

акултет едицински  
Универзитет у Крагујевцу



# ИСТРАЖИВАЧКИ И ДИЈАГНОСТИЧКИ АСПЕКТ ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКОГ МЕТОДА У ХИРУРШКОЈ ПАТОЛОГИЈИ

Слободанка Љ. Митровић

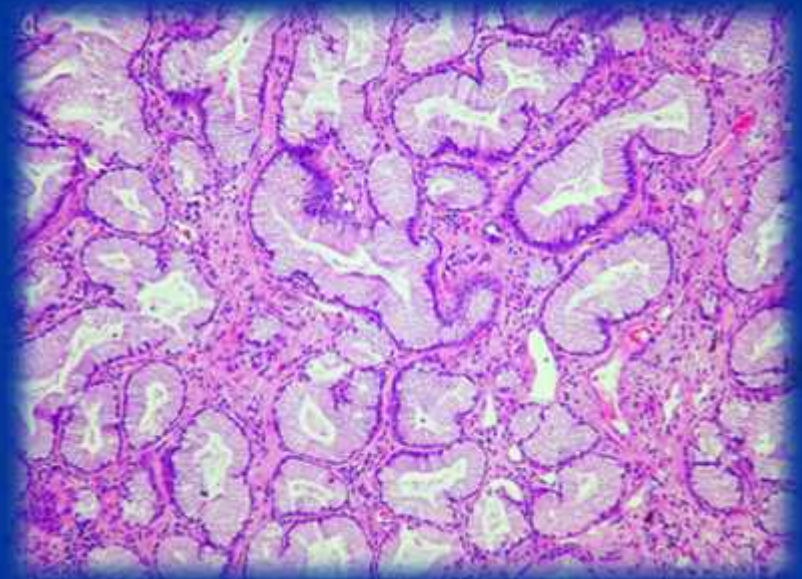
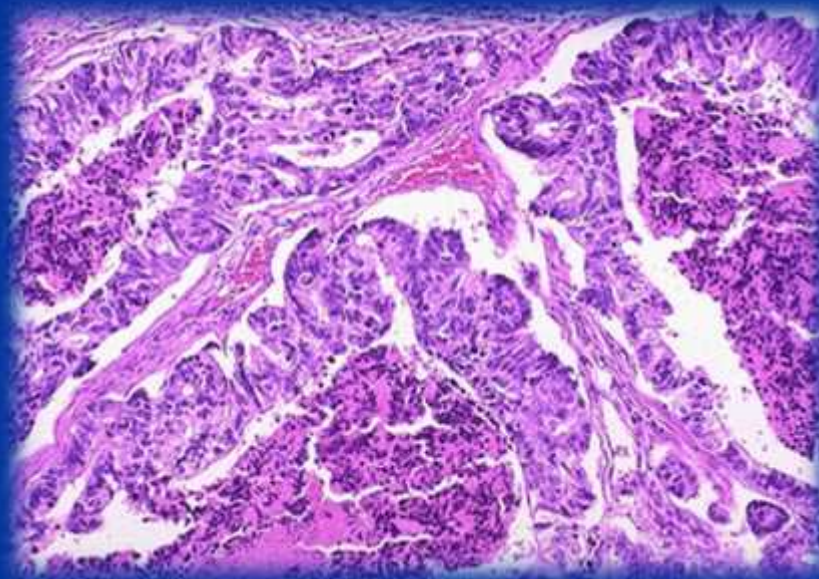
основна мисија патохистологије:

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

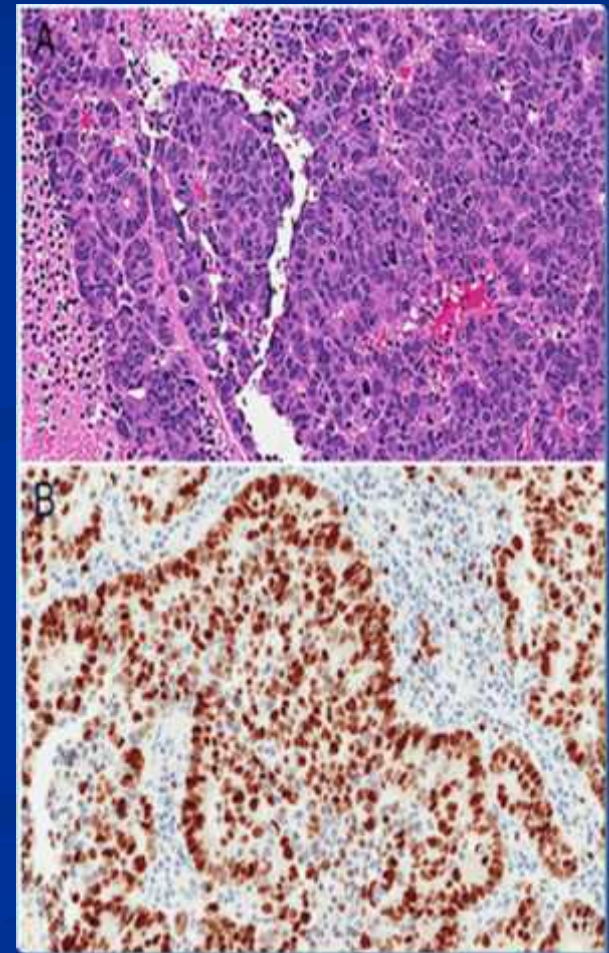


■ *Heidenhain* (1896) – / (H&E)

■  
“ ,  
” ,  
H&E  
.



- **ИМУНОХИСТОХЕМИЈА** 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* су 1968. год., увођењем практичне примене антитела на парафинским пресецима донели револуцију у развоју имунохистохемије
- Увођењем ензимског обележавања отворили еру модерне имунохистохемије.
- Ћелије се обележавају антителом коњугованим са ензимом (пероксидаза рена), а реакција се визуелизује одговарајућом обојеном субстанцом, хромогеном, као што је диаминобензедин (DAB)
- Ткиво се, на крају, контрастира хематоксилином што омогућава истовремену анализу имунохистохемијске реакције, морфолошких детаља и тачно локализовање антигена у ткиву.



# ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИ МЕТОД

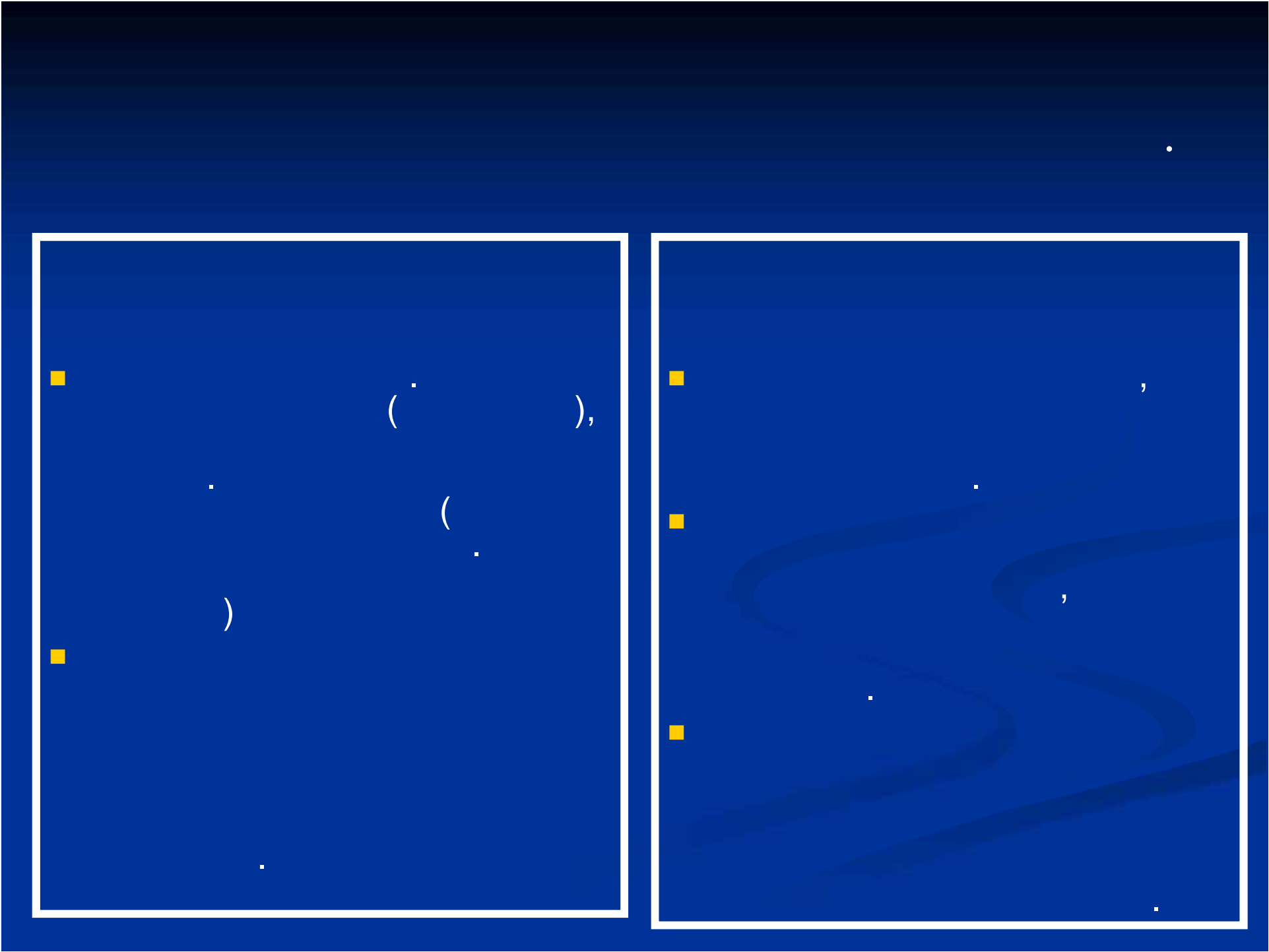
■ ( *“one step”* )  
( )

■ ,  
.

■ ,  
( ) ,

# ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИ МЕТОД

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

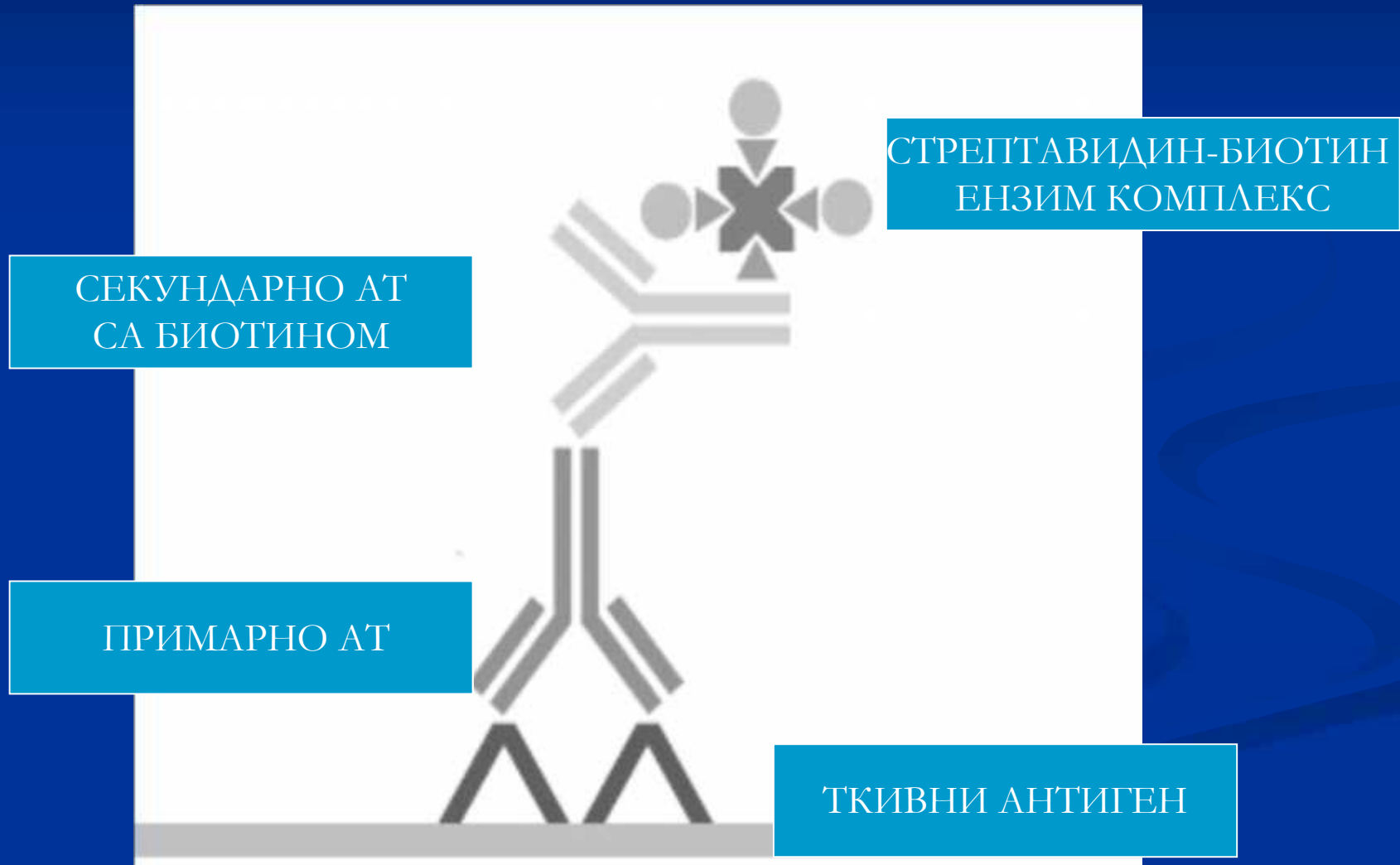


■ **РАР** и **АРААР** ( ) - **РАР**  
- , **АРААР**

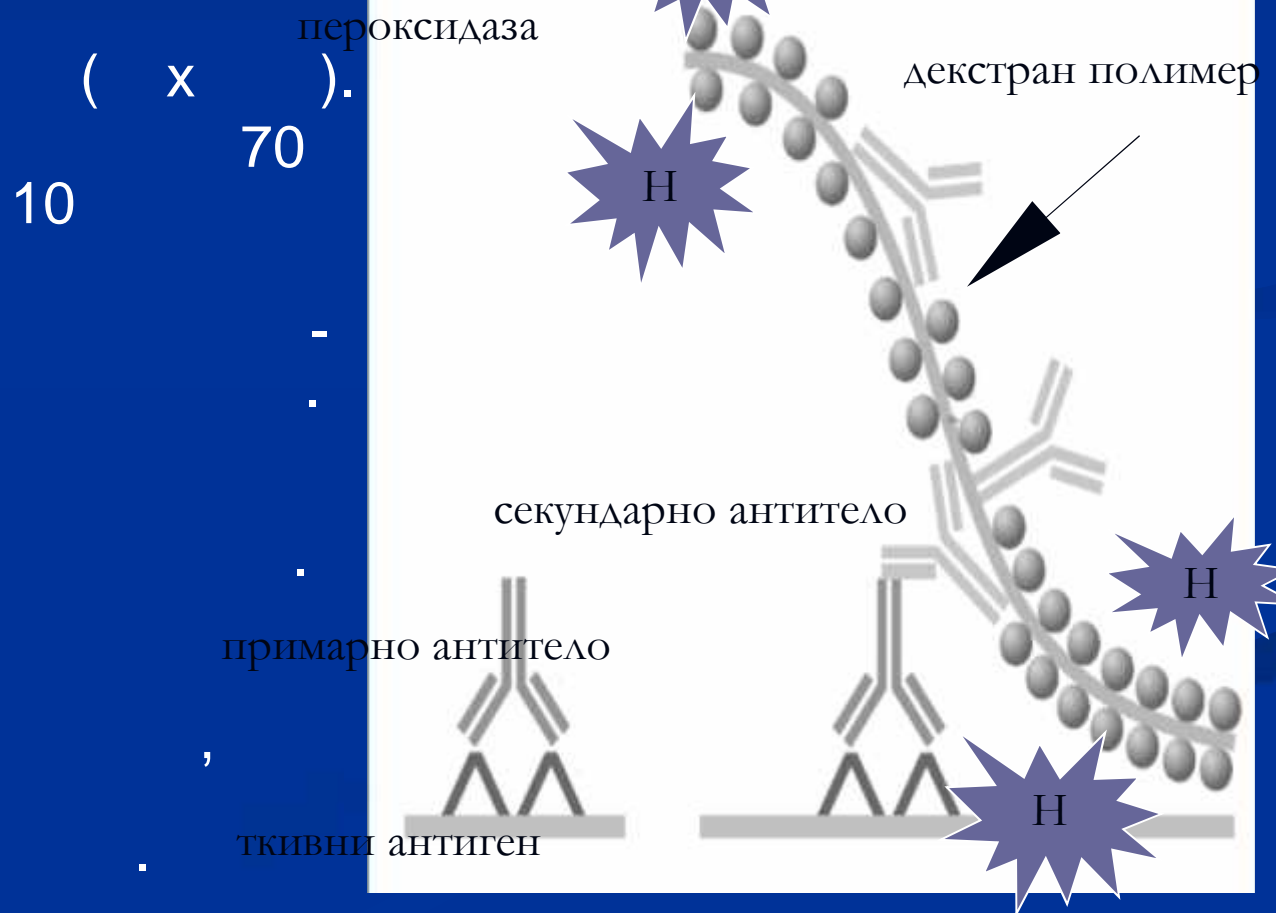
■ **АВС** ( *vidin-biotin complex* ) -

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

# LSAB



# Индиректна техника ланчаног полимера (EnVision\*).



LSAB

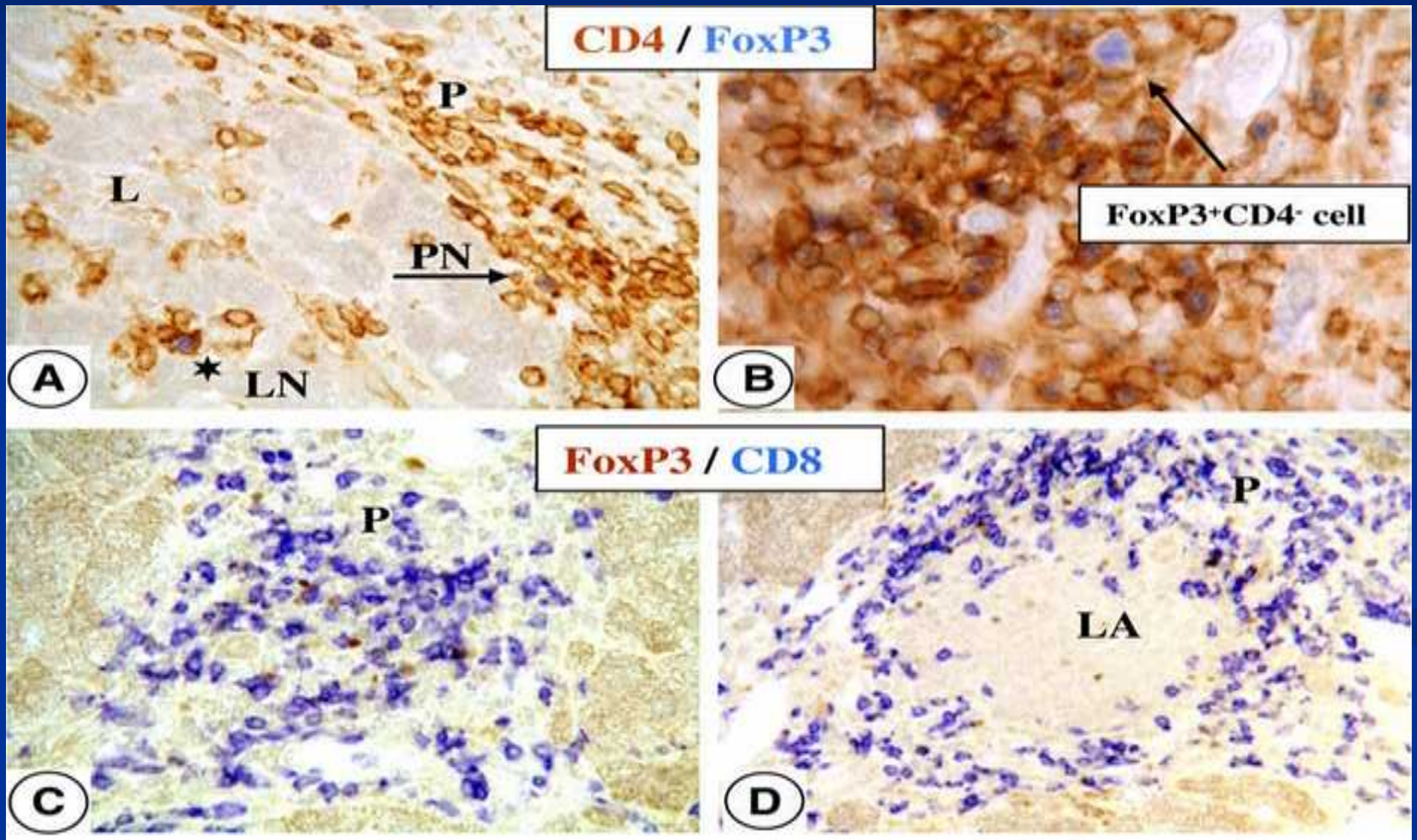


- Имунохистохемијске технике настављају да се развијају, њихове апликације у патологији и научним истраживањима су све вредније.
- Методе амплификације су допринеле да се рутински идентификују протеини за које се веровало да су изгубљени у процесима фиксације
- Како технологија напредује, нови маркери 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.



-

.

,

,

,

-

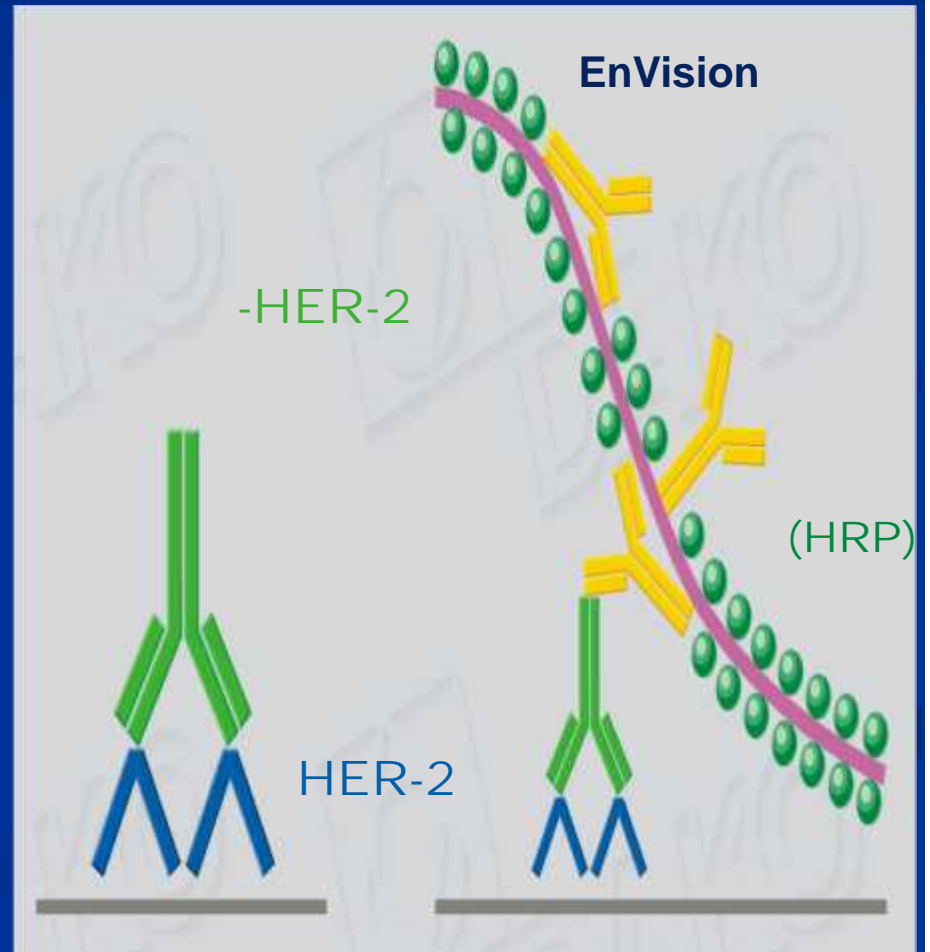
,

HER-2

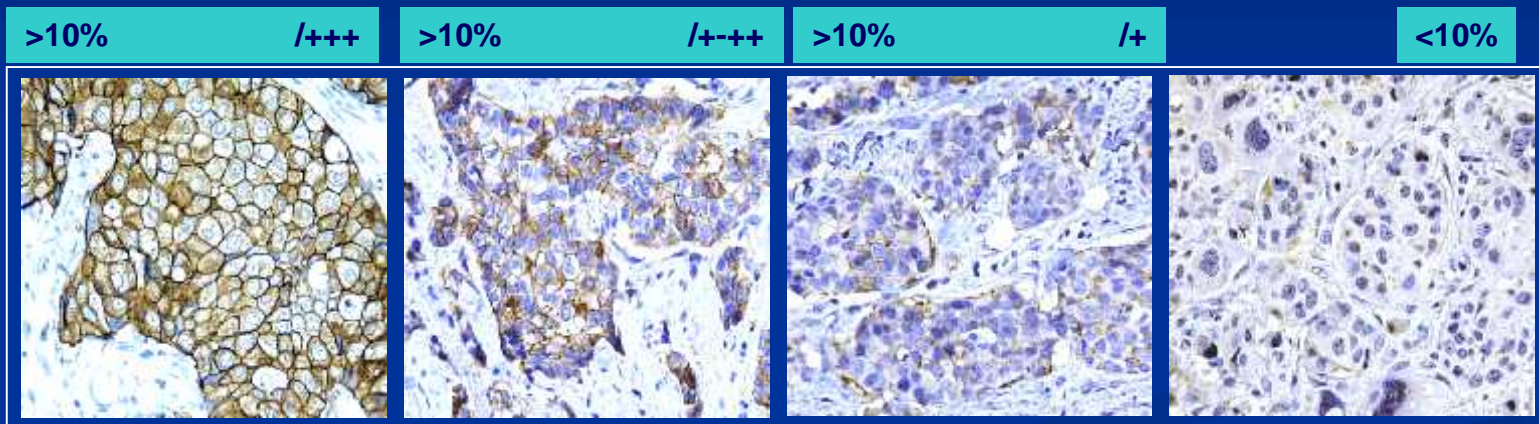
EnVision

-HER-2

(HRP)







**3+**

**2+**

**1+**

**0**

**HER2**

**HER2 -**

*HER-2*

*UK NEQAS-ICC- .*

( 10%),

: *HER-2 - HER-2+*,

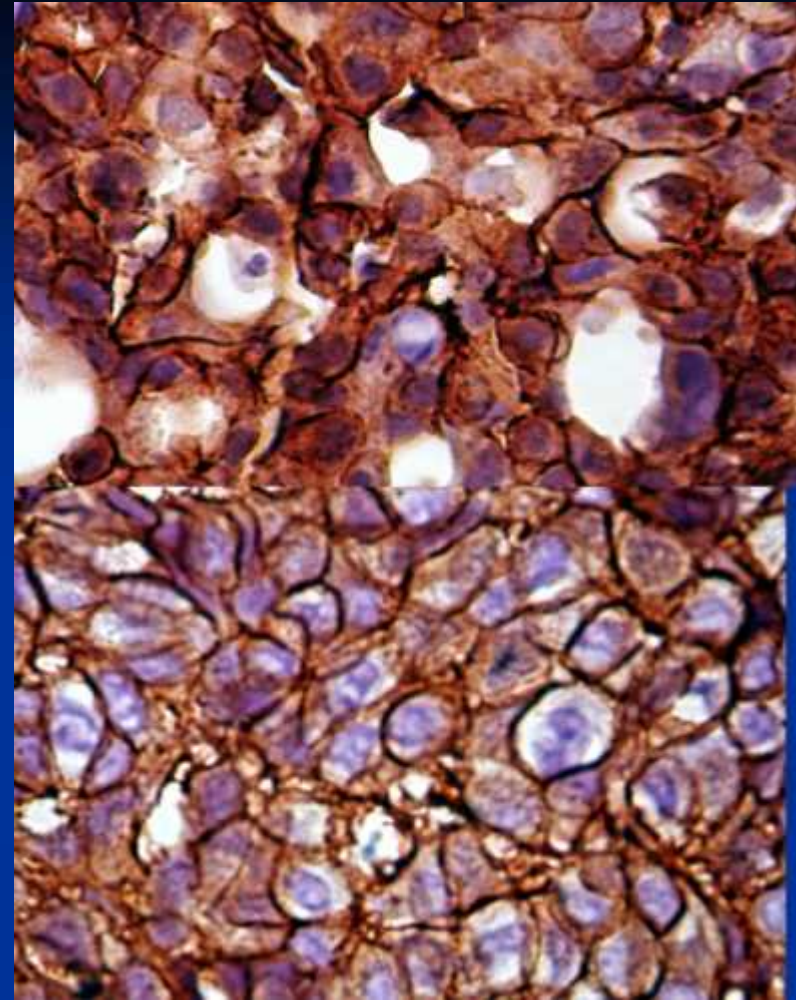
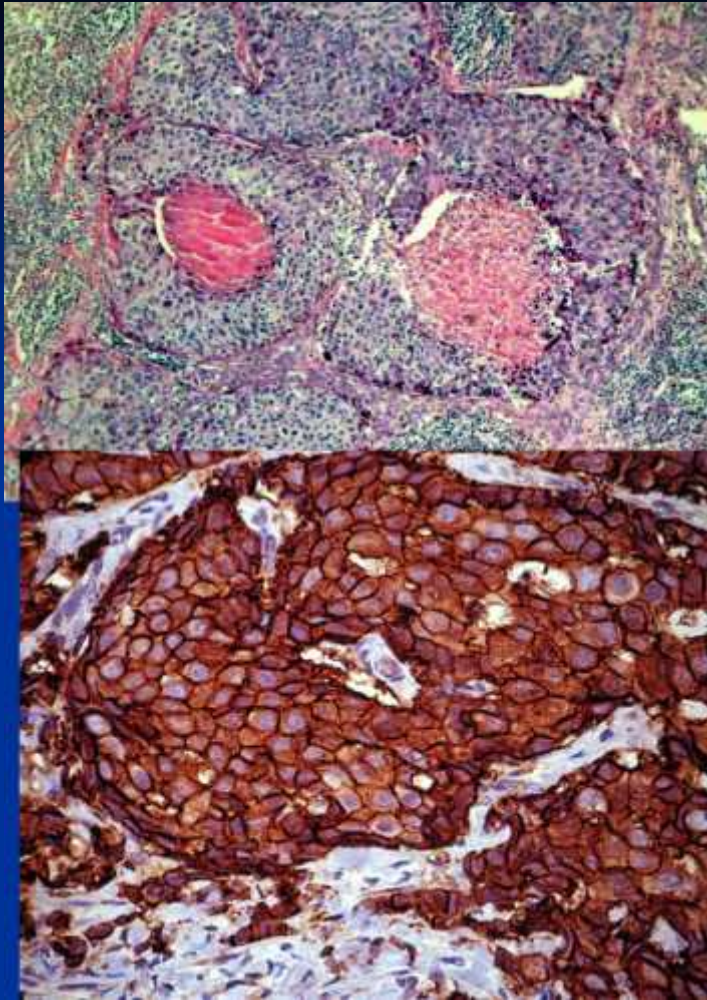
(0)

(1+)

(3+)

, *HER-2+*.

(2+)



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).

ER, PR, p53

ALLRED SCORE METOD:

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



- 15%

- 20%

- 15%

:

,

,

10- 20%

( ),

&





,

⋮

—

—

—

—

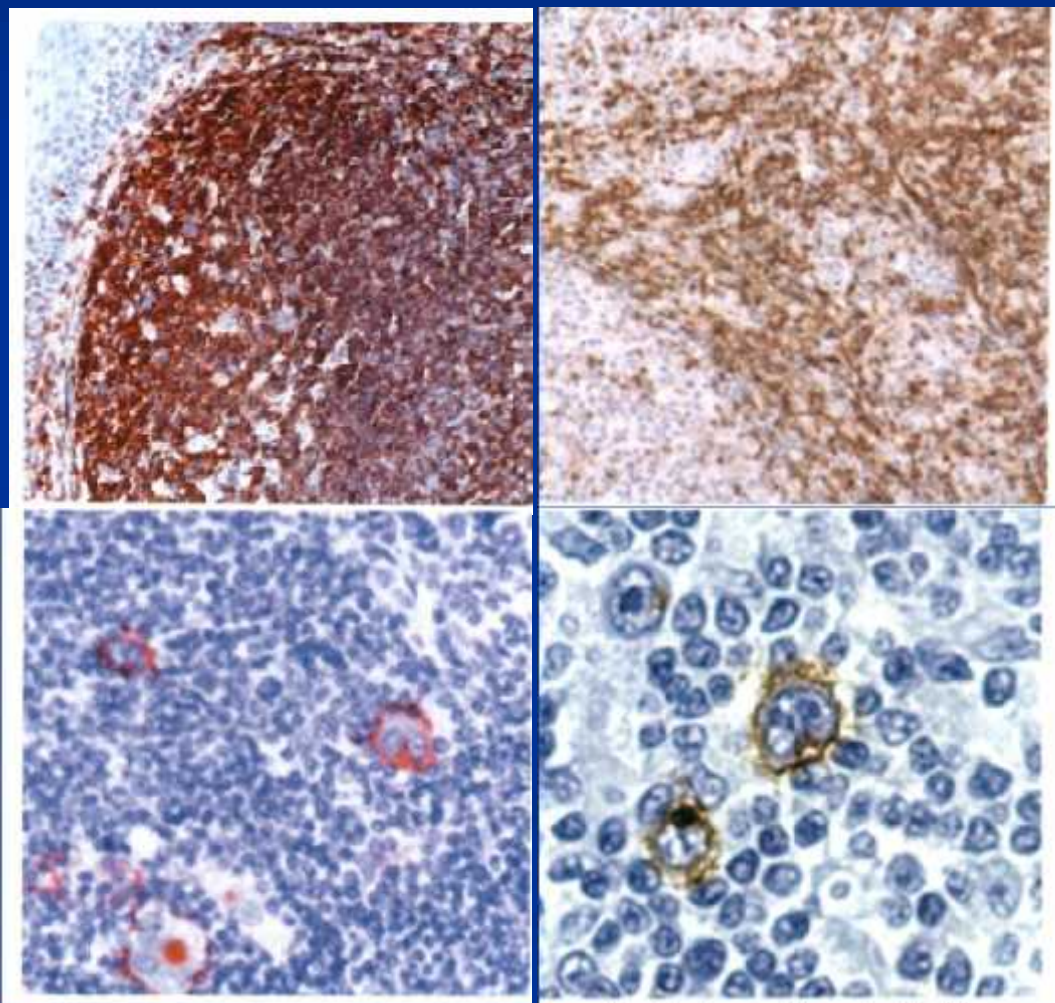
—



- 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

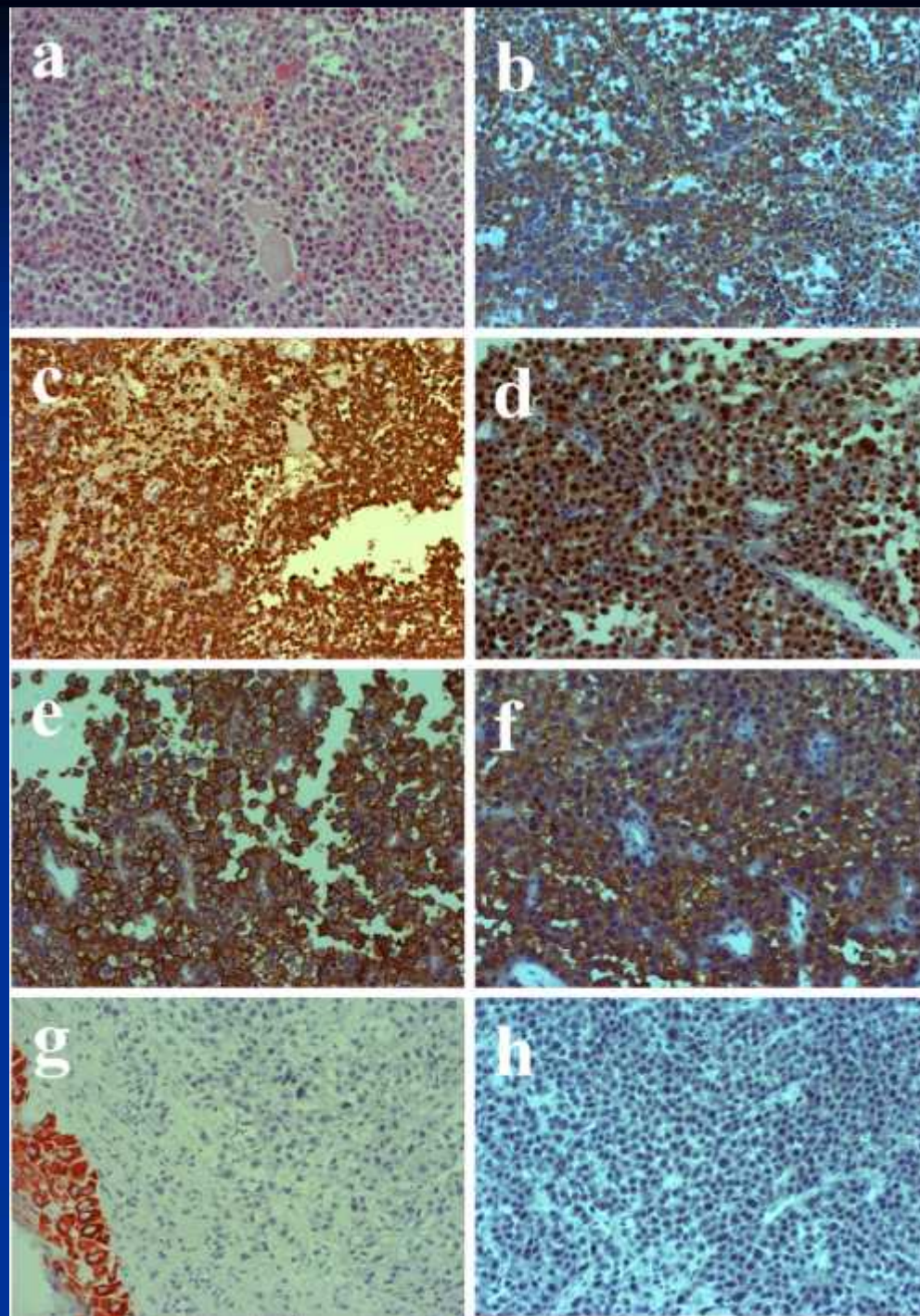
	СК	vim	S-100	HMB45	CD45
Малигни Меланом	—	+	+	+	—
Карцином	+	—	+	—	—
Лимфом	—	+	—	—	+



# ПЛАЗМОЦИТОМ

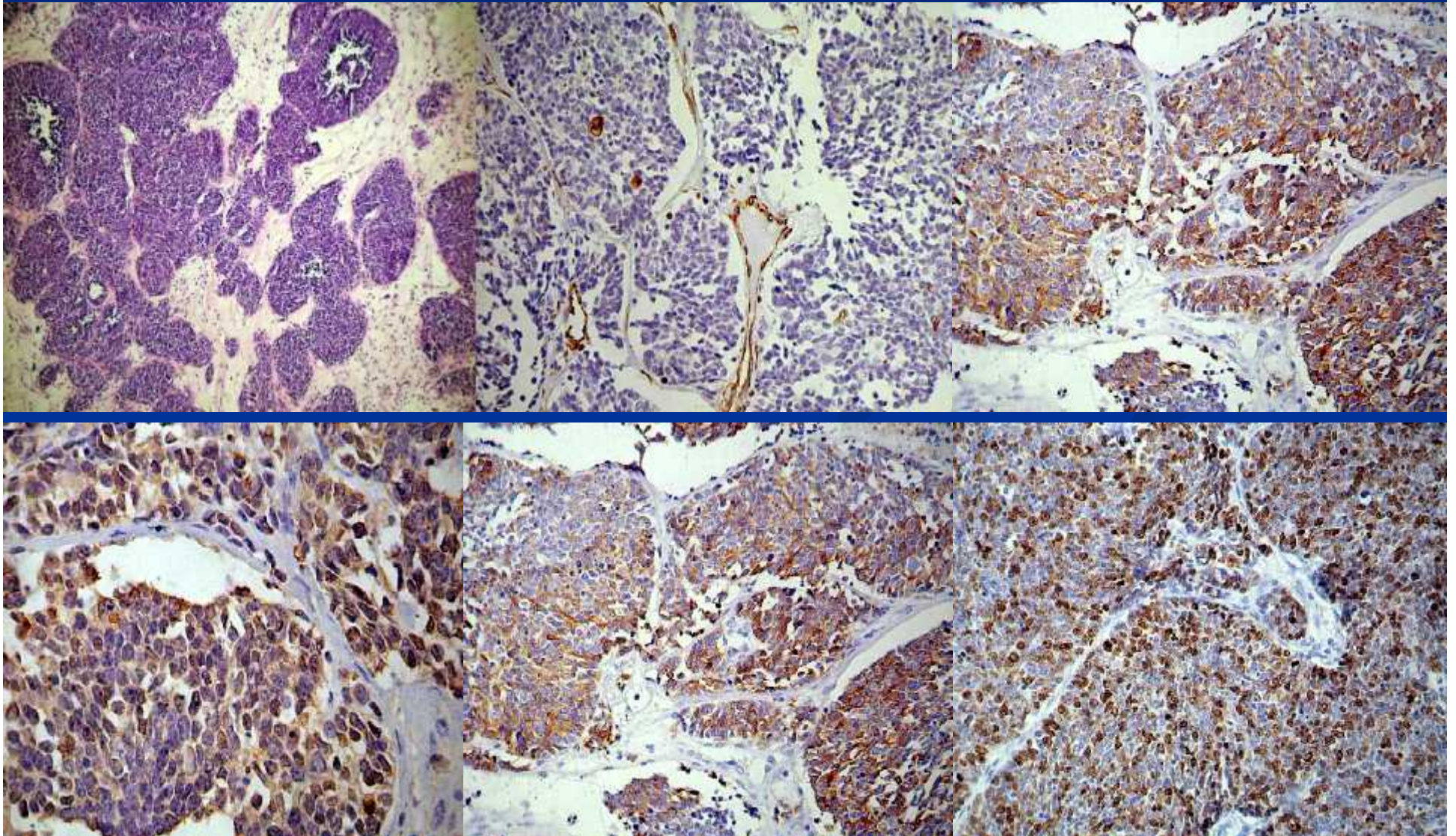
## ИМУНОФЕНОТИП:

Lambda ++, CD 79<sup>α</sup> +++,  
MUM1 +++, CD138 +++, СК-,  
CD20 +/-, vim-, NSE-, CD3-





Vim - , EMA-, NSE+, syn+, chrom +, Ki67+++,

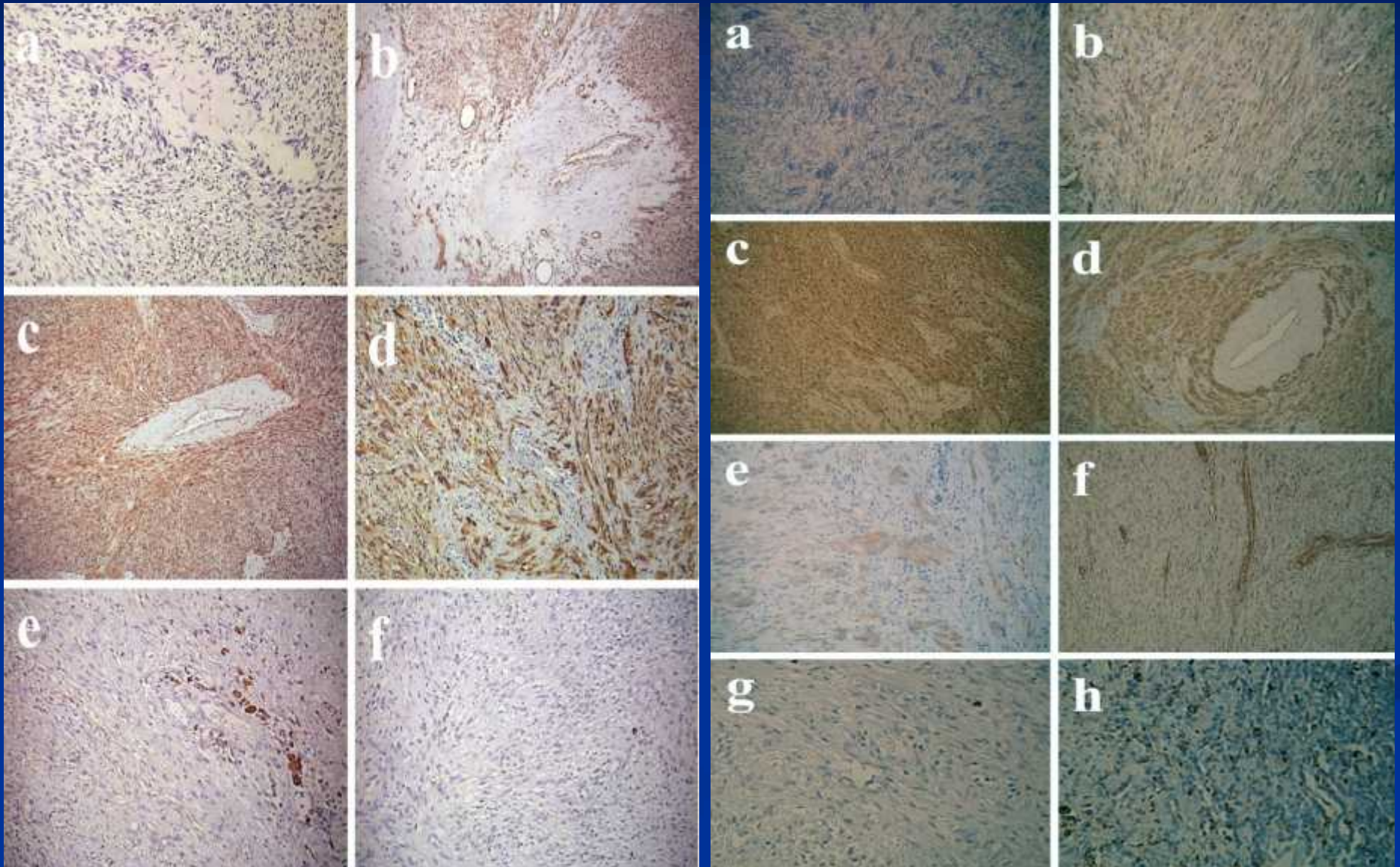




### III Дијагностички панел маркера за мезенхималне туморе(саркоме) и друге диференцијације

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

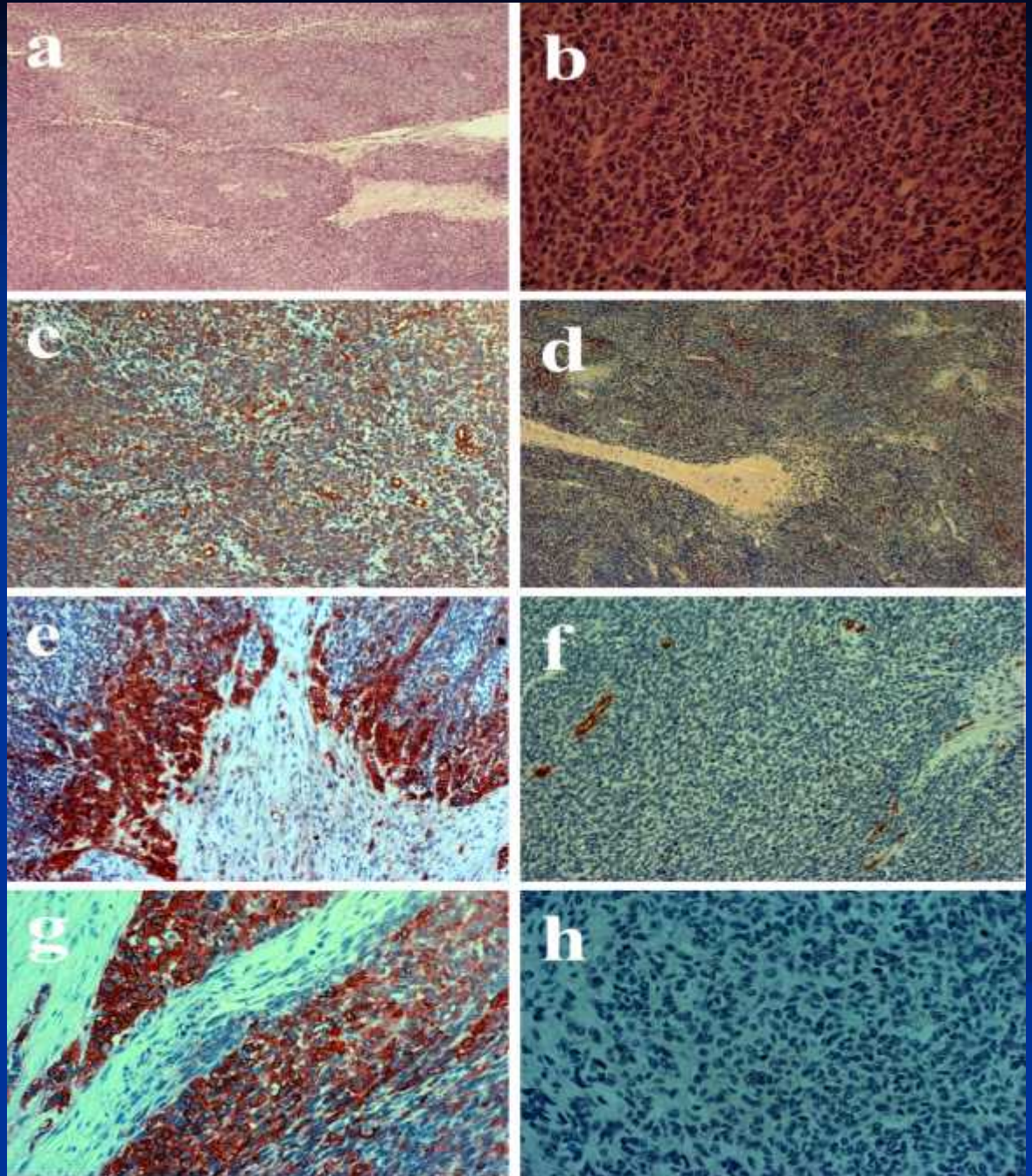
Vim+, S-100 protein +, GFAP+, CK+/-, SMA-, CD 68-, Ki-67 1%





# СИНОВИОСАРКОМ

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

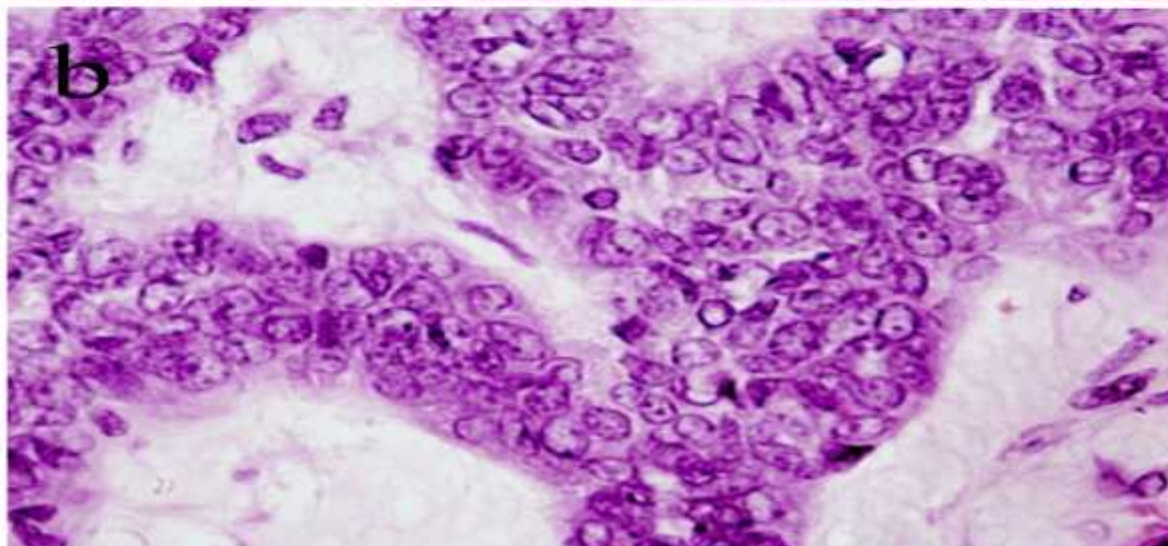
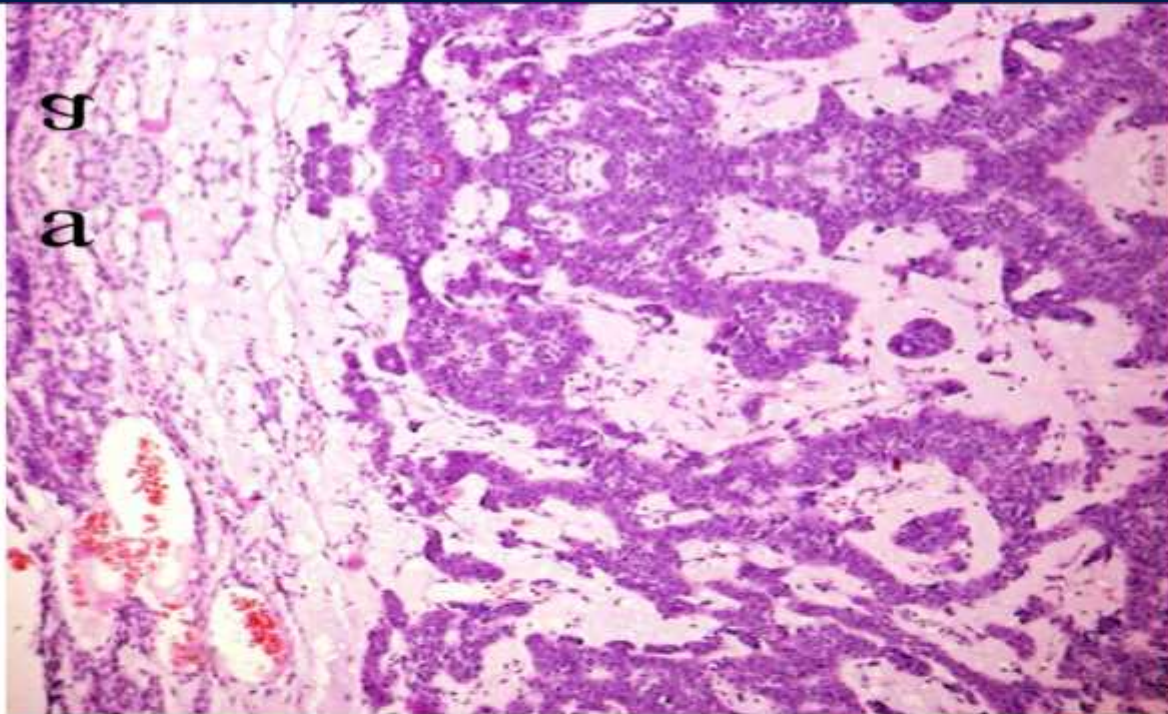


# Прогностички и предиктивни сет маркера у онкологији (Хормонотерапија, Herceptin® Gleevec® MabThera® Avastin®)

- 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

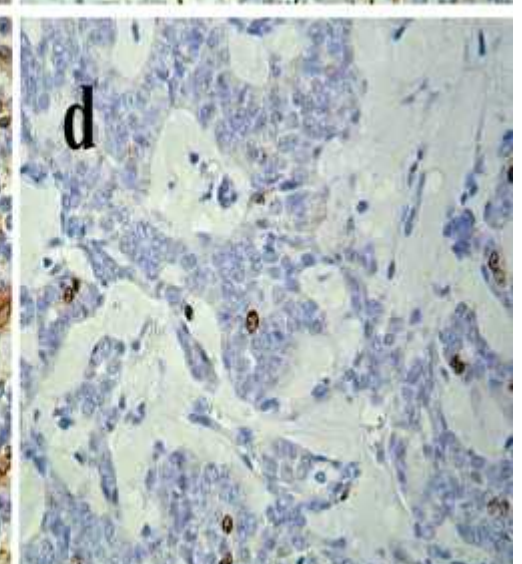
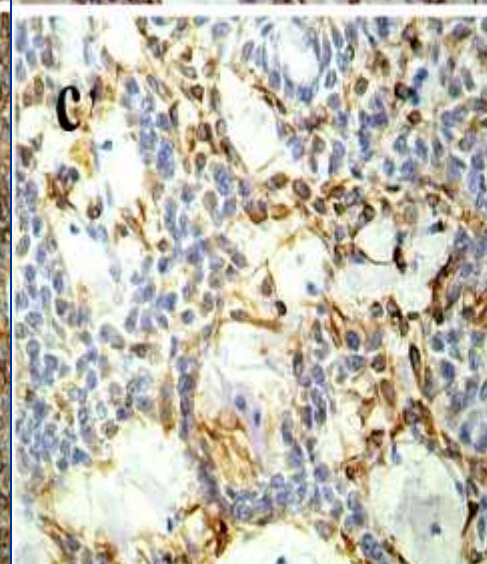
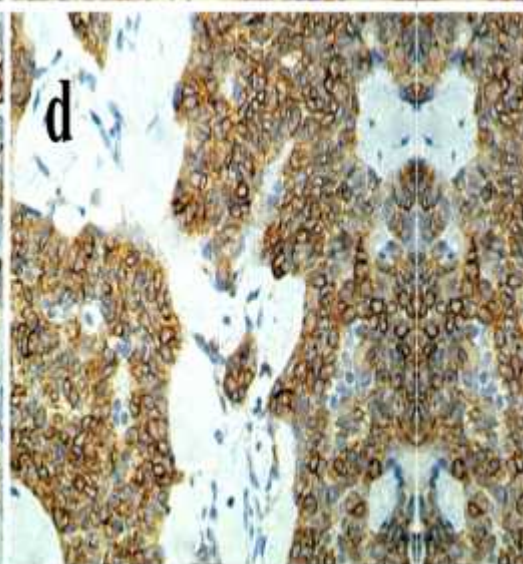
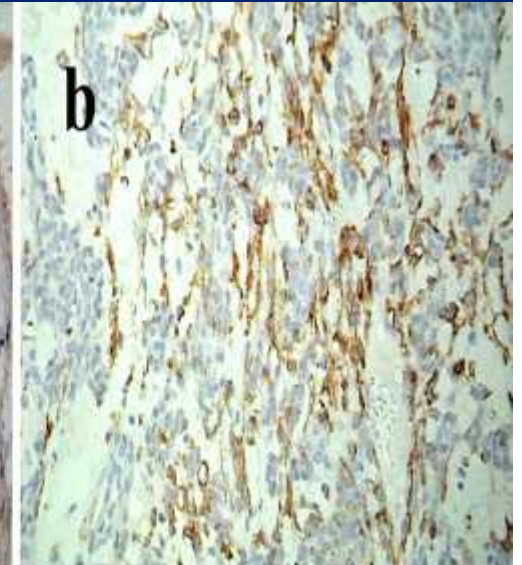
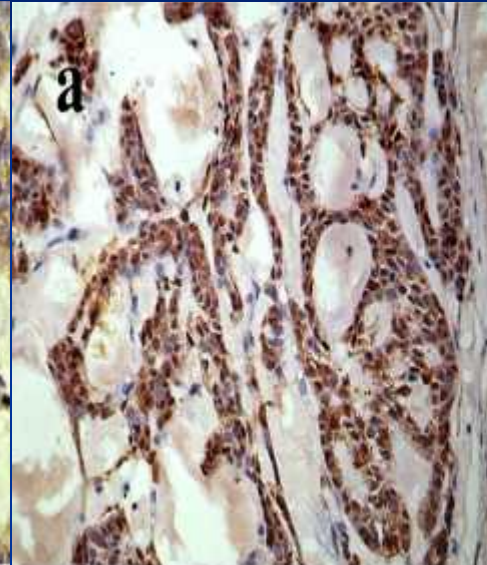
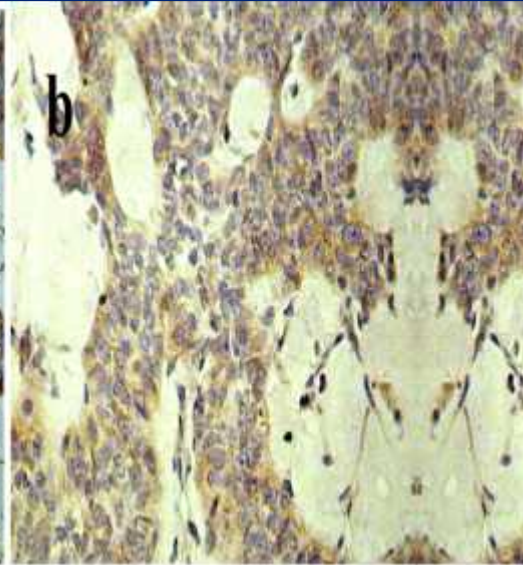
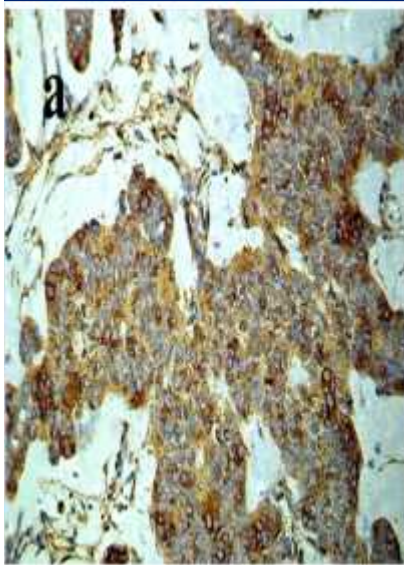


# Тумор дојке ????





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



,  
 ,  
 .



.



O

20%

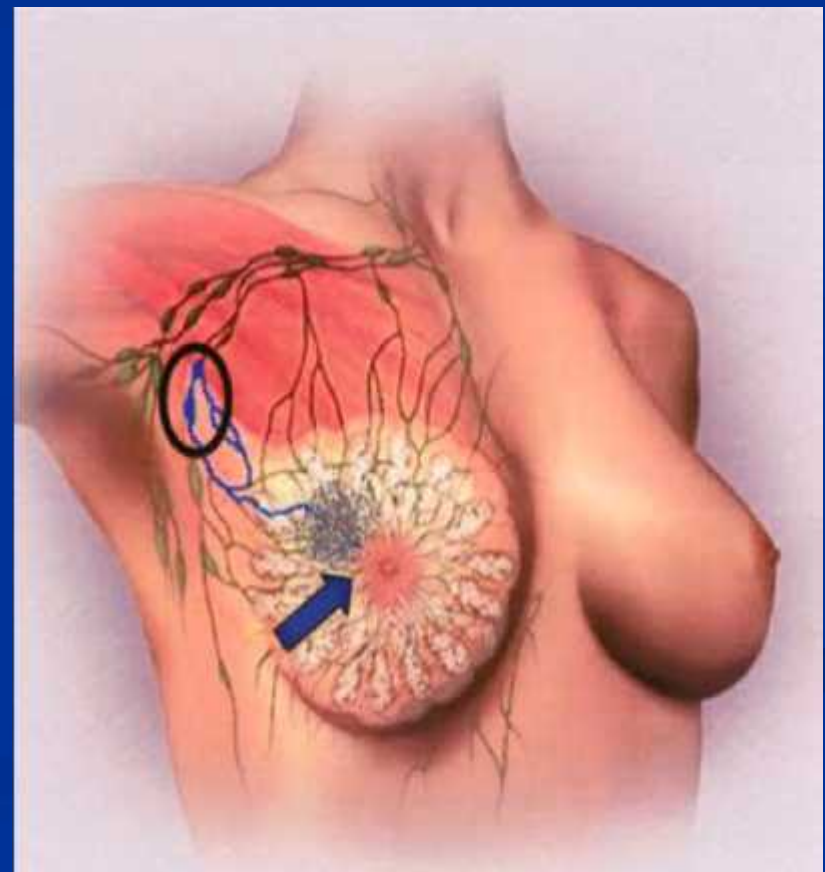
(

2.

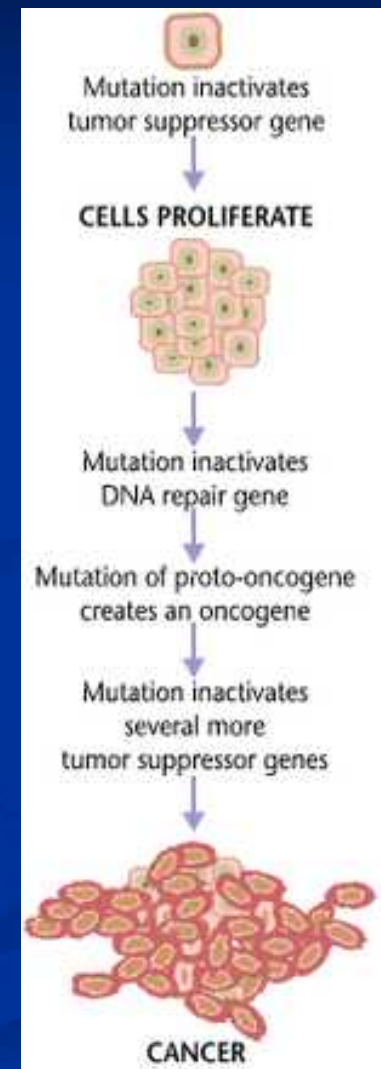
,

50

35-50. .)





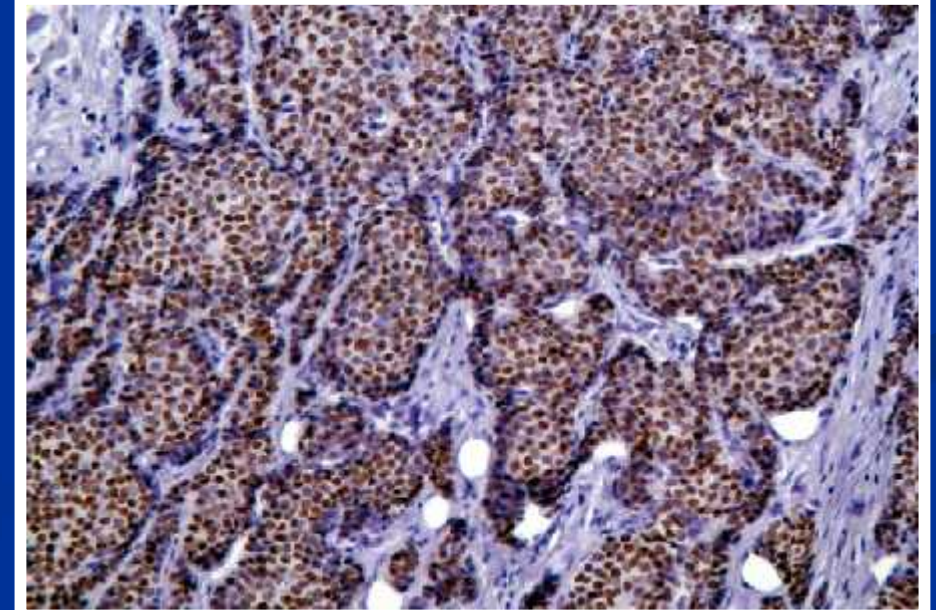
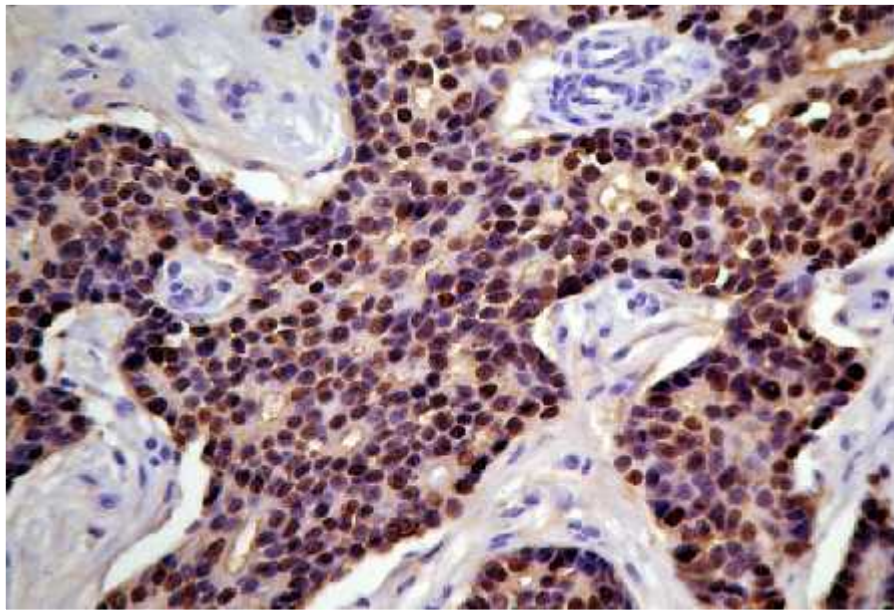
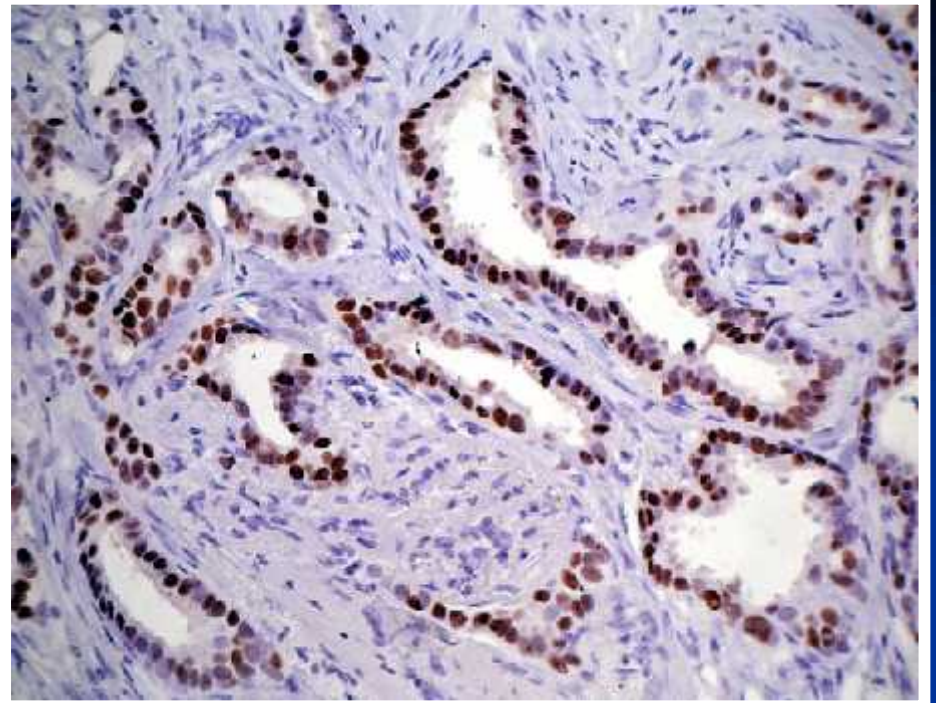
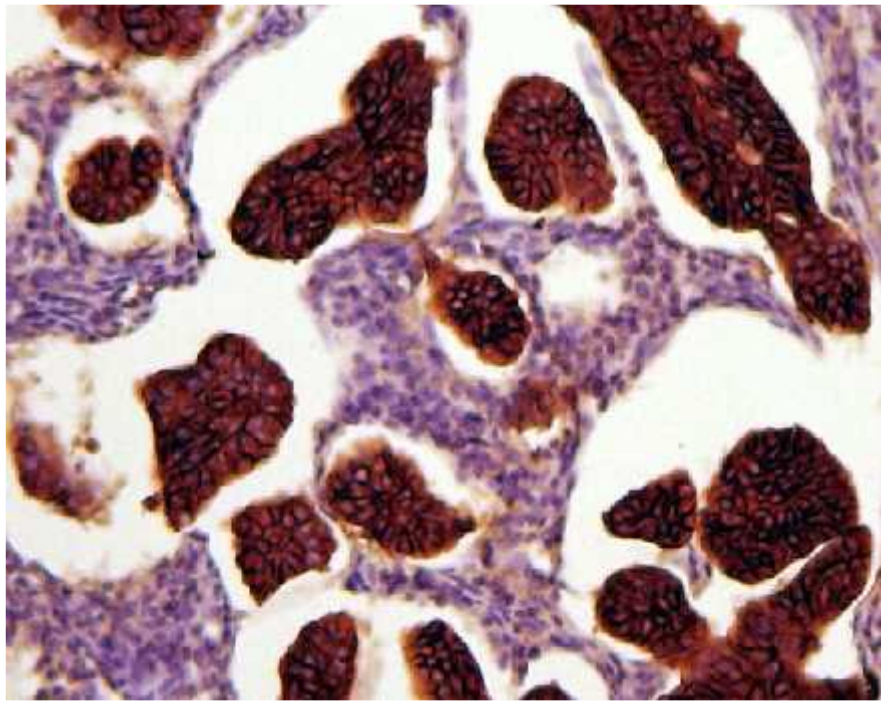


- Због постојања више хиљада различитих комбинација генетских промена и вишеструког укрштања путева у онкогенези, *неопходно је пратити однос експресије различитих туморских маркера*, а никако појединачну експресију.
- Крајњи циљ је одређивање експресијског профила сваког тумора, са надом да ће он указати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

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

1. луминални тумори А и Б
2. *HER-2* позитивни тумори
3. група троструко негативних тумора
4. нормална група (*normal breast-like*).





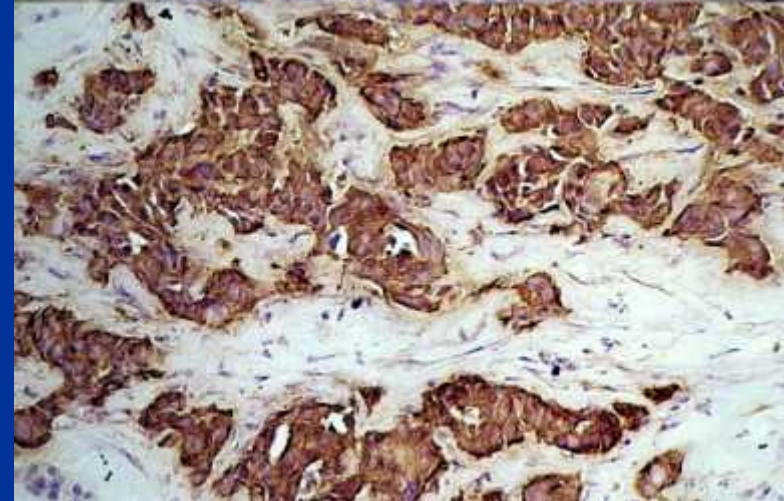
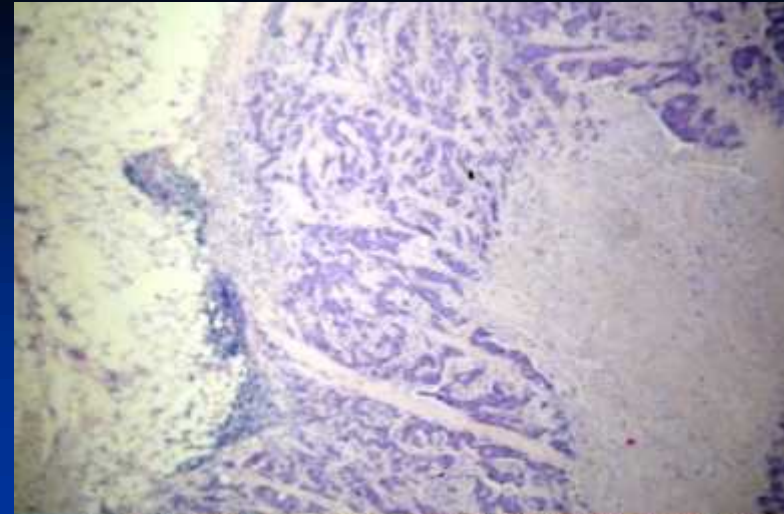
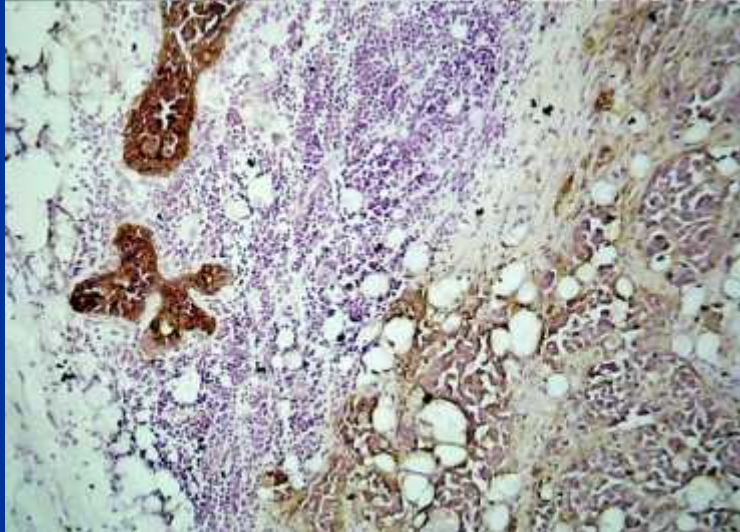
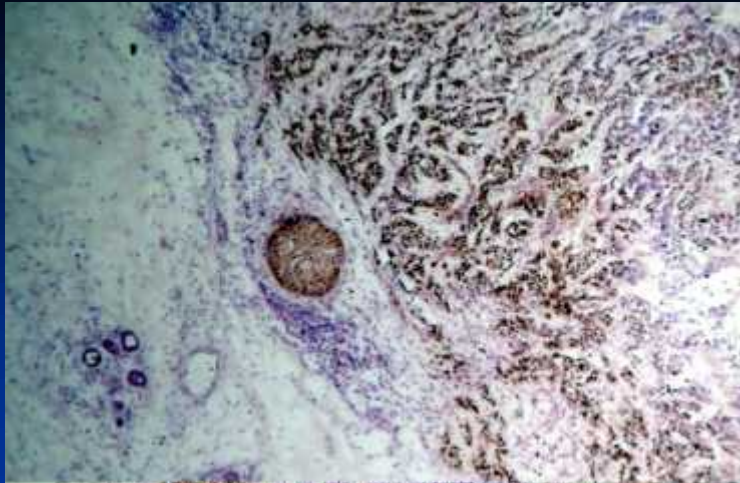
- A  
ER /HER-2  
: , 61,2% ER+ /HER-2-  
ER+ /HER-2+ 9,0%, 13,4%  
ER-/HER-2 -, 16,4% ER -/HER-  
2+.

- ER+/HER-2- ,  
( )  
ER -/HER-2+ ;

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

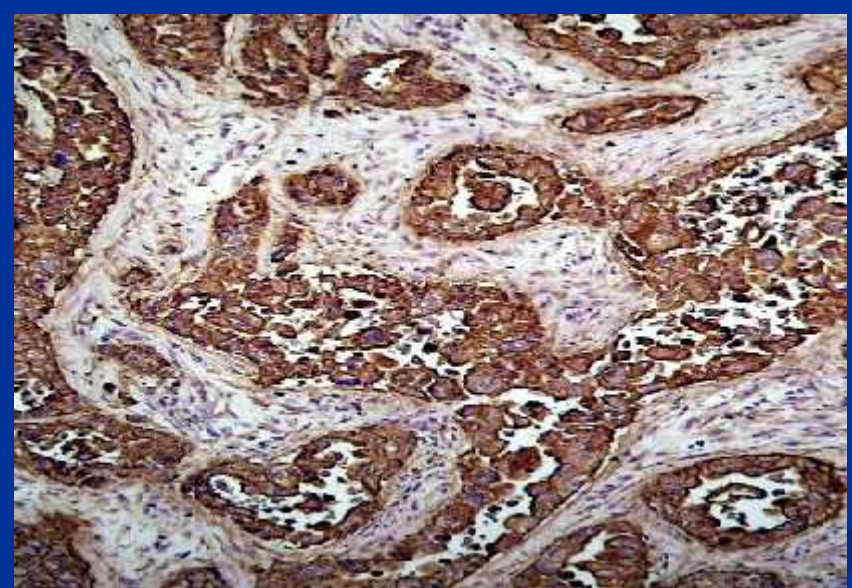
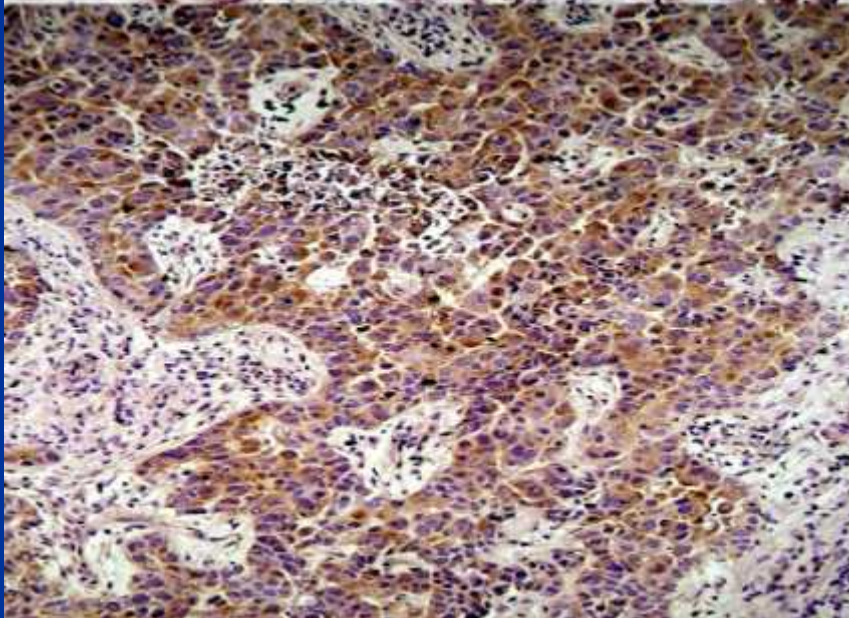
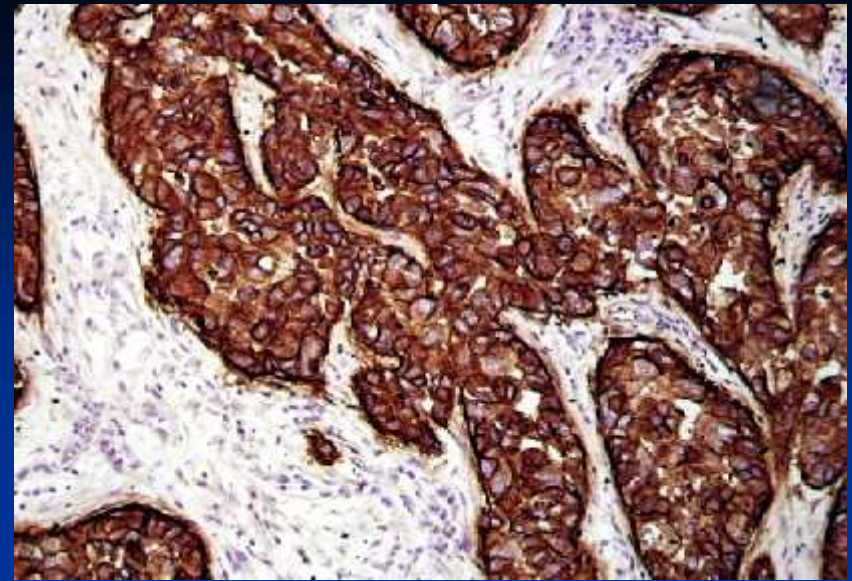
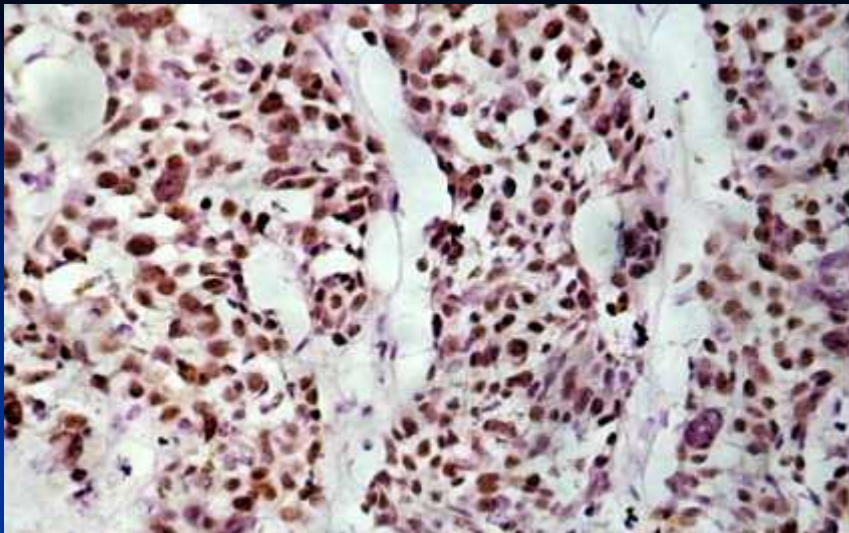
<i>ER / HER-2</i>	%	
<i>ER+ / HER2 -</i>	61,2%	<b>74%</b>
<i>ER+ / HER2+</i>	9,0%	
<i>ER - / HER2 -</i>	13,4%	58%
<i>ER - / HER2+</i>	16,4%	<b>54%</b>





ER-/PR- (IHC, 53,x10) , ( . 91) ) 53+  
 HER-2 nm23 (IHC, nm23, x40) ,  
 (IHC, HER-2, x10) )  
 19 (IHC, 19, x40)





)  
 HER-2, x20) ) 50%  
 )

( . 63) ) 70%

p53+ (IHC, p53, x40)  
 (IHC,  
 nm23+(nm23, x20)  
 (IHC, 19, x20)

- Сви ови подаци о генском експресијском профилу и молекуларној субкласификацији, представљају значајну повратну везу ка класично-патолошким фенотипским особинама ћелија карцинома дојке.
- Уколико би се туморски субтипови могли разликовати **комбинацијом хистоморфолошких карактеристика и експресије различитих имунохистохемијских маркера**, онда би то био **прави пут** побољшања дијагнозе и терапије, а самим тим и прогнозе малигних болести.



ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА  
ИСТРАЖИВАЊА У  
ДИЈАГНОСТИЦИ  
ТУМОРА  
МЕЛАНОГЕНЕТСКОГ  
ПОРЕКЛА



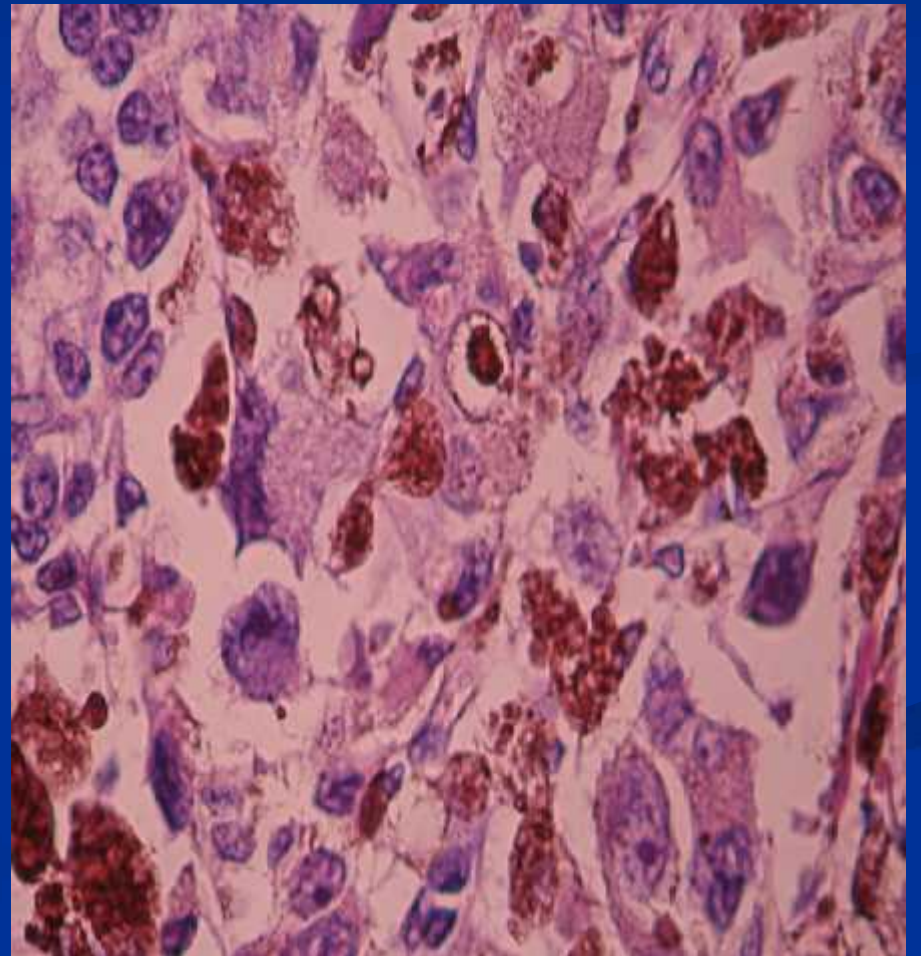
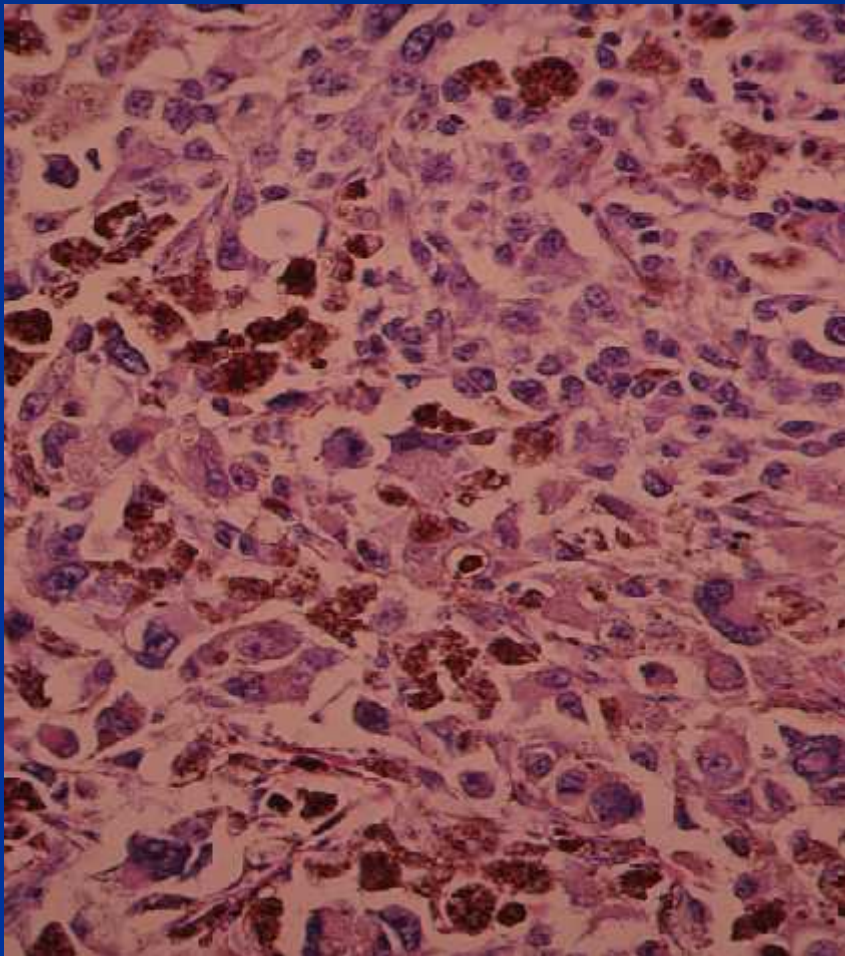
,

,

,

-

.





,

,

,

,

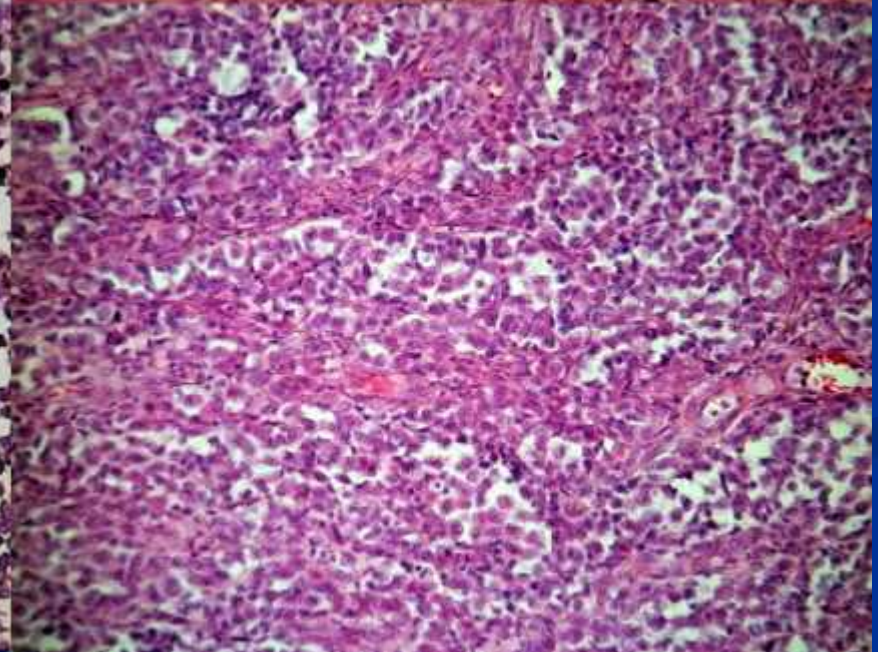
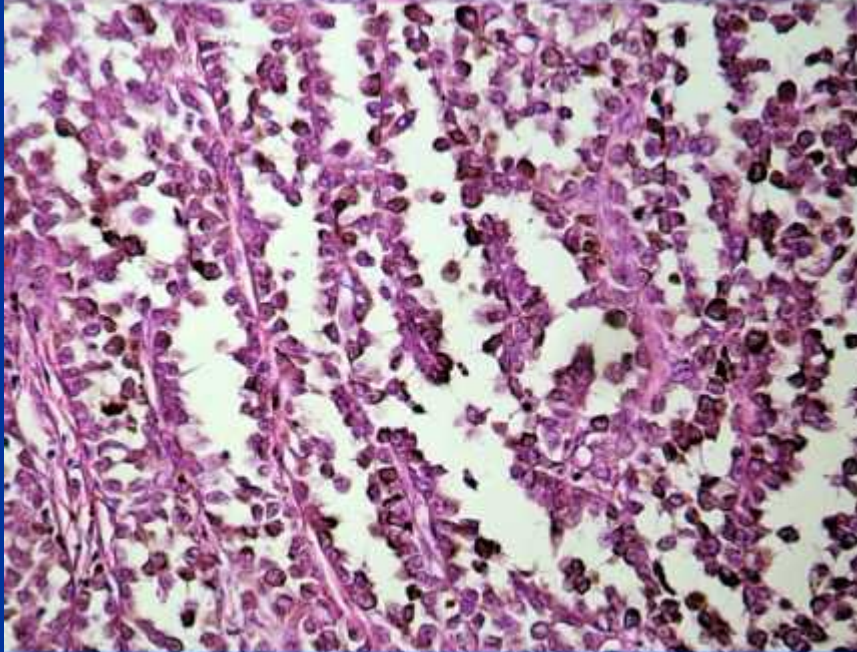
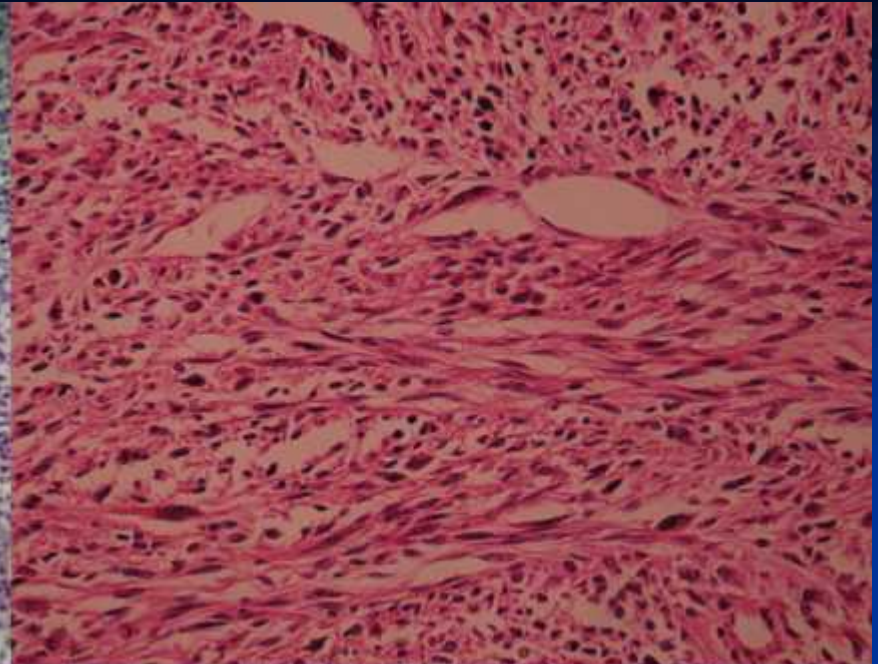
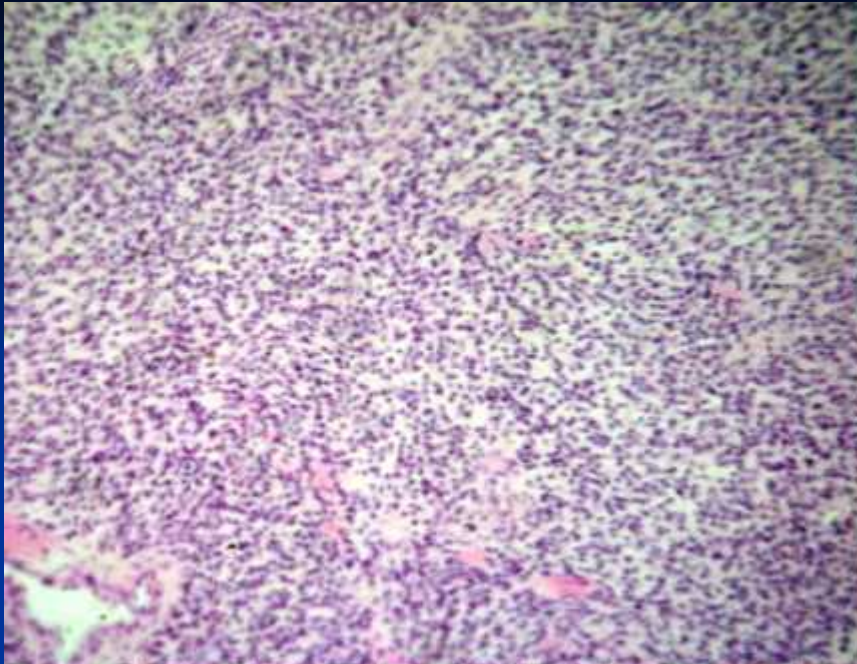
,

.





- Дивергентна диференцијација ММ укључује фибробластну, миофибробластну, глаткомишићну, рабдомиосаркоматозну, остеохрскавичаву, Шваномску, перинеуријалну, неуроендокрину, епителну и тд. У неким радовима ова способност се описује као метапластична промена.
- Свеједно како називали ову особину, она условљава експресију великог броја различитих маркера, који додатно повећавају дијагностички проблем.



:



,



,



,

■ *Spitz-*      *Reed-*      ,

■ in situ      ,



Paget-



.....

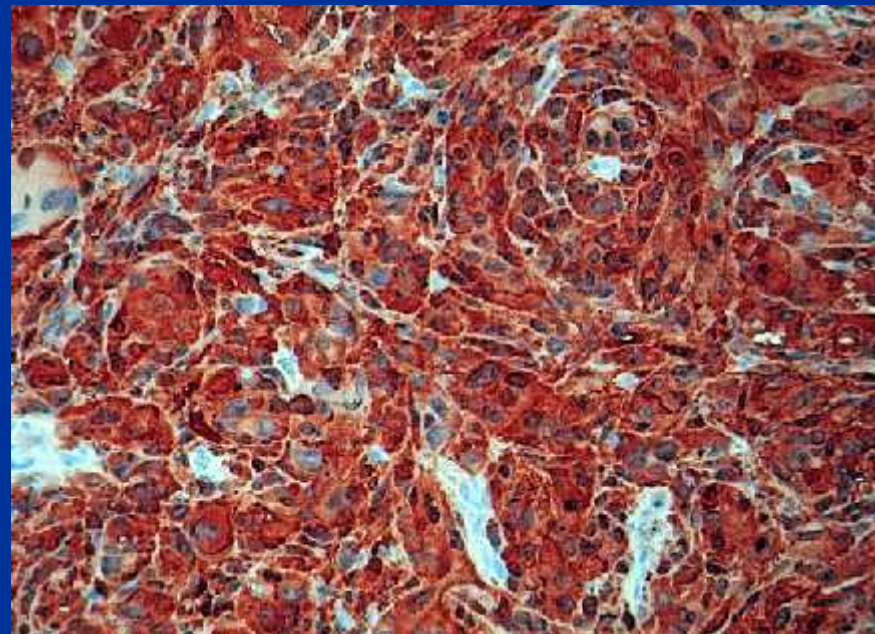
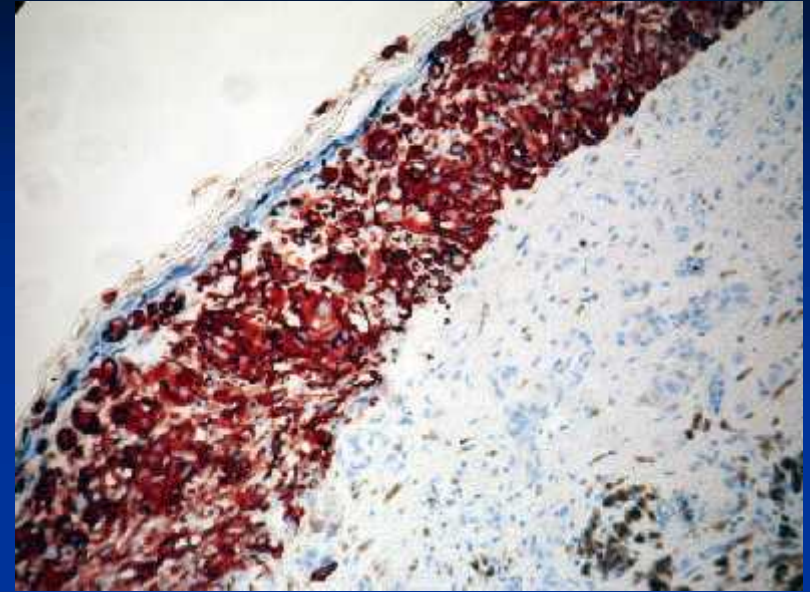
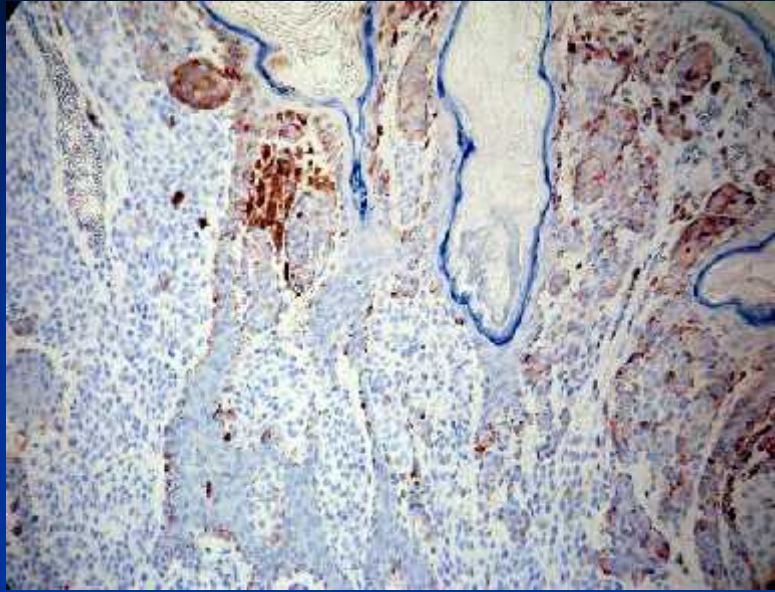
.



PNL2.

Melan A, gp100/ HMB45  
S100

95%



# МЕТАСТАТСКИ ТУМОРИ НЕПОЗНАТЕ ПРИМ. ЛОКАЛИЗАЦИЈЕ

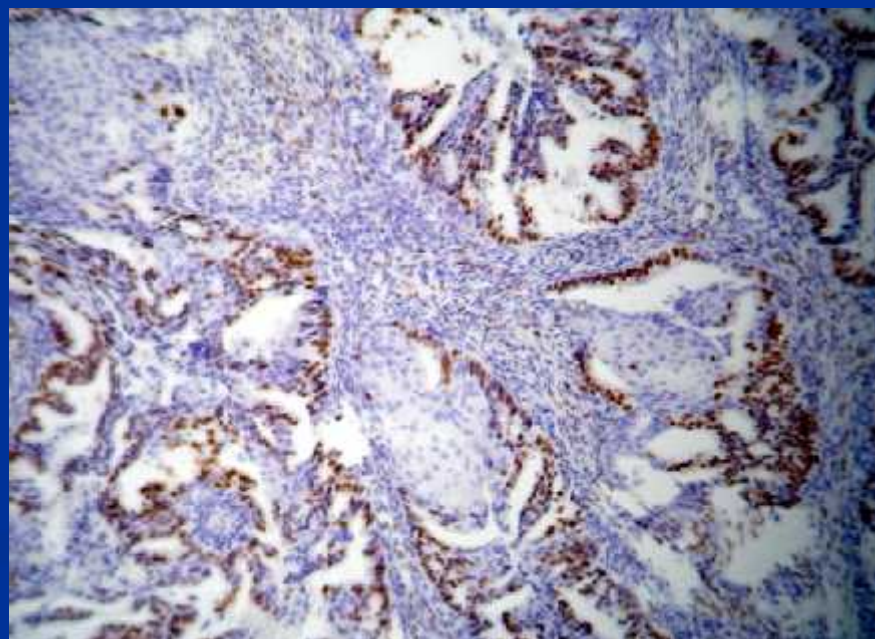
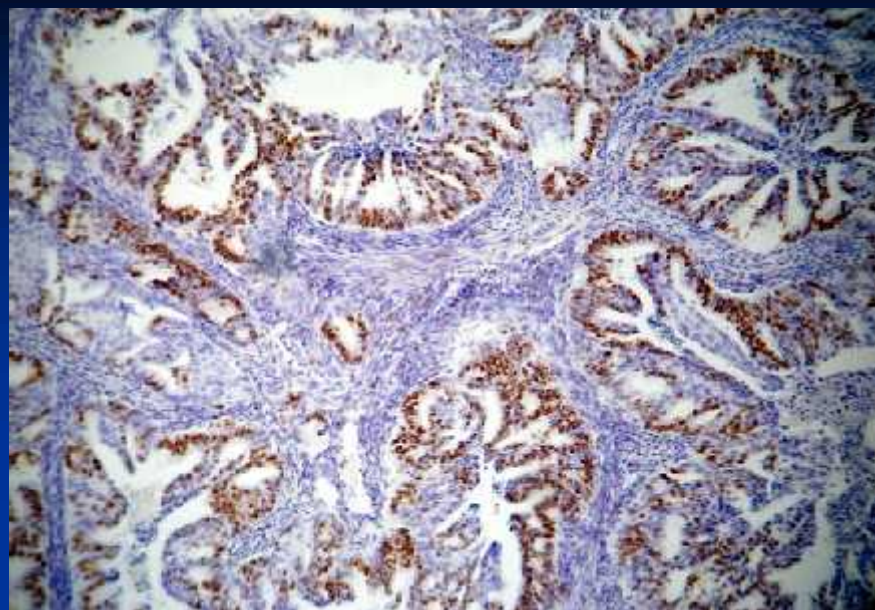
- Метастатски тумор је прва презентација малигног процеса у чак до 10% случајева.
- У 2-4% и поред детаљних клиничких дијагностичких процедура, не открије се примарна локализација
- У тим случајевима, од круцијалног терапијског значаја је одређивање имунохистохемијског профила метастазе и патохистолошко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

# МЕТАСТАТСКИ ТУМОРИ НЕПОЗНАТЕ ПРИМ. ЛОКАЛИЗАЦИЈЕ

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

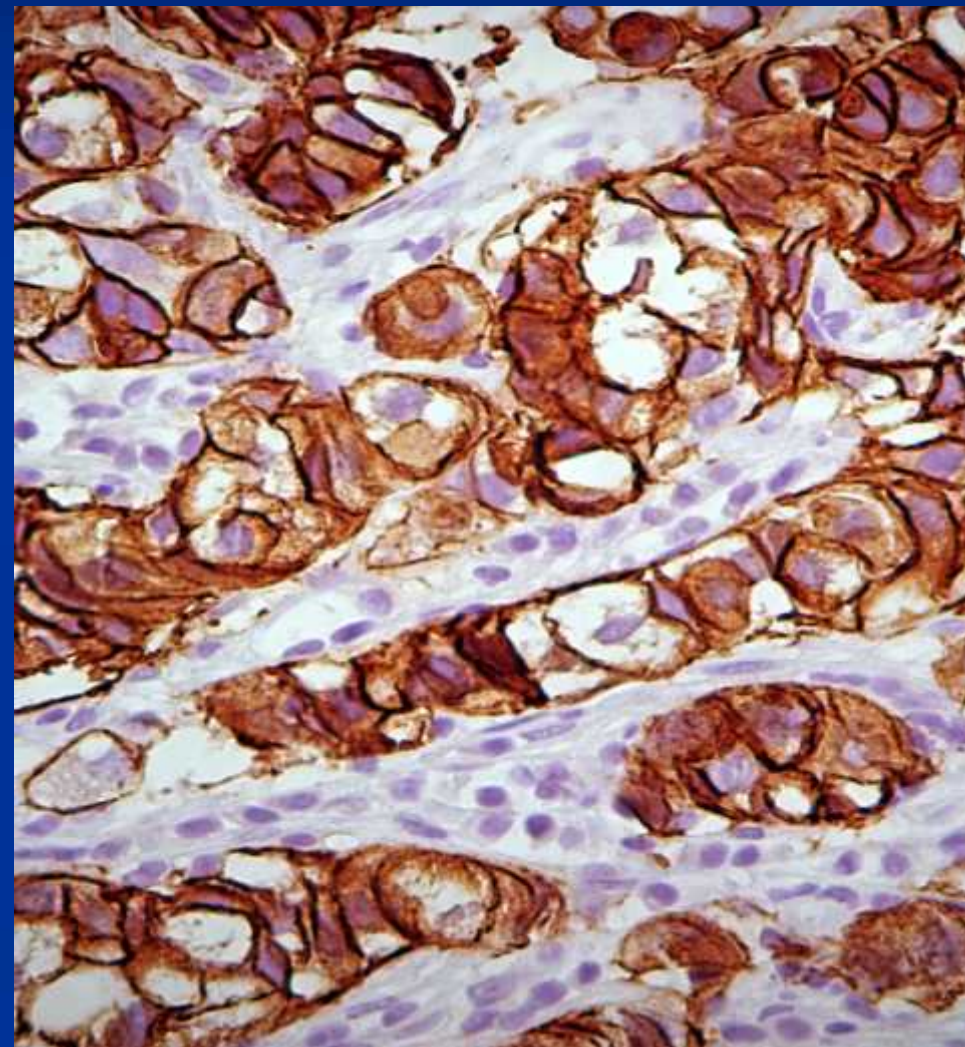
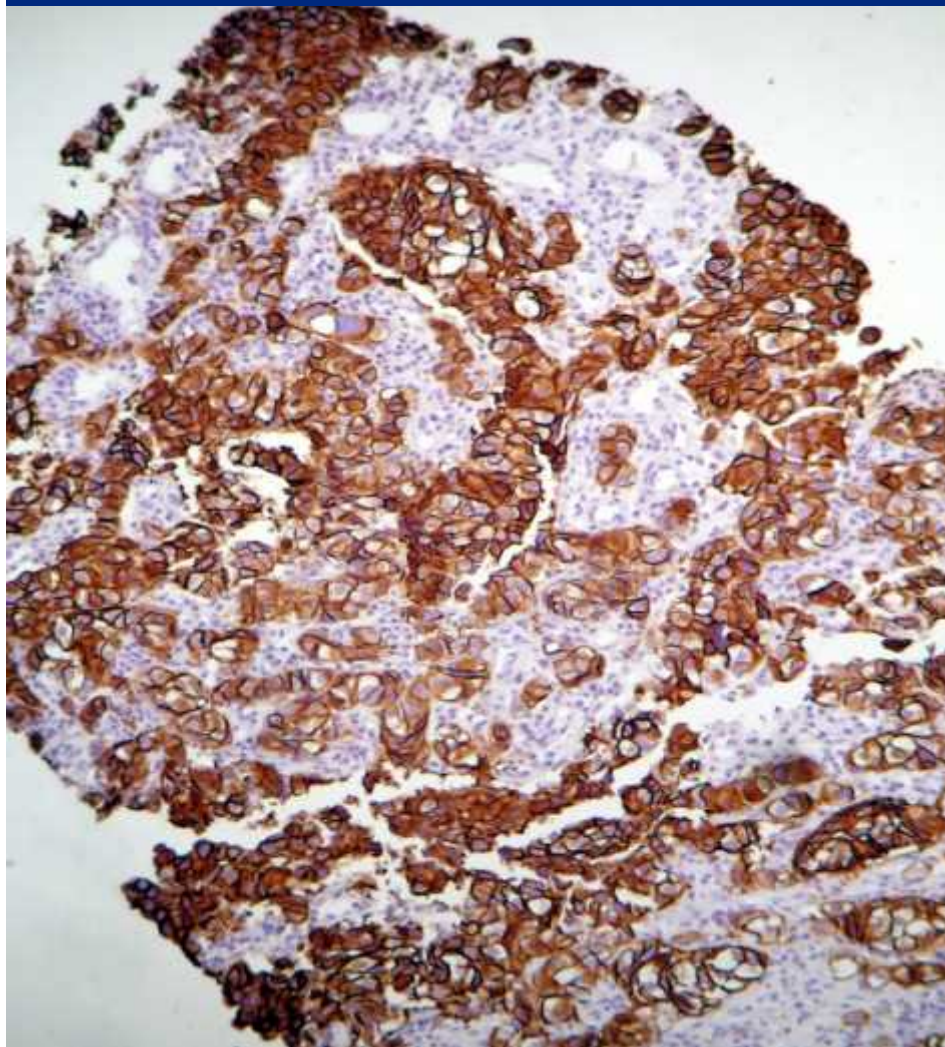


■ Метастаза  
ER+ и PR+  
карцинома дојке  
у мозгу



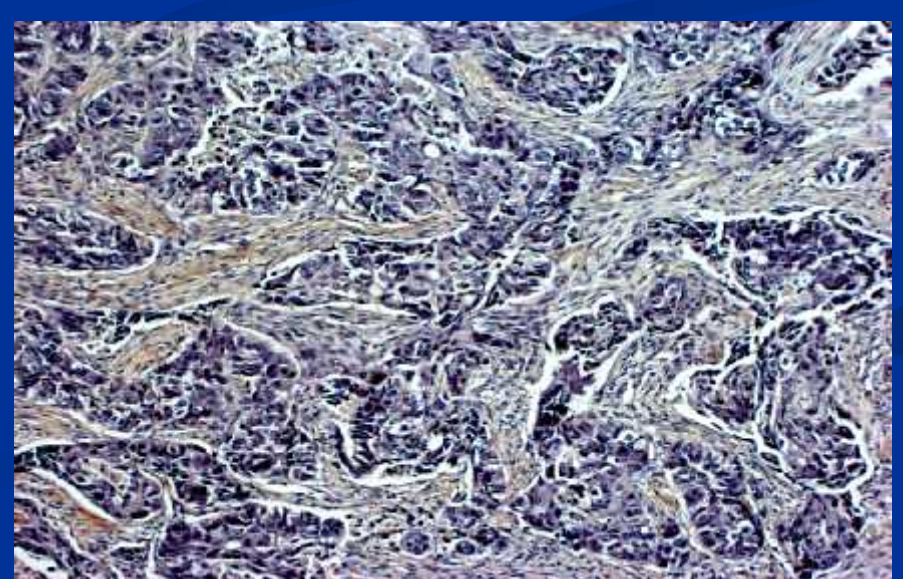
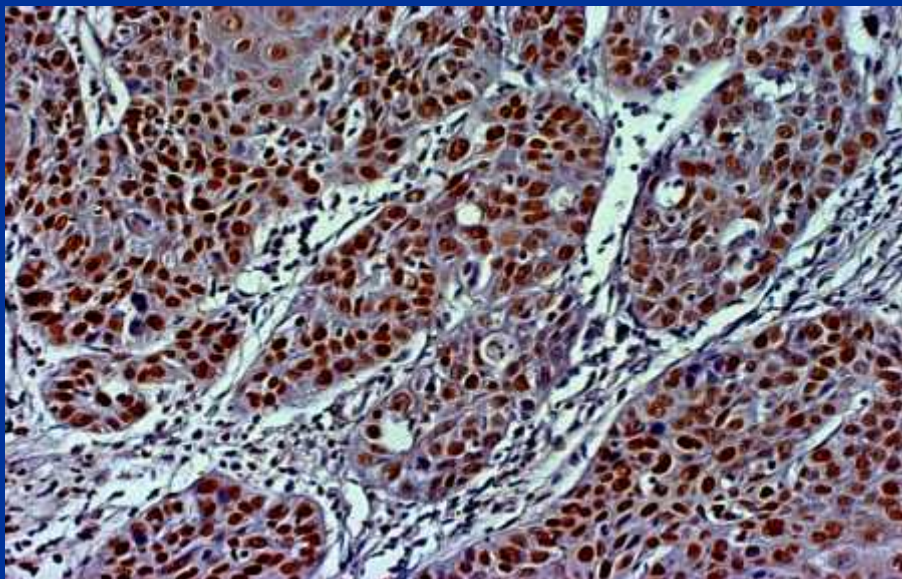
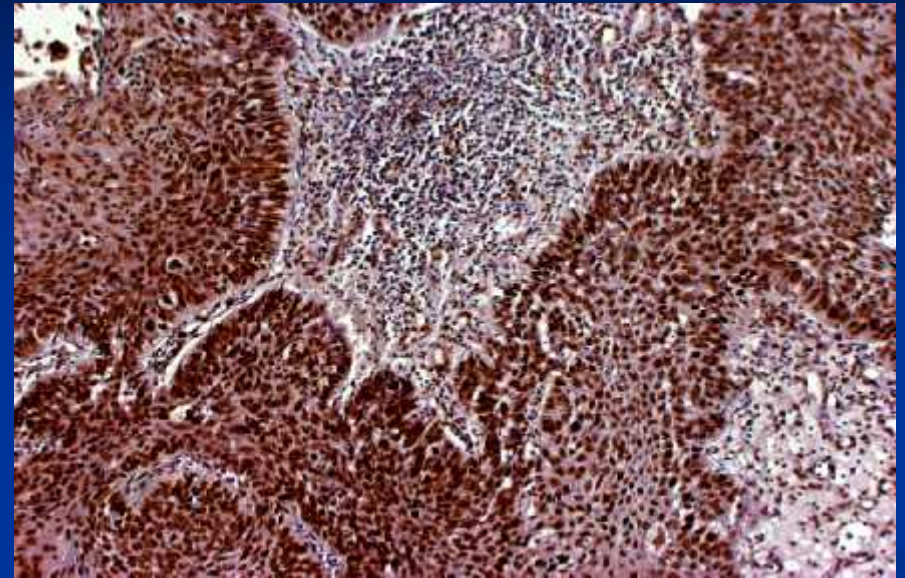
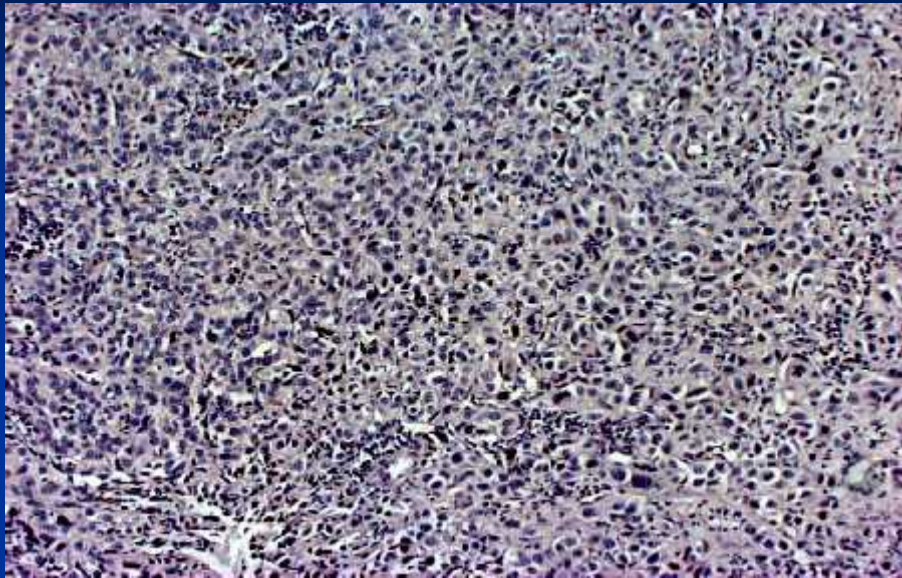


# Метастаза ЕR-,РR- и HЕR-2+ карцинома дојке у јетри





# Метастаза СК7- , p63+, HPV16 и СК20- сквамозног карцинома у лимфном нодусу





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



# 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

	CK 7	CK 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%
<b>Breast, infiltrating carcinoma</b>	<b>CK7+/CK20-</b>	<b>90%</b>
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%
<b>Lung, adenocarcinoma</b>	<b>CK7+/CK20-</b>	<b>94%</b>
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%
<b>Uterus, adenocarcinoma</b>	<b>CK7+/CK20-</b>	<b>89%</b>
Uterus cervical squamous cell	CK7+/CK20-	87%



■ ХВАЛА НА ПАЖЊИ!