ПРИОРИТЕТНЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОЕКТ «ОБРАЗОВАНИЕ»

РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ

И.И. БАБИЧЕНКО, В.А. КОВЯЗИН

НОВЫЕ МЕТОДЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Учебное пособие

Москва

2008

Инновационная образовательная программа
Российского университета дружбы народов

«Создание комплекса инновационных образовательных программ и формирование инновационной образовательной среды, позволяющих эффективно реализовывать государственные интересы РФ через систему экспорта образовательных услуг»

Экспертное заключение –

доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии лечебного факультета РГМУ *М.В. Самойлов*

Бабиченко И.И., Ковязин В.А.

Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста: Учеб. пособие. – М.: РУДН, 2008. – 109 с.

В учебно-методическом комплексе представлены программа курса, включающая темы лекций и семинарских занятий, темы самостоятельных работ, описание системы контроля занятий, примеры тестовых заданий, учебно-тематический план и тексты лекций, посвященные современным данным иммуногистохимической диагностики опухолей человека. На лекциях и семинарских занятиях обсуждаются вопросы истории развития иммуногистохимии как методики; основные методические приемы проведения реакции, возможные ошибки при интерпретации полученных результатов и методы их устранения. Рассматриваются фундаментальные данные в области молекулярной биологии нормальных и малигнизированных клеток и алгоритмы для выявления опухолей различной локализации. Учебно-методический комплекс предназначен для патоморфологов, студентов старших курсов медицинских вузов, ординаторов, аспирантов и врачей других специальностей, интересующихся данной проблемой.

Учебное пособие выполнено в рамках инновационной образовательной программы Российского университета дружбы народов, направление «Комплекс экспортоориентированных инновационных образовательных программ по приоритетным направлениям науки и технологий», и входит в состав учебно-методического комплекса, включающего описание курса, программу и электронный учебник.

© Бабиченко И.И., Ковязин В.А., 2008

СОДЖЕРЖАНИЕ

ОСНОВЫ ИММУНОХИМИИ

Тема № 1. Введение. История развития метода.
Основные фундаментальные знания в области иммунохимии 4

Тема № 2. Методические вопросы проведения иммуногистохимической реакции 10

Тема № 3. Оценка результатов иммуногистохимической реакции. Положительные и негативные контроли. Возможные проблемы при проведении реакции 20

ПРИКЛАДНЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОГИСТОХИМИИ

Тема № 4. Значение клеточных белков в оценке гистогенеза опухолей 25

Тема № 5. Рецепторные белки в неизмененных и опухолевых клетках 32

Тема № 6. Белки – маркеры клеточного цикла 37

Тема № 7. Факторы апоптоза и пролиферации 44

Тема № 8. Белковые молекулы, характеризующие клеточную адгезию 50

Тема №9. Иммуногистохимия ангиогенеза 57

ПРАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ОНКОМОРФОЛОГИИ

Тема № 10. Иммуногистохимическая характеристика опухолевых клеток.
Опухоли из эпителия 63

Тема № 11. Выявление гистогенетической принадлежности опухолей мезенхимального происхождения 71

Тема № 12. Дифференциальная диагностика лимфом 78

ЛИТЕРАТУРА 89

ОПИСАНИЕ КУРСА И ПРОГРАММА 93

ОСНОВЫ ИММУНОХИМИИ

Тема № 1. Введение. История развития метода. Основные фундаментальные знания в области иммунохимии

Введение

Иммуногистохимия (ИГХ) – метод выявления точной локализации клеточного или тканевого компонента (антигена) с помощью иммунологических и гистохимических реакций; при этом иммунологический анализ срезов тканей или цитологического материала проводится в условиях сохранения морфологии клеток.

В диагностической практике можно выделить несколько основных областей применения ИГХ: во-первых, при исследовании опухолей человека с целью определения гистогенеза недифференцированных опухолевых образований, отдаленных метастазов, для дифференцировки различных тканевых компонентов, составляющих комплексные опухоли; во-вторых, с целью прогностической оценки дальнейшего течения заболевания и, наконец, при назначении терапии.

Особую ценность иммуногистохимия приобретает в том случае, когда имеются трудности в определении гистогенетической принадлежности опухолевой ткани на основании изучения рутинных срезов, окрашенных гематоксилин-зозином, при этом морфологи нередко используют термин «недифференцированные опухоли». Выявление гистогенеза опухоли необходимо для решения вопроса о тактике лечения заболевания и прогностической оценке. Наибольшее клиническое применение в настоящее время ИГХ получила при классификации лейкозов и лимфом. Определенные панели антител позволяют охарактеризовать острые и хронические лейкозы, лимфогранулематоз и различные типы неходжкинских лимфом. Так, используя антитела к общему лейкоцитар-

ному антигену, выявляют лимфомы, а антитела к белкам S-100 и HMB-45 позволяют определить меланомы.

Иммуногистохимические исследования с целью оценить органоспецифичность отдаленных метастазов проводятся с использованием набора антител, характеризующих антигенные свойства клеток различных органов: в частности, антитела к PSA выявляют рак простаты; наличие в опухолевой ткани рецепторов к эстрогенам и прогестерону позволяет сделать предположение о метастазе из молочной железы или эндометрия; антитела к тиреоглобулину выявляют опухолевые клетки фолликулярного рака щитовидной железы. Большую помощь в определении органной принадлежности метастазов оказывают антитела к различным цитокератинам.

С целью прогностической оценки заболевания, предсказания биологического поведения опухоли, появления метастазов, эффективности терапии проводят исследование пролиферативной активности (Ki-67), выраженности ангиогенеза, определение рецепторов факторов роста (продукты онкогенов her-2/neu при раке молочной железы), выявление рецепторов к стероидным гормонам, изучение степени анаплазии клеток (мутантный белок гена p53*)*.

Несомненна роль ИГХ исследования при определении рецепторов к эстрогенам и прогестерону для назначения ряда гормональных препаратов (тамоксифен).

Таким образом, ИГХ представляет ценный современный метод диагностики, позволяющий определить гистогенез, степень пролиферативной активности и анаплазии опухолевых клеток, охарактеризовать прогноз и предложить адекватные методы лечения пациентов. Однако не следует и преувеличивать возможности данного метода при лечении конкретного пациента. ИГХ является только дополнительной методикой исследования, и ее результаты должны быть интерпретированы в контексте с другими данными обследования, включая клинические.

История развития метода

Основной принцип иммуногистохимии был предложен 70 лет назад J.R. Marrack (1934) и заключается в том, что в качестве гистохимических реагентов используют антитела, к которым присоединяют определенный флуоресцентный маркер. Авторами метода по праву считается группа исследователей под руководством A.H. Coons, которая в 1942 году впервые с помощью антител, меченных изоцианатом, выявила антигены пневмококков в инфицированных тканях (Coons A.H. et al., 1941; 1955). Затем ИГХ применяли в области эндокринологии для выявления мест синтеза различных гормонов. Однако эта методика не находила широкого применения из-за сложностей, связанных с использованием флуоресцентных микроскопов, трудностей выявления основных компонентов тканей и высокой чувствительности флуоресцентных маркеров к дегидратации.

Одним из важных открытий для дальнейшего широкого использования иммуногистохимии было выявление в 1951 году J.M. Marshall возможности локализовать in vitro молекулы адренокортикотропного гормона в гипофизе с помощью антител, меченных флуоресцентными маркерами. Локализация эндогенных антигенов in vivo была осуществлена через 4 года с помощью непрямого метода. В этих экспериментах кроличья антисыворотка против крысиного почечного антигена была введена крысам и на замороженных срезах почки крысы было выявлено наличие гамма-глобулинов с помощью меченных флуоресцентным маркером цыплячьих антител против кроличьих глобулинов.

В 1960 году для осуществления визуализации антител в электронной микроскопии было введено большое количество маркеров тяжелых металлов, таких как ферритин, коллоидное золото. Тяжелые металлы не являются идеальными маркерами для иммуногистохимии по самым различным техническим причинам, хотя сейчас применяются оригинальные методики с использованием коллоидного золота.

Методы использования конъюгированных ферментами антител были независимо разработаны P.K. Nakane, G.B. Pierce (1966) и S. Avrameas, J. Uriel (1966). Наибольшую популярность получил пероксидазно-антипероксидазный

метод L.A. Sternberger с соавт. (1977). Для визуализации энзиматических маркеров в конце реакции антиген-антитело проводят гистохимическую реакцию, в результате которой фермент становится видимым на световом уровне. Дальнейшее усовершенствование этой реакции привело к тому, что продукты реакции были видны и на электронно-микроскопическом уровне, за счет взаимодействия с осмием они становились электронно-плотными.

В последние годы применение иммуногистохимии в морфологии широко развивалось в связи с разработкой новых методов конъюгации антител, фиксации тканей, демаскирования антигенов, а также использования новых ламп и фильтров для флуоресцентной микроскопии.

Основные фундаментальные знания в области иммунохимии

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. 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.

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 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 ви-

дов 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-диаминобензидина 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.

Тема № 2. Методические вопросы проведения иммуногистохимической реакции

Подготовка клеток и тканей

Выявление антигенов в клетках и тканях с помощью иммуногистохимии осуществляется в несколько этапов. Исследуемые образцы замораживаются или заключаются в парафин, режутся на микротоме и помещаются на предметные стекла. Затем срезы освобождаются от парафина, на них проводят демаскирование антигенов, блокируют неспецифическое связывание белков и эндогенную пероксидазную активность и затем проводят инкубацию с первичными антителами. Связавшиеся первичные антитела выявляют, добавляя вторичные антитела, конъюгированные при помощи полимера с пероксидазой хрена, и осуществляют визуализацию вторичных антител при помощи субстрата – диаминобензидина. После достижения максимальной интенсивности окрашивания, срезы промывают водой для прекращения реакции, докрашивают гематоксилином и заключают в заливочную среду.

Для ИГХ пригоден практически любой материал: цитологические мазки, свежезамороженная или фиксированная ткань. Выбор исследуемого материала должен определяться свойствами изучаемого антигена: так, большинство цитоплазматических антигенов выявляются на фиксированных формальдегидом и залитых в парафин срезах; поверхностные клеточные антигены, как правило, разрушаются или маскируются при обычной фиксации и могут быть выявлены только на свежезамороженных тканях либо в культуре клеток.

Фиксация

Основная часть гистологических и цитологических методик направлена на сохранение морфологической структуры клеток и тканей, для этого исследуемые образцы помещают в фиксирующие растворы. Фиксация необходима для предотвращения аутолиза антигенов; при этом блокируются лизосомные

ферменты и предотвращается рост бактерий, которые вызывают разрушение клеточной структуры.

Положительный результат иммуногистохимической реакции во многом определяется адекватной фиксацией исследуемых антигенов в тканях. Выявляемый антиген должен быть нерастворимым в жидкостях за счет процесса фиксации его к тканевым компонентам. Особенностью антигена является доступность его первичной структуры для антител. С другой стороны, за счет денатурации белков, фиксация вызывает структурные изменения и инактивацию антигенного профиля клеток. Идеальный фиксатор должен сохранять морфологию исследуемого материала, закреплять исследуемый антиген в месте его распределения и не нарушать его антигенные свойства. До настоящего времени подобного фиксатора не описано. Выбор специфического фиксатора для отдельных компонентов клетки имеет большое значение. Из этих компонентов важную роль играют белки клетки, а лучшим для них фиксатором является формалин; в тех случаях, когда формалин использовать нельзя, его обычно заменяют спиртом или ацетоном. В частности, антигены промежуточных филаментов лучше выявлять на свежезамороженных срезах или тканях, фиксированных в спиртах.

Фиксация мазков крови и цитологических препаратов. Перед фиксацией препараты высушивают 1-2 часа при комнатной температуре для предотвращения повреждения клеток. При высушивании клетки плотно прилипают к стеклу и не смываются при последующей фиксации. Высушивание не повреждает структуры поверхностных антигенов лейкоцитов. Мазки фиксируют либо в абсолютном ацетоне, либо в 96º этаноле 1-3 мин, с последующей окраской клеток.

Приготовление срезов тканей

Иммуногистохимия на криостатных срезах. Криостатные срезы подходят для выявления большинства антигенов. Срезы толщиной 5 мкм помещают на покрытые поли-L-лизином стекла и высушивают в течение 12 часов при комнатной температуре. Срезы фиксируют, погружая в холодный ацетон -20ºС,

либо другой фиксатор (этиловый спирт, формалин и т.п.) на 2 мин. Стекла высушивают на воздухе и проводят регидратацию в 1% неиммунной бычьей сыворотке в солевом фосфатном буфере (PBS), затем осуществляют иммуногистохимическую реакцию.

Иммуногистохимия на парафиновых срезах. Современные методы демаскирования клеточных антигенов позволяют проводить ИГХ реакции на парафиновых срезах. При этом в качестве фиксатора может быть использован 10% раствор забуференного формальдегида.

Заливка в парафин:

1. Фиксация в забуференном формалине – сутки.
2. Промывка в проточной воде – 2 часа.
3. 70% этанол – 30 мин.
4. 80% этанол – 30 мин.
5. 90% этанол – 30 мин.
6. 100% этанол – 3 смены по 1 часу.
7. Ксилол/ этанол 1:1 – 15 мин.
8. Ксилол – 2 смены по 30 мин.
9. Ксилол/ парафин 1:1 при 56ºС – 30 мин.
10. Парафин – 2 смены при 56ºС 1 час.
11. Заливка.

Перед проведением ИГХ реакции на парафиновых срезах необходимо осуществить их регидратацию. Срезы толщиной 4-5 мкм режутся на покрытые поли-L-лизином стекла, затем высушиваются при 37ºС в течение ночи и 1 час при 60ºС.

Регидратация:

1. Ксилол – 3 смены по 5 мин.
2. 100% этанол – 2 смены по 3 мин.

3. 96% этанол – 2 смены по 3 мин.
4. 80% этанол – 3 мин.
5. Дистиллированная вода – 2 смены по 3 мин.

Демаскирование антигенов

После фиксации в формалине и заливки в парафин тканевые антигены необходимо демаскировать. Эта процедура направлена на восстановление оригинальной структуры белка. Методы демаскирования антигенов, такие как обработка протеолитическими ферментами или нагревание в микроволновой печи после формалиновой фиксации и заключения в парафин способствуют обнаружению не выявляемых ранее антигенов.

Демаскирование клеточных антигенов ферментами (трипсин, протеиназа К, проназа) применяется, как правило, для цитокератинов и некоторых других клеточных антигенов. Другой способ «освобождения» антигенов осуществляется путем нагревания, при этом отмечается усиление иммуногистохимической реакции на срезах, фиксированных в формалине. Для нагревания можно использовать как водяную баню, так и микроволновую печь. Как правило, нагревание срезов проводят в 10мМ цитратном буфере при pH 6,0.

Протокол обработки срезов ферментами:

1. Поместить срезы в дистиллированную воду.
2. Приготовить 0,1% раствор трипсина или протеиназы К в PBS (pH 7,6).
3. Инкубировать при 37ºС от 15 до 60 мин.
4. Остановить действие фермента ополаскиванием в холодной воде.
5. Перенести в PBS.

Протокол обработки срезов в микроволновой печи:

1. Поместить срезы в пластиковый контейнер с 10 мМ цитратным буфером (pH 6,0).
2. Нагревать срезы при мощности 700 Вт 7 мин.

3. Долить испарившуюся жидкость и нагревать срезы при мощности 350 Вт 20 мин.

4. Остудить срезы вне печи в течение 15 мин.

5. Перенести срезы в PBS.

Блокировка эндогенной активности ферментов

Эндогенная активность пероксидазы. Пероксидазная активность встречается во многих клетках организма: эритроцитах (гемоглобин), миоцитах (миоглобин), макрофагах и нейтрофилах (цитохромы), гепатоцитах и эпителии почек (каталаза). Для нейтрализации эндогенной пероксидазной активности на срезы на 10 мин наносят 1-3% раствор перекиси водорода.

Эндогенная активность щелочной фосфатазы. Блокирование щелочной фосфатазы осуществляют 5 мМ раствором левамизоля.

Биотин. Витамин Н – биотин – присутствует в печени, почках и др. органах. При использовании по время ИГХ реакции пероксидазно-авидинового комплекса для визуализации меченых биотином вторичных антител, возможно его неспецифическое связывание с клеточными компонентами, содержащими эндогенный биотин. Для предотвращения подобной неспецифической реакции перед осуществлением блокирования эндогенной пероксидазы проводят инкубацию срезов в 0,1% р-ре авидина, а затем в 0,01% растворе биотина в Трис-буфере (ТБС). Второй способ избежать неспецифической реакции с биотином – это использование современных безбиотиновых систем визуализации антигенов.

Проведение иммуногистохимической реакции

Существует множество различных методов иммуноферментной окраски, которые позволяют определить место локализации антигена: прямой метод, непрямые методы, методы с использованием ферментных иммунных комплексов, авидин-биотиновые методы и др.

Прямой метод. Эта методика была разработана A.H. Coons, M.H. Kaplan (1950). Меченые ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианатом) первичные антитела наносили непосредственно на срезы. После инкубации несвязанные антитела смывали фосфатным буфером и с помощью ультрафиолетового света выявляли места локализации антигенов по зеленоватой флюоресценции.

Непрямой метод. Был также описан A.H. Coons с соавт. (1955). Этот метод более чувствителен, чем прямой, т.е. то же количество первичных антител, присоединенных к тканевым антигенам, будет более интенсивно окрашиваться по сравнению с прямым методом либо то же количество антигенов можно локализовать за счет более низкой концентрации первичных антител. Первичные немеченые антитела наносят на срезы, а их избыток смывается буфером. Затем наносятся вторичные конъюгированные с ФИТЦ антитела, принадлежащие другому виду животных, полученные к гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови животных, использовавшихся в качестве первичных антител. В этом случае первичные антитела, связавшиеся с антигенами исследуемой ткани являются антигенами для меченых вторичных антител, которые также распределяются в месте локализации тканевых антигенов.

Другим преимуществом непрямого метода является возможность применения одних и тех же меченых вторичных антител, при использовании первичных антител от одного и того же вида животных. Маркеры для этого метода могут быть флуоресцентными (флуоресцин, родамин), ферментными (пероксидаза хрена), а также коллоидное золото.

Не конъюгированный антигенно-ферментный метод. Название связано с тем, что как первичные, так и вторичные антитела не конъюгируются с маркерами. В свою очередь, вторичные антитела используются как мостик между первичными антителами и конечными, которые также не конъюгируются, а получаются путем иммунизации животных того же вида, что и первичные антитела к пероксидазе хрена. За последним слоем антител наносится пероксидаза хрена, которая присоединяется путем реакции антиген-антитело и затем прояв-

ляется гистохимически. За счет отсутствия химической конъюгации, не повреждается иммунологическая реактивность всех антител.

Одиночный мост. Первым слоем может быть кроличья сыворотка, полученная против первичного антигена, второй слой – неконъюгированная сыворотка козы против кроличьих гаммаглобулинов и третий слой – кроличья сыворотка, полученная против пероксидазы хрена, которая затем проявляется гистохимическим методом, таким как диаминобензидин и перекись водорода по R.C. Graham и M.J. Karnovsky (1966).

Двойной мост. Он включает повторение второго слоя, сыворотки козы против кроличьих иммуноглобулинов после кроличьей антипероксидазной сыворотки и затем повторение кроличьей антипероксидазной сыворотки перед нанесением пероксидазы и её визуализацией, таким образом достигается увеличение числа мест, связывающих пероксидазу.

Пероксидазно-антипероксидазный метод. Развитие этого метода L.A. Sternberger (1979) оказало большое влияние на иммуногистохимию. Модификация Штейнбергом мостовой методики заключалась в проведении реакции антипероксидазных антител с пероксидазой перед нанесением их на ткани. Эта реакция приводила к образованию стабильного комплекса трех молекул пероксидазы хрена с двумя молекулами антител. Этот комплекс отделялся от непрореагировавших антител и пероксидазы перед использованием. Он реагирует как антиген третьего слоя. Первый слой составляют кроличьи антитела, реагирующие с тканевыми антигенами, второй слой образует неконъюгированная вторичная сыворотка козы против кроличьих антител в избытке, таким образом одно из парных соединительных мест антител (Fab-часть) является свободной для реагирования с третьим слоем кроличьего ПАП комплекса. Таким образом, обеспечивается высокое соотношение между количеством пероксидазного маркера и первичным антигеном. Кроличьи ПАП молекулы реагируют только с антикроличьими иммуноглобулинами козы второго слоя, и это обеспечивает отсутствие неспецифического связывания с тканью. Это специфичная и свобод-

ная от фона реакция. Для увеличения интенсивности, нанесение второго и третьего слоев можно повторить.

Авидин-биотиновый метод. Два новых вещества стали использовались в иммуногистохимии после исследований J.L. Guesdon с соавт. (1979) – биотин и авидин. Биотин (витамин Н) в большом количестве содержится в белках птичьих яиц, где он связан с большим гликопротеидом – авидином. Авидин имеет высокую аффинность к биотину, одна его молекула может присоединить 4 молекулы биотина. Биотин может связываться с Fc-иммуноглобулинами, каждая молекула биотина имеет одно место связывания, но с одной молекулой иммуноглобулина могут связываться несколько молекул биотина. Как биотин, так и авидин могут быть помечены флуоресцентной меткой, ферментом, ферритином или молекулой золота. Методика с использованием авидин-биотиновых комплексов считается соответствующей либо даже превышающей ПАП метод по чувствительности. В этой методике первый слой представляют первичные кроличьи антитела; второй слой составляют биотинилированные антикроличьи иммуноглобулины козы; третий слой представлен авидин-биотиновым комплексом. Авидин реагирует с биотинилированной пероксидазой хрена в такой пропорции, при которой три связывающих места авидина взаимодействуют с биотинилированной пероксидазой, оставшееся одно место на каждой молекуле является свободным для взаимодействия с биотином второго слоя антител. Метод блокирования неспецифического взаимодействия с тканевым биотином был предложен G.S. Wood и R. Warnke (1981). Неконъюгированный авидин наносится на ткани для связывания биотина и затем добавляется в избытке неконъюгированный биотин для предупреждения любого связывания авидин-биотинового комплекса.

В последнее время различными фирмами разработаны *новые методы визуализации иммуногистохимической реакции* с использованием конъюгатов полимеров. К длинной молекуле полимера присоединяется большое количество фермента. За счет увеличения концентрации фермента повышается чувствительность метода. При этом с полимером могут быть конъюгированы как пер-

вичные антитела, так и молекулы фермента EPOS (Enhanced Polymer One Step-staining) фирмы Dako. Если с молекулой полимера конъюгируются вторичные антитела и фермент (EnVision, фирмы Dako), то иммуногистохимическая реакция проводится в два этапа, при этом достигается высокая чувствительность по сравнению с другими методами визуализации.

Наибольшую популярность в настоящее время получили иммуногистохимические методики, использующие для визуализации реакции ферменты пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу, с использованием стрептовидин-биотинового комплекса. Эта методика проводится в три этапа: нанесение неокрашенных первичных антител, затем биотинилированных вторичных антител и добавление связанного с молекулами фермента стрептовидина (Dabbs D.J., 2002). Необходимо отметить, что чувствительность ИГХ методики во многом зависит от используемых реагентов и особенностей проведения реакции, в связи с чем, сложно сравнивать результаты ИГХ при использовании различных реактивов и методических приемов.

Важными условиями проведения иммуногистохимической реакции является подбор титра антител. Титром антител называют максимальное разведение сыворотки, при котором наблюдается выраженное специфическое окрашивание без неспецифического фонового окрашивания окружающих тканей. Все коммерческие антитела имеют инструкции с описанием оптимального разведения, однако часто подбирать титр антител приходится экспериментально, поскольку этот показатель зависит от таких причин, как длительность инкубации первичной сыворотки, окружающая температура, выбранная система визуализации распределения первичных антител и т.п.

Перед нанесением первичных антител срезы помещают на 1-2 мин в PBS, затем необходимо удалить избыток буфера вокруг среза и капнуть на срез небольшое количество первичной сыворотки от 30 до 50 мкл в зависимости от площади среза. Затем срезы помещают горизонтально во влажную герметичную камеру на подставку, под которой находится фильтровальная бумага, смоченная водой, для предотвращения неспецифического связывания антител с

тканью за счет их высыхания. И проводят инкубацию при комнатной температуре в течение 15-30 мин в зависимости от рекомендаций производителя антител. Для ускорения процессов связывания антител с антигенами можно проводить инкубацию при температуре 37ºС. Для повышения интенсивности ИГХ реакции и увеличения разведения используемой сыворотки можно проводить реакцию при 4ºС в холодильнике в течение ночи.

Протокол иммуногистохимической реакции, предлагаемый компанией Dako.

1. Приготовить парафиновые срезы на стеклах, покрытых поли-L-лизином, провести депарафинирование и регидратацию в TBS (Dako TBS, S196830, добавить 0,05% Tween 20).
2. Удалить избыток жидкости вокруг срезов и капнуть 1% р-р перекиси водорода 10 мин.
3. Промыть в TBS.
4. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.
5. Нанести первичные антитела (мышиные или кроличьи). Инкубировать 30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
6. Промыть в TBS.
7. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.
8. Нанести вторичные антитела (смесь антимышиных или антикроличьих биотинилированных антител). Инкубировать 15-30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
9. Промыть в TBS.
10. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.
11. Нанести конъюгированный с пероксидазой стрептавидин. Инкубировать 15-30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
12. Промыть в TBS.
13. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.
14. Провести гистохимическое выявление пероксидазной активности с раствором диаминобензидина 5-10 мин.

15. Промыть в воде.
16. Докрасить ядра гематоксилином Майера 1-2 мин.
17. Промыть срезы в проточной воде.
18. Провести дегидратацию в восходящей батареи спиртов.
19. Заключить срезы в канадский бальзам.

Тема № 3. Оценка результатов иммуногистохимической реакции. Положительные и негативные контроли. Возможные проблемы при проведении реакции

При использовании различных методов визуализации антигенов должно получиться интенсивное четко выявляемое окрашивание тканевых антигенов в исследуемом образце и позитивном контроле. Окрашивание негативного контроля также необходимо принимать во внимание при оценке специфичного расположения исследуемых антигенов. Интерпретация полученных результатов ИГХ реакции включает такие термины, как «выраженная позитивная реакция», «ложно-позитивная реакция», «негативная реакция», «ложно-негативное окрашивание».

Негативную реакцию сложно интерпретировать, в отличие от позитивной, для этого необходимо провести контрольные исследования с различными дополнительными антителами. Так, при выявлении гистогенеза недифференцированной злокачественной опухоли на предмет рак это или лимфома, отрицательной реакции с антителами на кератин (промежуточный филамент, выявляемый в большинстве раков) недостаточно для постановки диагноза лимфомы. Необходимо провести дополнительное исследование и получить положительное окрашивание опухолевых клеток на общий лимфоцитарный антиген (белок, характерный для большинства лимфом).

Контроль иммуногистохимической реакции

При любом иммуногистохимическом исследовании необходимо использовать различные контрольные тесты для оценки адекватности методической процедуры. Для подобных процедур исследуют стекла с тканью положительного и негативного контроля для того, чтобы убедиться в том, что 1) система визуализации работает адекватно, 2) положительное или негативное окрашивание является специфичным, 3) полностью соблюдена методическая последовательность.

Контроль ИГХ реакции означает оценку специфичности взаимодействия антител с тканевыми антигенами. С этой целью используют отрицательный и положительный контроль.

Отрицательный контроль.

- Для отрицательного контроля берут срезы тканей, в которых заведомо нет искомого антигена. Результаты реакции должны быть отрицательными.
- При проведении ИГХ реакции исключают инкубацию с первичными антителами, заменяя их неиммунной сывороткой. Результаты реакции должны быть отрицательными.
- Антитела (в максимальном разведении) предварительно адсорбируют специфическим антигеном (0,1-10 нмоль/ мл), затем их наносят на срезы в качестве контроля. Результаты реакции должны быть отрицательными. После адсорбции специфическим антигеном антитела должны терять способность окрашивать ткань. Подобный контроль необходимо ставить с каждой новой антисывороткой и при обнаружении новых участков взаимодействия антител с тканью.

Положительный контроль.

В любом опыте важно иметь положительный контроль – окрашивать ткань, заведомо содержащую исследуемые антигены, для того чтобы убедиться, что все антитела работают нормально. В качестве положительного контроля

служат срезы тканей, в которых исследуемый антиген заведомо присутствует. Результаты реакции должны быть положительными.

Возможные проблемы, возникающие при проведении ИГХ реакции

Если наблюдается сильное фоновое окрашивание, то необходимо:

- до нанесения первичных антител провести блокирование нормальной сывороткой животного, донора вторичных антител, либо использовать готовые антитела для блокирования мест неспецифического связывания антител, значительно снижающие фоновую неспецифическую окраску срезов;
- использовать более высокие разведения первичных и/или вторичных антител. В результате разведения абсолютное количество загрязненных антител падает, в то время как количество специфических антител остается достаточным для визуализации антигенов;
- возможно, во время инкубации с сыворотками срезы подсохли;
- уменьшить время инкубирования первичных антител;
- снизить температуру при инкубации первичных антител;
- уменьшить время инкубации субстрата;
- более тщательно промывать срезы после инкубации с антителами;
- провести адсорбцию первичных и вторичных антител альбумином. Неспецифическое связывание иммуноглобулинов с компонентами ткани за счет гидрофобных или электростатических взаимодействий можно предотвратить путем адсорбции антисыворотки альбуминами животного, ткань которого предстоит окрашивать. При этом блокируются большинство участков неспецифического связывания, но образующиеся связи слабее, чем связь антиген-антитело и не мешают взаимодействовать специфическим антителам с антигеном. К рабочему раствору антител можно также добавить нормальную сыворотку до концентрации 1%;
- внести в буфер, используемый для промывки, детергент (0,2% тритон Х-100) для снижения неспецифического связывания белка;

- попытаться дополнительно заблокировать эндогенную пероксидазу например 3% или 6% раствором перекиси водорода, нитроферрицианидом натрия или смесью периодат-борогидрид;
- ткани обладают эндогенной биотиновой активностью. Необходимо провести блокирование эндогенной биотиновой активности, используя авидин-биотин блокирующие реагенты до нанесения первичных антител;
- антитела и исследуемая ткань принадлежат к одному виду животных. Мышиные антитела используются для выявления антигенов в тканях мыши;
- удалить комплемент из препарата первичных антител, прогревая антисыворотку 30 мин при 56ºС.

Возможные причины слабого окрашивания всех срезов:

- неадекватная фиксация ткани. Необходимо сделать криостатные срезы замороженной нефиксированной ткани, фиксировать их в различных фиксаторах, затем проводить ИГХ реакцию;
- ошибки при осуществлении демаскирования антигенов;
- антиген был разрушен до инкубации с первичной сывороткой. Следует провести блокирование эндогенной пероксидазной активности после проведения реакции с первичными антителами;
- низкая концентрация первичных или вторичных антител. Для подбора оптимальной концентрации антител необходимо провести пробную ИГХ реакцию с их различными разведениями;
- ошибки или пропуск одной из процедур иммунохимического окрашивания. Возможно использование вторичных антител, которые специфически не взаимодействуют с первичными. Если используются первичные мышиные антитела, необходимо применить вторичные антимышиные антитела;
- слишком короткое время инкубации с первичными антителами;
- слишком низкая температура при инкубации с первичными антителами;
- старый субстрат. Свежий субстрат как правило представляет светло розовый раствор, появление коричневой окраски свидетельствует о том, что субстрат – старый;

- слишком интенсивное смывание реагентов буфером привело к разведению реагентов;
- несовместимость реагентов докрашивания или заключения срезов с продуктами реакции;
- неполная депарафинизация срезов. Необходимо продлить время депарафинизации срезов, либо заменить ксилол;
- антитела не работают из-за неправильного их хранения. Хранить антитела желательно в замороженном состоянии в небольших объемах при температуре -20ºС – -70ºС, избегая повторного замораживания и оттаивания антител.

Причины окрашивания только срезов с положительным контролем, в то время как исследуемая ткань не окрасилась, могут быть следующие:

- в исследуемой ткани нет искомого антигена или его концентрация незначительна. Необходимо увеличить время инкубации первичных антител;
- неадекватная обработка исследуемой ткани, вызвавшая денатурацию исследуемых антигенов;
- образцы слишком долго фиксировались в формалине. В результате произошло маскирование антигена за счет кросс-связывания альдегидов и увеличения гидрофобности ткани. Возможно, для демаскирования антигена необходимо провести дополнительное нагревание срезов в микроволновой печи или обработку ферментом;
- иммунореактивность уменьшилась или повредилась во время обработки тканей при высокой температуре. Не следует нагревать образцы выше 60ºС.

Срезы слетают с предметных стекол:

- исключить детергенты из буфера для промывания срезов;
- прогреть парафиновые срезы в термостате в течение 2 суток при температуре 37ºС;
- нарушена морфология исследуемой ткани;
- плохая фиксация ткани;
- ткань повреждена из-за высокой концентрации или длительной обработкой детергентами (Triton X-100).

ПРИКЛАДНЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОГИСТОХИМИИ

Тема № 4. Значение клеточных белков в оценке гистогенеза опухолей

Для иммуногистохимического анализа опухолей и их метастазов применяется широкий спектр маркеров, к которым можно отнести: тканеспецифические белки – белки промежуточных филаментов (ПФ), компоненты базальной мембраны, рецепторы, молекулы клеточной адгезии и др.

Для иммуногистохимической верификации опухолей человека используют антитела к белкам ПФ. Промежуточные филаменты вместе с микротрубочками и микрофиламентами составляют цитоскелет всех клеток эукариотов. Свое название ПФ (диаметр 10 нм) получили из-за того, что они тоньше микротрубочек (диаметр 24 нм), но толще микрофиламентов (диаметр 7 нм). Основная функция ПФ – создание внутриклеточного каркаса, механическое поддерживание плазматической мембраны в местах соприкосновения с другими клетками и внеклеточным веществом, а также поддержание ядерной оболочки. ПФ не подвергаются циклическим изменениям, как это происходит с микрофиламентами и микротрубочками. В клетке ПФ достаточно стабильны, даже после обработки клеток детергентами они остаются интактными, в то время как большинство микротрубочек и микрофиламентов в клетках деполимеризируются до растворимых форм.

Все промежуточные филаменты разделены на шесть групп:

кислые цитокератины (молекулярная масса 40-64 кДа), по каталогу цитокератинов R. Moll (1998) они имеют порядковые номера № 9-20;

нейтрально-основные цитокератины, № 1-8 (молекулярная масса 52.5-68 кДа);

виментин (молекулярная масса 58 кДа), располагается в мезенхимальных клетках: фибробластах, остеоцитах и остеобластах, хондроцитах, шванновских

клетках, меланоцитах кожи, лейкоцитах, плазматических клетках, эндотелии сосудов, некоторых эпителиальных клетках; *десмин* мышечных клеток (молекулярная масса 54 кДа) – в клетках скелетных мышц, кардиомиоцитах, гладкомышечных клетках висцеральных органов и кровеносных сосудов; *глиальный фибриллярный кислый белок* (молекулярная масса 55 кДа) – маркер астроцитарных клеток; *периферин* распределяется в нейронах периферической нервной системы;

белки нейрофиламентов (молекулярная масса 68, 145 и 220 кДа) и альфа-интернексин;

ядерные ламины формируют оболочку ядра, их экспрессия связана со степенью дифференцировки клетки;

белок *нестин* экспрессируется в стволовых клетках нейроэпителия.

Иммуногистохимическое изучение с помощью моноклональных антител белков ПФ в опухолевых клетках различных эпителиальных и мезенхимальных новообразований показало, что в них стойко сохраняются те белки, которые характерны для ПФ нормальных клеток, явившихся источником развития данной опухоли, причем сохранность белков не зависит от степени анаплазии опухолевых клеток и зрелости новообразования в целом. Таким образом, выявление ПФ в опухолевых клетках с помощью специфических антител к различным ПФ позволяет определить эпителиальное, мезенхимальное или нейроэктодермальное происхождение опухолевых клеток, поставить диагноз и назначить адекватное лечение.

Цитокератины – маркеры различных типов эпителия

Наиболее многочисленной группой белков ПФ являются цитокератины. Цитокератины – белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. Клетки различных эпителиев имеют разные молекулярные формы цитокератина.

В настоящее время выявлено 20 типов цитокератинов СК1-СК20. Спектр цитокератинов в эпителиальных клетках зависит от типа дифференцировки, положения клетки в эпителиальном пласте.

В клетках *простого однослойного эпителия* экспрессируется СК8 и СК18. Эти низкомолекулярные цитокератины выявляются в клетках печени, поджелудочной железы, большинстве эндокринных клеток и эпителиальных клетках проксимальных извитых канальцев почек. Эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта, желчных протоков и протоков поджелудочной железы, легочных альвеол, эндометрия и собирательных трубочек почек также содержат СК7 и СК19. Нормальные клетки фолликулов щитовидной железы экспрессируют СК7, но не содержат СК19 и СК20. В базальном слое кожи СК20 окрашивает эндокринные клетки Меркеля. Железистый эпителий, с выраженным базальным или миоэпителиальным клеточным слоем (базальные и миоэпителиальные клетки молочной железы, потовых и слюнных желез, предстательной железы) экспрессирует СК5, СК14 и СК17, в то время как в секреторном эпителии выявляются цитокератины СК8, СК18, СК7, СК19.

В многослойном плоском эпителии базальный слой может экспрессировать СК5 и СК14, представляя цитокератины высокого молекулярного веса, а также СК19 (за исключением кожи). Средний и поверхностный слои неороговевающего многослойного плоского эпителия слизистых оболочек экспрессируют СК4 и СК13, в эпидермисе экспрессируются СК1 и СК10.

В переходном эпителии во всех клетках выявляются цитокератины СК8, СК18, СК19 и СК7, в то время как поверхностные «зонтичные» клетки специфически экспрессируют СК20.

В мезотелии выявляются цитокератины СК8, СК18, СК19, СК7 и цитокератины многослойного эпителия СК5, СК14, СК17.

Таким образом, присутствие цитокератинов в клетке является признаком, который может быть использован для идентификации эпителия: каждому виду эпителиальных клеток с определенной функцией и локализацией соответствует характерный набор цитокератиновых полипептидов.

Цитокератины в диагностике опухолевых заболеваний

В новообразованиях человека установлены определенные закономерности экспрессии белков ПФ.

Злокачественные опухоли из эпителия экспрессируют цитокератины, выявляемые и в неизмененных клетках того же гистогенеза. Аденокарциномы в основном экспрессируют цитокератины однослойного эпителия – СК8, СК18, СК19 и часто СК7. В клетках переходноклеточного рака и рака из клеток Меркеля сохраняются биохимические свойства нормальных клеток и выявляется СК20. В анапластических клетках плоскоклеточного рака встречаются СК5, СК6, СК14, СК16 и СК17.

Неэпителиальные опухоли, как правило, цитокератин-негативны, однако некоторые мезенхимальные опухоли, такие как лейомиома, рабдомиосаркома, меланома, шваннома и анапластическая крупно-клеточная лимфома могут экспрессировать цитокератины СК8, СК18, СК19. Эпителиоидная саркома, хондрома и амелобластома экспрессируют цитокератины простого эпителия (СК8, СК18, СК19). Синовиальная саркома и злокачественная мезотелиома экспрессируют цитокератины однослойного эпителия, однако в области расположения дифференцированных клеток возможна экспрессия и высокомолекулярных цитокератинов, характерных для многослойного плоского эпителия.

Цитокератины – *важные маркеры для иммуногистохимической классификации недифференцированных опухолей*.

Для выявления цитокератинов в опухолевых клетках часто используются так называемые общие цитокератины (клоны AE1/AE3 и MNF 116, Dako) – антитела с широкой специфичностью к различным эпителиям, они могут применяться для дифференциальной диагностики рака с большинством неэпителиальных опухолей. Антитела к общему цитокератину можно использовать для выявления микрометастазов или разбросанных опухолевых клеток в лимфатических узлах и костном мозге, инфильтрирующего роста при раках желудка и молочной железы.

Преимущественная экспрессия цитокератинов многослойного плоского эпителия высокого молекулярного веса, таких как СК5 и СК13, в опухолях характеризует плоскоклеточную дифференцировку и помогает выявить *слабо дифференцированные плоскоклеточные опухоли*. СК8, СК18 и СК19 могут экспрессироваться как в аденокарциномах, так и в плоскоклеточных раках, в таких случаях наличие СК5 и отсутствие экспрессии СК7 позволяет *предположить плоскоклеточный рак*.

Из *внутримозговых опухолей* цитокератины экспрессируют: папилломы хориодного сплетения и злокачественные папилломы хориодного сплетения, некоторые менингиомы, в то время как глиомы и низкодифференцированные нейроэктодермальные опухоли СК-негативны.

Антитела к плоскоклеточному эпителию СК5 выявляют базальные эпителиальные и миоэпителиальные клетки и таким образом могут помочь в *выявлении инвазии при раке предстательной и молочной желез*.

Для переходноклеточного рака мочевого пузыря экспрессия СК13 и СК20 является хорошим прогностическим признаком. Начало экспрессии СК14 в переходноклеточном раке свидетельствует о плоскоклеточной дифференцировке и неблагоприятном прогнозе. В папиллярных уротелиальных опухолях нормальный (поверхностный) тип экспрессии СК20 характерен для нерецидивирующих опухолей и может быть использован для дифференциальной диагностики между инвазивными и неинвазивными опухолями.

Экспрессия СК7 без коэкспрессии СК20 характерна для аденокарциномы легких, молочной железы, эндометрия и щитовидной железы, а также для немуцинозной аденокарциномы яичников и злокачественной мезотелиомы.

Типичным антигенным паттерном для рака толстого кишечника является экспрессия цитокератинов, характерных для эпителия тонкого кишечника, СК20 и отсутствие экспрессии СК7.

Экспрессия СК7 и СК20 характерна для переходноклеточного рака мочевого пузыря, муцинозного рака яичников и аденокарцином желудка, желчных путей и поджелудочной железы.

В свою очередь, гепатоцеллюлярный рак, рак предстательной железы, почечноклеточный рак и мелкоклеточный рак легких не экспрессируют СК7 и СК20.

С.В. Петров, Н.Т. Райхлин (2000) на первом этапе, при диагностике анапластических опухолей, предлагают использовать 4 типа антител – к виментину, цитокератинам (СК-Pan), белку S-100 (представляющему семейство Ca^{2+}-связывающих белков, которые обнаружены в клетках различных тканей) и общему лейкоцитарному антигену. Если ИГХ реакция будет везде положительной или везде отрицательной – это расценивается как артефакт. Если положительная реакция отмечается только на виментин, то ставится диагноз саркома (либо семинома). При положительной реакции на виментин и белок S-100, эта опухоль оценивается как липосаркома или меланома. Если положительная окраска на виментин сочетается с реакцией на общий лейкоцитарный антиген – и в редких случаях низкомолекулярные цитокератины, то предполагается наличие лимфомы. При положительной реакции на цитокератины и в виде исключения на белок S-100 – виментин, можно думать о низкодифференцированном раке, гермиоме и о других опухолях.

На втором этапе удается разделить цитокератин-позитивные низкодифференцированные опухоли на переходноклеточные, плоскоклеточные, нейроэндокринные раки, аденокарциномы и мезотелиому.

Если положительная реакция на цитокератины, характерные для плоского эпителия (СК5, СК13), сочеталась с положительной реакцией на цитокератины однослойного эпителия (СК8, СК18, СК19, СК7), то это – переходноклеточный рак или некоторые протоковые аденокарциномы. Если иммунофенотип опухоли был СК5 и СК14 (+), а СК8, СК18 (-), то это – плоскоклеточный рак.

При положительной реакции на широкий спектр цитокератинов и виментина, это – мезателиома либо синовиальная или эпителиоидная саркома, либо некоторые раки щитовидной железы, почки и другие редкие раки.

В случае коэкспрессии CK8, CK7, CK18 с общим лейкоцитарным антигеном предполагается анапластическая крупноклеточная лимфома, диагноз которой уточняется с помощью антител к CD-30, антигену ALCL.

Если положительная реакция на CK8, CK18, CK19 и CK7 сочеталась с отрицательной реакцией на CK5, CK6, CK14, CK16 и CK17, то эта опухоль являлась аденокарциномой, которая в дальнейшем тестировалась на раковоэмбриональный антиген (РЭА). Выраженная реакция на РЭА свидетельствует о раке толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, желчных протоков. Слабая реакция на РЭА наблюдается при раке мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, легкого (при плоскоклеточном крупноклеточном варианте). Отрицательная реакция на РЭА наблюдается в клетках аденокарциномы простаты, почки, печени, яичников, щитовидной железы, эндокриноклеточных раковых опухолях.

Третий этап имеет цель определить органную локализацию анапластической опухоли с иммунофенотипом РЭА (+), CK8, CK18, CK19, CK7 (+) и проводится с помощью органоспецифических маркеров.

При раке простаты выявляется специфический антиген простаты (PSA) и щелочная фосфатаза, специфичная для простаты (PAP), при раке щитовидной железы – тиреоглобулин, в клетках печеночноклеточного рака – альфафетопротеин, рака яичника – CA-125, хориоэпителиомы – хорионический гонадотропин. Клетки эндокринных раков экспрессируют нейрон-специфическую энолазу (NSE), хромогранин и др. Положительные на виментин и отрицательные на общий цитокератин (CK-Pan) мягкотканые опухоли являются новообразованиями мезенхимальной природы (лимфомы, саркомы), некоторыми нейрогенными опухолями, либо меланомами.

Анапластические опухоли, дающие окраску на виментин подразделяются на лимфомы (Т- и В-клеточные), меланому (положительная реакция с белком S-100), миогенные саркомы (позитивные реакции на гладкомышечный актин, десмин, миоглобин), ангиосаркомы (реагирующие с антителами к фактору VIII свертывания крови, CD31), злокачественную фиброзную гистиоцитому (экс-

прессирует альфа-1-антитрипсин, CD68, лизоцим, альфа-1-антихимотрипсин, иногда белок S-100), фибросаркому, реагирует с виментином и CD34).

Тема № 5. Рецепторные белки в неизмененных и опухолевых клетках

Первыми клеточными маркерами, исследование которых стало использоваться в практической медицине, были *рецепторы к стероидным гормонам* – эстрогенам (РЭ) и прогестерону (РП). Их изучение проводилось у больных раком молочной железы и результаты учитывались при назначении терапии.

Рецепторы стероидных гормонов представляют собой белки, специфически и избирательно связывающие соответствующие стероиды, после их проникновения в клетку и опосредующие их биологические эффекты. Присутствие РЭ в первичной опухоли молочной железы свидетельствует о ее потенциальной чувствительности к лечебным мероприятиям, направленным на противодействие эффектам эстрогенов. Считается, что наличие в опухоли рецепторов к эстрогенам (РЭ) и рецепторов к прогестерону (РП) свидетельствует о ее чувствительности к экзогенным гормонам и является прогностически благоприятным фактором. РП синтезируются в клетке под влиянием эстрогенов и, следовательно, являются показателем функциональной активности РЭ.

Содержание рецепторов эстрогена и прогестерона всегда выше в высокодифференцированных опухолях, а также у больных, находящихся в постменопаузе, по сравнению с женщинами репродуктивного и пременопаузального возраста. Известно, что при отсутствии гормонорецепторов в опухоли прогноз менее благоприятен и риск возникновения рецидивов выше. Показано, что в рецептор-негативных опухолях пролиферация опухолевых клеток в 10 раз активнее. В рецептор-положительных опухолях эстрогены тоже стимулируют процессы пролиферации, однако они не достигают уровня, свойственного рецептор-негативным опухолям.

Известно, что гормонозависимые опухоли молочной железы, содержащие оба или хотя бы один из рецепторов, имеют более благоприятное течение и лучший прогноз, независимо от проводимого адъювантного лечения, чем больные с рецептор-отрицательными опухолями. В.Ф. Семиглазов с соавт. (2001) установили, что опухоли, содержащие более 10% окрашенных на рецепторы к эстрогенам или прогестерону клеток, оказываются чувствительными к гормонотерапии. Больные, у которых опухоль не содержит рецепторов к стероидным гормонам, только в 5-10% случаев отвечают на гормональную терапию. У этих пациентов можно получить более выраженный лечебный эффект от цитостатической терапии.

Прогностическое значение рецепторного статуса опухоли отражает влияние эстрогенов на характер и течение заболевания. Известно, что РЭ(+)-опухоли обладают меньшей склонностью к прогрессированию, чем РЭ(-)-опухоли, но этот факт отчетливо проявляется лишь в первые годы наблюдения и заметно сглаживается к 10-летнему сроку.

Определение рецепторов к стероидным гормонам также важно для выбора тактики лечения и оценки эффективности проводимой гормонотерапии. Чувствительность опухоли к гормонам определяется сохранением в опухоли рецепторов, способных воспринять гормональный сигнал и транслоцировать его в ядро. Есть сведения о существовании различных форм рецепторов к эстрогенам и прогестерону: РЭ-альфа, РЭ-бета, РП-А и РП-В. Оба вида РЭ обладают практически одинаковым сродством к эстрадиолу. С присутствием РЭ-альфа в опухолях молочной железы связана чувствительность к тамоксифену. Рецепторы прогестерона, представленные изоформами А и В, играют различные роли в проникновении стероидов внутрь клетки.

При наличии в опухоли рецепторов двух видов (РЭ и РП) эффективность метода гормонотерапии составляет 50–70%. Если присутствуют только рецепторы одного вида (РЭ или РП), то эффективность снижается до 33–39%.

Половые гормоны играют важную роль и в этиологии рака предстательной железы (ПЖ). Функциональная активность предстательной железы взрос-

лого мужчины зависит от уровня тестостерона в крови. Андрогены необходимы для нормального роста и функциональной активности ПЖ человека. Андрогены, действуя через андрогеновые рецепторы (АР), играют важную роль в развитии рака предстательной железы (РПЖ). Существуют доказательства, что усиленная трансактивационная активность АР может быть связана с риском развития РПЖ. Андрогены выступают как опухолевые промоторы через АР-связанный механизм, который ведет к усилению клеточной пролиферации и уменьшению апоптоза.

Клиническая стадия заболевания, степень анапластических изменений опухолевых клеток, объем опухоли и уровень ПСА в сыворотке крови являются традиционными маркерами, позволяющими судить о прогрессии РПЖ. Однако они не всегда информативны и не дают надежной оценки эффективности лечения у конкретного пациента. В течение последних лет интенсивно изучаются молекулярные маркеры, участвующие в генетических процессах онкогенеза при РПЖ: мутации, амплификации или другие повреждения соответствующих генов или экспрессия их белков. Поскольку андрогены действуют через АР, уровень их экспрессии при первичном РПЖ может иметь прогностическое значение при назначении гормональной терапии.

В нормальной ПЖ взрослого человека белок АР экспрессируется в основном в ядрах эпителия и стромальных клетках. Имеются иммуногистохимические работы по изучению АР при ДГПЖ и РПЖ, в большинстве из них выявлена ядерная экспрессия АР. АР экспрессировались во всех первичных опухолях и метастазах в лимфатические узлы и кости. В РПЖ окрашивание клеток на АР является гетерогенным со значительным снижением АР-позитивных клеток в менее дифференцированных опухолях, что свидетельствует об их невысокой чувствительности к антиандрогеновой терапии.

Обнаружено, что иммуногистохимическое определение экспрессии АР является надежным показателем для прогноза эффективности антиандрогеновой терапии, поскольку экспрессия АР значительно ниже при РПЖ по сравнению с неопухолевой тканью. Многофакторный анализ выявил достоверную

корреляцию между прогрессией и уровнем АР и пролиферативной активностью клеток.

В настоящее время доказано, что развитие РПЖ зависит от уровня андрогенов в организме, однако опухоли нередко прогрессируют до андроген-независимых, и это приводит к низкой эффективности гормональной антиандрогеновой терапии и последующей смерти пациентов. В связи с этим фактом ИГХ окрашивание опухолей ПЖ на андрогеновые рецепторы может быть полезным индикатором течения заболевания, подобно тому, как изучаются рецепторы к эстрогенам при раке молочной железы. В настоящее время показано, что андроген-независимость первичной опухоли ПЖ является достоверным признаком плохого прогноза у пациентов. Можно ожидать, что потеря опухолевыми клетками экспрессии АР будет сопровождаться потерей регуляции со стороны андрогенной сигнальной системы и развитием резистентности к антиандрогеновой терапии.

Рецепторы факторов роста. Рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР) – это трансмембранный гликопротеин, после активации которого под действием внутриклеточных тирозиновых киназ происходит деление клетки. Он экспрессируется при раке желудка, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря и многих других эпителиальных опухолях. Количественные исследования показали, что экспрессия РЭФР в опухолевых клетках более выражена, чем в неизмененном эпителии. При раке желудка экспрессия РЭФР пропорциональна глубине инвазии и характеризует низкую выживаемость пациентов. В нормальном уротелии эти рецепторы располагаются вдоль базальной мембраны, тогда как при переходноклеточном раке определяются во всех его слоях. При этом установлено, что обнаружение РЭФР при раке мочевого пузыря является прогностически неблагоприятным признаком, в связи с тем, что наличие этого маркера связано со стадией, степенью дифференцировки и плоидностью опухолевых клеток.

Четыре сходных по структуре трансмембранных рецептора РЭФР (ErbB-1), HER-2/neu (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3), HER-4 (ErbB-4), принадлежащих к се-

мейству тирозинкиназных рецепторов (продуктов онкогенов C-erbB), представляют одну из важнейших систем передачи митотического сигнала.

Рецепторы семейства ErbB могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, при этом во многих случаях наиболее активными являются гетероструктуры с участками не имеющего собственного лиганда рецептора HER-2/neu. Этот рецептор – уникальный представитель семейства трансмембранных тирозинкиназ, поскольку не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активизирующих родственные рецепторы, является ключевым звеном передачи митотических сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для усиленного функционирования всей системы. Перспектива практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста рака молочной железы появилась после внедрения препарата герцептина, представляющего собой гуманизированные антитела к HER-2/neu, как одному из рецепторов семейства ErbB, к которому принадлежит и РЭФР.

Эффективность применения препарата герцептин во многом зависит от выраженности окрашивания опухолевых тканей на белок HER-2/neu, таким образом, можно существенно замедлить или остановить рост опухолей.

Относительно прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации гена C-erbB-2 (HER-2/neu) единого мнения не существует.

A. Hamilton и M. Piccart (2000) отмечают положительную корреляцию между экспрессией HER-2/neu и развитием рецидивов у больных РМЖ. Опухоли с амплифицированным геном *her-2/neu* слабо реагировали на эндокринную терапию, но были чувствительны к последующей химиотерапии. По мнению приведенных авторов, больным с HER-2/neu-положительными опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы химиотерапии, чем больным с опухолями, не имеющими повышенной экспрессии этого онкогена.

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) и его рецепторы (РЭФР), а также трансформирующий фактор роста альфа (ТФРА) и его рецепторы выявлены P. De Miguel с соавт. (1999) в неизмененной, гиперплазированной и неоплазиро-

ванной ткани предстательной железы человека. ТФРА стимулирует пролиферативную активность эпителиальных клеток предстательной железы. В нормальной простате ЭФР, ТФРА и рецепторы распределяются только в базальном клеточном слое. При ДГП ростовые факторы кроме базального, выявляются и в клетках секреторного эпителия, а рецепторы – только в базальном эпителиальном слое. В аденокарциномах простаты ЭФР, ТФРА и рецепторы выявлялись как в базальном слое желез, так и в клетках секреторного эпителия.

Трансформирующий фактор роста бета- (ТФРБ) обладает функциями торможения и стимуляции пролиферативной активности культуры эпителиальных клеток. В небольших концентрациях этот фактор обладает митогенными свойствами, а в больших концентрациях подавляет клеточный рост. В работе M. Royuela с соавт. (1998) были проведены полуколичественные сравнительные иммуногистохимические исследования распределения ТФРБ и его рецепторов в нормальной предстательной железе, а также при ДГП и формировании аденокарциномы. Было показано, что в неизменной простате распределение ТФРБ и его рецепторов ограничивается базальным слоем железистого эпителия. При ДГП, кроме базального слоя, очаги положительной иммунореактивности к ТФРБ и его рецепторам выявлялись и среди секреторных клеток цилиндрического эпителия, а в случае выявления аденокарциномы простаты, интенсивное диаминобензидиновое окрашивание отмечалось во всех анапластических клетках желез.

Таким образом, достижения в области молекулярной биологии последних лет позволили клиницистам использовать промежуточные филаменты, рецепторы стероидных и пептидных гормонов, различные факторы роста и их рецепторы в качестве прогностических факторов опухолей различной локализации и в выборе их адекватной терапии.

Тема № 6. Белки – маркеры клеточного цикла

В основе развития раковых опухолей лежит пролиферация клеток, которая приводит к увеличению числа анапластических элементов.

Цикл деления или пролиферации клеток можно разделить на две основные «сверочные точки» (checkpoints) S и M и две подготовительные точки – G_1 и G_2. Патология в одной или нескольких этих фазах, контролирующих клеточный цикл, лежит в основе формирования злокачественных опухолей и их прогрессирования в инвазивные формы. S точка определяется как момент репликации ДНК. Полностью дублированные хромосомы разделяются в ядра каждой из 2 дочерних клеток во время митоза в точку M. Во время G_1 и G_2 фаз происходит синтез клеточных белков, необходимых для осуществления соответствующей фазы клеточного деления.

Универсальным маркером для оценки клеточного цикла является белок Ki-67, по экспрессии которого можно исследовать пролиферативную активность клеток. Антитела к Ki-67 выявляют пролиферирующие клетки, находящиеся в разных фазах цикла. Это наиболее надежный и четкий маркер пролиферации. Антиген Ki-67, выявляемый соответствующими моноклональными антителами, представляет собой короткоживущий протеин, он разрушается в течение 1,5-2 часов. Поэтому, антитела к Ki-67 выявляют только делящиеся клетки, так как Ki-67 не успевает накапливаться и не остается в покоящихся клетках (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2000).

Ki-67 представлен двумя различными формами с молекулярной массой 320 kD и 359 kD. Кодирующий их ген локализуется в 10 хромосоме и состоит из 15 экзонов. Белок Ki-67 в основном связан с хромосомами, выявляется в области теломер, центромер, в ядрышках. Он очень лабилен в присутствии протеаз, это затрудняет его изучение и поэтому связь с белками, регулирующими клеточный цикл, мало изучена и четко не определена. Однако показано, что микроинъекции антител к Ki-67 приводят к снижению пролиферативной активности клеток. В точке G_0 клеточного цикла белок не выявляется, также как и в начале G_1-фазы первого клеточного цикла. Появление Ki-67 происходит в конце фазы G_1, его уровень постепенно нарастает на протяжении S-фазы и достигает максимума к митозу. Ki-67 является надежным индикатором пролиферации практически во всех опухолевых образованиях человека.

Прохождение основных точек клеточного цикла требует активирования внутриклеточных ферментов, известных как циклин-зависимые киназы (Cdk), для активности которых требуется присутствие активаторной субъединицы – циклина. Таким образом, каждая из Cdk не может активироваться пока для неё не будет синтезирован специфический циклин. Экспрессия каждого из циклинов и Cdk изменяется в определенные фазы клеточного цикла. Переход клетки из точки G_0 в G_1 характеризуется образованием комплексов циклинов D (D1-D3) в зависимости от типа клеток с Cdk4 или Cdk6. Переход из G_1 в S связан с образованием комплексов циклина E с Cdk2. Вход в митоз обусловлен образованием комплексов циклина B с Cdc2 и т.д. Другими участниками регуляции клеточного цикла является наличие белков, известных как ингибиторы циклин-зависимых киназ – CKI, которые могут блокировать процессы активирования различных киназ. Имеются два класса ингибиторов Cdk. Один класс тормозит несколько Cdk и включает p21CIP4, p27KIP1 и p57KIP2. Другие ингибиторы Cdk являются специфичными и тормозят эффект отдельных комплексов циклинов с соответствующими Cdk-комплеком циклин D/Cdk4 (или Cdk6) и включают p16INK4, p15INK4B, p18INK4C и p19INK4D.

Выход покоящейся клетки из точки G_0 и вступление её в митотический цикл инициируется различными внешними стимулами – цитокинами, принадлежащими к группе факторов роста. Связывание рецепторов со своими лигандами – ростовыми факторами и белками внеклеточного матрикса (фибронектином, коллагеном) индуцирует аутофосфорелирование ферментных систем рецепторов и последующее их взаимодействие с сигнальными белками. В результате этого происходит активация киназных каскадов – MAP (Mitogen Activated Proteins). Конечные продукты этих каскадов – серин-треониновые киназы ERK1/2, JNK и p38 – переходят из цитоплазмы в ядро, где они активируют Cdk и индуцируют переход клетки в точку S.

Торможение клеточного цикла основано на активации CKI семейств Ink4 и Cip/Kip, что приводит к остановке клеточного цикла в определенных его точках G_1, S, G_2 и M. Синтез, активирование и разрушение подобных CKI регули-

руется в ответ на митогенные и амитогенные сигналы. Так, регуляция клеточного цикла под действием трансформирующего фактора роста (TGF-ß) осуществляется ингибитором Cdk – p27KIP1.

Патологические изменения в механизмах регулирования клеточного цикла достаточно подробно описаны при развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии. Вирус папилломы человека высокого риска вызывает экспрессию вирусного онкогена в реплицирующихся стволовых клетках. На этом этапе продукты генов E6-E7 перехватывают контроль клеточного цикла и митотической активности и в дальнейшем индуцируют многоступенчатый мутагенез с тяжелой геномной нестабильностью. Детальный молекулярный анализ этой активности позволил выделить биомаркеры неопластических клеток шейки матки. Выраженная гиперэкспрессия ингибитора циклинзависимой киназы p16INK4a регулярно наблюдается в злокачественных поражениях, вызванных вирусом человеческой папиломы высокого риска и свидетельствует об активной экспрессии вирусного онкогена E7 в пораженных клетках. Морфологически эти молекулярные расстройства отражаются, в основном, в изменении ядерно-цитоплазматического соотношения, анизонуклеозе, гиперхромазии. При иммуногистохимической реакции на p16INK4a окрашиваются атипические клетки, которые легко могут быть обнаружены даже при малых увеличениях, а при больших увеличениях могут быть отдифференцированы от атрофических или метапластических клеток. В сомнительных случаях помогает дополнительное использование маркеров пролиферации, таких как Ki-67, PCNA и др. Использование новых иммуногистохимических маркеров значительно снижает частоту ложноотрицательных и ложноположительных результатов при традиционных методах диагностики рака и предрака шейки матки.

В отличие от контролируемого различными ферментными системами деления нормальных клеток, быстрая пролиферация опухолевых клеток происходит из-за нарушения регулирующих механизмов работы Cdk в клеточном цикле, в основе которых чаще всего лежит гиперэкспрессия циклина D1 за счет амплификации соответствующего гена, расположенного в хромосоме 11q13. По-

добные процессы выявлены при меланоме, раке легких, молочной железы, мочевого пузыря, пищевода и плоскоклеточном раке в области головы и шеи. Гиперэкспрессию циклина D1 в этих опухолях можно выявить иммуногистохимическим методом в большинстве ядер опухолевых клеток. Гиперэкспрессию циклина D1 за счет его транслокации в хромосомах можно также выявить в саркомах, раке толстого кишечника, В-клеточной лимфоме мантийной зоны. Циклин D1 активирует клеточный цикл от G_0 до S фазы под влиянием факторов роста, в свою очередь, независимая экспрессия циклина D1 может вызвать автономную активацию циклин D1/Cdk4 и привести к продолжительному делению клеток даже без наличия соответствующих факторов роста. Гиперэкспрессия циклинов D2 и D3 отмечается при раке толстой кишки. Мутации или делеции INK4 – ингибитора Cdk4 и Cdk6 выявлены при наследственных формах меланомы, раках пищевода, поджелудочной железы, легких, яичников, злокачественных опухолях головы и шеи.

Ключевым регулятором G_1/S фаз клеточного цикла является и ген *rb* (ретинобластомы). Белок pRb представляет собой фосфобелок с молекулярной массой 105кД, локализующийся в ядре и экспрессирующийся в большинстве типов клеток. Он дефосфорилирован в неделящихся клетках, а также в пролиферирующих клетках, находящихся в начале точки G1 клеточного цикла. В таком состоянии pRb образует комплексы с рядом белков, в том числе с белками, вызывающими ремоделирование хроматина (гистоновые деацетилазы HDAC, комплексы SWI-SNF) и транскрипционными факторами семейства E2F, регулирующими активность генов, продукты которых необходимы для начала и прохождения S-фазы.

Белок pRb играет ключевую роль в контроле последовательности событий, обеспечивающих переход клетки из G0/G1 в S фазу и ее успешное завершение. При мутациях обоих аллелей гена *rb*, вызывающих отсутствие в клетке белка pRb или экспрессию его функционально неактивной формы, транскрипционный фактор E2F находится в перманентно активированном состоянии. Это увеличивает вероятность появления постоянно пролиферирующих клонов кле-

ток, в которых будут накапливаться и другие онкогенные мутации, ведущие к злокачественной трансформации. С патологией *rb* гена связывают возникновение ретинобластомы, мутации этого гена наблюдаются при остеосаркоме и саркомах мягких тканей, раке молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, почек, печени, поджелудочной железы, шейки матки, легких и при лейкозах.

Другой важный ингибитор Cdk в фазах G_1/S и G_2/M клеточного цикла представлен геном p53, этот опухолевый супрессорный ген наиболее часто подвергается мутации при раках.

Основная транскрипционная мишень p53 в системе контроля клеточного цикла – белок $p21^{Waf1}$. Повышение экспрессии $p21^{Waf1/Cip1}$ в ответ на гиперэкспрессию p53 и повреждение ДНК вызывает остановку клеточного цикла в поздней G1 фазе. $P21^{Waf1/Cip1}$ связывается с комплексами [циклин E/Cdc2], тем самым подавляя их способность фосфорилировать белки, активность которых необходима для входа клеток в S фазу. Идентифицирован также ряд генов-мишеней p53, продукты которых вызывают остановку в фазе G2. Задержка в ней наблюдается в случае, когда p53 активировался уже после того, как клетка прошла G1 фазу (Копнин Б.П., 2001). Активированный p53 подавляет функцию комплекса [циклин B/Cdc2]. Во-первых, он трансактивирует ген 14-3-3σ, белковый продукт которого связывает и транспортирует комплексы циклин B/Cdc2 в цитоплазму. Во-вторых, p53 трансактивирует ген GADD45, белковый продукт которого обладает способностью связывать Cdc2, разрушая, таким образом, комплексы циклин B/Cdc2. В-третьих, p53 репрессирует транскрипцию генов циклина B и Cdc2, что уменьшает синтез их продуктов.

Одной из функций p53 является остановка клеточного цикла после повреждения генома в точке G_1, это позволяет клетке восстановить целостность поврежденной ДНК до её репликации и деления клетки, если восстановить ДНК не удается, то p53 запускает в клетке механизм апоптоза. Потеря функции p53 снижает стабильность генов, что, в свою очередь, может привести к акти-

вированию дополнительных мутаций, приводящих к неопластической трансформации клеток.

В последнее время для определения пролиферативной активности клеток используют молекулярный маркер MCM2 (Mini Chromosome Maintenance protein 2), увеличение экспрессии которого обнаружено при цервикальной интраэпителиальной неоплазии, плоскоклеточных раках шейки матки, кожи, легких, пищевода, переходноклеточном раке мочевого пузыря, аденокарциномах эндометрия и простаты, муцинозной аденокарциноме яичников, почечноклеточном раке, лимфомах, олигодендроглиоме. Величина экспрессии MCM2 коррелирует со степенью дифференцировки опухолей. Индекс метки MCM2 повышен в эпителии полости рта при его дисплазии и является надежным маркером пролиферации клеток. Многие авторы рекомендуют использовать MCM2 в качестве маркера пролиферативной активности клеток наряду с Ki-67 и циклином D1.

MCM2 – белок из семейства MCM (MCM2-7), был обнаружен в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* как фактор, необходимый для поддержания целостности и стабильности минихромосом. В ранней G1-фазе клеточного цикла на молекуле ДНК происходит сборка молекулы ORC (origin recognition complex – комплекс, распознающий точки начала репликации), Cdc6 (cell division cycle protein 6 – белок регулятор клеточного цикла 6) и MCM в предрепликационный комплекс, что делает ДНК готовой к репликации («лицензирование» репликации). Сборка предрепликационного комплекса – необходимое условие начальной стадии репликации ДНК, без которого невозможно деление клетки.

Ген *mdm2* кодирует белок, который связывает белок P53 и приводит к последующему его разрушению. Большое количество белка MDM2 в клетке приводит к инактивации P53. Гиперэкспрессия этого белка, вызванная амплификацией соответствующего гена, выявляется при различных саркомах.

Пролиферация опухолевых клеток связана с вовлечением тех же механизмов, что и у нормальных клеток, основные изменения наблюдаются при прохождении ключевых точек клеточного цикла. Несмотря на выявление большого количества протоонкогенов и опухолевых супрессоров, вовлеченных

в трансдукцию сигналов и нарушения пролиферативных механизмов в ключевых точках клеточного цикла, развитие онкопатологии связано с нарушением системы pRb и p53. Именно мутации этих двух генов наблюдаются в большинстве опухолевых клеток человека, и нарушения Rb и p53 сигнальных путей являются необходимыми для появления постоянно пролиферирующих неопластических клеток.

Таким образом, иммуногистохимические исследования клеточных маркеров пролиферативных процессов при злокачественных опухолях помогают поставить диагноз неоплазии и определить прогноз онкологического заболевания.

Тема № 7. Факторы апоптоза и пролиферации

Изменения в генетическом аппарате опухолей связаны с их генетически запрограммированной клеточной гибелью, обозначаемой термином «апоптоз» (Kerr J.F.R. et al., 1972). Программированная клеточная смерть может быть разделена на три фазы: активация сигнала – индукция апоптоза, регуляция и выполнение (эффекторная фаза), структурное клеточное повреждение.

Активация сигнала

Существует широкий диапазон внутренних и внешних стимулов, способных запустить апоптоз: гормоны, цитокины, повреждение ДНК, недостаток ростовых факторов, повышенная экспрессия генов опухолевых супрессоров, факторы гибели, продуцируемые соседними клетками, фармакологические препараты и т.д.

Факторы, способные повреждать ДНК, такие как облучение, цитостатические или генотоксические воздействия также могут запускать апоптоз. Изменения ДНК обнаруживает транскрипторный фактор p53, он блокирует клеточный цикл в фазах G1 и G2 до репликации ДНК и митоза, соответственно, делает возможной репарацию поврежденной ДНК и предотвращает появление мутаций в клетках. Если активность репарационных систем недостаточна и по-

вреждения ДНК сохраняются, то p53 запускает апоптоз, стимулируя транскрипцию некоторых проапоптозных генов, включая bax и fas, что приводит к защите организма от клеток, способных к злокачественной трансформации.

Опухолевый супрессор p53 координирует все основные процессы поддержания стабильности генома, являясь центральным компонентом системы контроля повреждений в клетке. В этом качестве p53 регулирует экспрессию более десяти белков, ответственных за активацию различных супрессорных систем. Среди них – индукторы апоптоза, регуляторы клеточного цикла, секретируемые ингибиторы роста и ангиогенеза. Невыясненной остается функция еще множества генов, для которых p53 также является фактором транскрипции.

В обычных («нестрессовых») условиях практически весь p53 инактивируется протоонкогеном Mdm2. При возникновении повреждений ДНК белки семейства PI3K фосфорилируют p53 по Ser-15. В результате конформация N-концевого участка p53 меняется таким образом, что он теряет способность связываться с Mdm2. Таким образом, p53 стабилизируется в ядре и приобретает способность связывать базовые транскрипционные факторы.

Число p53-регулируемых генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, невелико, в отличие от огромного и до сих пор растущего числа потенциальных медиаторов p53-зависимого апоптоза. Такое многообразие объясняется тем, что в клетках разных тканей, а также в клетках, находящихся в различных физиологических условиях, могут реализоваться альтернативные программы p53-зависимого апоптоза. При этом p53 контролирует синтез двух основных путей индукции апоптоза: митохондриального и стимулируемого «рецепторами смерти».

Регуляция и выполнение (эффекторная фаза)

Морфологические изменения, которые наблюдали J.F.R. Kerr с соавт. (1972) в апоптотических клетках, являются результатом расщепления белков цитоскелета и ядерной оболочки каспазами (цистеиновыми протеазами). В клетке каспазы синтезируются в форме латентных предшественников – про-

ферментов, называемых прокаспазами. По выполняемой каспазами функции их можно разделить на две основные группы: инициаторные каспазы (8, 9 и 10) и эффекторные каспазы (3, 6 и 7). На этапе активации инициирующих прокаспаз жизнь клетки еще можно сохранить. Существуют регуляторы, которые блокируют или, напротив, усиливают разрушительное действие инициирующих каспаз. К ним относятся антиапоптозный белок BCL-2 и проапоптозный белок BAX. После того, как каспазы из первой группы активируют эффекторные каспазы, процесс, запущенный «программой смерти», оказывается необратимым. Активация инициирующих прокаспаз может происходить в ответ на действие лигандов через клеточные рецепторы (внешний апоптотический путь) или в ответ на сигналы из самой клетки (внутренний апоптотический путь).

Внешняя апоптотическая передача сигналов происходит путем активации так называемых «рецепторов смерти», которые представлены рецепторами на поверхности клеток и передают апоптотический сигнал после взаимодействия с определенными лигандами. Рецепторы смерти принадлежат к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), включающих Fas/CD95, TNFR-1 и TRAIL рецепторы. Все члены TNFR семейства состоят из внеклеточных субдоменов, с помощью которых они и распознают свои лиганды.

Внутренняя апоптотическая передача сигнала происходит путем образования в митохондриальных мембранах мегаканалов, так называемых «гигантских пор». В результате открытия этих пор из митохондрии выходят апоптогенные факторы, которые и запускают механизмы, приводящие к апоптозу. Комплекс BCL-2 взаимодействует с гигантской порой и это взаимодействие является важнейшим звеном регуляции проницаемости митохондрии.

Bcl-2 семейство

Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) гены локализованы на 18 хромосоме и играют важную роль в определении, будет ли клетка необратимо подвержена апоптозу. Известно, что Bcl-2 – только один член этого семейства, состоящего из многочисленных белков, гомологов Bcl-2. Другие члены bcl-2 семейства ге-

нов, вероятно, играют важную роль в регулировании апоптоза при помощи механизмов, которые являются противоположными или комплиментарными действию Bcl-2. Члены данного семейства взаимодействуют через гомодимерные или гетеродимерные ассоциации так, что восприимчивость клеток к потенциальному апоптотическому стимулу может быть определена степенью проапоптотических и антиапоптотических воздействий представителей этой группы белков, находящихся в клетке в данное время.

Проапоптозный белок Bax является членом Bcl-2 семейства. Он увеличивает восприимчивость клеток к клеточной смерти, возможно, противодействуя эффекту антиапоптозного белка Bcl-2 на клеточное выживание путем гетеродимерного взаимодействия. Белки Bcl-2 и Bax формируют гомодимеры либо гетородимеры. Bax-Bax гомодимеры индуцируют апоптоз, гетеродимеры Bcl-2-Bax препятствуют процессам апоптоза как в нормальных, так и в патологических тканях.

Другой член этого семейства генов, bcl-x, представляет интересный пример одиночного гена, который через альтернативные связанные механизмы кодирует положительную и отрицательную регуляцию апоптоза. Длинная форма Bcl-X - Bcl-X_{long} состоит из 233 аминокислот с двумя гомологичными доменами к Bcl-2, тогда как Bcl-X_{short} (170 аминокислот) – усеченная форма Bcl-X_{long}, в которой участок высоко гомологичный Bcl-2 удален. Эти две формы Bcl-X имеют противоположное действие, в котором Bcl-X_{long} придает клеткам устойчивость к апоптозу, тогда как Bcl-X_{short} противодействует сопротивлению к апоптотической клеточной смерти, обеспечиваемой Bcl-2.

В норме ген p53 функционирует как «молекулярный полицейский», осуществляющий защиту генома. Нарушения процессов апоптоза наступают в том случае, если ген p53 теряет свои функции. Это может произойти в условиях патологии, когда в результате мутации гена p53 образуется его мутантный аналог – mt p53. Мутация p53 приводит к нарушению внутриклеточных механизмов регуляции клеточного цикла и не дает реализоваться апоптозу, чем способствует опухолевому росту.

Белок P53 постоянно синтезируется в клетках, но является короткоживущим белком. Мутации гена p53 ведут к «сверхэкспрессии» этого белка, которые иммуногистохимическим путем выявляются с помощью анти-P53 антител. Мутированный ген p53 является ранним маркером процессов малигнизации и опухолевой прогрессии. Во многих типах опухолей человека обнаружена корреляция между увеличением экспрессии mt p53 и нарастанием морфологической атипии и степени злокачественности. Для иммуногистохимического выявления P53 широко используются моноклональные антитела. В методическом плане следует подчеркнуть, что дикий тип P53 – короткоживущий протеин, его период полураспада не превышает 20 минут, поэтому в клетке его очень мало (не больше нескольких тысяч молекул в одной клетке) и его содержание практически может быть ниже чувствительности иммуногистохимических методов. Мутантный тип P53, напротив, долгоживущий протеин, его период полураспада длится до 24 часов, и он успевает накапливаться в количествах, вполне достаточных для иммуногистохимической идентификации. Считается, что иммуногистохимическая положительная реакция полностью зависит от наличия мутантного типа P53 (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2000).

Несмотря на обилие методов выявления апоптоза, данные относительно его развития в клетках неоднозначны, основные противоречия связаны с особенностями методических приемов при изучении программированной клеточной гибели. Для разрешения описанных выше недостатков методов И.И. Бабиченко с соавт. (2002) предложили новый подход к изучению апоптоза, позволяющий оценивать его с принципиально новых позиций, т.е. оценивать его признаки до развития фрагментации ядер.

Для оценки апоптоза был использован новый фактор дифференцировки клеток HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor), который первоначально был выделен из среды культивирования промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, обработанных полностью-транс-ретиноевой кислотой. Данный фактор представляет собой небольшой гликозилированный белок с молекулярной мас-

сой 8.2 кДа, индуцирующий дифференцировку исходных активно пролиферирующих клеток HL-60 по гранулоцитарному пути (Костанян И.А. и др., 1994).

HLDF играет важную роль в процессе апоптоза, поскольку как сам фактор HLDF, так и его ДНК-гидролизующий фрагмент, принимают участие в процессах запрограммированной гибели клеток. Скорее всего, зрелый фактор дифференцировки (и его предшественник) непосредственно участвуют во фрагментации ДНК в клетках миелоидного ряда с запущенным процессом программированной гибели. Направления развития метаболизма – апоптоз, или дифференцировка – зависят от физиологического состояния клетки. Были получены поликлональные антитела против фактора дифференцировки HLDF. Специфичность связывания антител подтверждалась иммуноблоттингом с синтезированным пептидом HLDF. Иммуногистохимическое окрашивание клеток HL-60 с помощью поликлональных антител против HLDF показало, что только в дифференцированных под воздействием ретиноевой кислоты или введенных в апоптоз обработкой церамидом C2-Cer (N-ацетил сфингозин) в течение суток клетках, наблюдается специфическое точечное окрашивание ядер и цитоплазматической мембраны. При этом более интенсивное окрашивание наблюдается в апоптотических клетках.

Результаты иммуногистохимических исследований позволяют сделать заключение, что фактор HLDF может быть использован в качестве маркера апоптоза. Гиперэкспрессия этого фактора в цитоплазме клеток, содержащих ядра, позволяет оценивать ранние фазы развития программированной клеточной смерти, еще до формирования апоптозных телец.

Патология процесса апоптоза в клетках играет важную роль в накоплении генетических клеточных повреждений, ответственных за развитии опухолевой прогрессии. При этом опухолевые клетки получают возможность выживать без наличия экзогенных факторов роста, становятся устойчивыми к гипоксии, активизируют пролиферативные процессы, в них нарушается дифференцировка, клетки стимулируют ангиогенез, приобретают клеточную подвижность и инвазивный рост. Нарушения апоптоза активируют метастазирование, позволяя

отдельным эпителиальным клеткам выживать вне связи с внеклеточным матриксом. Таким образом, патология апоптоза является фундаментальной причиной возникновения злокачественных опухолей.

Существуют некоторые взаимосвязи между регуляцией пролиферации клеток и апоптозом. Так, известно, что в большинстве медленно пролиферирующих опухолей, таких как хронический лимфоцитарный лейкоз, индолентные Неходжкинские лимфомы, миелома, а также раки толстого кишечника и молочной железы, наблюдается гиперэкспрессия антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-X_L. Имеются данные, что Bcl-2 и родственные ему белки обладают двумя различными функциями: они не только тормозят апоптоз, но и вхождение клетки в клеточный цикл. Замедление вхождения клетки в клеточный цикл можно связать с лучшим прогнозом у пациентов с раком молочной железы и высоким уровнем экспрессии Bcl-2. Неактивные лейкозные клетки также гиперэкспрессируют Bcl-2 и Bcl-X_L, по сравнению с активно пролиферирующими аналогами.

Таким образом, апоптоз представляет собой универсальный механизм физиологической и патологической гибели клеток. Феномен апоптоза привлек к себе внимание исследователей тем, что он расширил представление о механизмах возникновения как опухолевых, так и неопухолевых заболеваний. Если раньше считалось, что опухоли возникают только за счет неконтролируемой пролиферации клеток, то сейчас установлено, что нарастание клеточной массы может происходить также и за счет нарушения процесса гибели клеток.

Тема № 8. Белковые молекулы, характеризующие клеточную адгезию

При формировании ткани и в ходе ее функционирования важную роль играют процессы межклеточных коммуникаций – узнавание и адгезия. Узнавание – это специфическое взаимодействие клетки с другой клеткой или внекле-

точным матриксом; в результате узнавания неизбежно развивается ряд процессов, одним из которых является адгезия. Адгезия – необходимое условие поддержания тканевой структуры. Адгезией называют способность клеток избирательно прикрепляться друг к другу или к компонентам внеклеточного матрикса посредством специальных гликопротеинов – молекул адгезии. Прикрепление клеток к компонентам внеклеточного матрикса осуществляют точечные (фокальные) адгезионные контакты, а прикрепление клеток друг к другу – межклеточные контакты.

Молекулы клеточной адгезии могут способствовать инвазии опухоли и метастазированию. Пусковым механизмом прогрессирования опухоли может стать изменение межклеточных связей в её ткани, которое также играет важную роль на различных этапах метастатического каскада.

Инвазия опухоли протекает в три фазы и связана с генетическими перестройками, которые заключаются в дефектах генов, кодирующих гликопротеины клеточной адгезии. Клетки способны к перемещению только после дезинтеграции адгезионных контактов. Подобные процессы происходят при выселении злокачественных клеток из опухоли и их метастазировании, когда отдельные трансформированные клетки отделяются от опухоли, мигрируют и образуют новые опухолевые очаги (метастазы). Например, метастазы и разрастания карцином желудка, эндометрия, яичника возникают вследствие нарушения адгезии опухолевых клеток, содержащих мутантный ген Е-кадгерина, и экспрессии его дефектного продукта.

Первая фаза инвазии опухоли характеризуется ослаблением контактов между клетками, о чем свидетельствуют уменьшение количества межклеточных контактов, снижение концентрации некоторых адгезивных молекул и, наоборот, усиление экспрессии прочих, обеспечивающих мобильность опухолевых клеток и их контакт с экстрацеллюлярным матриксом. На клеточной поверхности снижается концентрация ионов кальция, что приводит к повышению отрицательного заряда опухолевых клеток. Усиливается экспрессия рецепторов, обеспечивающих прикрепление клетки к компонентам экстрацеллюлярно-

го матрикса – ламинину, фибронектину, коллагенам. Во второй фазе опухолевая клетка секретирует протеолитические ферменты и их активаторы, которые обеспечивают деградацию экстрацеллюлярного матрикса, освобождая тем самым ей путь для инвазии. В то же время продукты деградации фибронектина и ламинина являются хемоаттрактантами для опухолевых клеток, которые мигрируют в зону деградации в ходе третьей фазы инвазии, а затем процесс повторяется снова.

Особенности экспрессии и распределения молекул клеточной адгезии в ткани опухоли могут служить дополнительными критериями злокачественности при оценке прогноза заболевания. В частности, рассматриваемые ниже Е-кадгерин, катенины, CD44, матриксные металлопротеиназы – выступают в качестве маркеров инвазии и метастазирования.

Прочность адгезивных связей клеток обеспечивают Е-кадгерин, относящийся к семейству кадгеринов, и протеогликан CD44.

Кадгерины – трансмембранные гликопротеины, имеющие аминотерминальную экстрацеллюлярную часть, трансмембранный компонент и внутриклеточный домен, локализующийся в цитоплазме клеток, – являются важными элементами межклеточных связей и в системе передачи сигналов, осуществляющих контроль миграции, роста и дифференцировки клеток.

Е-кадгерин – представитель семейства классических кадгеринов, кальций-зависимая адгезивная молекула, характерная для клеток эпителиальных тканей. Длинные экстрацеллюлярные участки молекулы Е-кадгерина формируют на поверхности клеток параллельные димеры, которые при контакте с другими молекулами Е-кадгерина соседних эпителиальных клеток образуют прочные связи по типу молнии («zippers»). Цитоплазматический домен Е-кадгерина взаимодействует с цитоплазматическими протеинами: бета-катенином и гамма-катенином. Эти молекулы реагируют с альфа-катенином, который, в свою очередь, связывает кадгерин-катениновый комплекс с актиновым цитоскелетом. Эта система обеспечивает стабильные межклеточные адге-

зивные связи, а молекулы катенинов – регуляцию функции молекул Е-кадгерина.

Нарушение процессов регуляции функции молекул кадгеринов и катенинов происходит при мутации соответствующих генов. Мутантные молекулы Е-кадгерина утрачивают способность связываться с катенинами, а соответственно, и с актиновыми волокнами, в результате чего нарушается стабильность межклеточных контактов. Генетические альтерации бета-катенина нарушают взаимодействие между Е-кадгерином и альфа-катенинами и также приводят к снижению межклеточной адгезии.

Патологические изменения Е-кадгерин-связанной межклеточной адгезии ведут к опухолевой прогрессии и метастазированию. Онкогенный эффект мутаций Е-кадгерина связан с нарушениями морфогенетических свойств клетки. Кроме того, Е-кадгерин, вероятно, участвует в регуляции активности протеина клеточного цикла p53, в связи с этим можно полагать что онкогенное действие мутаций Е-кадгерина влияет на регуляцию клеточного цикла, апоптоз и контроль генетической стабильности тканей.

В настоящее время отмечена положительная корреляция между распределением Е-кадгерина и плохим прогнозом для различных опухолей. Невысокая экспрессия Е-кадгерина и катенинов в эпителиальных новообразованиях и меланомах ассоциирована с низкой дифференцировкой опухоли, локальной инвазией, вовлечением регионарных лимфоузлов и меньшей продолжительностью жизни.

Как правило, чем ниже дифференцировка опухоли, тем меньше экспрессия Е-кадгерина в ткани. Это характерно для карциномы мочевого пузыря, поджелудочной железы, гепатоцеллюлярного рака, в которых наблюдается соответственно снижение альфа-катенина и бета-катенина. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Е-кадгерину в высокодифференцированной аденокарциноме толстого кишечника, как правило, демонстрирует фокальное окрашивание опухоли, в умереннодифференцированной – с полями неоднородного

слабого окрашивания структур, в низкодифференцированной – опухолевые клетки Е-кадгерин негативные.

CD44 – трансмембранный гликопротеин, участвующий в межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействиях и обладающий свойствами рецептора гиалуроната. Существует всего 11 разновидностей CD44 – стандартная, или так называемая гемопоэтическая изоформа (CD44H или CD44s), и 10 вариантных изоформ (CD44v), которые образуются при альтернативном сплайсинге.

Молекулы CD44 играют важную роль в процессе развития опухолей и, как полагают, способствуют опухолевой прогрессии. CD44 способен стимулировать клеточную пролиферацию, миграцию и изменение дифференцировки клеток первичной опухоли. Экспрессия молекул CD44 значительно усиливается в клетках новообразований. При взаимодействии с гиалуронат-содержащими структурами, которые входят в состав многих компонентов экстрацеллюлярного матрикса: коллагена, ламинина, хондроитина сульфата, фибронектина и др. CD44 способствует передаче межклеточных сигналов, стимулирует моторную и пролиферативную активность клеток. Обладая протеазным действием, CD44 разрушает протеины экстрацеллюлярного матрикса, особенно богатого гиалуронатами, и способствует инвазии опухолевых клеток, проникновению их через базальную мембрану и сосудистые стенки в кровеносное русло.

Выраженная экспрессия CD44 отмечается не только в эпителии опухолей, но и в клетках стромы – лимфоцитах, макрофагах и в компонентах экстрацеллюлярного матрикса. Характерно, что экспрессия CD44 в строме никак не связана с его экспрессией в опухолевых клетках. Однако имеются работы, в которых отмечалась стимуляция иммунной реакции опухолевыми клетками. Известно, что CD44 также является маркером активации лимфоцитов. Стромальные элементы опухоли оказывают значительное влияние на регуляцию роста опухоли, а аномалии молекул CD44 способствуют перестройке компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Существуют работы, в которых выявлена корреляция между прогнозом развития опухоли и иммунореактивностью клеток к CD44.

Во многих опухолях человека, таких как колоректальный рак, неходжкинская лимфома, рак молочной железы и меланома, белок CD44 может быть использован как диагностический и прогностический маркер.

В значительной степени прогноз результата лечения онкологических больных зависит от оценки вероятности развития метастазов. До настоящего времени исследователи не располагают достаточно четкими критериями, позволяющими распознать новообразования с высоким метастатическим потенциалом. Тем не менее, степень инвазивного роста и метастазирование опухолевых клеток может определяться по их способности расщеплять компоненты экстраклеточного матрикса (ЭКМ) – базальные мембраны и межтканевую строму, состоящую из различных структурных белков: коллагенов, эластинов, ламининов и т.д. Преодоление базальной мембраны и продвижение по внеклеточному матриксу обеспечиваются секрецией протеаз. Многие протеолитические ферменты, такие как катепсины, сериновые протеазы, способны лизировать отдельные компоненты ЭКМ in vitro, однако разлагать все структуры ЭКМ могут только матриксные металлопротеиназы.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – это семейство ферментов, которые способны разрушать внеклеточный матрикс или базальную мембрану. Они играют важную роль в росте опухоли и метастазировании, так как обеспечивают миграцию и внедрение опухолевых клеток. Активность этих ферментов регулируется тканевыми ингибиторами и активаторами.

Свое название матриксные металлопротеиназы получили за способность специфически гидролизовать основные белки экстраклеточного матрикса. ММП относятся к семейству цинковых металлопротеиназ, так как содержат в активном центре Zn2+. Известно около 20 представителей этого семейства.

Большинство ММП секретируется клетками в виде неактивных ферментов. В обычных условиях в тканях обнаруживаются незначительные количества ММП, при этом их активация приводит к протеолитическому разрушению окружающих клетку белков. Активацию большинства ММП осуществляют протеазы типа плазмина и активатора плазминогена урокиназного типа. Некоторые

ММП могут активизировать друг друга. В норме существует биологический механизм ограничения протеолиза тканей, вызванного активными ММП, в виде секреции клетками стромы тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP). В настоящее время хорошо изучены три TIMP из различных тканей человека – TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3. Это белки небольшого размера, способные формировать нековалентные комплексы со многими членами семейства матриксных металлопротеиназ.

Злокачественные опухоли характеризуются инвазивным ростом и способностью к метастазированию. Деградация базальной мембраны и стромы − пусковой фактор начала этих процессов. Многие опухоли имеют локально увеличенные уровни матриксных металлопротеиназ, ферментов, способных разлагать любой белок матрикса, что позволяет многим исследователям связывать их с инвазивным фенотипом опухоли. В свое время поиск ферментов, способных к разложению базальных мембранных коллагенов, привел к идентификации ММП-2, известной как коллагеназа IV типа.

В клинических исследованиях присутствие больших количеств активной ММП-2 связано с инвазивными раком молочной железы и карциномой легкого. У больных раком гортани наблюдалась корреляция между экспрессией ММП-2 и наличием метастазов в лимфатических узлах. Таким образом, продукция ММП-2 опухолевыми клетками может свидетельствовать об их инвазивном потенциале.

В последнее время происходит активный поиск прогностических биохимических маркеров, которые могли бы выявлять пациентов с высоким риском возникновения рецидивов. На роль таких факторов прогноза претендуют многие опухолеассоциированные протеазы. Так, большое количество работ по раку молочной железы показало, что определение содержания протеазы активатора плазминогена урокиназного типа и его ингибиторов может иметь огромное прогностическое значение в оценке возникновения рецидивов. Кроме того, высокие уровни TIMP-2 в ткани рака молочной железы коррелируют с сокраще-

нием времени ремиссии и полного выживания, а высокий уровень ММП-11 связан с плохим прогнозом.

Матриксные металлопротеиназы в настоящее время активно исследуются как прогностические факторы при многих других локализациях опухолевого процесса. Показатели экспрессии мРНК ММП-9 и TIMP-2 могут предсказать возникновение рецидива у больных с поверхностной переходноклеточной карциномой мочевого пузыря. Другие исследователи рекомендуют оценивать уровни экспрессии ММП-2, TIMP-2 и ММП-14 (активатора ММП-2) для прогноза выживаемости при инвазивных раковых образованиях мочевого пузыря. Описаны также уровни разновидностей ММП при опухолях других локализаций: повышенная экспрессия ММП-2 и ММП-9 обнаруживалась при инвазивных карциномах головы и шеи, экспрессия TIMP-2 коррелировала с локальной инвазией опухоли. Прогностическая важность уровней ММП-2 была описана у больных раком простаты, а уровней ММП-2 и ММП-9 – у больных раком желудка и у больных раком гортани. ММП-7 – основная металлопротеаза, продуцируемая клетками аденокарциномы пищевода, и ее экспрессия характеризует агрессивные инвазивные опухоли. ММП-11 в настоящее время считается маркером прогрессии опухоли ободочной кишки и рака молочной железы, её присутствие свидетельствует о плохом прогнозе заболевания. Обратная корреляция наблюдалась между уровнями экспрессий TIMP-2, TIMP-3 и стадией опухолевого процесса в опухолях гипофиза.

Таким образом, в настоящее время бесспорной является роль молекул адгезии не только в процессах эмбрионального развития, воспаления, иммунного ответа, формирования тромба, апоптоза, роста, регенерации, но также и в возникновении рецидивов и метастазировании опухолевых образований.

Тема №9. Иммуногистохимия ангиогенеза

Формирование кровеносных сосудов и/или кровеносной системы определяется двумя процессами: васкулогенезом и ангиогенезом.

Васкулогенез заключается в дифференцировке ангиобластов (предшественников эндотелиальных клеток) у эмбрионов в кровяных островках, которые после слияния формируют сердечно-сосудистую систему или васкуляризируют эндодермальные органы.

Ангиогенез включает в себя пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток в первичных васкулярных структурах и способствует васкуляризации эктодермальных и мезенхимных органов, реконструкции капиллярной сети.

Ангиогенез необходим для процессов заживления ран, развития многих эмбриональных тканей и плаценты, а также для циклических репродуктивных изменений в женском организме, связанных с формированием желтого тела, ростом эндометрия и лактацией.

Факторы, стимулирующие образование кровеносных сосудов, носят название ангиогенных. К ним относятся: фактор роста сосудов эндотелия (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиогенин, трансформирующий фактор роста-α (TGF-α). Все ангиогенные факторы можно подразделить на 2 группы: первая непосредственно влияет на эндотелиальные клетки, вторая является группой факторов, осуществляющих свое действие опосредованно через макрофаги, которые выделяют факторы роста и цитокины. К факторам второй группы принадлежит ангиогенин.

В новообразованиях процессы неоваскуляризации составляют важный компонент инвазивной и метастатической активности. Данные, накопленные за последнее десятилетие, убедительно показывают необходимость ангиогенеза для роста подавляющего большинства злокачественных опухолей. Формирование сети капилляров из эндотелиальных клеток, выстилающих мелкие венулы, -– необходимое условие для дальнейшего роста опухолевого узелка, достигшего в диаметре 2-4 мм. Процессы образования и роста кровеносных сосудов необходимы и для развития метастазов.

Капиллярная сеть сначала развивается в прилежащих к опухоли тканях, которые впоследствии замещаются неопластическими клетками. При этом, хотя капиллярная сеть, окружающая опухоль, формируется из клеток нормального

эндотелия организма, однако заметно отличается от нормальной по морфологии, плотности и проницаемости сосудов. Плотная сеть капилляров снабжает развивающуюся опухоль кислородом, необходимыми питательными веществами и позволяет выводить токсичные продукты жизнедеятельности опухолевых клеток. Наличие капиллярной сети облегчает также внедрение и распространение клеток метастазирующих опухолей. Таким образом, для того чтобы злокачественное новообразование превысило в толщину несколько слоев живых клеток, необходима высокоспециализированная система капилляров.

Экспериментальные данные последних лет позволяют предположить, что подобная сеть образуется не как результат иммунной реакции организма на воспаление или некроз, а в ответ на вполне определенные сигналы, вырабатываемые опухолевыми клетками. Способность неопластических клеток стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток связана с двумя основными событиями. Во-первых, прекращением секреции ими факторов, ингибирующих ангиогенез (например тромбоспондинов), и, во-вторых, увеличением продукции цитокинов – стимуляторов ангиогенеза, являющихся факторами роста и митогенами для эндотелиоцитов (в первую очередь, VEGF, а также FGF, EGF, TGF-α) и повышением секреции и/или активности протеаз, обеспечивающих протеолиз внеклеточного матрикса и инвазию эндотелиоцитов в ткани новообразования.

Установлено, что из многих ростовых факторов, участвующих в ангиогенезе, VEGF (фактор роста сосудов эндотелия) является самым мощным и доминирующим медиатором этого процесса. VEGF – гликопротеин, связывающийся только с эндотелиальными клетками и стимулирующий их пролиферацию. Этот фактор усиленно продуцируется клетками опухолей человека, способствуя неоваскуляризации опухоли и, возможно, связанной с этим ранней ее диссеминации. Помимо ангиогенного действия, VEGF значительно усиливает проницаемость сосудов.

Экспрессия VEGF значительно ниже в опухолях, не содержащих p53 мутантного типа и с низкой степенью васкуляризации. Уровень экспрессии VEGF

в плоскоклеточных карциномах обратно коррелирован с общей выживаемостью пациентов и был выше в опухолях легкого с метастазами в лимфоузлы. VEGF считается важной терапевтической мишенью при разработке антиангиогенных противоопухолевых препаратов.

Оценка ангиогенеза в опухоли считается одним из маркеров прогноза течения заболевания, наличия метастазов и чувствительности к противоопухолевой терапии. Возникновение метастазов – основная причина смертности больных раком, поэтому идентификация маркеров, тесно связанных с метастатическим потенциалом каждой отдельной опухоли, клинически необходима для планирования терапии больных раком.

Появляется все большее количество доказательств, что метастазирование как на ранних, так и на поздних стадиях зависит от степени васкуляризации опухоли. При метастазировании гематогенным путем опухолевые клетки должны прикрепиться к эндотелию, пройти в просвет сосуда, выжить в циркулирующей крови, остановиться в какой-либо отдаленной ткани и образовать там колонию. Клиническая значимость определения количества сосудов в опухоли продемонстрирована для опухолей различных типов: чем выше плотность сосудов, тем хуже прогноз для пациента. Высокоангиогенные первичные опухоли с высокой внутриопухолевой плотностью сосудов обладают большей способностью дать в отдаленном органе ангиогенный клон, который при благоприятных условиях образует метастаз.

Проводится огромное количество исследований, подтверждающих, что ангиогенез в опухоли является независимым прогностическим маркером. Хотя имеются значительные различия в исследованных группах пациентов и используемых методах оценки ангиогенеза, большинство исследований продемонстрировали обратную связь между опухолевой васкуляризацией и выживаемостью пациентов. Этот факт характерен для опухолей различных локализаций, в частности, для рака молочной железы, рака шейки матки, рака легкого, рака простаты, рака пищевода, рака мозга, рака мочевого пузыря, рака яичка, рака пищевода, рака прямой кишки, мягкотканных сарком, опухолей головы и шеи и т.д.

Главное требование для новых прогностических маркеров – их биологическая роль, должна быть связана с агрессивностью каждой отдельно взятой опухоли. Плотность микрососудов в опухоли как прогностический маркер полностью отвечает этому требованию по нескольким причинам. Во-первых, ангиогенез необходим для перехода от преинвазивной (карцинома in situ) к инвазивной стадии первичной опухоли. Во-вторых, в инвазивных опухолях, даже в одинаковых гистологических типах, ангиогенная активность опухоли различается, что показано на примере опухолей молочной железы. Это делает возможным разделить пациентов по степени ангиогенной активности опухоли. В-третьих, клинико-патологические исследования показали, что плотность микрососудов в опухоли не связана с экспрессией некоторых других биологических маркеров, включая P53, C-erbB-2, EGFR, рецепторов гормонов. Это - биологическая основа независимой оценки ангиогенеза как прогностического маркера. И, наконец, высокая ангиогенная активность опухоли способствует развитию местных и отдаленных метастазов.

Широко используемым методом оценки ангиогенеза в опухолях человека является подсчет микрососудов в первичной опухоли с помощью специфических маркеров эндотелиальных клеток, таких как VIII-фактор, CD31, CD34, и стандартной иммунопероксидазной техники окраски сосудов.

Согласно работам, наиболее чувствительным из доступных панэндотелиальных маркеров являются антитела к фактору CD31. Он распознает большее количество микрососудов, чем другие эндотелиальные маркеры. В частности, CD34 и VIII-фактор окрашивают не все опухолевые сосуды, а антитела к VIII-фактору реагируют также с лимфоцитами. Однако специфичность антител к CD31 тоже не абсолютна, так как они дают положительную реакцию с плазматическими клетками. Следует подчеркнуть, что описанные маркеры окрашивают как покоящийся, так и активированный/пролиферирующий эндотелий.

В заключение следует отметить, что определение и исследование биологических характеристик ангиогенеза опухолей может иметь важнейшее значение не только для лучшего понимания причин развития первичной опухоли и

метастазов, но и для лучшего планирования лечения. За последнее время наши знания о биологических процессах, вовлеченных в формирование новых микрососудов, значительно расширились. И хотя прогностические и терапевтические принципы еще только формируются, достижения в понимании патологии ангиогенеза используются в клинической практике и, возможно, оценка ангиогенеза будет применяться в рутинной клинической деятельности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ОНКОМОРФОЛОГИИ

Тема № 10. Иммуногистохимическая характеристика опухолевых клеток. Опухоли из эпителия

В настоящее время иммуногистохимический метод исследования широко применяется для выявления неизвестной локализации первичной опухоли при наличии её метастазов. От 10 до 15% раковых опухолей характеризуются метастазами в различных органах, полостях и лимфатических узлах.

При морфологической диагностике метастатические опухоли, согласно рекомендациям Европейского общества медицинской онкологии (ESMO, 2004), целесообразно разделять на пять крупных категорий: аденокарцинома, плоскоклеточный рак, нейроэндокринный рак, недифференцированный рак, недифференцированная опухоль. Эти морфологические категории наряду с данными о распространённости процесса во многих случаях позволяют определить адекватный план обследования и лечения.

Частота случаев, когда заболевание сопровождалось развитием метастазов, а локализация первичной опухоли на момент морфологического исследования неизвестна, составляет 3-15% от всех онкологических заболеваний. При этом локализация первичного очага определяется при жизни в среднем у 30-40% пациентов, на аутопсии – у 60-70%.

Иммуногистохимическое исследование в зависимости от морфологического типа новообразования позволяет уточнить гистогенез опухоли и/или высказаться о вероятной локализации первичного очага. Большинство из этих опухолей представляют аденокарциномы молочной железы, толстого кишечника, легких, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы и желудка.

В случае метастазов аденокарциномы задача иммуногистохимического исследования состоит в выявлении вероятного источника метастазирования.

Для этих целей в настоящее время используется целый ряд маркеров включая цитокератины 7 и 20, тиреоидный фактор транскрипции (TTF-1), CA125, CDX2, рецепторы к эстрогенам, GCDFP-15, лизоцим, мезотелин, простат-специфический антиген.

Цитокератин 7 (CK7) относится к семейству белков промежуточных филаментов, имеет молекулярную массу 54 кДа, выявляется в различных видах железистого эпителия. Антитела клона OV-TL (Dako) окрашивают цитоплазму различных видов клеток нормального и неопластического железистого эпителия, включая эпителий протоков. CK7 выявляется в клетках цилиндрического и железистого эпителия легких, шейки матки, молочной железы, желчевыводящих путей и собирательных трубочек почек. CK7 окрашивает переходный эпителий мочевого пузыря, эпителий яичников и легких. Иногда можно встретить положительное окрашивание эндотелия сосудов. В свою очередь, CK7 не экспрессируется в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта, предстательной железы. Практически не выявляется CK7 в гепатоцитах, эпителии проксимальных и дистальных извитых канальцев почек, миоэпителиальных клетках, многослойном эпителии кожи, языка, пищевода и эктоцервикса. Моноклональные антитела OV-TL выявляют отдельные виды аденокарцином и могут быть использованы для проведения дифференциальной диагностики между CK7-позитивными тканями (такими как рак яичников и переходноклеточный рак) и CK7-негативными тканями (такими как аденокарциномы желудочно-кишечного тракта и рак предстательной железы).

Цитокератин 20 (CK20) является представителем кератина I типа, который непосредственно экспрессируется в эпителии желудка и тонкого кишечника, уротелии и клетках Меркеля кожи. Антитела (клон Ks 20.8, Dako) реагируют с соответствующим белком молекулярной массой 46 кДа. CK 20 – это основной белок зрелых энтероцитов и бокаловидных клеток; он специфически экспрессируется в эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка и тонкого кишечника. Его также можно выявить в аденокарциномах толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, желчных капилляров, в муциноз-

ных опухолях яичников, переходноклеточном раке мочевого пузыря и раке из клеток Меркеля. В свою очередь, в плоскоклеточных раках, аденокарциномах молочной железы, легких, эндометрия, не муцинозных опухолях яичников и мелкоклеточных карциномах легких СК 20 не экспрессируется.

TTF-1 – ядерный фактор транскрипции, представляющий собой гомеодоменный белок семейства NKX2 (молекулярная масса 40 кДа); экспрессируемый эмбриональной и зрелой тканью легкого и щитовидной железы. В ядрах клеток большинства других органов – печени, желудка, поджелудочной железы, тонкого и толстого кишечника, почек, молочной железы, кожи, яичек, гипофиза, предстательной железы и надпочечников данный фактор не содержится. TTF-1 выявлен в первичных легочных аденокарциномах и не экспрессируется в аденокарциномах толстого кишечника и молочной железы. Антитела к TTF-1 являются ценным маркером при дифференциальной диагностике аденокарциномы легких с метастазами рака молочной железы и мезотелиомы. При выявлении аденокарцином легких с помощью TTF-1 окраска является более специфичной, чем при использовании антисурфактантных антител.

Лизоцим катализирует гидролиз отдельных мукополисахаридов клеточной оболочки бактерий. Используется для выявления опухолей из гистиоцитов и лейкозных клеток миелоидного ряда. Он выявлен в клетках селезенки, легких, почек, лейкоцитах крови, плазматических клетках, слюне, молоке и слезной жидкости.

Мезотелин – клеточный гликопротеин (молекулярная масса 40 кДа), располагается на поверхности мезотелиальных клеток и связан с механизмами клеточной адгезии. Он также выявляется в мезотелиомах, эпителиальных раках яичников и некоторых плоскоклеточных раках. Клон 5B2 (Novocastra) окрашивает эпителиоидные мезотелиомы и аденокарциномы легких, яичников, опухоли брюшины, эндометрия, поджелудочной железы, желудка и толстого кишечника. Антитела не реагируют с тканью почек, печени, плаценты, кожи и щитовидной железы. Мезотелина много в обычных мезотелиальных клетках, из которых формируются злокачественные мезотелиомы и цистаденокарциномы

яичников. Эти антитела вместе с антителами к калретинину могут быть использованы для выявления мезотелиом.

CDX2 – рекомбинантный белок прокариотов, соответствующий 180 аминокислотному N-терминальному участку молекулы CDX2 человека. Является специфическим транскрипционным фактором клеток тонкого кишечника. Ген *cdx2* кодирует интестинально-специфический транскрипционный фактор, его белок экспрессируется на ранних стадиях развития тонкого кишечника и может иметь значение в регулировании пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток тонкого кишечника. Играет важную роль в инициации дифференцировки клеток в зрелые энтероциты. Клон AMT28 (Novocastra) реагирует с 40кДа белком, расположенным в ядрах клеток. Он экспрессируется в ядрах эпителиальных клеток кишечника от двенадцатиперстной кишки до прямой кишки. Белок CDX2 экспрессируется также в первичных и метастатических опухолях толстого кишечника, а также выявляется при кишечной метаплазии желудка и кишечном типе рака желудка, в свою очередь, в нормальных эпителиальных клетках желудка он не встречается. Данный белок обнаруживается в ядрах только цилиндрического эпителия и раковых клетках колоректальных аденокарцином, таким образом с его помощью можно идентифицировать метастазы рака толстого кишечника.

CA125 – белок ракового антигена яичников. Моноклональные антитела (клон Ov185:1, Novocastra) распознают муциноподобный гликопротеин молекулярной массой около 200 кДа. Антитела окрашивают различные опухоли, такие как аденокарциномы толстого кишечника, аденокарциномы молочной железы, опухоли матки, бронхо-альвеолярные раки, эндометриоидные и серозные аденокарциномы яичников.

ER – рецепторы к эстрогенам. Клон 6F11 (Novocastra) взаимодействует с эстрогеновым рецептором альфа. Антитела окрашивают ядра с рецепторами к эстрогенам в эпителиальных и гладкомышечных клетках матки, а также ядра эпителия молочных желез. Выявление рецепторов к стероидным гормонам широко применяется при лечении гормонально-зависимых опухолей. Наличие ре-

цепторов к эстрогенам является маркером рака молочной железы, а также может свидетельствовать о прогнозе заболевания и эффективности эндокринной терапии.

Простат-специфический антиген (ПСА) – представляет собой гликопротеин. Клон ER-PR8 (Dako) получен к белку молекулярной массой 35 кДа. ПСА биохимически и иммуногистохимически отличается от другого широко используемого маркера опухоли предстательной железы – кислой простатической фосфатазы. Он располагается в цитоплазме клеток ацинарного и протокового эпителия нормальной ткани, выявляется при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и аденокарциноме. Эти антитела можно использовать для выявления метастазов рака предстательной железы, поскольку ПСА выделяется опухолевыми клетками простаты и определяется в плазме крови у больных с раком простаты.

GCDFP-15 – белок, который встречается при диффузной кистозной мастопатии, для которой характерны макро- и микрокисты, протоковая и дольковая гиперплазия и др. патология молочных желез. Кисты формируются за счет апокриновой секреции эпителиальными клетками. Жидкость кист содержит гликопротеины, включая уникальный 15 кДа мономер. В нормальной ткани подобный белок встречается в эпителии слезных, подъязычных и мелких слюнных желез, в клетках серозных оболочек, трахеальных и бронхиальных желез. GCDFP-15 и PSA одновременно экспрессируются в опухолях молочных желез с положительной реакцией на рецепторы к андрогенам. Данный маркер может быть использован для выявления аденокарциномы молочной железы, протоковых раков слюнных желез и апокринового эпителия.

Часть маркеров, такие как ПСА для рака предстательной железы, TTF-1 для рака легких, работают моноспецифично. Другая часть маркеров этой панели характерна для нескольких опухолей: так, рецепторы к эстрогенам могут быть выявлены при раке молочной железы или яичников, CDX2 – при опухолях желудочно-кишечного тракта. Часть маркеров может характеризовать источ-

ник метастаза только комплексно: рецепторы к эстрогенам, мезотелин и CA125 характеризуют опухоли яичников.

J.L Dennis с соавт. (2005) предложили алгоритм для выявления локализации первичных опухолей по иммуногистохимической характеристике метастазов с использованием данного набора маркеров:

1. ПСА-позитивные опухоли, как правило, в 99% случаев представляют собой рак предстательной железы.
2. TTF1-позитивные опухоли, в 98% случаев - рак легких.
3. GCDFP-15-позитивные опухоли могут быть либо аденокарциномой толстого кишечника, либо аденокарциномой молочной железы. В данном случае для дифференциальной диагностики используется маркер CDX2. Опухоли CDX2(+) составляют аденокарциномы толстого кишечника, CDX2(–) – аденокарциному молочной железы.
4. Положительная реакция с маркерами CDX2 и CK20 наблюдается в метастазах из опухолей желудка, поджелудочной железы и толстого кишечника. Применение дополнительного маркера CK7 позволяет дифференцировать эти опухоли. CK7(+) характерен для аденокарциномы желудка и поджелудочной железы; CK7(–) – характеризует аденокарциному толстого кишечника.
5. Рецепторы к эстрогенам встречаются как в опухолях яичников, так и при раке молочной железы. В дифференциальной диагностике этих опухолей помогает маркер мезотелин(+), фенотип характерен для рака яичников; фенотип мезотелин(–) наблюдается при раке молочной железы.
6. CA125 является маркером аденокарциномы поджелудочной железы.
7. Мезотелин(+) характерен для опухолей желудка или поджелудочной железы.
8. Лизоцим(+) выявляет опухоли желудка и поджелудочной железы.

Метастазы плоскоклеточного и нейроэндокринного рака без выявленного первичного очага (Савелов Н.А., Петровичев Н.Н., 2006)

При метастазах плоскоклеточного рака проводить иммуногистохимическое исследование нецелесообразно, так как возможности метода не позволяют уточнить вероятный источник метастазирования. Это относится и к метастазам низкодифференцированного нейроэндокринного рака. Однако при метастазах высокодифференцированного нейроэндокринного рака (синоним – атипичный карциноид) коэкспрессия CK7 и TTF1 может свидетельствовать о локализации первичного очага в легком, а коэкспрессия CK20 и CDX2 – в органах ЖКТ.

Метастазы недифференцированного рака без выявленного первичного очага (Савелов Н.А., Петровичев Н.Н., 2006)

У пациентов с метастазами без четких морфологических признаков железистой (аденогенной), нейроэндокринной или плоскоклеточной дифференцировки главной задачей дополнительных методов исследования является уточнение гистогенеза опухоли (точнее, установление направления дифференцировки опухолевых клеток). Для этого применяется следующая панель антител: p63, CK5, CK14 или CK5/CK6, CK18, CD56 (N-CAM).

Антитела к белку P63 (клон 4A4, Dako). Белок P63 принадлежит к семейству P53 опухолевых супрессорных генов, которые также включают белок P73. Эти белки регулируют процессы клеточной транскрипции и запускают процессы апоптоза в ответ на повреждение ДНК и развитие гипоксии. P63 экспрессируется в ядрах базальных клеток различных видов эпителия. Белок P63 выявляется в пролиферирующих клетках эпителия шейки матки, уротелия и предстательной железы. Он также экспрессируется в большинстве низкодифференцированных плоскоклеточных раков. Антитела к P63 помогают дифференцировать доброкачественные и злокачественные опухоли предстательной железы.

Антитела к белку CD56 (клон MOC-1, Dako). Белок CD56 является антигеном клеток натуральных киллеров. Реагирует с CD4+ и CD8+, Т-клетками в периферической крови. CD56 можно выявить в нейробластоме и мелкоклеточном раке легких, а также некоторых других опухолях.

Цитокератины CK5/CK6 (клон D6/16 B4, Dako). Цитокератины относятся к семейству промежуточных филаментов и выявлены практически во всех клетках. Типы цитокератинов CK5/CK6 выявляются в мезотелиальных клетках и не встречаются в аденокарциномах. CK5/CK6 применяются как маркеры мезотелиомы и плоскоклеточного рака легких, болезни Боуэна (разновидности карциномы, поражающей чешуйчатые клетки эпидермиса кожи, но не распространяющейся на ее базальные слои). Они не встречаются в аденокарциномах легких, но окрашивают мезотелиому и базальные клетки желез простаты. Данные антитела не реагируют с тканями мезодермального происхождения, такими как мышцы и соединительная ткань. Цитокератины CK5/CK6 экспрессируются в низкодифференцированных аденокарциномах и выявляются в эпителиоидных мезотелиомах.

Цитокератин CK14 (клон LL002, BioGenex), молекулярная масса 50 кДа, – это кислый цитокератин первого типа, с помощью которого можно отличить многослойный плоский эпителий от простого эпителия. Цитокератин CK14 равномерно экспрессируется в цитоплазме всех клеток многослойного плоского ороговевающего эпителия. Моноклональные антитела к цитокератину CK14 помогают дифференцировать типы клеток в молочных железах при развитии аденокарциномы.

Цитокератин CK18 (клон DC10, Dako) – белок с молекулярной массой 45 кДа. Антитела реагируют с большинством видов простого эпителия, включая эпителий протоков и ацинусов желез. Данный белок экспрессируется в эпителии щитовидной железы, молочной железы, желудочно-кишечного тракта и дыхательной системы. Антитела используют для выявления аденокарцином легких, при этом они окрашивают цитоплазму опухолевых клеток из эпителия и не окрашивают опухолевые неэпителиальные клетки (глиомы, меланомы, остеосаркомы).

Для дифференциальной диагностики низкодифференцированных опухолей используется следующий алгоритм:

1. СК18(+) – аденокарцинома;
2. СК5/14(+) и p63(+) – плоскоклеточный рак;
3. СК5/СК14(+), СК18(+), p63(+) – переходноклеточный рак, плоскоклеточный рак, тимома;
4. СК18(+), CD56(+) – нейроэндокринный рак.
5. При выявлении экспрессии СК5/14, СК18 и p63 дифференцировать переходноклеточный рак от плоскоклеточного в ряде случаев возможно, исследуя коэкспрессию СК7 и СК20, которая наблюдается приблизительно в 60% метастазов переходноклеточного рака.

Тема № 11. Выявление гистогенетической принадлежности опухолей мезенхимального происхождения

Опухоли мезенхимального происхождения представляют один из наиболее сложных разделов онкоморфологии. Это связано с большим числом нозологических форм и их вариантов, обусловленных многообразием гисто- и морфогенеза, сложностями дифференциального диагноза при наличии весьма близкой структурной и клеточной характеристики опухоли, разнообразием клинического течения и прогноза (Франк Г.А., 2004).

При идентификации опухолей мягких тканей используется большое количество иммуногистохимических маркеров, наиболее часто встречающимися из них являются следующие.

Виментин – это один из белков промежуточных филаментов, являющихся главными структурными белками клетки. Только виментин представлен в мезенхимальных клетках во время раннего эмбрионального развития и, как правило, как только клетка подвергается дифференцировке, заменяется типовыми специфическими промежуточными филаментами. Несмотря на то, что виментин раньше считали специфическим маркером мезенхимальной дифференцировки клеток, этот белок был найден в различных немезенхимальных опухолях,

включая аденокарциномы яичников, щитовидной железы, эндометрия, почек, молочной железы, надпочечников и легких, а также меланомы, мезотелиомы и лимфомы.

Цитокератин – главный компонент цитоскелета эпителиальных клеток. Антитела, направленные против цитокератина, являются самыми частыми иммунореагентами при определении эпителиальной дифференцировки. Некоторые из мезенхимальных опухолей обладают способностью экспрессировать кератин, наиболее часто СК8 и СК18. К ним относятся: синовиальная саркома, мезотелиома, десмопластическая мелко-круглоклеточная опухоль, хондрома, парахордома, меланотическая нейроэктодермальная опухоль и внепочечная рабдоидная опухоль.

EMA (эпителиальный мембранный антиген) – гликопротеин, присутствующий на плазматической мембране эпителиальных клеток. EMA, наподобие цитокератинов, обнаруживается в различных видах нормального эпителия и развивающихся из него опухолях. Характерная локализация – на клеточной поверхности или на внутрицитоплазматических мембранах. Антиген был также обнаружен в плазматических клетках, в крупноклеточных лимфомах, особенно в анапластической крупноклеточной лимфоме с транслокацией t(2;5).

EMA-экспрессия в мезенхимальных опухолях по большей части аналогична цитокератинам, за исключением нескольких характерных особенностей. Антитела к EMA более чувствительны при установлении эпителиальной дифференцировки в низкодифференцированных случаях монофазной синовиальной саркомы

Актины – сократительные белки, являющиеся главными компонентами системы микрофиламентов клетки. Выявлено шесть основных изоформ актина.

Антитела к альфа-актину гладких мышц являются надежными маркерами для определения гладкомышечных опухолей. SMA и α-SMA также окрашивают клетки с частичной гладкомышечной дифференцировкой: перициты, миоэпителиальные клетки и миофибробласты. Определение перицитов вокруг сосудистых структур – признак доброкачественного сосудистого процесса, тогда как

в большинстве злокачественных сосудистых новообразований число перицитарных клеток снижено.

Десмин – промежуточный филамент, найденный в сердце, скелетных и гладких мышечных волокнах. В скелетных мышечных клетках нити десмина вплетаются в Z-диски, в гладкомышечных клетках связывают веретенообразные плотные пятна, которые идут параллельно нитям актина. Антитела к десмину являются хорошим маркером для определения гладко- и скелетномышечной дифференцировки; чаще этот маркер экспрессируется в рабдомиосаркоме, чем в лейомиосаркоме. Наличие десмина также обнаруживается в ангиомиофибробластоме вульвы, где главными неопластическими элементами могут быть измененные миофибробластоподобные клетки.

Миозины в мышечных клетках действуют как ферменты и структурные белки. Они имеют способность связывать актиновые нити в мышцах и инициируют мышечное сокращение. Миозины могут быть разделены на гладкий и поперечно-полосатый мышечные типы. Поперечно-полосатый тип миозина (скелетный и сердечный мышечные миозины) называют саркомерным миозином. Антитела к нему нашли применение в диагностике рабдомиосаркомы.

Антиген, связанный с *фактором VIII***,** также известный как *фактор фон Виллебранда*, является большим мультимерным компонентом комплекса фактора VIII системы свертывания крови. Синтезируется эндотелиальными клетками, мегакариоцитами и тромбоцитами, а также во внутриклеточных органеллах клеток эндотелия – тельцах Weibel-Palade. Антитела к фактору VIII часто рассматриваются в качестве специфических маркеров эндотелиальной дифференцировки, но не являются достаточно чувствительными, так как не окрашивают эндотелий капилляров в различных органах и дают слабую окраску лимфатического эндотелия.

CD30 экспрессируется в клетках Рида-Штейнберга при болезни Ходжкина, на поверхности активированных В- и Т-клеточных лимфоцитов, а также в эмбриональных злокачественных клетках.

CD31 – гликопротеин, который принадлежит к молекулам клеточной адгезии семейства иммуноглобулинов, известный также как молекула адгезии PECAM-I (эндотелиальная молекула адгезии тромбоцитов), представлен на тромбоцитах, гранулоцитах и клетках эндотелия. Ранее считалось, что этот белок менее специфичен для эндотелия, чем фактор VIII. Однако CD31 оказался более чувствительным маркером злокачественных сосудистых опухолей в связи с его способностью иммуноокрашивать низкодифференцированные очаги в ангиосаркомах и веретеноклеточные поля саркомы Капоши. В случаях мезотелиомы и некоторых аденокарцином может выявляться слабое цитоплазматическое окрашивание на белок CD31. При этом отсутствует специфический мембранозный тип экспрессии, характерный для клеток эндотелия.

CD34 – гликозилированная трансмембранная молекула адгезии клеток, которая встречается на гемопоэтических клетках-предшественниках, эндотелиальных клетках сосудов и субпопуляции фибробластоподобных клеток в пределах соединительной ткани. Способность экспрессировать данный белок теряют зрелые клетки или подвергающиеся дальнейшей дифференцировке. Как маркер эндотелия CD34 окрашивает внутрицитоплазматические пространства неопластических клеток, составляющих эпителиоидную гемангиоэндотелиому, и показывает большую чувствительность, сопоставимую с CD31, чем фактор VIII, особенно при определении низкодифференцированных ангиосарком, веретенообразных участков саркомы Капоши.

Энолаза – это гликолитический фермент. Различные изоформы энолазы состоят из гомодимеров альфа-, бета- и гамма-субъединиц и встречаются практически во всех тканях тела человека. Гамма-энолаза или нейрон-специфическая энолаза (NSE) находится в высоких концентрациях в клетках нервной системы и нейроэндокринных клетках. Первоначально NSE рассматривался как специфический маркер нейроэндокринной дифференцировки, однако экспрессия данного белка была обнаружена в нейроэндокринной карциноме, нейробластоме, параганглиоме и феохромоцитоме. Последние исследования показали, что NSE иммунореактивность для нейроэндокринных клеток ме-

нее специфична, так как была определена в тканях не нервного происхождения, различных не эндокринных карциномах, в нескольких вариантах сарком: рабдомиосаркоме, лейомиосаркоме, ангиомиосаркоме, синовиальной саркоме, светлоклеточной саркоме и альвеолярной мягкотканой саркоме, а также в меланоме и лимфоме. Другие мезенхимальные опухоли, которые экспрессируют NSE, – это саркома Юинга (примитивная нейроэктодермальная опухоль), десмопластическая мелко-круглоклеточная опухоль, гастроинтестинальная стромальная опухоль и мезенхимальная хондросаркома. В настоящее время доступен ряд более специфичных маркеров нервной ткани.

Белок S-100 относится к группе небольших кальцийсвязывающих белков, которые участвуют в клеточном цикле, клеточной дифференцировке, в процессах взаимодействия цитоскелета с мембраной. Данный белок экспрессируется шванновскими клетками периферической нервной системы, гистиоцитами с антиген-презентирующей функцией типа клеток Лангерганса, адипоцитами, хондроцитами, меланоцитами, миоэпителиальными клетками, клетками мозгового вещества надпочечников. С диагностической точки зрения, белок S-100 рассматривается как чувствительный, но не специфичный маркер периневрия и меланоцитов и поэтому должен быть использован в панели с другими иммунореагентами. Сильная и диффузная ядерная или цитоплазматическая экспрессия белка S-100 типична для нейролеммомы (доброкачественная и клеточная шваннома) и более вариабельна в нейрофиброме.

Как маркер опухолей меланоцитарного происхождения антитела к белку S-100 окрашивают практически все доброкачественные меланоцитарные процессы, исключая некоторые голубые невусы, а также меланомы, включая десмопластический вариант. Белок S-100 (наряду с цитокератинами) можно использовать в диагностике хордомы. S-100 иммунореактивность обнаруживается в большей части хорошо дифференцированных хондроидных опухолей; для внескелетной миксоидной хондросаркомы характерна низкая или отрицательная реакция. Ограниченная экспрессия данного белка в определенных субпопуляциях гистиоцитов используется при подтверждении диагноза гистиоцитоза

Лангерганса и заболевания Розаи-Дорфмана, развивающегося в мягких тканях. Иммунореактивность белка S-100 также отмечена в миоэпителиоме мягких тканей, парахордоме и в приблизительно 30% синовиальных сарком.

Антитела к *HMB-45* реагируют с антигенами, которые ассоциируются с ранними стадиями образования меланосомы. Несмотря на то, что антитела к HMB-45 окрашивают эмбриональные меланоциты и соединительнотканные невусы, включая соединительнотканный компонент сложного невуса, они не дают реакции со зрелыми меланоцитами или внутридермальными невусами. Отмечено, что данные антитела являются специфичными и чувствительными для меланомы и могут использоваться вместе с S-100.

Ген MIC2 локализуется в псевдоаутосомных участках X и Y хромосом и кодирует гликопротеин – *CD99* (или антиген E2), который экспрессируется на поверхностных мембранах некоторых лимфоцитов, Т-лимфоцитов коркового вещества тимуса, клетках зернистого слоя фолликулов яичников. Антиген также экспрессируется большинством клеток панкреатических островков, клеток Сертоли яичек и некоторыми эндотелиальными клетками. Наибольшее диагностическое значение CD99 имеет при дифференциальной диагностики примитивной нейроэктодермальной опухоли – саркомы Юинга от низкодифференцированной нейробластомы, в которой, несмотря на значительное морфологическое сходство, реакция с CD99 не наблюдается. CD-экспрессия характерна не только для саркомы Юинга, но также обнаружена в опухолях из малых клеток голубого невуса, при острой лимфобластной Т-клеточной лимфоме, рабдомиосаркоме, опухоли Вильямса, мелкоклеточной остеосаркоме и других опухолях.

C-kit кодирует трансмембранный рецептор тирозинкиназного фактора роста (KIT, *CD117*), который найден в гематопоэтических «стволовых» клетках, тучных клетках, зародышевых клетках, меланоцитах, интерстициальных клетках Кахала желудочно-кишечного тракта и некоторых эпителиальных клетках. CD117 не выявляется в лейомиомах; обычно он обнаруживаются в гастроинтестинальных стромальных опухолях. CD117 также экспрессируется в большин-

стве опухолей из тучных клеток, обнаружен в некоторых гранулоцитарных саркомах.

При определении нозологических форм опухолей мезенхимального происхождения первоначально приходится основываться на гистологическом строении опухолевых клеток, а затем иммуногистохимически ставить точный диагноз. В подобных случаях полезно использовать следующую панель.

При преобладании в опухоли веретеновидных клеток следует использовать следующие маркеры: гладкомышечный актин (SMA), десмин, белок S-100, цитокератины, CD34, эпителиальный мембранный антиген.

Опухоли с плеоморфной клеточной структурой исследуют на: цитокератины, белок S-100, актин, десмин, CD30.

При эпителиоидном строении опухолевых клеток применяют следующие маркеры: цитокератины, белок S-100, CD34.

Опухоли преимущественно круглоклеточного строения исследуют на: цитокератины, общий лейкоцитарный антиген, десмин и/или myf-4, CD99, белок S-100.

Таким образом, большинство мезотелиальных опухолей можно идентифицировать с помощью нескольких специфических иммуногистохимических маркеров:

- для лейомиосаркомы характерна экспрессия гладкомышечного актина и десмина;
- синовиальная саркома выявляется эпителиальным мембранным антигеном (ЭМА) и цитокератинами;
- для злокачественной шванномы характерен белок S-100;
- рабдомиосаркома экспрессирует десмин, саркомерный актин, миоглобин;
- саркома Юинга – CD99, нейронспецифическую энолазу;
- ангиосаркома – CD31, CD34, фактор Виллебранда;
- эпителиоидная саркома – эпителиальный мембранный антиген, цитокератины;
- светлоклеточная саркома – белок S-100, HMB-45.

Тема № 12. Дифференциальная диагностика лимфом

В настоящее время появились новые методики, позволяющие проводить дифференциальную диагностику лимфом. Они основаны на выявлении белков иммуногистохимическими методами в нормальных лимфоцитах в процессе их дифференцировки и генетических изменений при злокачественной трансформации. В основе современной классификации опухолей лимфоидной ткани лежит принцип трансформации лимфоцитов на различных стадиях их дифференцировки в их злокачественные опухолевые аналоги.

Лимфоциты – это основные клетки иммунных реакций. Все лимфоциты делятся на Т- и В-лимфоциты. Т-лимфоциты дифференцируются из стволовых клеток крови в тимусе – это антигеннезависимый Т-лимфоцитопоэз. В ходе него на Т-лимфоцитах появляются специфические Т-клеточные рецепторы CD3, CD4, CD8. Из тимуса Т-лимфоциты поступают в периферические лимфоидные органы, где под влиянием антигена формируются следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-лимфоциты памяти, Т-хелперы/индукторы, Т-супрессоры/цитотоксические.

В-лимфоциты человека дифференцируются в красном костном мозге из стволовых клеток крови, при этом осуществляется антигеннезависимый В-лимфоцитопоэз. После этого В-лимфоциты поступают в В-зависимые зоны периферических органов иммунитета. В них под влиянием антигена происходит антигензависимая дифференцировка В-лимфоцитов с превращением их в плазмоциты, В-лимфоциты памяти и В-супрессоры. В-лимфоциты несут на своей поверхности ряд рецепторов для Fc-фрагментов антител, антигенов, С3-компонента комплемента, митогенов и гормонов. Они экспрессируют молекулы МНС обоих классов, а также CD19, CD20, CD21, CD22, CD23. Периферическими органами иммунитета являются селезенка, лимфоузлы, миндалины, аппендикс, одиночные и групповые лимфоидные фолликулы. Выделяют также кожно-ассоциированную лимфоидную ткань, лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистыми оболочками (MALT), бронхо-ассоциированную лимфоидную ткань.

Лимфомы – злокачественные опухоли лимфоидных органов, основным клеточным элементом которых являются лимфоциты, гистиоциты и их предшественники.

Для установки диагноза лимфомы используют биологические свойства нормальных и неопластических В- и Т-клеток, включая их морфологические характеристики, иммунофенотип, генетические мутации, а также клиническую картину заболевания.

Антигенная дифференцировка опухолевых клеток так же, как и нормальных лимфоцитов зависит от стадии развития анапластической клетки и включает наличие pan-B или pan-T антигенов. Кроме этого, если мутации возникают на различных этапах дифференцировки лимфоцитов, то в них можно выявить антигены клеток-предшественников (TdT), антигены, связанные с антигеннезависимой дифференцировкой В-клеток (CD5), антигены клеток герминативных центров (CD10 и BCL-6) или антигены более зрелых лимфоцитов (CD38 и CD138). Анапластическая крупноклеточная лимфома характеризуется наличием CD30 (Ki-1) антигенов. Выявление богатой лимфоцитами калассической лимфомы Ходжкина проводится с помощью антигенов CD15 и CD30.

Все злокачественные лимфомы подразделяют на две большие группы:

I. Лимфогрануломатоз, или лимфома Ходжкина, или Болезнь Ходжкина (HD) с характерными клетками Рида – Штейнберга (Reed –Strenberg). Эту группу составляют 25% злокачественных лимфом.

II. Неходжкинские лимфомы (NHL), составляющие большую часть лимфом.

В 1997 г. международная группа по изучению лимфом опубликовала усовершенствованную европейско-американскую классификацию лимфоидных опухолей (REAL classification).

Болезнь Ходжкина

- Нодулярная, с преобладанием лимфоидной ткани, лимфома Ходжкина.
- Классическая лимфома Ходжкина:

1. Нодулярный или узловатый склероз (G1-G2).
2. С преобладанием лимфоидной ткани.
3. Смешанно-клеточный тип.
4. С истощением лимфоидной ткани.

Неходжкинские лимфомы.

А. Индолентные В-клеточные варианты (CD20, CD 79a):

1. Хронический лимфоцитарный лейкоз (мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома).
2. Волосатоклеточный лейкоз.
3. Фолликулярная лимфома.
4. Лимфоплазмоцитарная лимфома.
5. Нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны.
6. Экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT-лимфома).
7. Селезеночная лимфома маргинальной зоны.

Б. Агрессивные В-клеточные неоплазии:

1. Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома.
2. Фолликулярная крупноклеточная лимфома.
3. Лимфома из клеток зоны мантии.
4. Лимфома Беркитта.
5. Солитарная плазмоцитома/плазмоклеточная миелома.

Лейкозы и лимфомы Т-клеток (CD 2, CD 7-позитивные).

А. Индолентные Т-клеточные неоплазии:

1. Т-клеточный лейкоз.
2. Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз.
3. Кожная Т-клеточная лимфома (синдром Сезари, грибовидный микоз).

Б. Агрессивные Т-клеточные неоплазии:

1. Лимфома из клеток с иммунофенотипом периферических Т-лимфоцитов.
2. Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома.
3. Т-клеточная лимфома типа энтеропатии.
4. Т-лимфобластный лейкоз.

Болезнь Ходжкина прежде всего наблюдается в лимфатических узлах и вовлекает окружающую ткань вторично. Наиболее часто болеют люди в возрасте между 15 и 35 годами жизни и после 50 лет, причем чаще болеют мужчины. Классической диагностической картиной является наличие клеток Рида – Штейнберга**.**

В онкологической практике из неходжкинских лимфом выделяют те разновидности новообразований лимфоидной ткани, которые встречаются наиболее часто, в частности крупноклеточную В-лимфому (31%), фолликулярную лимфому (22%), хронический лимфоцитарный лейкоз (7%) и лимфогранулематоз. Также к широко известным лимфоидным опухолям следует отнести MALT-лимфому (8%) и лимфому мантийной зоны (6%).

Индолентные лимфомы NHL характеризуются длительным периодом выживаемости пациентов, годы – даже без лечения.

Фолликулярная лимфома – наиболее частый вид индолентной NHL и морфологически соответствует нормальным герминативным центрам вторичных лимфатических фолликулов. Подобно нормальному герминативному центру, в фолликулярной лимфоме выявляется небольшое число Т-клеток и фолликулярных дендритных клеток, но не встречаются крупные макрофаги. Все фолликулярные лимфомы экспрессируют моноклональные поверхностные антигены (Ig): HLA-DR, pan-B-клеточные антигены (CD19 и CD20), CD21, CD10 и CD79a, но не содержат CD5.

Мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL) составляет 6% NHL, морфологически представлена небольшими лимфоцитами, экспрессирующими HLA-DR, pan-B антигены (CD19, CD20 и CD22), CD23, CD5, sIgM и IgD.

Лимфоплазмоцитарная лимфома (иммуноцитома) является видом индолентной лимфомы, характеризующейся диффузной пролиферацией небольших лимфоцитов с признаками дифференцировки до плазматических клеток. Она составляет около 1% NHL. С помощью специального окрашивания в этих клетках можно выявить Ig. Эти опухоли экспрессируют pan-B антигены (CD19, CD20, CD22) и sIgM. Антигены: CD5, CD10 и CD23 отсутствуют.

Лимфомы маргинальной зоны (MZL) включают нодальные, экстранодальные (MALT) и селезеночные. В нодальных MZL опухолевые клетки цитологически представлены неизмененными моноцитоидными В-клетками и часто занимают синусы лимфатических узлов. Фенотипически эти опухоли экспрессируют sIgM, pan-B-клеточные антигены (CD19, CD20, CD22). Опухолевые клетки негативны на IgM и IgD и окрашиваются антителами на антигены CD5, CD10, CD43 и CD23. Они также экспрессируют BCL-2 и не содержат CD25. Как и другие индолентные лимфомы, MZL могут трансформироваться в лимфомы более злокачественных форм.

Агрессивные лимфомы.

Лимфома зоны мантии (MCL) является неопластическим аналогом антигеннезависимых В-клеток зоны мантии. Морфологически MCL может иметь или диффузную архитектуру, или нодулярную картину, иногда распространяющуюся в зону мантии вторичных лимфоидных фолликулов. Цитологически неопластические клетки имеют средний размер и ядро неправильной формы. Встречаются MCL с преимущественным распределением бластных клеток с высоким митотическим индексом. Иммунофенотип лимфомы представлен pan-B-клеточными антигенами, IgM и IgD, CD5 и CD43; по сравнению с фолликулярной лимфомой и SLL, лимфомы MCL не содержат CD10 и CD23 антигенов. Высокая экспрессия Cyclin D1 отличает эти опухоли от других лимфом.

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) характеризуется диффузной пролиферацией крупных клеток с высокой митотической активностью. Клетки имеют цитоплазму средних размеров с расщепленными ядрами, в которых часто видны множественные ядрышки. DLBCL-

лимфома соответствует В-клеткам герминативных центров или активированным В-лимфоцитам. Опухолевые клетки в основном экспрессируют pan-В-клеточные антигены (CD19, CD20, CD22) и моноклоны sIgM, иногда наблюдается экспрессия других изотипов тяжелых цепей и экспрессия CD5 и CD10. Bcl-2 экспрессируется в 25-80% случаев и характеризует плохой прогноз. Около 70% опухолей экспрессирует Bcl-6, который связан с герминативными центрами.

Лимфома Беркитта (BL) **и Беркитт-подобные лимфомы (**BLL**)**. Цитологически BL представлена небольшими не расщепленными клетками в неизмененных герминативных центрах вторичных лимфатических фолликулов. Эти клетки отличаются от лимфобластов средним размером, изогнутыми ядрами, грубыми скоплениями хроматина и широкой цитоплазмой. Из-за высокой митотической активности в них часто видны митотические фигуры. На фоне темных клеток при BL видны крупные светлые макрофаги, образуя гистологическую картину «звездного неба».

BL экспрессирует В-клеточные антигены, включая CD19, CD20, sIgM, а также HLA-DR и CD10. Экспрессия CD21, EBV/C3d зависит от вирусной природы лимфомы.

Клетки BLL-лимфомы имеют больший полиморфизм и содержат меньше ядрышек. Количество пролиферирующих клеток по показателю Ki 67 в BLL составляет 99%. Иммунофенотип BLL подобен BL, однако экспрессия CD10 и CD21 достаточно вариабельна.

Периферические Т-клеточные лимфомы (PTCL) составляют 15% от всех NHL взрослых пациентов. Диффузные клеточные инфильтраты, как правило, разнообразны: они могут быть представлены смесью мелких и крупных клеток, эозинофилов, клеток типа Рида – Штейнберга или преобладанием крупных клеток. По сравнению с В-клеточными лимфомами паттерн поверхностных антигенов может значительно варьировать. Фенотипически большинство клеток экспрессирует CD2, CD3, CD4, CD8 антигены и теряют антигены зрелых клеток: CD5 и CD7.

Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (AILD-like), кроме плеоморфного клеточного инфильтрата содержит большое количество венул, которые создают картину гиперваскуляризации опухоли.

Ангиоцентрические T/NK–клеточные лимфомы характеризуются васкулярной инвазией и выраженным разрушением ткани. Опухолевые клетки экспрессируют фенотип NK-клеток: CD2, CD56, CD45RO и CD43, но не содержат поверхностных CD3 и Т-клеточных рецепторов.

Подкожная целлюлит-подобная Т-клеточная лимфома характеризуется подкожными узлами с клеточными инфильтратами в подкожной жировой клетчатке.

Интестинальная Т-клеточная лимфома характеризуется глютеиновой энтеропатией, изъязвлением слизистой и клеточными инфильтратами в тонком кишечнике. Инфильтрат содержит анапластические крупные клетки. Слизистая оболочка характеризуется атрофией кишечных ворсинок и скоплением лимфоцитов. Опухолевые клетки экспрессируют CD4 и CD103 антигены, которые представляют молекулы рецепторов адгезии на поверхности тонкокишечных лимфоцитов.

Анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL) является подтипом PTCL лимфом, которая встречается в лимфатических узлах, мягких тканях или коже. При вовлечении лимфатических узлов, ALCL характеризуется наличием в синусоидах лимфатических узлов крупных клеток причудливой формы. Эти опухоли были отнесены к крупноклеточным анапластическим лимфомам за счет выраженной экспрессии в них CD30 антигена. Неопластические клетки ALCL также экспрессируют фенотип зрелых активированных Т-клеток (HLA-DR, CD25). Небольшая часть клеток не экспрессирует ни В-, ни Т-антигены. В 40-60% случаев в подобных лимфомах экспрессируется белок киназа анапластических лимфом (ALK). При этом отмечается как ядерное, так и цитоплазматическое окрашивание клеток при наличии хромосомных изменений t(2; 5). ALK-позитивные случаи чаще встречаются у детей, и характеризуются лучшим прогнозом течения заболевания по сравнению с ALK-негативными лимфомами.

Предшественники Т- или В-лимфобластных лимфом имеют высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, обширную цитоплазму и ядра с нитевидным хроматином и множеством мелких ядрышек, эти клетки обладают высоким митотическим индексом. Ядерная оболочка клеток образует складки. Подавляющее большинство лимфобластных лимфом относятся к Т-клеточной линии. Они принадлежат к фенотипу общих Т-лимфоцитов тимуса (CD4+, CD1a+, Cd8+), около 30% лимфом по своему фенотипу соответствуют ранним Т-лимфоцитам тимуса (CD38+, CD 4+) и около 20% лимфом – зрелым (CD3+, CD8+). 40% Т-клеточных лимфобластных лимфом экспрессируют CD10. Редко встречаются экстранодальные формы лимфобластных лимфом.

Алгоритм выявления лимфом (по N.L. Harris с соавт., 2001).

В основе гистологического исследования биопсий лимфатических узлов, как и всех других органов и тканей, лежит исследование тканевой структуры (архитектоники) и клеточного состава биоптата. Гистологическое исследование препаратов, окрашенных гематоксилином–эозином или азур II-эозином, позволяет отнести исследуемую опухоль лимфоидной ткани к одной из групп лимфом, объединенных выраженным морфологическим сходством: пролиферацией мелких лимфоидных клеток или пролиферацией крупных лимфоидных клеток.

Пролиферация мелких лимфоцитарных клеток.

Диффузная пролиферация мелких лимфоидных клеток не вызывает сложности при диагностике опухолевой природы процесса при достаточном объеме исследуемой ткани. Обычно обнаруживаются объемные опухолевые массы монотонного строения, замещающие организованную лимфоидную ткань. Характерен инфильтративный рост за пределы капсулы лимфатического узла в перинодальную жировую ткань, мономорфный клеточный состав и более или менее выраженные признаки клеточной атипии. Диагностические проблемы возникают при исследовании небольших или сильно деформированных биоптатов, когда трудно оценить структуру ткани и строение клеток.

В подавляющем большинстве случаев опухоли диффузного строения из мелких клеток имеют В-клеточный фенотип, очень редким исключением может быть Т-пролимфоцитарный лейкоз. Если иммуногистохимическое исследование указывает на В-линейное происхождение лимфомы мелкоклеточного строения, то круг дифференциальной диагностики ограничивается лимфоцитарной лимфомой, лимфомой маргинальной зоны, лимфомой из клеток зоны мантии, лимфоцитарным лейкозом, лимфоплазмоцитарной лимфомой и фолликулярной лимфомой I степени с диффузным характером роста.

При выявлении мелких лимфоцитарных клеток следует ответить на вопрос, является ли процесс доброкачественным или злокачественным. Для этого исследуют иммуноглобулины легких цепей (kappa и lambda), а также белок BCL-2 в фолликулах. Если иммуноглобулины kappa/lambda представлены поликлонами или иммуногистохимическая реакция на Bcl-2 в фолликулах – отрицательная, то ставится диагноз реактивного пролиферативного процесса. Если kappa/lambda моноклональные или реакция на Bcl-2 в фолликулах - положительная, то ставится диагноз – мелкоклеточная В-клеточная лимфома.

Далее производится *классификация мелкоклеточной В-клеточной лимфомы.*

Если ИГХ реакция на CD5 положительная, то это хронический лимфоцитарный лейкоз (мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома) или лимфома из клеток мантии. Отрицательная реакция на циклин D1 и положительная реакция на CD23 свидетельствуют о хроническом лимфоцитарном лейкозе (мелкоклеточной лимфоцитарной лимфоме). Положительная реакция на циклин D1 и отрицательная реакция на CD23 свидетельствуют о лимфоме из клеток мантии.

Если реакция на CD5 отрицательная, то проводится дифференциальная диагностика между фолликулярной лимфомой и лимфомой маргинальной зоны (MALT). Для этого проводят фенотипирование CD10. Если реакция с CD10 – положительная, то это фолликулярная лимфома, если – отрицательная, то это лимфома маргинальной зоны или CD10-негативная фолликулярная лимфома.

Уточнить диагноз лимфомы можно исследуя Bcl-6, CD43, Bcl-2. BCL-6(+), CD43(–), Bcl-2(+) в фолликулах свидетельствует о фолликурярной лимфоме. BCL-6(–), CD43(+), Bcl-2(–) в фолликулах говорит о лимфоме маргинальной зоны.

Пролиферация крупных лимфоцитарных клеток.

При выявлении крупных лимфоцитарных клеток следует ответить на вопрос: это – лимфома или опухоль другой этиологии? Диффузная полиморфноклеточная опухолевая лимфоидная пролиферация при первичной локализации в лимфатических узлах в большинстве случаев связана с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой или лимфомой из клеток с иммунофенотипом периферических Т-лимфоцитов и является неуточненной. Экстранодальная первичная локализация лимфомы полиморфноклеточного строения характерна для экстранодальной NK/T-клеточной лимфомы назального типа, панникулитоподобной Т-клеточной лимфомы подкожной клетчатки и Т-клеточной лимфомы типа энтеропатии.

Для выявления лимфомы или опухоли другой этиологии исследуют CD45 (общий лейкоцитарный антиген), общие антигены для В-лимфоцитов и общие Т-клеточные антигены, иммуноглобулины легких цепей, цитокератины, маркеры меланомы.

Классификация лимфом с крупными клетками.

Положительная реакция с общими В-клеточными антигенами (CD20, CD79a) – это В-клеточная лимфома. Наличие положительной реакции с иммуноглобулинами легких цепей Ig(+) – то это диффузная крупноклеточная лимфома или лимфома Беркитта.

Иммунофенотип CD10(+), Bcl-2(–), Ki67>99% свидетельствует о лимфоме Беркитта. Иммунофенотип CD10(–), Bcl-2(+), Ki67<90% характеризует диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

Наличие отрицательной реакции с иммуноглобулинами легких цепей Ig(–) свидетельствует о зрелой В-клеточной лимфоме или лимфобластной лимфоме.

Иммунофенотип деоксинуклеотид трансфераза TdT(+), CD10(+) выявляет В-лимфобластную лимфому. Иммунофенотип деоксинуклеотид трансфераза TdT(–), CD10(–/+) указывает на диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

Положительная реакция с общими Т-клеточными антигенами (CD3, CD2, CD45RO) диагностирует Т-клеточную лимфому или лимфому из натуральных клеток-киллеров.

Иммунофенотип деоксинуклеотид трансфераза TdT(+) показывает Т-лимфобластную лимфому. Иммунофенотип деоксинуклеотид трансфераза TdT(–) определяет лимфому из зрелых T/NK клеток.

Иммунофенотип CD21(+) в фолликулярных дендритных клетках (FDC), CD10(+) свидетельствует о ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме. Иммунофенотип CD30(+), киназа анапластических лимфом ALK(+) говорит о анапластической крупноклеточной лимфоме.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабиченко И.И., Костанян И.А., Липкин В.М.* HLDF – новый маркер анапластических процессов в предстательной железе человека // В кн.: Рак предстательной железы. / Под ред. Н.Е. Кушлинского, Ю.Н. Соловьева, М.Д. Трапезниковой. – М: Изд. РАМН, 2002. – С. 289-305.

2. *Георгиев Г.П.* Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей // Соросовский образовательный журнал. – 2000. –Т. 6, № 11. –С. 1-7.

3. *Епифанова О.И.* Лекции о клеточном цикле. – Изд. КМК, 2003. – 160 с.

4. *Копнин Б.П.* Основные свойства неопластической клетки и базовые механизмы их возникновения. Российский онкологический сервер. (www.rosoncoweb.ru/library/01/02.htm).

5. *Костанян И.А., Осипова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М.* Выделение и изучение механизма действия пептидно-белковых факторов дифференцировки, вырабатываемых активированными клетками HL-60 // Цитология. – 1994. – Т. 36, № 6. – С. 525.

6. *Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю.* Гибель клетки (апоптоз). – М.: Медицина, 2001. – 192 с.

7. *Лысенко О.Н., Ашхаб М.Х., Стрижова Н.В., Бабиченко И.И.* Иммуногистохимические исследования экспрессии рецепторов к стероидным гормонам при гиперпластических процессах в эндометрии // Архив патологии. – 2004. – Т. 66, № 2. – С. 7-10.

8. *Мазуров В.И., Криволапов Ю.А.* Классификация лимфом, морфология, иммунофенотип, молекулярная генетика неходжкинских лимфом // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5. – С. 169-175.

9. *Побединский Н.М., Балтуцкая О.И., Омельяненко А.И.* Стероидные рецепторы нормального эндометрия // Акушерство и гинекология. – 2000 . – №3. – С. 5-8.

10. *Полак Дж., Ван Норден С.* Введение в иммуногистохимию: современные методы и проблемы. – М.: Мир, 1987. – С. 9-22.

11. *Райхлин Н.Т., Петров С.В., Чаиркин И.Н.* История иммуногистохимии // В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. – Казань, 2000. – С. 12-14.

12. *Самуилов В.Д.* Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 10. – С. 18-25.

13. *Семиглазов В.Ф., Нургазиев К.Ш., Арзуманов А.С.* Опухоли молочной железы (лечение и профилактика). – Алматы, 2001. –345 с.

14. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.* Рецепторы физиологически активных веществ. – Волгоград: Семь ветров, 1999. – 538 с.

15. *Угрюмов М.В.* Современные методы иммуноцитохимии и гистохимии. «Итоги науки и техники» ВИНИТИ, серия «Морфология». – 1991. – вып. 15. – 115 с.

16. *Франк Г.А.* Проблемы морфологической классификации и диагностики опухолей мягких тканей // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5. – С. 231-236.

17. *Фролова И.И., Бабиченко И.И., Местергази Г.М.* Цервикальные интраэпителиальные неоплазии и дискератозы шейки матки. – М.: Издательский дом «Династия», 2004. – 88 с.

18. *Хансон К.П., Имянитов Е.Н.* Эпидемиология и биология неходжкинских лимфом // Практическая онкология. – 2004. –Т. 5. – С. 163-169.

19. *Coons A.H., Kaplan M.H.* Localization of antigen in tissue cells // J. Exp. Med. – 1950. – V.91. – P. 1-13.

20. *Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N.* Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1941. – V. 47. – P. 200-202.

21. *Coons A.H., Leduc E.H., Connolly J.M.* Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit // J. Exp. Med. – 1955. – V. 102. – P. 49-60.

22. *Dabbs D.J.* Diagnostic Immunohistochemistry. 2-nd ed. – Elsevier, 2006. – 828 p.

23. *De Miguel M.P., Royuela M., Bethencourt F.R., Ruiz A., Fraile B., Paniagua R.* Immunohistohemical comparative analysis of transforming grows factor alpha, epidermal growth factor and epidermal grows factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates // Cytokine. – 1999. – V.11, N9. – P. 722-727.

24. *Graham R.C., Karnovsky M.J.* The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique // J. Histochem. Cytochem. – 1966. – V. 14. – P. 291-302.

25. *Guesdon J.L., Ternynck T., Avrameas S.* The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques // J. Histochem. Cytochem. – 1979. – V.27. – P. 1131-1139.

26. *Guesdon J.L., Ternynck T., Avrameas S.* The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques // J. Histochem. Cytochem. – 1979. – V. 27. – P. 1131-1139.

27. *Harris N.L., Stein H., Coupland S.E.* et al. New approaches to lymphoma diagnosis // Hematology 2001. – V.1. –P. 194-220.

28. *Kerr J.F.R., Wyllie F.N., Currie A.R.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics // Brit. J. Cancer. – 1972. – V. 26, № 2. – P. 239-257.

29. *Mar K.C. et al.* Cell proliferation marker MCM2, but not Ki 67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid // Histopathology. – 2006. – V. 48, N 7. – P. 801-807.

30. *Marrack J.R.* Nature of antibodies // Nature. – 1934. – V. 133. – P. 292-293.

31. *Marshall J.M.* Localization of adrenocorticotropic hormone by histochemical and immunochemical methods // J. Exp. Med. – 1951. – V. 94. – P. 21–30.

32. *Moll R.* Subcellular Biochemistry. Vol 31: Intermediate Filaments/ Ed. Herrmann and Harris. Plenum Press, New York, 1998. – P. 205-262.

33. *Nakane P.K., Pierce G.B.Jr*. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigen // J. Histochem. Cytochem. – 1966. – V. 14. – P. 929.

34. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. WHO Classification of Tumours. – 2006 . – V.5. – 427 p.

35. *Royuela M., De Miguel M.P., Bethencourt F.R., Sanchez-Chapado M., Fraile B., Paniagua R.* Transforming growth factor beta 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma // Growth Factors. – 1998. –V. 16, N 2. – P. 101-110.

36. *Sternberger L.A.* The unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In: Sternberger, L.A., Ed Immunocytochemistry. John Wiley, New York, 1979.-p. 104-169.

37. *Thornton A.D., Ravn P., Winslet M., Chester K.* Блокада ангиогенеза с помощью бевацизумаба и хирургическое лечение колоректального рака // Современная онкология. – 2007. – Т. 9, № 1. (www.consilium-medicum.com/media/onkology/07_01/49.shtml).

38. *Van Aken E., De Wever O., da Rocha A.S.C., Mareel M.* Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer // Virchows Arch. – 2001. – V. 439. – P. 725-751.

39. *Wood G.S., Warnke R.* Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems // J. Histochem. Cytochem. – 1981. – V. 29. – P. 1196-1204.

ОПИСАНИЕ КУРСА И ПРОГРАММА

1. Общее описание курса

Название курса: «Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста».

Цель курса. Классическая диагностика опухолей основана на гистологической оценке степени выраженности тканевого и клеточного атипизма. Учитывая уникальность генетических изменений в опухолевых клетках, патолог нередко сталкивается с трудностями в идентификации тканевой принадлежности опухоли и степени ее анаплазии. Подобные проблемы можно с успехом решать современными иммуногистохимическими методиками, поскольку большинство опухолей несмотря на клеточный и тканевой атипизм способны экспрессировать белки, специфичные для данного вида ткани.

Важным направлением молекулярной диагностики опухолей является определение чувствительности опухолей к гормональным воздействиям в организме. Этот вид исследований актуален при изучении эстрогеновых рецепторов в опухолях женской половой сферы и андрогеновых в опухолях предстательной железы. Выявление рецепторов к гормонам, позволяет оценить степень анапластических процессов в опухолевых клетках.

Апоптоз как уникальный генетически запрограммированный клеточный механизм привлекает ученых онкологов, прежде всего тем, что с его патологией может быть связан неограниченный опухолевый рост. В настоящее время известно большое количество факторов препятствующих развитию апоптоза (BCL-2, BCL-X) и способствующих его развитию (P53, BAX). Выявление подобных факторов, как правило, не позволяет оценить гистогенетическую принадлежность опухолевых клеток, но с достаточной определенностью свидетельствует о степени их анапластических изменений.

В связи с вышеизложенным, целью курса является фундаментальное обучение студентов и выпускников медицинских вузов новым методам иммуногистохимической диагностики опухолевых заболеваний человека, которые позволяют не только дать точную характеристику неопластического процесса, определить прогноз заболевания, но и предложить современные и адекватные методы лечения.

Задача курса, включая сведения:

Задачами курса являются:

– ознакомить слушателей с историей развития иммуногистохимии как науки;

– дать фундаментальные знания о строении и механизмах иммунологических реакций;

– рассказать об основных методических приемах подготовки тканей для проведения данного исследования (особенностях фиксации тканей, демаскирования антигенов, проведения иммуногистохимической реакции);

– описать основные требования к проведению данной процедуры и о возможных ошибках при интерпритации полученных результатов;

– дать характеристику основных цитоплазматических белков в неизменных и малигнизированных клетках;

– привести примеры изучения рецепторов к стероидным гормонам;

– описать маркеры клеточного цикла и апоптотические белки.

Данная разработка учебно-методического комплекса направлена на углубленное изучение медицины в качестве дополнительного образования, может быть теоретическим курсом по выбору по профилю патологическая анатомия и онкология

Инновационность курса.

Определяется тем фактом, что авторы данного курса активно занимаются научно исследовательской работой по разработке и внедрению в клиническую

практику новых иммуногистохимических методов. По данной теме опубликованы монографии:

Бабиченко И.И., Костанян И.А., Липкин В.М. HLDF- новый маркер неопластических процессов в предстательной железе человека. В кн.: Рак предстательной железы. /Под ред. Н.Е.Кушлинского, Ю.Н.Соловьева, М.Ф.Трапезниковой/- М.: Изд. РАМН, 2002, с.289-305;

Фролова И.И., Бабиченко И.И., Местергази Г.М. «Цервикальные интраэпителиальные неоплазии и дискератозы шейки матки» М.: Издательский дом «Династия», 2004. – 88 с.

И оригинальные статьи в ведущих отечественных и зарубежных журналах:

Ковязин В.А., Костанян И.А., Драницына С.М., Бабиченко И.И. Иммуногистохимическое исследование экспрессии факторов апоптоза и рецепторов к стероидным гормонам в эндометрии при нормальном менструальном цикле. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2006. - Т. 5, № 2. – С.12-17;

Лысенко О.Н., Ашхаб М.Х., Стрижова Н.В., Бабиченко И.И. Иммуногистохимические исследования экспрессии рецепторов к стероидным гормонам при гиперпластических процессах в эндометрии. Архив патологии 2004, Т. 66, № 2.- С.7-10.

Babichenko I.I., Lysenko O.N., Dranitsyna S.M., Kostanyan I.A. Simple endometrial hyperplasia: BCL-2, HLDF expression and clinical behavior. // Virchows Archiv, 2003, V. 443, N 3, P. 268.

Фролова И.И., Бабиченко И.И. Клинико-морфологические исследования дискератозов и предрака шейки матки.// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2003, Т. 2, № 3, с.19-24.

Babichenko I.I., Lysenko O.N., Dranitsyna S.M., Kostanyan I.A. Simple endometrial hyperplasia: BCL-2, HLDF expression and clinical behavior. // Virchows Archiv, 2003, V. 443, N 3, P. 268.

Фролова И.И., Бабиченко И.И. Клинико-морфологические исследования дискератозов и предрака шейки матки.// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2003, Т. 2, № 3, с.19-24.

Фролова И.И., Местергази Г.М., Радзинский В.Е., Шелястина Н.Н., Бабиченко И.И. Иммуногистохимические исследования дискератоза и неопластических изменений экзоцервикса при системной гинекологической патологии. Архив патологии, 2002, т.64, № 6, с.23-26.

Совместно с учеными ИБХ РАН был выявлен новый фактор дифференцировки клеток - HLDF. показано, что данный фактор иммуногистохимически выявляется в цитоплазме малегнизированных эпителиальных клеток предстательной железы человека и опухолях эндометрия. На данный способ диагностики была сделана Международная патентная заявка -International filing on patent 2000, N PCT/RuQO/00121, Lipkin V.M, Kostanyan LA., Dranitsyna S.M., Bogachuk A.P., Rodionov I.L., Babichenko I.I., Shelyastiria N.N. Antibodies to HLDF, methods of obtaining, peptide with antigemc and NA-hydrolizing properties and diadnostic method of anaplastic state of human cell.

Инновационность в методике преподавания заключается в том, что данный курс предлагает слушателям, фундаментальные знания в области иммунохимии, конкретные практические навыки, а также знакомит с оригинальными разработками авторов.

Инновационность по литературе заключается в том, что в ходе обучения слушатели познакомятся публикациями авторов настоящего курса.

Организация обучения будет проводиться в виде лекционных и семинарских занятий с использованием мультимедийной техники. Инновационность в организации обучения заключается в том, что кроме лекций и практических занятий в ходе самоподготовки слушатели должны будут самостоятельно подготовить реферативные доклады по тематике курса.

2. Программа курса

Темы лекций

Основы иммунохимии

Тема № 1. Введение. История развития метода. Основные фундаментальные знания в области иммунохимии (2 часа).

Тема № 2. Методические вопросы проведения иммуногистохимической реакции. Подготовка тканей. Фиксация, заливка. Демаскирование антигенов проведение иммуногистохимической реакции (2 часа).

Тема № 3. Оценка результатов иммуно-гистохимической реакции. Обработка полученных данных. Протоколы проведения реакции. Положительные и негативные контроли. Возможные проблемы при проведении реакции (2 часа).

Прикладные вопросы иммуногистохимии.

Тема № 4. Значение клеточных белков для выявления гистогенетической принадлежности опухолевых клеток (2 часа).

Тема № 5. Рецепторные белки в неизмененных и опухолевых клетках (2 часа).

Тема № 6. Белки – маркеры клеточного цикла (2 часа).

Тема № 7. Факторы апоптоза и пролиферации (2 часа).

Тема № 8. Белковые молекулы, характеризующие клеточную адгезию (2 часа).

Тема № 9. Иммуногистохимия ангиогенеза (2 часа).

Практические вопросы онкопатологии.

Тема № 10. Иммуногистохимическая характеристика опухолевых клеток. Опухоли из эпителия (2 часа).

Тема № 11. Выявление гистогенетической принадлежности опухолей мезенхимального происхождения (2 часа).

Тема № 12. Дифференциальная диагностика лимфом (2 часа).

Темы семинарских занятий по курсу

Теоретические и методические вопросы иммуногистохимии.

Тема 1. «Основы иммунологии» (3 часа).

1. Строение антител.
2. Получение антител.
3. Моно- и поликлональные антитела.

Литература:

1. Райхлин Н.Т., Петров С.В., Чаиркин И.Н. История иммуногистохимии. В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т.Райхлина /- Казань, 2000, с.12-14.

2. Хасанов Р.Ш. 2-я всероссийская школа-семинар по иммуногистохимической диагностике опухолей. – вопросы онкологии, 200. - т.46, №2. –с.247-248.

Тема 2. «Практические вопросы иммуногистохимии» (3 часа).

1. Условия необходимее для проведения иммуногистохимической реакции.
2. Методы фиксации тканей.
3. Демаскирование антигенов.
4. Подготовка срезов и проведение реакции.

Литература.

1. Полак Дж., Ван Норден С. Введение в иммуногистохимию: современные методы и проблемы. М. «Мир» 1987.- с. 9-22.

2. Киясов А.П. Методы иммуногистохимии. В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т.Райхлина /- Казань, 2000, с.15-38.

3. Угрюмов М.В. Современные методы иммуноцитохимии и гистохимии. «Итоги науки и техники» ВИНИТИ, серия «Морфология», 1991, вып.15.- 115 с.

Тема 3. «Протоколы проведения иммуногистохимических реакций» Контрольные вопросы. (3 часа).

1. Прямые методы.
2. Непрямые методы.
3. Протоколы проведения реакций.
4. Положительные и негативные контроли.
5. Интерпретация полученных результатов.

Литература.

1. Полак Дж., Ван Норден С. Введение в иммуногистохимию: современные методы и проблемы. М. «Мир» 1987.- с 22-47.

2. Киясов А.П. Методы иммуногистохимии. В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т.Райхлина /- Казань, 2000, с.15-38.

Прикладные вопросы иммуногистохимии.

Тема 4. «Значение клеточных белков в оценке гистогенеза опухолей» (3 часа).

1. Общие принципы диагностики.
2. Основные белки – маркеры.
3. Особенности экспрессии белков в различных тканях

Литература:

1. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Общие принципы иммуногистохимической диагностики и классификации опухолей. В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т.Райхлина /- Казань, 2000, с.39-57.

Тема 5. «Рецепторные белки клеток и их значение для онкологии» (3 часа).

1. Роль рецепторных белков в организме человека.
2. Рецепторы к стероидным гормонам.

3. Рецепторы к факторам роста.

Литература:

1. Побединский Н.М., Балтуцкая О.И., Омельяненко А.И. Стероидные рецепторы нормального эндометрия. // Акушерство и гинекология. - №3. - 2000. - С.5-8.

2. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. – Волгоград: «Семь ветров», 1999. – 538с.

3. Лысенко О.Н., Ашхаб М.Х., Стрижова Н.В., Бабиченко И.И. Иммуногистохимические исследования экспрессии рецепторов к стероидным гормонам при гиперпластических процессах в эндометрии. Архив патологии 2004, Т. 66, № 2.- С.7-10.

Тема 6. «Клеточный цикл и основные его маркеры» (3 часа).

1. Клеточный цикл.
2. Циклин-зависимые киназы.
3. Иммуногистохимические маркеры клеточного цикла.

Литература:

1. Епифанова О.И. «Лекции о клеточном цикле» Изд.: КМК, 2003, 160 с.

2. Mar K.C. et al. Cell proliferation marker MCM2, but not Ki 67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid.// Histopathology.- 2006.- Vol. 48 (7).- P. 801-807.

3. Копнин Б.П. Основные свойства неопластической клетки и базовые механизмы их возникновения. Российский онкологический сервер. (www.rosoncoweb.ru/library/01/02.htm).

Тема 7. Факторы апоптоза и пролиферации (3 часа).

1. Пути активации сигнала апоптоза.
2. Основные белки регуляторы апоптоза.
3. Маркеры пролиферации клеток.

Литература:

1. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). – М.: Медицина, 2001. – 192с.

2. Самуилов В.Д. Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных // Соровский образовательный журнал – 2001. – Т.7, №10. – С.18-25.

3. Бабиченко И.И., Костанян И.А., Липкин В.М. HLDF – новый маркер анапластических процессов в предстательной железе человека. // В кн.: Рак предстательной железы. /Под ред. Н.Е. Кушлинского, Ю.Н. Соловьева, М.Д. Трапезниковой/ М. Изд. РАМН. 2002. - С.289-305.

4. Райхлин Н.Т., Райхлин А.Н. Апоптоз – основные механизмы развития и роль в онкологической практике. В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина /- Казань, 2000, с.250-265.

Тема 8. Белковые молекулы, характеризующие клеточную адгезию (3 часа).

1. Межклеточные контакты. Кадхерины, их свойства. Основные группы кадхеринов. Е-кадхерин.

2. Кадхерин и молекулярные механизмы прогрессии опухолей.

3. Роль матриксных металлопротеиназ в прогрессировании и метастазировании рака

Литература.

1. Георгиев Г.П. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей. Соросовский образовательный журнал. 2000.-Т.6, №11,-с.1-7.

2. Van Aken E., De Wever O., da Rocha A.S.C., Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. // Virchows Arch. – 2001. – V.439. – P.725-751.

Тема 9. Иммуногистохимия ангиогенеза. Контрольные вопросы (3 часа).

1. Роль VEGF – фактора роста эндотелия сосудов в стимулировании опухолевого ангиогенеза.

Литература:

Thornton A.D., Ravn P., Winslet M., Chester K. Блокада ангиогенеза с помощью бевацизумаба и хирургическое лечение колоректального рака. Современная онкология. -2007, т.9, №1.- с (http://www.consilium-medicum.com/media/onkology/07_01/49.shtml).

Практические вопросы онкопатологии.

Тема 10. «Иммуногистохимическая характеристика опухолевых клеток. Опухоли из эпителия» (3 часа).

1. Классификация опухолевых клеток.
2. Иммуногистохимические маркеры плоскоклеточного и переходного эпителия.
3. Маркеры аденокарцином.

Литература:

1. Петров С.В., Райхлин Н.Т., Руководство по иммуногистохимической диагностике опухоли, Казань, Из-во Титул, 2004, с.110-117.
2. В.О.Магер, Н.В.Казанцева. Прогностическое значение биологических маркеров у больных поверхностным и инвазивным раком мочевого пузыря http://www.uroweb.ru/db/science/article/?id_article=69
3. А. Г. Юрин, Г. Б. Ковальский. Опухоли кишечника (классификации, частота, критерии злокачественности, прогноз, макро- и микроскопическое строение, использование иммуно-гистохимических маркеров для диагностики) // Библиотека патологоанатома. Науч.-практич. журнал – СПб, 2005. – Вып. 59. – 68 с.

Тема 11. «Выявление гистогенетической принадлежности опухолей мезенхимального происхождения» (3 часа).

1. Международная классификация опухолей.
2. Основные иммуногистохимические маркеры сарком.

Литература:

1. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. WHO Classification of Tumours. 2006, v.5.- 427 p.

2. Смирнов А.В. Иммуногистохимия в морфологичекой диагностике опухолей мягких тканей // Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. Петрова С.В. и Райхлина Н.Т. – Казань: Титул. 2004, с.189-237.

3. Франк Г.А. Проблемы морфологической классификации и диагностики опухолей мягких тканей. Практическая онкология 2004, Т.5, с.231-236.

Тема 12. Дифференциальная диагностика лимфом. Контрольные вопросы (3 часа).

1. Характеристика лейкозов и лимфом.
2. Основные маркеры В-клеточных опухолей.
3. Выявление Т-клеточных опухолей.

Литература:

1. Мазуров В.И., Криволапов Ю.А. Классификация лимфом, морфология, иммунофенотип, молекулярная генетика неходжкинских лимфом. Практическая онкология, 2004, Т.5, с. 169-175.

2. Тупицын Н.Н. Иммуноморфологическая диагностика гемобластозов. В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т.Райхлина /- Казань, 2000, с.149-165.

3. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология неходжкинских лимфом. Практическая онкология, 2004, Т.5, с. 163 -169.

Темы самостоятельных работ

1. Получение поликлональных и моноклональных антител.
2. Методы выявления комплекса антиген-антитело на гистологических препаратах.
3. Способы двойного окрашивания гистологических препаратов.

4. Способы устранения неспецифического окрашивания срезов.

5. Значение цитокератинов при исследовании гистогенеза опухолей.

6. Роль белков рецепторов к эстрогенам и прогестерону в практической онкологии.

7. Рецепторные белки к эпидермальному фактору роста. Значение для диагностики и лечения раковых опухолей.

8. Характеристика рецепторных белков к андрогенам и их значение для лечения рака предстательной железы.

9. Диагностическое значение маркеров пролиферации: Ki-67, MDM2 и циклин D1.

10. Про- и антиапоптотические белки клеток и особенности их экспрессии в неопластических тканях.

11. Проапоптотический белок P53 маркер анапластических изменений в опухолевых клетках и их чувствительности к химеотерапии.

12. Особенности функционирования Е-кадхериновой системы в доброкачественных и злокачественных опухолях человека.

13. Значение для опухолевого роста гиперэкспрессии фактора роста сосудов VEGF.

14. Цитокератины в диагностике гистогенетической принадлежности злокачественных опухолей различных органов.

15. Иммуногистохимический анализ виментин- и десмин-позитивных опухолей.

16. Дифференциальная диагностика ходжкинских и нежоджкинских лимфом.

17. Иммуногистохимическая характеристика Т-клеточных лимфом.

18. Основные маркеры В-клеточных лимфом.

19. MALT –лимфомы, признаки злокачественности.

20. Основные молекулярно-генетические принципы терапии опухолевого роста.

Описание системы контроля занятий

По итогам занятий планируется провести разбор рефератов слушателей и

Провести три письменных тестирования слушателей по 3 вопроса в каждом варианте, с разбором правильных и неправильных ответов слушателей на темы:

1. Теоретические и методические вопросы иммуногистохимии (1 час).
2. Прикладные вопросы иммуногистохимии (2 часа).
3. Практические вопросы онкопатологии (2 часа).

По окончании каждого раздела выдается контрольные задания в форме тестов.

Примеры тестовых заданий и их выполнения:

Вариант №1.

I. Выберете способы демаскирования антигенов:

1) автоклав;
2) микроволновка;
3) обработка ферментом;
4) все перечисленное.

II. В процессе работы ксилол используется для:

1) удаления парафина;
2) обезвоживания ткани;
3) удаления эндогенной пероксидазы;
4) проявления иммуногистохимической реакции.

III. Диффузная коричневая окраска по всему срезу препарата свидетельствует о:

1) неспецифической реакции;

2) выраженной реакции;

3) высокой концентрации первичной сыворотки;

4) неправильно проведенном порядке нанесения сывороток.

IV. Перечислите основные белки-регуляторы апоптоза:

1) P53;

2) Ki-67;

3) BCL-2;

4) VEGF;

5) CK20.

V. Перечислите молекулярно-диагностические маркеры эпителиальных клеток:

1) S-100;

2) HMB-45;

3) Цитокераины;

4) Десмин;

5) CD45.

VI. Маркер Ki-67 характеризует:

1) апоптотическую активность;

2) пролиферативную активность;

3) адгезивные свойства;

4) принадлежность к определенному гистотипу ткани.

VII. Фиксацию тканей проводят:

1) нейтральным формалином;

2) ацетоном;

3) раствором Корнуа;

4) все перечисленное.

VIII. Перекись наносят перед:

1) демаскированием антигенов;
2) нанесением первичной сыворотки;
3) нанесением вторичной сыворотки;
4) нанесением ДАБ.

IX. Перечислите молекулярно-диагностические маркеры мышечных клеток:

1) Виментин;
2) HMB-45;
3) Гладко-мышечный актин;
4) Десмин;
5) CD45.

X. Перечислите маркеры инвазии и метастазирования:

1) Е-кадхерин
2) BAX
3) Металлопротеиназы
4) P21
5) CD44

ОТВЕТЫ:

I. 4; II. 1; III. 1; IV.1,3; V. 3; VI. 2; VII. 4; VIII.2; IX. 3,4; X. 1,3

Примеры вопросов:

1. Что такое моноклональные антитела?
2. Какие существуют методы проведения иммуногистохимической реакции?
3. Что такое демаскирование антигенов?
4. Зачем нужен положительный контроль?
5. Каков механизм действия стероидных гормонов?
6. Что такое иммуногистохимическая панель?

Балльная структура оценки:

Посещение занятий – 12 баллов;

Активная работа на семинаре -24 балла;

Курсовая работа - 34 балла;

Контрольные занятия -30 баллов

Всего- 100 баллов.

Шкала оценок: A (5) – 91-100 баллов; B (4) -71-90 баллов; C (3) – 51-70 баллов; D (2) – 50 баллов и менее.

Пояснение оценок:

A – Освоение теоретического материала и практических навыков отлично;

B - Освоение теоретического материала и практических навыков хорошо;

C – Освоение теоретического материала и практических навыков удовлетворительно;

D – прослушал курс.

УЧЕБНО-ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН КУРСА

№ темы	НАИМЕНОВАНИЕ ТЕМЫ	Количество часов			
		Всего	Лекции	Семинарские занятия	Самост. подготовка
1	Введение. История развития метода. Основные фундаментальные знания в области иммунохимии (2 часа).	6	2	3	1
2	Методические вопросы проведения иммуногистохимической реакции. Подготовка тканей. Фиксация, заливка. Демаскирование антигенов. Проведение иммуногистохимической реакции (2 часа).	6	2	3	1
3	Оценка результатов иммуно-гистохимической реакции. Обработка полученных данных. Протоколы проведения реакции. Положительные и негативные контроли. Возможные проблемы при проведении реакции (2 часа).	6	2	3	1
4	Прикладные вопросы иммуно-гистохимии. Значение клеточных белков для выявления гистогенетической принадлежности опухолевых клеток (2 часа).	6	2	3	1
5	Рецепторные белки в неизмененных и опухолевых клетках (2 часа).	6	2	3	1
6	Белки – маркеры клеточного цикла (2 часа).	6	2	3	1
7	Факторы апоптоза и пролиферации (2 часа).	6	2	3	1
8	Белковые молекулы, характеризующие клеточную адгезию (2 часа).	6	2	3	1
9	Иммуногистохимия ангиогенеза (2 часа).	6	2	3	1
10	Иммуногистохимическая характеристика опухолевых клеток. Опухоли из эпителия (2 часа).	6	2	3	1
11	Выявление гистогенетической принадлежности опухолей мезенхимального происхождения (2 часа).	6	2	3	1
12	Дифференциальная диагностика лимфом (2 часа).	6	2	3	1
	ВСЕГО: 2 кредита	72	24	36	12