

## Ανοσοεντόπιση της κυτοκερατίνης 8 σε πορογενή διηθητικά καρκινώματα του μαστού σε ημίλεπτες τομές εποξικών ρητινών

Σ. Χαβάκη,<sup>1</sup>  
Ε. Μπαητατζή-Βοηουδάκη,<sup>2</sup>  
Ο. Δαφνή,<sup>3</sup>  
Ν. Γούτας,<sup>1</sup>  
Δ.Λ. Αρβανίτης,<sup>4</sup>  
Χρ. Κίττας,<sup>1</sup>  
Ε. Μαρίνος<sup>1</sup>

**ΣΚΟΠΟΣ** Οι κυτοκερατίνες ανήκουν στα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων. Ο συνδυασμός των κυτοκερατινών που εκφράζονται σε ένα επιθήλιο είναι ειδικός για το συγκεκριμένο είδος επιθηλίου. Η κυτοκερατίνη 8 (Κ8) εκφράζεται κυρίως στα απλά επιθήλια, όπως στα κύτταρα του πόρου του μαζικού αδένα, καθώς και στα αντίστοιχα νεοπλάσματα. Η Κ8 φαίνεται να εμπλέκεται στην ενίσχυση της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων μαστού *in vitro*. Έχει εντοπιστεί, σε καλλιέργεια, στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, καθώς και στο καλλιεργητικό μέσο. Με βάση το γεγονός ότι η ακριβής κατανομή και λειτουργία της Κ8 *in vivo* δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανοσοϊστοχημική μελέτη, σε επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου, της κατανομής της Κ8 σε ημίλεπτες τομές εποξικών ρητινών πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού, με την προοπτική της λεπτομερούς μελέτης της σε επίπεδο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (ΗΜ). Επίσης, εξετάστηκε ο ρόλος της Κ8 ως προγνωστικού παράγοντα στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Μελετήθηκαν 9 περιπτώσεις διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων μαστού και 4 περιπτώσεις ινοαδενωμάτων. Από κάθε περίπτωση, μικρά τεμάχια φρέσκου ιστού μονιμοποιήθηκαν, αφυδατώθηκαν και εγκλιείστηκαν σε μίγμα εποξικών ρητινών. Μετά τη διάβρωση του πολυμερούς των εποξικών ρητινών από ημίλεπτες τομές επιλεγμένων καρκινικών περιοχών, εφαρμόστηκε η έμμεση ανοσοϊστοχημική μέθοδος δύο βημάτων της ανοσουπεροξειδάσης για την εντόπιση της Κ8. Ακολούθησε ψηφιακή ανάλυση εικόνων των καρκινικών κυττάρων για τη μέτρηση της μέσης οπτικής πυκνότητας του κυτταροπλάσματός τους, που αντιπροσωπεύει το βαθμό έκφρασης της Κ8. Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Σε όλες τις περιπτώσεις των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού παρατηρήθηκε διαβάθμιση της αντίδρασης ως προς την Κ8 στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων. Στα καλοήγη νεοπλάσματα η αντίδραση ήταν πιο έντονη και ομοιογενής, ενώ στους αρνητικούς μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε αντίδραση. Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων της μέσης κυτταροπλάσματικής οπτικής πυκνότητας των καρκινικών κυττάρων έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των βαθμών κακοήθειας II, III και των ινοαδενωμάτων, ενώ δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων βαθμών κακοήθειας. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Ο τρόπος επεξεργασίας του υπό μελέτη υλικού εξασφάλισε την επιτυχή και ειδική ανοσοεντόπιση της Κ8 σε ημίλεπτες τομές πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα το ίδιο ακριβώς υλικό να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη της υπερμικροσκοπικής κατανομής της Κ8 στο ΗΜ. Τα στατιστικά αποτελέσματα έδειξαν ότι ο βαθμός έκφρασης της Κ8 δεν αποτελεί ασφαλή δείκτη για την εκτίμηση του βαθμού κακοήθειας, αντίθετα όμως αποτελεί ασφαλή δείκτη διάκρισης μεταξύ κακοήθειας και καλοήθειας.

<sup>1</sup>Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών  
<sup>2</sup>Τμήμα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας-Κυτταρικής Βιολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Ογκολογίας «Γ. Παπανικολάου», Αντικαρκινικό Νοσοκομείο «Άγιος Σάββας»  
<sup>3</sup>Τομέας Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών  
<sup>4</sup>Τμήμα Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Immunolocalization of cytokeratin 8 on epoxy resin semithin sections of ductal infiltrating breast carcinomas

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Ανοσοϊστοχημεία  
Κυτοκερατίνη 8  
Μαστός  
Μορφομετρία  
Πορογενές διηθητικό καρκίνωμα

Υποβλήθηκε 27.6.2000  
Εγκρίθηκε 14.11.2000

Οι κυτοκερατίνες υπάγονται στα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροσκελετού. Αποτελούν ομάδα 20 διαφορετικών πεπτιδίων,<sup>1-4</sup> που συνδυάζονται ανά δύο για να συνθέσουν ετεροδιμερή. Οι κυτοκερατίνες βρίσκονται σε διάφορα είδη ιστών και είναι άφθονες στα επιθήλια. Ο συνδυασμός των κυτοκερατινών που εκφράζονται σ' ένα επιθήλιο είναι ειδικός για τον τύπο του συγκεκριμένου επιθηλίου και εξαρτάται από το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων.<sup>1,5-7</sup> Είναι χαρακτηριστικό ότι, όταν φυσιολογικά κύτταρα ενός επιθηλίου υφίστανται εξαλλαγή, συνεχίζουν να εκφράζουν συνήθως τον ίδιο συνδυασμό κυτοκερατινών όπως και τα αντίστοιχα φυσιολογικά, από τα οποία έχουν προέλθει.<sup>8,9</sup> Η διαπίστωση αυτή έχει προσφέρει μεγάλη βοήθεια στη διαφορική διάγνωση και στο διαχωρισμό κατά κατηγορίες των επιθηλιακών όγκων,<sup>10</sup> με την εφαρμογή μεθόδων ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού των κυτοκερατινών σε μεγάλη ποικιλία ιστών. Ο ακριβής λειτουργικός ρόλος των κυτοκερατινών παραμένει ακόμη άγνωστος<sup>11,12</sup> και η πιθανή ικανότητά τους να αλλάζουν το δυναμικό της καρκινογένεσης απαιτεί περαιτέρω μελέτη.<sup>13</sup>

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κυτοκερατίνη 8 (K8), η οποία εκφράζεται κυρίως στα απλά επιθήλια, όπως σε αυτό του πόρου του μαζικού αδένου, στο επιθήλιο της τραχείας, της ουροδόχου κύστης και στα ηπατοκύτταρα.<sup>3</sup> Η K8 συνθέτει ετεροπολυμερές με την κυτοκερατίνη 18 (K18) ή την κυτοκερατίνη 19 (K19), για να διαμορφωθεί το ενδιάμεσο ινίδιο του κυτταροσκελετού. Η K8, μαζί με τις K18 και K19, είναι από τις πρώτες κυτοκερατίνες που εκφράζονται κατά τη φυλογονία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες,<sup>14</sup> ενώ συνήθως εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό και στα επιθηλιακά νεοπλάσματα.<sup>3</sup> Ο βαθμός έκφρασης της K8 ποικίλλει ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης των αδενοκαρκινωμάτων, με τους πιο καλά διαφοροποιημένους όγκους να εμφανίζουν πιο διάχυτη έκφραση της K8.<sup>15</sup>

Η K8, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, εμπλέκεται στη ρύθμιση της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων μαστού *in vitro*, δρώντας ως υποδοχέας του πλασμινογόνου.<sup>16-19</sup> Επιπλέον, η K8 έχει εντοπιστεί, σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο, στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς μαστού MCF-7 μέσα σε κυστικούς σχηματισμούς της κυτταρικής μεμβράνης.<sup>20</sup> Απ' αυτούς τους κυστικούς σχηματισμούς είναι δυνατό να προέρχεται η K8 που εντοπίζεται στο καλλιεργητικό υλικό της ίδιας σειράς. Η εξωκυτάρια εντόπιση της K8 και *in vivo* έχει μεγάλη κλινική σημασία, γιατί η διάχυσή της στον εξωκυττάριο χώρο και η δίοδός της στην κυκλοφορία του αίματος θα μπορούσε να αποτελέσει καρκινικό δείκτη.<sup>21</sup>

Με βάση τα παραπάνω και το γεγονός ότι η ακριβής κατανομή και λειτουργία της K8 *in vivo* δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανοσοϊστοχημική μελέτη της κατανομής της K8, σε επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου, σε πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού, εγκλεισμένα σε μίγμα εποξικών ρητινών. Εφαρμόστηκε η έμμεση ανοσοϊστοχημική μέθοδος δύο βημάτων της υπεροξειδάσης σε ημίλεπτες τομές υλικού βιοψίας από πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού. Στη συνέχεια, έγινε μορφομετρική μελέτη των καρκινικών κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο με σύστημα ψηφιακής ανάλυσης εικόνας, σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα.<sup>22-25</sup> Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά, για να εξεταστεί η συσχέτιση του βαθμού έκφρασης της K8 με το βαθμό κακοήθειας του υπό μελέτη υλικού, με απώτερο σκοπό να γίνει εφικτή η εκτίμηση του ρόλου της K8 ως προγνωστικού παράγοντα στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελετήθηκε υλικό βιοψίας από 9 πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού και 4 ινοαδενώματα, μετά από χειρουργική αφαίρεσή τους από γυναίκες. Ο αριθμός των περιπτώσεων κρίθηκε ως επαρκής με την εφαρμογή κατάλληλων (στατιστικών) κριτηρίων ελέγχου. Ο βαθμός κακοήθειας των νεοπλασμάτων καθορίστηκε σύμφωνα με το σύστημα βαθμοποίησης Bloom-Richardson (Nottingham modification). Από τις 9 περιπτώσεις πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού, 3 ήταν grade I, 3 grade II και 3 grade III. Το υλικό προσφέρθηκε από το Ιατρικό Κέντρο Διάγνωσης και Παρακολούθησης «Γρόληψης».

### Επεξεργασία του ιστού

Από κάθε περίπτωση, μικρό τμήμα νωπού ιστού (5–10 mm<sup>3</sup>) εμβαπτιζόταν σε μονιμοποιητικό διάλυμα γλυταραλδεϋδης 2,5% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) 0,01 M, pH 7,4, για 1 ώρα στους 4 °C. Στη συνέχεια, κοβόταν σε μικρότερα ιστοτεμάχια (1–1,5 mm<sup>3</sup>). Σ' αυτό το στάδιο, υπήρχε δυνατότητα παραμονής των ιστοτεμαχίων στο PBS στους 4 °C μέχρι 3 μέρες. Ακολουθούσε δεύτερη μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων σε υδατικό διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου 1% για 1 ώρα στους 4 °C και έκπλυσή τους με PBS (3×10 min) στους 4 °C. Στη συνέχεια, γινόταν σταδιακή αφυδάτωση των ιστοτεμαχίων, σε θερμοκρασία δωματίου, με εμβάπυσή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υδατικών διαλυμάτων αιθυλικής αλκοόλης 30%, 50%, 70%, 90%, για 10 min στο κάθε διάλυμα, και τελικά σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (3×10 min). Σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθούσε, αρχικά, εμπότιση των ιστοτεμαχίων με οξειδίο του προπυλενίου (3×5 min) και κατόπιν σταδιακή εμπότισή τους από μίγμα εποξικών ρητινών (Epon-Araldite)/οξειδίου του προπυλενίου σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης, σε αναλογίες: (α) 1:2

για 15 min, (β) 1:1 για 30 min, (γ) 2:1 για 60 min, και τελικά σε καθαρό μίγμα ρητινών (3×15 min). Στη συνέχεια, γινόταν σκάνωση των ιστοτεμαχίων σε ειδικά επίπεδα ελαστικά εκμαγεία και πολυμερισμός των εποξικών ρητινών σε κλίβανο στους 60 °C για 24 ώρες.<sup>26</sup> Από κάψουλες, που είχαν επιλεγεί τυχαία, κόβονταν αρχικά σε υπερμικροτόμο LKB III ημιλεπτες τομές του ιστού, πάχους 1 μm, για να εκτιμηθεί ιστολογικά η περιοχή της βιοψίας, και στη συνέχεια κόβονταν ημιλεπτες τομές ίδιου πάχους από περιοχές που στο μεγαλύτερο μέρος τους είχαν καρκινικά κύτταρα. Οι τομές αυτές του ιστού τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες καλυμμένες με poly-L-λυσίνη (#P 8920, Sigma, USA), ώστε να αποφευχθεί η αποκόλληση των τομών κατά την ανοσοϊστοχημική διαδικασία.<sup>27</sup> Η κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών γινόταν με υδατικό διάλυμα poly-L-λυσίνης (1:10), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

### Ανοσοϊστοχημεία

Στις ημιλεπτες τομές εποξικών ρητινών εφαρμόστηκε η έμμεση μέθοδος δύο βημάτων της ανοσοϊστοχημικής διαδικασίας.<sup>28,29</sup> Όλα τα βήματα της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, εκτός από το βήμα της επώασης στο πρωτογενές αντίσωμα.

Λόγω της υδρόφοβης φύσης των εποξικών ρητινών (που καθιστά δύσκολη την πρόσβαση των ανοσοϊστοχημικών αντιδραστηρίων στον ιστό), πριν από την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου γινόταν χημική διάβρωση των τομών, με εμβάπτισή τους σε κορεσμένο αλκοολικό διάλυμα αιθοξειδίου του νατρίου, για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γινόταν (α) σταδιακή ενυδάτωση των τομών με εμβάπτισή τους σε 100%, 90%, 70%, 50% υδατικά διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης, για 5 min σε κάθε διάλυμα, και τελικά σε δισοαπεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O), (β) απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης, με εμβάπτιση των τομών σε υδατικό διάλυμα 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#1.07210.1000, Merck, Germany) για 30 min, σε σκοτεινό μέρος, (γ) ξέπλυμα με dH<sub>2</sub>O (2×5 min) και στη συνέχεια με PBS, pH 7,4 (3×5 min), (δ) δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με επώαση των τομών σε διάλυμα 20% ορού κουνελιού (#X 0902, DAKO, Denmark, σε PBS), (ε) επώαση με το πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα κυτοκερατίνης 8 (#C5301, Sigma, Germany) σε τελική αραιώση 1:20 σε PBS που περιείχε 1% λευκωματίνης ορού εμβρύου βοός (BSA) (#A7638, Sigma, Germany), για 20 ώρες, στους 4 °C, (στ) ξέπλυμα με PBS (3×5 min), (ζ) επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (#P161, DAKO, Germany) σε τελική αραιώση 1:20 σε PBS, pH 7,4 για 1 ώρα, (η) ξέπλυμα με PBS (3×5 min), (θ) επώαση με το διάλυμα του χρωμογόνου 3,3'-τετραϋδροχλωρική διαμινοβενζιδίνη (DAB) (#18865, Boehringer Ingelheim Bioproducts, Germany) 0,05% παρουσία 0,024% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#1.07210.1000, Merck, Germany) για 7 min, (ι) ξέπλυμα με νερό βρύσης και στη συνέχεια με dH<sub>2</sub>O για 5 min, (ια) συμπληρωματική χρώση με αιματοξυλίνη Harris (#35194 6T, BDH, Germany) για 20 min, (ιβ) ξέπλυμα με dH<sub>2</sub>O, (ιγ) αφυδάτωση σε υδατικά διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης 50%, 70%, 90%, για 3 min σε κάθε

διάλυμα, και σε 100% αιθυλική αλκοόλη για 3 min, διαύγαση σε ξυλόλη και κάλυψη των τομών με DPX (#36029 4H, BDH, Germany). Η παρατήρηση των τομών γινόταν σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Axiolab εφοδιασμένο με φακούς Zeiss Achromplan. Περιοχές καρκινικών κυττάρων καταγράφονταν με βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης SONY CCD-IRIS, που ήταν προσαρμοσμένη στο οπτικό μικροσκόπιο, και οι εικόνες αποθηκεύονταν σε H/Y Pentium II 350 MHz. Η εκτύπωση των εικόνων γινόταν σε εκτυπωτή Hewlett-Packard Color LaserJet 4.500 υψηλής ανάλυσης.

### Μάρτυρες

Για τον έλεγχο της ειδικότητας της ανοσοϊστοχημικής αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν αρνητικοί μάρτυρες, δηλαδή κατά την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημικής αντίδρασης είχε παραλειφθεί το βήμα της επώασης των τομών του ιστού με το πρωτογενές αντίσωμα.

### Σύστημα ανάλυσης εικόνας – Μορφομετρία

Για τη μορφομετρική μελέτη των καρκινικών κυττάρων και την αξιολόγηση του βαθμού έκφρασης της κυτοκερατίνης 8 (K8) σε αυτά, γινόταν ψηφιακή ανάλυση εικόνων του υλικού. Ειδικότερα, εικόνες καρκινικών κυττάρων, μετά από παρατήρηση με τον αντικειμενικό καταδυτικό φακό 100×, καταγράφονταν με βιντεοκάμερα SONY CCD-IRIS υψηλής ανάλυσης, προσαρμοσμένη στο οπτικό μικροσκόπιο, και επεξεργάζονταν ψηφιακά σε H/Y Pentium II 350 MHz, με χρήση του ειδικού προγράμματος μορφομετρίας Image-Pro Plus 3.1 της Media Cybernetics. Συγκεκριμένα, στην κάθε εικόνα, με ειδικό σύστημα μακροεντολών, γινόταν (α) αυτόματη βαθμονόμηση του φωτισμού της, (β) μετατροπή της εικόνας σε διαβάθμιση του γκρι (0–256), (γ) βαθμονόμηση της κλίμακας της οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) με βάση την ελάχιστη και μέγιστη φωτεινότητα της ασπρόμαυρης εικόνας, (δ) ορισμός και μέτρηση του εμβαδού του καρκινικού κυττάρου και του εμβαδού του πυρήνα, (ε) να βρεθεί το εμβαδόν του κυτταροπλάσματος και (ε) αυτόματη μέτρηση της μέσης ΟΠ στο καθορισμένο κυτταρόπλασμα, που αντιπροσωπεύει το βαθμό αντίδρασης ως προς την K8. Από κάθε περίπτωση γινόταν μέτρηση της κυτταροπλασματικής ΟΠ σε 50 καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων καταχωρούνταν αυτόματα και επεξεργάζονταν σε λογιστικά φύλλα στο πρόγραμμα Excel. Οι ίδιες μετρήσεις γίνονταν και στα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα των ινοαδενωμάτων.

### Στατιστική ανάλυση

Στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων, η ομάδα των ινοαδενωμάτων χαρακτηρίστηκε ως «βαθμός κακοήθειας 0», σε αντιπαράθεση με τους βαθμούς κακοήθειας I, II και III, των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού που μελετήθηκαν. Η στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε με το στατιστικό πακέτο SAS. Χρησιμοποιήθηκε λογαριθμικός μετασχηματισμός των μετρήσεων της ΟΠ για την επίτευξη κανονικότητας. Για τη διερεύνηση της διαφοράς των ΟΠ στη λογαριθμική κλίμακα μεταξύ των διαφόρων βαθμών κακοήθειας

ας των νεοπλασμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (Random effects models).<sup>30</sup> Σε αυτό το μοντέλο λαμβάνεται υπόψη το γεγονός ότι πολλαπλά κύτταρα προέρχονται από το ίδιο άτομο. Περαιτέρω, με τη μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων του Scheffe<sup>31</sup> έγιναν ανά δύο συγκρίσεις μεταξύ των βαθμών κακοήθειας. Όλα τα αναφερόμενα παρατηρούμενα επίπεδα σημαντικότητας (P-values) είναι αμφίπλευρα. Στατιστική σημαντικότητα αναφέρεται όταν  $P < 0,05$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

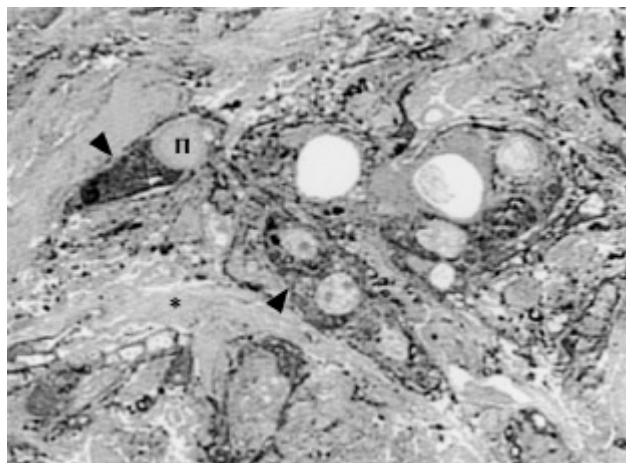
Στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού που μελετήθηκαν, η αδενική διαφοροποίηση μειωνόταν όσο αύξανε ο βαθμός κακοήθειας του καρκινώματος. Τα καρκινικά κύτταρα, διαταγμένα σε μεγάλες ή μικρές στρογγυλές ή ταινιοειδείς αθροίσεις, χαρακτηρίζονταν από ποικιλία σε μέγεθος και σχήμα. Οι πυρήνες τους ήταν μεγάλοι, συχνά με πυρηνίσκους και πολύμορφοι. Στα καλοήθη νεοπλάσματα που μελετήθηκαν, τα επιθηλιακά κύτταρα ήταν πιο ομοιόμορφα, με μικρότερους πυρήνες και χωρίς μτώσεις. Η αρχιτεκτονική δομή του ιστού ήταν πιο καλά διατηρημένη.

### Ανοσοϊστοχημεία

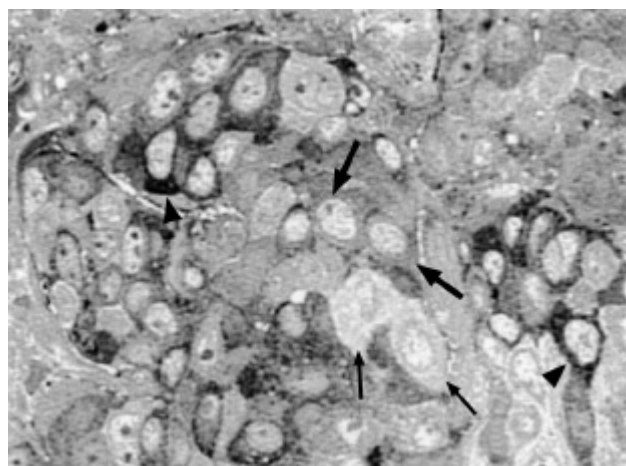
Σε όλες τις περιπτώσεις πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού που μελετήθηκαν, η κυτοκερατίνη 8 (K8) εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων. Και στους τρεις βαθμούς κακοήθειας, δηλαδή στα grade I, grade II και grade III, παρατηρήθηκε διαβάθμιση της αντίδρασης ως προς την K8 στα καρκινικά κύτταρα κάθε περίπτωσης. Συγκεκριμένα, σε ομάδες καρκινικών κυττάρων, κάποια κύτταρα είχαν έντονη αντίδραση ως προς την K8 στο κυτταρόπλασμά τους (εικόνες 1, 2), άλλα είχαν μέτρια αντίδραση (εικ. 3), ενώ γειτονικά τους κύτταρα ήταν αρνητικά ως προς την K8 (εικόνες 2, 3).

Από τη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης της K8 στα καρκινικά κύτταρα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού, παρατηρήθηκαν οι εξής τύποι αντίδρασης:

- Έντονη αντίδραση της K8 ομοιόμορφα κατανεμημένη σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος του καρκινικού κυττάρου (εικόνες 1, 2)
- Μέτρια αντίδραση της K8 ομοιόμορφα κατανεμημένη σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος του καρκινικού κυττάρου (εικόνες 2, 3)
- Έντονη έκφραση της K8 στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος και γύρω από τον πυρήνα του καρκινικού κυττάρου (εικ. 4)



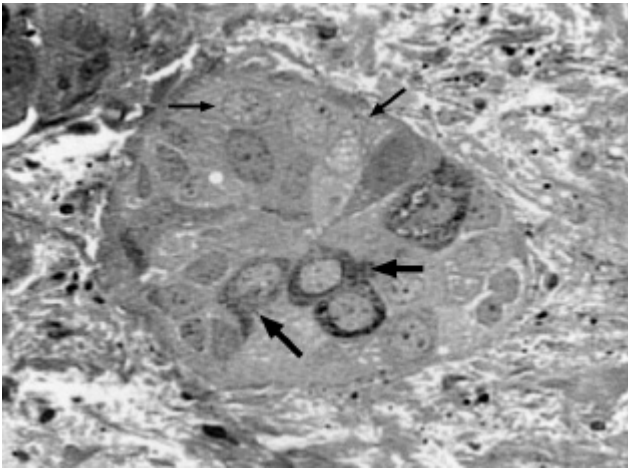
**Εικόνα 1.** Καρκινικά κύτταρα σε πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μαστού grade I με έντονη κυτταροπλασματική έκφραση της K8 (κεφαλές βελών), λόγω του καλού βαθμού διαφοροποίησης του καρκινώματος. Οι πυρήνες (Π) και τα στρωματικά στοιχεία (αστερίσκος) είναι αρνητικά ως προς την K8 (x500).



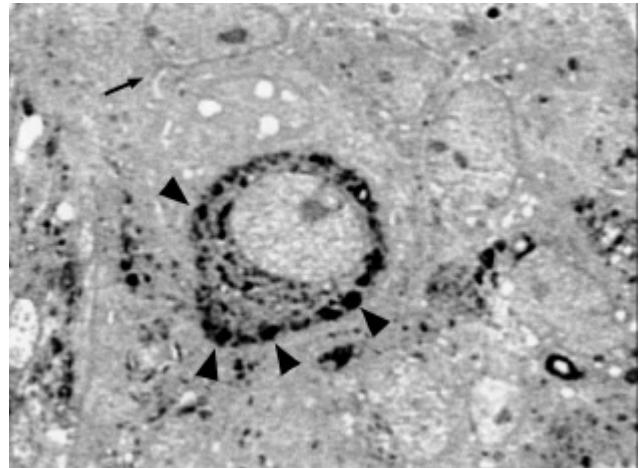
**Εικόνα 2.** Ακανόνιστες αθροίσεις καρκινικών κυττάρων σε πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μαστού grade III. Παρατηρούνται ορισμένα κύτταρα με έντονη αντίδραση (κεφαλές βελών) ως προς την K8, άλλα με μέτρια αντίδραση (παχιά βέλη), καθώς και γειτονικά τους με αρνητική αντίδραση (λεπτά βέλη) (x500).

- Έντονες και μεγάλες εστιακές εναποθέσεις της K8 κυρίως στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος, αλλά και μικρότερες εστιακές εναποθέσεις της K8 κατανεμημένες σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος του καρκινικού κυττάρου (εικ. 5)
- Έντονη έκφραση της K8 γύρω από κυτταροπλασματικά κυστίδια. Σε ορισμένα από αυτά η αντίδραση δεν ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένη, ενώ γύρω από άλλα κυστίδια η αντίδραση ήταν αρνητική (εικ. 6).

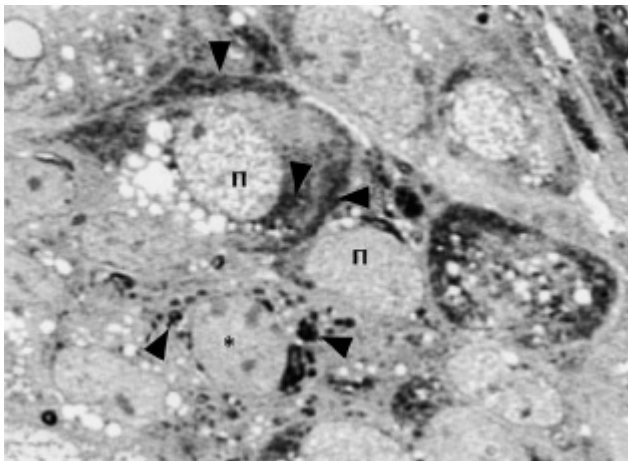
Στα καλοήθη νεοπλάσματα, η αντίδραση ως προς την K8 στο κυτταρόπλασμα των πιο καλά διαφοροποιημένων



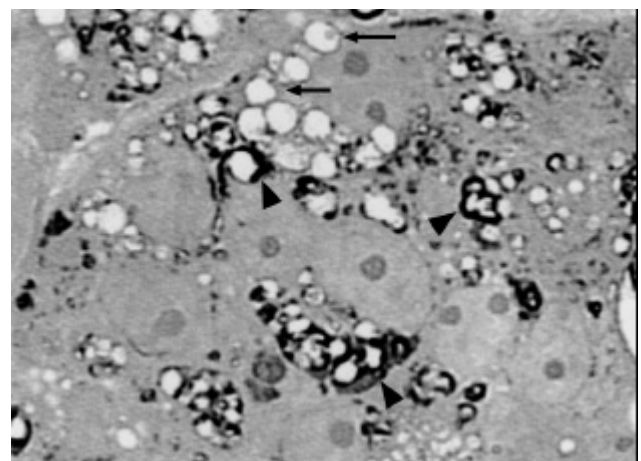
**Εικόνα 3.** Ομάδα καρκινικών κυττάρων σε πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μαστού grade II με μικρή διατήρηση της αδενικής διαφοροποίησης. Παρατηρούνται λίγα κύτταρα με μέτρια αντίδραση ως προς την K8 (παχιά βέλη), ενώ τα περισσότερα δεν εκφράζουν την K8 (λεπτά βέλη) ( $\times 500$ ).



**Εικόνα 5.** Ομάδα καρκινικών κυττάρων σε περίπτωση πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μαστού, όπου σ' ένα κύτταρο παρατηρούνται έντονες εστιακές εναποθέσεις της K8 (κεφαλές βελών), που διατάσσονται κυρίως στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος. Τα γειτονικά κύτταρα είναι αρνητικά ως προς την K8 (λεπτό βέλος) ( $\times 1300$ ).



**Εικόνα 4.** Ομάδα καρκινικών κυττάρων σε περίπτωση πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μαστού. Παρατηρείται έντονη έκφραση της K8 στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος και γύρω από τον πυρήνα (κεφαλές βελών). Σε γειτονικό κύτταρο (αστερίσκος) διακρίνονται έντονες εστιακές εναποθέσεις της K8 (κεφαλές βελών). Οι πυρήνες των κυττάρων (Π) είναι αρνητικοί ως προς την K8 ( $\times 1300$ ).



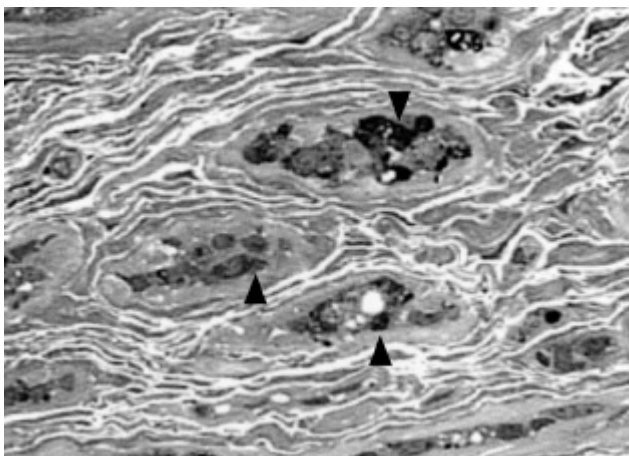
**Εικόνα 6.** Ομάδα καρκινικών κυττάρων σε περίπτωση πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μαστού, με έντονους πυρηνίσκους και πολλά κυστίδια στο κυτταροπλάσμα τους. Γύρω από αρκετά κυστίδια παρατηρείται έντονη αντίδραση ως προς την K8 (κεφαλές βελών), ενώ σε άλλα δεν παρατηρείται αντίδραση (λεπτά βέλη) ( $\times 1300$ ).

κυττάρων ήταν εντονότερη και πιο ομοιογενής (εικ. 7). Στις περιπτώσεις όπου είχε παραλειφθεί το πρωτογενές αντίσωμα (αρνητικοί μάρτυρες), δεν παρατηρήθηκε αντίδραση (εικ. 8).

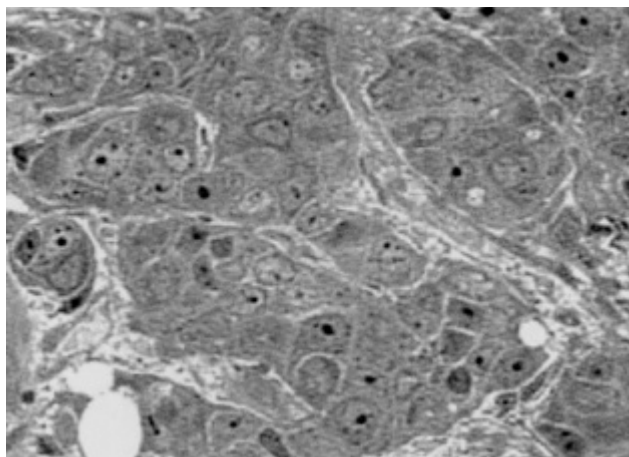
### Στατιστική

Περιγραφικά στατιστικά μέτρα των ΟΠ (μέσος  $\pm$  τυπική απόκλιση) ανά άτομο και συνολικά για κάθε βαθμό κακοήθειας παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Στην εικόνα 9, δίνεται ένα διάγραμμα πλαισίου-απολήξεων

της κατανομής του λογαρίθμου των ΟΠ ανά βαθμό κακοήθειας. Βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά των ΟΠ στη λογαριθμική κλίμακα ( $P=0,0001$ ) μεταξύ των διαφορετικών ομάδων βαθμών κακοήθειας (0, I, II και III). Ειδικότερα, βάσει της μεθόδου πολλαπλών συγκρίσεων του Scheffe, βρέθηκε ότι ο λογάριθμος των ΟΠ κατά μέσο όρο διαφέρει στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των ομάδων βαθμού κακοήθειας II και 0 ( $P=0,032$ ), καθώς και μεταξύ των ομάδων βαθμού κακοήθειας III και 0 ( $P=0,0003$ ), ενώ απέχει ελάχιστα από τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας η διαφορά μετα-



**Εικόνα 7.** Μικρές ομάδες νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων σε ινοαδένωμα μαστού με έντονη κυτταροπλασματική έκφραση της K8 (κεφαλές βελών). Παρατηρείται μεγαλύτερη αδενική διαφοροποίηση και καλύτερη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του ιστού (x500).



**Εικόνα 8.** Ο αρνητικός μάρτυρας σε περίπτωση πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μαστού, όπου δεν παρατηρείται κανένα είδος ανοσοεντόπισης ως προς την K8 (x500).

ξύ βαθμού κακοήθειας I και 0 ( $P=0,067$ ). Μη στατιστικώς σημαντικές ήταν οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων βαθμών κακοήθειας ( $P=0,995$ ,  $P=0,461$  και  $P=0,621$ , για τη σύγκριση I έναντι II, I έναντι III και II έναντι III, αντίστοιχα).

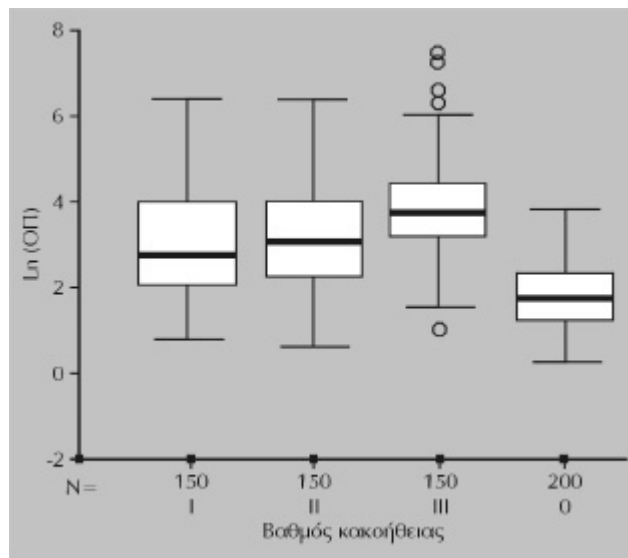
**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στην εργασία αυτή γίνεται με επιτυχία ανοσοεντόπιση της K8 με χρήση DAB ως χρωμογόνο, σε ημίλεπτες τομές από πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού.

Η επιτυχία της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου που εφαρμόζεται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του μονιμοποιητικού μέσου που χρησιμοποιείται, από το χρόνο μονιμοποίησης του ιστού και από το μέγεθος του

**Πίνακας 1.** Περιγραφικά στατιστικά μέτρα των οπτικών πυκνοτήτων (ΟΠ) ανά άτομο και συνολικά για κάθε ομάδα βαθμού κακοήθειας.

Βαθμός κακοήθειας	Αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν ανά άτομο	ΟΠ Μέσος±τυπική απόκλιση
0 (Ινοαδενώματα)	Άτομο 1 (N=50)	8,08±8,04
	Άτομο 2 (N=50)	6,91±6,97
	Άτομο 3 (N=50)	9,88±6,48
	Άτομο 4 (N=50)	5,67±4,46
	Σύνολο (N=200)	7,64±6,75
I	Άτομο 1 (N=50)	16,22±23,57
	Άτομο 2 (N=50)	26,74±33,77
	Άτομο 3 (N=50)	95,21±120,15
	Σύνολο (N=150)	46,06±80,87
II	Άτομο 1 (N=50)	13,08±21,81
	Άτομο 2 (N=50)	68,42±98,32
	Άτομο 3 (N=50)	57,18±71,89
	Σύνολο (N=150)	46,23±74,90
III	Άτομο 1 (N=50)	55,25±51,80
	Άτομο 2 (N=50)	105,45±214,37
	Άτομο 3 (N=50)	105,92±243,22
	Σύνολο (N=150)	88,87±189,78



**Εικόνα 9.** Διάγραμμα πλαισίου-απολήξεων της κατανομής του λογαρίθμου των οπτικών πυκνοτήτων (ΟΠ) ανά βαθμό κακοήθειας.

ιστοτεμαχίου που πρόκειται να μονιμοποιηθεί, με σκοπό τη διατήρηση της καλής μορφολογίας του ιστού, αλλά και της αντιγονικότητάς του,<sup>32,33</sup> ώστε να μην καλύπτονται οι διαθέσιμες αντιγονικές θέσεις με την ανάπτυξη πλευρικών δεσμών γύρω από αυτές.<sup>34</sup> Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η χρήση φορμόλης ως μονιμοποιητικού μέσου έχει αρνητική επίδραση στην ανοσοεντόπιση αντιγονικών θέσεων σε μόρια κυτοκερατινών και άλλων βιομορίων, με αποτέλεσμα να απαιτείται η χρήση πρωτεϊνών για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων.<sup>35,36</sup>

Στην παρούσα εργασία, το μικρό μέγεθος των ιστοτεμαχίων ( $1-1,5 \text{ mm}^3$ ), που μονιμοποιούνταν σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση γλουταραλδεϋδης (2,5%) για 1 ώρα στους  $4^\circ\text{C}$ , εξασφάλισε την καλή διατήρηση της μορφολογίας του ιστού, αλλά ταυτόχρονα και την αντιγονικότητά του ως προς την K8, με αποτέλεσμα να αποδοθεί λεπτομερής ανοσοεντόπιση.

Πριν από την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικής μεθόδου σε ημίλεπτες τομές εποξικών ρητινών, είναι απαραίτητη η επώαση των τομών με κατάλληλο μέσο, ώστε να διαβρωθεί το πολυμερές των ρητινών και να είναι δυνατή η διείσδυση των ανοσοϊστοχημικών αντιδραστηρίων στον ιστό. Η χρονική διάρκεια όμως της επώασης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την επιτυχή έκβαση της ανοσοϊστοχημικής αντίδρασης, γιατί η μακρόχρονη επώαση καταστρέφει τη μορφολογία του ιστού, ενώ η βραχύχρονη δεν αφαιρεί ολοκληρωτικά τη ρητίνη, επηρεάζοντας αρνητικά το βαθμό της ανοσοαντίδρασης. Στην παρούσα εργασία, η επώαση των ημίλεπτων τομών, πάχους  $1 \mu\text{m}$ , σε κορεσμένο αλκοολικό διάλυμα αιθοξειδίου του νατρίου για 10 min, έδωσε τα καλύτερα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα.

Η επεξεργασία και η προετοιμασία του υλικού που χρησιμοποιήθηκε επιτρέπει τη μορφολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη του ίδιου υλικού και σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο, με παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Έτσι, μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της K8 σε διαδοχικά γειτονικές ημίλεπτες και υπέρλεπτες τομές του ιστού και η συσχέτισή της με υπερμικροσκοπικές δομές. Επομένως, είναι δυνατός ο ακριβής εντοπισμός της K8 στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού.

Η ψηφιακή ανάλυση εικόνας χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στην παθολογική ανατομική και στην ιστολογία για τη μέτρηση και αξιολόγηση μορφολογικών και οπτικών παραμέτρων σε ιστολογικά παρασκευάσματα, κατάλληλα ιστοχημικά ή ανοσοϊστοχημικά χρωματισμένα.<sup>22</sup> Στον καρκίνο του μαστού, η ανοσοεντόπιση βιολογικών δεικτών και η μελέτη τους με ψηφιακό σύστημα ανάλυσης εικόνας δίνει τη δυνατότητα αντικειμενικής και επαναλαμβανόμενης εκτίμησης και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ακριβέστερη διάγνωση και πρόγνωση.<sup>23,25,37</sup> Από τις μετρήσεις, με το ψηφιακό σύστημα ανάλυσης εικόνας, των κυτταροπλασματικών ΟΠ στα καρκινικά κύτταρα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού που μελετήθηκαν, γίνεται φανερό η ετερογένεια στην έκφραση της K8, τόσο σε επίπεδο περίπτωσης, από τη μεγάλη τυπική απόκλιση των τιμών, όσο και μεταξύ των περιπτώσεων που ανήκουν στον ίδιο βαθμό κακοήθειας. Αντίθετα, στα μελετηθέντα καλοήθη νεοπλάσματα (ινοαδενώματα) η τυπική απόκλιση δεν είναι τόσο

μεγάλη και οι τιμές των ΟΠ μεταξύ των περιπτώσεων είναι πιο ομοιόμορφες.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι, μεταξύ των βαθμών κακοήθειας των περιπτώσεων του πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μαστού που μελετήθηκαν, δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση της K8. Το δεδομένο αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη των Heatley et al (1995),<sup>38</sup> στην οποία έγινε συγκριτική μελέτη της έκφρασης των κυτοκερατινών με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε καλοήθη και κακοήθη νεοπλάσματα του μαστού. Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα, μεταξύ άλλων, ότι, αυξανόμενου του βαθμού κακοήθειας στα συγκεκριμένα νεοπλάσματα, η μεταβολή της έκφρασης των κυτοκερατινών –όπου παρατηρείται– δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

Επομένως, από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα φαίνεται ότι, αφενός μεν ο βαθμός έκφρασης της K8 δεν αποτελεί ασφαλή δείκτη για την εκτίμηση του βαθμού κακοήθειας στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα του μαστού και αφετέρου μπορεί να αποτελέσει ασφαλή δείκτη διάκρισης μεταξύ κακοήθειας και καλοήθειας. Ο δείκτης αυτός θα μπορούσε μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικές διαδικασίες και προς την κατεύθυνση αυτή πιστεύεται ότι θα βοηθήσει αποτελεσματικά η ολοκλήρωση της μελέτης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από τον ΕΛΚΕ του Πανεπιστημίου Αθηνών (κωδ. 70/4/3495) και από την Ερευνητική Επιχορήγηση Ακαδημαϊκού Έτους 1999 της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (έτος 1999) για την ενίσχυση ερευνητικών προγραμμάτων. Οι συγγραφείς εκφράζουν τις ευχαριστίες τους στον ιατρό κ. Στ. Βασιλάρο, άμισθο επίκουρο καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την προσφορά του υπό μελέτη υλικού από το Ιατρικό Κέντρο Διάγνωσης και Παρακολούθησης «Πρόληψις», την καθηγήτρια κα Μ. Ισιδωρίδου, υπεύθυνη της Ερευνητικής Μονάδας Ιστοχημείας και Κυτταρικής Βιολογίας της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο, για την παραχώρηση του υπερμικροτόμου, τη στατιστικό κα Χρ. Σωτηροπούλου, για τη διεξοδική επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των δεδομένων, και την τεχνολόγο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Ευγενίδειου Θεραπευτηρίου κ. Α. Στεργιώτη, για την αμέριστη και ουσιαστική βοήθεια στη συλλογή του υπό μελέτη υλικού. Τέλος, οι συγγραφείς ευχαριστούν θερμά την εταιρεία συστημάτων ανάλυσης ψηφιακής εικόνας Digital Image Systems για την άφογη τεχνική υποστήριξη του υπολογιστικού συστήματος μορφομετρίας και ανάλυσης εικόνας, καθώς και για τον προγραμματισμό των μακροεντολών.*

## ABSTRACT

**Immunolocalization of cytokeratin 8 on epoxy resin semithin sections  
of infiltrating ductal breast carcinomas**

S. HAVAKI,<sup>1</sup> I. BALTAZIS-VOLOUDAKIS,<sup>2</sup> U. DAFNI,<sup>3</sup> N. GOUTAS,<sup>1</sup> D.L. ARVANITIS,<sup>4</sup> Ch. KITTAS,<sup>1</sup> E. MARINOS<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, <sup>2</sup>Department of Electron Microscopy and Cell Biology, Research Center of Oncology "G. Papanikolaou", "Saint Savas" Anticancer Hospital, <sup>3</sup>Department of Public Health, Faculty of Nursing, University of Athens, <sup>4</sup>Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical School of Larissa, University of Thessaly, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(6):584-592*

**OBJECTIVE** Cytokeratins belong to the intermediate filament family of the epithelial cells. The cytokeratin class expressed in an epithelial cell is cell specific. Cytokeratin 8 (CK8) is present in simple epithelia, such as mammary gland duct cells, and in related neoplasms. CK8 may be implicated in the promotion of breast cancer cell invasiveness *in vitro*. It is immunolocalized at the outer phase of the cellular membrane of breast cancer cells and is also released into the culture medium; the precise distribution and function of CK8 *in vivo* has not yet been elucidated. The purpose of this study was the immunolocalization of CK8, under the light microscope, on epoxy resin semithin sections of infiltrating ductal breast carcinomas. The role of CK8 as a prognostic factor was also investigated in infiltrating ductal breast carcinomas. **METHOD** Nine cases of infiltrating ductal breast carcinoma and 4 cases of fibroadenoma were studied. In each case, small pieces of fresh tissue were fixed, dehydrated, and embedded in a mixture of epoxy resins. After removal of the epoxy resin polymer in semithin sections of selected cancerous areas, the two step indirect immunoperoxidase method was applied for CK8 immunolocalization. The average optical density in the cytoplasm of the cancer cells, which represents the CK8 expression, was measured by image analysis and the results were analysed statistically. **RESULTS** In all cases of infiltrating ductal breast carcinoma, grading of CK8 immunoreaction in the cytoplasm of cancer cells was observed, but in the benign neoplasms the reaction was more intense and uniform. No reaction was observed in negative controls. Statistically significant difference was observed in the average cytoplasmic optical density of the cancer cells, between histological grades II, III and the fibroadenomas, while there was no statistically significant difference between histological grades I, II and III. **CONCLUSIONS** The tissue preparation procedure assured successful and specific CK8 immunolocalization on semithin sections of infiltrating ductal breast carcinomas. It is possible that using the same experimental material, the detailed distribution of CK8 can be further studied under the electron microscope. The statistical analysis showed that the value of CK8 expression in assessing tumor grade appears to be limited, where as it can be used as a safe indicator to distinguish malignant from benign tumors.

**Key words:** Breast, Cytokeratin 8, Ductal infiltrating carcinoma, Immunohistochemistry, Morphometry

### Βιβλιογραφία

1. FRANKE WW, SCHILLER DL, MOLL R, WINTER S, SCHMID E, ENGELBRECHT I ET AL. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J Mol Biol* 1981, 153:933-959
2. FRANKE WW, SCHILLER DL, HATZFELD M, WINTER S. Protein complexes of intermediated-sized filaments. Melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:7113-7117
3. MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, GEIGER B, KREPLER R. The catalog of human cytokeratin polypeptides. Patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982, 31:11-24
4. MOLL R, SCHILLER DL, FRANKE WW. Identification of protein IT of intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* 1990, 111: 567-580
5. KIM KH, RHEINWALD JG, FUCHS E. Tissue specificity of epithelial keratins. Differential expressions of mRNAs from two multigene families. *Mol Cell Biol* 1983, 3:495-502
6. KIM KH, MARCHUK D, FUCHS E. Expression of unusually large keratins during terminal differentiation. Balance of type II keratins is not disrupted. *J Cell Biol* 1984, 99:1872-1877
7. FUCHS E, COPPOCK SM, GREEN H, CLEVELAND DW. Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance. *Cell* 1981, 27:75-84



8. FRANKE WW, SCHMID E, WEBER K, OSBORN M. HeLa cells contain intermediate-sized filaments of the prekeratin type. *Exp Cell Res* 1979, 118:95-109
9. WU YJ, RHEINWALD JG. A new small (40 kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell* 1981, 25:627-635
10. BATTIFORA H. The biology of the keratins and their diagnostic applications. In: DeLellis RA (ed) *Advances in Immunohistochemistry*. Raven Press, New York, 1988:191-221
11. TAKEI H, IINO Y, HORIGUCHI J, KANO H, TAKAO Y, OYAMA T ET AL. Immunohistochemical analysis of cytokeratin 8 as a prognostic factor in invasive breast carcinoma. *Anticancer Res* 1995, 15:1101-1106
12. VISSCHER D, ZARBO RJ, CRISSMAN JD. Application of monoclonal antibodies to high and low molecular weight cytokeratins in the differential diagnosis of human carcinomas. *Surg Pathol* 1988, 1:407-416
13. TRASK DK, BAND V, ZAJCHOWSKI DA, YASWEN P, SUH T, SAGER R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:2319-2323
14. NAGLE RB. Intermediate filaments. A review of basic biology. *Am J Surg Pathol* 1988, 12(Suppl 1):4-16
15. SHAH KD, TABIBZADEH SS, GERBER MA. Comparison of cytokeratin expression in primary and metastatic carcinomas. Diagnostic application in surgical pathology. *Am J Clin Pathol* 1987, 87:708-715
16. HEMBROUGH TA, VASUDEVAN J, ALLIETTA MM, GLASS WF II, GONIAS SL. A cytokeratin 8-like protein with plasminogen-binding activity is present on the external surfaces of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. *J Cell Sci* 1995, 108:1071-1082
17. HEMBROUGH TA, KRALOVICH KR, LI L, GONIAS SL. Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells *in vitro* binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochem J* 1996, 317:763-769
18. HEMBROUGH TA, LI L, GONIAS SL. Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1996, 271:25684-25691
19. KRALOVICH KR, LI L, HEMBROUGH TA, WEBB DJ, KARNS LR, GONIAS SL. Characterization of the binding sites for plasminogen and tissue-type plasminogen activator in cytokeratin 8 and cytokeratin 18. *J Protein Chem* 1998, 17:845-854
20. GODFROID E, GEUSKENS M, DUPRESSOIR T, PARENT I, SZPIRER C. Cytokeratins are exposed on the outer surface of established human mammary carcinoma cells. *J Cell Sci* 1991, 99:595-607
21. CHAN R, ROSSITTO PV, EDWARDS BF, CARDIFF RD. Presence of proteolytically processed keratins in the culture medium of MCF-7 cells. *Cancer Res* 1986, 46:6353-6359
22. MAYR NA, STAPLES JJ, ROBINSON RA, VANMETRE JE, HUSSEY DH. Morphometric studies in intraductal breast carcinoma using computerized image analysis. *Cancer* 1991, 67:2805-2812
23. QUERZOLI P, FERRETTI S, ALBONICO G, RINALDI R, MAGRI E, SCAPOLI D ET AL. Application of quantitative analysis to biologic profile evaluation in breast cancer. *Cancer* 1995, 76:2510-2517
24. TUCZEK HV, FRITZ P, SCHWARZMANN P, WU X, MAHNER G. Correlations between visual diagnostic criteria for histologic grading and features of image analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996, 18:481-493
25. QUERZOLI P, ALBONICO G, FERRETTI S, RINALDI R, MAGRI E, NENCI I. Quantitative immunoprofiles of breast cancer performed by image analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999, 21:151-160
26. PICKEL VM, JOH TH, REIS DJ. Monoamine-synthesizing enzymes in central dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. Immunocytochemical localisation by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1976, 24:792-806
27. HUANG WM, GIBSON S, FACER P, GU J, POLAK JM. Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. *Histochemistry* 1983, 77:275-279
28. LANE BP, EUROPA DL. Differential staining of ultrathin sections of epon-embedded tissue for light microscopy. *J Histochem Cytochem* 1965, 13:579-582
29. NAKANE PK, PIERCE GB. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigen. *J Histochem Cytochem* 1966, 14:929-931
30. LAIRD NM, LANGE N, STRAM D. Maximum likelihood computations with repeated measures: application of the EM algorithm. *J Am Statistical Assoc* 1987, 82:97-105
31. SCHEFFE H. A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika* 1953, 40:87-104
32. BEROD A, HARTMAN BK, PUJOL JF. Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem* 1981, 29:844-850
33. ΧΑΒΑΚΗ Σ, ΑΡΒΑΝΙΤΗΣ Δ, ΚΙΤΤΑΣ Χ, ΜΑΡΙΝΟΣ Ε. Τεχνικές επισημάνσεις για την εφαρμογή ειδικών ανοσοϊστοχημικών τεχνικών στο οπτικό και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. *Ιπποκράτης* 1998, 6:64-67
34. BATTIFORA H, KOPINSKI M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *J Histochem Cytochem* 1986, 34:1095-1100
35. BATTIFORA H. Recent progress in the immunohistochemistry of solid tumors. *Semin Diagn Pathol* 1985, 1:251-271
36. NAGLE RB, McDANIEL KM, CLARK VA, PAYNE CM. The use of antikeratin antibodies in the diagnosis of human neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1983, 79:458-466
37. WELLS WA, RAINER AR, MEMOLI U. Equipment, standardization, and application of image processing. *Am J Clin Pathol* 1993, 99:48-56
38. HEATLEY M, MAXWELL P, WHITESIDE C, TONER P. Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease. *J Clin Pathol* 1995, 48:26-32

*Corresponding author:*

E. Marinos, Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, 75 Mikras Asias street, GR-115 27 Goudi, Athens, Greece