

Η χρησιμοποίηση του "Thin Prep" στον προσδιορισμό των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης σε καρκίνο του μαστού

I.Σ. Κωστόπουλος¹, P. W-L Kwan²

Immunocytochemical determination of estrogen and progesterone receptors in breast cancer using "Thin prep processor"

I.S. Kostopoulos¹, P. W-L Kwan²

¹Pathology Department School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, GREECE, ²Pathology Department NEMC, Tufts University, School of Medicine, Boston MA, USA

The objective of this study is to develop an appropriate protocol of fixation in "Thin Prep" cytologic sample preparations from breast cancer for adequate immunocytochemical localization of ER/PR. Suspensions of MCF-7 BUS cultured cells, an estrogen sensitive human breast cancer cell line, were used to prepare a large series of Thin Prep slides. A part of slides subjected to a second fixation step using different fixatives as formalin/methanol/acetone or formalin only, while a third part of slides has not subjected any previous fixation step. A heat induced epitope retrieval step greatly enhanced the staining for the receptors.

In summary, it appears that the second fixation step in formalin/methanol/acetone and the heating procedure in citrate buffer permit a better qualitative and quantitative immunocytochemical evaluation of hormonal status. Once the cytologic sample was in the preservative solution, secondary fixation can be carried out up to seven days later without any damage on the cells. This protocol described here can be easily extended to clinical settings including fine needle aspirations and "brush preps" from breast tumors.

Key words: Thin Prep, MCF-7 BUS cultured cells, estrogen receptors, progesterone receptors, immunocytochemistry.

Ο σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός αποδοτικού πρωτοκόλλου μονιμοποίησης στα ετοιμασθέντα με "Thin prep" κυταρολογικά υλικά από

¹Εργαστήριο Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ, ²Pathology Department NEMC, Tufts University, School of Medicine, Boston MA, USA

Υποβλήθηκε: 14.3.2001
Εγκρίθηκε: 20.4.2001

καρκινώματα του μαστού, ώστε να επιτυγχάνεται ανοσοϊστοχημικά, η ανίχνευση των υποδοχέων ER/PR.

Υλικό και Μέθοδος: Για την προετοιμασία επαρκούς αριθμού πλακιδίων με τη συσκευή "Thin prep processor" χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργημένα, οιστρογονο-ευαίσθητα, καρκινικά κύτταρα της σειράς MCF-7 BUS συγκεντρωμένα εντός διατηρητικού διαλύματος (PreservCyt solution). Ένα μέρος των πλακιδίων μονιμοποιήθηκε επιπροσδέτως σε φορμόλη/μεθανόλη/ακετόνη, ένα άλλο ισάριθμο μέρος μόνο σε φορμόλη και το υπόλοιπο τρίτο μέρος δεν επιδέχθηκε καμμία περαιτέρω μονιμοποίηση. Επίσης έγινε χρήση υψηλής θερμοκρασίας για την καλύτερη ανάδειξη των επιτόπων.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι η μονιμοποίηση στη φορμόλη/μεθανόλη/ακετόνη και η χρήση υψηλής θερμοκρασίας προσφέρουν την πλέον αξιόπιστη ποιοτικά και ποσοτικά ανοσοϊστοχημική εκτίμηση των ER/PR. Από την άλλη μεριά το κυτταρολογικό υλικό μπορεί να διατηρείται εντός του διατηρητικού διαλύματος χωρίς καμμία κυτταρική αλλοίωση μέχρι και 7 ημέρες μετά την ημέρα λήψης, χρονικό περιδώριο που εξασφαλίζει την αποστολή του υλικού σε ειδικό κέντρο για να γίνει ο προσδιορισμός των ER/PR. Γίνεται σαφές ότι το πρωτόκολλο αυτό μπορεί να εφαρμοσθεί στην κλινική πράξη σε υλικό αναρρόφησης διά λεπτής βελόνης και σε υλικό ληφθέν με βούρτσα (brush preps) από όγκους του μαστού.

Λέξεις-κλειδιά: κυτταροκαλλιέργεια MCF-7 BUS, υποδοχείς οιστρογόνων, υποδοχείς προγεστερόνης, ανοσοϊστοχημεία

Ο προσδιορισμός των ορμονικών υποδοχέων σε καρκινώματα του μαστού αποτελεί σήμερα πρακτική ρουτίνας πριν οποιαδήποτε θεραπευτική αντιμετώπιση. Σε όλα τα εγχειρητικά παρασκευάσματα του μαστού, ακόμη και σε υλικό ληφθέν με βελόνη (core biopsy) που περιλαμβάνουν καρκινωμάτωδη κύτταρα γίνεται προσδιορισμός των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR) με βιοχημική μεθοδολογία και κυρίως με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές σε τομές ψυκτικού μικροτόμου και ιδιαίτερα σε μόνιμες τομές παραφίνης^{1,2}. Το υλικό αναρρόφησης με λεπτή βελόνη (FNA) είναι ελάχιστο και μάλλον ανεπαρκές για βιοχημικό προσδιορισμό των ER/PR³, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανοσοϊστοχημικό προσδιορισμό των ορμονικών υποδοχέων μετά από προετοιμασία σε κυτταρικά εντυπώματα⁴ ή έγκλειση σε παραφίνη (cell blocks). Με την τεχνική "Thin Prep process" ήτοι προετοιμασία κυτταρικών εντυπωμάτων από κυτταρικά εναιωρήματα (υλικό σε υγρή φάση) και χρησιμοποιώντας τη συσκευή Thin Prep processor (Cytoc Corporation, Marlborough, MA) προετοιμάζονται πολύ καλύτερης ποιότητας κυτταρικά εντυπώματα⁵. Η νέα αυτή τεχνική βασίζεται στην αυτοματοποιημένη απευθείας μεταφορά των κυττάρων από το κυτταρικό εναιώρημα στην

επιφάνεια των πλακιδίων μέσω ενός ειδικού μεμβρανικού φίλτρου. Με τον τρόπο αυτόν επιτυγχάνονται μονοεπίπεδα κυτταρικά εντυπώματα, τα οποία προσφέρουν ευκρινέστερη μικροσκοπική εικόνα σε σύγκριση με τα εντυπώματα που προετοιμάζονται με παραδοσιακές μεθόδους⁵⁻⁷.

Η χρησιμοποίηση της συσκευής "Thin Prep processor" σε κυτταρολογικά υλικά για τον προσδιορισμό των υποδοχέων ER/PR καθιστά αναγκαίο τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθοδολογίας σε συνδυασμό με τις παραμέτρους που φαίνεται ότι παίζουν δυναμικό ρόλο στη διατήρηση/ανάδειξη των ανιχνευόμενων αντιγονικών επιτόπων. Η κατάλληλη μονιμοποίηση των κυτταρικών εναιωρημάτων/εντυπωμάτων, η χρησιμοποίηση μεθόδου ανάδειξης των αντιγονικών δέσεων μετά από έκθεση των εντυπωμάτων σε υψηλή θερμοκρασία (HIER, Heat Induced Epitopes Retrieval) και οι παρεμβαλλόμενοι χρόνοι μεταξύ της λήψης/παραλαβής του κυτταρολογικού υλικού και της εκτέλεσης της ανοσοχρώσης φαίνεται να σχετίζονται τόσο ποσοτικά, όσο και ποιοτικά με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των υποδοχέων ER/PR. Στην παρούσα εργασία εφαρμόσαμε την τεχνική "Thin Prep process" σε εναιωρήματα καρκινικών κυττάρων MCF-7 BUS και

έγινε συγκριτική μελέτη μεταξύ ορισμένων πρωτοκόλλων μονιμοποίησης και της χρήσης ή μη της μεθόδου HIER με σκοπό την καλύτερη ανοσοϊστοχημική ανάδειξη των υποδοχέων ER/PR.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταρική σειρά MCF-7 BUS

Η κυτταρική σειρά MCF-7 BUS αντιπροσωπεύει καλλιέργεια νεοπλασματικών κυττάρων, οιστρογόνο-ευαίσθητων από γνωστό καρκίνωμα μαστού.

Η καλλιέργεια των κυττάρων MCF-7 BUS αναπτύχθηκε σε μέσον επώασης, τύπου Dulbecco's modification Eagle's medium (DME, GIB Co, Grand Island, NY) με την προσθήκη και εμβρυϊκού βόιου ορού (FBS, Hyclone Logan, Utah) σε θερμοκρασία 37°C με κεκορεσμένη υγρασία και υπό πίεση 1 ατμόσφαιρας 95% αέρος και 5% CO₂.

Σαρανταοκτώ ώρες πριν ολοκληρωθεί η επώαση των κυττάρων εξήχθησαν οι ήδη υπάρχουσες στο μέσον επώασης ποσότητες οιστρογόνων με τη μέθοδο "εξάιρεσης στεροειδών με ανδρακούχο δεξτράνη"⁸.

Κατόπιν τα κύτταρα αποκολλήθηκαν και τέθηκαν υπο μορφή εναιωρήματος σε 1 ml αλατούχου φωσφορικού διαλύματος (PBS). Μία μικρή ποσότητα (50ml) χρησιμοποιήθηκε για τη καταμέτρηση των κυττάρων με μετρητή Coulter. Ο αριθμός των κυττάρων κυμαινόταν από 3 έως 6,5 εκατομμύρια κύτταρα ανα ml^{8,9}.

Προετοιμασία και μονιμοποίηση των κυτταρικών εντυπωμάτων

Το αρχικό σε 1 ml PBS εναιώρημα με τα κύτταρα MCF-7 BUS αναμείχθηκε σε διάλυμα 20 ml PreservCyt solution που εμπεριέχει ως βασικό συνδετικό EDTA (Cytoc Corporation, φιαλίδια των 20 ml). Τα κύτταρα αφού παρέμειναν στο παραπάνω διάλυμα για 2 ώρες χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία 54 συνολικά εντυπωμάτων (πλακίδια) με τη συσκευή "Thin Prep processor". Κατόπιν τούτου τα 18 από τα 54 πλακίδια μονιμοποιήθηκαν διαδοχικά σε 10% φορμόλη για 10', σε απόλυτη μεθανόλη για 5' και σε ακετόνη για άλλα 5' με ενδιάμεσα διάρκειας 5' ξεπλύματα σε PBS. Δεκαοκτώ (18) πλακίδια μονιμοποιήθηκαν μόνο σε φορμόλη για 10', ενώ τα άλλα 18 πλακίδια δεν επιδέχθηκαν περαιτέρω μονιμοποίηση εκτός της αρχικής παραμονής τους στο

διάλυμα PreservCyt solution. Την ίδια ημέρα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημική χρώση για τους υποδοχείς ER/PR 6 πλακίδια από κάθε σειρά των 18 πλακιδίων. Στα 4 πλακίδια, εκ των οποίων τα 2 χρησίμευσαν ως αρνητικοί μάρτυρες της ανοσοχρώσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HIER, ενώ στα υπόλοιπα 2 δεν έγινε έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία.

Τα εναπομείναντα 36 συνολικά πλακίδια, 12 από κάθε σειρά, διατηρήθηκαν σε PBS στους 40C και χρησιμοποιήθηκαν ανα 18 (6+6+6) για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των υποδοχέων ER/PR με την ίδια μεθοδολογία σε δύο διαφορετικούς αυθαίρετα επιλεγμένους χρόνους, ήτοι μετά παρέλευση 3 και 6 ημερών (4η και 7η ημέρα αντίστοιχα) από την ημέρα της προετοιμασίας των εντυπωμάτων. Το εναιώρημα των κυττάρων MCF-7 BUS εντός του διαλύματος PreservCyt solution διατηρήθηκε σε ψυγείο, στους 4°C, για 1 εβδομάδα. Στο μέσον και στο τέλος της εβδομάδας 4η και 7η ημέρα αντίστοιχα, το εναιώρημα χρησιμοποιήθηκε εκ νέου για την προετοιμασία άλλων πλακιδίων με την τεχνική "Thin Prep process". Στις συγκεκριμένες ημέρες και αφού έγινε η μονιμοποίησή σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται παραπάνω για τις πρώτες σειρές πλακιδίων ακολούθησαν με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.

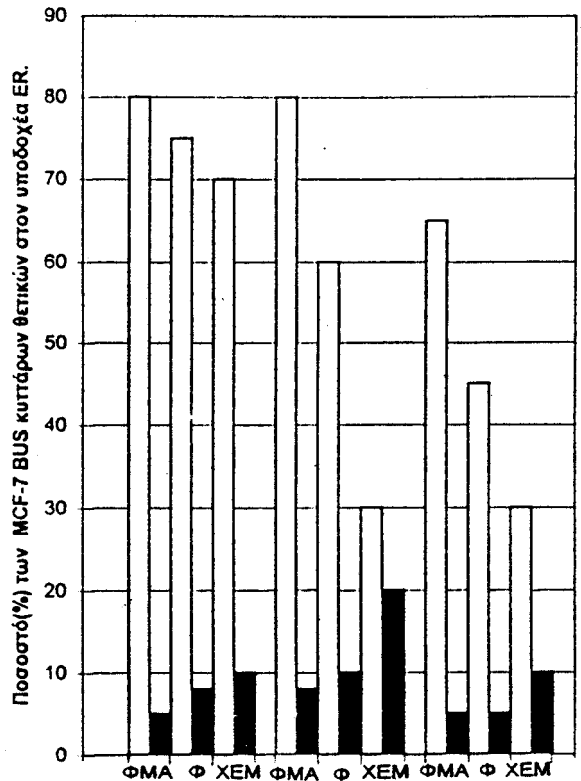
Ανοσοϊστοχημεία

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης, όπως περιγράφηκε από τους Hsu και συν¹⁰. Πριν από την εκτέλεση της ανοσοχρώσης τα 36 πλακίδια εκτέθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για την ανάδειξη των επιτόπων (μέθοδος HIER)¹¹. Για τον λόγο αυτόν τα πλακίδια εμβυθίστηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος 10 mM με pH 6.0 και τοποθετήθηκαν σε μία οικιακή συσκευή τύπου "ατμόμαγειρα" (steamer, Sunbean Oster Household Products, Schaumburg IL) όπου και αναπτύχθηκε υψηλή θερμοκρασία 100°C για 20'. Κατόπιν και αφού μηδενίστηκε η θερμοκρασία αυτά παρέμειναν εντός του κιτρικού διαλύματος και της συσκευής για ακόμη 20' σε περιβάλλον προοδευτικής πτώσης της θερμοκρασίας. Μετά από ξέπλυμα σε PBS τα παραπάνω πλακίδια μαζί με τα υπόλοιπα που δεν εκτέθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των υποδοχέων ER/PR. Η διαδικασία περιελάμ-

βανε εμβύδιση των πλακιδίων για 15' σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% και μεθανόλης 100% σε αναλογία 1:4 για την εξουδετέρωση της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Επώαση των εντυπωμάτων, μετά από ξέπλυμα με PBS, με μερικές σταγόνες διαλύματος καζεΐνης (Power Block, BioGenex, San Ramon, CA) για 5' για τη μείωση της μη ειδικής χρωστικής αντίδρασης. Ξέπλυμα των εντυπωμάτων με PBS και επώαση με τους ειδικούς αντιορούς για 18h (over night) σε υγρό περιβάλλον και σε θερμοκρασία 4°C. Ο ειδικός αντιορός έναντι των υποδοχέων ER (κλώνος 1D5) ήταν της DAKO και χρησιμοποιήθηκε στην αραιώση 1:50. Ο ειδικός αντιορός έναντι των υποδοχέων PR (κλώνος 1A6) ήταν της BioGenex και χρησιμοποιήθηκε στην αραιώση 1:10. Ως δετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν περιπτώσεις καρκινωμάτων του μαστού, γνωστές εκ των προτέρων ως δετικές στους ορμονικούς υποδοχείς. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν εντυπώματα από τη δική μας σειρά πλακιδίων στα οποία παραλείφθηκαν οι ειδικοί αντιοροί. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τις παρακάτω φάσεις: χρησιμοποίηση του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης και του χρωμογόνου της διαμινοβενζιδίνης, χρώση με αιματοξυλίνη, αφυδάτωση σε διαβαθμισμένα οινόπνευμα, διαύγαση με ξυλόλη και επικάλυψη με Cytoseal (Stephens Scientific, Riverdale, NY).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

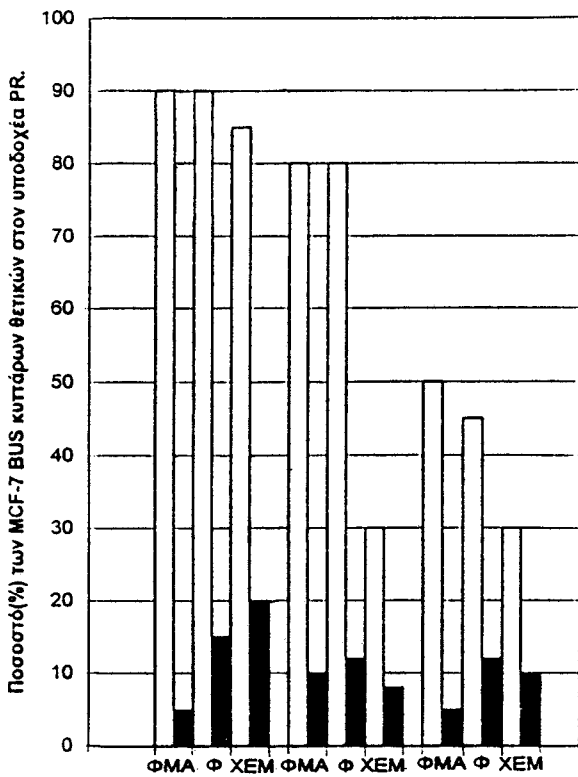
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των υποδοχέων ER/PR τόσο στις τομές παραφίνης από επιλεγμένα καρκινώματα του μαστού (δετικοί μάρτυρες) όσο και στα κύτταρα MCF-7 BUS (Thin Prep process) εμφανίζεται μέσω της χρωστικής αντίδρασης του προϊόντος της διαμινοβενζιδίνης στους πυρήνες των κυττάρων. Η καταμέτρηση του ποσοστού των δετικών στους υποδοχείς ER/PR κυττάρων έγινε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές (IK, PK). Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα απεικονίζονται στα διαγράμματα 1, 2, 3, 4. Αναλυτικά, στην ομάδα των πλακιδίων που ετοιμάστηκαν κατά την ημέρα λήψης του υλικού και εφαρμόσθηκαν διαδοχική μονιμοποίηση σε φορμόλη/μεθανόλη/ακετόνη και η μέθοδος HIER, το ποσοστό των δετικών κυττάρων στον υποδοχέα ER αντίστοιχα προς τις διαφορετικές ημέρες εκτέλεσης της ανοσοχρώσης ήταν 80% κατά την 1η



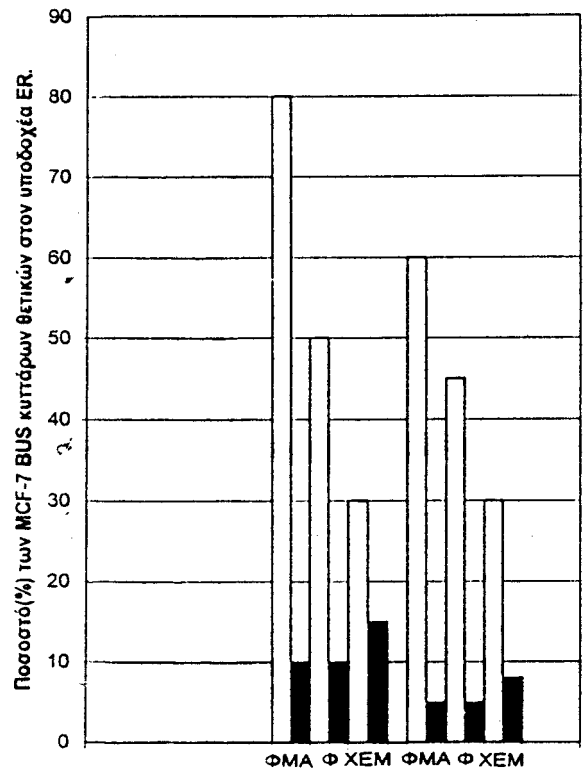
Διαγράμμα 1. Εντυπώματα με Thin Prep process κατά την ημέρα παραλαβής των κυττάρων, άμεση μονιμοποίηση και ανοσοχρώσεις τις ημέρες 1η, 4η και 7η.

και 4η ημέρα και 65% την 7η ημέρα (Εικόνα 1α-β). Τα ποσοστά των κυττάρων των δετικών στον υποδοχέα PR ήταν για τις αντίστοιχες ημέρες 90, 80 και 50% (Εικόνα 2αβ).

Τα εντυπώματα που ετοιμάστηκαν την ίδια ημέρα αλλά μονιμοποιήθηκαν μόνο σε φορμόλη και εκτέθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία (μέθοδος HIER) παρουσίασαν για τις αντίστοιχες ημέρες συγκριτικά χαμηλότερα ποσοστά όσον αφορά τον υποδοχέα ER, ήτοι 75%, 60% και 45% με τη μεγαλύτερη διαφορά (μείωση κατά 20 μονάδες) να σημειώνεται την 4η ημέρα, ενώ για τον υποδοχέα PR τα ποσοστά κυμάνθηκαν στα ίδια περίπου επίπεδα με την προηγούμενη ομάδα πλακιδίων και με τις ακόλουθες τιμές: 90%, 80% και 45%. Από την άλλη μεριά τα κυτταρικά εντυπώματα που δεν επιδέχθηκαν επιπρόσθετη μονιμοποίηση πέραν της αρχικής τους παραμονής στο διάλυμα PreservCyt solution και εκτέθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία έδειξαν κύτταρα δετικά σε ποσοστά σαφώς μειωμένα, ιδιαίτερα κατά τις ημέρες 4η και 7η με



Διαγράμμα 2. Εντυπώματα με Thin Prep process κατά την ημέρα παραλαβής των κυττάρων, άμεση μονιμοποίηση και ανοσοχρώσεις τις ημέρες 1η, 4η και 7η.



Διαγράμμα 3. Διατήρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε PreservCyt solution, μονιμοποίηση και ανοσοχρώσεις τις ημέρες 1η, 4η και 7η.

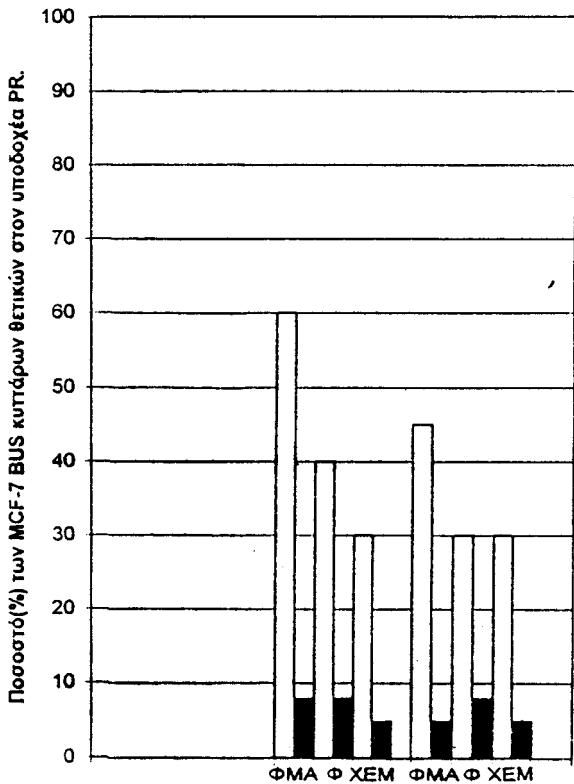
τιμές 70%, 30%, 30% για τον υποδοχέα ER και 85%, 30%, 30% για τον υποδοχέα PR (Διάγραμμα 1, 2).

Τα ποσοστά δεικτών κυττάρων στους ορμονικούς υποδοχείς σχετικά με τα πλακίδια που ετοιμάστηκαν από το ίδιο κυτταρικό εναιώρημα, αλλά μετά παρέλευση 3 και 6 ημερών αντίστοιχα από την ημέρα παραλαβής του υλικού ήταν ανεξαρτήτως πρωτοκόλλου μονιμοποίησης χαμηλά για τον υποδοχέα PR και χωρίς αποκλίσεις για τον υποδοχέα ER συγκριτικά με εκείνα που ετοιμάστηκαν και μονιμοποιήθηκαν ακριβώς την ημέρα παραλαβής του κυτταρολογικού υλικού.

Συγκεκριμένα η ομάδα των πλακιδίων με μονιμοποίηση σε φορμόλη/μεθανόλη/ακετόνη και έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία έδειξε κύτταρα δεικτικά στον υποδοχέα ER σε ποσοστό 80% την 4η ημέρα και 60% την 7η ημέρα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τον υποδοχέα PR ήταν 60% και 45%. Στην ομάδα αυτή η μεγαλύτερη απόκλιση διαπιστώθηκε για τον υποδοχέα PR και μάλιστα κατά την 4η ημέρα με τιμή χαμη-

λότερη κατά 20 μονάδες από την αντίστοιχη τιμή της ομάδας των πλακιδίων που είχε το ίδιο πρωτόκολλο μονιμοποίησης αλλά ετοιμάστηκε και μονιμοποιήθηκε την ημέρα παραλαβής του κυτταρολογικού υλικού. Ομοίως χαμηλά ποσοστά δεικτών κυττάρων για τον υποδοχέα PR (40% κατά την 4η ημέρα, 30% την 7η ημέρα) παρατηρήθηκαν και στα πλακίδια που μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη. Εδώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κυρίως την 4η ημέρα με τιμή στο μισό της αντίστοιχης τιμής των πλακιδίων που ετοιμάστηκαν και μονιμοποιήθηκαν την ημέρα της παραλαβής του υλικού. Η μείωση που παρατηρήθηκε την 7η ημέρα ήταν 15 μονάδες. Σχετικά με τον υποδοχέα ER παρατηρήθηκε μικρή απόκλιση περίπου 10 μονάδων κατά την 4η ημέρα. Πολύ χαμηλά ποσοστά για αμφότερους τους υποδοχείς γύρω στο 30% παρατηρήθηκαν στην ομάδα των πλακιδίων που δεν επιδέχθηκε επιπρόσθετη μονιμοποίηση, τόσο κατά την 4η, όσο και κατά την 7η ημέρα.

Από την άλλη μεριά στα εντυπώματα που δεν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HIER, ανε-



Διαγράμμα 4. Διατήρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε PreservCyt solution, μονιμοποίηση και ανοσοχρώσεις τις ημέρες 1η, 4η και 7η.

ξαρτήτως του πρωτοκόλλου μονιμοποίησης που εφαρμόσθηκε, τα ποσοστά θετικών κυττάρων για τους υποδοχείς ER/PR ήταν εντελώς χαμηλά (5-20%) και η χρωστική αντίδραση ασθενής σε αντιδιαστολή με τα υψηλά ποσοστά θετικών κυττάρων και την έντονη χρωστική αντίδραση που παρατηρήθηκαν στα πλακίδια στα

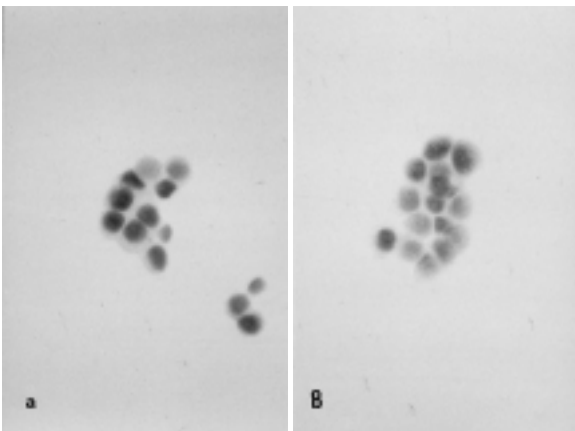
οποία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HIER.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

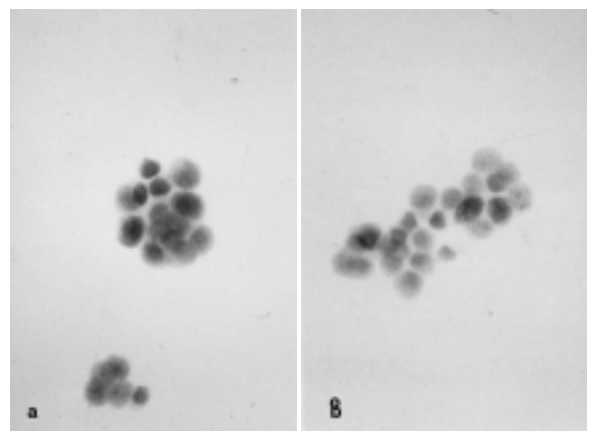
Η τεχνική "Thin Prep process" είναι μία νέα τεχνική προετοιμασίας του κυτταρολογικού υλικού, η οποία φαίνεται να είναι η περισσότερο αποδοτική τεχνική στη διαγνωστική κυτταρολογία. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται υπαγορεύει ως βασική προϋπόθεση τη μεταφορά του κυτταρολογικού υλικού σε φιαλίδια με διατηρητικό διάλυμα (preservative solution) ώστε να επιτυγχάνεται η προπαρασκευή ενός κυτταρικού εναιωρήματος (υγρή φάση) προσδίδοντας στα κύτταρα ομοιογενή κατανομή. Η συσκευή "Thin Prep processor" λειτουργεί με αναρρόφηση του κυτταρικού εναιωρήματος, συλλογή των κυττάρων σε πολυανθρακούχο ηδμό (polycarbonate filter) και αυτοματοποιημένη μεταφορά των κυττάρων στην επιφάνεια ενός πλακιδίου.

Από την κλινική έρευνα έχει φανεί ότι η χρησιμοποίηση της τεχνικής "Thin Prep process" στη διαγνωστική κυτταρολογία μειώνει κατά 4 φορές τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ακόμη και όταν το υλικό που προσφέρεται είναι ότι έχει απομείνει μετά την αρχική χρησιμοποίηση του για τη συνήδη προπαρασκευή των επιχρισμάτων^{6,12,13}.

Οι Hutchinson και συν.⁶ συγκρίνοντας τα μικροσκοπικά ευρήματα μεταξύ των κλασσικών επιχρισμάτων και των μονοεπίπεδων εντυπωμάτων που παρασκευάζονται με τη συσκευή "Thin Prep processor" χρησιμοποιώντας το ίδιο κυτταρολογικό υλικό (αρχικά έγινε η προπαρασκευή των απλών επιχρισμάτων και ακολού-



Εικόνα 1α-β.



Εικόνα 2α-β.

δησε από το υπόλοιπο του υλικού η ετοιμασία των μονοεπίπεδων εντυπωμάτων) έδειξαν ότι τα πλακίδια με τα μονοεπίπεδα εντυπώματα είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά μιας ενδεχόμενης ιστικής αλλοίωσης από ότι είναι τα απλά επιχρίσματα. Τούτο καθιστά την τεχνική "Thin Prep process" αναπαραγωγίμη, ενώ τη συμβατική προετοιμασία των απλών επιχρισμάτων μειονεκτική, αφού δεν εκπροσωπεί πλήρως τον κυτταρικό πληθυσμό του δείγματος.

Η συνεχώς αυξανόμενη χρήση της τεχνικής της αναρρόφησης δια λεπτής βελόνης (FNA) στη διαγνωστική ογκολογία επέφερε την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας γενικώς στα κυτταρικά επιχρίσματα, σε υλικό κυτταροφυγοκέντρησης και σε κυτταρολογικό υλικό εγκλεισθέν σε παραφίνη (cell blocks)¹⁴⁻¹⁷. Με την εφαρμογή της τεχνικής "Thin Prep process" παρατηρείται σημαντική ποιοτική βελτίωση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων στα κυτταρικά επιχρίσματα. Κατά την προετοιμασία των συμβατικών κυτταρικών επιχρισμάτων συσσωρεύεται ή παγιδύεται πρωτεϊνικό υλικό γύρω από τα κύτταρα, το οποίο και εμποδίζει την εισχώρηση των αντισωμάτων στα κύτταρα. Με την τεχνική "Thin Prep process" και τη χρησιμοποίηση του διαλύματος PreservCyt solution, αφενός διατηρούνται καλά οι αντιγονικοί επίτοποι, αφετέρου μειώνεται αισθητά η καθίζηση του πρωτεϊνικού υλικού μεταξύ των κυττάρων. Η τεχνική "Thin Prep process" είναι απλή, γρήγορη και επιτρέπει την ανίχνευση ευρείας σειράς, αντιγόνων. Από την άλλη μεριά επιτυγχάνονται πολύ καλά ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας τα αντισώματα σε υψηλές αραιώσεις.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η ανοσοϊστοχημική αναζήτηση των υποδοχέων ER/PR στη κυτταρική σειρά MCF-7BUS με τη χρησιμοποίηση της συσκευής "Thin prep processor", την επιπρόσδετη μονιμοποίηση των εντυπωμάτων σε ΦΜΑ ή σε Φ και τη χρήση της μεθόδου HIER έδειξαν τα ακόλουθα: Η μέθοδος HIER φαίνεται να αποτελεί την πιο ουσιαστική παράμετρο στην ανάδειξη των αντιγονικών επιτόπων με αποτέλεσμα εξαιρετικά υψηλά ποσοστά δετικών κυττάρων σε αμφότερους τους υποδοχείς. Τα υψηλότερα ποσοστά όπως αυτά προκύπτουν στα αντίστοιχα διαγράμματα τόσο για τους υποδοχείς ER, όσο και για τους PR αποδίδονται εκτός της χρήσης της μεθόδου HIER και στην επιπρόσδετη μονιμοποίηση καθώς και στην άμεση εκτέλεση της ανοσοχρώσης μετά τη λήψη/παραλαβή του υλικού (1 ημέρα). Ένα

από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής "Thin Prep process" είναι η διατήρηση του κυτταρολογικού υλικού υπο μορφή εναιωρήματος στο ειδικό διάλυμα PreservCyt solution, παρ' όλο που στη μελέτη μας χαμηλά ποσοστά δετικών κυττάρων στους ορμονικούς υποδοχείς σημειώνονται στα κυτταρικά εναιωρήματα με το ανωτέρω διάλυμα, στα οποία όμως δεν έγινε καμία άλλη επιπρόσδετη μονιμοποίηση. Τα χαμηλά ποσοστά παρατηρούνται στα πλακίδια που χρωματίστηκαν κατά την 4η και 7η ημέρα μετά την ημέρα λήψης/παραλαβής του υλικού και δεν σχετίζονται με τη χρονική στιγμή κατά την οποία έγινε η προετοιμασία των πλακιδίων. Εν αντιθέσει επισημαίνεται ο σημαντικός ρόλος της επιπρόσδετης μονιμοποίησης του κυτταρολογικού υλικού με ΦΜΑ ή και με Φ αφού τα ποσοστά δετικών κυττάρων είναι ιδιαίτερα υψηλά κατά την 4η και 7η ημέρα συγκριτικά με εκείνα των εντυπωμάτων που δεν επιδέχθηκαν επιπρόσδετη μονιμοποίηση. Η επιπρόσδετη μονιμοποίηση με ΦΜΑ προσφέρει τα καλύτερα ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα στον ανοσοϊστοχημικό προσδιορισμό των υποδοχέων ER/PR στο κυτταρολογικό υλικό, το οποίο παρέμεινε για ορισμένο χρονικό διάστημα σε υγρή φάση εντός του διαλύματος PreservCyt solution. Οι διαφορές στα ποσοστά των δετικών κυττάρων είναι μικρές στα κυτταρικά εναιωρήματα, τα οποία είχαν μεν διαφορετική μονιμοποίηση, αλλά προετοιμάστηκαν και χρωματίστηκαν αμέσως μετά τη λήψη του υλικού.

Σχετικά με τη διατήρηση της αντιγονικότητας των νεοπλασματικών κυττάρων καθοριστικό ρόλο φαίνεται να παίζει ο χρόνος που μεσολαβεί από την ημέρα λήψης/παραλαβής του υλικού μέχρι την ημέρα εκτέλεσης της ανοσοχρώσης. Μέχρι και παρέλευση 3 ημερών δεν παρατηρείται σημαντική έκπτωση της αντιγονικότητας. Κατά τις επόμενες ημέρες παρατηρείται σταδιακή έκπτωση με τη μεγαλύτερη μείωση του ποσοστού δετικών κυττάρων μετά την παρέλευση 6 ημερών.

Τα ευρήματά μας καταδεικνύουν ότι το κυτταρολογικό υλικό (FNA) από μαστό αφού τεθεί αμέσως μετά τη λήψη σε διάλυμα PreservCyt solution η επιπρόσδετη μονιμοποίηση με ΦΜΑ μπορεί να γίνει σε ένα χρονικό διάστημα όχι πέραν των 7 ημερών χωρίς να υπάρξουν ουσιαστικά προβλήματα στην απόδοση των ανοσοχρώσεων. Αυτό είναι μέγα πλεονέκτημα για τον προσδιορισμό των υποδοχέων

ER/PR σε κυτταρολογικά υλικά αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανοσοϊστοχημική μελέτη των ως άνω υποδοχέων το υπόλοιπο του υλικού μετά τη χρησιμοποίηση μέρους αυτού για την κυτταρολογική διάγνωση χωρίς να απαιτείται νέα βιοψία. Εξ'άλλου το γεγονός αυτό φαίνεται να διευκολύνει τη διακίνηση υλικών αναρρόφησης δια λεπτής βελόνης ή ληφθέντων με βούρτσα (brush preps) από όγκους του μαστού από περιφερικά Νοσοκομεία σε διαγνωστικά κέντρα με έμπειρο προσωπικό όσο αφορά τη διάγνωση της νόσου αλλά και κυρίως την αξιολόγηση των ορμονικών δεικτών.

Ευχαριστούμε θερμά τους Drs Ana Soto και Carlos Sonnenschein από το Εργαστήριο της Ανατομίας και Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου TUFTS (Boston MA) για την ευγενική προσφορά τους, όσες φορές χρειάστηκε στη διάρκεια της μελέτης μας, τόσο σε υλικό που χρησιμοποιήσαμε, όσο και υπο μορφή επιστημονικών συμβουλών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tesch M, Shawwa A, Henderson P, Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor status in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 99:8-12, 1993
2. Wilbur DC, Willis J, Mooney RA, Fallon MA, Moynes R, di Sant' Agnese PA. Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from breast carcinoma: a comparison in immunohistochemistry with the dextran-coated charcoal assay. *Mod Pathol* 5: 79-84, 1992
3. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim YD, Braithwaite L, Schneider F, Braverman AS, Axiotis C. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222 Spy in frozen sections of cytosol-based ligand-binding assays. *Am Cancer Society* 77: 2514-2519, 1996
4. Deligeorgi-Politi H, Bartziota EV, Maurogeorgis A, Sekeris CE. Determination of estrogen receptors in cytologic imprints of breast cancer using immunocytochemical methods. *Acta Cytol* 34(6):881-884, 1990
5. Hutchinson ML, Isestein LM, Goodman A, Hurley AA, Douglass L, Mui KK, Patten FW, Zahniser DJ. Homogeneous sampling accounts for the increased diagnostic accuracy using the Thin Prep processor. *Am J Clin Pathol* 101: 215-219, 1994
6. Hutchinson ML, Cassin CM, Ball HG: The efficacy of an automated preparation device for cervical cytology. *Am J Clin Pathol* 96:300-305, 1991
7. Hutchinson ML, Agarwal P, Denault T, Berger B, Cibas ES. A new look at cervical cytology: Thin Prep Multi center results. *Acta Cytol* 36:449-504, 1992
8. Soto AM, Lin TM, Justicia F, Silvia RM and Sonnenschein C. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-Screen). In: *Chemically Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection*. ed. T. Colborn and C.R. Clement. Princeton Scientific Pub. Co. 295-309, 1992
9. Soto AM and Sonnenschein C. The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J. Steroid Biochem.* 23:87-94, 1985
10. Hsu SM, Raine L, Franger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique. *J. Histochem Cytochem* 29:577, 1981
11. Taylor CR, Shi SR, Cote RJ. Antigen Retrieval for immunohistochemistry. Status and need for greater standardization. *Appl Immunohistochem* 4(3): 144-166, 1996
12. Hutchinson ML, Agarwal P, Denault T, Berger B, Cibas ES. A new look at cervical cytology: Thin Prep Multi-Center results. *Acta Cytol* 36: 499-504, 1992
13. Wilbur DC, Cibas ES, Merritt S, James LP, Berger BM, Bonfiglio TA. Thin Prep processor I: Clinical trials demonstrate an increased detection rate of abnormal cervical cytologic specimens. *Am J Clin Pathol* 101 (2): 209-214, 1994
14. Nadji M, Ganjei P. Special report. Immunocytochemistry in diagnostic cytology. A 12-year perspective. *Am J Clin pathol* 94(4):470-475, 1990
15. Brown DC, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY. Immunocytochemical analysis of cytocentrifuged fine-needle aspirates. A study based on lung tumours aspirates in vitro. *Anal Quant Cytol Histol* 11: 140-145, 1989
16. Dormagala W, Markiewski M, Tuziak T. Kram A, Weber K, Osborn M. Immunocytochemistry on fine-needle aspirates in paraffin miniblocks. *Acta Cytol* 34:291-296, 1990
17. Leung SW, Bedard YC. Simple miniblock-technique for cytology. *Mod Pathol* 6(5):630-632, 1993.

Corresponding author

Ioannis S. Kostopoulos

Department of Pathology

School of Medicine

Aristotle University of Thessaloniki

54006 Thessaloniki