

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

*С.В. Петров, Н.В. Балатенко, Н.Ф. Козырева, Г.И. Винокурова, Ф.М. Мазитова,
Р.Ш. Хасанов, Н.Т. Райхлин*

*Клинический онкологический центр (главврач — Р.Ш. Хасанов) МЗ РТ,
отдел патологической анатомии (зав. — проф. Н.Н. Петровицев)
НИИ клинической онкологии (директор — проф. М.И. Давыдов)
Онкологического научного центра РАМН, г. Москва*

Рост частоты злокачественных новообразований и возрастающие в связи с этим требования к диагностике и лечению опухолей предполагают использование самых последних достижений в мировой науке. Одним из новых методов морфологической диагностики новообразований является иммуногистохимия (ИГХ) опухоли, основанная на иммунологических реакциях выявления в опухолевых клетках большого ряда специфических антигенов [10—12]. Применение ИГХ в практической работе онкоморфолога позволяет осуществлять диагностику с позиций молекулярной патологии.

Дифференциальная диагностика новообразований человека с помощью ИГХ основывается на фундаментальных особенностях опухолевого роста, к которым относится сохранение экспрессии функционирующих генов (для ряда белков) в условиях злокачественной трансформации клетки [8, 12]. Это проявляется в сходстве фенотипа опухолевых клеток и их нормальных аналогов: эпителиальные, мышечные, сосудистые и другие опухоли имеют соответствующие наборы иммуногистохимических признаков. Значительное число белков, выявляемых в опухолях с помощью ИГХ, кодируется отдельными функциональными генами, экспрессия которых подчиняется определенным правилам. Например, экспрессия генов, кодирующих белки промежуточных филаментов (ПФ), имеет достаточно строгую тканеспецифичность (промоторы цитокератиновых генов активны в эпителиях, промотор гена виментина — в тка-

нях, происходящих из мезенхимы, промотор десминового гена — в мышцах и т.д.) [2, 8, 11]. В то же время для экспрессии генов ряда других маркеров (белка S100, ЭМА, NSE и др.) строгой закономерности не существует [12].

Необходимо отметить, что ИГХ, являясь дополнительным методом диагностики, в большинстве случаев не позволяет разграничить неопластические и неопухолевые процессы, злокачественные и доброкачественные новообразования, поэтому подобные задачи решают с помощью оценки обычных цитоморфологических критериев [1, 2, 3, 7]. Однако ИГХ оказалась чрезвычайно полезной для определения гистогенеза анапластических опухолей, тканевого и/или клеточного происхождения метастазов при невыявленном первичном очаге, очагов микроинвазии и дефектов базальных мембран, степени пролиферации и агрессивности опухоли [1, 4—7, 9, 12]. С помощью ИГХ мы приблизились к заветной цели онкоморфологов — альтернативной диагностике опухоли, позволяющей во многих случаях однозначно высказываться о природе и характере новообразований.

Для ИГХ анализа опухолей применяется широкий спектр маркеров, к которым можно отнести следующие: тканеспецифичные (белки промежуточных филаментов — ПФ, компоненты базальной мембраны — ВМ, рецепторы и др.), цитоспецифичные (CD-антигены лейкоцитов, миоглобин, гладкомышечный актин и др.), маркеры пролиферации (Ki-67, PCNA и др.), опухолеассоциированные антигены (CA 15-3,

Иммуногистохимическая диагностика опухолей

Виды опухолей	Число ответов	%
Патология лимфоидной и кроветворной тканей всего	79	26,3
в том числе		
В-клеточные лимфосаркомы	36	45,6
Т-клеточные лимфосаркомы	6	7,6
лимфогранулематоз	12	15,2
другие	9	11,4
Реактивная гиперплазия лимфоидной ткани	16	20,2
Раковые новообразования всего	55	18,3
в том числе		
первичные	34	61,8
в метастазах при невыявленном первичном очаге	21	38,2
Опухоли мягких тканей всего	48	16
в том числе		
шванномы	14	29,2
миосаркомы	10	20,8
прочие	24	50
Прочие опухоли	58	19,3
Неопухолевая патология	24	8
Необходимо повторить ИДО	36	12
Всего	300	
Гистогенез опухоли не установлен при первичном исследовании	36	12
окончательно	4	1,3

СА 125, СА 19-9 и др.), опухолевые маркеры — онкофетальные антигены (альфа-фетопротеин, РЭА и др.), гормоны, ферменты, а также белковые продукты клеточных онкогенов и анти-онкогенов, вирусных онкогенов. Некоторые иммуногистохимические маркеры имеют специфическую ультраструктурную локализацию, в то же время другие располагаются либо на различных оргanelлах, либо в цитозоле или внеклеточно.

Наиболее часто для иммуногистохимического анализа опухолей используют антитела к белкам ПФ. Установлены следующие закономерности их экспрессии в новообразованиях человека [8, 11].

1. В опухолях в основном сохраняется тканеспецифическая экспрессия генов белков ПФ (цитокератины — в раках, десмин — в мышечных саркомах и т. д.).

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

3. Различные наборы цитокератинов

позволяют разделять раковые опухоли по их происхождению и уровню дифференцировки.

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

В иммуногистохимической лаборатории Клинического онкологического центра Татарстана с 1996 г. проводится диагностика опухолей (ИДО) человека на текущем биопсийном материале (около 300 иммуногистохимических диагностических наблюдений в год). На исследование направлялись только те новообразования, верификация которых для онкоморфолога представляла значительные трудности.

Мы выполнили ИГХ исследование широкого ряда опухолей человека (рака различного генеза, сарком, лимфом, меланом) с помощью панели из 40 поли- и моноклональных антител к

различным ткане-цитоспецифическим антигенам, опухолевым маркерам, белковым продуктам экспрессии клеточных онкогенов и антионкогенов (см. табл.).

Из большого числа маркеров мы выбрали 4 антитела, с помощью которых нам удалось разделить новообразования по их тканевому происхождению. Для этого были использованы МКАТ к виментину, цитокератинам, белку S100, общему лейкоцитарному антигену. ИГХ анализ первичных низкодифференцированных опухолей позволил нам во всех случаях установить тканевое происхождение новообразований. Если ИГХ реакция оказывалась везде положительной или везде отрицательной, то это расценивалось нами как артефакт и ИГХ исследование мы повторяли. При положительной реакции только на виментин ставили диагноз саркомы либо саркомы, на виментин и S100 — меланомы либо липосаркомы. Если положительная окраска на виментин сочеталась с реакцией на общий лейкоцитарный антиген (ОЛА) и в редких случаях на низкомолекулярные цитокератины, то новообразование являлось лимфомой. Положительная реакция на цитокератины и в виде исключения на S100 и виментин была свойственна низкодифференцированному раку, герминоме, а также (в виде казуистики) другим опухолям.

С помощью ИГХ удалось разделить цитокератин-позитивные опухоли на переходноклеточные, плоскоклеточные, нейроэндокринные раки, аденокарциномы и мезотелиому. Если положительная реакция на цитокератины, характерные для плоского эпителия (ЦКР-плоск.), сочеталась с положительной реакцией на цитокератины, присущие однослойным (простым) эпителиям (ЦКР-прост.), то мы диагностировали переходноклеточный рак либо (изредка) некоторые протоковые аденокарциномы. Если иммунофенотип опухоли был ЦКР-плоск.(+), а ЦКР-прост (-), то мы ставили диагноз плоскоклеточного рака кожи либо ротоглотки, пищевода, шейки матки, гортани. Сочетание положительной реакции на широ-

кий спектр цитокератинов с окрашиванием на виментин было характерно для мезотелиомы либо синовиальной или эпителиоидной саркомы, либо для некоторых видов рака щитовидной железы, почки и др. В случаях коэкспрессии ЦКР-прост. с ОЛА мы предполагали анапластическую крупноклеточную лимфому; диагноз последней уточняли с помощью антител к CD-30. Если положительная реакция на ЦКР-прост. сочеталась с негативной окраской на ЦКР-плоск., то эта опухоль являлась аденокарциномой, которую в дальнейшем тестировали на РЭА. Ярко-положительная реакция на РЭА характерна для рака толстой кишки, желудка, поджелудочной железы, мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, легкого (плоскоклеточного крупноклеточного варианта), холангиогенного рака. Отрицательная реакция на РЭА наблюдается в клетках аденокарциномы простаты, щитовидной железы, яичника, почки, печени, а также в эндокринноклеточных, герминогенных новообразованиях и хорионэпителиоме.

Дальнейшую диагностику с целью определения органной локализации анапластической опухоли, имеющей иммунофенотип РЭА+, ЦКР-прост.+, проводили с помощью органоспецифических маркеров. Например, при раке простаты выявляются специфический антиген простаты (PSA) и щелочная фосфатаза, специфичная для простаты (PAP) [6, 12], при раке щитовидной железы — тиреоглобулин, в клетках печеночноклеточного рака — альфа-фетопrotein, рака яичника — ОС 125, хорионэпителиомы — хорионический гонадотропин. Клетки нейроэндокринного рака легкого, щитовидной железы (медулярный рак), островковой части поджелудочной железы, передней доли гипофиза, парашитовидной железы экспрессируют нейронспецифическую енолазу (NSE), синаптофизин, хромогранин, бомбезин и соответствующие специфические гормоны [3, 9, 12].

При сочетанном применении иммуногистохимического анализа и гибридизации *in situ* в опухоли из эндокринных клеток можно различать: а) клетки, вырабатывающие гормоны (определяются по синтезу мРНК), но не накапливающие их; б) клетки, не продуцирующие гормоны, но накапливающие их; в) клетки, синтезирующие и хранящие гормоны.

Последующая идентификация опухолей с фенотипом ЦКР-прост.+, РЭА+, а также таких видов, как рак молочной железы, проводится с помощью набора антител к ЭМА, лактальбумину, рецепторам эстрогенов/прогестерона, антигену BRST2, CU18 [12]. Органоспецифических маркеров рака легкого (плоскоклеточного крупноклеточного), мочевого пузыря, шейки матки, желудка, поджелудочной железы, билиарного тракта не существует [12]. В то же время для рака толстой кишки описан специфичный антиген—СОТА (colon-ovarian tumor antigen) [12].

Существует ряд маркеров, применяемых для диагностики опухолей щитовидной железы. Антиген 2G4, представляющий собой опухолевый тиреоглобулин, с высокой эффективностью применяется для диагностики фолликулярного рака [12]. Необходимо отметить, что малодифференцированные раки щитовидной железы дают негативную реакцию на тиреоглобулин, так как в них обнаруживается низкий уровень соответствующей мРНК.

Положительные на виментин и ЦКР-негативные недифференцированные мягкотканые опухоли являются новообразованиями мезенхимальной природы (лимфомы, меланомы, саркомы) либо нейрогенными опухолями.

Анапластические опухоли, дающие окраску на виментин, были подразделены на лимфомы (Т- и В-клеточные), меланому (реагирует с антителами к S100 протеину), миогенные саркомы (позитивная реакция на гладкомышечный актин, десмин, миоглобин), ангиосаркомы (реагирующие с антителами к фактору VIII свертывания крови), зло-

качественную фиброзную гистиоцитому — ЗФГ (экспрессирует альфа-1-антитрипсин, лизоцим, белок S100), фибросаркому (реагирует только с виментином). Плеоморфная липосаркома, некоторые шванномы, хондросаркома в ряде случаев, кроме виментина, экспрессировали белок S100. Лейо- и рабдомиомы можно выявлять раздельно: антитела к гладкомышечному актину окрашивают клетки лейомиосаркомы, а антитела к миозину — клетки рабдомиосаркомы. Альвеолярная саркома мягких тканей окрашивается на виментин и десмин.

Общим маркером для диагностики лимфом является антиген CD-45 (ОЛА — общий лейкоцитарный антиген). Некоторые лимфомы могут быть негативны на ОЛА, а некоторые опухоли, не относящиеся к лимфомам, могут давать положительную окраску на этот маркер. Поэтому при позитивной реакции на ОЛА необходимо дополнительно окрасить опухоль на Т- и В-маркеры. Опухолевые клетки при лимфогранулематозе характеризуются специфической для этого заболевания экспрессией CD-15, CD-30, BLA 36 и других антигенов.

Маркерами клеток меланомы являются антиген HMB-45 и белок S100. Последний для меланомы менее специфичен и может обнаруживаться в клетках ряда других опухолей (липосарком, хондросарком, шванном, нейрофибром, а также в новообразованиях слюнных, молочных желез). Необходимо отметить, что по отношению к клеткам меланомы антитела к HMB-45 (по сравнению с S100) более специфичны, но менее чувствительны. Поэтому в практической работе рекомендуется использовать сочетание этих маркеров. Окрашивание на S100 беспигментной меланомы более яркое, чем пигментированных опухолей, однако эти антитела не позволяют отличить меланоцитарную дисплазию от меланомы. Отмечено существование парадоксов в иммуногистохимии опухолей. Например, некоторые низкодифференцированные гепатомы могут быть цитокератин-негативными, а эндокринные опухоли с небольшим количеством сек-

реторных гранул могут давать ложнонегативные реакции на хромогрин, си-наптофизин и другие маркеры.

При функциональной характеристике апудом могут возникнуть затруднения из-за того, что антитела к различным гастроинтестинальным гормонам нередко дают перекрестные реакции. Подобные эффекты объясняются происхождением этих гормонов от общих предшественников, наличием у ряда гормонов гомологичных аминокислотных последовательностей (у холецистокинина и гастрина). Кроме того, отмечена одновременная экспрессия двух генов, кодирующих различные гормоны, которые упаковываются в нейросекреторные гранулы одного типа (это относится к кальцитонину и соматостатину в некоторых С-клеточных раках щитовидной железы). И, наконец, существуют популяции апудоцитов, содержащие секреторные гранулы различных типов.

К трудностям, специфическим для опухолевого роста, мы отметили: 1) ко-экспрессию маркерных белков, что дает "смешанный" иммунофенотип опухоли (например, ЦКР+, виментин+, нейрофиламенты+, десмин+ в группе PNET); 2) низкий уровень экспрессии (или его снижение) маркерных белков при прогрессии новообразования; 3) пост-трансляционную модификацию и/или блокирование синтеза маркерных полипептидов на разных этапах роста опухоли; 4) отсутствие для многих мягкотканых опухолей специфических маркеров (фибро-липо-хондросаркомы, гемангиоперицитома и др.); 5) смешанный клеточный состав (В-лимфосаркомы с выраженной инфильтрацией Т-лимфоцитами и/или гистиоцитами; лимфома Леннерта и др.); 6) изменение спектра выявляемых маркеров при лечебном патоморфозе (например, повреждение цитоскелета раковых клеток после облучения вызывает негативную реакцию на цитокератины при сохранении окраски на ЭМА).

Ограничениями методического характера являются маскировка антиген-

ных детерминант из-за длительной фиксации, процедуры заливки в парафин, длительного хранения архивных блоков, а также перекрестное реагирование некоторых моноклональных антител с клеточными типами, не связанными с иммуногеном, и реагирование многих моноклональных антител с соответствующими эпитопами только на криостатных срезах.

Для устранения влияния на результат ИГХ диагностики технических особенностей рекомендуется добиваться "корректного" окрашивания ткани или клеток. Например, ОЛА должен локализоваться на цитолемме, а рецепторы эстрогенов и прогестерона — в ядрах. Иная реакция свидетельствует о методической ошибке и требует повторного ИГХ исследования. В то же время для белка S100 стандартной внутриклеточной локализации не существует: клетки меланомы могут давать цитоплазматическую реакцию, а нейроэндокринного рака — ядерную.

Мы предлагаем для "внутреннего" контроля сохранности тканевых антигенов использовать антитела к ламинам А, В, С (ядра клеток в строме и паренхиме должны всегда окрашиваться). В будущем предполагается стандартизировать подходы к ИГХ анализу новообразований, продолжить поиск клеточных маркеров озлокачествления, внедрить ИГХ в практическую работу морфологических отделений специализированных клиник. Для этого рекомендуется создание иммуногистохимических групп или лабораторий, работающих в составе отделений патоморфологии, которые должны снабжаться необходимым набором реактивов и иметь соответствующее приборное обеспечение. Несмотря на очевидные успехи иммуногистохимической диагностики опухолей человека, мы находимся в конце начального этапа применения в практической онкоморфологии методов молекулярного маркирования.

ВЫВОДЫ

1. Иммуногистохимия опухолей является новым этапом в развитии диаг-

ностической онкологии, поскольку позволяет морфологически верифицировать практически все новообразования человека.

2. Необходимо строго следовать принципам иммуногистохимического анализа опухолей, обращая внимание на его трудности и ограничения.

3. Требуется дальнейшая разработка фундаментальных и прикладных аспектов иммуногистохимии опухолей человека, а также постепенная адаптация новых молекулярно-биологических подходов (гибридизация *in situ* и др.) к требованиям практической онкологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус Т.А., Литвинова Л.В., Франк Г.А.// Арх. патол. — 1994. — № 1. — С. 46—50.
2. Гельштейн В.И., Чипышева Т.А., Ермилова В.Д. и др.// Арх. патол. — 1990. — № 9. — С. 12—18.
3. Казанцева И.А., Калинин А.П., Полякова Г.А. и др.// Арх. патол. — 1995. — № 3. — С. 31—35.
4. Петров С.В., Райхлин Н.Т., Серре Г., Смедтс Ф.// Арх. патол. — 1995. — № 5. — С. 47—53.
5. Петров С.В., Райхлин Н.Т., Серре Г., Смедтс Ф.// Арх. патол. — 1996. — № 2. — С. 13—31.
6. Романенко А.М., Воробьева Л.Р.// Арх. патол. — 1995. — № 4. — С. 38—42.
7. Смирнов А.В., Соколова И.Н.// Арх. патол. — 1995. — № 5. — С. 14—21.
8. Трояновский С.М., Банников Г.М. Промежуточные филаменты в норме и патологии/ИНТ ВИНТИИ сер. "Общие проблемы физико-химической биологии". — 1989. — 187 с.

9. Франк Г.А., Казеалу Я.С.-В., Пуйрсоо А.О. и др.// Арх. патол. — 1992. — № 3. — С. 12—16.

10. De Lellis R.A. Diagnostic immunohistochemistry. — N.-Y., 1988.

11. Ramaekers F., Smedts F., Vooijs G.P. In: Current Persp. in Molecular and Cellular Oncology. Ed. by Spandidos D., JAI Press, London. — 1992. — P. 285—318.

12. Taylor C.R. and Cote R.J. (Eds.) Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. — 2-nd edition. W.B. Saunders, 1994.

Поступила 12.05.97.

FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS OF TUMORS IN A PERSON

S.V. Petrov, N.V. Balatenko, N.F. Kozyreva,
G.I. Vinokurova, F.M. Mazitova, R.Sh. Khasanov,
N.T. Raikhlin

S u m m a r y

The role of immunohistochemistry in the solution of a series of clinical oncology problems is studied on the basis of 300 observations taking into account current demands of histogenetic diagnosis of tumors. The most rational schemes of immunohistochemical diagnosis based on the use of minimum set of antibodies at the first and second stages of the study are given. The importance of the use of immunohistochemistry in differential histogenetic diagnosis of the most widely met tumors of a person is emphasized. This method significantly extends the possibilities of morphological verification of tumors. The prospects of the development of histochemistry for oncologic clinics are considered.