανοσοϊστοχημεία

Ε. Κυπαρίδου

Α. Τσίγκα

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εφαρμογή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας στο ιστοπαθολογικό εργαστήριο, είχε χωρίς αμφιβολία, καταλυτική επίδραση, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο.

Ο ρόλος του παθολογοανατόμου στην ομάδα της παροχής περίθαλψης, απέκτησε και αποκτά συνεχώς μεγαλύτερη σημασία, χάρις στις συνεχώς αυξανόμενες δυνατότητες που του παρέχουν οι ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, δυνατότητες που ξεπερνούν τη διάγνωση και μπαίνουν δυναμικά στο χώρο της πρόγνωσης και της απόφασης για τον θεραπευτικό χειρισμό.

Ιδιαίτερα στον τομέα της διάγνωσης των νεοπλασμάτων, η εφαρμογή των τεχνικών ανοσοϊστοχημείας αποτέλεσε κατά γενική ομολογία μια πραγματική επανάσταση και θεωρείται δίκαια η σημαντικότερη εξέλιξη των τελευταίων 50 ετών<sup>1,2,3</sup>.

### ΤΕΧΝΙΚΗ

Ανοσοϊστοχημεία ονομάζουμε μια εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, εφόσον είναι παρόν.

Επομένως, με τον όρο ανοσοϊστοχημεία εννοούμε μια ομάδα ανοσοσεσημασμένων τεχνικών, που επιτυγχάνουν να κα-

ταστήσουν ορατά διάφορα αντιγόνα σε ιστούς και κύτταρα. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία-ετικέτα καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό. Ανάλογα με τη φύση της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και το είδος της ουσίας-ετικέτας που χρησιμοποιούμε, η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος ελέγχεται με κοινό, φθορίζον ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο<sup>4</sup>.

Η αρχική μέθοδος ξεκίνησε από τον Coops που πρώτος είχε τη ιδέα να σημαίνει με φθορίζοντα ιχνηθέτη ένα αντίσωμα που ανέπτυξε σε πειραματόζωο και κατόπιν να αναζητήσει σε ιστική τομή το αντιγόνο εναντίον του οποίου είχε αναπτυχθεί το αντίσωμα εξετάζοντας τον ιστό (μετά την επώαση) με φθορίζον μικροσκόπιο. Αλλά μόνο μετά την εισαγωγή των σεσημασμένων με ένζυμα αντισωμάτων η ανοσοϊστοχημεία έγινε γενικά αποδεκτή σαν ένα απλό, έξυπνο και πρακτικό εργαλείο στη διαγνωστική ιστοπαθολογία<sup>5,6</sup>.

Το αμέσως επόμενο βήμα, που ήταν η εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημεία, πρόσφερε στο παθολογοανατομικό εργαστήριο μια ανεξάντλητη πηγή ειδικών αντιδραστικών μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διαφόρων αντιγόνων σε ιστούς και κύτταρα.

Το σύμπλεγμα αντισώματος-ενζύμου διατηρεί τόσο τις ανοσολογικές όσο και τις ενζυμικές του ιδιότητες και έτσι είναι σε θέση να δεσμεύει τόσο το αντιγόνο που αναζητούμε στον ιστό, όσο και να μεταβάλλει το χρώμα του κατάλληλου χρωμογόνου καθιστώντας το ορατό με το μικροσκόπιο<sup>7</sup>.

Η ανοσοϊστοχημεία συγκεντρώνει τα περισσότερα πλεονεκτήματα από οποιαδήποτε άλλη διαγνωστική μέθοδο ή τεχνική. Πολύ ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα, δυνατότητα εφαρμογής σε αρχειακό υλικό ρουτίνας ακόμα και μετά την παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος, επαναληψιμότητα και δυνατότητα συσχέτισης με τις μορφολογικές παραμέτρους. Είναι συμβατή με όλα σχεδόν τα μονιμοποιητικά υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα<sup>8,9</sup>, μπορεί να εφαρμοστεί ακόμα και μετά από αφαλάτωση του υλικού<sup>10</sup>, δίνει αποτελέσματα και σε υλικά που έχουν υποστεί αυτόλυση ή ακόμα και νέκρωση<sup>11</sup> και τέλος σε περίπτωση που αυτό απαιτείται μπορεί να εφαρμοσθεί και σε ιστολογική τομή που είχε προηγουμένως υποστεί χρώση ρουτίνας<sup>12</sup>. Εφαρμόζεται με πολύ καλά αποτελέσματα σε κυτταρολογικό υλικό<sup>13,14,15</sup>, σε υλικό για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο<sup>16,17</sup> και μπορεί να συνδυαστεί με άλλες, ιστοχημικές χρώσεις στην ίδια τομή<sup>18</sup>.

Πολλές τεχνικές είναι σήμερα διαθέσιμες για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση αντιγόνων με πλέον χρησιμοποιούμενες, αυτές του ανοσο-σμπλέγματος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP method) και της ανοσοενζυμικής τεχνικής βιοτίνης-αβιδίνης (Biotin-Avidin procedure).

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ-ΑΝΤΙ-ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ (PAP METHOD)**

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα δεύτερο

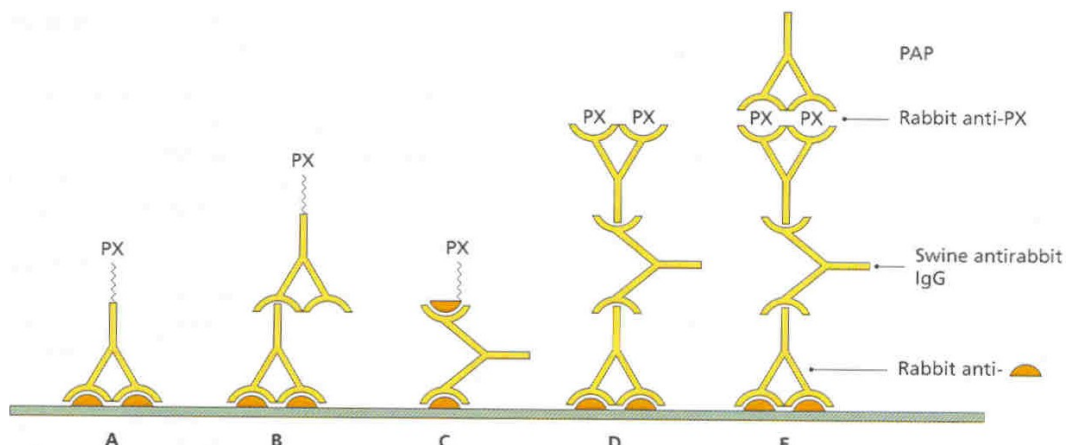
αντίσωμα-γέφυρα, για την ένωση του πρωτοταγούς αντισώματος με το αντιδραστήριο PAP. Το αντιδραστήριο PAP, έχει τη μορφή ενός σταθερού ανοσοσμπλέγματος, αποτελούμενου από το αντιγόνο υπεροξειδάση του φυτού *Armoracia rusticana* (horseradish) και από το αντίσωμα έναντι του αντιγόνου αυτού.

Το αντιδραστήριο PAP και το πρωτοταγές αντίσωμα είναι αναγκαίο να έχουν παραχθεί στο ίδιο είδος ζώου, ενώ το αντίσωμα-γέφυρα παράγεται σε διαφορετικό είδος ζώου<sup>19</sup>. Το τελευταίο έχει ειδικότητα έναντι του πρωτοταγούς αντισώματος και έναντι της ανοσοσφαιρίνης του PAP ανοσοσμπλέγματος, με αποτέλεσμα τη σταθερή διασύνδεσή τους.

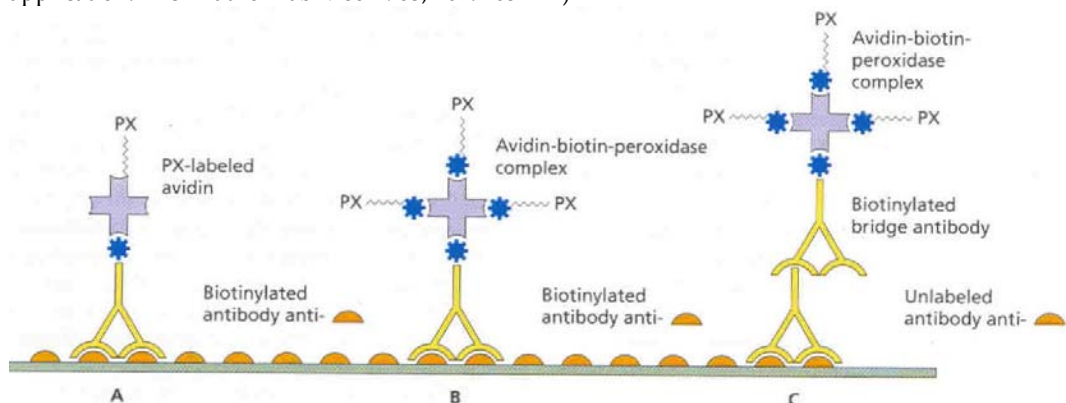
Η τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως σε τομές παραφίνης με πολύ καλά αποτελέσματα λόγω της υψηλής ευαισθησίας, ειδικότητας και σταθερότητας των αντιδραστηρίων. Περιορισμό της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι το αντίσωμα του αντιδραστηρίου PAP και το πρωτοταγές αντίσωμα πρέπει να παράγονται στο ίδιο είδος ζώου. Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμα αντιδραστήρια PAP που έχουν παραχθεί σε όλα τα είδη ζώων που παράγονται και τα πρωτοταγή αντισώματα<sup>19</sup>.

Ανάλογες με τις παραπάνω είναι και οι αρχές της τεχνικής αλκαλικής φωσφατάσης-αντι-αλκαλικής φωσφατάσης (τεχνική APAAP) στην οποία, στη θέση του συμπλόκου PAP χρησιμοποιείται το σύμπλοκο APAAP. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται όταν στους υπό εξέταση ιστούς υπάρχουν υψηλά επίπεδα ενδογενούς υπεροξειδάσης, όταν θέλουμε να ανιχνεύσουμε ειδικά κύτταρα που ευνοούνται από το έντονο κόκκινο χρώμα των υποστρωμάτων της αλκαλικής φωσφατάσης και σε περιπτώσεις διπλής ανοσοχρώσης σε συνδυασμό με μέθοδο υπερο-

ξειδάσης<sup>20</sup> (σχήματα 1 και 2).



Σχήμα 1. Μέθοδοι ανοσουπεροξειδάσης. Α, Σύμπλοκο αντισώματος έναντι υπεροξειδάσης, άμεση μέθοδος. Β, Σύμπλοκο αντισώματος έναντι υπεροξειδάσης, έμμεση μέθοδος. Γ, Μέθοδος σεσημασμένου αντιγόνου. Δ, Μέθοδος ενζυμικής γέφυρας. Ε, Μέθοδος ανοσοσυμπλέγματος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP). Το χρωματιστό ημικύκλιο αναπαριστά το αντιγόνο (Από: Falini b., Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med 1983, 107: 105-117)



Σχήμα 2. Ανοσοενζυμικές τεχνικές βιοτίνης-αβιδίνης. Χρωματιστό ημικύκλιο: αντιγόνο, PX: υπεροξειδάση, \* : βιοτίνη, σταυρός: αβιδίνη. Α, Μέθοδος πρωτογενούς αντισώματος συνδεδεμένου με βιοτίνη. Β, Μέθοδος υπεροξειδάσης συνδεδεμένης με βιοτίνη. Γ, Μέθοδος συμπλόκου αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης. (Από: Falini b., Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med 1983, 107: 105-117)

### ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΙΟΤΙΝΗΣ-ΑΒΙΔΙΝΗΣ (BIOTIN-AVIDIN PROCEDURE)

Στη μέθοδο αυτή εκμεταλλευόμαστε τον υψηλό βαθμό συγγένειας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης. Με χημική διαδικασία συνδέεται η βιοτίνη με το πρωτογενές αντίσωμα σχηματίζοντας σύμπλοκη ένωση. Με την τοποθέτηση της

ένωσης αυτής στον ιστό γίνεται σύνδεσή της με το ανάλογο αντιγόνο, όπου και αν υπάρχει αυτό. Κατόπιν προστίθεται η αβιδίνη η οποία έχει σημανθεί με υπεροξειδάση. Η αβιδίνη εντοπίζει το σύμπλοκο βιοτίνης-αντισώματος με το οποίο ενώνεται σταθερά, μεταφέροντας την υπεροξειδάση στη θέση όπου βρίσκεται το

αντιγόνο.

Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι μερικοί ιστοί διαθέτουν σημαντικές ποσότητες ενδογενούς βιοτίνης, με αποτέλεσμα να συνδέουν άμεσα το σύμπλοκο αβιδίνης-υπεροξειδάσης, δίνοντας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα<sup>20</sup>.

Επί πλέον φαίνεται ότι οι διαφορετικές παρτίδες βιοτίνης και αβιδίνης εμφανίζουν μεταξύ τους ποικίλης έντασης συγγένεια με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου σε διαφορετικά εργαστήρια.

Αρκετά από τα προβλήματα αυτά επιλύονται με τη χρήση στρεπταβιδίνης αντί της βιοτίνης (B-SA method). Η στρεπταβιδίνη είναι ένα τετραμερές ανάλογο της αβιδίνης που απομονώθηκε από το βακτήριο *streptomyces avidinii* και έχει την ιδιότητα να συνδέεται με τη βιοτίνη με πολύ υψηλή συγγένεια<sup>20</sup>.

Θεωρητικά, η συγγένεια αυτή είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από τη συγγένεια των περισσότερων αντισωμάτων προς τα αντιγόνα τους και παρέχει ανίχνευση της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος με αυξημένη ειδικότητα. Το μόριο της στρεπταβιδίνης δεν περιέχει υδατάνθρακες, γεγονός που εμποδίζει την μη ειδική σύνδεση με μόρια ανάλογα των λεκτινών που βρίσκονται σε αρκετούς ιστούς όπως νεφροί, ήπαρ, εγκέφαλος και κύτταρα όπως τα σιτευτικά<sup>20</sup>.

Το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης, σχηματίζει ένα πολύ σταθερό αντιδραστήριο, που μπορεί να αραιωθεί και να αποθηκευθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα και δεν δημιουργεί μη-ειδικούς ηλεκτροστατικούς δεσμούς.

Πολύ σημαντική εξέλιξη στην ανοσοϊστοχημεία ήταν η επινοήση μεθόδων-τεχνικών που ενίσχυαν την ευαισθησία της. Ο σκοπός αυτών των τεχνικών ήταν

να αποκαλύψουν επιτόπους (αντιγονικές θέσεις) που κανονικά είναι καλυμμένοι γιαυτό και ονομάστηκαν μέθοδοι αποκάλυψης ή επανάκτησης του αντιγόνου<sup>21,22,23</sup>.

Τέτοιες μέθοδοι είναι η πέψη του ιστού με πρωτεολυτικά ένζυμα, η επεξεργασία του με μικροκύματα, και η έκθεσή του σε υψηλή θερμοκρασία και υψηλή πίεση συγχρόνως<sup>7</sup>.

Παράλληλα η πρόσφατα εξελισσόμενη τεχνική tissue microarrays η οποία επιτρέπει την σύγχρονη εκτίμηση σε πάνω από 100 διαφορετικά δείγματα με μια μόνο σταγόνα αντισώματος πάνω σε ένα πλακίδιο, αναπτύσσεται συνεχώς και νέες εκδοχές της ανακοινώνονται καθημερινά στη σχετική βιβλιογραφία<sup>24,25</sup>.

Στην προσπάθεια να αυξηθεί η ευαισθησία της ανοσοϊστοχημείας έχουν επινοηθεί διάφοροι συνδυασμοί των παραπάνω μεθόδων και κυκλοφορούν στο εμπόριο συσκευασίες (kits) που αυξάνουν τη σταθερότητα των αποτελεσμάτων, αφού μειώνουν σημαντικά τις πιθανότητες λάθους στην αραιώση των αντιδραστηρίων ή στη σειρά των σταδίων της τεχνικής.

Η παράλληλη ανάπτυξη συσκευών και οργάνων επιτρέπει την αυτοματοποίηση της μεθόδου και την καθιστά οικονομικά συμφερότερη λιγότερο χρονοβόρα και πιο αξιόπιστη.

Σήμερα η πλειοψηφία των παραγομένων αντισωμάτων χρησιμοποιείται στην ανίχνευση αντιγόνων που βρίσκονται σε νεοπλασματικά κύτταρα. Τα αντιγόνα αυτά είναι πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες εντοπιζόμενες στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα ή την κυτταρική μεμβράνη. Η ακριβής γνώση της εντόπισης του κάθε αντιγόνου καθώς και τυχόν ιδιαίτερη ποιότητα της θετικής έκφρασης του, είναι

προαπαιτούμενα για την σωστή και αποτελεσματική εκτίμηση του αποτελέσματος. Για παράδειγμα, τα περισσότερα αντι σώματα έναντι αντιγόνων των λευκοκυττάρων εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, οπότε εκεί αναμένεται η θετική χρώση<sup>1</sup>.

Το ίδιο ισχύει και για το αντίσωμα cerb-B2. Αντίθετα, αναμένεται πυρηνική χρώση για τ' αντι σώματα έναντι των ορμονικών υποδοχέων είτε έναντι του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67. Τα περισσότερα εκ των λοιπών αντισωμάτων εντοπίζουν αντιγόνα του πρωτοπλασματος των κυττάρων.

Όσον αφορά την ποιότητα έκφρασης του αντισώματος, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην αξιολόγηση λόγω της πιθανότητας ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Σε αυτή την περίπτωση, η αντίδραση δίνει ένα θαμπό καφέ χρώμα, με κοκκώδη είτε «αραχνοϋφαντη» υφή, και εντοπίζεται σχεδόν πάντα στο κυτταρόπλασμα<sup>1</sup>.

### **ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ**

Όπως και κάθε άλλη εργαστηριακή τεχνική η ανοσοϊστοχημεία για να αποβεί χρήσιμη πρέπει να εκτιμάται με την απαιτούμενη προσοχή και από παθολογοανατόμους που γνωρίζουν τις παγίδες που μπορεί να κρύβει. Πολλές παγίδες κρύβει το τεχνικό μέρος της μεθόδου, που οι περισσότερες μπορούν να αποφευχθούν, όταν η τεχνική είναι σχολαστικά ακριβής, γίνεται περιοδικά έλεγχος της δραστηριότητας των αντισωμάτων και χρήση θετικών και αρνητικών μαρτύρων<sup>4</sup>.

Όταν διαπιστώνουμε τεχνικό πρόβλημα, σκόπιμο είναι να θυμόμαστε ότι αυτό μπορεί να δημιουργήθηκε πριν από τη χρώση, να αφορά δηλαδή σε καθυστέρηση της μονιμοποίησης του ιστού, ανε-

παρκή μονιμοποίηση, άниση μονιμοποίησης, ανεπαρκή αφυδάτωση προ της εμπέδωσης στην παραφίνη λόγω βλάβης του μηχανήματος επεξεργασίας των ιστών, επιλογή ακατάλληλων αντικειμενοφόρων πλακών και κακή τομή του ιστού με αναδιπλώσεις ή ρωγμές, ή να δημιουργήθηκε στη διάρκεια της χρώσης και να αφορά σε χρησιμοποίηση ληγμένων αντιδραστηρίων, ακατάλληλη αραίωση, παράλειψη βημάτων της χρώσης, ξήρανση του δείγματος, ακατάλληλο χρωμόνο ή ακατάλληλο μέσο επικάλυψης<sup>7</sup>.

Οπωσδήποτε είναι σε κάθε περίπτωση βασικό είναι να θυμόμαστε ότι ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα έχουμε όταν :

1. Το αντίσωμα είναι ακατάλληλο, εξασθενημένο ή χρησιμοποιείται σε λάθος πυκνότητα<sup>4</sup>.
2. Υπάρχει απώλεια του αντιγόνου λόγω διάχυσης ή αυτόλυσης<sup>4</sup>.
3. Το αντιγόνο στον ιστό βρίσκεται σε πυκνότητα χαμηλότερη από την πυκνότητα που απαιτείται για να ανιχνευθεί από τα αντιδραστήρια και την χρησιμοποιούμενη μέθοδο<sup>4</sup>.

Για τους παραπάνω λόγους ένα αρνητικό ανοσοϊστοχημικό αποτέλεσμα ακόμα και όταν υπάρχει θετικός μάρτυρας, δεν είναι αρκετό για να αποκλείσει μια διάγνωση κυρίως όταν η διάγνωση αυτή υποστηρίζεται από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τα στοιχεία του κλινικού ιστορικού.

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουμε όταν :

1. Το αντίσωμα αντιδρά με διαφορετικά αντιγόνα από αυτά που αναζητούμε.
2. Υπάρχει μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος στον ιστό<sup>26</sup>.
3. Παρουσία ενδογενούς υπεροξειδάσης ή έλξη για το σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης σε ή από κάποια στοιχεία του ιστού.

4. Φαγοκυττάρωση (εγκλωβισμός) φυσιολογικών ιστών από νεοπλασματικά κύτταρα<sup>4</sup>.

5. Απελευθέρωση πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα φυσιολογικών κυττάρων, τα οποία καταστρέφονται από ένα διηθητικό νεόπλασμα και εισχώρηση τους στα νεοπλασματικά κύτταρα όπου ακολούθως ανιχνεύονται ανοσοϊστοχημικά<sup>27</sup>.

6. Έκτοπη αντιγονική έκφραση οφειλόμενη σε άγνωστη μέχρι τώρα διασταυρούμενη αντίδραση, ή στο γεγονός ότι ένα, θεωρούμενο ειδικό, για κάποιον όγκο αντίσωμα, αποδεικνύεται ότι αντιδρά και με άλλα νεοπλάσματα<sup>4,28</sup>.

#### **ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ**

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός των αντισωμάτων-δεικτών που διατίθενται προς χρήση, δημιουργεί σε κάθε εργαστήριο την ανάγκη ταξινόμησης τους, που μπορεί να γίνεται: α) ανάλογα με το είδος των ιστών στους οποίους ανιχνεύονται και να έχουμε έτσι δείκτες επιθηλιακούς, μεσεγχυματικούς, λεμφικούς κ.λ.π., β) ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής τους και έχουμε έτσι μονοκλωνικούς ή πολυκλωνικούς δείκτες ή γ) ανάλογα με την ειδικότητά τους και να έχουμε δείκτες ειδικούς και μη ειδικούς<sup>7</sup>.

Σαν ειδικούς χαρακτηρίζουμε τους δείκτες που η έκφρασή τους περιορίζεται σε μια κυτταρική σειρά και χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου δείκτη είναι το ειδικό προστατικό αντιγόνο που εκφράζεται στο αδενικό επιθήλιο του προστάτη αδένος. Όμως οι περισσότεροι από τους δείκτες που χρησιμοποιούμε είναι μη ειδικό εκφραζόμενοι σε περισσότερους από έναν κυτταρικούς τύπους. Αυτό βέβαια δεν μειώνει τη χρησιμότητά τους καθώς μας επιτρέπουν να εντάξουμε έναν κυτταρικό πληθυσμό σε μια γενική κατηγορία π.χ. επιθηλιακός, μεσεγχυματικός,

λεμφικός κ.α.

Η διαγνωστική αξία των διαφόρων δεικτών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι η ειδικότητα και η ευαισθησία. Με βάση αυτές τις δύο ιδιότητες μπορούμε να διακρίνουμε τους δείκτες μας σε πολύ χρήσιμους και απλά χρήσιμους<sup>7</sup>. Στην κατηγορία των πολύ χρήσιμων δεικτών ανήκουν αυτοί που είναι όχι μόνο ειδικό για μια κυτταρική σειρά αλλά και εκφράζονται από την συγκεκριμένη σειρά με πολύ μεγάλη συχνότητα.

Τέτοιοι δείκτες είναι ,επομένως, πολύ χρήσιμοι τόσο όταν το αποτέλεσμα είναι θετικό, αλλά και όταν είναι αρνητικό. Το ειδικό προστατικό αντιγόνο είναι ένας δείκτης αυτής της κατηγορίας γιατί όχι μόνο εκφράζεται αποκλειστικά από τα φυσιολογικά και νεοπλασματικά αδενικά κύτταρα του προστάτη αλλά εκφράζεται και σε ποσοστό μεγαλύτερο του 97% των περιπτώσεων. Δυστυχώς δείκτες με τέτοια ειδικότητα και ευαισθησία υπάρχουν λίγοι, ο αριθμός τους όμως αυξάνεται σταδιακά<sup>7</sup>.

Στην κατηγορία των χρήσιμων δεικτών ανήκει η μεγάλη πλειοψηφία των χρησιμοποιούμενων στην διάγνωση δεικτών μας. Μερικοί από αυτούς έχουν πολύ μεγάλη ειδικότητα για έναν κυτταρικό τύπο αλλά δεν εκφράζονται με μεγάλη συχνότητα από νεοπλάσματα του τύπου αυτού. Π.χ. η μυοσφαιρίνη είναι ειδική για τις ραβδομυοβλάστες, υπάρχουν όμως ραβδομυοσαρκώματα που δεν την εκφράζουν<sup>7</sup>,

Τέτοιοι δείκτες είναι επομένως χρήσιμοι όταν δίνουν θετικό αποτέλεσμα, όχι όμως όταν δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα.

#### **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Για τους παθολογοανατόμους, και ιδιαίτερα για τους ασχολούμενους με τη

διάγνωση των νεοπλασμάτων, η δυνατότητα ανίχνευσης μιας τόσο μεγάλης ποικιλίας δεικτών των όγκων, πέρα από την αναμφισβήτητη ενίσχυση της διαγνωστικής μας ικανότητας, συνετέλεσε και στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας των νεοπλασματικών ασθενειών.

Το γεγονός της ύπαρξης του πολύ μεγάλου αριθμού των δεικτών πέρα από τη θετική του πλευρά έχει και κινδύνους. Ο κίνδυνος που αφορά τους ασθενείς είναι να οδηγηθούμε σε λάθος διάγνωση παρασυρόμενοι από ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα, επειδή ακολουθήσαμε λανθασμένα μονοπάτια στην επιλογή των δεικτών (απειρία, έλλειψη ιστορικού), ενώ υπάρχει πάντα και ο κίνδυνος της άσκοπης κατασπατάλησης οικονομικών και ανθρώπινων πόρων, όταν υποκύψουμε στον πειρασμό της εφαρμογής πολύ μεγάλου αριθμού αντιδραστηρίων χωρίς σωστό και προκαθορισμένο σχεδιασμό.

Οι κίνδυνοι αυτοί, που έγιναν πολύ γρήγορα αντιληπτοί, αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς με τη χρήση προκαθορισμένων ομάδων (πάνελς) δεικτών που προεπιλέγονται για κάθε διαγνωστικό πρόβλημα και την αλγοριθμική ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Αυτή η προσδιοριστική, αλγοριθμική, ανοσοϊστοχημική, διάγνωση αποτέλεσε για τους παθολογοανατόμους, τον μίτο της Αριάδνης που οδηγεί μέσα από τον απίστευτο λαβύρινθο των αντισωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με άπειρες τεχνικές και συνδυασμούς και να ερμηνευθούν με άπειρους τρόπους, στον ποθητό στόχο, που είναι φυσικά η τεκμηριωμένη διάγνωση.

Η χρήση ομάδων αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημεία αυξάνει τόσο την ειδικότητα και την ευαισθησία της μεθόδου, εξοικονομεί χρόνο και μειώνει τα έξοδα

αφού τις περισσότερες φορές αποτρέπει την εφαρμογή επιπλέον δεικτών για τη διάγνωση<sup>7</sup>.

Ακόμα προσφέρει στρατηγικές για την επίλυση προβλημάτων που υποτροπιάζουν και συμβάλει στην κατανόηση της πραγματικότητας που είναι ότι δεν υπάρχει αντιδραστήριο που να μπορεί μόνο του να δώσει καθοριστική απάντηση σε οποιοδήποτε διαγνωστικό πρόβλημα.

Ο αριθμός των δεικτών που μπαίνει κάθε φορά στο πάνελ εξαρτάται από το είδος της διαφορικής διάγνωσης που πρέπει να γίνει. Γενικά χρησιμοποιούνται ένα ή δύο αντισώματα ως κύρια διαγνωστικά αντιδραστήρια και ένα ή περισσότερα αντισώματα για την επιβεβαίωση της διάγνωσης. Η χρήση μιας ομάδας δύο ή περισσότερων αντισωμάτων στη διαφορική διάγνωση είναι αποτελεσματική μόνο όταν την καταρτίσουμε βασιζόμενοι σε εύλογα ιστοπαθολογικά και κλινικά κριτήρια. Η αδιάκριτη χρήση άσχετων αντισωμάτων, χωρίς προσεκτική εκτίμηση των ιστομορφολογικών χαρακτηριστικών και του κλινικού ιστορικού, δυσχεραίνει μάλλον παρά διευκολύνει τη διάγνωση και επιφέρει μεγάλη σπατάλη χρόνου και ακριβών αντιδραστηρίων<sup>4,7</sup>.

Για την σωστή επιλογή των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στη διαφορική διάγνωση των νεοπλασμάτων, πολύ σημαντικό στοιχείο είναι η μελέτη της μορφολογίας τους αλλά και η εμπειρία του παρατηρητή.

Αν η αρχική ιστολογική εκτίμηση είναι λανθασμένη η ανοσοϊστοχημεία είναι πιθανόν να περιπλέξει ακόμα περισσότερο παρά να διευκολύνει την διάγνωση.

Τα στοιχεία του κλινικού ιστορικού που είναι απαραίτητα για την διαφορική διάγνωση των νεοπλασμάτων είναι η ηλικία

α, το φύλλο, το ατομικό αναμνηστικό και το πρόσφατο κλινικό ιστορικό, το όργανο και η θέση από την οποία ελήφθη το δείγμα, κάθε ιστορικό τυχόν προηγούμενης νεοπλασματικής νόσου και του είδους της θεραπείας της<sup>7</sup>. Π.χ. η επιλογή των αντισωμάτων για την ταυτοποίηση ενός μικροκυτταρικού νεοπλάσματος εξαρτάται απολύτως από την ηλικία του ασθενούς ενώ στην περίπτωση που ερευνάζεται η πρωτοπαθής εστία ενός μεταστατικού νεοπλάσματος στα οστά, η επιλογή διευκολύνεται σημαντικά από την πληροφόρησή μας για τυχόν προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις στον προστάτη (ώστε να συμπεριληφθεί ειδικό προστατικό αντιγόνο), τον θυρεοειδή (ώστε να συμπεριληφθεί θυρεοσφαιρίνη) κ.λ.π<sup>7</sup>.

Η σωστή διαφορική διάγνωση των νεοπλασμάτων βασίζεται επομένως στην ιστομορφολογία, τις κλινικές πληροφορίες και την πιθανότητα εμφάνισης συγκεκριμένων νεοπλασμάτων, στην ηλικιακή ομάδα του ασθενούς μας και στη συγκεκριμένη εντόπιση. Η διαφορική διάγνωση είναι δυνατόν να κινείται μέσα σε ευρέα ή στενά όρια. Π.χ. ένα αδιαφοροποίητο μεγαλοκυτταρικό νεόπλασμα μπορεί να είναι καρκίνωμα, μελάνωμα, σάρκωμα ή λέμφωμα και να απαιτούνται πολλοί δείκτες για τη διάγνωση, ενώ ένα αδενοκαρκίνωμα που διηθεί την ουροδόχο κύστη και τον προστάτη συγχρόνως απαιτεί σαφώς πολύ λιγότερους δείκτες<sup>29</sup>.

Σήμερα πολλές ομάδες αξιόλογων διαγνωστικών κέντρων έχουν καταρτίσει και δημοσιεύσει αλγοριθμικούς πίνακες ανοσοϊστοχημικών δεικτών για κάθε κατηγορία διαγνωστικού προβλήματος.

## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

Οπωσδήποτε για την επιτυχία της αλγοριθμικής προσέγγισης στη διαγνωστική ανοσοϊστοχημεία, πέρα από τη χρήση των αναγνωρισμένων από έμπειρους ερευνητές αλγορίθμων απαιτούνται επίσης (πίνακες 1 ως 4):

1. Κατάλληλες και σταθερές συνθήκες επεξεργασίας των ιστών σε όλα τα στάδια και τακτικός έλεγχος τήρησης των κανόνων<sup>14</sup>.

2. Καθορισμός των αραιώσεων των αντισωμάτων με δοκιμές στο υλικό του συγκεκριμένου εργαστηρίου<sup>14</sup>.

3. Γνώση των δυνατοτήτων και του φάσματος της δράσης όλων των αντισωμάτων στα διάφορα νεοπλάσματα.

4. Οι αλγόριθμοι πρέπει να βασίζονται σε στατιστικές αναλύσεις της ειδικότητας και της ευαισθησίας των αντισωμάτων στα διάφορα νεοπλάσματα ώστε να μπορεί να καθορίζεται η σχετική αξία κάθε αποτελέσματος<sup>14</sup>.

5. Η σειρά της εφαρμογής μιας ομάδας ανοσοχρώσεων θα πρέπει να καθορίζεται από τις σχετικές στατιστικές τους αξίες, κινούμενη από το πλέον ειδικό αντίσωμα στο λιγότερο ειδικό.

6. Τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα πρέπει να ερμηνεύονται στα πλαίσια πολύ προσεκτικής μορφολογικής ανάλυσης και διαφορικής διάγνωσης. Η ανοσοϊστοχημεία δεν μπορεί να αντικαταστήσει την εμπειρία στη μορφολογική ανάλυση, που μαζί με το ιστορικό αποτελούν τη βάση της διάγνωσης<sup>14</sup>.

Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούμε πρέπει να διαθέτουν ελαστικότητα, τόσο σε καινούργια αντισώματα, όσο και σε νέες μεθόδους<sup>1</sup>.



Πίνακας 1. Διαγνωστικός αλγόριθμος. Αναπλαστικοί όγκοι [κερατίνη, βιμεντίνη, (κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο), S-100 πρωτεΐνη]

	Κερατίνη	(+)		
	Βιμεντίνη	(+)		Πιθανόν τεχνικό σφάλμα
	LCA	(+)		
	S-100	(+)		
	Κερατίνη	(+)		
	Βιμεντίνη	(-)	(+)	Πιθανόν κερκίνωμα (δυνατόν όγκος γεννητικών κυττάρων ή μεσοθηλίωμα)
	LCA	(-)		
	S-100	(-)	(+)	
	Κερατίνη	(-)		
	Βιμεντίνη	(+)		Πιθανόν λέμφωμα
Κερατίνη	LCA	(+)	(-)	
Βιμεντίνη	S-100	(+)	(-)	
LCA	Κερατίνη			
S-100	Βιμεντίνη	(+)		Πιθανόν μελάνωμα (δυνατόν λιποσάρκωμα)
	LCA	(-)		
	S-100	(-)		
	Κερατίνη	(+)		
	Βιμεντίνη	(+)		Πιθανόν σάρκωμα (δυνατόν σεμίνωμα)
	LCA	(-)		
	S-100	(-)		
	Κερατίνη	(-)		
	Βιμεντίνη	(-)		Πιθανόν τεχνικό σφάλμα
	LCA	(-)		
	S-100	(-)		

Immunomicroscopy, Taylor, Cote, 1994

## Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ (ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ)

Ο ρόλος της ανοσοϊστοχημείας έχει καταλυτική επίδραση τα τελευταία χρόνια στον θεραπευτικό χειρισμό του ασθενούς.


Η δυνατότητα ανίχνευσης της έκφρασης συγκεκριμένων αντιγόνων στα κύτταρα ποικίλων νεοπλασμάτων, επέτρεψε την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών, δηλαδή μονοκλωνικών αντισωμάτων που στρέφονται εναντίων αυτών των αντιγονικών μορίων.

Το πιο γνωστό ίσως παράδειγμα αποτελεί το αντιγόνο HER-2 (erbB2/neu), το οποίο υπερεκφράζεται στο 20-25% των

περιπτώσεων καρκίνου του μαστού<sup>30</sup>. Τα επίπεδα του HER-2 σχετίζονται με την πρόγνωση και την παθογένεση του καρκίνου του μαστού, έχουν υψηλότερες τιμές στα νεοπλασματικά παρά στα φυσιολογικά κύτταρα, και ανιχνεύονται τόσο στην πρωτοπαθή εντόπιση, όσο και στις μεταστατικές εστίες.

Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του HER-2 με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος αποτελεί πλέον ρουτίνα στα περισσότερα παθολογοανατομικά εργαστήρια. Οι ασθενείς με υψηλή έκφραση του μορίου λαμβάνουν ως θεραπεία το μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab (Herceptin; Genentech, South San Francisco, CA), το οποίο αναστέλλει την υπερέκφραση του HER-2<sup>30</sup>.

Πίνακας 2. Διαγνωστικός αλγόριθμος. Όγκοι με έκφραση κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου (LCA) και βιμεντίνης

		Αναπλαστικά λεμφώματα (μερικά) CD <sub>30</sub> , ALK-P <sub>80</sub>	
		Ανοσοβλαστικά λεμφώματα Β και Τ (CD <sub>20</sub> , CD <sub>3</sub> )	
		Ιστιοκυτταρικά λεμφώματα (μερικά)CD <sub>68</sub>	
		N. Hodgkin κλασικού τύπου (μεικτής κυτταροβρίθειας, οζώδης σκλήρυνση, λεμφοπενικός)	
LCA (+)	CD <sub>30</sub> (+)	Αναπλαστικά λεμφώματα ALK-P <sub>80</sub>	 CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> CD <sub>43</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> :CD <sub>43</sub> (n ull)
Κερατίνη (-)	CD <sub>20</sub> (+)	N. Hodgkin λεμφοεπικρατούντος τύπου EMA (+) (-)	
Βιμεντίνη (+)		Β μη Hodgkin λέμφωμα πλούσιο σε Τ λεμφοκύτταρα	
S-100 (-)		Κεντρολεμφοζιδιακό, CD <sub>10</sub> <sup>+</sup> λέμφωμα μανδύα CD <sub>5</sub> <sup>+</sup> , λεμφοκυτταρικό λέμφωμα CD <sub>5</sub> <sup>+</sup> , CD <sub>23</sub> <sup>+</sup> , οριακής ζώνης, CD <sub>79a</sub> , CD <sub>45</sub> RA, Burkitt CD <sub>10</sub> <sup>+</sup> , λεμφοβλαστικό Tdt <sup>+</sup>	
	CD <sub>20</sub> (-)	Ανοσοβλαστικό Β Πλασματοκύττωμα	}CD <sub>79a</sub>
	CD <sub>3</sub> (+)	Τ περιφερικό λέμφωμα	CD <sub>43</sub> <sup>+</sup>
		Τ λεμφοβλαστικό λέμφωμα Tdt	CD <sub>45</sub> RO <sup>+</sup>
	CD <sub>43</sub> (±)	Μυελογενής λευχαιμία MPO <sup>+</sup>	
	CD <sub>68</sub> (+)(KP <sub>1</sub> )	Κακοήθης ιστοκυττάρωση Ιστιοκυτταρικό λέμφωμα	

Immunomicroscopy, Taylor CR, Cote RJ, 1994 (τροποποιημένο)

Πίνακας 3. Διαγνωστικός αλγόριθμος. Όγκοι με έκφραση κυτοκερατινών

Κερατίνη (+)	Βιμεντίνη (+)	Μεσοθηλίωμα Ber <sub>4</sub> , CEA, CD <sub>15</sub> (LeuM <sub>1</sub> )
		{ Συνοβιακό και επιθηλιοειδές σάρκωμα Καρκίνωμα θυρεοειδούς (θηλώδες-θυλακιοκυτταρικό):Θυρεοσφαιρίνη <sup>+</sup> Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα
Κερατίνη (+)		Μικροκυτταρικό καρκίνωμα K8.18 <sup>+</sup> , NSE <sup>+</sup> , χρωμογρανίνη <sup>+</sup>
Βιμεντίνη (-)		{ Merkel καρκίνωμα K20 <sup>+</sup> NSE <sup>+</sup> , νευροϊνίδια <sup>+</sup>
LCA (-)		{ Εμβρυϊκό καρκίνωμα PLAP <sup>+</sup> , CD <sub>30</sub> <sup>+</sup>
S-100 (-)		Χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα CEA <sup>+</sup> , CD <sub>15</sub> (LeuM <sub>1</sub> ) <sup>+</sup>

Immunomicroscopy, Taylor CR, Cote RJ, 1994 (τροποποιημένο)

Ένα άλλο μόριο-στόχος για θεραπεία με μονοκλωνικό αντίσωμα αποτελεί η πρωτεΐνη του γονιδίου c-kit, το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης (Kit) στην κυτταρική μεμβράνη<sup>31</sup>. Μεταλλάξεις του γονιδίου, οι οποίες ενεργοποιούν την κινάση, ανιχνεύονται στο 57%-90% των στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού

(GISTs). Μεταλλάξεις με το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρούνται επίσης σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Η θετική ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης c-kit τόσο στα GISTs όσο και στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία αποτελεί την βασική προϋπόθεση για να χορηγηθεί στους ασθενείς το μονοκλωνικό αντίσωμα STI571 (Gleevec<sup>TM</sup>, imatinib mesy-

late; Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland) το οποίο είναι εκλεκτικός αναστολέας της Kit<sup>31</sup>.

Πίνακας 4. Διαγνωστικός αλγόριθμος. Όγκοι με έκφραση βιμεντίνης.

	LCA	(+)	
	Βιμεντίνη	(+)	Πιθανόν λέμφωμα ή λευχαιμία
	Ακτίνη	(+)	Μυογενείς όγκοι
	Δεσμίνη	(+)	Μυοσφαιρίνη, ΜγoD1, Μγf3, Μγf4(+): Ραβδομυοσάρκωμα
	Παράγων VIII	(+)	Αγγειοσάρκωμα, αγγειοενδοθηλίωμα, σάρ. Kaposi
	CD <sub>31</sub>	(+)	
	Λυσοζύμη	(+)(-)	
	α1 αντιχυμοθρυσίνη	(+)	Κακώθες ινώδες ιστιοκύττωμα
Βιμεντίνη (+)	CD <sub>68</sub>	(+)	
LCA (-)	NCAM	(+)	
Κερατίνη (-)	NSE	(+)	Νευροβλάστωμα
S-100 (-)	Συναπροφυσίνη	(+)	
	Νευροϊνίδια	(+)	
	NSE	(+)	
	Νευροϊνίδια	(+)	PNET/Ewing
	CD <sub>99</sub>	(+)	
	PLAP	(+)	Σεμίνωμα
	Φερριτίνη	(±)	
	S-100	(±)	Λιποσάρκωμα, χονδροσάρκωμα, νευρινοσάρκωμα
	S-100	(+)	Πιθανόν μελάνωμα
	Βιμεντίνη	(+)	

Immunomicroscopy, Taylor CR, Cote RJ, 1994 (τροποποιημένο)

Επίσης, αποτελεί ήδη αναπόσπαστο κομμάτι του θεραπευτικού χειρισμού, ο προδιορισμός έκφρασης της πρωτεΐνης EGFR στο μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, προκειμένου να χορηγηθεί στον ασθενή αντι-EGFR αγωγή (πχ, το μονοκλωνικό αντίσωμα C225, το μόριο-αναστολέας gefinitib κα.)<sup>32,33</sup>.

Η ανεύρεση καινούριων μορίων τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πιθανούς στόχους θεραπευτικής αγωγής με μονοκλωνικά αντισώματα, αποτελεί αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος παγκοσμίως.

Παραδείγματα αποτελούν αντιγόνα

όπως ο VEGF (vascular endothelial growth factor) και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (MMPs) σε όγκους του πνεύμονα<sup>34</sup>, η μεσοθηλίνη σε μεσοθηλίωμα καθώς και σε παγκρεατικούς και ωθηλικούς όγκους<sup>35</sup>, ο Hif-1α σε όγκους του νεφρού<sup>36</sup> κτλ. Η αξιόπιστη ανίχνευση όλων αυτών των αντιγόνων εναπόκειται στον παθολογοανατόμο, ο οποίος αναλαμβάνει έτσι καθοριστικό ρόλο στην απόφαση για τον θεραπευτικό χειρισμό του ασθενούς.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Chan JK. Advances in Immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol.* 17:170-177,2000

- 2) Mukai K, Rosai J. Applications of immunoperoxidase techniques in surgical pathology. In Wolff M, Fenoglio CM (eds): Progress in Surgical Pathology, vol1. New York, Masson Publishing USA, Inc., pp 15-99,1980
- 3) Rosai J. A consultant's apologia of immunohistochemistry. Appl Immunohistochem .2:229-230, 1994
- 4) Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Mosby. 9th Edition, vol 1, p 37-89, 2004
- 5) Avrameas S, Uriel J. Methode de marquage d'antigenes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. CR Acad Sci. 262:2543, 1966
- 6) Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J Histochem Cytochem 14:929, 1966
- 7) Silverberg S. G. Principles and Practice of surgical Pathology. Churchill-Livingstone. 2nd Edition. 1990
- 8) Jacobsen M, Jacobsen JK. The influence of various fixatives on the immunohistochemical demonstration of a number of plasma proteins and oncofetal proteins in paraffin embedded material. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A), 92:461-468, 1984
- 9) Larsson L. Tissue preparation methods for light microscopic immunohistochemistry. Appl immunohistochem. 1:2-16,1993
- 10) Mukai K, Yoshimura S, Anzai M. Effects of decalcification on immunoperoxidase staining. Am J Surg Pathol. 10: 413-419, 1986
- 11) Judkins AR, Montone KT, LiVolsi VA, van de Rijn M. Sensitivity and specificity of antibodies on necrotic tumor tissue. Am J Clin Path. 110:641-646, 1998
- 12) Ordonez NG, Brooks T, Tompson S, Batsakis JG. Use of *Ulex europaeus* agglutinin I in the identification of lymphatic and blood vessel invasion in previously stained microscopic slides. Am J. Surg. Pathol. 11:543-550, 1987
- 13) Chess Q, Hajdu SI. The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. Acta Cytol (Baltimore). 30:1-7, 1985
- 14) Domagala W, Lubonski J, Weber K, Osbom M. Intermediate filament typing of tumor cells in fine needle aspirates by means of monoclonal antibodies. Acta Cytol (Baltimore). 30:214-224, 1986
- 15) Li C-Y, Lazcano-Villareal O, Pierre RV, Yam LT. Immunohistochemical Identification of cells in serous effusions. Technical considerations. Am J Clin Pathol. 88:696-706, 1987
- 16) Herrera GA. Ultrastructural immunolabeling. A general overview of techniques and applications. Ultrastruct Pathol. 16:37-45, 1992
- 17) Mount SL, TaatjesDJ, von TurKovich M, Tindle BH, Trainer TD. Diagnostic immunoelectron microscopy in surgical pathology. Assessment of various tissue fixation and processing protocols. Ultrastruct Pathol. 17:547-556, 1993
- 18) Lundqvist M, Wilander E. A simple procedure for immunocytochemical- and silverstaining of endocrine cells in the same section. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A) 91: 493-494, 1983
- 19) Sternberger LA, ed. Immunocytochemistry. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1974
- 20) Dabbs David J. Diagnostic Immunohistochemistry. Churchill Livingstone, p 3-44, 2002
- 21) McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. Arch Pathol Lab Med.109:716-721, 1985
- 22) Gown A. de Weber N, Battifora H. Microwave-based antigenic unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. Appl Immunohistochem. 1:256-266, 1993
- 23) Momose J, Mehta P, Battifora J. Antigen retrieval by microwave irradiation in lead thiocyanate. Comparison with protease digestion retrieval. Appl immunohistochem. 1:69-76, 1993
- 24) Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happer-

- field L, Bobrow LG, Pharoah PD, Caldas C. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol.* 12:27-34, 2003
- 25) Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell-lines: opportunities and limitations. *Lab Invest.* 81:1331-1338, 2001
  - 26) Buffa R, Crivelli O, Fiocca R, Fontana P, Solcia E. Complement-mediated unspecific binding of immunoglobulins to some endocrine cells. *Histochemistry.* 63:15-21, 1979
  - 27) Carcangiu ML, Sibley RK, Rosai J. Clear cell change in primary thyroid tumors. A study of 38 cases. *Am J Surg Pathol.* 9:705-722, 1985
  - 28) Dranoff G, Bigner DD. A word of caution in the use of neuron-specific enolase expression in tumor diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 108:535, 1984
  - 29) Nadji M, Morales AR: Immunoperoxidase. Part II. Practical applications. *Lab Med.* 15:33, 1984
  - 30) Nahta Rita, Esteva Francisco J. HER-2-Targeted Therapy. Lessons Learned and Future Directions. *Clinical Cancer Research* Vol. 9: 5078-5084, 2003
  - 31) DeMatteo Ronald P. The GIST of Targeted Cancer Therapy: A Tumor (Gastrointestinal Stromal Tumor), a Mutated Gene (*c-kit*), and a Molecular Inhibitor (STI571). *Annals of Surgical Oncology* 9:831-839, 2002
  - 32) Pawel J. Gefinitib (Iressa, ZD1839): a novel targeted approach for the treatment of solid tumors. *Bull Cancer.* 91(5)-E70-6, 2004
  - 33) Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z. In vivo enhancement of tumor radioreponse by C225 antiperidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res.* 6:701-708, 2000
  - 34) Herbst Roy S. Targeted Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oncology.* Vol 16, No 9, Suppl 9, 2002.
  - 35) Hassan R., Bullock S., Kreitman R. J., Kindler H. L., Pastan I. Targeted therapy of mesothelin expressing mesotheliomas (MM), ovarian cancer (OC) and pancreatic cancer (PC): Results of phase I study of SS1(dsFv)PE38 (SS1P). SOURCE: *ASCO, 2004 Annual Meeting*
  - 36) Pantuck Allan J., Zeng Gang, Beldegrun Arie S., Figlin Robert A. Pathobiology, Prognosis, and Targeted Therapy for Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* Vol. 9, 4641-4652, October 15, 2003