

# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

ЛЕКЦИЯ ДЛЯ ФУВ

2019, МАЙ.

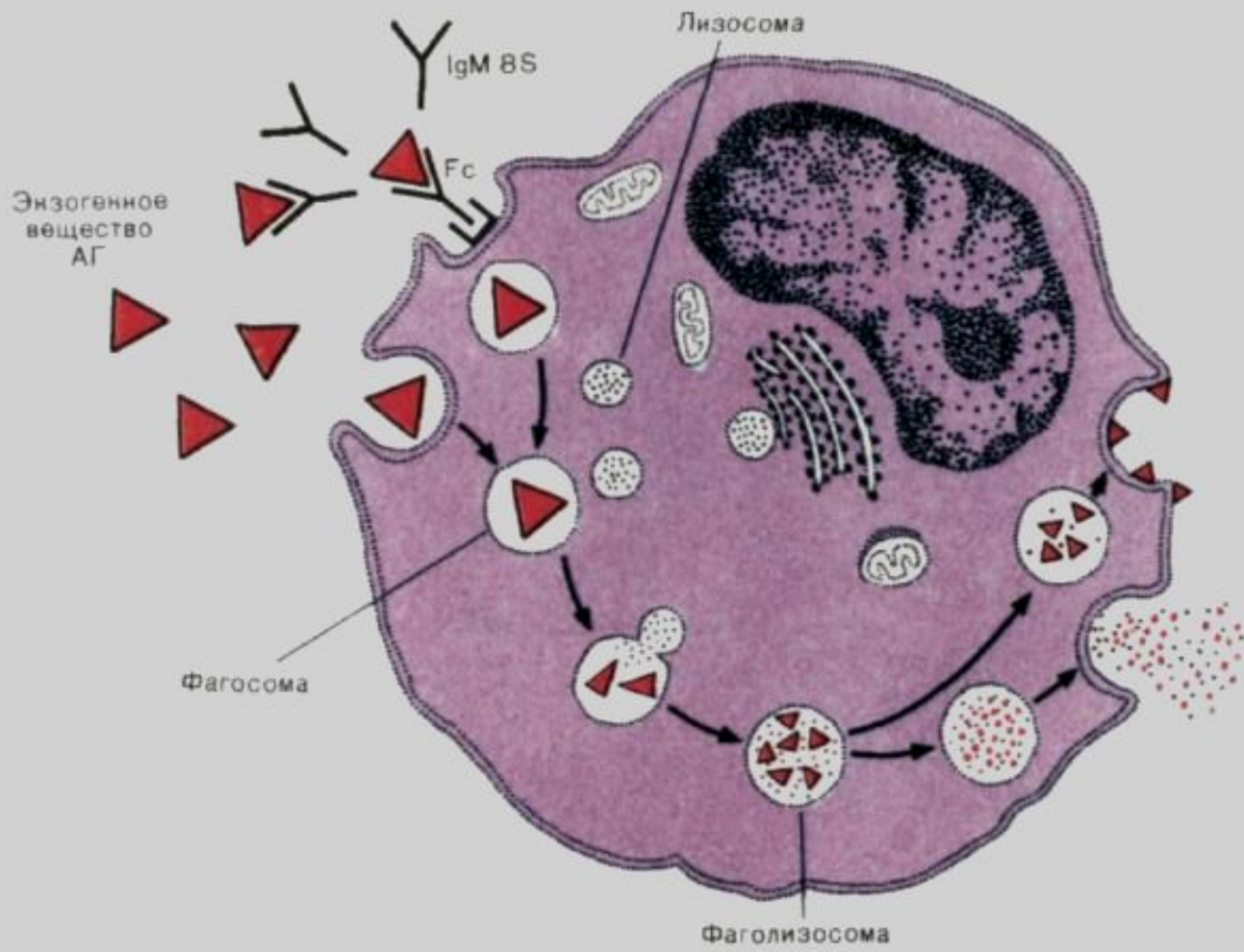
# ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ

- Иммунная система — совокупность органов, тканей и клеток, обеспечивающих клеточно - генетическое постоянство организма.
- Принципы поддержания структурного постоянства основываются на распознавании «своего- чужого» и во многом обусловлены системой генов и гликопротеинов — продуктов их экспрессии — главный комплекс гистосовместимости (МНС — major histocompatibility complex).
- В многих случаях происходит распознавание изменённого «своего», что расценивается иммунной системой как «чужое».

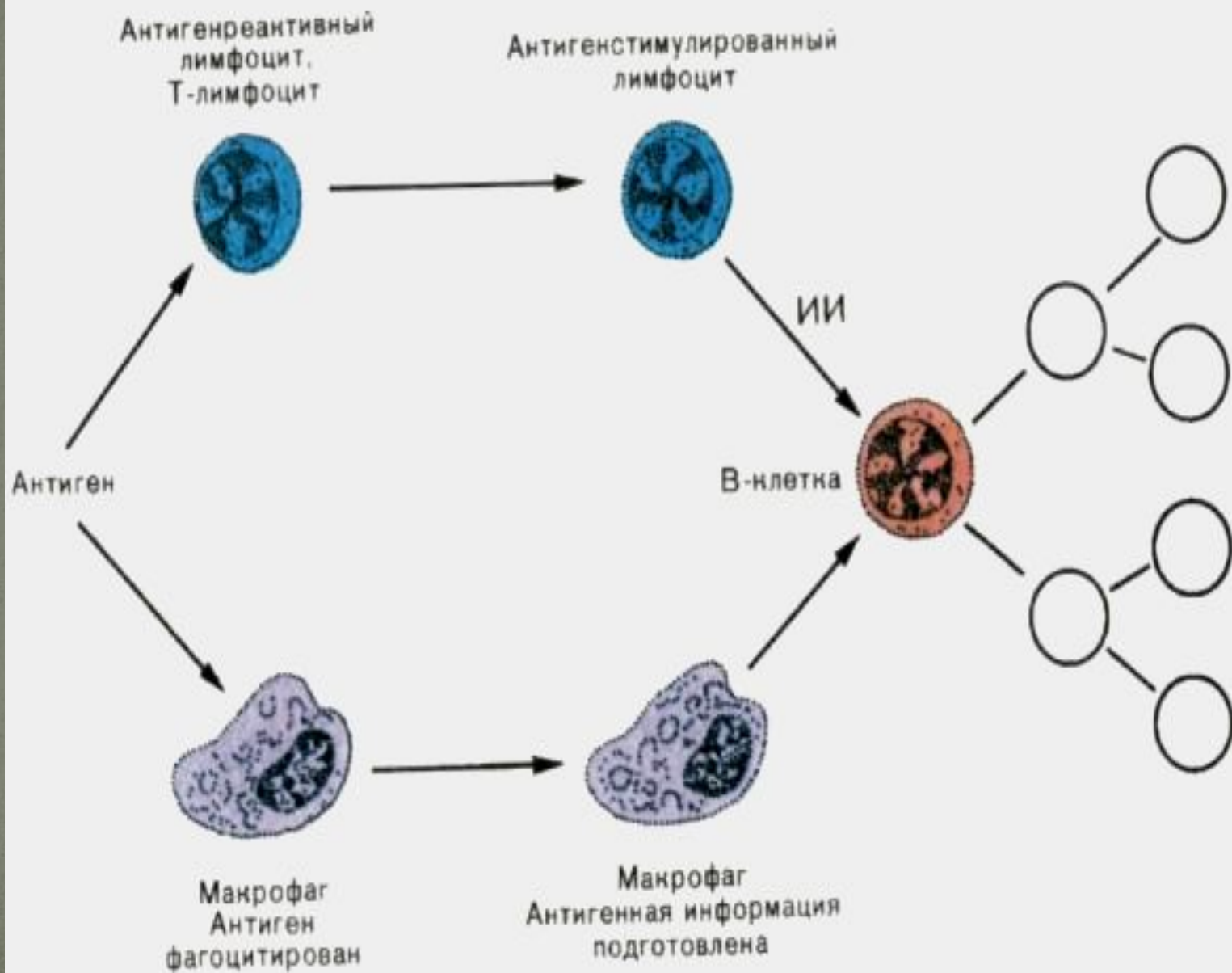
- **Органы системы.**

- **Выделяют центральные (костный мозг, вилочковая железа и лимфоидная ткань кишечника) и**
  - **периферические (селезёнка, лимфатические узлы и скопления лимфоидной ткани в собственном слое слизистых оболочек кишечного типа) органы.**

- а. Центральные органы осуществляют образование и созревание иммунокомпетентных клеток.
- б. Периферические органы иммунной системы обеспечивают адекватный иммунный ответ на антигенную стимуляцию — «обработку» Аг,
  - его распознавание и
- клональную пролиферацию лимфоцитов (Аг-зависимая дифференцировка).



- Имму́нный ответ вызывают Аг (термин предложил Дотр- Дойч, 1899).
- а. Антигены — вещества различного происхождения, несущие признаки генетической чужеродности и вызывающие развитие иммунных реакций (гуморальных, клеточных, состояние иммунологической толерантности, индуцирование иммунологической памяти).
- б. Иммуногенность и антигенность. Свойства Аг определяет их иммуногенность способность индуцировать иммунный ответ — и антигенность — способность Аг избирательно реагировать со специфичными к нему АТ или Аг - распознающими рецепторами лимфоцитов.



- **Эпитоп (антигенная детерминанта) — фрагмент молекулы (молекул) Аг, (локализующийся внутри или на поверхности молекулы).**
- **Индукцирующий иммунный ответ и определяющий его специфичность.**
- **Антигенная детерминанта избирательно реагирует Аг-распознающими рецепторами и/или АТ.**
- **(а) Структура многих Аг-детерминант известна. Например, в полипептидной последовательности эпитопом может быть фрагмент из 7-8 аминокислотных остатков,**
- **но свойство антигенности дополнительно и облигатно определяет пространственная конфигурация фрагмента.**



- Иммуногистохимия – это методика выявления наличия онкологического процесса в организме посредством оценки содержания антигенов.
- С ее помощью можно не только диагностировать раковое заболевание на ранней стадии, но и спрогнозировать дальнейшее течение.
- Используется в качестве диагностики рака и оценки эффективности выбранного метода лечения

# Иммуногистохимический метод

Метод исследования тканей, обеспечивающий выявление в них антигенов, маркированных специфическими антителами

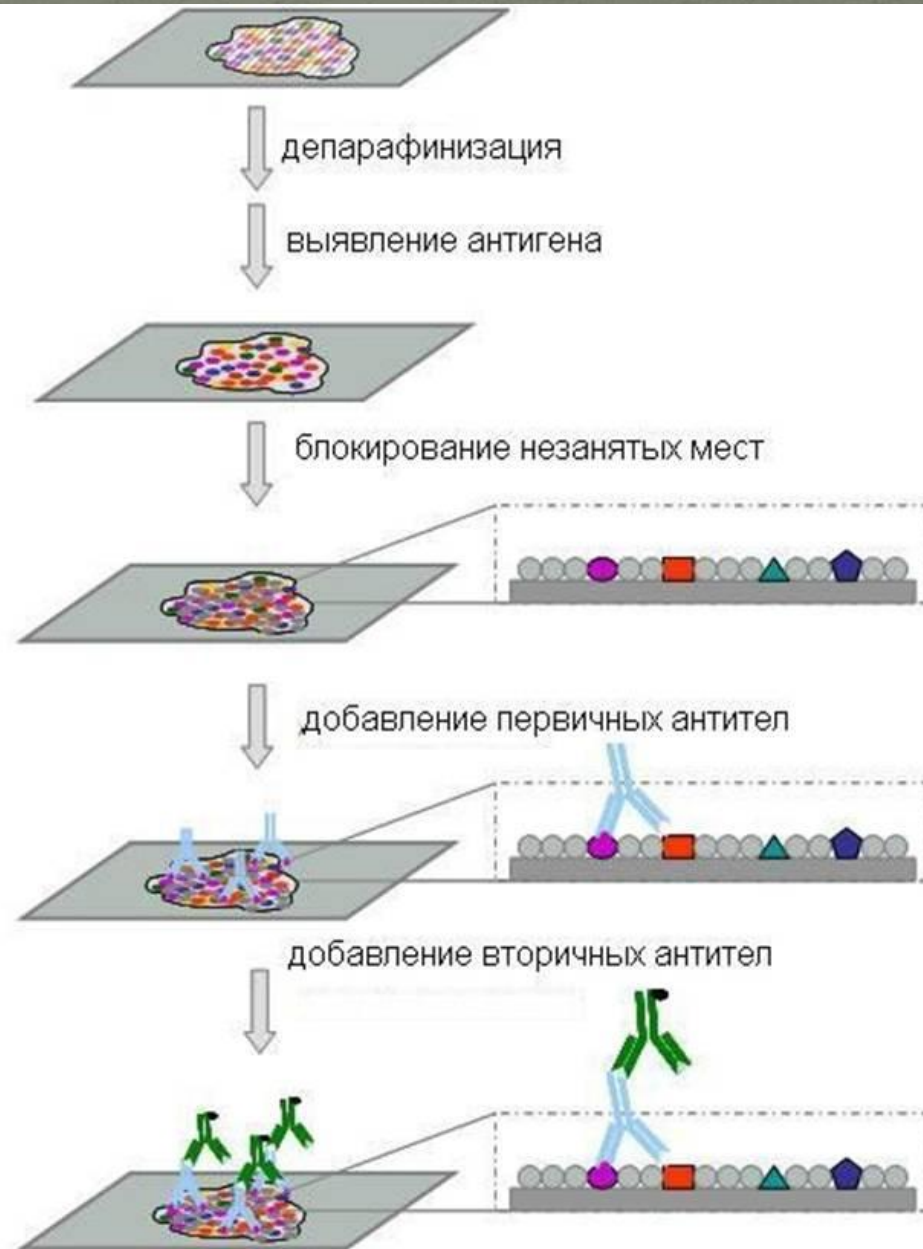


**иммуногистохимические свойства используют для диагностики опухолей**

- **Суть и возможности метода**
- **При наличии в организме онкологического процесса, в кровь попадают антигены.**
- **Их наличие указывает на патологию, а конкретный тип на место локализации новообразования.**
- **С его помощью можно более точно поставить диагноз и определиться с эффективностью лечения.**

- Исследование заключается в выявлении антигенов, что возможно посредством проведения ряда тестов.
- Используются реактивы, в состав которых входят «меченые» антитела. Эти белковые структуры имеют определенный цвет, который придают им специализированные красители.
- Антитела способны выискивать антигены и вступать с ними в связи.
- Подобная реакция называется «антиген-антитело», когда с помощью меченых клеток удается определить наличие антигенов, указывающих на наличие злокачественного опухолевого процесса.

- С помощью иммуногистохимического исследования можно выявить не только наличие онкогенных маркеров, но и
- определить некоторые рецепторы к гормонам, что
- эффективно при гормонозависящем типе опухоли или прогрессирующих эндокринных заболеваниях.



- Результаты исследования показывают:
- Гистологическую принадлежность опухоли, что подтверждает или опровергает наличие рака.
- Локализацию опухолевого процесса и органы-мишени, которые в дальнейшем пострадают – это позволяет максимально направить все методы лечения на подавление патологического процесса именно в конкретном участке тела.
- Возможную методику лечения и резистентность клеток к определенным видам медикаментов.
- Врач может прогнозировать, насколько эффективным будет тот или иной препарат для конкретного пациента.
- Это минимизирует риски развития побочных воздействий и отсутствие терапевтического эффекта.

- (б) Моноклональные АТ специфически распознают собственные Аг -детерминанты и связываются с ними.
- Каждое моноклональное АТ распознаёт только одну Аг - детерминанту.
- (в) Поликлональные АТ (например, антисыворотки), как правило, распознают несколько Аг - детерминант в составе Аг.
- (2) В отечественной практике иммуногенность чаще определяют как специфичность, а
- термин «антигенность» больше связан с понятием «чужеродность».



- Многообразие понятия «антиген».
- Аг разделяют на **полные** (иммуногенные), всегда проявляющие антигенные свойства, и **неполные** (гаптены), неиммуногенные.
- 1. Гаптены обладают антигенностью, но не иммуногенны.
- Гаптены могут стать иммунными при связывании с носителем - **шлеппером**, обладающим собственной иммуногенностью.
- Например, хром и никель, связываясь с белками кожи, способны вызвать аллергический контактный дерматит, развивающийся при повторных соприкосновениях кожи с хромированными или никелированными предметами.

- а. Простые гаптены представлены дисахарами и простыми органическими соединениями.
- б. Комплексные (преципитирующие) гаптены — полипептиды, полисахариды, липиды и нуклеиновые кислоты.
- 2. Природа Аг.
- Аг могут быть белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты в комбинации между собой или липидами.
- Наибольшей иммуногенностью обладают белковые Аг, например все бактериальные токсины, вирусная нейраминидаза и гемолизины, сывороточные белки (исключением являются казеин и фибриноген).

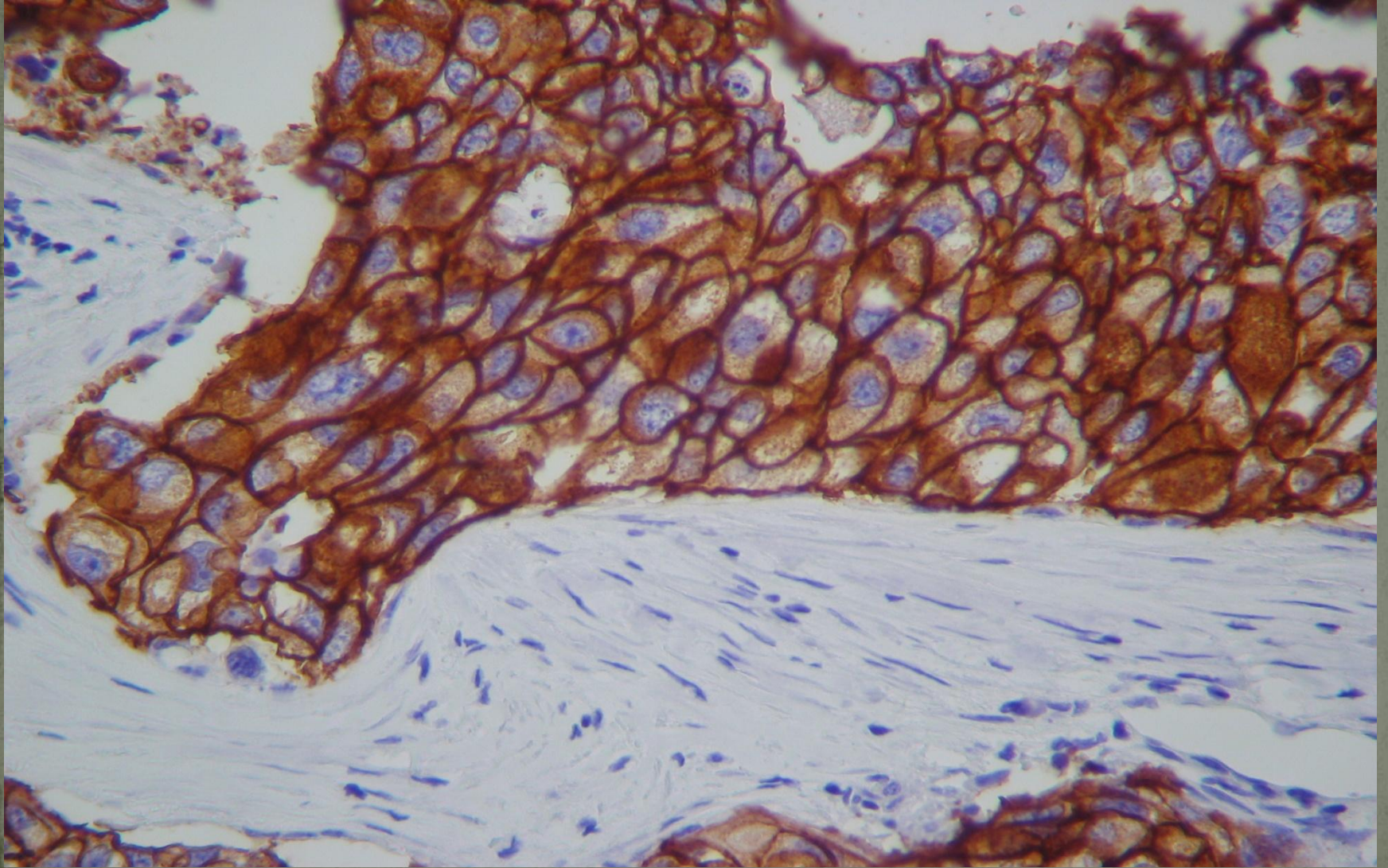
- Преимуществом иммуногистохимии является точное выявление типа рака и места его локализации (очага).
- Выявить это никакими другими сверхточными методиками невозможно.
- Именно окрашивание образца биоматериала показывает, какие клетки имеются в опухоли, как они себя ведут, и как будет вести себя при воздействии на них определенных способов лечения.

- Показания для иммуногистохимии
- Исследование необходимо в следующих ситуациях:
- При наличии опухоли, которая подает нечеткие эхо-признаки, что требует установления ее природы.
- Если имеются метастазы для выявления мест их локализации, что помогает поставить стадию рака.
- Составление прогноза и скорости распространения опухолевого процесса.
- При необходимости исследования чувствительности рецепторов к определенным видам гормонов, если у человека имеются нарушения в работе эндокринной системы.
- Если врач сомневается в методике проведения выбранного типа медикаментозного лечения или отсутствует какой-либо терапевтический эффект.
- Показанием служит выраженный опухолевый процесс в любых частях тела.
- Иммуногистохимия показывает степень его злокачественности, возможный прогноз и толерантность к медикаментам.

- Долабораторная подготовка образца – получение нужного образца осуществляют с помощью биопсии.
- Выбор метода зависит от места локализации опухоли, ее формы и распространенности опухолевого процесса.
- Часть иссеченных тканей помещают в раствор формалина, после чего образец передают в лабораторию.
- Еще одним преимуществом иммуногистохимии является возможность исследования через определенное время.
- Нет необходимости обрабатывать образец сразу, как только произведена биопсия. Образцы хорошо хранятся и показывают результаты не хуже, чем в день их забора.

- **Подготовка образца к исследованию – биоматериал вводят в парафин, что необходимо для полной фиксации образца.**
- **Из полученных элементов тканей готовят тончайшие срезы, что возможно с помощью высокоточного оборудования.**
- **Чем тоньше срез, тем проще проследить химическую реакцию. Срезы укладывают на специальную панель, на которую в дальнейшем будет наноситься реагент.**
- **Окрашивание срезов посредством введения антигенов – готовят несколько образцов, на которые воздействуют различными антителами. Полученный результат фиксируют по степени окрашенности конкретного участка среза.**
- **Одновременно можно выявлять до 10 типов антигенов, что позволяет установить точную природу опухоли.**

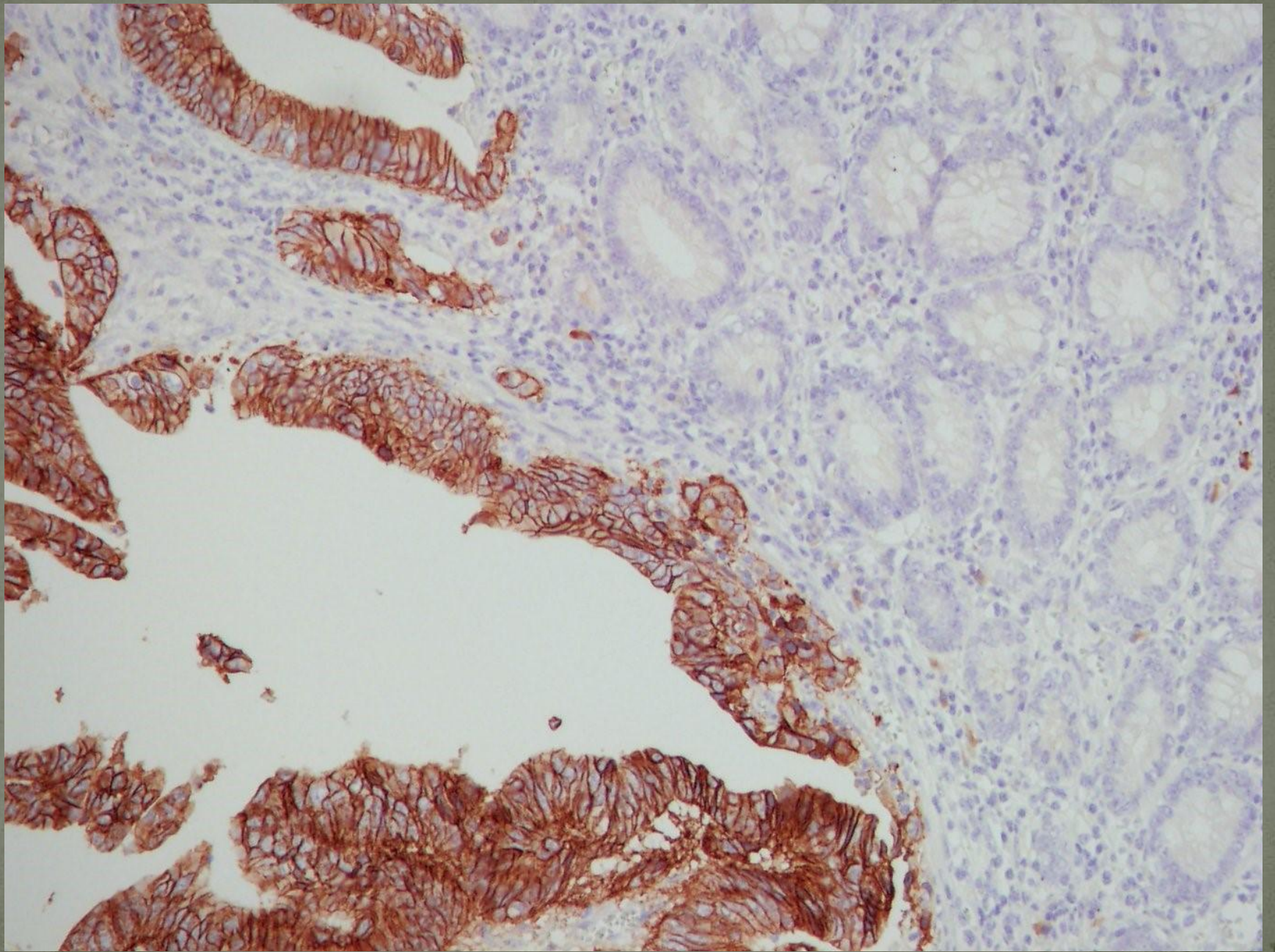
- Оценка результатов – по истечению определенного времени (7-10 дней) с помощью высокоточного оборудования оценивают степень окраски образцов, делая заключение.
- Все полученные данные вносят в специальный бланк-расшифровку, который помогает при постановке точного диагноза.
- Его передают лечащему врачу, после чего подбирается соответствующее лечение.





## ● Иммуногистохимия проходит в 4 этапа

- Забор биоматериала осуществляют до начала лечения, чтобы оценить истинное положение вещей.
- Если использовались медикаменты, данные результатов будут несколько отличаться от истинных.
- Для исследования используют часть биоматериала. Вторая часть может храниться в лаборатории.
- Это позволит снизить количество вмешательств в организм, особенно при выборе метода лечения.
- Нет необходимости сдавать биопсию повторно, чтобы установить, какой именно медикамент будет эффективен в той или иной ситуации.
- Преимущество отдают тем лабораториям, в которых окрашивание образцов осуществляется автоматически.
- Минимизация человеческого вмешательства в процесс позволяет получать наиболее точные результаты.



- а. Экзогенные Аг подвергаются эндоцитозу и расщеплению в Аг-представляющих клетках;
- затем фрагмент Аг, содержащий Аг - детерминанту в комплексе с молекулой класса II МНС, транспортируется к плазматической мембране Аг - представляющей клетки,
- встраивается в неё и предъявляется  $CD4^+$  Т-лимфоцитам.
- б. Эндогенные Аг — продукты собственных клеток организма.
- Чаще всего это вирусные белки, синтезируемые вирусинфицированными клетками хозяина, и аномальные белки опухолевых клеток.
- Их Аг-детерминанты предъявляются  $CD8^+$  Т-лимфоцитам в комплексе с молекулой класса I МНС.

- 3. Гетерогенные Аг. Аг, характеризующиеся наличием общих Аг-детерминант между тканями организмов разных таксономических групп, называют гетерогенными, или перекрестно реагирующими.
- а. Аг Форссманна — характерный представитель перекрёстно реагирующих Аг, выявлен в эритроцитах кошек, собак, овец и почке морских свинок.
- б. Rh - система эритроцитов.
- У человека типичные перекрёстные Аг — Rh -Аг, т.к. их агглютинируют АТ к эритроцитам обезьян.
- Известны также общие Аг эритроцитов человека и палочки чумы, вирусов оспы и гриппа.
- в. Групповые Аг крови — сильные иммуногены; обнаружены на мембране эритроцитов и других клеток.
- Поскольку человек обладает естественными АТ (изогемагглютинины) к групповым Аг крови, последние приобретают свойства сильных трансплантационных Аг.
- Поэтому перед трансплантацией и гемотрансфузией необходимо определить группы крови донора и реципиента. Выделяют 4 антигенных фенотипа (группы крови) системы АВО: А, В, АВ и о. Фенотипические варианты обусловлены различными комбинациями аллелей.
- г. Наличие перекрёстных Аг способно блокировать системы, распознающие чужеродные структуры.

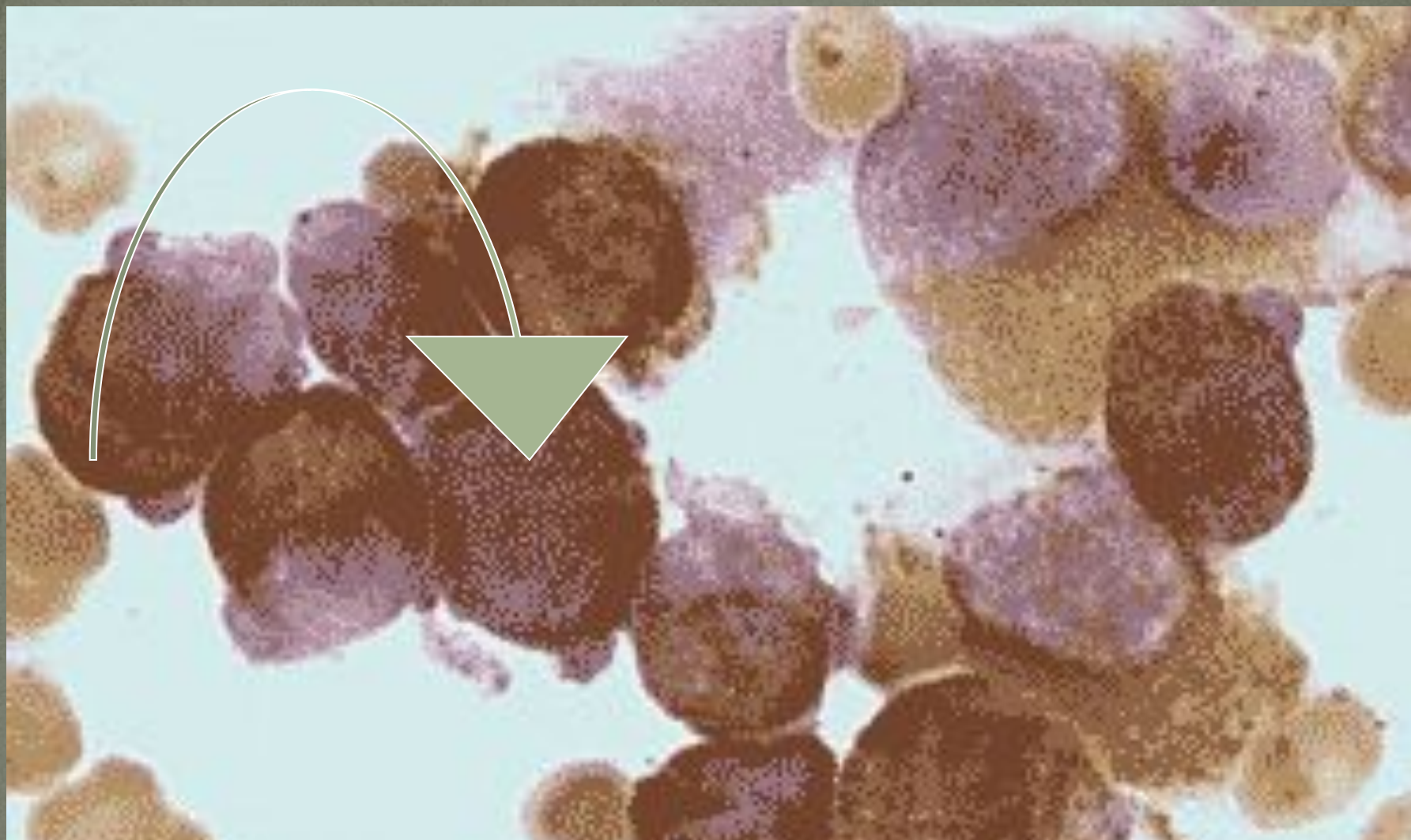
- Не существует противопоказаний к иммуногистохимии в принципе.
- Невозможность исследования обусловлена невозможностью забора биоптата, что возможно при расположении опухоли в глубоких слоях тканей и органов, при внедрении в которые есть риски развития смертельно опасных осложнений. Это касается опухолей головного мозга, внутренних частей органов.

- Интерпретация 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.

- Когда показатель опухолевого процента менее 10%, прогноз благоприятный.
- При правильно подобранном комплексном лечении существует 95% вероятность перехода в пожизненную ремиссию с сохранением здоровья.
- Чем выше процент онкогенности, тем неблагоприятнее прогноз и меньше шансов на жизнь.

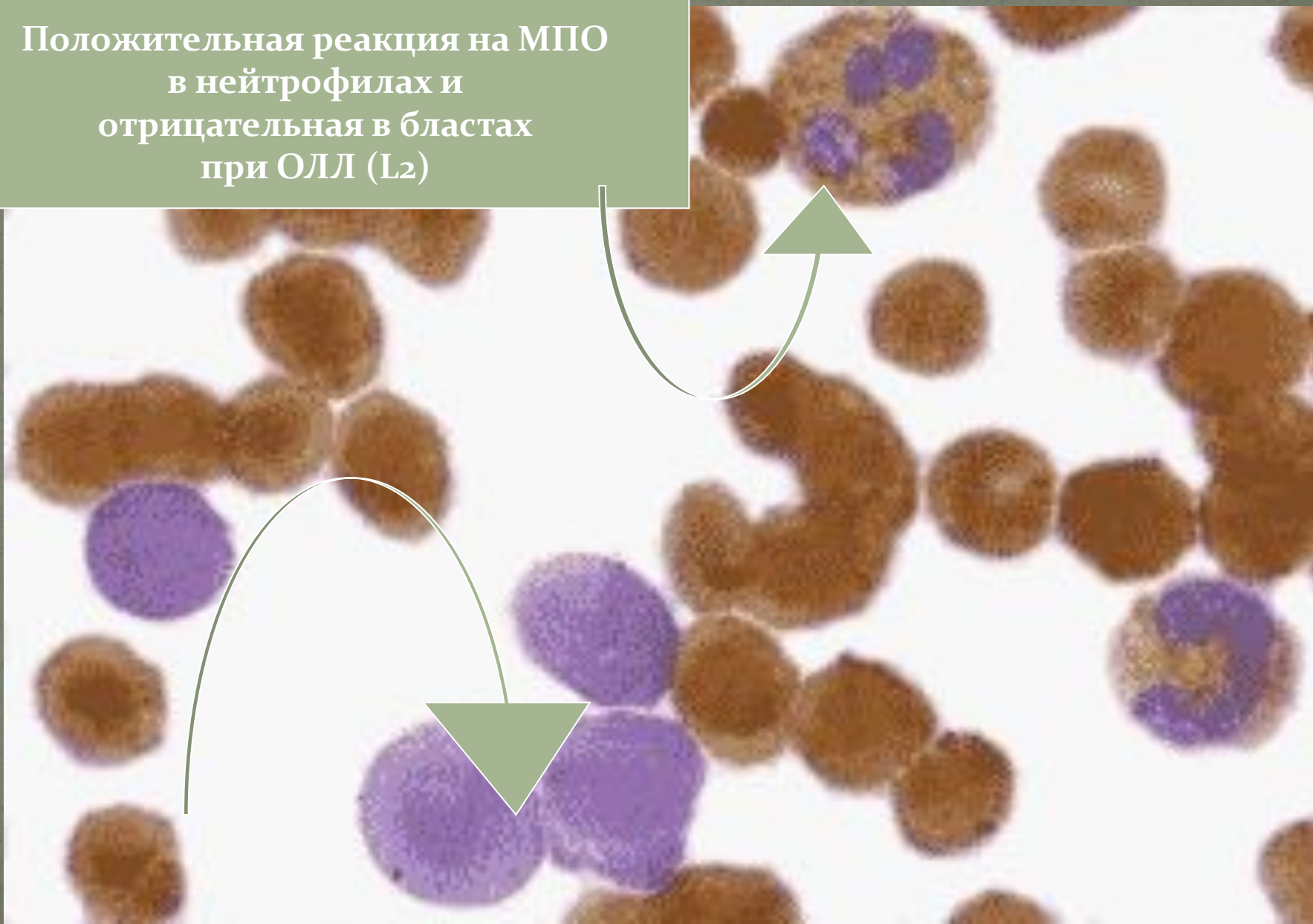
- После проведения курса лечения иммуногистохимию производят повторно.
- На основании оценки количественного и качественного состава клеток можно проследить динамику и эффективность лечения.
- Отсутствие терапевтического эффекта может быть поводом для повторного проведения исследования, но в другой лаборатории.



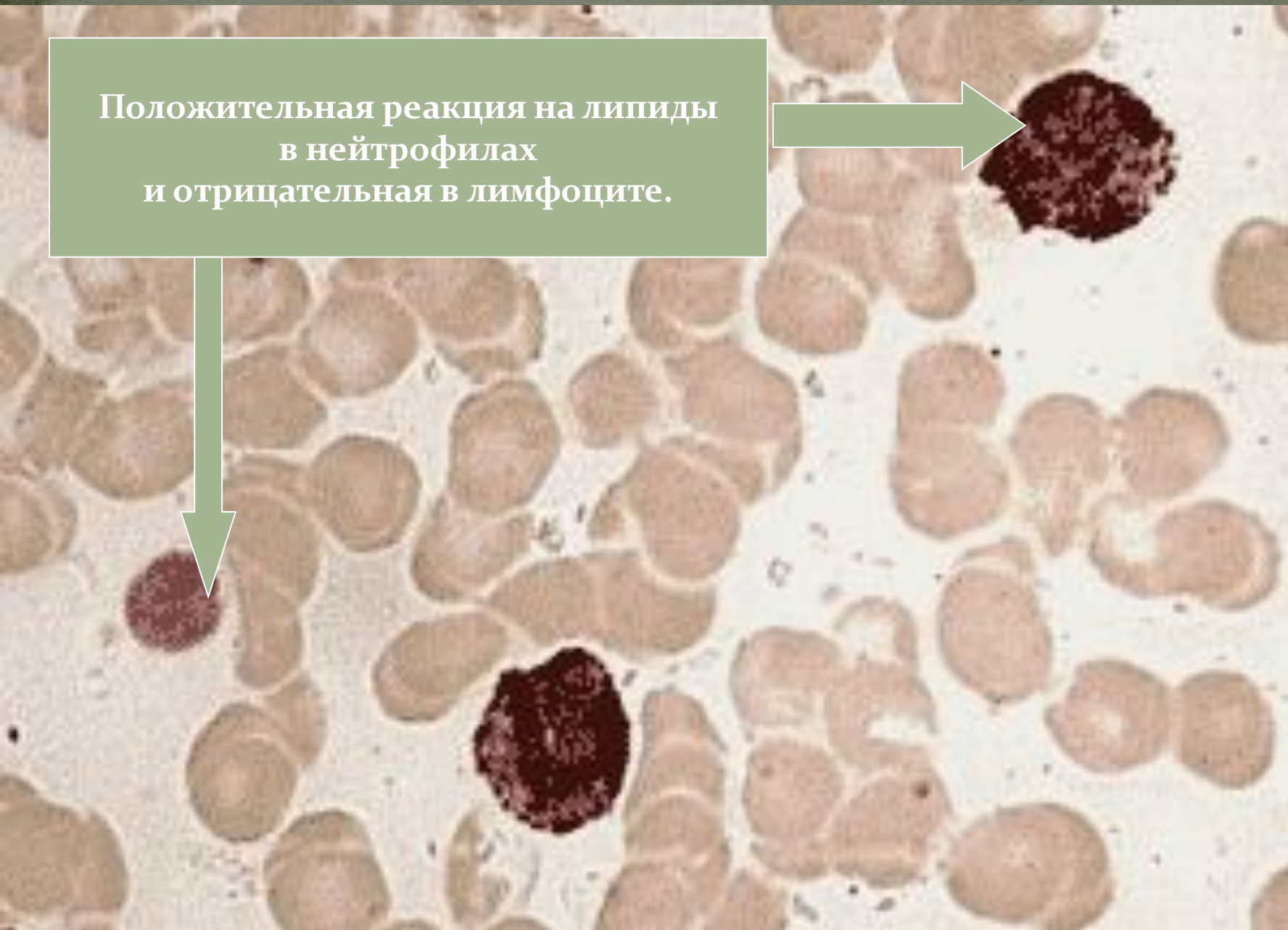


Положительная реакция на МПО  
в бластах (М3) (костный мозг).

Положительная реакция на МПО  
в нейтрофилах и  
отрицательная в бластах  
при ОЛЛ (L2)



Положительная реакция на липиды  
в нейтрофилах  
и отрицательная в лимфоците.



Положительная реакция  
на липиды в бластах (M2).





ОММНЛ. Реакция на липиды с суданом черным В.

- СРОКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИГХ ИССЛЕДОВАНИЯ
- В соответствии с п.24 Приказа №179н от 24.03.2016 г. Минздрава России, срок выполнения ИГХ исследования:
  - с использованием до 5 маркеров включительно – не более 7 рабочих дней,
  - с использованием более 5 маркеров – не более 15 рабочих дней.

## ● ВОЗМОЖНОСТИ ИГХ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ● 1. Диагностика:

- окончательное (реже промежуточное) установление диагноза опухолевого процесса (различные варианты рака, саркомы мягких тканей, меланома, типирование лимфом и лейкозов),
- уточнение степени злокачественности опухоли (напр., нейроэндокринной опухоли), что будет определять прогноз заболевания,
- дифференциальная диагностика опухолей и неопухолевых процессов,
- определение органной принадлежности метастаза с неизвестной первичной локализацией (применимо не для всех опухолей!),
- дифференцирование множественных опухолевых процессов (наличие у пациента 2 и более разных опухолей).

### ● 2. Лекарственная чувствительность

- рецепторы стероидных гормонов (рецепторы эстрогенов, рецепторы прогестерона, рецепторы андрогенов) – рак молочной железы, рак тела матки (эндометрия), другие опухоли;
- белок Her2/neu - рак молочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря; Her2Neu - это рецептор эпидермального фактора роста раковой клетки. Это - ген, который воздействует на мембранные рецепторы клетки, и стимулирует её к усиленному делению. В некоторых опухолях (чаще всего рак молочной железы, рак пищевода, рак желудка) присутствует гиперэкспрессия (повышенная активность) Her2Neu, что вызывает быстрое деление опухолевой клетки и её повышенную активность. Также снижается эффективность химиотерапии, лучевой терапии, гормональной терапии.
- рецепторы соматостатина 2А и 5 типов – нейроэндокринные опухоли (карциноиды);

- PD-L1 – немелкоклеточный рак легкого, беспигментная меланома, другие опухоли;
- ALK - немелкоклеточный рак легкого;
- ROS1 - немелкоклеточный рак легкого;
- микросателлитная нестабильность (MSI) – рак толстой кишки, другие опухоли;
- индекс пролиферативной активности (Ki-67) – различные виды злокачественных опухолей.



# Существует две методики определения наличия у опухоли гена Her2neu

- 1. Иммуногистохимическое исследование Результаты иммуногистохимического исследования выражаются в баллах: 0-1 означает, что опухоль без гиперэкспрессии Her2neu. 3 означает, что опухоль с гиперэкспрессией Her2neu.
- 2. Метод FISH (Флуоресцентная гибридизация in situ)
- В отличие от иммуногистохимического исследования, при котором определяются белки, при методе FISH определяется наличие генов, кодирующих протеины Her2neu.
- В зависимости от их наличия, определяется гиперэкспрессия Her2neu. Определение гиперэкспрессии рецептора Her2neu в опухоли молочной железы является очень важным для дальнейшего назначения лечения.
- В современной онкологии гиперэкспрессию Her2neu определяют, чтобы понять, необходимо ли добавление к лечению ингибиторов Her2neu.
- Для лечения опухолей с гиперэкспрессией рецептора Her2neu активно и успешно используются таргетные препараты Трастузумаб (Герцептин), Пертузумаб (Перьета), Трастузумаб-эмтанзин (Кадсила), Бейодайм (Трастузумаб+Пертузумаб).
- Эти препараты прицельно блокируют рецепторы Her2neu, тем самым останавливая активный рост опухолевых клеток и повышая их чувствительность к химиопрепаратам.
- Добавление таргетной терапии к стандартной химиотерапии при лечении Her2neu позитивных опухолей, серьезно увеличивает общую выживаемость и результат противоопухолевого лечения.

- 3. Ki-67 Ki-67 - это маркер пролиферативной активности опухолевой клетки.
- Данный параметр оценивается в процентах и показывает, сколько процентов опухолевых клеток активно делятся. Если Ki-67 меньше 15%, опухоль считается слабоагрессивной, при показателе Ki-67 от 30 до 50% опухоль считается агрессивной, а при показателе Ki-67 выше 50% опухоль является высокоагрессивной.
- Также Ki-67 является фактором прогноза течения опухолевого заболевания и ответа опухоли на химиотерапевтическое лечение. Определяется это простым способом: чем ниже показатель Ki-67, тем хуже опухоль реагирует на химиотерапевтическое лечение.

- 4. Белок p53 Белок p53 - это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл.
- В быстро делящихся клетках обнаружено увеличение концентрации белка p53 по сравнению с клетками, делящимися медленно, что обусловлено высоким риском их онкогенности.
- Белок p53 предотвращает образование злокачественных опухолей в нашем организме.
- В норме, антионкоген p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК в здоровой клетке - активируется.
- Функция белка p53 состоит в удалении тех клеток, которые являются потенциально онкогенными. Это называется - индуцированный апоптоз, уничтожение потенциально опасной клетки.
- При иммуногистохимическом исследовании, повышенное содержание белка p53 обнаруживается в 50% злокачественных клеток, что позволяет им беспрепятственно делиться и избегать апоптоза (уничтожения).
- Количество белка p53, определяют в дополнение к показателю Ki67, для того, чтобы понять насколько агрессивна опухоль и определить дальнейшее течение болезни.
- Если уровень белка p53 высокий, значит опухоль не агрессивная и не склонна к метастазированию и быстрому росту.
- Если же, показатель белка p53 низкий, то значит опухоль агрессивна и склонна к быстрому росту в окружающие ткани и метастазированию.

- 5. VEGF (Фактор роста эндотелия сосудов) VEGF – это сигнальный белок, вырабатываемый клетками для активного роста новых сосудов в уже существующей сосудистой системе.
- Есть несколько видов белка VEGF, и каждый воздействует на определенный рецептор VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor).
- Для того чтобы активно делиться, опухоли нужно питание, а для этого нужны сосуды, по которым это питание будет поступать. Именно по этой причине в опухолевых клетках содержится повышенное содержание белка VEGF - для того, чтобы в короткие сроки строить сосудистые сети.
- Наличие белка VEGF в опухоли говорит о возможности применения таргетной терапии такими препаратами, как Бевацизумаб (Авастин), Рамуцирумаб (Цирамза), Афлиберцепт (Залтрап). Они перестраивают сосудистую сеть опухоли, тем самым лишая её питания.

- 6. Определение экспрессии белков PD-1, PDL-1 и PDL-2
- Иммуноterapia в онкологии появилась сравнительно недавно, но уже успела показать удивительные результаты в лечении опухолей.
- Механизм иммунотерапии рака заключается в том, что препарат позволяет иммунитету увидеть опухоль и уничтожить её.
- Ответственные за «видимость» опухоли белки PD-1, PDL-1 и PDL-2 в достаточном количестве присутствуют не во всех опухолях.
- Именно поэтому одним пациентам иммуноterapia помогает, а другим нет.
- Чаще всего определение гиперэкспрессии белка PD-1 и его лиганд PDL-1 и PDL-2 необходимо при меланоме, немелкоклеточном раке легкого, раке желудка и раке почки.
- Для того чтобы отобрать пациентов, которым показана иммуноterapia, проводится определение наличия экспрессии PD-1 и его лиганд PDL-1 и PDL-2, при помощи флюоресцентной гибридизации in situ (FISH).
- При наличии экспрессии PD-1 и его лиганд PDL-1 и PDL-2, показано применение иммунотерапии препаратами Пембролизумаб (Кейтруда), Ниволумаб (Опдиво), Атезолизумаб (Тецентрик).
- В современной онкологии иммуногистохимическое исследование играет очень важную роль, так как при помощи этого исследования онкологи определяют наличие тех или иных факторов в опухоли, которые позволяют грамотно и адекватно составить дальнейшее лечение пациента и говорить о прогнозах заболевания.