



Факултет медицинских наука
Универзитет у Крагујевцу

ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ ПРОЦЕДУРЕ У ИСТРАЖИВАЊУ БОЛЕСТИ УНУТРАШЊИХ ОРГАНА

Слободанка Љ. Митровић

основна мисија патохистологије:

“Тачна, благовремена и
савремена дијагностика, сваком
пацијенту у сваком тренутку.”

■ *Heidenhain* (1896) – / (H&E)



”

“

,

,

H&E

,

.

ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИ МЕТОД

- ИХХ је потпуно изменила дијагностичку процедуру у патологији.
- Због својих могућности, сензитивности и специфичности, потиснула је многе конвенционалне методе.

Ниједна од техничких процедура није имала тако снажан, дуготрајан и значајан утицај на свакодневну патолошку праксу као имунохистохемија.

Није претерано рећи да се ради о револуцији, нарочито у патологији тумора.

Juan Rosai

ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИ МЕТОД

- Имунохистохемија је молекуларна техника која комбинује принципе имунологије и биохемије у циљу идентификације молекула и структура у ткивима.
- Метода откривања ћелијских и ткивних антигена путем антиген-антитело реакције

ИСТОРИЈАТ

- Од првог описа имунохистохемијске процедуре **1942** године, начињени су значајни кораци који су омогућили да имунохистохемија постане приступачна и незаменљива техника у патохистолошким лабораторијама широм света.
- Најзначајнији кораци у развоју имунохистохемије су :
 - 1942. - Coons, Creech, Jones i Berliner – Развијају технику индиректне имунофлуоресценције за идентификацију пнеумококног антигена у ткиву
 - 1959. - Singer - коњугат високе електронске густине
 - 1966. - Graham i Karnovsky - Развија методу везивања ензима за протеине (*enzyme tagging method - horseradish peroxidase*)
 - 1968. **Nakane i Pierce** - техника обележавања антитела ензимом (*enzyme-labelled antibody technique immunoperoxidase*)

ИСТОРИЈАТ

Nakane i Pierce 1968. :



(),

(DAB) ,



, , ,

.

ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИ МЕТОД

■ (*“one step”*)
()

■

■

(,)

ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИ МЕТОД

- (,) ()
- ().
- .
- ,
- .

- необележено прим. антитело везује за антиген (први корак), потом се на њега везује секунд. антитело које је обележено ензимом (други корак и у њему је прим. антитело практично постало антиген)
- на крају се додаје супстрат хромогена који реагује са ензимом којим је обележено секундарно антитело и мења боју те је омогућена визуелизација места везивања.

- идентична са претходном, али се додају два секундарна антитела обележена ензимом једно за другим.
- Додавање трећег слоја антитела служи како би се даље појачао сигнал, будући да је још антитела у стању да се веже за секундарно антитело.
- Процедура је од користи при бојењу антигена са ограниченим бројем епитопа и једноставан је начин за даље повећање интензитета бојења у односу на друге технике.

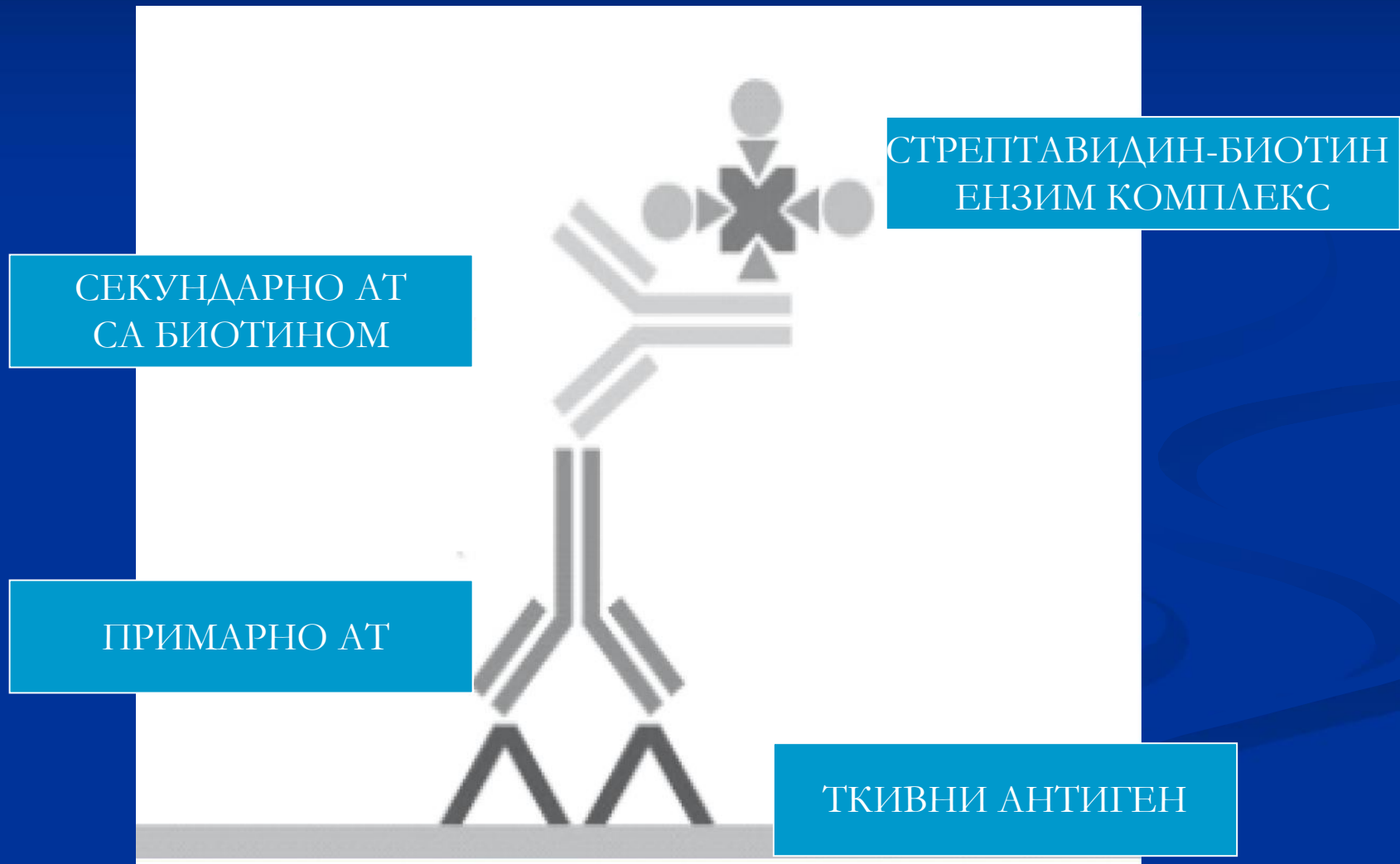
■ **РАР** и **АРААР** () - **РАР**
- , **АРААР**

■ **АВС** (*vidin-biotin complex*) -
,

■ **LSAB** -
(*Labeled Streptavidin-Biotin*) ,

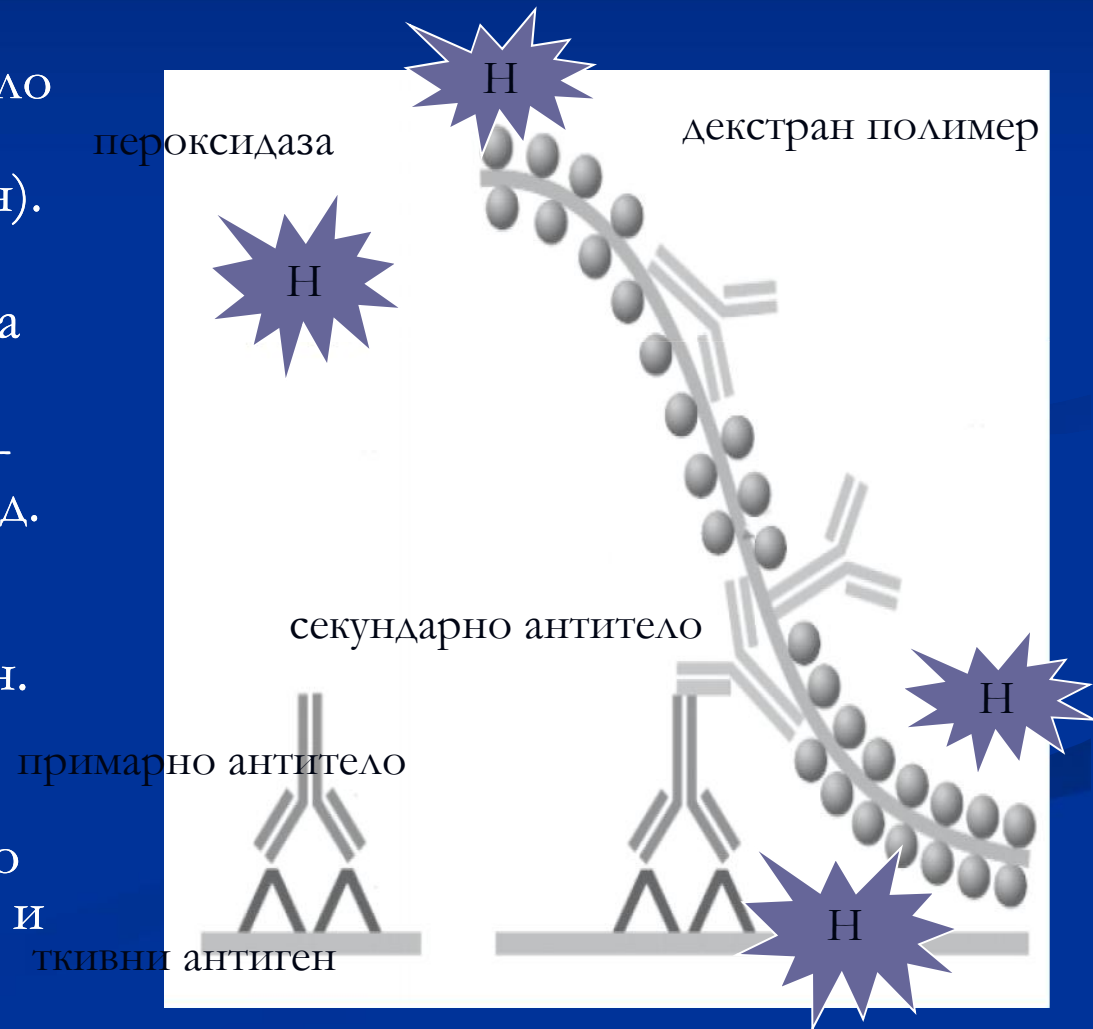
/

LSAB



Индиректна техника ланчаног полимера (EnVision*).

- Ова техника користи некоњуговано примарно антитело и секундарно антитело коњуговано са ензимом и ланчаним полимером (декстран).
- Ланац декстрана везује око 70 молекула ензима и 10 молекула антитела.
- Истовремено везивање и анти-мишијих и анти-зечијих секунд. антитела омогућава употребу истог реагенса и са моноклонским и са поликлон. антителима.
- Метод је брз, лак и поуздан за рад, уз високу осетљивост, тако да стиче све већу популарност и потискује LSAB технике.

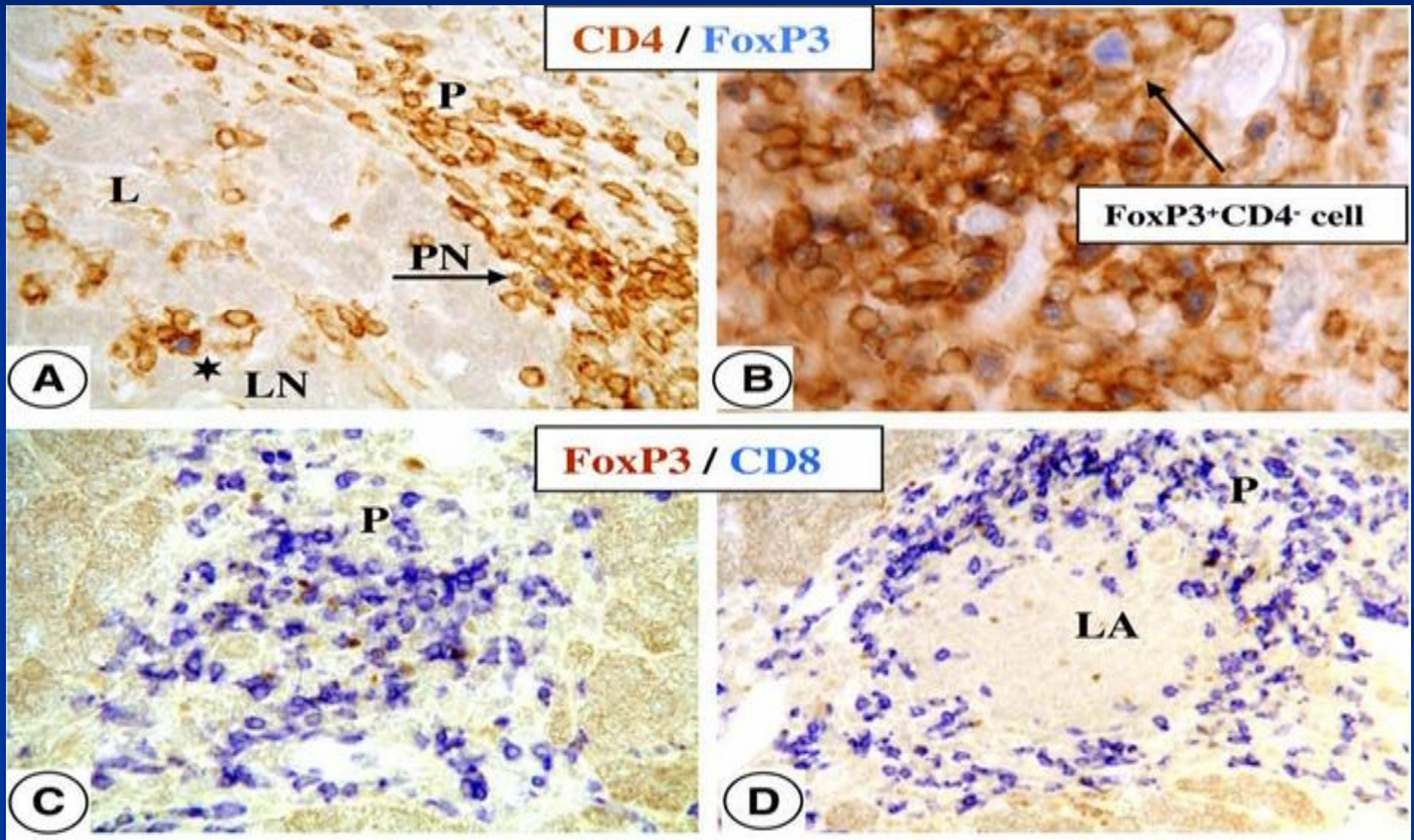


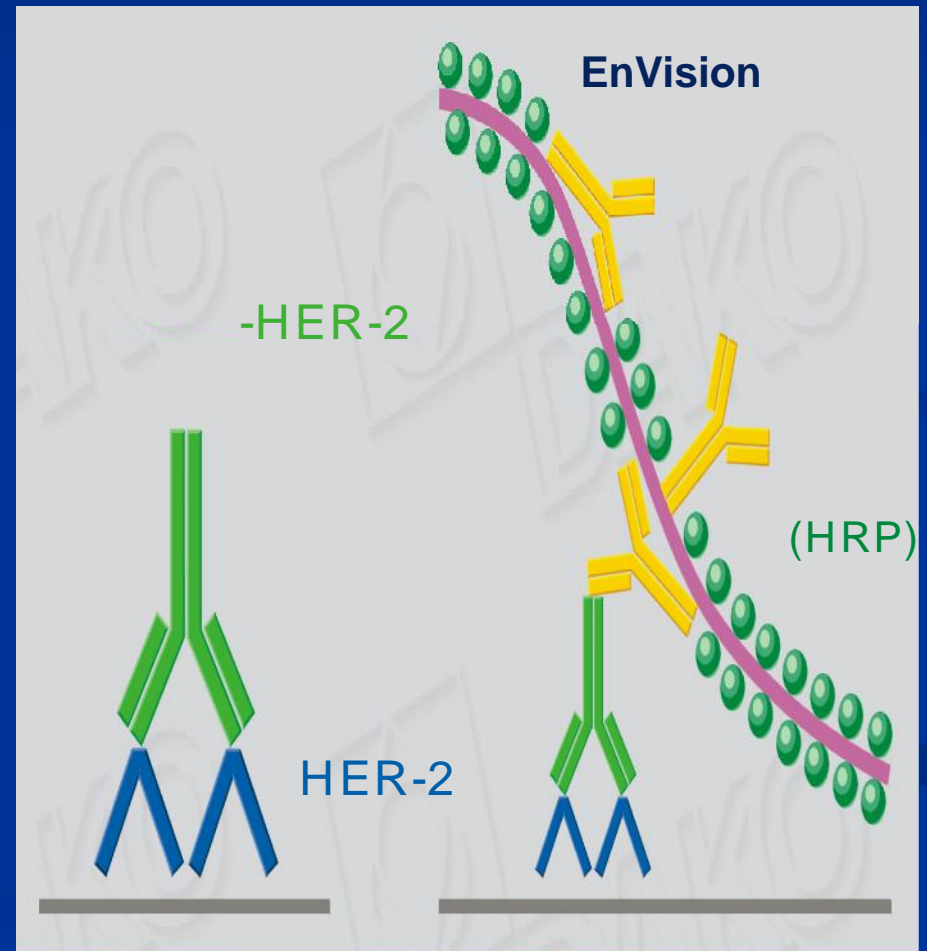
- Имунохистохемијске технике настављају са де развијају, њихове апликације у патологији и научним истраживањима су све вредније.
- Методе амплификације су допринеле да се рутински идентификују протеини за које се веровало да су изгубљени у процесима фиксације
- Како технологија напредује, нови маркери ткива се појављују као оруђе које истраживачима олакшава нова открића.
- Тиме је олакшано разумевање биологије и патогенезе бројних болести.

вишеструко (мултипло) ИХХ бојење (*multi-staining immunohistochemistry -MSI*).

- (, ,).
- () .
- ,
- , . ,

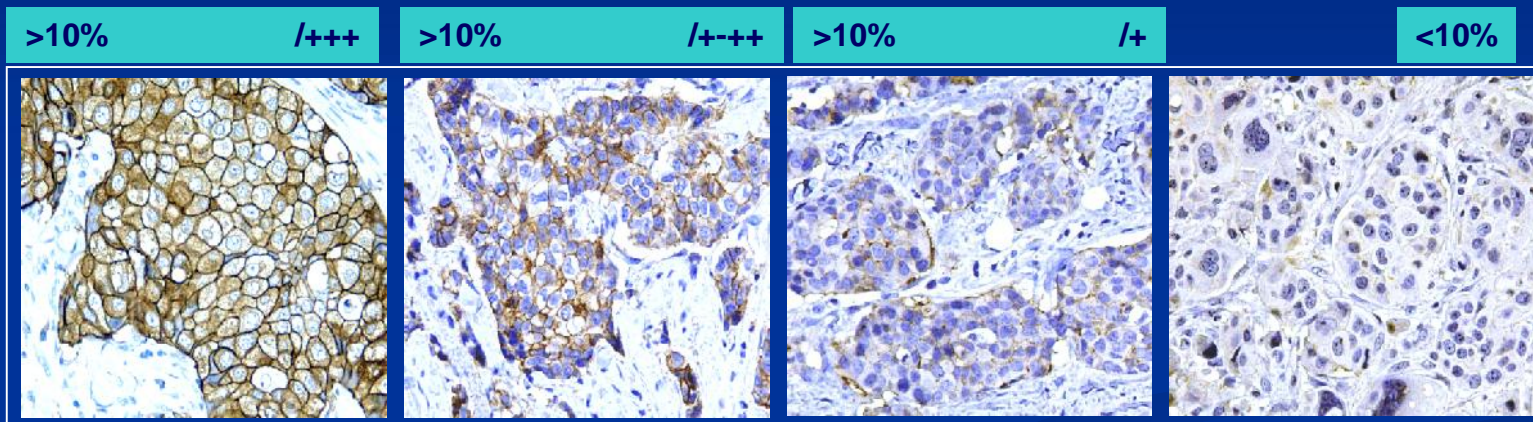
()
(multi-staining immunohistochemistry -MSI).





Ако се сврсисходно примењује,
уз савршену техничку процедуру и
стручно тумачење резултата,
високу цену методологије поништава
вишеструка корист коју добија
првенствено пацијент.

-
-
- Репродуцибилност и висок квалитет ИХХ технике су *sine qua non* у модерној патологији.



3+

2+

1+

0

HER2

HER2 -

HER-2

UK NEQAS-ICC- .

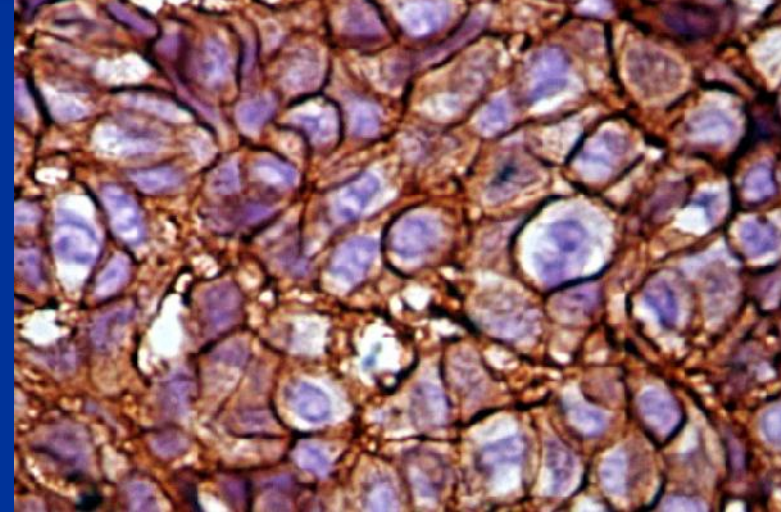
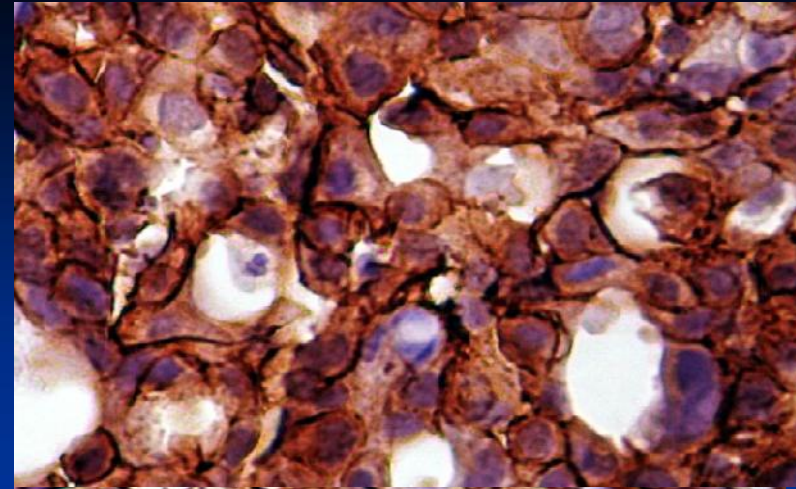
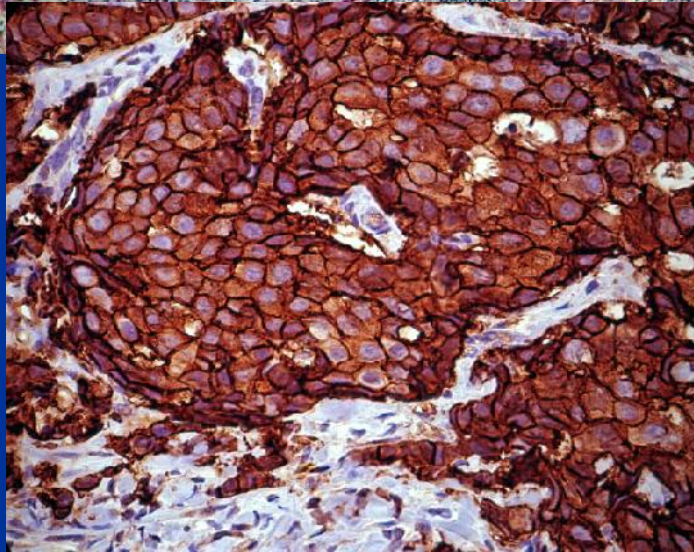
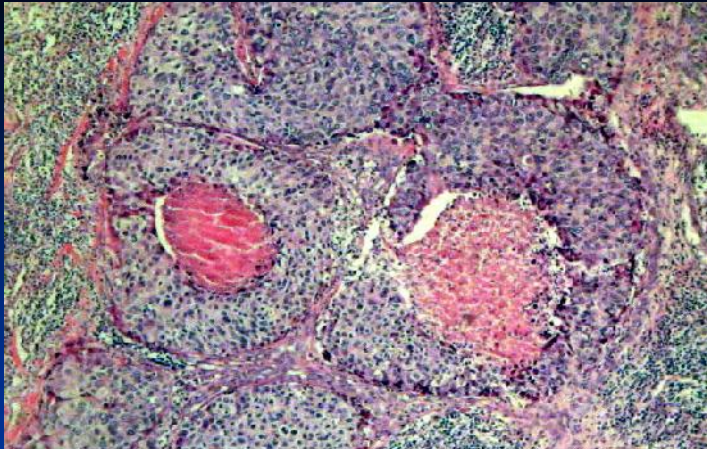
(
10%),
HER-2+,
(0)
(2+)

:

(1+)

: HER-2 -
, HER-2+.

(3+)



HER-2) HER-2=0,
 (IHC, HER-2, x20)) HER-2= 2+, 10%
 e ,
 10%
 (IHC, HER-2, x20))

.
 (IHC, HER-2, x40)) HER-2= 3+,
 IHC (IHC,HER-2,x40).



METOD: : *ALLRED SCORE*

,

.

0 8.

2

.

.



.

%	
0 =	0 =
1 = > 1%	1 =
2 = 1-10%	2 =
3 = 11-33%	3 =
4 = 34-66%	
5 = 67-100%	

Према циљу истраживања и врсти АТ која се употребљавају у ИХХ, маркери могу бити:

- ❖ Дијагностички маркери : обезбеђују информацију о присуству или одсуству дате болести
- ❖ Прогностички маркери: обезбеђују информацију о вероватноћи преживљавања
- ❖ Предиктивни маркери: обезбеђују информацију о вероватноћи одговора на терапију (Herceptin®
Gleevec®, MabThera®, Avastin®, Erbitux®, Tarceva®)
- ❖ Експериментални маркери: обезбеђују информацију о мутацији прото- и антионкогена

- Имунохистохемијске методе у :
 - 15% патохистолошких дијагноза имају суштинску улогу,
 - 20% случајева представљају значајан допринос дијагностици,
 - 15% помажу у потврђивању дијагнозе постављене на рутински обојеним ХЕ препаратима



10- 20%

,

,

,

,

:

-

,

,

,

,

-

-

(

),

.

-

,

.



&

,

,

,

.



-

-

-

-

-



:

,

,

,

,

,

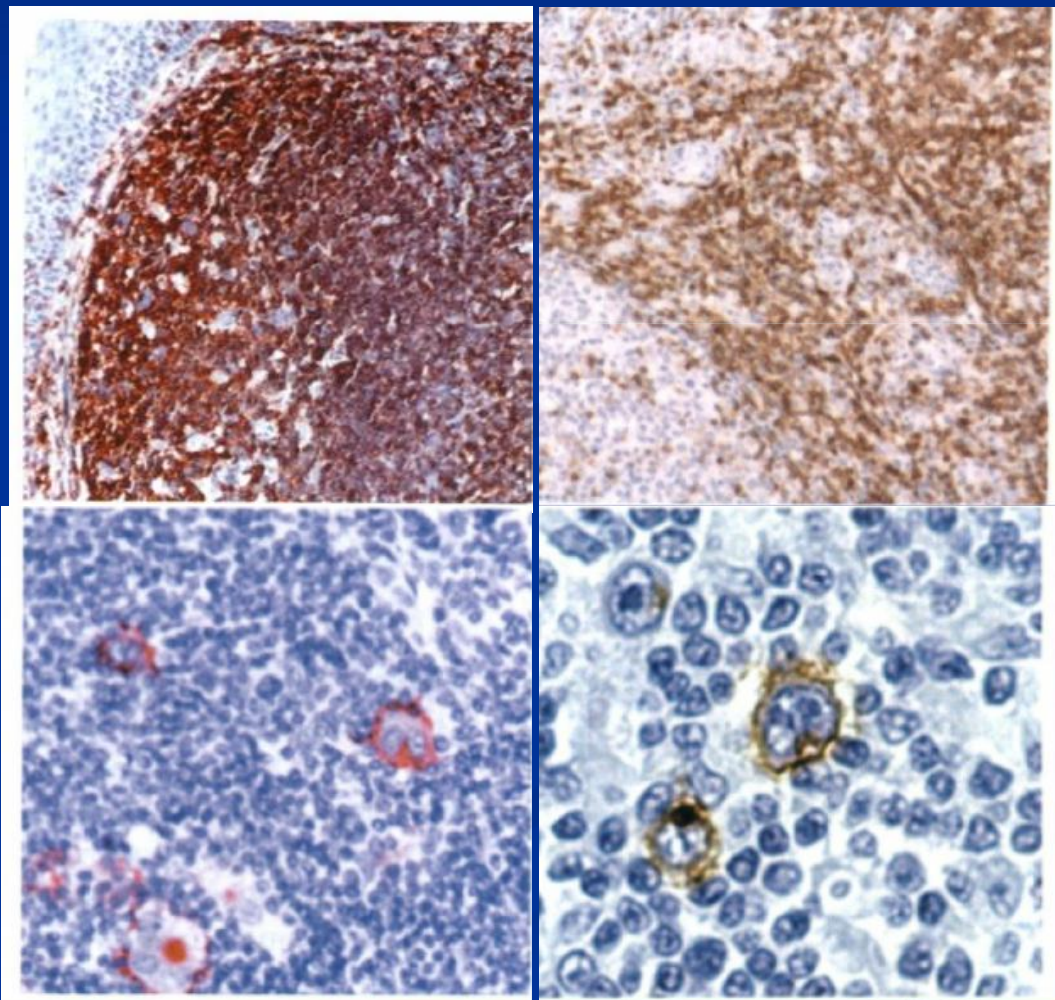
.



- Маркери потребни за идентификацију малигнитета, у овим случајевима, представљају **дијагностичке сетове или панеле**.
- Они су различити и врста неопходних АТ, **искључиво зависи од хистогенезе** болести тј. тумора који жели да се докаже.

I Дијагностички панел маркера за лимфоме

- 1.CD45
- 2.CD19
- 3.CD20
- 4.CD79a
- 5.IgM
- 6.CD3
- 7.CD5
- 8.CD7
- 9.Bcl2
- 10.Cyclin D1
- 11.Ki-67
- 12. TdT
- 13.CD68
- 14.CD15
- 15.CD30
- 16.EMA
- 17.Bcl-6
- 18.CD 10



- 1.CD1a
- 2.CD2
- 3.CD3
- 4.CD4
- 5.CD5
- 6.CD7
- 7.CD8
- 8.CD10
- 9.CD11b
- 10.CD11c
- 11.CD13
- 12.CD15
- 13.CD16
- 14.CD19
- 15.CD20
- 16.CD21
- 17.CD22
- 18.CD23
- 19.CD25
- 20.CD30
- 21.CD33
- 22.CD34
- 23.CD35
- 24.CD38
- 25.CD43
- 26.CD45 (LCA)
- 27.CD 45 R0
- 28.CD56
- 29.CD57
- 30.CD68
- 31.CD75
- 32.CD79a
- 33.CD79b
- 34.CD103
- 35.CD123
- 36.CD138
- 37.CD163
- 38.CD207
- 39.BCL2
- 40.BCL6
- 41.BOB1
- 42.Cyclin D1
- 43.EBV-LMP1
- 44.EMA
- 45.Granzyme B
- 46.HLA-DR
- 47.IRF4(MUM1)
- 48.J chain
- 49.Ki 67(MIB1)
- 50.Lysozyme
- 51.Myeloperoxidase
- 52.p21(WAF1)
- 53.p27
- 54.p53
- 55.p80(ALK1)
- 56.Perforin
- 57.S-100
- 58.Sm Ig heavy chain
- 59.Sm Ig light chain
- 60.TCR beta
- 61.TdT
- 62.Pan cytokeratin
- 63.PAX5

II Дијагностички панел маркера за недиферентоване туморе

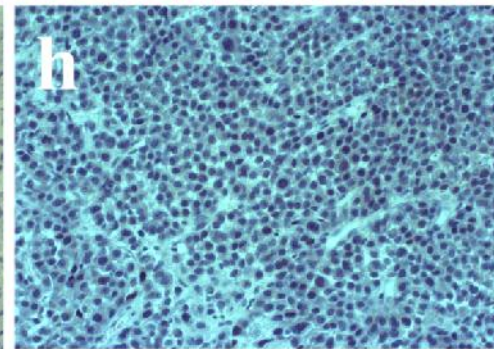
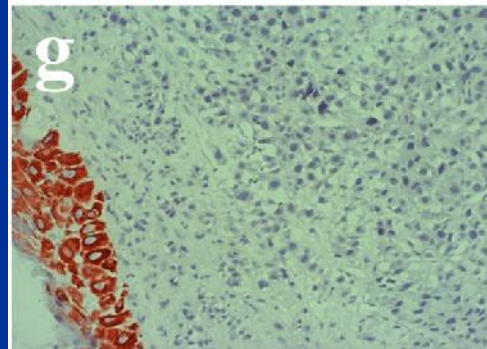
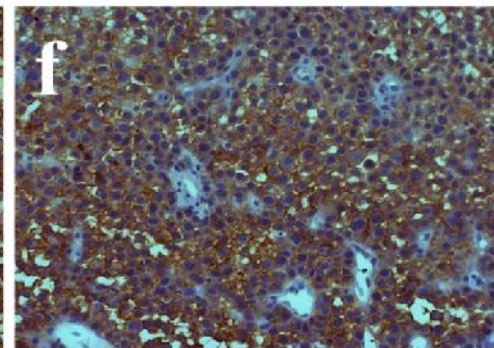
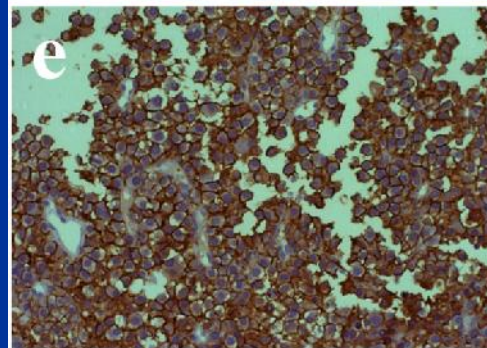
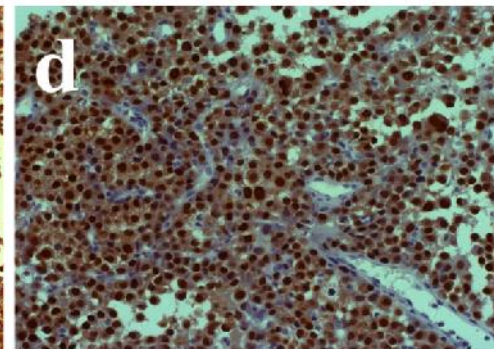
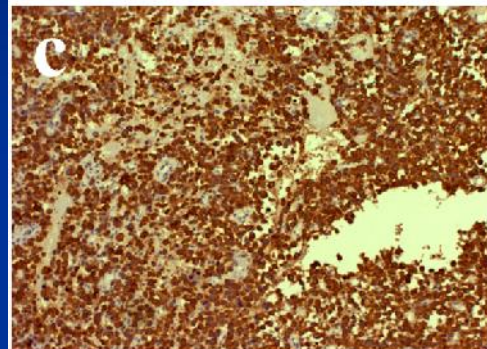
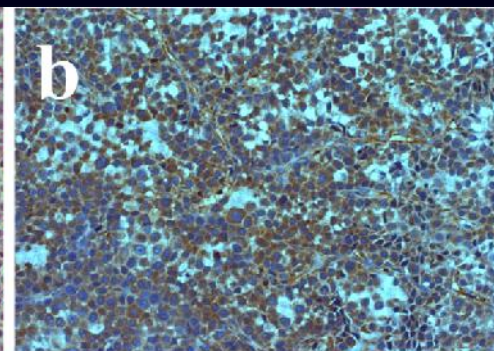
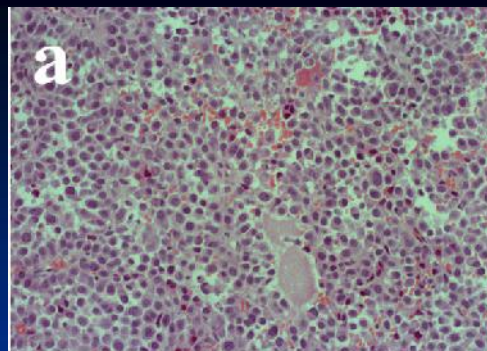
- 1.Vimentin
- 2.Citokeratin-pan
- 3.CK LMW
- 4.CK HMW
- 5.CK 7
- 6.CK 20
- 7.CK 19
- 8. S-100 protein
- 9.TTF
- 10.SMA
- 11.P63
- 12.NSE
- 13.Chromogranin(synaptophysin)
- 14.CEA

	СК	vim	S-100	HMB45	CD45
Малигни Меланом	—	+	+	+	—
Карцином	+	—	+	—	—
Лимфом	—	+	—	—	+

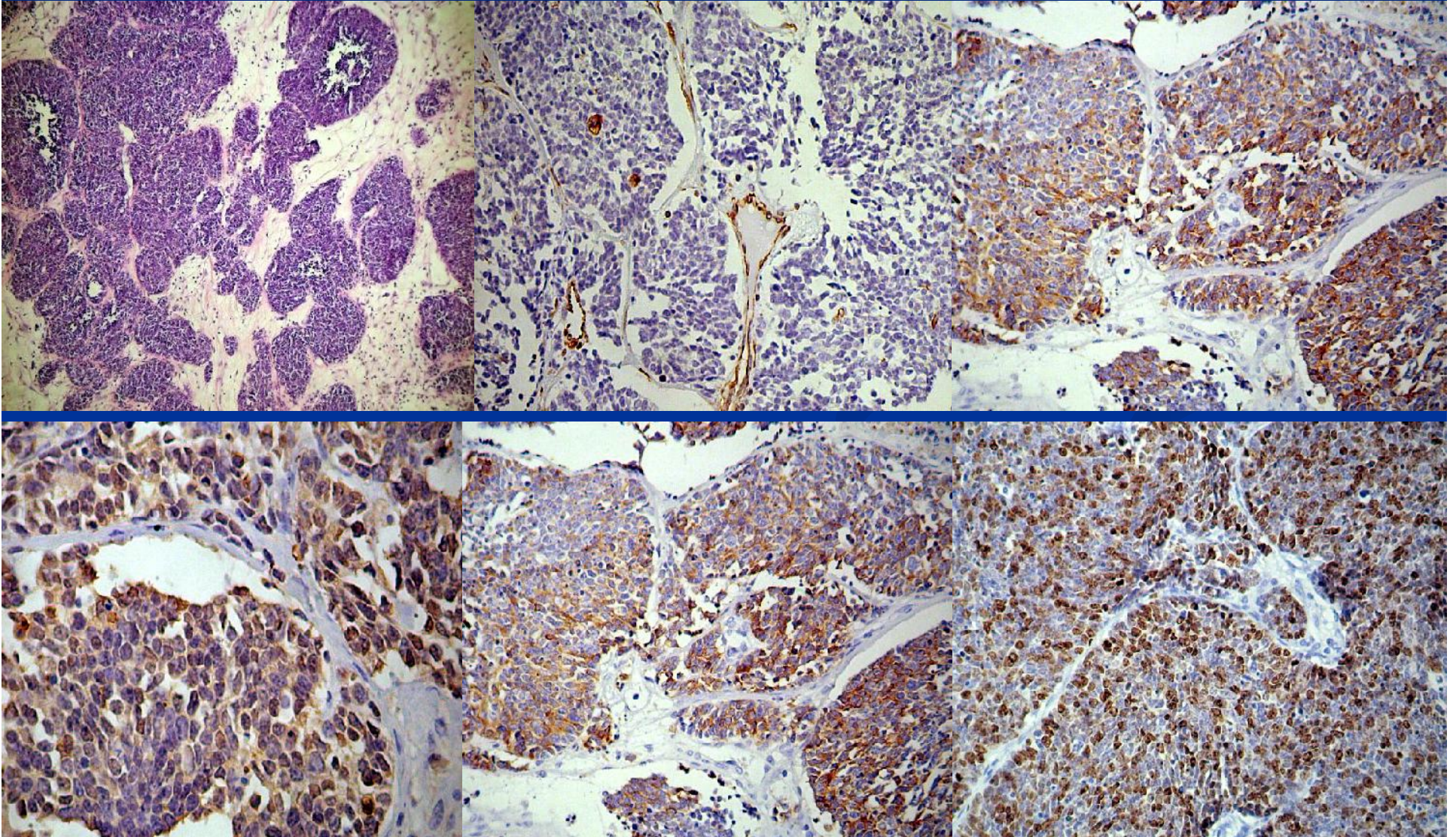
ПЛАЗМОЦИТОМ

ИМУНОФЕНОТИП:

Lambda ++, CD 79^α +++,
MUM1 +++, CD138 +++, СК-,
CD20 +/-, vim-, NSE-, CD3-



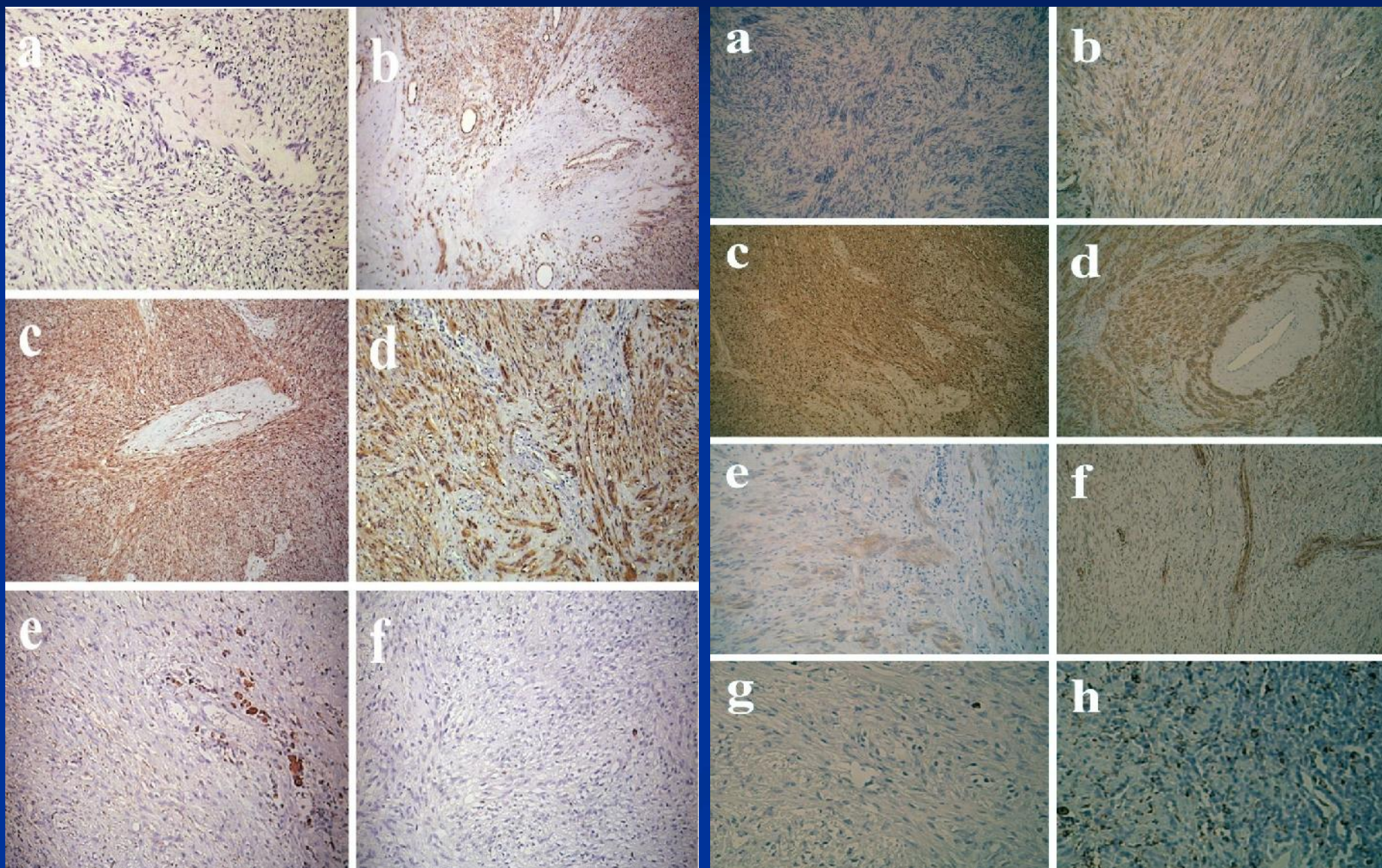
Vim - , EMA+, NSE+, chromogranin +, Ki67+++,



III Дијагностички панел маркера за мезенхималне туморе(саркоме) и друге диференцијације

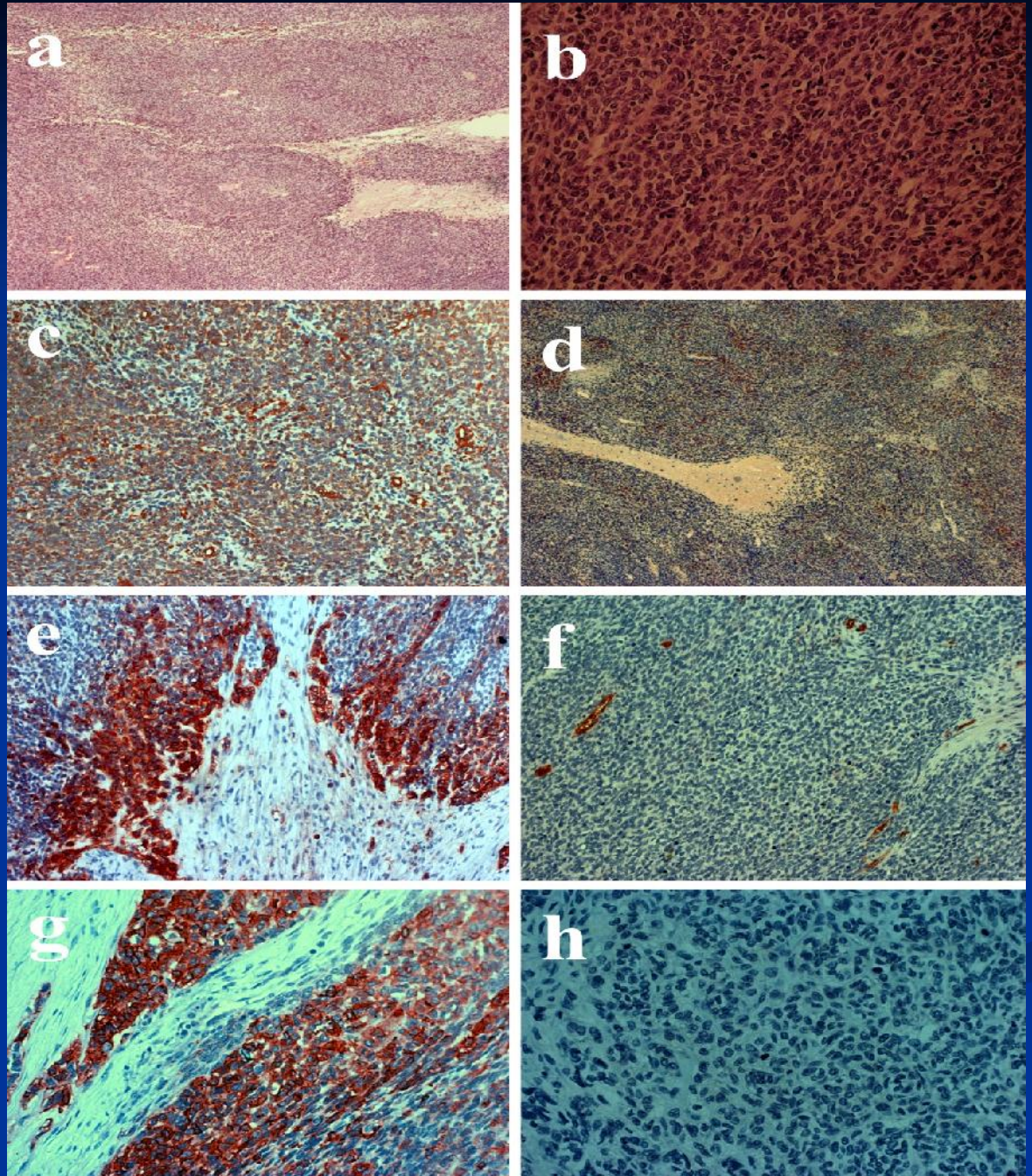
- 1.Desmin
- 2.Actin
- 3.GFAP
- 4.CD31(CD34)
- 5.HMB45
- 6.Melan-A
- 7.PSA
- 8.PSAP
- 9.E-cadherin
- 10.Collagen IV

Шваном: Vim+, S-100 protein +, GFAP+, CK+/-, SMA-, CD 68-, Ki-67 1%



СИНОВИОСАРКОМ

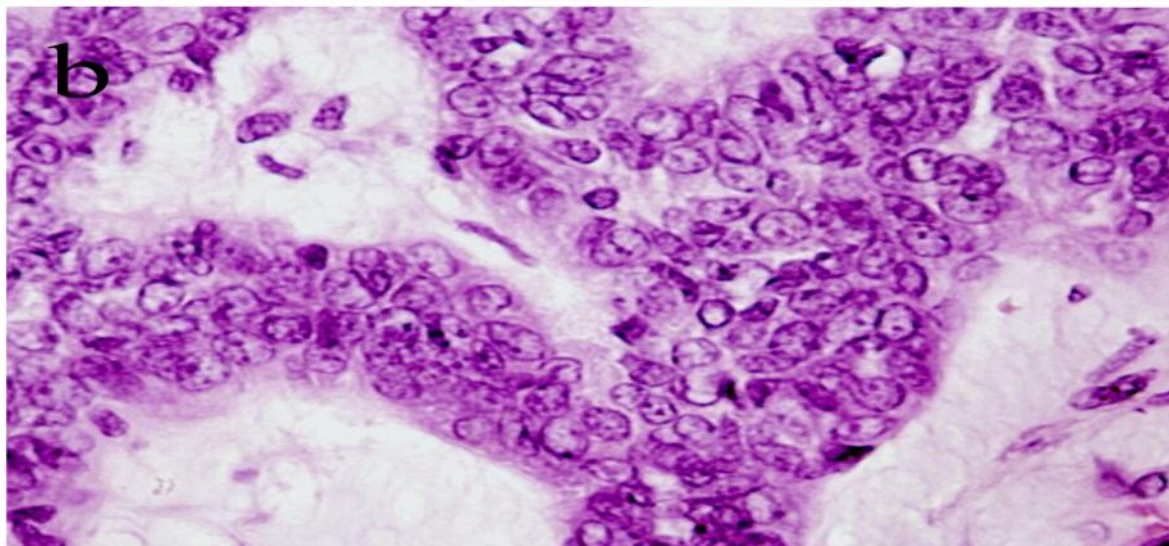
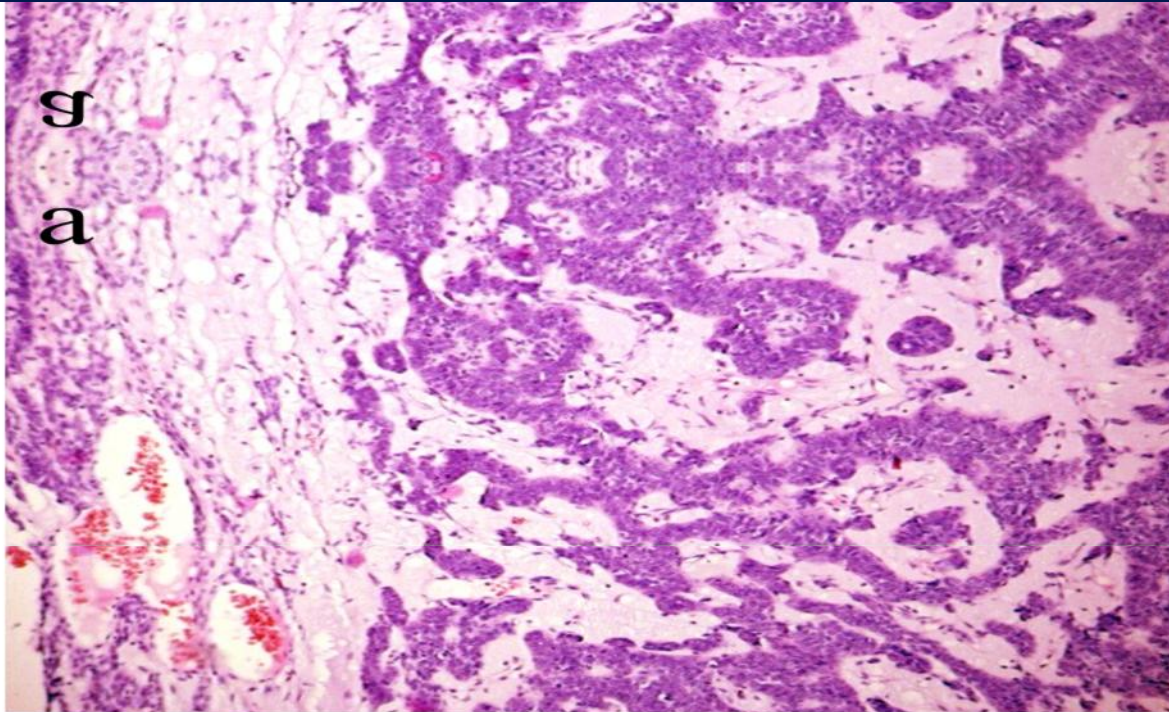
- Vim+,
- Aе1-3 +
- CK 18 +/-
- EMA+
- CD34 –
- Bcl2 +
- C-kit



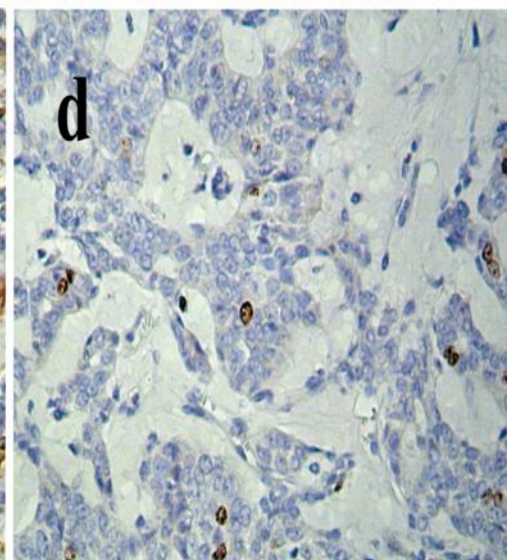
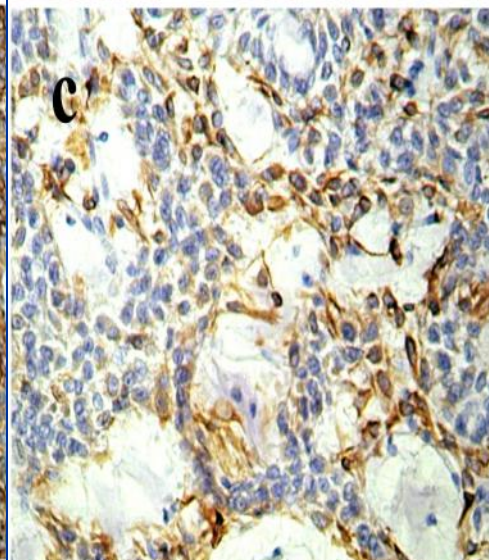
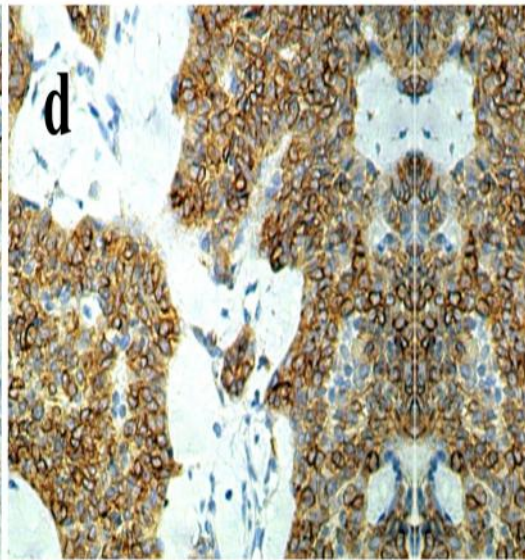
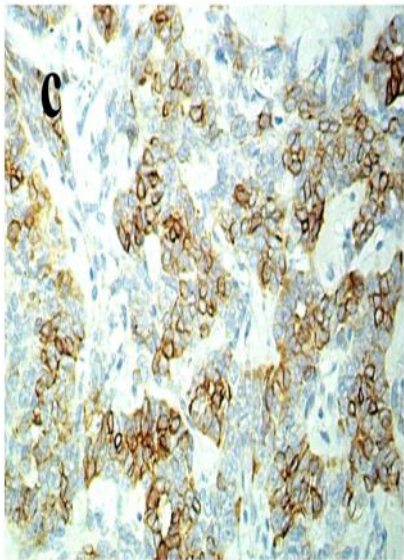
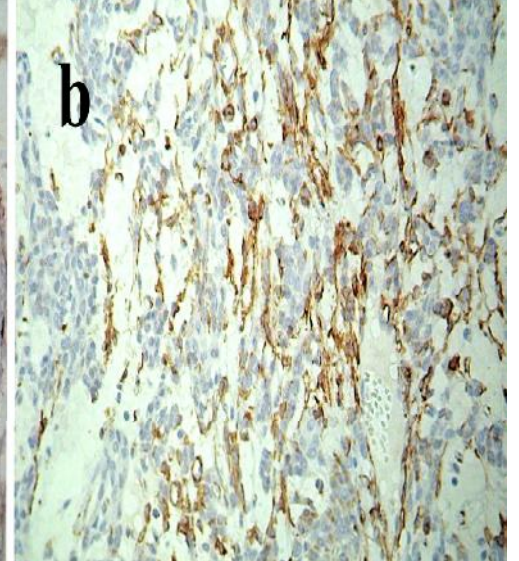
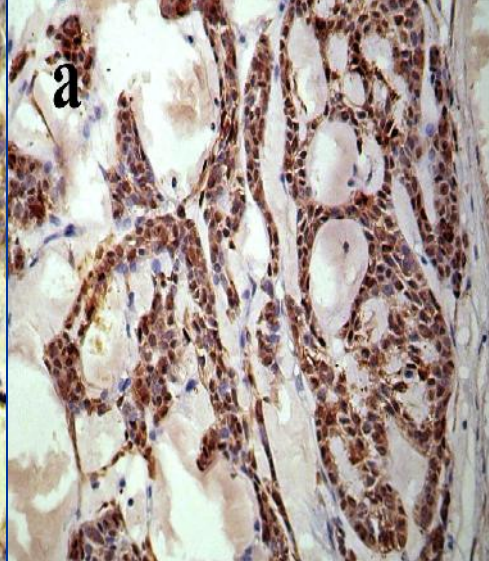
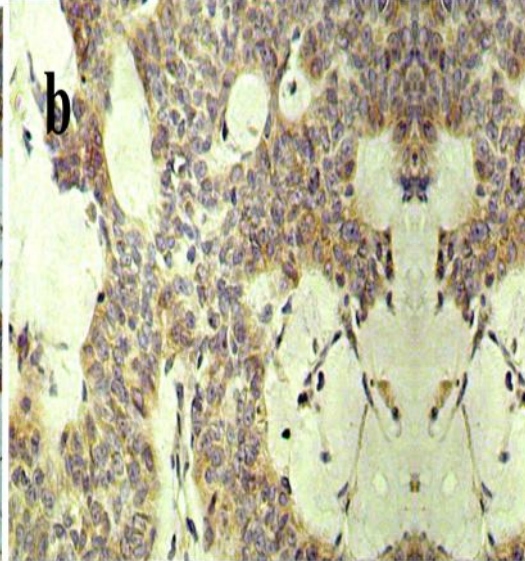
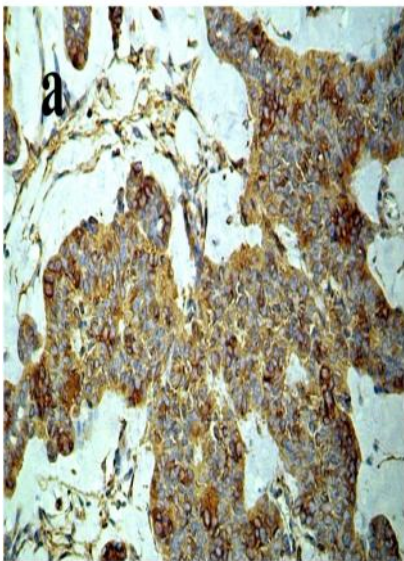
Прогностички и предиктивни сет маркера у онкологији (Хормонотерапија, Herceptin® Gleevec® MabThera® Avastin®)

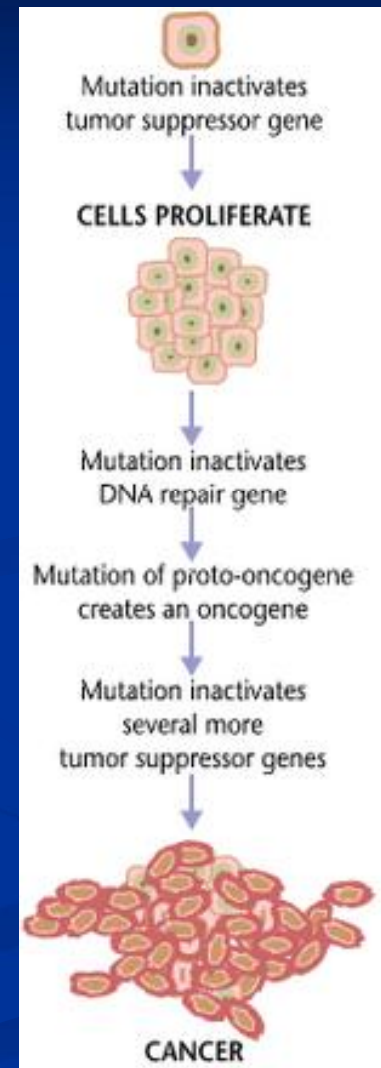
- 1. Estrogen receptor
- 2. Progesterone receptor
- 3. c-erbB2 Oncoprotein
- 4. EGFR1
- 5. p53
- 6. c-kit
- 7. VEGF 1
- 8. Timidilat-sintetaza
- 10. Androgen receptor
- 11. CA125
- 12. CA19-9
- 13. CA15-3
- 14. PCNA

Тумор дојке ????



**vim+++ , desmin + , CK HMW++ , CK LMW +++ , S-100 protein +++ , -SMA ++ ,
GFAP++ , Ki67 8% -**

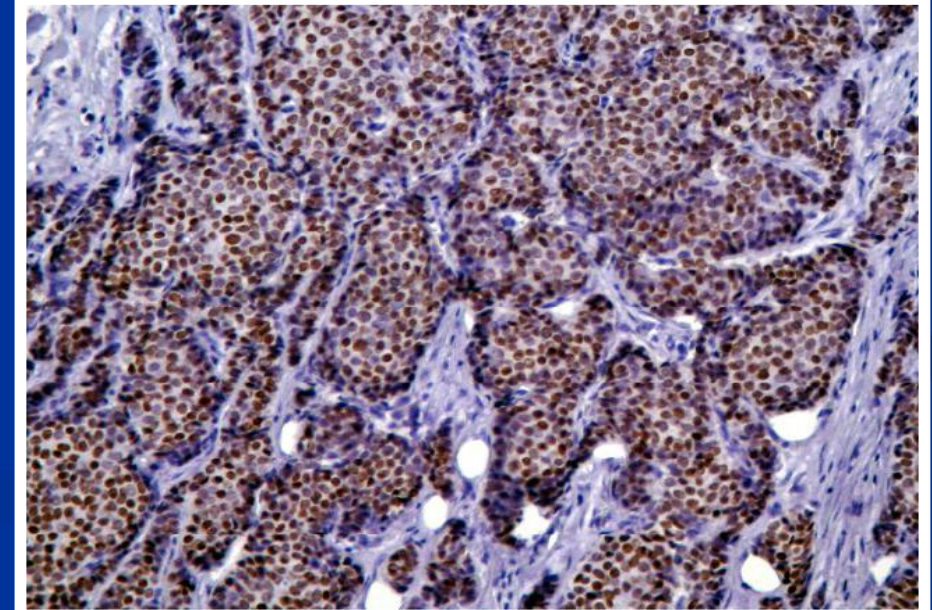
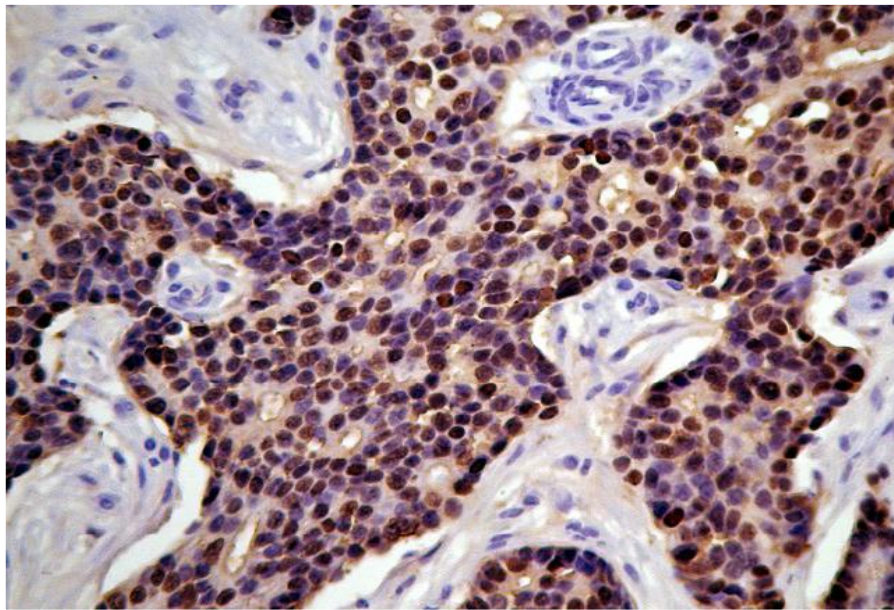
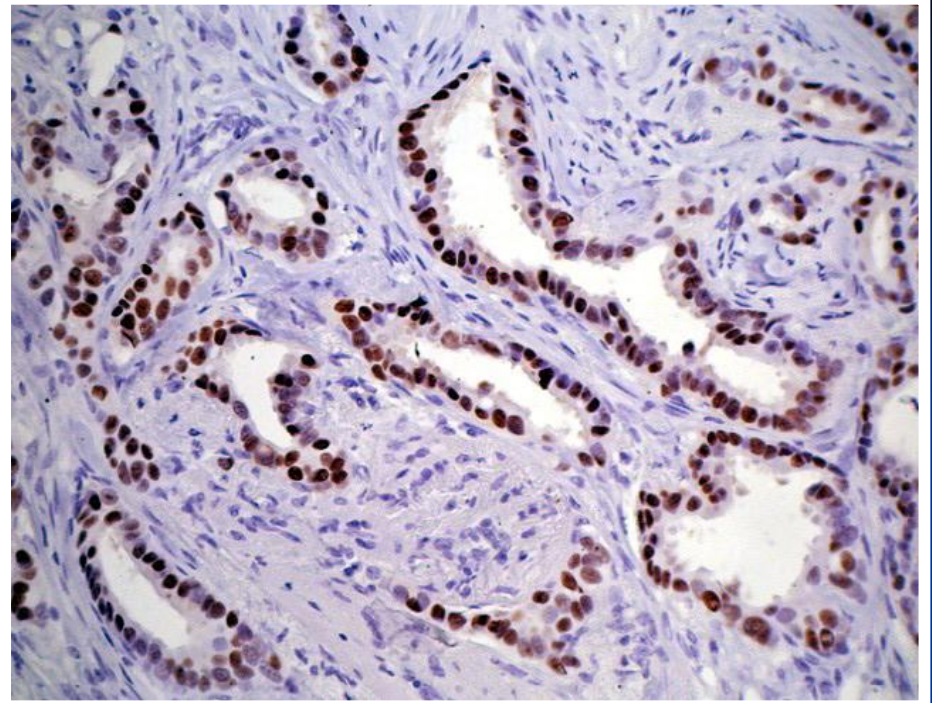
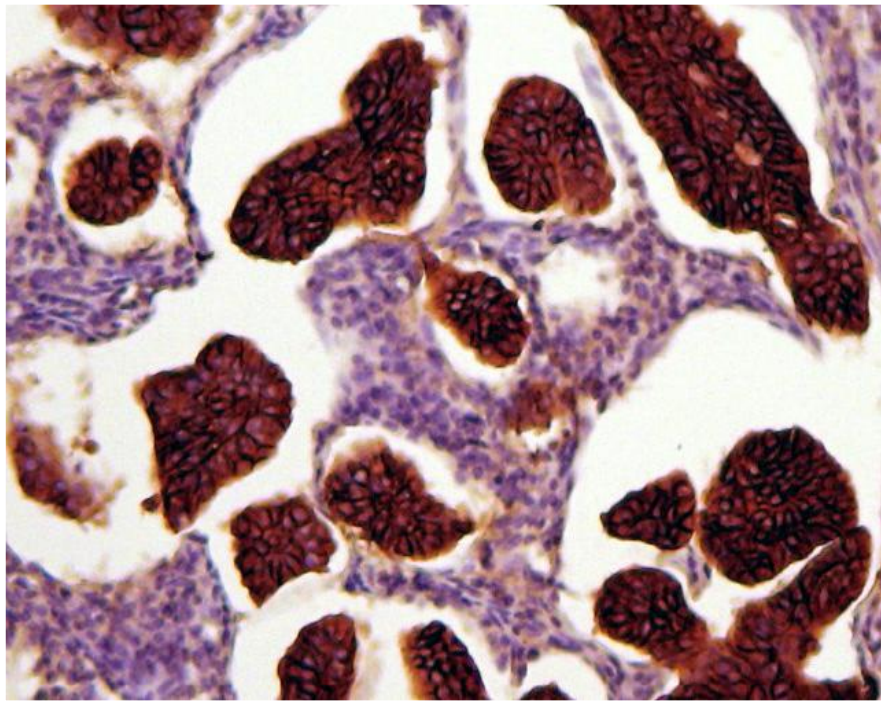




- Због постојања више хиљада различитих комбинација генетских промена и вишеструког укрштања путева у онкогенези, *неопходно је пратити однос експресије различитих туморских маркера*, а никако појединачну експресију.
- Крајњи циљ је одређивање експресијског профила сваког тумора, са надом да ће он указати на терапијски циљ у индивидуалном третману пацијената са карциномом.

■ Задњих година, показано је да карциноми дојке могу бити класификовани у 5 основних група на основу хијерархијско-групне анализе њиховог експресијског профила:

1. група луминалних тумора А и Б
2. *HER-2+* група
3. група тумора налик-базалним (*basal-like*)
4. нормална група (*normal breast-like*).



- A
ER /HER-2
: , 61,2% ER+ /HER-2-
ER+ /HER-2+ 9,0%, 13,4%
ER-/HER-2 -, 16,4% ER -/HER-
2+.

- ER+/HER-2- ,
ER -/HER-2+ ;
ER+/HER-2-
74%,
ER-
/HER-2- ER -/HER-2 + (58%
54%).

ER + / HER-2+ .

<i>ER / HER-2</i>	%	
<i>ER+ / HER2 -</i>	61,2%	74%
<i>ER+ / HER2+</i>	9,0%	
<i>ER - / HER2 -</i>	13,4%	58%
<i>ER - / HER2+</i>	16,4%	54%

МЕТАСТАТСКИ ТУМОРИ НЕПОЗНАТЕ ПРИМ. ЛОКАЛИЗАЦИЈЕ

- Метастатски тумор је прва презентација малигног процеса у чак до 10% случајева.
- У 2-4% и поред детаљних клиничких дијагностичких процедура, не открије се примарна локализација
- У тим случајевима, од круцијалног терапијског значаја је одређивање имунохистохемијског профила метастазе и патохистолошко дефинисање могуће примарне локализације

ЦИТОКЕРАТИНИ

- Најважнији и највише проучавани дијагностички маркери у одређивању примарне локализације метастатског тумора
- Најзначајније место заузима **СК7/СК20** профил.
- **СК7** се нормално експримира у епителу дојке, плућа, мезотела, мокраћној бешици, женског гениталног тракта, ограничено у епителу желудачне и интестиналне мукозе
- **СК20** се нормално експримира у епителу уротела и читавог гастроинтестиналног тракта

Метастазе аденокарцинома колона и јајника

	VIM	CEA	CA 19.9	CA 125	CK 7	CK 20
Adenocarcinoma colonis	+	+	+	+	—	+
Adenocarcinoma ovarii	+/-	—	—	+	+	—

Метастазе карцинома простате, мокраћне бешике и ректума

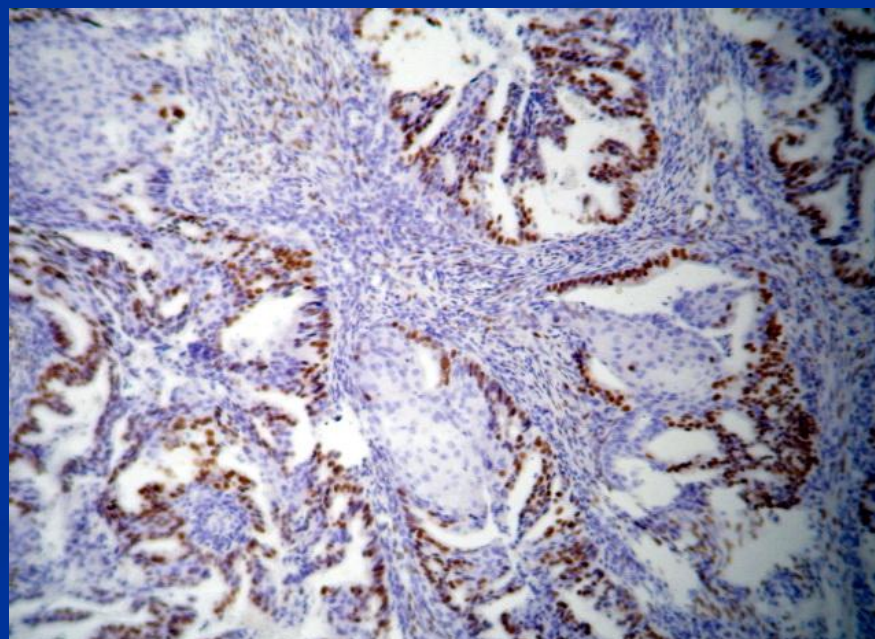
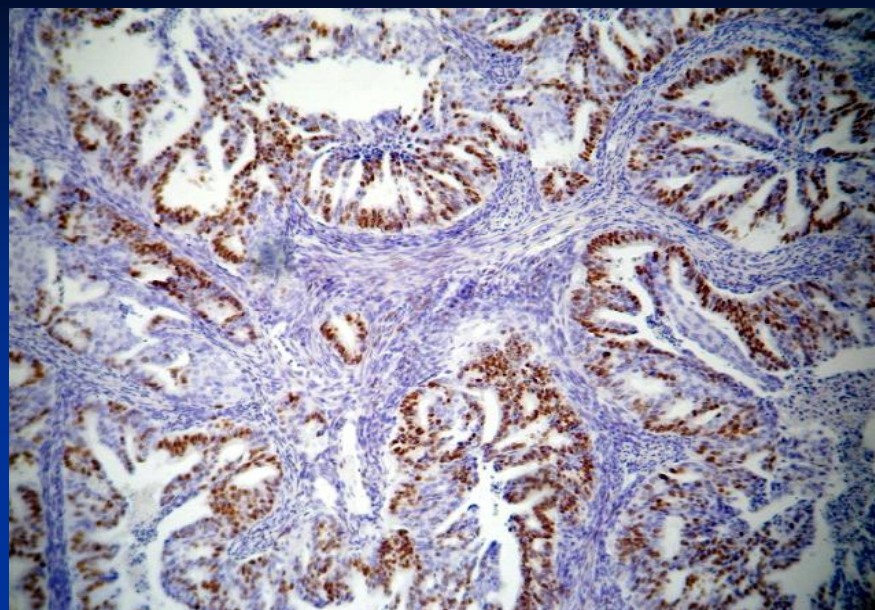
	СК 7	СК 20	PSA	PSAP	CEA
Карцинома простате	—	—	+	+	+
Карцином М. Бешике	+	+	—	+	+
Карцином ректума	—	+	—	—	+

Примарни тумор	СК профил	%
Bladder, transitional cell carcinoma	CK7+/CK20+	74%
Bladder, adenocarcinoma	CK7+/CK20+	73%
Breast, infiltrating carcinoma	CK7+/CK20-	90%
Colon, adenocarcinoma	CK7-/CK20+	81%
Oesophagus, squamous cell carcinoma	CK7-/CK20-	55%
Head and neck, squamous cell carcinoma	CK7-/CK20-	66%
Kidney, renal cell carcinoma	CK7-/CK20-	80%
Liver, hepatocellular carcinoma	CK7-/CK20-	78%
Liver, cholangiocarcinoma	CK7+/CK20-	50%
Lung, squamous cell carcinoma	CK7-/CK20-	70%
Lung, adenocarcinoma	CK7+/CK20-	94%
Lung small cell carcinoma	CK7-/CK20-	72%
Mesothelioma	CK7+/CK20-	61%
Ovary, serous adenocarcinoma	CK7+/CK20-	88%
Pancreas, adenocarcinoma	CK7+/CK20+	51%
Prostate, adenocarcinoma	CK7-/CK20-	77%
Skin, Merkel cell tumour	CK7-/CK20+	77%
Stomach, adenocarcinoma	CK7+/CK20+	30%
Uterus, adenocarcinoma	CK7+/CK20-	89%
Uterus cervical squamous cell	CK7+/CK20-	87%

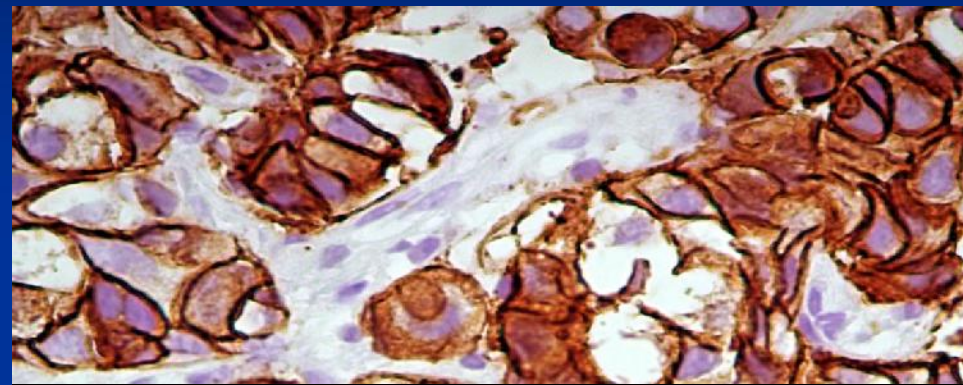
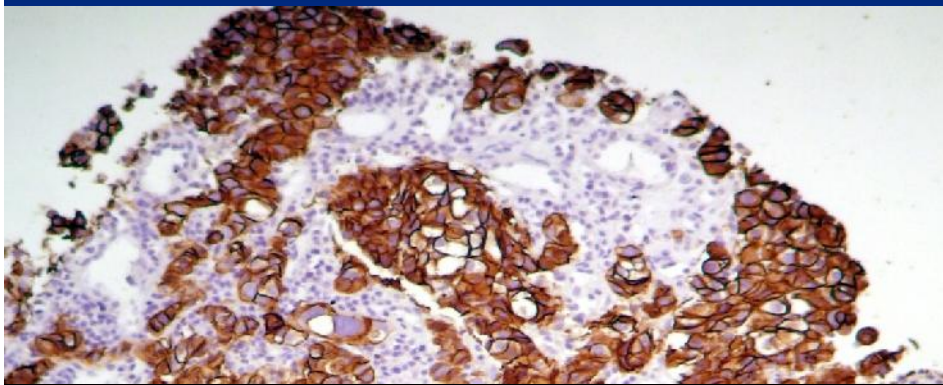
МЕТАСТАТСКИ ТУМОРИ НЕПОЗНАТЕ ПРИМ. ЛОКАЛИЗАЦИЈЕ

- Некад је имунохистохемијска анализа од велике помоћи и примарна локализација се одређује једноставно и прецизно.....

■ Метастаза
ER+ и PR+
карцинома дојке
у мозгу



Метастаза ЕR-,РR- и HЕR-2+ карцинома дојке у јетри



- Међутим, у већем броју случајева завршна дијагноза је само орјентациона, иако у ИХХ анализу буде укључена палета, некад од преко 20 антитета!!!

■ ХВАЛА НА ПАЖЊИ!