

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)
Отдел учебно-методической работы

**Артемьева А. С., Мурашкина А. А.,
Рогачев М. В.**

**Иммуногистохимия:
основы, методические подходы,
группы маркёров**

Учебное пособие

Санкт-Петербург
2020

УДК:616-006-076.5:612.017.1:577.1(07)
ББК:55.6я7

Артемьева А. С., Мурашкина А. А., Рогачев М. В. Иммуногистохимия: основы, методические подходы, группы маркёров: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – СПб.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. – 76 с.

ISBN 978-5-6045022-6-6

Рецензент: доктор медицинских наук, профессор, врач высшей квалификационной категории, главный научный сотрудник, клинический иммунолог ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России Калинина Наталия Михайловна.

В учебном пособии представлена информация о биологических и химических основах метода иммуногистохимии, варианты его реализации на практике, группы иммуногистохимических маркёров, характеристика доступных и часто используемых представителей каждой из групп. Представленные данные основаны на собственном опыте патологоанатомического отделения и научной лаборатории морфологии опухолей, опыте, систематизированном в отечественных и зарубежных руководствах по иммуногистохимии. Пособие содержит информацию, необходимую для внедрения методики иммуногистохимии в лаборатории различного уровня, оптимизации результатов исследования, организации системы контроля качества данного вида исследований, что крайне актуально для клинической практики.

Учебное пособие предназначено для врачей-патологоанатомов, для персонала, задействованного в реализации иммуногистохимического метода окрашивания, для научных сотрудников, а также для обучающихся в системе высшего образования (аспирантура, ординатура, специалитет) и дополнительного профессионального образования (повышение квалификации, профессиональная переподготовка).

Утверждено
в качестве учебного пособия
Ученым советом ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
протокол № 5 от 9 июня 2020 г.

ISBN 978-5-6045022-6-6

© Артемьева А.С. Коллектив авторов, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Глава 1. Теоретические основы иммуногистохимии	6
1.1. История развития иммуногистохимии	6
1.2. Представление о первичных антителах	8
1.3. Образование комплекса антиген-антитело	10
1.4. Способы визуализации комплекса антиген-антитело	14
1.5. Подавление активности эндогенной пероксидазы и щелочной фосфатазы	17
Глава 2. Методы иммуногистохимической окраски	19
2.1. Оборудование для проведения иммуногистохимического окрашивания	19
2.2. Прямой метод иммуногистохимической окраски	21
2.3. Непрямой метод иммуногистохимической окраски	22
Глава 3. Подготовительный этап обработки срезов	25
3.1. Депарафинизация среза и демаскировка антигена	25
3.2. Предварительная ферментативная обработка	26
Глава 4. Группы первичных антител	28
4.1. Диагностические антитела	29
4.1.1. Эпителиальные, органо/тканеспецифичные маркёры	29
4.1.2. Нейроэндокринные маркёры	40
4.1.3. Меланоцитарные маркёры	42
4.1.4. Мышечные и сосудистые маркёры	44
4.1.5. Герминогенные маркёры	48
4.2. Прогностические и предиктивные антитела	50
Глава 5. Стандартизация иммуногистохимических методов	53

5.1. Преаналитическая стадия	53
5.1.1. Обработка формалином	53
5.1.2. Обработка декальцинацирующими агентами	55
5.1.3. Влияние температуры	57
5.2. Аналитическая стадия	58
5.3. Постаналитическая стадия	61
Контрольные вопросы	63
Тестовые задания	66
Список литературы	75

Введение

Иммуногистохимическое исследование сегодня является неотъемлемой частью диагностического процесса при изучении новообразований ряда локализаций. Помимо диагностических задач метод позволяет с достаточной степенью надежности выявлять прогностические и предиктивные параметры.

На основании результатов иммуногистохимического исследования планируется лечебная тактика в отношении пациента, в том числе решается вопрос о наличии показаний к назначению таргетных и иммуноонкологических препаратов.

Иммуногистохимия – сложный многоэтапный процесс, на результат которого влияет масса факторов, как вне иммуногистохимической лаборатории, так и в ее стенах.

Для того, чтобы понять причинно-следственные связи между наблюдаемыми результатами окрашивания и тем, что происходило с гистологическим материалом в процессе его обработки и окрашивания, необходимо ознакомиться с основами взаимодействия используемых на разных этапах веществ.

В учебном пособии представлены информация о биологических и химических основах метода иммуногистохимии, варианты его реализации на практике, группы иммуногистохимических маркёров, характеристика доступных и часто используемых представителей каждой из групп.

Представленные данные основаны на собственном опыте патологоанатомического отделения и научной лаборатории морфологии опухолей, опыте, систематизированном в отечественных и зарубежных руководствах по иммуногистохимии. Пособие содержит информацию, необходимую для внедрения методики иммуногистохимии в лаборатории различного уровня, оптимизации результатов исследования, организации системы контроля качества данного вида исследований, что крайне актуально для клинической практики.

Глава 1.

Теоретические основы иммуногистохимии

Современное определение иммуногистохимии (иммуноцитохимии): иммуногистохимия (иммуноцитохимия) – один из методов окраски биологических объектов, основанный на специфическом связывании локализованных в объекте антигенов с антителом и выявлении результатов этого связывания на светооптическом уровне.

1.1. История развития иммуногистохимии

Развитие данного метода окраски началось в 1940-х годах с пионерской работы Albert H. Coons et al. [4], в которой была показана возможность обнаружения антигенов в тканях млекопитающих взаимодействием антиген-антитело с флуоресцентной визуализацией.

Дальнейшее развитие иммуногистохимии (1960-70 гг.) было связано с выбором методики мечения антител радиоактивными элементами и визуализацией по средствам радиографии, использование ферментных меток.

Следующий важный шаг в развитии технологии окраски был связан со способом получения моноклональных антител по гибридной технологии.

Прорывным шагом совершенствования методики иммуногистохимической окраски в 1980-х годах явилось развитие авидин-биотиновой методики, которая выразилась в конъюгации вторичных антител с биотином меченным ферментом, выступающим в качестве связующего звена между комплексом антиген-первичное антитело и вторичное антитело-авидин (или стрептавидин)-биотин-ферментным комплексом.

В качестве фермента в биотинированных вторичных антителах использовалась пероксидаза хрена, значительно повысившая чувствительность реакции [12].

На сегодняшний день в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России) иммуногистохимическое исследование проводится на повседневной основе для диагностики опухолей различной локализации и является обязательным дополнительным методом в дифференциальной диагностике опухолей.

В таблице 1 представлено количество иммуногистохимических исследований с 2017 года по I полугодие 2020 года в различных локализациях.

Таблица 1

Количество иммуногистохимических исследований
в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2017 года по I полугодие
2020 года в различных локализациях

Локализация	Количество иммуногистохимических исследований			
	2017 г.	2018 г.	2019 г.	I полугодие 2020 г.
Молочная железа	8405	10607	10405	8539
Лимфатические узлы	2698	2 891	3 344	2996
Гемиторакс	2702	3 054	3004	2607
Мочевыделительная система	487	562	586	496
Мужские половые органы	456	427	546	293
Женские половые органы	2375	4 005	4657	2854
Голова и шея	789	995	798	805
ЦНС	325	451	565	609
Мягкие ткани	1280	1 650	1866	1534
Кости и суставы	690	916	1342	1215
Итого	14748	17541	17885	14931

1.2. Представление о первичных антителах

Специфические антитела – иммуноглобулины, Ig (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD), вещества белковой природы, которые образуются в организме в ответ на антигены, которые, в свою очередь, являются чужеродными веществами сложной органической природы, способными вызывать иммунные реакции. Наиболее часто в иммуногистохимии используются иммуноглобулины IgG, IgM.

Имуноглобулины IgG состоят из двух легких, L, и двух тяжелых, H, полипептидных (белковых) цепей.

На рисунке 1 представлено схематическое изображение структуры иммуноглобулина IgG с указанием функциональных участков или фрагментов – моновалентных антигенсвязывающего фрагмента (Fab), кристаллического фрагмента (Fc), бивалентного антигенсвязывающего фрагмента $F(ab')_2$, а также доменов – переменные домены (V) и константные домены (C) в тяжелой и легкой цепях, соответственно, VH и VL, образующих антигенсвязывающий центр [1].

Небольшой участок антигена, с которым будет связываться антитело, называется эпитопом или антигенной детерминантой.

Имуноглобулин IgM представляет собой пентамер, состоящий из субъединиц, пространственной структурой напоминающих «звезду».

Антитела по популяции можно разделить на гетерогенную и гомогенную популяции и, соответственно, по своей специфичности к антигенным детерминантам – на поликлональные и моноклональные.

Поликлональные антитела получают иммунизацией лабораторных животных (кролик, мышь, козел, овца), при которой в ответ на введение антигена начинают вырабатываться специализированные В-лимфоциты, производящие антитела, специфичные к этому антигену.

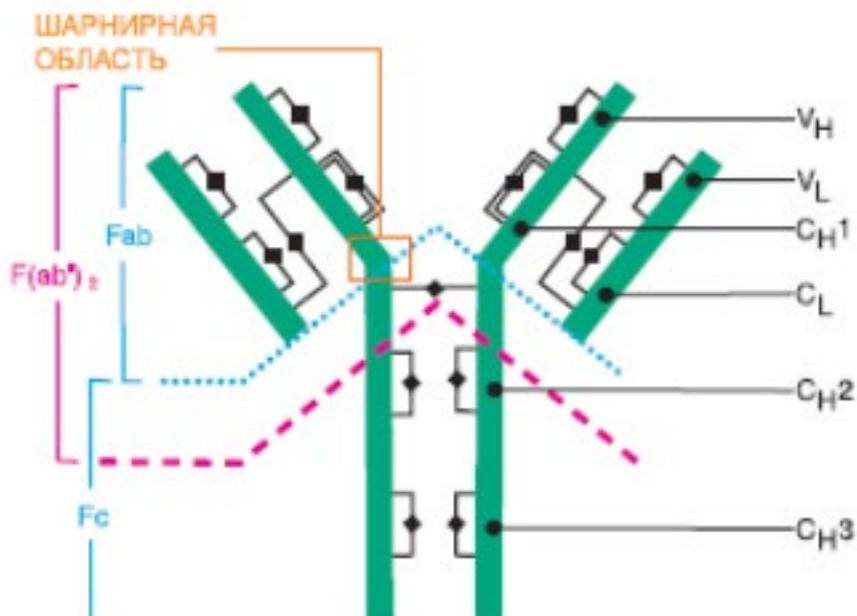


Рис. 1. Схематическое представление структуры IgG (приводится по [1]).

На следующем этапе можно, например, произвести выделение В-лимфоцитов и произвести процедуру слияния В-лимфоцитов с клетками миеломы с получением гибридных клеток, которые способны производить антитела против конкретного антигена, и на данном этапе получают поликлональные антитела.

После введения чужеродного белка – антигена – антитела вырабатываются разными клонами плазматических клеток, которые избирательно связываются с различными эпитопами антигена и имеют различные иммунохимические свойства.

Таким образом получается гетерогенная смесь антител, направленных против различных эпитопов одного и того же антигена. В составе поликлональных антител может фрагментарно присутствовать IgM. Он обнаруживается только у вновь иммунизированного

животного с момента введения антигена, далее в течение недели элиминируется.

Для получения моноклональных антител необходимо селектировать клетки. После проведения процедуры слияния В-лимфоцитов с плазмócитами необходимо специальными способами выявить клетки нужной специфичности и селективно их клонировать.

При сравнении поликлональных и моноклональных антител выявляются как их преимущества, так и недостатки.

Использование поликлональных антител в силу их мультиклональности повышает способность узнавать множество эпитопов на одной белковой молекуле, в то время как действие моноклонального антитела направлено против одного эпитопа.

В том случае, если произойдет повреждение данной антигенной детерминанты в результате предобработки ткани, специфического связывания и диагностической окраски ткани не произойдет.

В то же время мультиклональность повышает вероятность перекрестной реактивности с другими белками, имеющими схожую с антигеном аминокислотную последовательность, что приведет к фоновому окрашиванию либо ложным результатам.

1.3. Образование комплекса антиген-антитело

Природа взаимодействия антиген-антитело носит преимущественно физический характер.

В качестве примера, иллюстрирующего взаимодействие антиген-антитело, на рисунке 2 представлены аминокислотные последовательности и стереодиаграмма комплекса взаимодействия Fab НуHEL-63 с HEL (лизосимом белка куриного яйца).

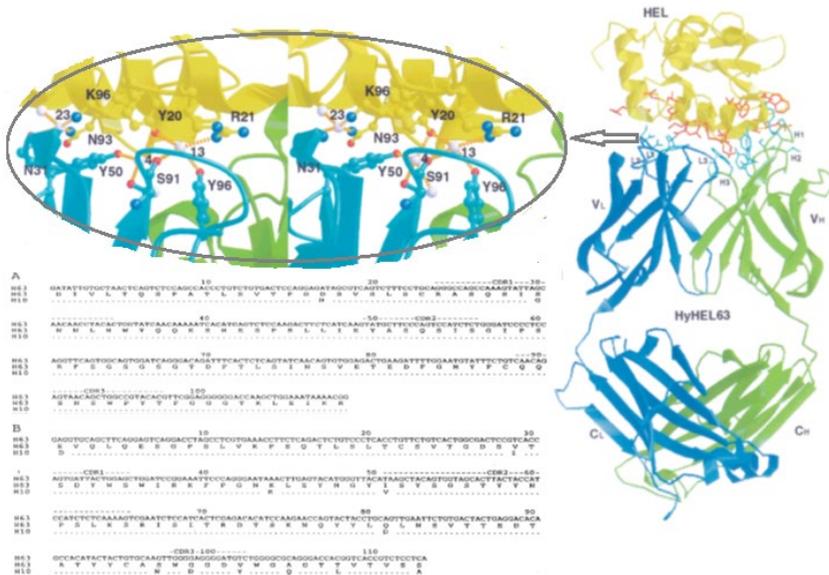


Рис. 2. Пример взаимодействия антиген-антитело: трехмерная структура Fab HyHEL-63 в комплексе с HEL (лизоцимом белка куриного яйца) – (комплементарное связывание А- и В-последовательностей аминокислот).

Оранжевым цветом указаны водородные связи, HEL – желтый, L-цепи – голубые, H-цепи – зеленые, атом азота – синяя сфера и атом кислорода – красная сфера.

Водородные связи представлены оранжевыми пунктирными линиями (приводится по [8]).

Основные силы взаимодействия, реализующиеся при связывании эпитопа антигена с комплементарной ему аминокислотной последовательностью антитела, следующие:

- 1) электростатические силы, обусловленные взаимным притяжением противоположно заряженных ионизированных функциональных групп (например, аминогруппой NH_3^+ и карбоксильной группой COO^-);

2) водородные связи, возникающие между электроотрицательным атомом и атомом водорода Н, связанным ковалентно с другим электроотрицательным атомом, (например, в группах

-ОН,
-NH₂,
-COОН);

3) гидрофобные взаимодействия – обеспечивают до 50% всего сродства между антигеном и антителом, возникают между гидрофобными группами белков (-CH₃, -CH₂ и др.);

4) сила Ван-дер-Ваальса – межмолекулярные силы, возникающие при поляризации молекул и образовании диполей.

На рисунке 3 представлена схематическая иллюстрация взаимодействия комплекса антиген-антитело.

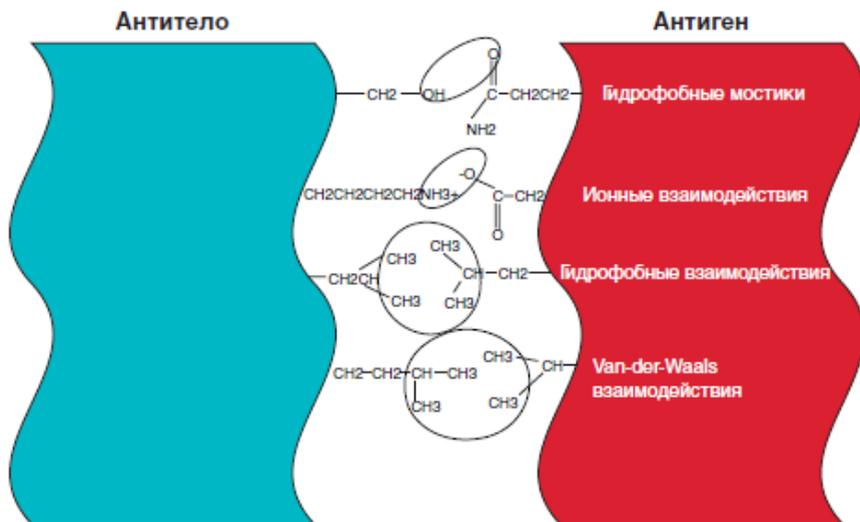


Рис. 3. Схематическое представление сил взаимодействия в комплексе антиген-антитело (приводится по [1]).

По взаимодействию антиген-антитело получаемые антитела характеризуются по следующим параметрам [1]:

1. Аффинность антитела связана с областью взаимодействия и определяется той же последовательностью аминокислот, которая определяет специфичность. Показателем аффинности антитела является константа ассоциации (K_a) связывания между антителом и его антигенной детерминантой.

Ее значение может варьировать от 10^3 до 10^{10} л/моль и является обратной величиной концентрации, выраженной в моль/л. Чем выше истинная аффинность антитела, тем меньшая концентрация антигена необходима для насыщения доступных мест связывания (достигается равновесие).

2. «Перекрестная реактивность» обозначает иммунохимическую активность, которая может наблюдаться как между антителом и двумя или более антигенами, так и, наоборот, при реакции антигена с несколькими различными антителами. Причиной в каждом случае является наличие, по крайней мере, одного общего эпитопа у нескольких антигенов.

3. Скорость реакции антител зависит от различных факторов: продолжительности фиксации ткани, концентрации антител, температуры окружающей среды и других факторов.

Для достижения максимальной реактивности в некоторых случаях может потребоваться до 48 часов инкубации первичного антитела.

4. Стабильность антител значительно зависит от метода очистки и условий хранения, а также от способа применения. Среди изменений, отмеченных после длительного хранения, чаще всего встречается образование растворимых агрегатов и впоследствии преципитирующихся полимеров.

Эти изменения, вероятно, являются результатом гидрофобного взаимодействия между молекулами IgG в растворе.

1.4. Способы визуализации комплекса антиген-антитело

Визуализация комплекса антиген-антитело – превращение комплекса последовательных взаимодействий в окрашенные конечные продукты, осуществляется с помощью «меток» на молекуле антитела.

Мечение антител может быть осуществлено введением специальных репортерных молекул, например, люминофоров, ферментов.

При использовании люминофоров для визуализации в иммунофлуоресцентной методике окрашивания возникают затруднения, связанные с коротким временем хранения препаратов – 1-2 недели и сильной автофлуоресценцией препаратов. Поэтому наиболее широкое распространение получило мечение антител ферментами.

Как известно, ферменты – обширный класс белковых катализаторов, включающих в себя гидролитические ферменты (эстеразы, пептидазы, амидазы), окислительно-восстановительные ферменты (дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, редуктазы), трансферазы и др.

Ферменты включены в комплекс реагентов для иммуногистохимии по причине способности выступать в качестве мостика – с одной стороны взаимодействовать своей белковой частью с белковой частью вторичного антитела, а с другой стороны – участвовать в окислительно-восстановительной реакции за счет присутствия переходных металлов в их активном центре.

Ферменты для иммуногистохимической реакции должны удовлетворять нескольким основным требованиям: быть доступными в высокоочищенной форме, хорошо конъюгировать с антителом, т.е. ковалентно связываться с антителом или авидином, быть стабильными в рабочих условиях.

Активность фермента зависит от концентрации, растворителя, pH, температуры.

В иммуногистохимических методах исследования указанным требованиям наиболее удовлетворяют ферменты: пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза.

Пероксидаза хрена (HRP) выделяется из корня хрена (растение *Coehlearia armoracia*). Активный центр HRP представляет собой железосодержащую группу гема (гематин), которая реагирует с перекисью водорода и вызывает ее распад до молекулы воды и атома кислорода.

HRP конъюгирует с белками с участием аминогруппы лизина и N-концевых аминогрупп белков с образованием стабильного комплекса.

На рисунке 4 представлена схема конъюгирования HRP с антителом.

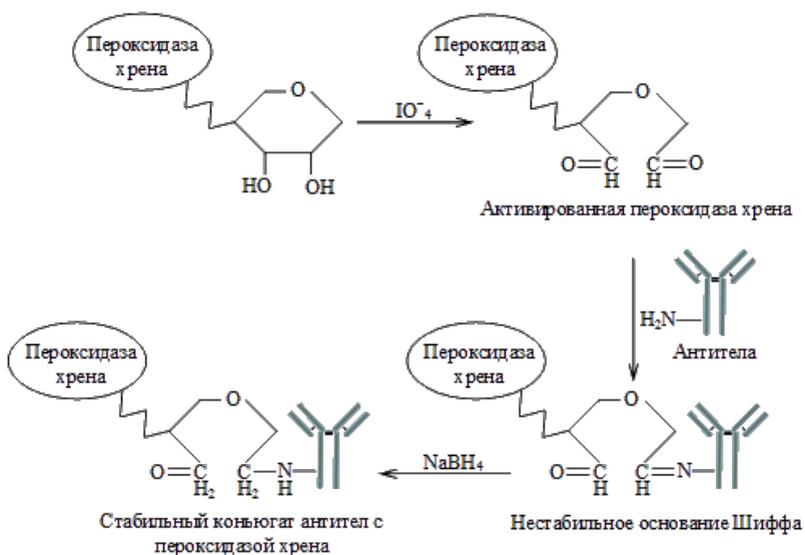


Рис. 4. Схема конъюгирования HRP с антителом (приводится по [7]).

Метод конъюгирования основан на мягком окислении полисахаридных цепей фермента до образования активных альдегидных групп, вступающих в реакцию нуклеофильного присоединения с аминок группой иммуноглобулинов с образованием оснований Шиффа.

Последующее восстановление оснований Шиффа тетраборатом натрия приводит к формированию стабильных высокомолекулярных конъюгатов.

Активность HRP к окрашиванию обусловлена присутствием донора электронов, который сначала образует комплекс фермент-субстрат с последующим окислением донора электронов.

Донор электронов обеспечивает движущую силу катализа перекиси водорода

В качестве доноров электронов, способных окрашиваться при окислении (так называемые хромогены), выступает 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид (DAB) – образует коричневый конечный продукт (рис. 5), 3-амино-9-этилкарбазол (AEC) – образует розово-красный продукт окисления, 4-хлоро-1-нафтол (CN) – образует конечный продукт синего цвета, р-фенилендиамин-дигидрохлоридел-пирокатехол – образует черный продукт окисления [1].

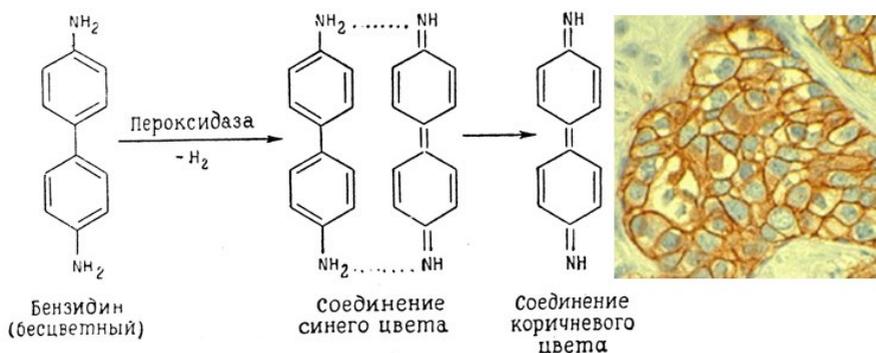


Рис. 5. Образование конечного продукта окисления субстрата пероксидазой хрена.

Щелочная фосфатаза гидролизует фосфаты нафтолов в присутствии солей диазония.

В качестве хромогенов используются прочный красный TR, прочный голубой BB, нафтол-AS-BI-фосфат, нафтол-AS-TR-фосфат и 5-бromo-4-хлоро-3-индоксилфосфат.

1.5. Подавление активности эндогенной пероксидазы и щелочной фосфатазы

При использовании в качестве ферментов для иммуногистохимической реакции пероксидазы хрена или щелочной фосфатазы в некоторых случаях можно наблюдать чрезмерное фоновое окрашивание, связанное с эндогенной активностью ферментов.

Эндогенная активность пероксидазы, приводящая к расщеплению H_2O_2 , проявляется в клетках периферической крови (эритроцитах), печени, почек, ткани костного мозга и т.д., в то же время активность эндогенной щелочной фосфатазы наиболее выражена в тканях тонкой кишки, почек, лимфатической ткани и т.д.

Для подавления эндогенной активности пероксидазы традиционно используется обработка среза перекисью водорода 3% – до 5 минут до этапа демаскировки.

Для блокирования активности эндогенной щелочной фосфатазы срезы обрабатывают слабым раствором кислоты до нанесения первичного антитела.

На рисунке 6 представлено влияние на результат ИГХ-окрашивания с использованием DAB с предварительной обработкой срезов H_2O_2 и азидом натрия при pH 7,4 для подавления активности эндогенной пероксидазы в тканях.

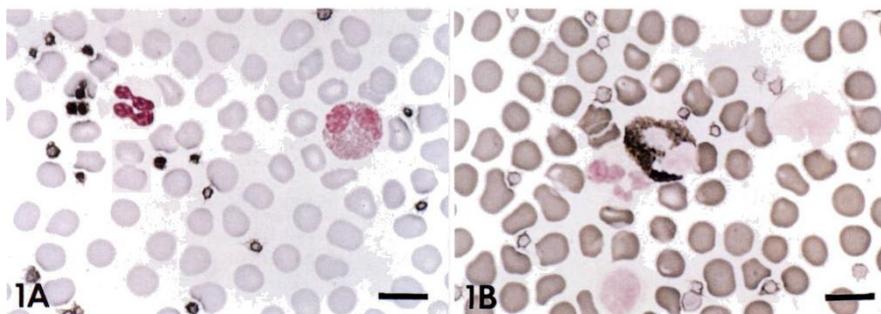


Рис. 6. Непрямое окрашивание моноклональным антителом HP1-1D в мазке крови.

А. Мазок предварительно инкубировали с 0,3% H_2O_2 в 0,1% ази-де натрия в качестве ингибитора эндогенной пероксидазы.

В. Мазок предварительно инкубировали с GOG в качестве инги-битора эндогенной пероксидазы (приводится по [9]).

Как можно видеть, на рисунке 6 (1а) эндогенная пероксидазная активность нейтрофилов, эозинофилов и эритроцитов полностью устранена, тогда как специфическое иммуноокрашивание тромбоцитов остается очень интенсивным.

В то же время при обработке GOG [β -D-глюкозой с глюкозоок-сидазой, при окислении которой кислородом воздуха выделяется пе-рекись водорода, рис. 6 (1б)] наблюдается значительное окрашива-ние в результате эндогенной пероксидазной активности присутствую-щих эозинофилов и эритроцитов.

Глава 2.

Методы иммуногистохимической окраски

Для иммуногистохимического окрашивания применяется, как ручной метод окраски, так и полуавтоматический, для этих видов окраски используются различная аппаратура.

2.1. Оборудование для проведения иммуногистохимического окрашивания

Существуют семейства различных иммуностейнеров, предлагаемых на мировом рынке.

Условно их можно разделить на полностью автоматические (например, иммуностейнер BenchMark ULTRA ИHC/ISH, Bond MAX) (рис. 7) и полуавтоматические (например, Dako Autostainer Link) (рис. 8).



а



б

Рис. 7. Автоматические иммуностейнеры: BenchMark ULTRA ИHC/ISH (а), Bond MAX (б).

В автоматическом режиме иммуностейнер осуществляет полный цикл иммуногистохимической окраски, включая этапы депарафинизации парафиновых срезов, демаскировки антигенов, нанесение первичного антитела и инкубации, нанесение вторичного антитела, инкубацию, визуализацию.



Рис. 8. Полуавтоматический иммуностейнер Dako Autostainer Link.

В полуавтоматическом режиме производится нанесение первичного антитела, инкубация, нанесение вторичного антитела, инкубация, визуализация.

Этапы предобработки необходимо осуществлять в ручном режиме до загрузки стекол в полуавтоматический иммуностейнер.

Для определения локализации антигена в гистологическом препарате используются прямой и непрямой методы иммуногистохимической реакции.

2.2. Прямой метод иммуногистохимической окраски

Прямой метод иммуногистохимической окраски основан на использовании меченых антител, непосредственно связываемых с искомым антигеном.

Существенным недостатком метода является слабая интенсивность окраски, поскольку усиление сигнала и чувствительности метода требует включения дополнительных этапов в методику иммуногистохимической окраски.

Мечение первичного антитела происходит согласно стехиометрии, следовательно, количество хромогена будет также пропорционально количеству искомого антигена – это является причиной снижения интенсивности окраски.

2.3. Непрямой метод иммуногистохимической окраски

Повысить чувствительность и детектирование метода возможно проведением непрямого метода иммуногистохимической окраски.

Данная технология основана на использовании меченных вторичных антител – непосредственно селективно взаимодействующих с первичным антителом после связывания последнего с антигеном.

Усиление сигнала детекции связано с уникальными свойствами компонентов, входящих в состав системы с вторичным антителом.

В основе системы детекции лежит полимерная матрица, с которой связаны молекулы вторичных антител и ферменты.

Данное сочетание позволяет произвести усиление сигнала за счет увеличения количества фермента при расчете на одну молекулу антигена (рис. 9).

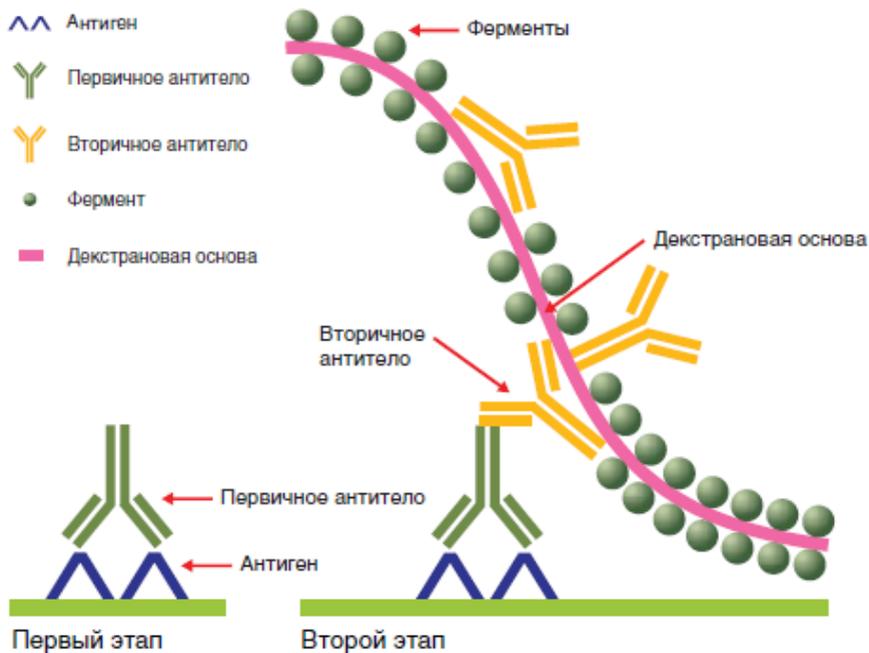


Рис. 9. Схематическая иллюстрация взаимодействия при непрямом методе ИГХ-окрашивания (приводится по [1]).

В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова принят протокол окрашивания непрямым ручным методом, который осуществляется по следующей схеме:

1. Поместить стекла с монтированными на них срезами ткани в термостат (60°C) на 30 минут.
2. Перенести немедленно в свежий ксилол на 5 минуты.
3. Повторить процедуру в п. 2 с новой порцией ксилола.
4. Поместить в изопропиловый спирт (абсолют) на 5 мин.
5. Повторить процедуру в п. 4 с новой порцией изопропилового спирта (абсолют).

6. Повторить процедуру в п. 4 с новой порцией изопропилового спирта (абсолют).

7. Повторить процедуру в п. 4 с новой порцией изопропилового спирта (абсолют).

8. Промыть в дистиллированной воде 3-5 мин.

9. Поместить стекла в 3% раствор пероксида водорода на 5 мин.

10. Промыть в дистиллированной воде 3-5 мин.

11. Перенести стекла в водяную баню на 30 мин, в зависимости от протокола к антителу использовать соответствующий буфер для демаскировки и температурный режим:

а) DakoCytomation Target Retrieval Solution (pH 6, × 10) при 98-99°C,

б) TRIS-EDTA Retrieval Buffer (pH 9, × 10) при 96-97°C.

12. Промыть дистиллированной водой 5 мин.

13. Перенести в промывочный TBS-буфер (pH 7,6, × 20) на 5-15 мин.

14. Нанести 100-300 мкл раствора антитела с соответствующим титром в центр анализируемой ткани, размещенной на предметном стекле.

15. Повторить процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.

16. Повторить процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.

17. Нанести вторичное антитело, связанное с активационным реагентом, EnVision FLEX HRP (Dako), инкубировать при комнатной температуре 30 мин.

18. Повторить процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.

19. Повторить процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.

20. Провести визуализацию 3,3'-диаминобензидином тетрагидрохлоридом (DAB) при комнатной температуре 200-600 мкл 5-10 мин.

21. Промыть в дистиллированной воде 3-5 мин.

22. Докраска ядер клеток гематоксилином Майера.

23. Дистиллированная вода – 2 мин.

24. Промывочный TBS-буфер (pH 7,6, × 20) – 2 мин.

25. Дистиллированная вода – 2 мин.

26. Изопропиловый спирт – 2 мин.

27. Изопропиловый спирт – 2 мин.

28. Изопропиловый спирт – 2 мин.

29. Изопропиловый спирт – 2 мин.

30. Ксилол – 2 мин.

31. Ксилол – 2 мин.

32. Заключение окрашенного препарата под покровное стекло.

Как можно видеть, этап детекции сигнала (п. 17 протокола) – нанесение вторичного антитела производится системой визуализации на основе полимерной композиции, связанной с вторичным антителом – anti-Goat IgG и ферментом – пероксидазой хрена.

Глава 3. Подготовительный этап обработки срезов

Подготовительный этап включает в себя депарафинизацию срезов и различные варианты демаскировки антигенов.

Далее следует обработка срезов протеолитическими ферментами.

3.1. Депарафинизация среза и демаскировка антигена

В процедуре окрашивания, до нанесения первичного антитела (см. п. 14 протокола НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова) необходимо произвести депарафинизацию образца (п.п. 1-8) и демаскировку антигена (п.п. 9-13).

Депарафинизация образца является стандартной рутинной процедурой в любой гистологической лаборатории и включает в себя стадии обработки парафинового среза ксилолом и спиртом для того, чтобы антитела, находящиеся в водном растворе, проникали в ткань и связывались с антигенными эпитопами.

Более подробно стоит остановиться на этапе демаскировки антигена.

В процессе преаналитического этапа ткань подвергается обработке агрессивными химическими агентами, например, формалином, спиртами, парафином и подвергается воздействию физических факторов – температуре и давлению.

Обработка формалином сохраняет морфологию ткани, однако искажает трехмерную структуру белков и приводит к модификации антигенов, а также изменению электростатических взаимодействий.

Этап демаскировки направлен на восстановление белка – антигена после внешнего воздействия и заключается в обработке образца – парафинового среза соответствующими буферными растворами.

Данная процедура демаскировки антигенных детерминант имеет несколько терминов в мировой литературе: «температурное восстановление эпитопа» (HIER) или «демаскировка эпитопа» и используется для описания процесса деградации эпитопа во время фиксации.

Термин «температурное восстановление антигена» (HIAR) описывает восстановление антигенности, потерянной в результате формалиновой фиксации [1].

Традиционно восстановление эпитопов проводится с использованием водяной бани для поддержания требуемого температурного режима, включающего в себя:

- предварительный нагрев до 65°C,
- температурную выдержку при 98°C,
- дальнейшее охлаждение.

Высокотемпературная предобработка буферными растворами нивелирует действие химических агентов и способствует регенерации нативной структуры белков.

В качестве буферных растворов для демаскировки антигенов используются цитратные буферные растворы, отличающиеся по pH и хелатирующей способности (цитратный буфер TRIS/EDTA pH 9,0 и TRIS pH 6,0) и, следовательно, различаются способом влияния на связывание антител с антигеном.

3.2. Предварительная ферментативная обработка

Обработка ткани протеолитическими ферментами применяется после стадии демаскировки и способствует разрушению ковалентных связей метиленовых мостиков, образующихся в процессе фиксации ткани формалином (см. гл. 4), позволяет восстановить конформацию детерминант антигенных эпитопов, обеспечивая более селективное связывание с первичным антителом.

Наиболее востребованными протеолитическими ферментами являются трипсин, пепсин, протеиназа К.

Трипсин расщепляет белки по карбоксильной группе лизина и аргинина.

Пепсин имеет широкий спектр расщепления аминокислотных последовательностей, но вероятность этого расщепления увеличивается в присутствии в полипептидной цепи тирозина, фенилаланина и триптофана.

Протеиназа К обладает широкой специфичностью, расщепляя пептидную связь, прилегающую к карбоксильной группе алифатических и ароматических аминокислот с заблокированными альфа-аминогруппами.

Следует помнить, что протеолитические ферменты, используемые при обработке, также расщепляют специфические последовательности аминокислот в пептидных цепях обрабатываемых белков. По этой причине они могут оказывать нежелательные эффекты на антигенную структуру эпитопа. Выбор протеаз необходимо осуществлять, основываясь на их расщепляющей способности и типе использованного фиксатора.

В настоящее время доступны протоколы с комбинированной предварительной обработкой – обработка ферментом и высокотемпературная демаскировка.

Глава 4. Группы первичных антител

На сегодняшний день доступны для использования в клинической диагностической работе более 200 антител, которые можно группировать различным образом.

По роли в плане установления диагноза или принятия решения в отношении тактики наблюдения за пациентом, назначения тех или иных препаратов антитела можно разделить на две большие разновеликие группы: диагностические и предиктивно-прогностические маркёры.

При этом на какие бы группы мы не делили антитела, часть из них обладает свойствами, позволяющими отнести их в несколько категорий.

Например, ER – маркёр, который в ряде случаев обладает диагностической ценностью, т.е. позволяет принять диагностическое решение и установить нозологическую принадлежность опухоли, но при этом наличие определенного уровня экспрессии рецепторов эстрогена может служить показанием для назначения соответствующей гормонотерапии (предиктивная роль).

Можно подразделять антитела по клональности (моноклональные и поликлональные), что может обуславливать их чувствительность, специфичность, частоту фонового окрашивания.

Можно подразделять антитела по локализации окрашивания в пределах клетки/ткани: ядерные, мембранные, мембранно-цитоплазматические, цитоплазматические, окрашивающие волокна или компоненты внеклеточного матрикса и т.п.

Но нередко встречается реактивность сразу в нескольких компартментах, так, S-100 может давать ядерную экспрессию, или ядерно-цитоплазматическую, или цитоплазматическую.

Локализация реакции также может иметь диагностическое значение: Ki67 – ядерный маркёр, дает мембранное окрашивание и в

склерозирующей пневмоцитоме легкого, и в гиалинизирующей трабекулярной опухоли щитовидной железы.

Это приводит нас к необходимости ознакомления с инструкцией (спецификацией) к каждому конкретному антителу, чтобы знать инструмент, с которым мы работаем, его особенности.

4.1. Диагностические антитела

Группа антител, которые преимущественно используются при дифференциальной диагностике различных новообразований, включает в себя большое количество маркёров, которые свойственны тем или иным типам тканей, в соответствии с этим родством их можно условно группировать следующим образом [11].

4.1.1. Эпителиальные, органо/тканеспецифичные маркёры

Пожалуй, это самая большая группа маркёров, что связано с большей частотой эпителиальных опухолей, их разнообразием.

В эту группу попадает широкий спектр промежуточных филаментов – цитокератинов, и ряд транскрипционных факторов, специфичных для определённых видов тканей, зачастую объединённых общностью происхождения.

Цитокератины (СК's) – группа белков промежуточных филаментов, которые являются компонентами цитоскелета всех эпителиальных клеток.

Промежуточные филаменты (микрофиламенты – размерами до 6 нм, микротрубочки – до 25 нм) в соответствии с происхождением клеток подразделяются на пять групп: цитокератины (эпителиальные клетки), глиальные (астроцитарные клетки), нейрофиламенты (нерв-

ные клетки), десмин (мышечные клетки) и виментин (мезенхимальные клетки).

В настоящее время выделяют еще 6 группу – нестин (стволовые клетки ЦНС).

Цитокератины, в свою очередь, подразделяются на кислые (СК 9-20) и основные (СК 1-8), они присутствуют как в нормальных, так и в опухолевых клетках вне зависимости от дифференцировки.

Использование цитокератинов в качестве ИГХ-маркёров имеет существенные ограничения, что связано с их невысокой специфичностью и чувствительностью (целый ряд неэпителиальных опухолей способен экспрессировать СК).

Экспрессия цитокератинов в некоторых эпителиальных опухолях отражена в таблице 2.

Таблица 2.

Экспрессия цитокератинов
в некоторых эпителиальных опухолях

Тип карциномы	Цитокератины									
	4	5	7	8	13	14	17	18	19	20
Плоскоклеточный рак, кожа		+				+			+ ^a	
Плоскоклеточный рак, пищевод	+				+	+			+	
Рак молочной железы			+	+		+ ^a	+ ^a	+	+	
Мезотелиома		+	+	+		+		+	+	
Аденокарцинома легкого			+	+				+	+	
Аденокарцинома толстой кишки				+				+	+	+
Рак поджелудочной железы			+	+				+	+	+ ^a
Гепатоцеллюлярный рак				+				+	+ ^a	
Мелкоклеточный рак				+				+	+ ^b	
Карцинома Меркеля				+				+	+	+
Почечноклеточный рак				+				+	+ ^b	
Уротелиальный рак, low grade	+		+	+	+			+	+	+ ^a
Уротелиальный рак, high grade			+	+	+ ^a			+	+	
Рак щитовидной железы				+				+	+	
Аденокарцинома простаты			+ ^a	+				+	+	
Аденокарцинома яичника			+	+				+	+	+ ^a

a – изредка присутствует/минорный компонент

b – часто но непостоянно присутствует

СК 5/6

СК 5/6 – высокомолекулярные цитокератины базального типа, в норме экспрессируются в базальном, промежуточном и поверхностном слоях многослойного плоского эпителия, в переходном эпителии и мезотелии.

Используется в дифференциальной диагностике эпителиальной мезотелиомы и аденокарциномы легкого, но часто негативен в саркоматоидной мезотелиоме, целесообразно использовать в панели антител.

Позитивен в плоскоклеточном раке (различных локализаций), что позволяет использовать этот маркер при дифференциальном диагнозе между аденогенными низкодифференцированными раками и плоскоклеточным раком.

Используется также для различения простой гиперплазии эпителия протоков молочной железы (где позитивен во внутрипротоковом клеточном пролиферате, который состоит помимо люминальных клеток еще и из миоэпителиальных, окрашивающихся СК 5/6) и атипической гиперплазии (внутрипротоковый пролиферат негативен к СК 5/6).

Кроме того, может быть использован для выявления базальных клеток в железах предстательной железы.

Из-за низкой специфичности имеет ограниченное значение при диагностике опухолей слюнных желез, легкого и верхнего аэродигестивного тракта, кожи, мочевыводящих путей и т.д.

Окрашивание диффузное цитоплазматическое, в качестве позитивного контроля может быть использована ткань кожи или нормальной предстательной железы.

СК 7

СК 7 – базальный цитокератин, обнаруживаемый в большинстве железистых и переходных эпителиев.

В нормальных тканях окрашивает большинство эпителиев, выстилающих протоки и железы, уротелий, альвеолярный эпителий, отсутствует в многослойном плоском эпителии, эпителии толстой кишки и предстательной железы.

Гепатоциты негативны, в то время как желчевыводящие протоки позитивны.

Окрашивает эпителиальные опухоли яичника, молочной железы, аденокарциномы легкого, в то время как аденокарциномы толстой кишки негативны.

Муцинозные опухоли яичника и легкого изредка могут быть негативны к СК 7 и окрашиваться СК 20, т.е. иметь фенотип, характерный для опухолей толстой кишки.

Может быть полезен в дифференциальном диагнозе уротелиальных карцином (СК 7⁺) и карциномы предстательной железы, в которой негативен.

В части случаев может быть позитивен в плоскоклеточных карциномах шейки матки и легкого.

СК 19

СК 19 – низкомолекулярный цитокератин, в норме экспрессируется в цитоплазме эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта, в том числе в червеобразном отростке, желчном пузыре и желчевыводящих протоках, поджелудочной железе, в миндалинах, мочевыводящих путях, выстилке бронхов и альвеолярном эпителии, эпителии желез шейки матки, эпителиальных клетках тимуса, эндометриальных железах, протоках слюнных желез, семявыносящих протоках, молочной железе, трофобласте и плаценте, почечных канальцах, протоковом эпителии придатков кожи.

СК 19 позитивен в плоскоклеточных карциномах головы и шеи, шейки матки, легкого, в уротелиальных раках, папиллярном раке щитовидной железы, части фолликулярных опухолей щитовидной железы, инвазивном раке молочной железы, аденокарциномах ЖКТ

(аппендикса, колоректальной зоны, поджелудочной железы, холангиокарциноме), нейроэндокринных опухолях (как высоко- так и низкодифференцированных) желудочно-кишечного тракта, аденокарциноме предстательной железы, муцинозных, серозных опухолях и светлоклеточных опухолях яичника, эндометриальной аденокарциноме, экстратаммарной болезни Педжета.

Экспрессия цитоплазматическая с частичным или полным мембранным окрашиванием, возможно, в виде парануклеарного гранулярного цитоплазматического окрашивания (dot-like) без диффузного цитоплазматического и/или мембранного.

Используется, как правило, в составе панели антител для подтверждения эпителиального происхождения низко-/недифференцированных опухолей, принадлежности к панкреатобилиарной зоне, а также в дифференциальной диагностике опухолей щитовидной железы.

СК 19 – независимый предиктор агрессивного течения нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, он может служить фактором благоприятного прогноза при экстратаммарной болезни Педжета.

СК 20

СК 20 – низкомолекулярный кератин, имеет относительно ограниченный спектр экспрессии, в норме выявляется в эпителии желудочно-кишечного тракта, уротелии и клетках Меркеля.

Опухоли, экспрессирующие СК 20, развиваются из эпителиев, которые в норме им окрашиваются: чаще всего позитивны колоректальные аденокарциномы, в то время как карциномы желудка и другие карциномы желудочно-кишечного тракта – значительно реже.

В ряде случаев окрашивание выявляется в панкреатобилиарных аденокарциномах, муцинозных опухолях яичника и легкого, переходноклеточных карциномах.

Таким образом, СК 20 может быть использован в качестве органо/тканеспецифического маркера, в том числе в силу того, что крайне редко выявляется в эпителиальных опухолях молочной железы, немучинозных карциномах легкого и яичника, раке эндометрия.

Экспрессия СК20 свидетельствует в пользу аппендикулярного происхождения псевдомиксомы брюшины у женщин.

Комбинация СК 7/СК 20 может быть использована в дифференциальной диагностике первичного и вторичного поражения яичников при кишечном фенотипе карцином (СК 7-/СК 20+-фенотип встречается в 94% метастатических карцином толстой кишки и в 5% первичных муцинозных карцином яичника), и в ряде других случаев (табл. 3).

Таблица 3

Экспрессия СК 7 и СК 20
в эпителиальных опухолях

	СК 20+	СК 20-
СК 7+	<p>Мочевой пузырь Молочная железа Толстая кишка Желчевыводящие пути Муцинозные опухоли яичника Поджелудочная железа Желудок</p>	<p>Шейка матки Эндометрий Пищевод Молочная железа Карциноид ЖКТ Желчевыводящие пути Поджелудочная железа Почка Печень Карциноид легкого Нейроэндокринные раки Плоскоклеточный рак легкого Мелкоклеточный рак легкого Мезотелиома Яичник Слюнные железы Щитовидная железа</p>
СК 7-	<p>Карцинома Меркеля Желудок Толстая кишка</p>	<p>Кора надпочечника Пищевод Карциноид ЖКТ</p>

		Герминогенные опухоли Почка Печень Карциноид легкого Нейроэндокринные раки Плоскоклеточный рак легкого Мелкоклеточный рак легкого Мезотелиома Предстательная железа Эпителиоидная саркома мягких тканей Тимус
--	--	---

Однако даже комбинация СК 7/СК 20 имеет специфичность ниже, чем ряд доступных на сегодня транскрипционных факторов (CDx2, SATB2, PAX8, WT1), что снижает значимость этих маркёров.

В качестве позитивного контроля целесообразно использовать нормальную слизистую оболочку толстой кишки, червеобразного отростка.

МСК (АЕ1/АЕ3)

МСК (АЕ1/АЕ3) – смесь двух моноклональных антител: АЕ1 окрашивает большинство кислых кератинов, а АЕ3 – большинство основных, данная комбинация имеет широкий спектр, позволяющий выявлять практически все типы эпителиев и опухоли, которые из них развиваются, при этом отсутствует перекрестная реактивность с другими промежуточными филаментами.

Благодаря конструкции коктейля, он интенсивно окрашивает как аденокарциномы различных локализаций, плоскоклеточные раки, так и тимомы, мезотелиомы и хордомы.

Ряд неэпителиальных опухолей могут демонстрировать окрашивание: герминогенные опухоли (кроме семиномы), синовиальная саркома и эпителиоидная саркома, возможно окрашивание в некоторых лейомиосаркомах.

Таким образом коктейль эффективен при выявлении эпителиального генеза низко-/недифференцированных опухолей, для различения опухолей с эпителиоидной морфологией, позволяет отличить карциномы от меланомы, крупноклеточной лимфомы.

СК HMW (клон 34bE12)

СК HMW (клон 34bE12) – выявляет группу высокомолекулярных цитокератинов: 1,5, 10 и 14, в норме окрашивает многослойный плоский эпителий, протоковый и другие комплексные эпителии.

Широко используется для детекции базальных клеток ацинусов предстательной железы, экспрессия отсутствует в аденокарциномах предстательной железы.

Позитивен в плоскоклеточном раке, дуктальной карциноме молочной железы и поджелудочной железы, холангиокарциномах, карциномах слюнных желез, уротелиальных раках, назофарингеальной карциноме, тимомах и эпителиоидных мезотелиомах.

Окрашивание в аденокарциномах вариативное, СК HMW, как правило, негативен в гепатоцеллюлярной карциноме, почечноклеточных раках, эндометриальной карциноме, мезенхимальных опухолях, лимфомах, меланомах, опухолях нейроэктодермального происхождения и нейроэндокринных.

p63

p63 – ядерный маркер, окрашивание в норме выявляется в многослойном плоском эпителии кожи, пищевода, эктоцервикса, миндалин, в уротелии, а также в других локализациях, где может быть выявлена плоскоклеточная метаплазия.

Кроме того, p63 экспрессируется базальными и миоэпителиальными клетками протоков и ацинусов различных экзокринных желез и железистых органов, как молочная железа, придатки кожи, шейка матки, уrogenитальный тракт, предстательная железа, а также в эпителии тимуса и цитотрофобласте плаценты.

Маркёр используется для идентификации плоскоклеточных карцином, уротелиальных раков, позитивен в части анапластических крупноклеточных лимфом, в мукоэпидермальном раке, аденокистозном раке, метапластической карциноме молочной железы, саркоматоидной карциноме, гигантоклеточных опухолях костей.

Используется также для подтверждения плоскоклеточной дифференцировки, выявления миоэпителиальных и базальных клеток в образованиях молочной и предстательной желез.

Цитоплазматическая экспрессия p63 обнаруживается в опухолях со скелетной мышечной дифференцировкой.

p40

p40 – это усеченный вариант p63, обладает более узким спектром, т.е. более высокой специфичностью в отношении плоскоклеточной дифференцировки.

Окрашивает эпителиальные клетки тимуса и тимомы, плаценту, пузырьный занос, хориокарциномы и эпителиальные трофобластические опухоли (кроме трофобластической опухоли плацентарной площадки), плоскоклеточный рак легкого, пищевода и др. локализаций, уротелиальные карциномы, краниофарингиому, эстезионейробластому, синоназальную недифференцированную карциному, аденокистозный рак, плеоморфную аденому слюнных желез, мукоэпидермоидную карциному, NUT-карциному средней линии, мелкоклеточные карциномы синоназального тракта, миоэпителиальные клетки в образованиях молочной железы, склерозирующую гемангиому легкого, злокачественные филоидные опухоли молочной железы, саркоматоидные карциномы.

TTF-1

TTF-1 – тиреоидный транскрипционный фактор, высокоспецифичен для фолликулярного эпителия щитовидной железы и альвео-

лярного эпителия легких, позитивен соответственно в эпителиальных опухолях щитовидной железы и аденокарциномах легкого.

Экспрессия ядерная, как правило интенсивная и диффузная. Слабое фокальное окрашивание может встречаться в аденокарциномах других локализаций, чаще верхних отделов желудочно-кишечного тракта.

Кроме того, позитивен в мелкоклеточных нейроэндокринных карциномах различных локализаций, в том числе экстрапульмонарных.

CDx2

CDx2 – транскрипционный фактор, в норме выявляется в кишечном эпителии от 12-перстной до прямой кишки.

Позитивен в первичных и метастатических колоректальных карциномах, в кишечной метаплазии эпителия желудка и пищевода, аденокарциномах тонкой кишки, муцинозных опухолях легкого, молочной железы, яичника, мочевого пузыря и панкреатобилиарного тракта, нейроэндокринных опухолях органов, развивающихся из средней и задней кишки.

Может выявляться в аденокарциномах кишечного типа шейки матки и синоназального тракта.

Экспрессия CDx2 и СК 20 может утрачиваться в колоректальных карциномах с дефицитом белков системы репарации неспаренных нуклеотидов ДНК (dMMR/MSI high).

PAX-8

PAX-8 – транскрипционный фактор, который экспрессируется преимущественно в эпителии щитовидной железы, тимуса, почек и эпителиях Мюллера типа.

В соответствующем морфологическом контексте эффективен для дифференциальной диагностики опухолей щитовидной железы,

почечноклеточных раков и эпителиальных опухолей женского полового тракта с опухолями других локализаций.

Позитивен также в нефробластоме и в части случаев в мезотелии и мезотелиомах.

Негативен в эпителии мочевыводящих путей, молочной железы и желудочно-кишечного тракта.

Окрашивание ядерное.

WT-1

WT-1 – в норме позитивен в клетках поверхностного эпителия яичников, выстилке инклюзионных кист, тубарном эпителии, не выявляется в цервикальном эпителии и эндометрии.

Демонстрирует ядерную экспрессию в клетках мезотелия и мезотелиомах (в аденокарциномах может выявляться цитоплазматическая реакция), большинстве серозных тубоовариальных карцином (муцинозные опухоли яичника и панкреатобилиарные карциномы не дают ядерного окрашивания).

Кроме того, позитивен в клетках бластымы опухоли Вилмса (ядерная экспрессия).

Иногда, помимо ядерного окрашивания, выявляется и цитоплазматическое, однако при отсутствии ядерной экспрессии оно должно расцениваться как недиагностическое, вероятно ассоциированное с неспецифическим связыванием хромогена компонентами цитоплазмы или фоновым окрашиванием.

GATA3

GATA3 – транскрипционный фактор, экспрессируется в эритроцитах на ранних стадиях и Т-клетках, интенсивно позитивен в эмбриональных тканях головного мозга, парашитовидных желез, кожи, внутреннего уха, надпочечников, печени и плаценте.

В нормальных тканях взрослых, включая легкие, слюнные железы, желудок, тонкую и толстую кишку, поджелудочную железу, пе-

чень, щитовидную железу, предстательную железу, семенные пузырьки, яичники и эндометрий – негативен.

Выявляется только в Т-лимфоцитах, люминальном эпителии молочной железы, парашитовидных железах и уротелии.

В почке экспрессия ограничена дистальными отделами канальцев.

Таким образом, GATA3 экспрессируется в большинстве уротелиальных раков и карцином молочной железы.

Может быть использован при дифференциальной диагностике уротелиальной карциномы и аденокарциномы предстательной железы или плоскоклеточного рака шейки матки и анального канала, или почечного клеточного рака.

Эффективен при метастазах карцином из невыявленного первичного очага, и/или для верификации вторичных очагов при уротелиальных раках и раке молочной железы.

4.1.2. Нейроэндокринные маркёры

Synaptophysin

Synaptophysin – поликлональное антитело к белку, компоненту классических, малых синаптических везикул, присутствующих практически во всех нейронах, мембранному протеину нейроэндокринных гранул с плотным центром (dense-core).

В нормальных тканях окрашивает нейроэндокринные клетки медуллярного вещества надпочечников, каротидных телец, кожи, гипофиза, щитовидной железы, легких, поджелудочной железы и ЖКТ.

Антитело окрашивает нейрональные, надпочечниковые и нейроэпителиальные опухоли: феохромоцитому, параганглиомы, опухоли из островковых клеток поджелудочной железы, медуллярный рак щитовидной железы, карциноидные опухоли различных локализаций, аденомы гипофиза и парашитовидных желез, нейробластомы,

ганглионейробластомы, ганглионевромы, центральную нейроцитому, ганглиоглиому.

Chromogranin A

Chromogranin A – один из основных белков нейросекреторных гранул нейроэндокринных клеток и симпатических нервов.

Хромогранины – группа белков, демонстрирующих вариабельность как количественного, так и качественного распределения в нейроэндокринных тканях, что обуславливает ограничения использования данных маркёров.

В порядке уменьшения концентрации они определяются в: мозговом веществе надпочечников, передних, промежуточных и задних отделах гипофиза, островках поджелудочной железы, тонкой кишке, С-клетках щитовидной железы, гипоталамусе.

Доступные антитела к хромогранину А окрашивают большинство нормальных нейроэндокринных клеток и опухолей, которые из них развиваются.

CD56

CD56 – молекула клеточной адгезии нервных клеток (NCAM), выявляется на NK-клетках и нейроэктодермальных дериватах: периферических нервах, надпочечниках, синапсах в коре головного мозга, а также в клетках фолликулярного эпителия щитовидной железы, проксимальных отделов почечных канальцев, гепатоцитах, париетальных клетках слизистой оболочки желудка, островковых клетках поджелудочной железы.

Может быть использован в панели антител для диагностики нейроэндокринных и нейроэктодермальных опухолей разной степени дифференцировки, обладает высокой чувствительностью в их отношении, но имеет низкую специфичность, вследствие чего необходимо включать в панель маркёры с более высокой специфичностью (synaptophysin, chromogranin A, B, PGP 9.5 и др.).

Кроме того, эффективность использования нейроэндокринных/нейроэктодермальных маркёров может существенным образом зависеть от внутрилабораторной практики, имеющихся в распоряжении клонов антител, систем детекции.

Для получения более надежного и воспроизводимого результата рекомендуется при диагностике данной группы новообразований включать в панель не менее 2 маркёров (из имеющихся в лаборатории), выбирать те, которые показывают более стабильное и читаемое окрашивание в вашей конкретной лаборатории.

4.1.3. Меланоцитарные маркёры

S-100

S-100 – белок, впервые выявленный в центральной нервной системе, присутствует в клетках всех трех зародышевых листков, в связи с чем демонстрирует широкий спектр экспрессии в нормальных и патологических тканях.

Позитивен в нормальной и опухолевой хрящевой ткани, что позволяет отличить хрящевые опухоли от образования другой природы.

Хордомы также могут быть иммунореактивны к S-100, но в отличие от хрящевых опухолей дополнительно экспрессируют цитоцератины и ЕМА.

S-100 позитивен в миоэпителиальных клетках, в том числе молочной железы, sustentakuлярных клетках мозгового вещества надпочечников и параганглиев, а также в опухолях, которые в них развиваются.

Маркёр полезен для детекции периферических нервов, белок присутствует в ядрах и цитоплазме шванновских клеток и сателлитных клеток парасимпатических и симпатических ганглиев.

Диффузно экспрессируется в большинстве доброкачественных опухолей из оболочек периферических нервов, гетерогенно позитивен в 40-50% злокачественных.

Позитивен в гистиоцитах и дендритных клетках, части опухолей соответствующего генеза, адипоцитах, части липосарком, некоторых опухолях придатков кожи и слюнных желез.

Один из базовых меланоцитарных маркёров, позитивен в невусах и меланомах (более 95%), в том числе в метастатических очагах.

Однако широкий спектр карцином (рак молочной железы, почечноклеточные раки, раки легкого, поджелудочной железы и женского полового тракта) также способен демонстрировать позитивное окрашивание в S-100, что может вызывать сложности в дифференциальной диагностике с образованиями неэпителиальной природы.

SOX.10

SOX.10 – транскрипционный фактор нервного гребня, критически необходимый для созревания шванновских клеток и меланоцитов.

Позитивен в меланомах, карциномах молочной железы (чаще трижды-негативных), глиомах (олигодендроглиомах, астроцитомах, глиобластомах), доброкачественных опухолях периферических нервов (шванномах), в 100% меланоцитарных невусов.

Положителен в 97-100% десмопластических и веретеночлеточных меланом, которые зачастую теряют другие меланоцитарные маркёры.

Более специфичный и чувствительный меланоцитарный маркёр и маркёр шванновской дифференцировки по сравнению с S-100.

Злокачественные серозные, муцинозные и эндометриоидные опухоли яичника чаще позитивны, чем доброкачественные или пограничные.

#

На сегодняшний день доступен большой спектр меланоцитарных маркёров: melan A, HMB-45, KBA.62, MITF, thyrosinase и т.п.

Они обладают различной чувствительностью и специфичностью, что обуславливает необходимость использования их в комбинации (не менее 2 маркёров) для подтверждения меланоцитарного происхождения образования.

Кроме того, часть из них встречается в опухолях другого генеза: периваскулярных эпителиоидных опухолях различной степени злокачественности (РЕС-омы), ангиомиолипомах, светлоклеточной саркоме и др.

4.1.4. Мышечные и сосудистые маркёры

h-Caldesmon

h-Caldesmon – белок, который связывает кальмодулин, тропомиозин и актин, и таким образом играет важную роль в регуляции мышечных сокращений.

Экспрессируется исключительно в гладкомышечных клетках сосудов и внутренних органов, миоэпителиальных клетках.

Интенсивно позитивен в опухолях с гладкомышечной дифференцировкой: лейомиомах, лейомиосаркомах, ангиомиомах, гломусных опухолях.

В то время как рабдомиосаркомы, недифференцированные саркомы, десмоид, воспалительная миофибробластическая опухоль, эндометриальная стромальная саркома – негативны.

Однако лейомиосаркомы периферических мягких тканей (в отличие от висцеральных, в первую очередь матки) демонстрируют невысокую частоту экспрессии, что ограничивает использование данного маркёра.

Calponin

Calponin – белок, специфичный для гладких мышц, обнаруживается во всех периацинарных и перидуктальных миоэпителиальных

клетках нормальных слюнных желез, в норме отрицателен в ацинарном/дуктальном люминальном эпителии.

Позитивен в плеоморфных аденомах слюнных желез, модифицированных и трансформированных миоэпителиальных клетках.

Наиболее чувствительный маркёр неопластического миоэпителия, позитивен в большинстве миоэпителиальных карцином.

Кроме того, выявляется в доброкачественных гладкомышечных опухолях различных локализаций, забрюшинных и маточных лейомиосаркомах, а также в миофибробластах и миофибробластических образованиях.

Desmin

Desmin – промежуточный филамент, цитоплазматический белок, который характерен для мышечных клеток.

Позитивен в широкой группе опухолей мышечного происхождения и/или с мышечной дифференцировкой: рабдомиосаркомах, лейомиомах, опухоли Тритон, злокачественных смешанных Мюллеровых опухолях, лейомиосаркомах, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли и др.

Может быть позитивен в миофибробластах, в том числе в посттравматических и реактивных образованиях.

Кроме того, сегодня доступен широкий спектр гладкомышечных маркёров (SMA, MSA, SMMS и др.).

Все они, наряду с desmin, имеют существенные ограничения в плане специфичности, обладают различной чувствительностью, а для установления диагноза гладкомышечной опухоли требуется не менее 2 диффузно позитивных гладкомышечных маркёра (desmin и caldesmon считаются наиболее специфичными).

Для опухолей со скелетной мышечной дифференцировкой также доступны Myo D1, Myf4, myogenin, которые необходимо использовать в комбинации (не менее 2 маркёров) и оценивать в морфологическом контексте, т.к. в эмбриональной рабдомиосаркоме экспрессия

может быть ограничена небольшим количеством клеток на той или иной стадии созревания.

CD31

CD31 – белок, молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток (PECAM-1), в норме экспрессируется эндотелием, гемопоэтическими клетками (тромбоцитами, моноцитами, гранулоцитами и В-клетками).

Также позитивен в эндотелии синусоидов печени, лимфатических узлов, селезенки.

Маркёр доброкачественных и неоплазированных эндотелиальных клеток, более чувствителен чем CD34 или фактор Виллебранда для злокачественных сосудистых опухолей.

Не экспрессируется в лимфангиомах.

Может встречаться в саркоме Юинга, ряде лимфом, мегакариоцитах.

CD34

CD34 – трансмембранный белок, присутствующий в стволовых гемопоэтических клетках, клетках незрелых лейкоцитов и сосудистых опухолей.

Обладает высокой чувствительностью в отношении сосудистых опухолей, позитивен как в эндотелии кровеносных, так и лимфатических сосудов.

Возможно окрашивание гладкомышечных клеток и опухолей, которые из них развиваются, а также в ряде других опухолей мягких тканей.

Позитивен в гастроинтестинальных стромальных опухолях, эпителиоидной саркоме мягких тканей, гигантоклеточной фибробластоме и взрывающейся дерматофибросаркоме.

ERG

ERG – транскрипционный фактор, член семейства белков ETS, позитивен в клетках эндотелия, части стволовых гемопоэтических клеток, миелоидных предшественниках, хряще.

Используется для подтверждения сосудистого генеза доброкачественных и злокачественных новообразований, позитивен к части аденокарцином предстательной железы.

Экспрессия ядерная.

#

Диагностика мезенхимальных опухолей за последние годы претерпела существенные изменения.

На место попыткам выявления линейной принадлежности или дифференцировки (гладкомышечной, нервной, адипоцитарной и т.п.) приходит выявление суррогатных маркёров генетических перестроек, свойственных конкретной опухоли или группе опухолей [12].

Так, для высокодифференцированной липосаркомы/атипической липоматозной опухоли и дедифференцированной липосаркомы характерны нарушения копийности генов CDK4 и MDM2, что может быть выявлено при помощи одноименных антител или реакции флуоресцентной гибридизации *in situ* с соответствующими зондами.

Для солитарной фиброзной опухоли характерна перестройка в гене STAT6, и сегодня доступно антитело, которое с высокой степенью специфичности окрашивает данные опухоли.

Перечень подобных суррогатных ИГХ-маркёров генетических перестроек стремительно увеличивается.

Сегодня, помимо вышеназванных, доступны следующие маркёры: INI-1 (SMARCB1), Fli-1, BRAF V600E, IDH-1, NUT, SDHB, BRG, TFE3, TFEB, TLE1.

4.1.5. Герминогенные маркёры

OCT3/4

OCT3/4 – транскрипционный фактор, экспрессирующийся в плюрипотентных примордиальных герминальных клетках и эмбриональных стволовых клетках, теряется по мере созревания.

Используется для дифференциального диагноза герминально-клеточной неоплазии *in situ* (GNIS) и реактивных изменений гоноцитов, для подтверждения диагноза инвазивной/метастатической герминально-клеточной опухоли и дифференциального диагноза в пределах группы герминально-клеточных опухолей (OCT3/4 позитивны семинома и эмбриональный рак, негативны – опухоль желточного мешка, сперматоцитарная опухоль, хориокарцинома).

Sall4

Sall4 – транскрипционный фактор из семейства «цинковых пальцев», детектируется во всех типах герминогенных опухолей, высокочувствителен в отношении первичных и метастатических герминогенных опухолей вне зависимости от варианта.

Положителен в гепатоидной карциноме желудка.

Может выявляться также в низкодифференцированных негерминально-клеточных опухолях: серозных карциномах яичника, аденокарциномах желудка, уротелиальных карциномах *high grade*, внутрипеченочных холангиокарциномах, мелкоклеточном раке легкого; изредка в рабдоидной опухоли почек, опухоли Вилмса, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эмбриональной рабдомиосаркоме шейки матки, эпителиоидной саркоме, лимфобластной лимфоме, анапластической крупноклеточной лимфоме, миелолейкозе.

D2-40

D2-40 – подопланин – обнаруживается в эндотелии лимфатических сосудов, герминальных опухолях яичника и яичка, плаценте (в эндотелии), легких (альвеолярном эпителии), головном мозге, ретикулярных клетках, фолликулярных дендритных клетках, миоэпителиальных клетках.

Экспрессируется в опухолях лимфатического происхождения, саркоме Капоши, гемангиоэндотелиоме, мезотелиомах, опухолях головного мозга (гемангиобластома, анапластическая эпендимома, часть медуллобластом, глиобластома, пинеальная герминома, краниофарингиома, папиллома и карцинома сосудистого сплетения, менингиома), плоскоклеточных раках головы и шеи, карциноме шейки матки, раке молочной железы, опухолях придатков кожи, семиномах, дисгерминомах, аденокортикальной карциноме, шванноме, эпителиоидной злокачественной опухоли из оболочек периферических нервов, дистальной эпителиоидной саркоме, миксоидной хондросаркоме скелета, хондроидных и хордоидных опухолях.

#

В дифференциальной диагностике герминогенных опухолей помимо маркёров PLAP, b-ХГЧ, а-FP, которые обладают различной чувствительностью и специфичностью, высокой вариабельностью окрашивания (как качественного так и количественного), традиционно применяются кластеры дифференцировки CD117 (позитивен в семиномах, герминомах, дисгерминомах) и CD30 (положителен в эмбриональном раке), которые обладают низкой специфичностью в силу широкого спектра негерминально-клеточных опухолей различного генеза, в которых они позитивны.

Использование транскрипционных факторов (OCT3/4, sall4) существенно повышает точность и специфичность диагностики герминогенных опухолей, что обуславливает необходимость их включения в диагностическую панель.

Кластеры дифференцировки (CD) составляют большую гетерогенную группу диагностических маркёров, используемых в первую очередь в диагностике и дифференциальной диагностике лимфопролиферативных заболеваний.

4.2. Прогностические и предиктивные антитела

В нашем арсенале сегодня имеется широкий набор иммуногистохимических маркёров, позволяющих охарактеризовать потенциал опухоли и выявить наличие мишеней для терапии: ER, PR, HER2, Ki67, p53, ALK, MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6), PD-L1 и др.

Оценка каждого маркёра регламентируется специфическими рекомендациями, может зависеть от клона антитела, лекарственного препарата, клинического запроса.

Многие из этих маркёров требуют количественной или полуколичественной оценки экспрессии, что обнажает проблему воспроизводимости такой оценки, в первую очередь межисследовательской и межлабораторной.

Использование методов цифровой патологии может помочь решить этот вопрос (рис. 10).

Кроме того, тестирование предиктивных маркёров требует внедрения и жесткого соблюдения стандартов контроля качества на всех этапах обработки гистологического материала (преаналитическом), выполнения тестирования и анализа его результатов.

Отчасти эти задачи могут быть решены посредством использования адекватного внешнего тканевого контроля (зависит от конкретного теста).

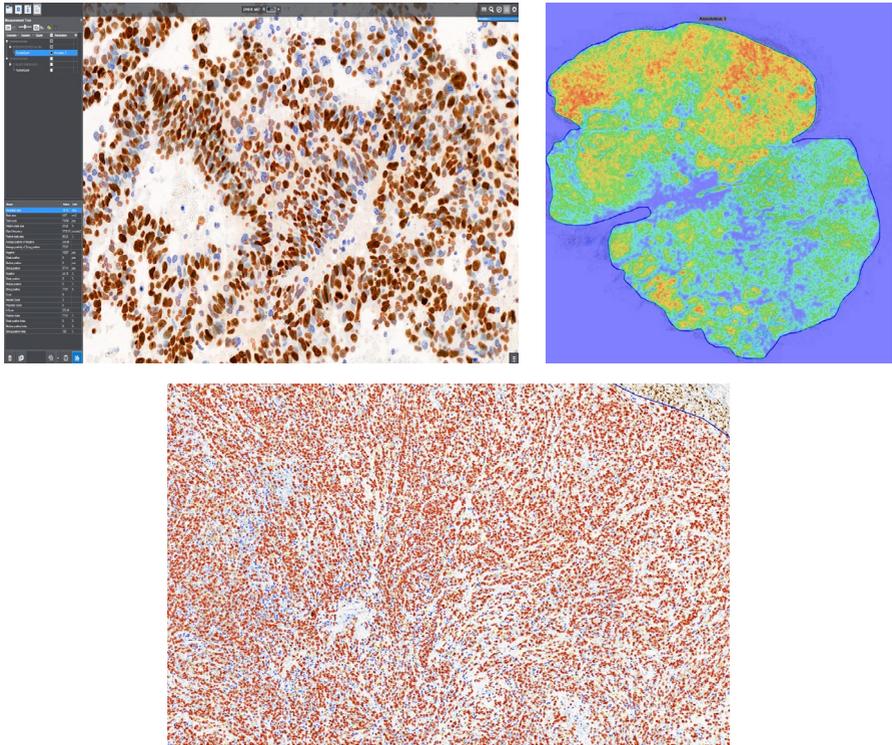


Рис. 10. Представлен вариант сегментации ткани (выделения ткани опухоли отличным цветом) и автоматизированного подсчета доли позитивных клеток в выделенном участке при помощи программного обеспечения.

Позволяет автоматизировать, ускорить процесс подсчета и значительно повысить воспроизводимость оценки.

Так, для тестирования HER2 оптимальным является использование составного тканевого контроля, который должен включать помимо позитивной ткани (3+), еще и фрагменты ткани с низким уровнем экспрессии (0, 1+), для исключения ситуации ложнопозитивного окрашивания.

Для PD-L1 оптимальным контролем (рис. 11) может служить ткань миндалина, так как она содержит клетки с разным уровнем интенсивности экспрессии маркера (клетки эпителия крипт, как правило, интенсивно позитивны, макрофаги центров размножения фолликулов – слабо позитивны).

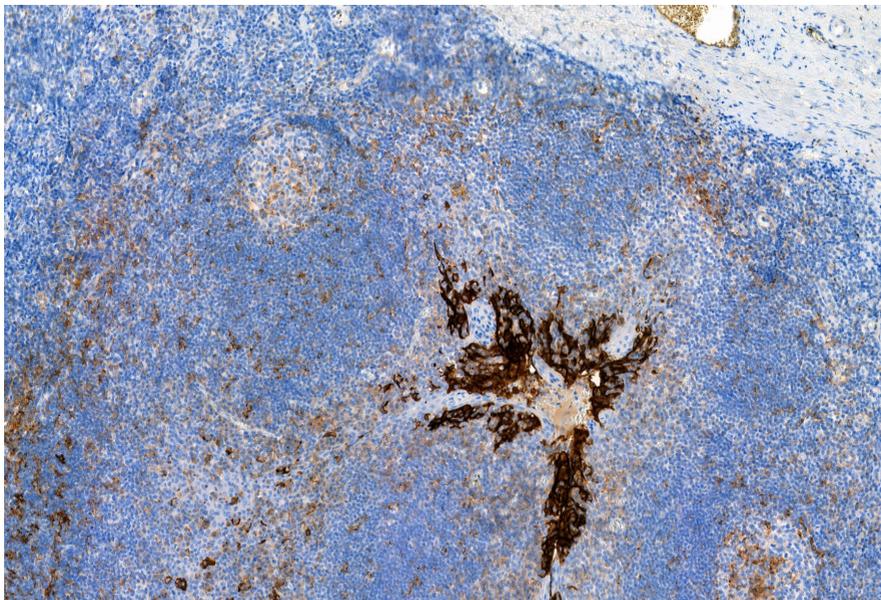


Рис. 11. Миндалины, окраска PD-L1 (22C3).

Пример оптимальной контрольной ткани – содержит элементы с разным уровнем экспрессии искомого антигена:

эпителиоциты крипт интенсивно окрашиваются,

гистиоциты центров размножения лимфоидных фолликулов – слабо.

Глава 5.

Стандартизация иммуногистохимических методов

Качество иммуногистохимической окраски, равно как и чувствительность метода, зависят не только от правильно подобранных реагентов для окрашивания, но во многом определяется гистологическим материалом.

Соответственно, преаналитическая стадия подготовки гистологического материала играет ключевую роль в воспроизводимости аналитической стадии и предопределяет диагностическую ценность аналитической и постаналитической стадий процедуры иммуногистохимического окрашивания.

5.1. Преаналитическая стадия

Преаналитическая стадия включает в себя несколько этапов обработки гистологического материала.

5.1.1. Обработка формалином

На первом этапе происходит иссечение фрагментов для патологоанатомического исследования, избегая разминания биоптата или его сдавливания, укладка материала в гистологические кассеты с последующей фиксацией в 10% забуференном формалине на следующей преаналитической стадии.

Критической стадией подготовки материала является стадия фиксации.

Действие фиксатора направлено на предотвращение аутолиза и основано на взаимодействии формальдегида с белками и нуклеиновыми кислотами.

Формальдегид модифицирует ткань реакциями поперечного сшивания, начиная с областей богатых аденин-тимидином (А-Т) в

нуклеиновых кислотах, реагирует с ненасыщенными липидами через взаимодействие по $-C = C$ и $-SH$ и белками – самое высокое сродство к формальдегиду имеют остатки аминокислот – цистеин, лизин, гистидин и тирозин.

На первой фазе взаимодействия аминогруппы ($-NH_2$) белка с формальдегидом образуется основание Шиффа (имин) (рис. 12) – это наиболее медленная лимитирующая стадия реакции.

Вторая фаза процесса сопряжена с образованием метиленового мостика как результат взаимодействия основания Шиффа с функциональной группой (R) второго белка (рис. 12) – она также является медленной стадией процесса фиксации.

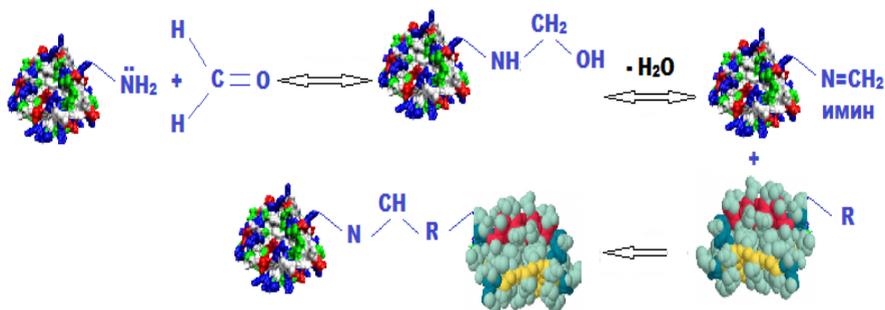


Рис. 12. Схема реакционного взаимодействия формальдегида с белками.

Процесс полной фиксации, по данным, описанным в мировой литературе, проходит за 24 часа при нормальных условиях.

Влияние перефиксации показано в [11] на биомаркёрах ER и PR с использованием различных производителей антител (рис. 13).

Дополнительная задержка материала в формалине приводит к увеличению количества метиленовых мостиков и их стабилизации, которые затрудняют восстановление нативной структуры белков при демаскировке антигена.

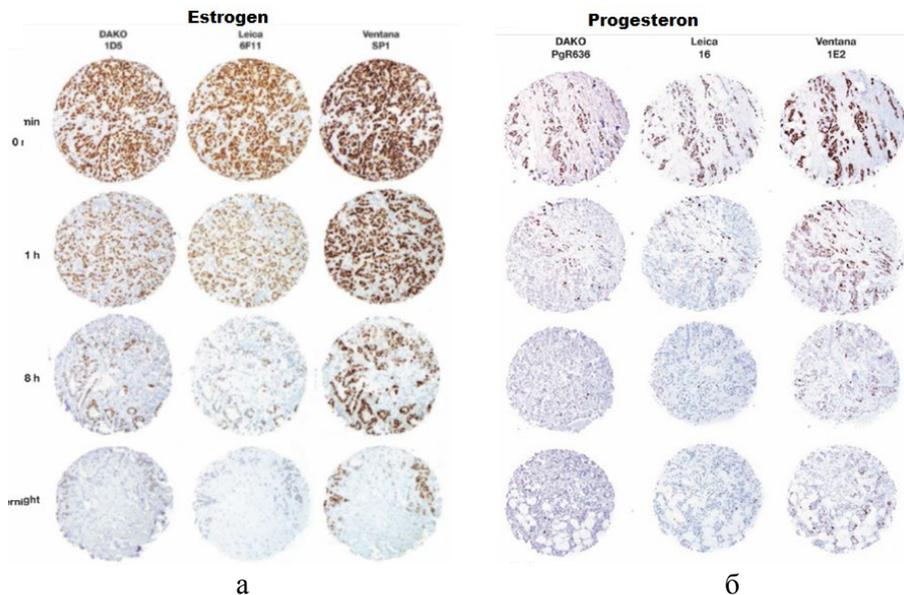


Рис. 13. Экспрессия рецепторов эстрогена (а) и прогестерона (б) различных клонов и с разным временем дополнительной задержки в формалине (0 минут, 1 и 8 часов и в течение ночи), приводится по [11].

5.1.2. Обработка декальцинирующими агентами

В процессе предобработки костной ткани гистологический образец подвергается дополнительным воздействиям кислотными растворами, содержащими как неорганические (азотная кислота, соляная кислота), так и органические кислоты (муравьиная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота-ЭДТА).

Кислоты способны привести к деструкции ДНК и белковых молекул.

Последнее является критическим моментом для проведения иммуногистохимических исследований в связи с необратимой потерей антигенных эпитопов.

На сегодняшний день биологический материал в гистологической лаборатории, потенциально пригодный для иммуногистохимических исследований, должен проходить декальцинацию в щадящих декальцинирующих растворах, например, в растворе ЭДТА или растворе разбавленной муравьиной кислоты.

На рисунке 14 представлен результат иммуногистохимического окрашивания материала после декальцинации в различных декальцинирующих растворах.

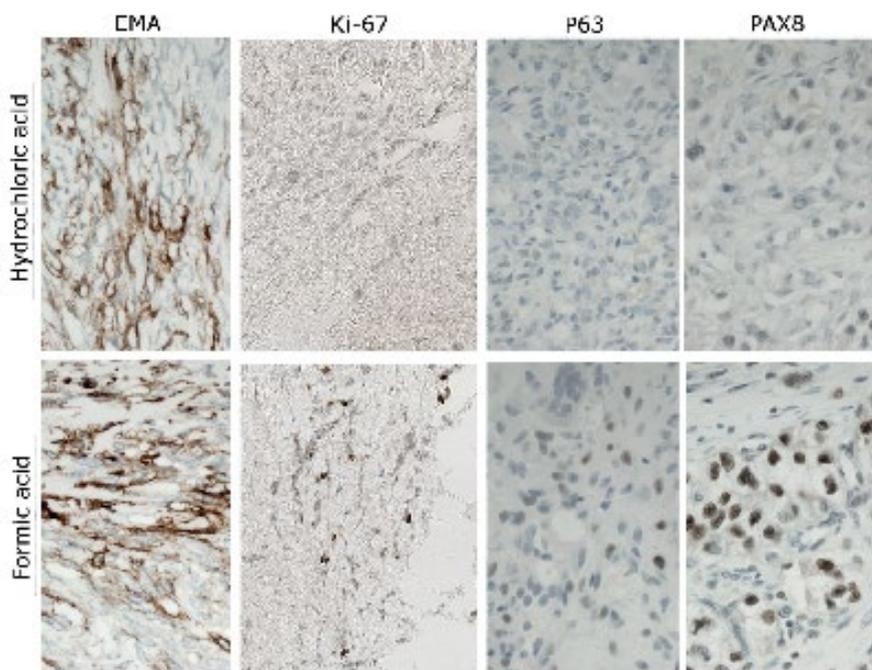


Рис. 14. Результат иммуногистохимического окрашивания костной ткани после декальцинации в различных декальцинирующих растворах:

соляная кислота – сверху,

муравьиная кислота – внизу (приводится по [10]).

Подготовка костного материала к иммуногистохимическому исследованию в патологоанатомическом отделении НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова осуществляется с использованием муравьиной кислоты или ЭДТА, время проведения декальцинации рассчитывается в зависимости от природы ткани, от размера и консистенции образца.

Наш опыт и результаты показывают, что декальцинирующие агенты на основе ЭДТА и муравьиной кислоты могут использоваться для декальцинации без оказания вредного необратимого воздействия на результаты иммуногистохимического окрашивания.

5.1.3. Влияние температуры

Существенным фактором внешнего пагубного необратимого воздействия на биологический объект является температура.

Влияние температуры может проявиться в момент пропитывания расплавленным парафином или в процессе сушки парафиновых срезов, подготовленных для иммуногистохимического исследования.

Деструктивное действие на белковые структуры выражено длительностью высокотемпературной выдержки ткани либо в жидком парафине, нагретом до 60-70°C, или при длительной сушке в термостате.

Для рутинной практики рекомендуется сушить стекла с монтированными парафиновыми срезами при комнатной температуре в течение 24 часов или от 50 до 60°C в течение минимум 1 часа.

В нашей лаборатории сушка осуществляется при 37°C в течение ночи.

По литературным данным [6] сушка при 60°C в течение 4 часов приводит к снижению интенсивности иммуногистохимического окрашивания у 23% целевых антигенов по сравнению ночной выдержкой при 37°C.

Эффекты усиливаются с температурой и продолжительностью температурного воздействия, так, 69% антигенов-мишеней демон-

стрируют пониженную интенсивность окрашивания или повышенное неспецифическое окрашивание после 8-часовой инкубации при 70°C.

Потеря антигенности архивных срезов тканей, фиксированных формалином и залитых парафином, отрицательно сказываются на диагностической ценности иммуногистохимического исследования.

Механизмы, лежащие в основе потери антигенности в парафиновых срезах, остаются неясными.

Существует предположение [5], что неадекватная обработка ткани, приводящая к задержке эндогенной воды в срезах ткани, приводит к деградации антигена и снижению иммунореактивности в препарате.

Таким образом, как показано в [5], воздействие высокой влажности и градиента температуры при хранении предметных стекол с смонтированными парафиновыми срезами значительно влияют на качество иммуногистохимического окрашивания.

Хранение при более низких температурах показало сохранение удобоваримого результата окрашивания, в то же время сухие условия хранения при комнатной температуре показывают заметную позитивную тенденцию по качеству окрашенных препаратов, по сравнению с хранящимися при низких температурах во влажной атмосфере (рис. 15).

5.2. Аналитическая стадия

На этом этапе при назначении панели маркёров врач должен выбрать фрагмент ткани, не только содержащий репрезентативный участок образования, которое планируется тестировать, но и содержащий нормальную неизменную фоновую ткань, которая может служить внутренним позитивным или негативным контролем для хотя бы части из назначенных антител. Это возможно в ситуациях соблюдения стандартов вырезки, подразумевающих обязательный забор фрагментов на границе измененных и неизмененных тканей.

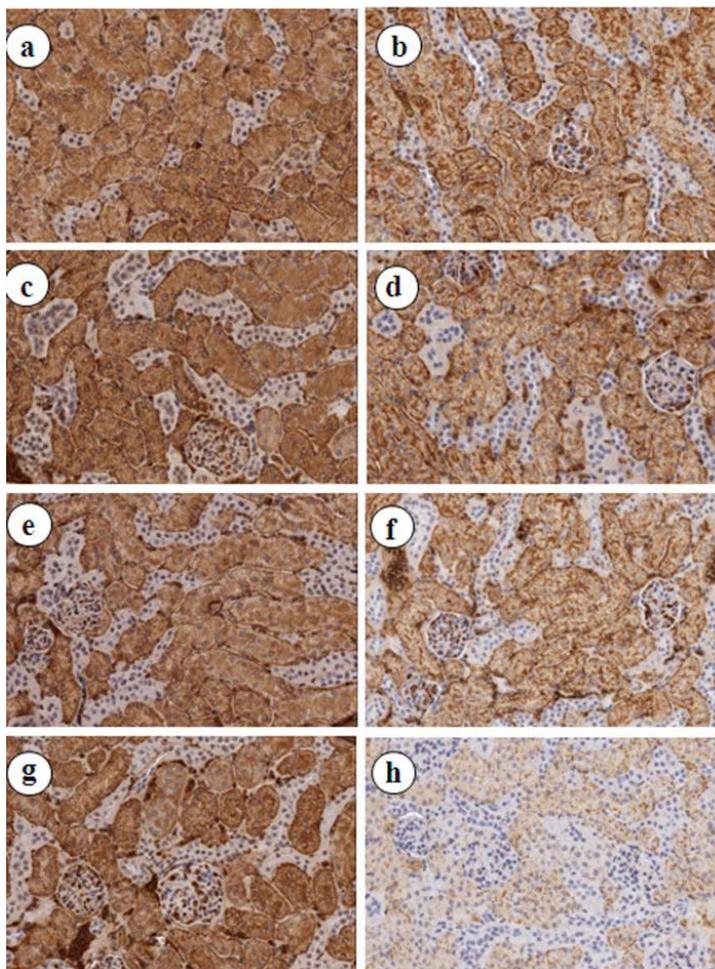


Рис. 15. Иммуногистохимический анализ экспрессии AQP1 в фиксированных формалином залитых парафином срезах ткани почек мыши при разных условиях хранения в течение 3 месяцев.

a – RT-Vac + Drierite, b – RT-НС, c – 4C-Vac + Drierite,

d – 4C-НС, e – 30C-Vac + Drierite, f – 30C-НС,

g – 37C-Vac + Drierite, h – 37C-НС.

All photomicrographs, $\times 200$. НС, humidity chamber; RT, room temperature;

Vac, vacuum packed (приводится по [5]).

Использование внутреннего контроля представляется более предпочтительным, чем использование внешнего контроля, т.к. внешняя контрольная ткань подверглась обработке в отличных в разной степени условиях (если тестируется образец из внешней лаборатории, то различия в обработке могут быть существенными), чем ткань в непосредственной близи от изучаемого объекта.

При отсутствии внутреннего контроля при назначении панели антител необходимо определиться с оптимальным внешним контролем для каждого из выбранных антител.

Оптимальной контрольной тканью может служить ткань, которая в норме демонстрирует не только интенсивную позитивную реакцию с тестируемым маркером, но и реакцию умеренной интенсивности и слабую, это особенно актуально при необходимости полуколичественной оценки интенсивности реакции и/или выявлении низких уровней экспрессии маркера.

При оценке выполненной ИГХ-реакции в первую очередь оценивается контрольная ткань (внешний и внутренний контроль) на предмет наличия экспрессии в негативном контроле, выраженного фонового окрашивания.

Если они имеют место быть, то стекло не подлежит дальнейшей оценке, необходимо переделать тест.

Если негативный контроль отрицателен, фоновое окрашивание отсутствует или не препятствует оценке реакции, то следующим этапом необходимо оценить наличие окрашивания в позитивном контроле.

Если окрашивание в позитивном контроле отсутствует, то стекло не подлежит оценке и требуется повторить тест.

Если имеется окрашивание позитивного контроля в ожидаемой интенсивности, то препарат может быть оценен качественно и, при необходимости, количественно/полуколичественно.

5.3. Постаналитическая стадия

Постаналитическая стадия включает в себя предупреждение выдачи ошибочных и сомнительных результатов, выработка мер по их устранению; проверка квалифицированным специалистом результата анализа на предмет его достоверности (в плане выявления противоречащих друг другу характеристик или оценок параметров).

На основании обобщенных данных формируется отчетная документация о качестве проведенного исследования.

При наличии единой лабораторной информационной системы отчет формируется непосредственно системой, что значительно уменьшает процент ошибок постаналитической стадии.

На данном этапе выявляется процент некачественных препаратов и анализируются возможные факторы появления дефектов, разрабатываются подходы к устранению возникших проблем.

Наиболее часто погрешность в иммуногистохимическом окрашивании связана с реагентами, качеством материала, человеческим фактором, внешними условиями среды.

Состояние реагентов необходимо отслеживать с помощью проведения внутреннего и внешнего, положительного и отрицательного контроля. Например, отрицательный контроль первичных антител осуществляется с использованием срезов тканей, не проявляющих специфического окрашивания по отношению к первичному антителу, в противоположность первому, положительный контроль проявляет выраженную специфичность к антителу.

Общепринято в лабораториях, осуществляющих иммуногистохимическое исследование, монтировать на предметном стекле соответствующие контроли в виде парафиновых срезов в непосредственной близости от анализируемого среза материала, при таком формировании образца осуществляется одновременный полный цикл иммуногистохимического окрашивания исследуемого материала и контроля.

Подобный подход позволяет установить достоверность и повысить диагностическую ценность исследования.

Внутренний контроль характеризуется наличием искомым антигенов в нормальных клетках обрабатываемой ткани, в то время как внешний контроль подразумевает использование сторонних образцов, предлагаемых производителями антител или организациями, осуществляющими внешний контроль качества препаратов на конкурсной основе.

Качество гистологического материала во многом определяет качество иммуногистохимического окрашивания.

Под качеством гистологического материала понимается весь спектр работы над биологическим объектом: идентификация материала и ее сохранность, вырезка, фиксация, проводка, заливка, микротомия, сушка стекол. Все это разнообразие предварительных этапов работы с тканью создает предпосылки для ошибок.

Устранение погрешностей в части работы с гистологическим материалом и уменьшение вклада человеческого фактора в эти погрешности возможно только при оптимизации управления материальными, информационными и людскими ресурсами внутри лаборатории.

Контрольные вопросы:

1. Первичные антитела, виды.
2. Первичные антитела, варианты производства.
3. Образование комплекса антиген-антитело.
4. История иммуногистохимии.
5. Способы визуализации комплекса антиген-антитело.
6. Этапы иммуногистохимического исследования.
7. Особенности взятия материала для выполнения иммуногистохимического исследования.
8. Особенности фиксации материала при выполнении иммуногистохимического исследования.
9. Особенности проводки ткани при выполнении иммуногистохимического исследования.
10. Получение срезов для выполнения иммуногистохимического исследования.
11. Демаскировка и ее значение при выполнении иммуногистохимического исследования.
12. Промывочные буферные растворы.
13. Методы иммуногистохимического исследования.
14. Оснащение иммуногистохимической лаборатории.
15. Отличие ручного и автоматического метода иммуногистохимического исследования.
16. Плюсы и минусы автоматического метода иммуногистохимического исследования.
17. Плюсы и минусы ручного метода иммуногистохимического исследования.
18. Протокол ручного иммуногистохимического исследования.
19. Отработка протоколов антител для иммуногистохимического метода исследования.
20. Подбор разведений антител иммуногистохимического метода исследования.

21. Контрольные ткани для проведения иммуногистохимического исследования.
22. Реактивы для проведения иммуногистохимического исследования.
23. Система детекции DAKO.
24. Система детекции Leica NOVOLINC.
25. Автоматизированная система окрашивания VENTANA.
26. Автоматизированная система окрашивания THERMO.
27. Автоматизированная система окрашивания DAKO.
28. Автоматизированная система окрашивания Leica BOND.
29. Стекла для иммуногистохимических исследований (адгезивные, заряженные).
30. Возможные артефакты при иммуногистохимическом исследовании.
31. Методы иммуногистохимической окраски.
32. Техника безопасности при проведении иммуногистохимического исследования.
33. Прямой метод иммуногистохимической окраски.
34. Непрямой метод иммуногистохимической окраски.
35. Полуколичественный метод оценки иммуногистохимического исследования.
36. Роль иммуногистохимического метода исследования в определении чувствительности опухоли к лекарственному лечению.
37. Роль иммуногистохимического метода исследования в определении прогноза заболевания.
38. Прогностические маркёры в иммуногистохимическом исследовании.
39. Подготовительный этап обработки срезов.
40. Депарафинизация среза.
41. Демаскировка антигена.
42. Предварительная ферментативная обработка.
43. Группы первичных антител.

44. Диагностические антитела.
45. Эпителиальные маркёры.
46. Органо/тканеспецифичные маркёры.
47. Цитокератины.
48. Нейроэндокринные маркёры.
49. Меланоцитарные и нейроэктодермальные маркёры.
50. Мышечные маркёры.
51. Сосудистые маркёры.
52. Маркёры герминогенных опухолей.
53. Суррогатные аналоги молекулярных перестроек.
54. Прогностические и предиктивные антитела.
55. Влияние преаналитического этапа на результат иммуногистохимического исследования.
56. Влияние фиксации на результат иммуногистохимического исследования.
57. Влияние обработки декальцинирующими агентами на результат иммуногистохимического исследования.
58. Механизм влияния обработки декальцинирующими агентами на результат иммуногистохимического исследования.
59. Влияние температуры на результат иммуногистохимического исследования.
60. Выбор фрагмента для тестирования с учетом внутреннего контроля.
61. Понятие о внутреннем и внешнем контроле.
62. Выбор внешней контрольной ткани.
63. Оценка результатов иммуногистохимического исследования с учетом реакции во внутреннем и внешнем контроле.
64. Цитокератины в иммуногистохимической диагностике опухолей.

Тестовые задания:

Инструкция: выберите один или несколько правильных ответов

1. С помощью какой специфической реакции выявляются белки в иммуногистохимии

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	реакция комплемента	
б	ПЦР	
в	антиген-антитело	+

2. Кто впервые использовал в диагностике меченые флюоресцеином антитела

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	А. Кунс	+
б	Л. Стенбергер	
в	С. Милстейн	

3. Какой маркер специфичен для меланомы?

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	СК	
б	S100	+
в	CD20	

4. Антиген лейкоцитов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD	+
б	СК	
в	СА	

5. Выберите онкофетальный антиген

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	синаптофизин	
б	хорионический гонадотропин	+
в	S100	

6. Какой антиген цитоспецифичный

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	рецептор эстрогена	+
б	гладкомышечный актин	
в	СА-125	

7. Какой антиген тканеспецифичный

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	миоглобин	
б	Ki67	
в	компоненты клеточной мембраны	+

8. Какой антиген специфичен для эпителиальных опухолей

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD10	
б	CK7	+
в	α-фетопроtein	

9. Какой антиген специфичен для лимфомы Ходжкина

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD15	+
б	S100	
в	TTF-1	

10. Какой антиген специфичен для периферических нервов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD10	
б	S100	+
в	TTF-1	

11. Какие рецепторы могут быть позитивны в раке молочной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ER	+
б	PR	+
в	TTF-1	

12. Какой антиген специфичен для герминомы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD117	+
б	S100	
в	CD10	

13. Какой антиген встречается в нейроглиальных опухолях

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	миоглобин	
б	нейроспецифическая энзолаза	+
в	кальретинин	

14. Белки промежуточных филаментов относятся к группе антигенов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	тканеспецифичные	+
б	цитоспецифичные	
в	опухольассоциированные	

15. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей молочной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	c-erbB2	+
б	α -фетопротеин	
в	рацемаза	

16. Экспрессия какого белка часто выявляется в герминогенных опухолях

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	кальпонин	
б	α -фетопротеин	+
в	кальцитонин	

17. Экспрессию какого антитела теряет дольковый рак молочной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	E-cadherin	+
б	α -фетопротеин	
в	кальцитонин	

18. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей молочной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	PAX-8	
б	NSE	
в	GATA3	+

19. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей почек

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	PAX-8	+
б	NSE	
в	HepPar1	

20. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей яичника

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	WT-1	+
б	PAP	
в	NSE	

21. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей яичника

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	РЭА	
б	PSA	
в	PAX-8	+

22. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей щитовидной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	тиреоглобулин	+
б	хромогранин	
в	аргиназа-1	

23. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей щитовидной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	глюкагон	
б	TTF-1	+
в	PSA	

24. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей щитовидной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ТТФ-1	+
б	РЭА	
в	CD10	

25. Какой антиген наиболее специфичен для миоэпителиальных клеток

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	кальпонин	+
б	глюкагон	
в	OC-125	

26. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей предстательной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	РАР	+
б	CDX-2	
в	хромогранин	

27. Какой антиген наиболее специфичен для миоэпителиальных клеток

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD56	
б	синаптофизин	
в	p63	+

28. Какой антиген наиболее специфичен для миоэпителиальных клеток

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	α -фетопроtein	
б	РАХ-8	
в	CK5/6	+

29. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей толстой кишки

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	синаптофизин	
б	РАХ-8	
в	CDX-2	+

30. Какой антиген относится к меланоцитарным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ER/PR	
б	тирозиназа	+
в	HepPar1	

31. Какой антиген относится к меланоцитарным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	KBA.62	+
б	хромогранин	
в	PSA	

32. Какой антиген относится к меланоцитарным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CK20	
б	CD56	
в	S100	+

33. Какой антиген относится к нейроэндокринным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	панкреатический полипептид	
б	хромогранин	+
в	рацемаза	

34. Какой антиген относится к нейроэндокринным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	β -катенин	
б	PSA	
в	синаптофизин	+

35. Какой антиген относится к нейроэндокринным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	BCA-225	
б	CD56	
в	PGP 9.5	+

36. Какой антиген относится к нейроэндокринным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	напсин А	
б	β -катенин	
в	хромогранин	+

37. Какой антиген наиболее специфичен для опухолей женского полового тракта

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	PAX-8	+
б	гастрин	
в	CD10	

38. Какой антиген относится к нейроэндокринным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	соматостатин	+
б	NSE	
в	CDX-2	

39. Какой антиген обнаруживается в нейроэндокринных раках

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	WT-1	
б	PAP	
в	NSE	+

40. Какой антиген обнаруживается в нейроэндокринных раках

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	синаптофизин	+
б	PAX-8	
в	CDX-2	

41. Какой антиген обнаруживается в нейроэндокринных раках

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	BCA-225	
б	CD56	+
в	VIP	

42. Какой антиген обнаруживается в нейроэндокринных раках

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	глюкагон	
б	β -катенин	
в	хромогранин	+

43. Выберите иммуногистохимический маркёр миогенной опухоли

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	глюкагон	
б	миозин	+
в	хромогранин	

44. Выберите иммуногистохимический маркёр миогенной опухоли

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	панкреатический полипептид	
б	десмин	+
в	рацемаза	

45. Выберите иммуногистохимический маркёр миогенной опухоли

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	тирозиназа	
б	СА 19-9	
в	актин	+

46. Выберите иммуногистохимический маркёр меланомы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	тирозиназа	+
б	СА 242	
в	актин	

47. Выберите иммуногистохимический маркёр меланомы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	РЭА	
б	маммоглобин	
в	НМВ-45	+

48. Выберите иммуногистохимический маркёр меланомы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	WT-1	
б	melan a	+
в	CD10	

49. Выберите иммуногистохимический маркёр герминальных клеток

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD15	
б	CD57	
в	OCT 3/4	+

50. Выберите иммуногистохимический маркёр герминальных клеток

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD117	
б	Sall4	+
в	CD56	

51. Выберите иммуногистохимический маркёр, не встречающийся в герминогенных опухолях

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	CD117	
б	Sall4	
в	CD 163	+

Список литературы

1. Иммуногистохимические методы: руководство / ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: ДАКО / пер. с англ., под ред. Г. А. Франка и П. Г. Малькова. – М., 2011. – 224 с.
2. Chetty R., Cooper K., Gown A. M. Leong's Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology. – 3th ed. – Cambridge University Press. – 2016. – 500 p.
3. Chu P., Weiss L. Modern Immunohistochemistry. – Cambridge University Press. – 2016. – 699 p.
4. Coons A. H., Creech H. J., Jones R. N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group // Exp. Biol. Med. – 1941. – Vol. 47. – P. 200. – DOI: 10.3181/00379727-47-13084P.
5. Dabbs D. J. Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and genomic application. – 5th ed. – ELSEVIER. – 2019. – 932 p.
6. Engel K. B., Moore H. M. Effects of Preanalytical, Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2011. – Vol. 135. – P. 537-543.
7. [Http://www.bialexa.ru/technical-support/methods/hrp-conjugate/](http://www.bialexa.ru/technical-support/methods/hrp-conjugate/)
8. Li Y., Li H., Smith-Gill S. J., Mariuzza R. A. Three-Dimensional Structures of the Free and Antigen-Bound Fab from Monoclonal Antilysozyme Antibody HyHEL-63 // Biochemistry. – 2000 – Vol. 39. – P. 6296-6309.
9. Li Y., Ziesmer S. C., Lazcano-Villareal O. Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the IP method // J. Histochem. Cytochem. – 1987. – Vol 35. – P. 1457.
10. Miquelestorena-Standley E., Jourdan M.-L., Collin C., Bouvier C., Larousserie F., Aubert S., Gomez-Brouchet A., Guinebretière J.-M., Tallegas M., Brulin B., Nail L.-R. L., Tallet A., Loarer F. L., Massiere J., Gonzague de Pinieux C. G. Effect of decalcification protocols on immunohistochemistry and molecular analyses of bone samples // Modern

Pathology. – 2020. – Vol. 33. – P. 1505-1517.

11. Qiu J., Kulkarni S., Chandrasekhar R., Rees M., Hyde K., Wilding G., Tan D., Khoury T. Effect of Delayed Formalin Fixation on Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer A Study of Three Different Clones // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2010. – Vol. 134. – P. 813-819.

12. Sternberger L. A., Hardy P., Cuculis J. J., Mayer H. G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* – 1970. – Vol. 18, № 5. – P. 315-333.

13. Xie R., Chung J.-Y., Ylaya K., Williams R. L., Guerrero N., Nakatsuka N., Badie C., Hewitt S. M. Factors, Influencing the Degradation of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* – 2011. – Vol. 59(4). – P. 356-365.

Отпечатано в ООО «АРТЕК»,
СПб, Университетская наб., д. 19
E-mail: artek-1@mail.ru, т. 323-32-01
Подписано в печать 09.11.20
Формат 60x90/16. Печ. л. 4,75.
Тираж 50 экз.

ISBN 978-5-6045022-6-6



9 785604 502266