

ФГБУ НИИ  
онкологии  
им. Н.Н. Петрова  
Минздравсоцразвития  
России,  
Санкт-Петербург

# ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ

А.О. Иванцов, Д.Е. Мацко

*Об успехах иммуногистохимии в практической онкологии говорят теперь все. Даже скептики вынуждены признать наличие серьезных успехов. Но успехи имеют и теневую сторону, когда теряется чувство меры и появляется стремление переоценить свои силы и попытки «в два счёта» разрешить все диагностические вопросы.*

## Введение

Иммуногистохимия (ИГХ) — это метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с мечеными антителами. Albert Coons в 1941 г. впервые получил меченые флюоресцеином антитела и применил их в диагностических целях [11]. Однако большая сложность получения антител, их визуализации с низкой воспроизводимостью результатов ограничила распространение метода. В 1970 г. Ludwig Sternberger изобрёл пероксидаза-антипероксидазный метод [25], а в 1975 г. - Georges Köhler и César Milstein впервые добились слияния короткоживущих лимфоцитов, продуцирующих антитела, и постоянно растущих клеток плазмоцитомы и полученные, теоретически «бессмертные», культивируемые клоны гибридных клеток позволили получать разнообразные моноклональные антитела в больших количествах (в 1984 г. авторы были удостоены нобелевской премии «за открытие принципа синтеза моноклональных антител») [18]. В 1990-х было обнаружено, что возможен поиск неактивных антигенов в тканях, фиксированных формалином и заключённых в парафин, путём их нагрева в буферных растворах. Это расширило возможности метода и повысило его чувствительность [1].

В последнее десятилетие ИГХ-анализ обрёл широкое применение в каждой диагностической практике, перестал быть методом сугубо научных исследований. На сегодняшний день существует различные иммуногистохимические методы, однако в практической деятельности наиболее широко распространено не прямое иммуноокрашивание с использованием биотин-авидинового комплекса. Непрямой метод предполагает использование двух различных антител. Первичные антитела реагируют с антигенами ткани. Связанные с меткой вторичные антитела специфически взаимодействуют с первичными, которые для вторичных антител являются антигеном. Метод значительно чувствительнее прямого, т. к. с каждой молекулой первичных антител связывается несколько молекул вторичных антител, содержащих метку. Биотин (витамин Н) — соединение, стойкое к действию высоких температур, к кислой и щелочной среде, хорошо растворяется в воде и спирте. Он является коферментом во многих реакциях присоединения (карбоксилирования). Биотин легко может вступать в стойкое соединение с различными белками, в том числе с ферментами и иммуноглобулинами. Авидин образует с биотином чрезвычайно стойкий комплекс. Разрушить такой комплекс можно только при температурной обработке, т. к. авидин разрушается при нагревании. Авидин имеет 4 места связывания, к которым можно присоединить биотин или белки. Таким образом, комплекс биотин-авидин используется связующим мостиком между антителами и ферментами. Для этого готовится комплекс, состоящий из фермента, связанного с биотином, и авидина. В образующемся комплексе три центра связывания авидина связаны через биотин с ферментом или флюорохромом, а четвертый остается свободным. Комплекс (рис.2) формируется в три этапа: 1. немеченые первичные антитела соединяются с антигеном, 2.

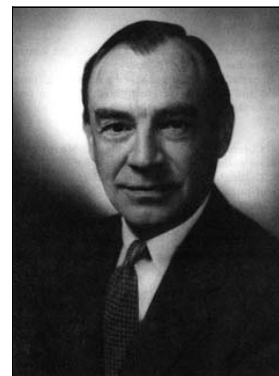


Рис. 1. Альберт Кунс (1912 – 1978).

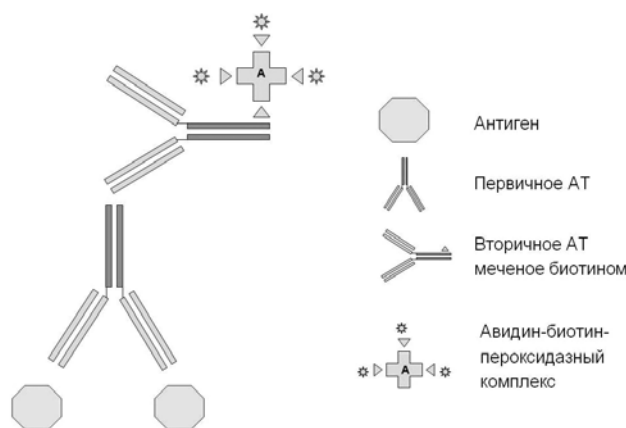


Рис. 2. Схема метода с биотин авидиновым комплексом [13].

меченые биотином вторичные антитела соединяются с первичными, 3. комплекс авидин-биотин-фермент, который присоединяется к биотину вторичных антител. Поэтому с одной молекулой антигена оказываются связанными три молекулы фермента. Данный метод был назван АВС-методом (Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macro-molecular Complex) [13].

Преимущества данного ИГХ метода по сравнению с остальными очевидны: использование вторичных антител в сотни раз повышает чувствительность определения антигена, требуется меньше первичных антител, возможность проведения реакции в течение 3 часов, приготовленный авидин-биотиновый комплекс может быть использован в течение нескольких дней. Недостатки: обязательное блокирование эндогенного биотина для предотвращения его неспецифического взаимодействия с авидином; в некоторых случаях эндогенный биотин может давать неспецифическое окрашивание (так называемый «фон»), что может затруднить определение искомого антигена.

ИГХ метод в практической онкологии.

В клиническом аспекте метод ИГХ анализа на современном этапе позволяет [4]:

- 1) осуществлять гистогенетическую диагностику опухолей;
- 2) определять нозологический вариант новообразования;
- 3) выявлять первичную опухоль по метастазу с неизвестным первичным очагом;
- 4) определять прогноз опухолевого заболевания;
- 5) определять злокачественную трансформацию клеток;
- 6) определять возможности таргетной терапии;
- 7) выявлять как резистентность, так и чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам;
- 8) определять чувствительность опухолевых клеток к лучевой терапии.

В 1994 году С. Таулог выполнил ретроспективный иммуногистохимический анализ 20000 низкодифференцированных новообразований и показал, что первоначальный гистологический морфологический диагноз (лимфома, рак, саркома, меланома и др.) оказался ошибоч-

ным в 50 % случаев [24]. К. Gatter проанализировал 120 недифференцированных опухолей: в 53 случаях установлен диагноз лимфома, в 43 – рак, 24 новообразования оказались не классифицированы. С применением набора антител 80 случаев были диагностированы как лимфомы (включая 29 ранее квалифицированных как карциномы) и 27 – аденокарциномы (включая 9 наблюдений бывших «лимфом»). Только 13 случаев (11 %) оказались не классифицированы [14].

Для ИГХ анализа первичных опухолей и их метастазов используется широкий спектр маркеров (биомаркер – индикатор нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологического ответа к терапевтическому вмешательству, который объективно измерен и оценен [7]). Среди них выделяют: цитоспецифичные (CD – антигены лейкоцитов, гладкомышечный актин, миоглобин, тиреоглобулин), тканеспецифичные (белки промежуточных филаментов, компоненты базальной мембраны, рецепторы), маркеры пролиферации (Ki-67, PCNA), опухольассоциированные антигены (CA 15-3, CA-125, CA 19-9), опухолевые маркеры: онкофетальные антигены (б-фетопротейн, раковоэмбриональный антиген), гормоны, ферменты, белковые продукты клеточных онкогенов и др.

В повседневной деятельности онколог ставит перед онкоморфологом задачи: выявить первичную опухоль и оценить злокачественный потенциал. Наличие тканеспецифичных маркеров в значительной части позволяет ответить на эти вопросы. CD15, CD30 – лимфома Ходжкина.  $\alpha$ -фетопротейн, гепатоцитарный антиген – гепатоцеллюлярная карцинома. CD117 (KIT) – гастроинтестинальные стромальные опухоли. CD10 (CALLA) – почкноклеточный рак, острая лимфобластная лейкемия. Простатспецифический антиген – рак предстательной железы. CD20 – В-клеточные лимфомы. CD3 – Т-клеточные лимфомы. НМВ-45, тирозиназа, мелан А – меланома. Тиреоглобулин, кальцитонин, TTF-1 – щитовидная железа. Сурфактант, TTF-1 – лёгкое. ER, PR – молочная железа. Также для определения аденокарцином (без уточнения локализации) используется карциноэмбриональный антиген, цитokerатины – позволяют дифференцировать карциномы (крайне редко встречаются в саркомах), нейроглиальные опухоли – нейронспецифическая энолаза, синаптофизин, глиальный фибриллярный кислый белок; мезотелиальные опухоли – мезотелин, кальретинин; герминогенные опухоли – PLAP, HCG.

Зачастую онколог, располагая анамнезом больного, результатами клинико-лабораторных исследований, настаивает на проведении «усечённого» ИГХ анализа, в рамках ключевых 2-3 маркеров, положительная реакция которых должна подтвердить его диагностическую гипотезу и сэкономить (по его мнению) значительные средства. Поэтому крайне важно знать, что ИГХ анализ, являясь дополнительным методом (исследование препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином – «золотой стандарт») должен включать как положительные результаты экспрессии маркеров, так и отрицательные, тем самым исключая другие

гипотезы. Особенно это актуально в случаях метастазов опухолей без выявленной первичной локализации. Как правило, онколог получает патоморфологическое заключение с перечисленными маркерами с положительной экспрессией, затем маркерами с отрицательной экспрессией, оценкой пролиферативной активности. В заключении он видит нозологическую единицу, и надо признать, что до сих пор для большинства клиницистов ИГХ анализ – это калейдоскоп маркеров («...из исследования в исследовании антитела одни и те же, а заключения каждый раз разные») в то время как для патологоанатома ИГХ анализ – это «игра в бисер», в которой всё имеет причинно-следственную упорядоченность.

В диагностическом процессе выбор антител может происходить двояко: поэтапно, постепенно увеличивая их спектр, либо можно сразу применять широкую панель реагентов. С одной стороны - значительная экономия реактивов с более высокими трудозатратами и длительным сроком выполнения, с другой – большой расход антител, незначительная часть которых помогает установить диагноз.



Рис. 3. Первый этап алгоритма ИГХ анализа аденокарцином неясной первичной локализации [13].

Продемонстрируем перечисленные принципы на примере ИГХ исследования метастазов аденокарцином неясной первичной локализации. Алгоритм ИГХ анализа злокачественных новообразований состоит из нескольких этапов. На первом этапе используется 4 тканеспецифичных моноклональных антитела к виментину (цитоплазматический белок промежуточных филаментов 3 группы, мол. масса 58 кДа, присутствует в мезенхимальных клетках и экспрессируется в большинстве сарком; наличие иммунореактивности виментина часто используется в качестве внутреннего контроля адекватного сохранения антигенов в ходе гистологической проводки), цитокератинам (белки промежуточных филаментов 1, 2 групп присутствуют в большинстве эпителиальных клеток), общему лейкоцитарному антигену (CD 45RO – семейство тирозиновых фосфатаз, которые экспрессируются на всех гематолимфоидных клетках и их предшественниках), белку S-100 (группа уникальных для нервной ткани кислых кальций-связывающих белков, неспецифичны для меланомы, но могут выявляться при липосаркоме, шванноме и др.; в нормальных тканях S-100 экспрессируется в глиальных, шванновских, миоэпителиальных, сустентакулярных клетках, меланоцитах, хондроцитах, адипоцитах, клетках Лангерганса)[9] (рис. 3).

В случае положительной реакции с цитокератинами на втором этапе исследуются цито- и органоспецифические признаки, для чего оценивают экспрессию CK7 и CK20. Это позволяет выделить среди низкодифференцированных эпителиальных опухолей переходноклеточные, плоскоклеточные, нейроэндокринные раки, аденокарциномы и мезотелиому [1]. На 3 этапе определяется органная локализация с помощью органоспецифических маркеров (рис. 4).

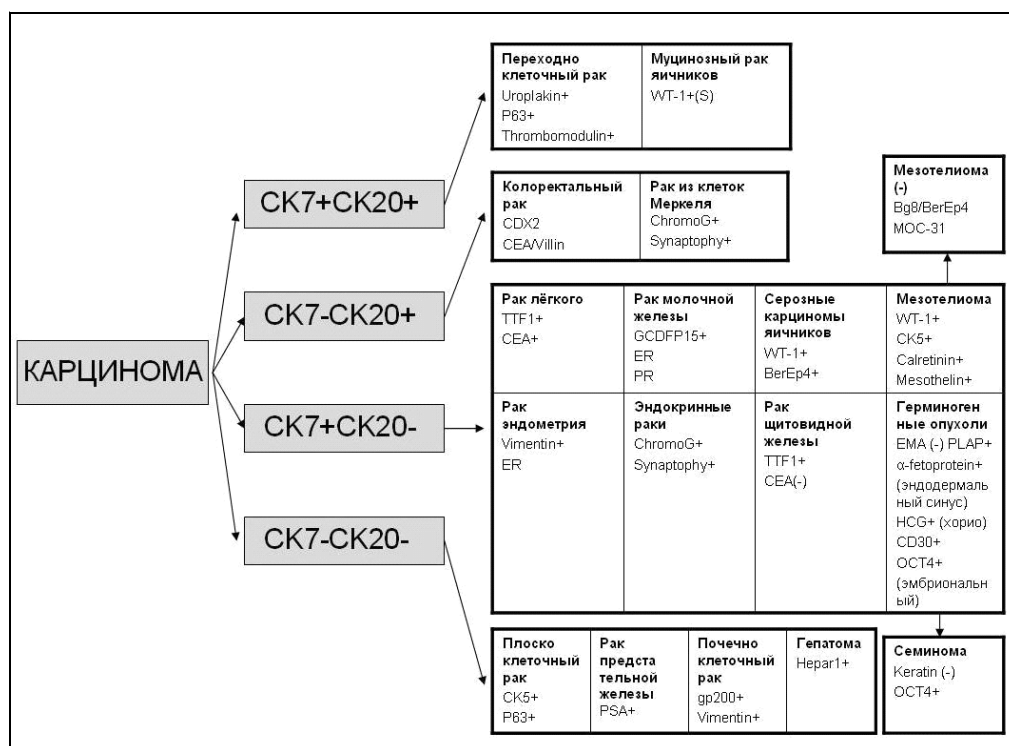


Рис. 4. Алгоритм ИГХ анализа аденокарцином неясной первичной локализации [13].

Таблица 1.

Основные технические проблемы ИГХ метода и способы их решения [5]

Возможные проблемы	Возможная причина	Способы устранения
1. Нет окрашивания в исследуемом и контрольном образцах	<p>А. Антитела не работают из-за неправильного хранения</p> <p>Б. Нарушена очередность этапов окрашивания</p> <p>В. Инактивированные первичные антитела</p> <p>Г. Несовместимость вторичных и первичных антител</p> <p>Д. Несовместимость буфера для подготовки реагентов энзима и субстрат-хромогена</p>	<p>А. Увеличить концентрацию антител в рабочем разведении Избегать повторного размораживания антител</p> <p>Б. Инкубация антител в правильном порядке Использование протокола</p> <p>В. Использовать новую партию антител (старые выбросить)</p> <p>Г. Вторичные антитела должны соответствовать первичным</p> <p>Д. Сравнить совместимость, повторить окрашивание</p>
2. Нет окрашивания в исследуемом образце, при адекватном окрашивании в контрольном	<p>А. Неправильная фиксация (образцы слишком долго фиксированы, вызывая «маскировку» антигена)</p> <p>Б. Использование плохо фиксированных или нефиксированных тканей</p> <p>В. Высыхание среза во время окрашивания</p> <p>Г. Для выбранного ИГХ метода уровень детекции антигена крайне низкий</p>	<p>А. Протеолитическое переваривание трипсином</p> <p>Б. Адекватная фиксация</p> <p>В. Контроль влажности во время исследования</p> <p>Г. Длительная инкубация с первичным антителом</p>
3. Слабое окрашивание	<p>А. Очень короткое время инкубации либо низкая концентрация разведённых антител</p> <p>Б. Срезы избыточно накапливают жидкость в буфере</p>	<p>А. Индивидуальный подбор титра антител и времени инкубации</p> <p>Б. Вытереть излишки жидкости вокруг среза</p>
4. Избыточное фоновое окрашивание	<p>А. Использование старых растворов</p> <p>Б. Не подавлена активность эндогенной пероксидазы</p> <p>В. Неправильное разведение антител</p> <p>Г. Неспецифическое связывание с белками</p> <p>Д. Избыточная инкубация с субстрат-хромогеном</p> <p>Е. Срезы плохо промыты</p> <p>Ж. Неполное удаление парафина</p>	<p>А. Приготовить свежий раствор</p> <p>Б. Повторить окрашивание после 10 мин 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p> <p>В. Использовать реагенты в большем разведении</p> <p>Г. Использовать неиммунную сыворотку того же животного</p> <p>Д. Снизить время инкубации</p> <p>Е. Промыть повторно</p> <p>Ж. Повторная депарафинизация</p>

Положительная реакция с виментином возможна при новообразованиях мезенхимальной природы (лимфомы, саркомы), некоторыми нейрогенными опухолями либо меланомами (рис. 5) [1].

ИГХ анализ опухолей мягких тканей (ОМТ), особенно сарком, имеет ряд особенностей. В отдельных случаях ОМТ диагноз может быть установлен без проведения ИГХ анализа. В некоторых опухолях экспрессируются специфические антитела, однако зачастую исследование необходимо начинать с самого начала (CD45RO, VIM, S-100, AE 1/3). Заключение формулируется на основании клинического течения заболевания, морфологической картины опухоли на светооптическом уровне и результатов ИГХ анализа и, если необходимо, другими вспомогательными методами молеку-

лярной и цитогенетики. Условно (по форме образующих клеток) ОМТ делятся на: 1. веретенчатые, 2. эпителиоидноклеточные, 3. мелкокруглоклеточные, 4. плеоморфные [12]. Алгоритмы анализа каждой группы представлены на рис. 5-9 [13] (каждый из которых содержит обязательный этап исключения эпителиальной природы новообразования). Основные технические проблемы метода и способы их решения приведены в табл. 1.

### Возможности и ограничения ИГХ метода в научной деятельности

В научных исследованиях ИГХ метод обладает следующими преимуществами:

1. Видимость местоположения и распределения белка.

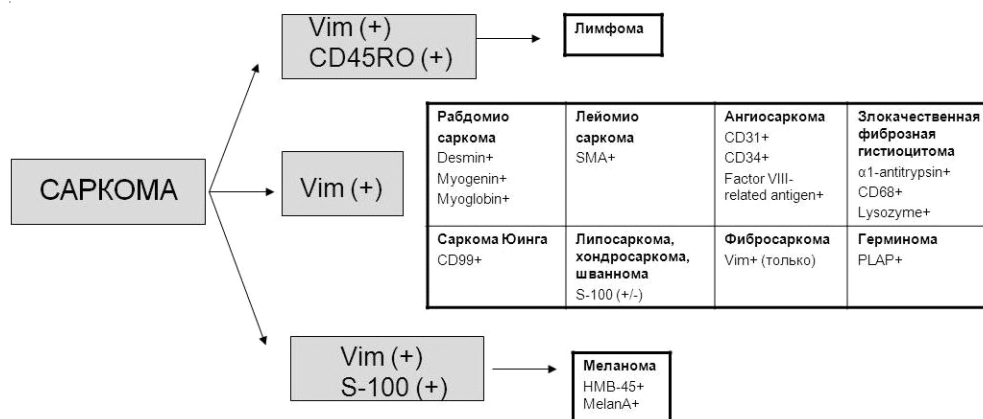


Рис. 5. ИГХ анализ виментин-положительных новообразований [1].

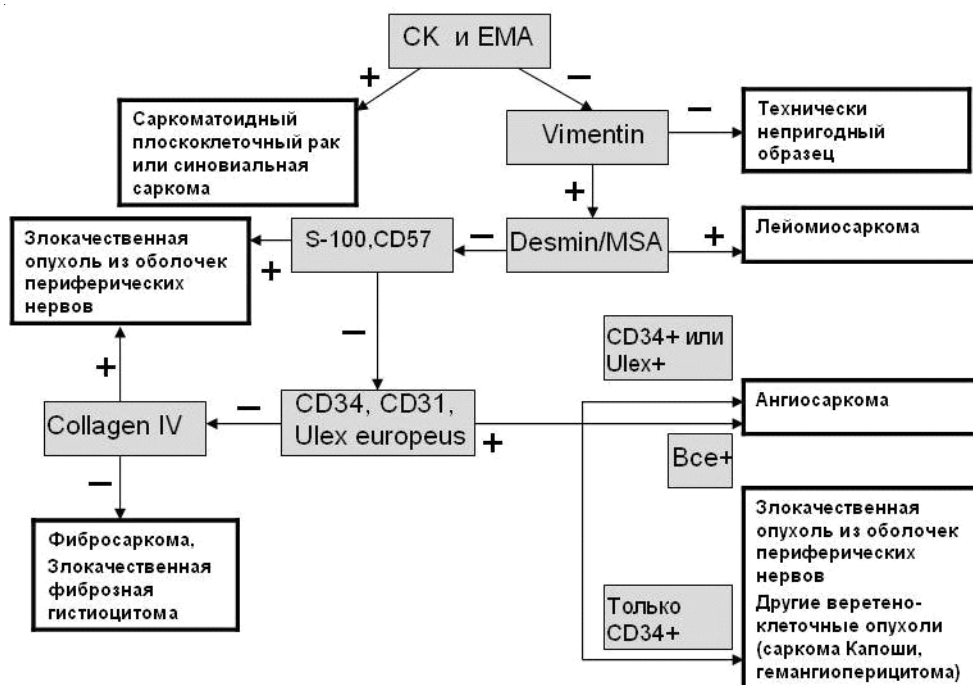


Рис. 6. Алгоритм ИГХ анализа веретенноклеточных опухолей [13].

2. Обнаружение белков в больших и маленьких кусочках исследуемой ткани и образцов, фиксированных в формалине.

3. Подтверждение других исследований с высокой пропускной способностью (ДНК-биочипы).

Однако присутствуют факторы, которые значительно ограничивают использование ИГХ метода:

1. Ограниченная способность количественного определения содержания белка.
2. Многообразие типов антител.
3. Ограниченная способность определения модификаций белка.
4. Нехватка или отсутствие критериев доказательной медицины.
5. Одновременно возможно определить не более 2 антигенов.

6. Большое количество систем подсчета и ограниченная воспроизводимость результатов.

7. Отсутствие «нормализованных» методов.
8. Ограниченная пропускная способность.
9. Ограниченные возможности составления «полной иммуногистохимической карты» опухолевого образца (только с ДНК-биочипами) [16].

Тканевая микроматрица (Tissue microarrays – TMA) [3, 17] – это парафиновый блок, в котором упорядоченно расположены фрагменты тканей, вырезанные из заранее определенных участков других парафиновых блоков. Идея создания парафинового блока, содержащего набор разнообразных тканей, была предложена Н. Battifora в 1986 г. [8] Им была разработана простая методика приготовления из многочисленных столбиков ткани толщиной около 1 мм компактного парафиново-

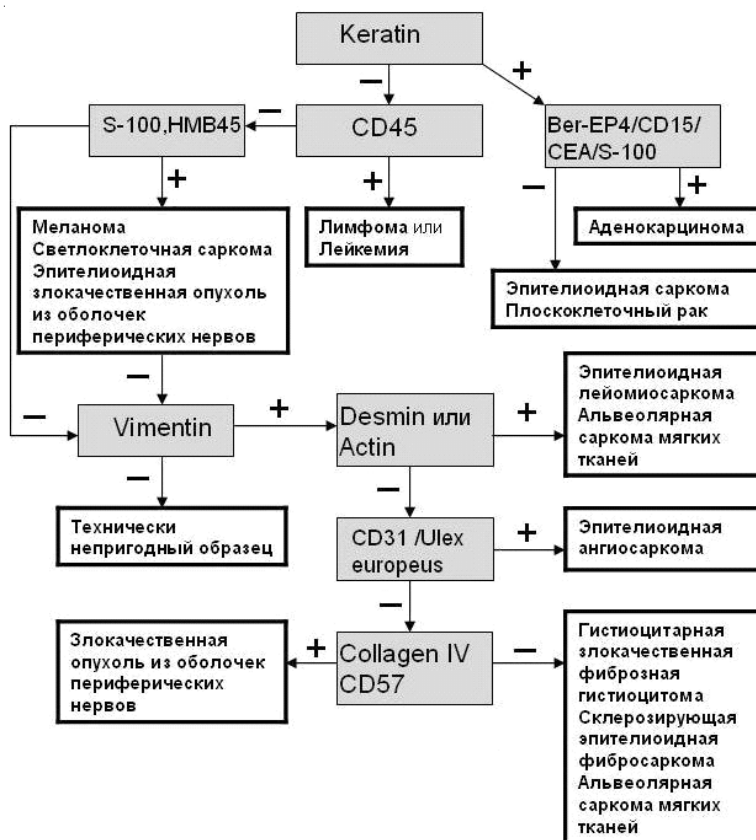


Рис. 7. Алгоритм ИГХ анализа эпителиоидноклеточных опухолей [13].

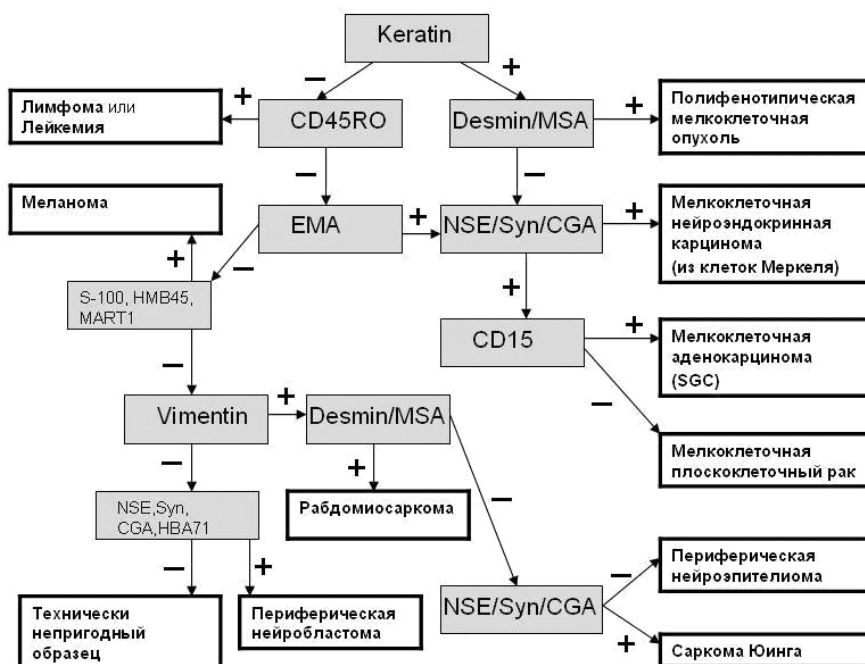


Рис. 8. Алгоритм ИГХ анализа мелкокруглоклеточных опухолей [13].

го блока, срезы которого позволяли исследовать на одном предметном стекле результаты иммуногистохимической реакции изучаемого антитела с десятками тканевых образцов. Современные устройства для тканевых микроматриц позволяют размещать в одном парафиновом блоке 200-300 стержней опухолей 0,6-1,5 мм диаметром, что в какой-то мере позволяет повысить пропускную способность в иммуногистохимии. В скрининговых исследованиях он значительно облегчает и удешевляет процесс. Некоторые исследователи предлагают оригинальные методики изготовления тканевых микроматриц с помощью подручных средств и смекалки [28].

Сравнение ИГХ анализа с альтернативными методами определения биомаркеров.

Выявление злокачественной опухоли, установление генеза, определение объективного ответа на лечение возможно, с одной стороны, с помощью ИГХ метода и ИГХ анализа в диагностической патологии и, протеомические (протеомика — наука, основным предметом изучения которой являются белки и их взаимодействия в живых организмах, в том числе — в человеческом [6]) количественная полимеразно-цепная реакция в реальном времени и ДНК-биочипы, с другой. [15, 16]. Недавно предложенные молекулярные классификации злокачественных новообразований и их использование в планировании лечения рака основаны на результатах ДНК-биочипирования - метода с четкой методологией и аналитической составляющей. Эта методика позволила в некоторых случаях выявить новые характеристики опухолей, которые не определялись методами световой микроскопии [15, 21, 22,26]. Методы ДНК-биочипов позволяют дифференцировать метастазы в лёгкие и первичные опухоли лёгкого [23], метастазы рака толстой кишки и яичников [19], опухоли неясной первичной локализации [27]. S. Cleator [10]

показал, что наличие примеси неопухолевых клеток в образцах, подвергнутых экспрессии гена, увеличивает уровень ошибок мультигенных предикторов, тем самым доказав существенное влияние неопухолевого продукта на профиль экспрессии гена в исследуемых образцах рака молочной железы.

При имеющихся преимуществах протеомических методов по сравнению с ИГХ методом (определение сотен и тысяч пептидов, высокая пропускная способность, высокая точность количественного определения, возможность определения модифицированных белков, огромные возможности определения клинических биомаркеров, создание баз данных обнаруженных генов и белков) необходимость использования свежих и замороженных образцов ткани и затруднительное обоснование того, что выявленный белок принадлежит именно опухолевой клетке (не говоря о локализации его в клетке) сводят на нет их применение в практической деятельности.

Н. Idikio предполагает, что в будущем опухолевый материал, полученный при биопсии, может быть использован для:

- проведения гистологического исследования с окрашиванием гематоксилином и эозином, ИГХ исследования с использованием критериев доказательной медицины;
- выделение молекул белков для двухмерного электрофореза в геле, белкового иммуноблота (western blotting), массовой спектрометрии;
- выделение информационных рибонуклеиновых кислот, изучение одиночных нуклеотидных полиморфизмов, вариаций числа копий генов, выполнение сравнительной геномной гибридизации [16].

О перспективах развития ИГХ метода в патологоанатомических лабораториях России.

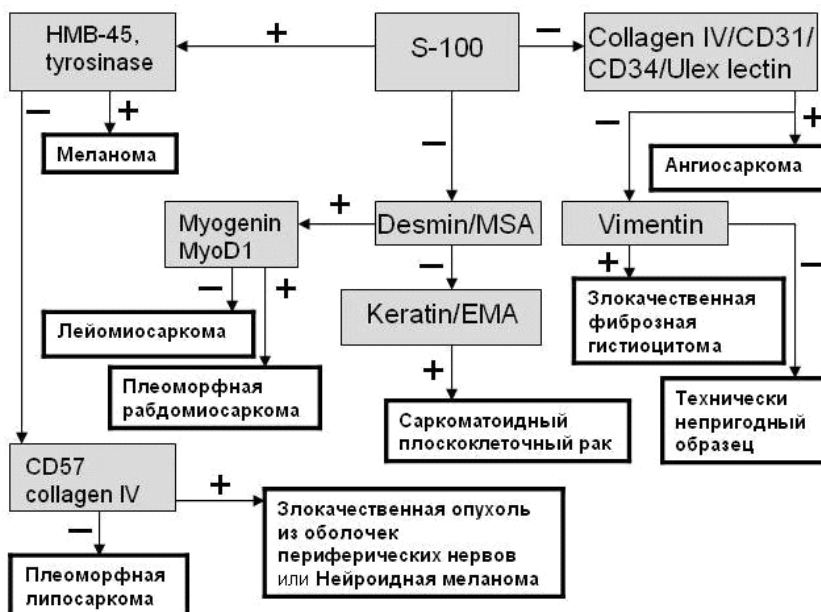


Рис. 9. Алгоритм ИГХ анализа эпителиоидноклеточных опухолей [13].

Интенсивное развитие иммуногистохимии на территории Российской Федерации отчасти связано с прорывом в лечении лимфопролиферативных заболеваний. Назначение дорогостоящих препаратов сопряжено с обязательной ИГХ верификацией морфологического диагноза. Опыт работы лабораторий, занимающихся диагностикой заболеваний лимфоидной ткани в России, показал отсутствие единых стандартов работы и плохое качество многих тестов. Данные об общем количестве лабораторий, осуществляющих ИГХ-диагностику в РФ, отсутствуют. В 2010 году 36 лабораторий, стремясь к повышению качества диагностики, приняли участие в системе добровольного внешнего контроля качества [2]. Лаборатория получала набор тестовых объектов, окрашивала по 2 среза имеющимися у них в лаборатории антителами, используемыми для диагностики лимфопролиферативных заболеваний, выбирали лучший препарат и отправляли экспертам для оценки. Окрашенные препараты обезличивались, и ни один из специалистов, оценивавших качество микропрепаратов, не имел доступа к информации о происхождении стекол. Оценку качества ИГХ окрашивания проводили 5 патоморфологов в два этапа (вначале каждый давал независимую оценку в баллах без обсуждения результатов, а затем результаты всех экспертов были собраны в таблицы и сопоставлены). В работе использовали следующие критерии оценки и качества окрашивания: оценка 5 – безупречно окрашенный препарат; 4 – хорошо окрашенный препарат, полностью пригодный для диагностики, могли присутствовать незначительные дефекты, которые не влияли на информативность окрашивания; 3 – присутствуют существенные дефекты окрашивания, можно обнаружить информативные участки, препарат минимально пригоден для диагностики; 2 – окрашивание отсутствует, неспецифическое окрашивание, сильное фоновое окрашивание, препарат для диагностики не пригоден. Средний балл всех лабораторий составил 3,29, индивидуальный средний балл был выше общего среднего в половине лабораторий. Оценка присланных препаратов показала, что только 2 из 36 лабораторий одновременно располагали полным набором антител и не имели ни одной неудов-

летворительной оценки, и лишь в одной лаборатории все полученные результаты были оптимального качества (все препараты всеми экспертами оценены на 4 и 5). В 6 лабораториях более половины представленных микропрепаратов были окрашены неудовлетворительно [2]. Авторы полагают, что оценка 3 балла не может быть ориентиром в работе. Сравнение результатов с данными Q. Nordi [20] показало, что по большинству маркеров наши показатели ниже на 30-50 %. Выводы: 1. В значительной части лабораторий-участников выявлены существенные дефекты технологии ИГХ-окрашивания 2. Обнаруженные дефекты ИГХ-окрашивания могут критически влиять на качество диагностики лимфом 3. Диагностические возможности некоторых лабораторий участников не соответствуют решаемым задачам из-за отсутствия ряда «ключевых» антител [2].

Возможные выходы из сложившейся ситуации следующие: первый – приостановить деятельность лабораторий, не прошедших добровольное (!) тестирование и проводить ИГХ-анализ лимфом в референсных центрах, второй – повышать качество методики проведения ИГХ-анализа на основе индивидуальных замечаний и рекомендаций экспертов в каждой конкретной лаборатории. При этом качество морфологической диагностики зависит от множества параметров, некоторые из которых имеют субъективную природу и связаны с уровнем профессиональной подготовки патоморфологов (по мнению А.Э. Мациониса, «ответственность патологоанатома за поставленный диагноз – совесть и память», с чем трудно не согласиться). Очевидно, что и в России назрела необходимость утверждения порядка и положений по ИГХ-диагностике и разработке требований, предъявляемых к лабораториям и специалистам.

Таким образом, диагностика злокачественных опухолей в онкологии на современном этапе без проведения ИГХ исследования невозможна, однако очевидна необходимость его стандартизации, совершенствования методов подсчёта с использованием критериев доказательной медицины, учётом функциональных состояний белков, анализа изображений с помощью прикладного программного обеспечения для систем визуализации.

## Список литературы

1. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Петров С.В., Райхлин Н.Т. // Казань. – 2000. – 456 с.
2. Криволапов Ю. А. Первый опыт проведения внешнего контроля качества иммуногистохимических исследований в диагностике лимфопролиферативных заболеваний / Криволапов Ю. А., Пешков М. В., Леенман Е. Е. с соавт. // Арх. патол. – 2011. – № 2. – С.25-32.
3. Криволапов Ю.А. Применение тканевых матриц в иммуногистохимии / Криволапов Ю. А., Храмов А. И. // Арх. патол. – 2005. – № 2. – С.48-50.
4. Мацко Д.Е. Современные методы в практической онкоморфологии / Мацко Д.Е., Шелехова К.В. // Практическая онкология. – 2007. – т.8. – №4. – С.182-187.
5. Al-nafussi A. Tumor diagnosis: practical approach and pattern analysis / Al-nafussi A. – Oxford University Press, 2005. – 1338 p.
6. Anderson N.L. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words / Anderson N.L., Anderson N.G. // Electrophoresis. – 1998. – Vol.19. – P.1853-1861.



7. Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework / Biomarkers Definitions Working Group // Clin. Pharmacol. Ther. – 2001. – Vol. 69. – P.89-95.
8. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing / Battifora H. // Lab. Invest. – 1986. – Vol. 55. – P.244-248.
9. Chu P. Modern immunohistochemistry / Chu P, Weiss L. – Cambridge Academy, 2009. – 712 p.
10. Cleator S. The effect of the stromal component of breast tumours on prediction of clinical outcome using gene expression microarray analysis / Cleator S.J., Powles T.J., Dexter T. et al. // Cancer Res. – 2006. – Vol. 8. – P.32.
11. Coons A.H. Immunological properties of an antibody containing a fluorescence group / Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1941. – Vol.47. – P.200-202.
12. Fisher C. Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue tumours / Fisher C. // Histopathology. – 2011. – Vol.58. – P.1001-1012.
13. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry / D. J. Dabbs. – Churchill Livingstone, 2002. – 828 p.
14. Gatter K.C. Clinical importance of analysing malignant tumours of uncertain origin with immunohistological techniques / Gatter K.C., Alcock C., Heryet A., Mason D.Y. // Lancet. – 1985. – Vol.1. – P.1302-1305.
15. Glinsky G.V. Classification of human breast cancer using gene expression profiling as a component of the survival predictor algorithm / Glinsky G.V., Higashiyama T., Glinski A.B. // Clin. Cancer Res. – 2004. – Vol.10. – P.2272-2283.
16. Idikio H.A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains / Idikio H.A. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2010. – Vol.3. – P.169-176.
17. Kononen J. Tissue microarray for high-throughput molecular profiling of tumor specimens / Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., et al. // Nat. Med. – 1998. – Vol.4. – P.844-847.
18. Köhler G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / Köhler G., Milstein C. // Nature. – 1975. – Vol. 256. – P.495-497.
19. Nishizuka S. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling / Nishizuka S., Chen S.T., Gwadry F. et al. // Cancer Research. – 2003. – Vol. 63. – P.5243-5250.
20. Nordi Q.C. <http://www.nordiqc.org>
21. Pinkel D. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer / Pinkel D., Albertson D. // Nature Genetics Supplement. – 2005. – №37. – P.11-17.
22. Rhoads D. Integrative analysis of the cancer transcriptome / Rhoads D., Chinnayan A. // Nature Genetics Supplement. – 2005. – №37. – P. S31-37.
23. Talbot S. Gene expression profiling allows distinction between primary and metastatic squamous cell carcinomas in the lung / Talbot S., Estilo C., Maghami E. et al. // Cancer Research. – 2005. – Vol. 65. – P.3063-3071.
24. Taylor C.R. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for surgical pathologist / Taylor C.R., Cote R.J. – Philadelphia, 1994. – 450 p.
25. Sternberger L.A. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes / Sternberger L.A., Hardy P.H., Cuculis J.J. et al. // J. Histochem. Cytochem. – 1970. – Vol.18. – P.315-333.
26. Su A. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures / Su A., Welsh J., Sapinoso L. et al. // Cancer Res. – 2001. – Vol.61. – P.7388-7393.
27. Veradachary G. Molecular profiling of carcinoma of unknown primary and correlation with clinical evaluation / Veradachary G., Talantov D., Raber M., et al. // J. Clin. Oncol. – 2008. – Vol.26. – P.4442-4448.
28. Vogel U.F. Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder / Vogel U.F., Bueltmann B.D. // Am. J. Clin. Pathol. – 2006. – Vol. 126. – P.342-348.