

Петров С.В.

Возможности и ограничения иммуногистохимического анализа в клинической онкологии

Казанский государственный медицинский университет, Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Казань

Petrov S. V.

The capabilities and limitations of immunohistochemical analysis in clinical oncology

Резюме

В лекции проф. С. В. Петрова – одного из ведущих онкоморфологов нашей страны, специалиста в области молекулярно-генетических методов исследования опухолей – представлены обобщенные материалы автора и его сотрудников, накопленные почти за 20 лет работы в области ИГХ-диагностики опухолей. Лекция посвящена одному из наиболее актуальных вопросов современной онкоморфологии – возможностям и ограничениям иммуногистохимического метода в клинической онкологии.

Ключевые слова: иммуногистохимический анализ, клиническая онкология, лекция

Summary

In the lecture Professor S. V. Petrov – is one of the leading oncomorphological in our country, a specialist in the area of molecular-genetic methods – generalized materials of the author and his collaborators, accumulated almost 20 years of experience in the area of immunohistochemical diagnostics of tumors. The lecture is devoted to one of the most pressing issues of modern oncomorphology – opportunities and limitations immunohistochemical method in clinical Oncology.

Keywords: immunohistochemically analysis, clinical Oncology, lecture

В настоящее время диагноз злокачественной опухоли основывается на комплексном клинико-морфологическом анализе с привлечением, при необходимости, результатов дополнительных цитогенетических и молекулярно-биологических методов исследования, в том числе иммуногисто-цитохимии (ИГХ).

Считается, что применения иммуногисто(cito)химии требует диагностика 25%-35% злокачественных опухолей. Следует особо подчеркнуть, что может не быть соответствия между степенью дифференцировки на гистологическом и иммуногистохимическом уровне. В иммуногистохимической верификации как раз чаще нуждаются опухоли гистологически низкодифференцированные, вызывающие наибольшие трудности при световой микроскопии. Обязательным является ИГХ анализ лимфом, мягкотканых сарком, рака молочной железы и ряда других опухолей.

Для ИГХ-анализа опухолей и их метастазов используется широкий спектр маркеров, к которым можно отнести: тканеспецифичные (белки промежуточных филаментов - ПФ, компоненты базальной мембраны - БМ, рецепторы и др.), цитоспецифичные (CD-антигены лейкоцитов, факторы транскрипции, миоглобин, гладкомышечный актин, тиреоглобулин и др.), маркеры пролиферации (Ki-67 и др.), опухоль-ассоциированные антигены (CA 15-3, CA-125, CA

19-9 и др.), опухолевые маркеры: онкофетальные антигены (альфа-фетопротеин, РЭА и др.), гормоны, ферменты, а также белковые продукты клоничных онкогенов и генов-супрессоров (p53, p16, PTEN, Rb), вирусных онкогенов и др.

Наиболее часто для иммуногистохимического анализа анапластических опухолей человека применяют антитела к белкам ПФ. Как сейчас считается, промежуточные филаменты взаимодействуют с плазматической мембраной и оболочкой ядра и играют в клетке больше механическую, чем динамическую роль. Виментин экспрессируется в фибробластах, остеоцитах и остеобластах, хондроцитах, шванновских клетках, меланоцитах кожи, некоторых типах лимфоцитов, плазматических клетках. Десмин найден в клетках скелетных мышц, кардиомиоцитах, гладкомышечных клетках висцеральных органов и кровеносных сосудов. Глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) является маркером астроцитов. Белок периферин найден в нейронах периферической нервной системы, а также в эндокринных раках кожи. Ламинны типа А и типа В формируют оболочку ядра и их экспрессия связана со степенью дифференцировки клетки. Пестин экспрессируется в стволовых клетках нейроэпителия.

Наиболее многочисленной группой белков промежуточных филаментов являются цитокератины (син: прекера-

тины, кератины, ЦКР). Различные варианты эпителия имеют специфические наборы ЦКР и спектр экспрессируемых ЦКР в эпителиальных клетках зависит от типа дифференцировки, положения клетки в эпителиальном пласте.

В новообразованиях человека установлены определенные закономерности экспрессии белков ПФ, широко используемые в практической работе:

1. В опухолях и их метастазах, в основном, сохраняется тканеспецифическая экспрессия генов белков ПФ (цитокератины - в раках, десмин - в мышечных саркомах, GFAP - в глиомах и т.д.).

2. Гистологическая дифференцировка раковой опухоли коррелирует с синтезом специфических цитокератинов.

3. Различные наборы цитокератинов позволяют разделять раковые опухоли по их происхождению и уровню дифференцировки.

4. Информация, полученная при ИГХ анализе белков ПФ, независима от морфологических данных, поэтому эти маркеры используют для исследования низкодифференцированных новообразований, метастазов с одинаковыми морфологическими характеристиками.

В своей практической работе мы разбиваем диагностику анапластических опухолей на этапы. На первом этапе используем 4 антигена, которые дают наиболее важную информацию о тканевом происхождении опухоли, т.е. определяем тканеспецифические иммуногистохимические признаки, характерные для данной опухоли. Для этого применяем МКАТ к виментину, цитокератинам, белку S100, общему лейкоцитарному антигену (ОЛА). ИГХ анализ большого числа первичных низкодифференцированных опухолей, проведенный нами, позволил во всех случаях установить тканевое происхождение новообразований.

Если ИГХ реакция оказалась везде положительной или везде отрицательной, то это оценивалось как артефакт и ИГХ исследование повторялось. Если имелась положительная реакция только на виментин, то такими опухолями могли быть: лимфомы, различные саркомы. В тех наблюдениях, когда выявлялась яркая позитивная реакция на виментин и белок S100, то эта опухоль могла оцениваться в дальнейшем как меланома, или липосаркома. Если положительная окраска на виментин сочеталась с реакцией на ОЛА и, в редких случаях, низкомолекулярные цитокератины, то предполагалась лимфома. При положительной реакции на цитокератины, и, в виде исключения, на белок S100, виментин, можно было думать о низкодифференцированном раке, герминоме, а также (значительно реже) о других опухолях.

На 2-м этапе удается разделить цитокератинопозитивные низкодифференцированные опухоли на переходноклеточные, плоскоклеточные, нейроэндокринные раки, аденокарциномы и мезотелиому, т.е. определить цитинили органоспецифические иммуногистохимические признаки.

• Если положительная реакция на цитокератины, характерные для плоского эпителия (ЦКР плоск. или №№ 5, 6, 10), сочеталась с положительной реакцией на цитокератины, присущие однослойным (простым) эпителиям (ЦКР прост. или №№ 7, 8, 18, 19), то это был переходноклеточный рак, либо некоторые протоковые аденокарциномы.

• Если иммунофенотип опухоли был ЦКР-плоск. (+), а ЦКР-прост. (-), то это плоскоклеточный рак кожи, либо ротоглотки, пищевода, гортани.

• Если положительная реакция на широкий спектр цитокератинов сочеталась с окрашиванием на виментин, то это была мезотелиома, либо синовиальная или эпителиоидная саркома, либо некоторые раки щитовидной железы, почки, яичника и другие, более редкие, раки.

• В случаях коэкспрессии ЦКР-прост. с ОЛА предполагалась анапластическая крупноклеточная лимфома; диагноз последней уточнялся с помощью антител к CD30, EMA, транзитин - В, антигену CD246 (ALK).

• Если положительная реакция на ЦКР-прост. сочеталась с негативной окраской на ЦКР-плоск., то эта опухоль являлась аденокарциномой, которая в дальнейшем тестировалась на РЭА, виллин.

• В случаях ярко положительной реакции на РЭА необходимо думать о раке толстой кишки, желудка, поджелудочной железы, желчных протоков.

• Слабая реакция на РЭА встречается при раке мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, легкого (плоскоклеточном крупноклеточном варианте).

• Отрицательная реакция на РЭА наблюдалась в клетках аденокарцином простаты, почки, печени, опухолях желточного мешка, яичников (серозный рак), щитовидной железы, а также в эндокриноподобных раковых опухолях, в том числе в мелкоклеточном раке легкого с эндокриноидной дифференцировкой.

3-й этап. Дальнейшая диагностика, имеющая целью определить органную локализацию анапластической опухоли с иммунофенотипом РЭА +, ЦКР-прост. +, проводится с помощью органоспецифических маркеров.

При раке простаты выявляется специфический антиген простаты (PSA) и щелочная фосфатаза, специфичная для простаты (PAP), AMACR-раисмаза, белок гена ERG, при раке щитовидной железы - тиреоглобулин, хромогранин, кальцитонин, TTF-1, в клетках печеночноклеточного рака - альфа-фетопrotein и антиген гепатоцитов, рака яичника - WT-1, OC 125, хорионэпителиома- хорионический гонадотропин. Клетки эндокриноидных раков легкого, щитовидной железы (медулярный рак), островковой части поджелудочной железы, передней доли гипофиза, парашитовидной железы экспрессируют нейрон-специфическую энолазу (NSE), N-CAM (CD56), синаптофизин, хромогранин, бембезин и соответствующие специфические пептидные гормоны. Последующая идентификация опухолей с фенотипом ЦКР - (прост.+), РЭА (+), таких, как рак молочной железы, проводится с помощью набора антител к белку HER2, рецептору эстрогенов/прогестерона, антигену BSA-225, антигену GCDFF-15 и др.

Органоспецифических маркеров рака шейки матки, желудка, поджелудочной железы, билиарного тракта не существует. 70% аденокарцином легкого и 90% мелкоклеточных раков легкого дают ядерную реакцию на тиреоидный фактор транскрипции (TTF-1). Урогелиальными маркерами могут служить тромбомодулин, антиген CD10, уроплаклин.

Анапластические опухоли, дающие окраску на виментин, были подразделены на лимфомы (Т и В-клеточные),

меланому (реагирует с антителами к S100 протейну, Melan A, HMB-45, тирозиназа, MITF), миогенные саркомы (позитивная реакция на гладкомышечный актин, десмин, миогенин, миоглобин), ангиосаркомы (реагирующие с антителами к фактору VIII свертывания крови, CD 31, CD 34, фасцин), злокачественную фиброзную гистиоцитому - ЗФГ (экспрессирует альфа-1-антитрипсин, фактор XIIIa, CD68, лизоцим, альфа-1-антитимотрипсин, иногда белок S100), фибросаркому (реагирует с виментином, CD34 при отсутствии белка коллагена IV в каркасе вокруг клеток). Плеоморфная липосаркома, некоторые шванномы, хондросаркома в ряде случаев, кроме виментина, экспрессировали белок S100. Лейо- и рабдомиосаркомы можно выявлять отдельно: антитела к гладкомышечному актину, калдесмону, кальпону окрашивают клетки лейомиосаркомы, а антитела к миоглобину, миогенину выявляют клетки рабдомиосаркомы. Альвеолярная саркома мягких тканей окрашивается на виментин и (в ряде случаев) на десмин.

Необходимо помнить, что в новообразованиях мягких тканей опухолевые клетки не всегда сохраняют фенотип, присущий нормальному клеточному аналогу и иногда экспрессируют маркерные молекулы, не связанные с предполагаемым направлением дифференцировки новообразования (например, мышечные маркеры в злокачественной фиброзной гистиоцитоме; цитокератины в неэпителиальных опухолях и др.). Поэтому диагноз мягкотканной опухоли всегда должен основываться на: а) клинико-анатомических данных (возраст, пол, локализация и характер роста новообразования, данных МРТ); б) специфических морфологических признаках (размер, форма клеток, характеристики ядра); в) иммуногистохимическом фенотипе; г) данных цитогенетики.

В дифференциальную диагностику анапластических опухолей лимфомы включаются очень часто. По морфологическим признакам крупноклеточная лимфома может подходить на меланому или рак. Анапластические крупноклеточные (Ki-1+ или CD30, а также ALK-позитивные) лимфомы трудны для диагностики еще и потому, что часть из них может окрашиваться на ЭМА и цитокератины. Лимфомы, состоящие из небольших по размерам клеток, могут напоминать ряд мелкоклеточных опухолей (например, нейроэндокринный рак в легком и т.д.). Иммуногистохимия играет решающую роль не только в установлении лимфоидной природы опухолей, но и в их классификации по критериям ВОЗ (2008).

Диагностика лимфом - это тот редкий раздел онкоморфологии, где иммуногистохимия может помочь в разграничении злокачественного роста и реактивных изменений в лимфатическом узле. Равномерное окрашивание на bcl-2 герминативных центров лимфоидных фолликулов указывает на фолликулярную лимфосаркому, в то время как негативная реакция таких центров свидетельствует о доброкачественном гиперпластическом процессе. Другим примером служит иммуногистохимическое доказательство моноклональной пролиферации лимфоидных элементов в лимфомах (на основании преобладания лямбда- или каппа- цепей иммуноглобулинов). Общим маркером для лимфом является общий лейкоцитарный антиген (ОЛА).

Необходимо учитывать тот факт, что некоторые лимфомы могут быть негативны на ОЛА, а ряд опухолей, не относящихся к лимфомам, может давать положительную окраску на этот маркер (ЗФГ). Поэтому, при позитивной реакции на ОЛА необходимо дополнительно окрасить опухоль на Т- и В-маркеры. Опухолевые клетки при болезни Ходжкина характеризуются специфической экспрессией CD15, CD30, BLA 36, фасцина, PAX-5, MuM-1 и, как правило, отрицательной реакцией на ОЛА.

Маркерами клеток меланомы являются антигены HMB-45, Melan-A, тирозиназа, белок S100 и др. Последний для меланомы менее специфичен и может выявляться в клетках ряда других опухолей (липосарком, хондросарком, шванном, нейрофибром, а также в новообразованиях слюнных, молочных желез). Необходимо отметить, что по отношению к клеткам меланомы антитела к HMB-45 (по сравнению с S100) являются более специфичными, но менее чувствительными. Поэтому в практической работе рекомендуется использовать сочетание ряда (лучше 2-3) меланоцитарных маркеров. Окрашивание на S100 беспигментной меланомы более яркое, чем пигментированных опухолей. Следует помнить, что эти антитела не позволяют отличить меланоцитарную дисплазию от меланомы.

Иммуногистохимия позволяет достаточно надежно идентифицировать мелкие очаги микроинвазии и микрометастазы. Так, например, антитела к цитокератинам широкого спектра легко выявляют небольшие группы или единичные раковые клетки в лимфатических узлах. Что касается диагностики метастазов без первичного очага, то, по мнению большинства авторов, органную/клеточную принадлежность опухолевых клеток удается определить не более, чем в 30% случаев.

Рекомендованная система последовательных этапов иммуногистохимического исследования экономит время, труд, реактивы. Она вносит определенную последовательность в иммуногистохимическое исследование, рациональна и научно обоснована.

Тот факт, что для иммуногистохимического исследования в настоящее время подходит множество антител, порождает определенные проблемы, связанные с выбором необходимых реагентов из имеющихся 100-150. Как правило, полезную для диагностики информацию, в конечном счете, дает выявление 2-3 антигенов, причем, более ценной является позитивная, нежели негативная реакция. На выбор исследуемых антигенов оказывает влияние множество факторов (клинические данные, пол, возраст, морфологическая характеристика опухоли, результаты рентгенологического, биохимического исследования), а также частота встречаемости новообразования данной локализации. Например, у молодых лиц с недифференцированной опухолью средостения необходимо исключать герминогенное новообразование и лимфому. С другой стороны, в случаях костных метастазов рака у пожилых мужчин наиболее вероятной первичной локализацией опухоли является простата.

Необходимо помнить, что аккуратно выполненное иммуногистохимическое исследование с последующим точным диагнозом в ряде случаев делает целесообразным проведение дополнительных более дорогостоящих диагно-

стических процедур (КТ, МРТ, скитингграфию и пр.), помогает существенно сократить число койко-дней.

Несмотря на широкие возможности, для иммуногистохимии существуют определенные ограничения. К трудностям, специфическим для опухолевого роста, можно отнести: 1) коэкспрессию маркерных белков, что дает "смешанный" иммунофенотип опухоли (например, ЦКР+, виментин+, нейрофиламенты+, ЭМА+, синалтофизин+ в группе PNET, primitive neuroectodermal tumors); 2) низкий уровень экспрессии (или его снижение) маркерных белков при прогрессии новообразования (в метастазах и рецидивных опухолях); 3) посттрансляционную модификацию и/или блокирование синтеза маркерных белков на разных этапах роста опухоли; 4) отсутствие для многих мягкотканых опухолей специфических маркеров (фибро-липо-хондро-саркомы, альвеолярная саркома и др.); 5) смешанный клеточный состав (В-лимфосаркомы с выраженной инфильтрацией Т-лимфоцитами и/или гистиоцитами; некоторые лимфомы Ходжкина и др.); 6) изменение спектра выявляемых маркеров при лечебном патоморфозе (например, повреждение цитоскелета раковых клеток после облучения может вызвать негативную реакцию на цитокератины при сохранении окраски на ЭМА); отмечены постлучевые изменения фенотипа клеток Ходжкина и Рид-Штернберга).

Нужно особо подчеркнуть, что во многих случаях ИГХ не позволяет подтвердить или отвергнуть злокачественный, либо доброкачественный характер опухоли.

Ограничения возможностей ИГХ методического характера включают в себя:

- 1) маскировку антигенных детерминант из-за длительной фиксации, нарушений процедуры заливки в парафин, длительного хранения архивных блоков;
- 2) перекрестное реагирование некоторых моноклональных антител с клеточными типами, не связанными с иммуногеном;
- 3) неспецифическую диффузию антигенов в срезы (например, тиреоглобулина), 4) реагирование ряда моноклональных антител с соответствующими эпитопами только на криостатных или только на парафиновых срезах;
- 5) неспецифическую абсорбцию антител на срезы.

Необходимо помнить, что многие МКАТ могут эффективно окрашивать опухолевые клетки только после проведения адекватных процедур демаскировки антигенов, указанных фирмой-производителем антител (нагревание в микроволновой печи, кипячение в цитратном буфере или обработка протеолитическим ферментом).

Среди технических трудностей, связанных с процедурой демаскировки антигенов, следует отметить: 1) денатурацию ткани, приводящую к повреждению среза, нарушению морфологии клеток; эффект возникает при слишком долгой обработке стекол или фиксации опухоли не в растворе формалина; 2) потерю срезов со стекол, покрытых белком, что предотвращается предварительной обработкой поверхности стекла поли-лизинном или другими адгезивными веществами; 3) избыточную реактивность (артефакт) некоторых антител с клеточными элементами, которые не должны были окрашиваться. Необходимо отметить, что методы демаскировки антиген-

ных детерминант подходит не для всех антител. Например, интенсивность окраски на антиген HMB-45 (маркер меланомы) после процедур демаскировки не меняется.

Другим разделом клинической онкологии, где ИГХ нашла широкое применение, оказался анализ маркеров, способных определить не только чувствительность опухоли к терапии, но и степень их клинической агрессивности. Эти маркеры включают в себя рецепторы стероидных гормонов, белки онкогенов и генов-супрессоров (p53, Her2 (рис. 1, рис.2), c-kit, pRb, bcl-2 и др.), белки, связанные с клеточным циклом (Ki-67, циклины, p16, топоизомераза-2а и др.), каспазы, молекулы адгезии (CD44, кадхерины и др.), инвазивности и метастазирования (металлопротеиназы и др.), а также ангиогенеза (факторы роста сосудов, их рецепторы и др.). Если для ряда маркеров существуют полуколичественные критерии оценки, позволяющие стандартизировать методику (гормонорецепторы-система счёта по С. Allred, белок HER2 – HercepTest и др.), то для других маркерных молекул подобные подходы находятся в стадии разработки. Поэтому иммуногистохимия для целей «таргетной» терапии должна использоваться только в хорошо оборудованных лабораториях с грамотным, обученным персоналом врачей и лаборантов.

В референсной лаборатории иммуногистохимической диагностики опухолей (ИДО) нашего диспансера за 19 лет выполнена ИГХ верификация новообразований у 32 тыс. пациентов. Из них 57% случаев составили опухоли молочной железы, которые исследовались на прогностические маркеры. Из оставшихся наблюдений 15% были лимфопролиферативными процессами, 15% -анпластическими раками и метастазами без выявленного очага и 10% составляли мягкотканые опухоли. Процент ошибочных иммуногистохимических заключений был 2,6, и они касались чаще опухолей центральной нервной системы, лимфом и метастазов без первичного очага. Среди главных причин неточных диагнозов следует назвать отсутствие у патолога результатов клинического исследования, узкую панель примененных антител, неправильную трактовку данных ИГХ и гистологической структуры, технические проблемы.

В заключение следует подчеркнуть целесообразность и перспективность в ряде диагностических случаев сочетания иммуногистохимии с FISH, SISH, RT-PCR и другими методами молекулярной биологии и цитогенетики.

Мы считаем, что внедрение в последнее десятилетие иммуногисто (cito-)химии в повседневную практику врачей-онкологов в регионах России позволило поднять качество диагностики и лечения опухолей на высокий уровень, характерный для современной онкологической клиники. ■

Семен Венедиктович Петров, Доктор медицинских наук, профессор, Казанский государственный медицинский университет, Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Казань

Литература:

1. Атлас опухолей лимфатической системы. Под ред. А.И.Воробьева и А.М.Кременецкой.-М.: Ньюдиамед, 2007-294 стр.
2. Биопсии костного мозга / Ю. А. Криволапов.- М.: Практическая медицина, 2014.-528 стр.
3. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей/Под ред. Д.Ф. Глузмана.- К.: Морион, 2003.-156 стр.
4. Иммуногистохимические методы: Руоводство /Ed. by G. Kumar et al.:ДАКО/ Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова.- М., 2011.-224 стр.,
5. Ковригина А.М., Пробатова Н.А. Лимфома Ходжкина и крупноклеточные лимфомы. М.: МИА. 2007.-214 стр.
6. Криволапов Ю.А., Леенман Е.Е. Морфологическая диагностика лимфом.- СПб.: «КОСТА», 2006.-208 стр.
7. Райхлин Н.Т., Петров С.В. Способность опухолевых клеток к специфической дифференцировке как основа для иммуногистохимической диагностики опухолей человека. Вестник ОНЦ им. Н.Н.Блохина, 1998, ч 3, с. 3-10.
8. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 4-е изд., под ред. С.В.Петрова и Н.Т. Райхлина.- Казань, 2012.-624 стр.
9. Руководство по дерматоонкологии. Под ред. Г.А. Галил-Оглы и др., М., 2005.-872 стр.
10. Франк Г.А. Руководство по HER2 тестированию при раке желудка, пищевожно-желудочного перехода.-М.: Боргес, 2012.- 54 стр.
11. Dabbs D. J. (Ed.) Diagnostic immunohistochemistry.- Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002-1st Ed, 2004-2nd Ed., 2010 - 3d Ed.
12. Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors //Subcellular Biochemistry, vol. 31: Intermediate Filaments, eds. By Herrmann and Harris. Plenum Press, New York, 1998. - P.205-262.
13. Taylor C.R. and Cote R.J.(Eds.) //Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologists 2nd edition. W.B. Saunders, 1994, 3d edition. W.B. Saunders, 2006.