

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства
здравоохранения Российской Федерации ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф.
В.Ф. Войно-Ясенецкого

Кафедра онкологии и лучевой терапии с курсом ПО

РЕФЕРАТ

Роль иммуногистохимии в морфологической диагностике злокачественных новообразований



Зук Р.А.
18.11.1920

Заведующий кафедрой:

ДМН, профессор Зук Р.А.

Проверил: КМН, доцент Гаврилюк Д.В.

Выполнила: ординатор Левченко Е.А.

Красноярск 2019

План:

1) Введение.....	3
2) Базовые понятия.....	3
3) История развития.....	6
4) Задачи ИГХ.....	6
5) Отличия гистологического и иммуногистохимического исследований.....	6
6) Сроки выполнения ИГХ исследования	7
7) Метод проведения иммуногистохимии	8
8) Пример: Тестирование рака молочной железы	8
9) Оценка результатов	9
10) Вывод.....	9
11) Список литературы.....	11

Иммуногистохимия, или иммуногистохимический анализ — является дополнительным методом исследования, применяемым в патологической анатомии при диагностике доброкачественных и злокачественных новообразований, когда постановка диагноза по гистологическим препаратам не представляется возможной или требуется уточнение клинически важных молекулярных параметров опухоли.

Данная методика основана на выявлении в анализируемом образце ткани белков, специфичных для того или иного вида клеток, что позволяет отличать один вид опухоли от другого, а также выявлять маркеры, отвечающие за лекарственную чувствительность опухолевой ткани.

Термин «иммуногистохимия» образован из трех составляющих, указывающих на три медико-биологические дисциплины, — иммунологию, гистологию и химию, которые послужили основой для этого нового научного направления. Иммуногистохимия (ИГХ), или иммуноцитохимия (ИЦХ), — это область биологической и медицинской науки, теоретическое обоснование, разработка и практическое применение современных методов гистологического исследования и микроскопической диагностики, базирующихся на использовании реакции «антиген — антитело» для селективного выявления белков (и других молекул, обладающих антигенными свойствами) в гистологических срезах и цитологических препаратах.

Понятия «иммуногистохимия» и «иммуноцитохимия», по существу, должны считаться синонимами. Однако на практике нередко под *иммуногистохимическими* подразумевают методы, используемые для определения искомым антигенов в тканевых срезах, тогда как реакции с антигенами, выявляемыми в цитологических препаратах, называют *иммуноцитохимическими*. Следует заметить, что принципиальных различий в теоретических основах и практическом применении этих методов нет. В дальнейшем в настоящей книге будет использоваться термин «иммуногистохимия» и только в тех случаях, когда это будет необходимо в соответствии с контекстом, — «иммуноцитохимия».¹

Базовые понятия

В основе любой иммунологической реакции лежит взаимодействие антигена с антителом, которое приводит к формированию комплекса «антиген-антитело».

Антигены — чужеродные вещества сложной органической природы, способные при попадании в организм вызывать иммунные реакции.

¹ Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии, руководство под ред Д.Э. Коржэвского, 2014. Изд-е 2.

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

Различают полные и неполные антигены. Полные антигены – это белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, синтетические высокополимерные соединения, вирусы, паразиты, бактерии. Неполные антигены, или гаптены, – низкомолекулярные соединения, которые сами по себе не могут вызывать иммунного ответа, однако, соединяясь с клетками и тканями организма, в комплексе становятся полными антигенами, способными вызывать иммунный ответ.²

Антитела – вещества белковой природы, которые образуются в организме в ответ на антигены и, специфически взаимодействуя с ними, уничтожают их, обеспечивая гуморальный иммунитет. Антитела обладают специфичностью к антигенам, т.е. связываются только с тем антигеном, на который вырабатывались.

Антитела принадлежат к группе белков иммуноглобулинов – близкие по химическому строению и свойствам глобулярные белки, которые обладают способностью соединяться с антигенами. Антигены, попадая в организм, способствуют образованию антител. У человека и высших позвоночных известно 5 классов иммуноглобулинов (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM). Молекулы иммуноглобулинов (Ig) построены из легких и тяжелых полипептидных цепей, расположенных симметрично (L- и H-цепи). Легкие и тяжелые цепи состоят из двух областей – вариабельной и постоянной. Вариабельные участки принимают участие в контакте с антигеном, это определяет специфичность антител. Антитела чувствительны к протеолитическим ферментам и распадаются на два идентичных Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Fab-фрагменты сохраняют свою способность связываться с антигеном. Fc-фрагмент не способен связываться с антигеном, он определяет специфичность связывания молекулы Ig с клетками-эффекторами, несущими на своей поверхности рецепторы Fc-фрагмента; именно к этой части антитела можно присоединить различные вещества; в частности для проведения иммуногистохимических реакций к данному фрагменту присоединяют биотин, флуорохромы или ферменты.

Структурное разнообразие антител определяется последовательностью аминокислот в вариабельных областях тяжелых и легких цепей. Постоянные области иммуноглобулинов кодируются одним геном для каждого класса антител. И антитела, и антигены могут быть поливалентными (т.е. иметь

² . Иммуногистохимические методы, руководство George L. Kumar, Lars Rudbeck (Русское издание под редакцией Г.А.Франка и П.Г.Малькова) Москва, 2011.

множество участков связывания) в результате повторения эпитопов и в результате наличия многих эпитопов, с которыми будут связываться разные антитела.

Антитела, которые используются в иммунологических методиках, получают путем повторной иммунизации различных животных (чаще мышей, кроликов, крыс, овец, лошадей и др.) определенным антигеном. После выработки антител у иммунизированного животного берут сыворотку крови и очищают ее от других сывороточных протеинов.

Поскольку большие молекулы могут иметь несколько эпитопов, они стимулируют множество линий В-клеток, которые синтезируют несколько видов антител к разным эпитопам одного и того же антигена. Получаемые антитела называют «поликлональными», они являются смесью антител к различным эпитопам антигена.

Моноклональные антитела представляют собой продукт одного клеточного клона плазматических клеток, таким образом все антитела являются иммунологически идентичными и реагируют с одним эпитопом антигена, к которому они были получены. Получение моноклональных антител включает в себя следующие этапы: иммунизация животных; подготовка В-лимфоцитов селезенки к слиянию; слияние с клетками миеломы; отбор индуцирующих специфические антитела клонов; клонирование и наработка гибридомных клеток; получение культуральной жидкости или асцита, содержащих антитела; выделение антител.

Важнейшим этапом любого иммуногистохимического метода является визуализация результатов реакции «антиген – антитело». Антитела обладают свойством прочно связываться с тканевыми антигенами, при этом не связанные антитела можно удалить отмыванием срезов. Поскольку окрашенные продукты реакции являются нерастворимыми, они оседают в месте взаимодействия антител. Для выявления образовавшегося в процессе реакции комплекса «антиген – антитело», используют различные метки, связанные с Fc-фрагментом антител: ферменты, флуорохромы, биотин, металлы.

В настоящее время в качестве окрашенных меток широко используются пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза. Окисление пероксидазы хрена с помощью 3-диаминобензидаина тетрахлорида придает продуктам реакции коричневую окраску, в то время как щелочная фосфатаза после взаимодействия с различными субстратами (AS-MX фосфат, 5-бром-4-хлоро-3-индоксил фосфат и др.) формирует нерастворимые продукты, которые в зависимости от используемого красителя можно окрасить в синий (прочный синий ВВ) или красный (прочный красный TR) цвет.

Подобным образом осуществляется визуализация первоначально не видимых тканевых и клеточных антигенов с помощью иммуногистохимической методики.

Историческая справка

В 1941 году американский иммунолог Альберт Кунс впервые решил использовать антитела в лаборатории, чтобы «распознавать» с помощью них белки бактерий. В 1984 году биохимик из Аргентины Сезар Мильштейн получил Нобелевскую премию за то, что создал гибрид опухолевой клетки с лимфоцитом, которая могла синтезировать моноклональные антитела. После этого началось производство моноклональных антител для диагностических и лечебных целей.

В 1994 г. С. Тэйлор применил иммуногистохимический анализ, чтобы проверить 20 000 опухолей, и обнаружил, что диагнозы в половине случаев были ошибочными. Иммуногистохимия зарекомендовала себя как эффективный метод диагностики.

Задачи ИГХ

- Отнести злокачественную опухоль к тому или иному типу.
- Выяснить, в каких генах опухолевых клеток произошли мутации, какие белки способствуют прогрессированию рака.
- Выявить первичную опухоль и ее метастазы.
- Определить, произошла ли злокачественная трансформация клеток.
- Определить прогноз для пациента.
- Разобраться, поможет ли в данном случае таргетная терапия.
- Определить, чувствительны ли опухолевые клетки к химиотерапии, лучевой терапии.

Отличия гистологического и иммуногистохимического исследований

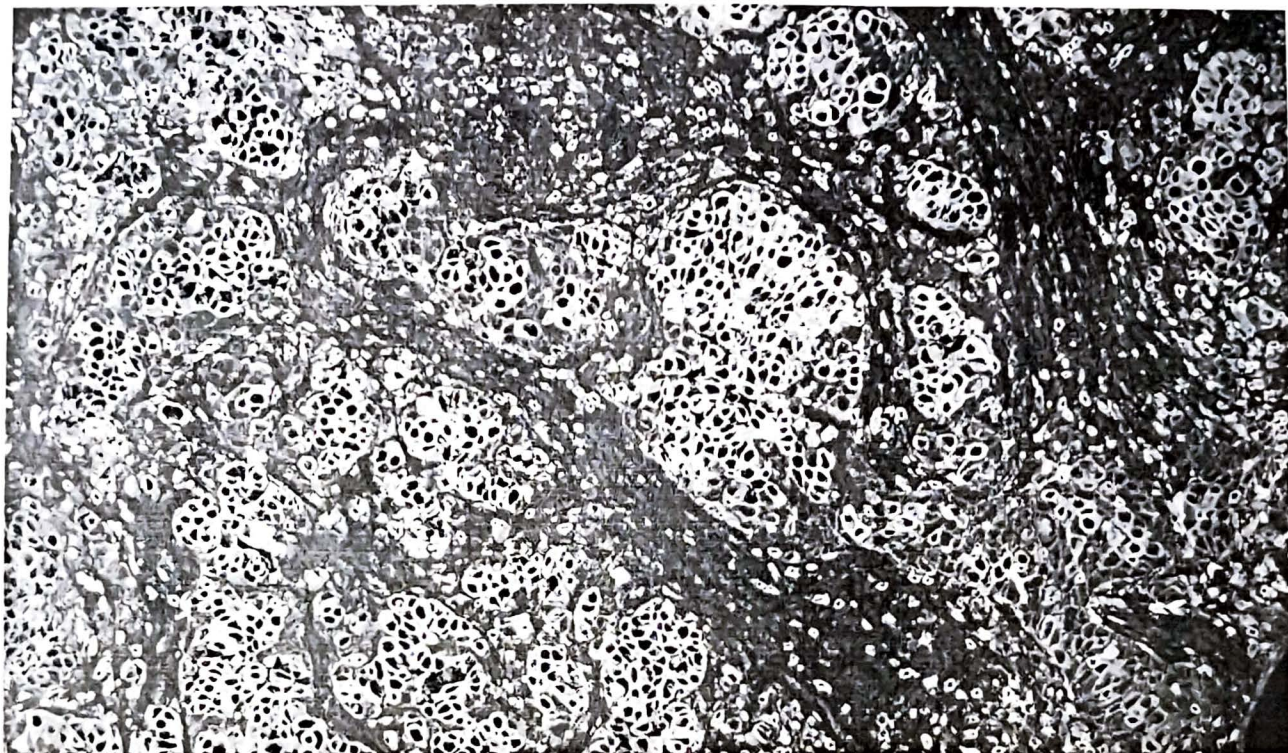
В ряде случаев проведения обычного гистологического исследования биопсии бывает недостаточно, что объясняется следующей причиной: опухоль имеет крайне неспецифичное микроскопическое строение, которое не позволяет поставить окончательный диагноз.³

Например, диагноз практически всех лимфом и лейкозов (более 70 видов!) ставится после ИГХ исследования, а в части случаев дополнительно требуется молекулярно-генетическое исследование; в свою очередь, за гистологическим диагнозом «мелкокруглоклеточная опухоль» может скрываться до 13 различных злокачественных опухолей, каждая из которых

³ Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей. Петров С.В. Райхлин Н.Г. Казань, 2004. Стр12.

имеет свой прогноз и требует индивидуального плана химиолучевого лечения единственным методом, способным помочь врачу в дифференцировании этой группы опухолей, является ИГХ исследование.

Таким образом, иммуногистохимия позволяет точно указать нозологию (разновидность) опухоли, что чрезвычайно важно для проведения адекватного лечения, а также – для прогнозирования развития заболевания. Например, некоторые разновидности рака молочной железы (тубулярный, фиброматоз-подобный) не требуют иного лечения, кроме хирургического.



Сроки выполнения ИГХ исследования

В соответствии с п.24 Приказа №179п от 24.03.2016 г. Минздрава России, срок выполнения ИГХ исследования¹:

- с использованием до 5 маркеров включительно – не более 7 рабочих дней,
- с использованием более 5 маркеров – не более 15 рабочих дней.

Метод проведения иммуногистохимии

Для того чтобы выполнить иммуногистохимический анализ, нужно получить опухолевую ткань, то есть провести биопсию. В качестве материала можно

¹ п.24 Приказа №179п от 24.03.2016 г. Минздрава России о правилах проведения патолого-анатомических исследований

использовать столбик ткани, полученный во время трепан-биопсии, фрагмент тканей или даже целый орган, удаленный во время операции. Образец ткани фиксируют с помощью формальдегида (иногда используют метанол, ацетон и другие фиксаторы — это зависит от того, какой антиген нужно выявить, и реагирует ли он с теми или иными фиксаторами) и погружают в парафин. Парафинизация помогает законсервировать ткань, сохранить ее структуру на длительное время.

Затем ткань, помещенную в парафин, нарезают с помощью специального инструмента — микротомы — на слои толщиной 3–5 мкм. Эти тонкие срезы помещают на стекло, покрытое, специальным клеем.

Некоторые образцы слишком чувствительны к реагентам, которые применяют во время вышеописанной процедуры. Их нельзя помещать в парафин. Такие ткани замораживают жидким азотом. Этим альтернативным методом пользуются редко, только в случае необходимости, так как у заморозки есть некоторые недостатки: она делает изображение под микроскопом не таким четким, требует специальных условий хранения образцов. Фиксацию ткани в таких случаях проводят уже после нанесения на стекло и размораживания, ацетоном или формальдегидом.

После того как срезы нанесены на стекло, из них нужно удалить весь парафин, иначе антитела не прореагируют с антигеном. Эта процедура называется депарафинизацией. Ее проводят с помощью ксилола. Затем выполняют еще некоторые подготовительные процедуры, чтобы антитела могли успешно прореагировать с нужными антигенами, и, наконец, проводят непосредственно иммуногистохимический анализ. Обработанную антителами ткань рассматривают под микроскопом, чтобы проверить, окрасилась ли она.⁵

Тестирование рака молочной железы.

Ведущее место среди онкологических заболеваний у женщин принадлежит раку молочной железы (РМЖ). Проблема особенно актуальна в связи с ростом заболеваемости (более 1 млн новых случаев ежегодно) и все еще высокой смертностью от этой формы рака, который прогрессирует на фоне низкой эффективности проводимой терапии. Для того, чтобы оценить прогноз заболевания и подобрать адекватную терапию, в настоящее время уже недостаточно рутинного гистологического исследования препаратов, окрашенных гематоксилином-эозином. Потенциал злокачественности опухоли во многом определяется иммунофенотипом ее клеток и экспрессией

⁵ Иммуногистохимические методы, руководство George L. Kumar, Lars Rudbeck (Русское издание под редакцией Г.А.Франка и П.Г.Малькова) Москва, 2011.

молекул, которые способны запускать механизмы канцерогенеза и способствовать прогрессированию опухоли. Один из видов таргетной терапии основывается на блокировании в клетках РМЖ рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа – HER-2/neu. Сверхэкспрессия (амплификация) гена HER-2/neu в клетках РМЖ во многом определяет прогноз заболевания. Выявление сверхэкспрессии этих рецепторов в опухолевых клетках позволило разработать и внедрить методы селективного или таргетного воздействия на опухоль. В настоящее время используют два основных класса таргетных препаратов: МКАТ, которые получили наибольшее распространение (герцептин, трастузумаб), ингибиторы молекул тирозинкиназы (гефитиниб, га-патиниб). Под воздействием герцептина уменьшается пролиферативная активность опухолевых клеток и повышается их чувствительность к цитостатикам и факторам апоптоза, а наличие подтвержденного HER-2/neu-положительного статуса РМЖ является показанием к применению этого препарата.⁶

Оценка результатов

В ходе проведенного исследования выявляется тип онкогенных клеток и их количество, что в дальнейшем способствует составлению точного прогноза. Внимание обращают на показатель Ki-67. Именно этот маркер показывает степень злокачественности процесса. Если его процентное содержание более 85%, то это указывает на запущенный онкологический процесс с наличием метастазов. Чем выше процент онкогенности, тем неблагоприятнее прогноз.

ИГХ позволяет достаточно надежно идентифицировать мелкие очаги микроинвазии и метастазы. Например, антитела к цитокератинам широкого спектра легко выявляют небольшие группы или единичные раковые клетки в лимфоузлах.⁷

Несмотря на высокую точность полученных результатов, диагноз ставится на основании комплексного обследования.

Вывод

Любой метод имеет свои возможности и ограничения, ИГХ в этом плане не исключение. К трудностям, специфическим для опухолевого роста относятся: коэкспрессия маркерных белков, что дает «смешанный

⁶ Значение иммуногистохимии для таргетной терапии и прогнозирования в онкологии Л.Е. Гуревич, И.А. Казанцева, Н.А. Корсакова, М.А. Бобров ГБУЗМО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ), 2012. №27 стр 28.

⁷ Способность опухолевых клеток к специфической дифференцировке как основа для иммуногистохимической диагностики опухолей человека Н.Т. Райхлин, С.В.Петров, 2014

иммунофенотип» опухоли; низкий уровень экспрессии (или его снижение) маркерных белков при прогрессии новообразования; отсутствие для многих мягкотканых опухолей специфических маркеров; смешанный клеточный состав. Вне зависимости от трудностей метода, ряд преимуществ в выборе метода ИГХ выше: точность дифференцировки типа опухоли, определение метастазов и определение эффективности препаратов.

Список литературы

1. Иммуногистохимические методы, руководство George L. Kumar, Lars Rudbeck (Русское издание под редакцией Г.А.Франка и П.Г.Малькова) Москва, 2011.
2. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии, руководство под ред Д.Э. Коржэвского, 2014. Изд-е 2, стр.20-22
3. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей. Петров С.В. Райхлин Н.Т. Казань, 2004.
4. Значение иммуногистохимии для таргетной терапии и прогнозирования в онкологии Л.Е. Гуревич, И.А. Казанцева, Н.А. Корсакова, М.А. Бобров ГБУЗМО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ), 2012, №27 стр 28.
5. Роль иммуногистохимического исследования в онкологии А.Р. Бейсенаева, 2015
6. Способность опухолевых клеток к специфической дифференцировке как основа для иммуногистохимической диагностики опухолей человека Н.Т. Райхлин, С.В.Петров, 2014

Рецензия
на реферат по онкологии
ординатора Левченко Е.А. на тему: «Роль иммуногистохимии в
морфологической диагностике злокачественных новообразований».

В данной работе раскрыты наиболее важные аспекты, касающиеся преимущества выбора метода иммуногистохимии. Понятие преимуществ и трудностей, а так же правильная организация процесса проведения данного метода диагностики в значительной степени влияют на качество и дифференцировку диагноза, поэтому данный доклад является актуальным. В реферате приведена информация необходимая для понимания выбора метода, его преимущества перед другими, рассмотрены базовые понятия темы и примеры научных и практических исследований и правила проведения иммуногистохимии. Выводы, сформулированные на основе анализа материала, обоснованы. Работа выполнена без орфографических ошибок и в соответствии с требованиями - по структуре и оформлению. Оценка « хорошо ».

Комментарии и замечания: *нужно расширить список локализаций злокачественных новообразований других опухолей.*

Дата: 18.11.19г.

Удоч. Габриелян Ф.В.

Подпись рецензента:

Подписьординатора: