

*Л.Г. Роша,  
доцент кафедри патологічної анатомії з секційним курсом,  
Одеський національний медичний університет,  
м. Одеса, Україна*

## ОПТИМІЗАЦІЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

***Анотація.** Стаття ґрунтується на тому, що головною передумовою для проведення якісних імуногістохімічних досліджень є адекватна матеріально-технічна база, досвідчені кваліфіковані фахівці, достатній об'єм досліджень, оптимальна організація досліджень і досконала нормативно-правова база.*

***Ключові слова:** імуногістохімічні дослідження, патогістологія, контроль якості.*

Значний прогрес у лікуванні злоякісних пухлин, широке впровадження індивідуалізованої та таргетної терапії, потреба у визначенні прогностичних факторів вимагають від патологоанатомів не лише точної діагностики, а й використання методів імуногістохімії та генетичних досліджень.

Швидке прийняття імуногістології як безцінного доповнення до морфологічної діагностики стало можливим завдяки розвитку нових, чутливих антитіл (далі – АТ) і систем детекції. Антиген-пошукові методи сьогодні дещо узгоджені, що дозволяє імуногістохімічному дослідженню (далі – ІГХД) бути надійно використаним як діагностичний інструмент. Поява прогностичних маркерів, прагнення до індивідуалізованої терапії призвели до бажання використовувати ІГХД не лише якісно, а й у кількісному вираженні. Коли технологія використовувалась якісно, серйозних проблем не було. Численні зміни в преаналітичному та аналітичному етапах процедури, які впливають на імуноекспресію білків, стали критичними для стандартизації. Велика кількість змін ускладнює забезпечення порівняння результатів, отриманих у різних лабораторіях, і навіть у тій же лабораторії, коли кожен зразок тканини піддається різним змінам на преаналітичному етапі. Крім того, існують різні інтерпретації оцінки реакції, відрізняються пороги чутливості. Невизнання хибнопозитивних і хибнонегативних реакцій призводить до подальших помилок кількісного виміру. Частина проблем, пов'язаних з технологією та інтерпретацією імунореактивності, зумовлена невизнанням відмінності ІГХД від інших гістологічних методик і включає багато кроків, які не можуть контролюватися доти, доки кінцевий результат не буде досягнутий. Точна і відтворена кількісна оцінка імунофарбування залишається невловимою, хоча й є перелік деяких заходів для вирішення цих проблем.

Імуногістохімічне дослідження – це метод визначення наявності, точної локалізації та кількісного визначення антигенів у певних компонентах тканин, типах клітин і структурах клітин за допомогою моноклональних чи поліклональних антитіл.

Імуногістохімічний метод є доповненням до основного патогістологічного дослідження. ІГХД як метод діагностики захворювань широко використовується для діагностики злоякісних новоутворень (верифікації пухлин, виявлення первинної пухлини за анонімним метастазом, диференційної діагностики пухлин, прогнозу чутливості до таргетної терапії, оцінка гормонального статусу пухлини, імунофенотипування пухлин кровотворної системи, визначення прогностичних факторів). Вкрай важливим цей метод зарекомендував себе щодо пухлин, які патоморфологи називають «недиференційованими», тобто під час рутинного забарвлення гематоксиліном та еозином пухлина не має жодних типових ознак гістогенетичної належності. Неоцінений внесок ІГХД був зроблений у діагностику лімфопроліферативних пухлин. Зараз жоден діагноз лімфоми не є доведеним та обґрунтованим без цього методу дослідження.

За допомогою цього методу можливе визначення збудників інфекційних хвороб (бактерій, вірусів) у біопсійному та операційному матеріалі. Виявлення у клітині шийки матки певних типів вірусу папіломи людини впливає на лікування. За допомогою ІГХД уточнюється локалізація вірусу та стадія інфекції (репродуктивна чи вже інтегративна). Це є підґрунтям прогнозу передпухлинної патології шийки матки.

ІГХД є важливим доповненням та уточненням діагнозу (аутоімунні хвороби тощо), а також дозволяє оцінити функціональний стан клітин організму. Широко використовуються ІГХ реакції для різноманітних наукових досліджень.

Суть методу полягає у проведенні на гістологічному зрізі реакції антиген-антитіло, мічене антитіло виявляється за допомогою імунологічних та гістохімічних реакцій.

Антигенами є різноманітні чужорідні речовини, які здатні під час потрапляння в організм викликати імунні реакції. Розрізняють повні (білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди, віруси) та неповні антигени (гаптени, які здатні утворювати комплекс антиген-антитіло лише з залученням клітин організму). Ділянка антигену, до якої антитіло буде прикріплюється, називається епітопом. Антитіла – це складні речовини білкової природи. Антитіла мають специфічність, тобто зв'язуються з певними антигенами. Антитіла можуть бути полівалентними, тобто можуть мати багато однакових епітопів. Вони також можуть мати різні епітопи та зв'язуватись з різними антитілами. Моноклональні антитіла є імунологічно ідентичними, зв'язуються лише з одним епітопом антигену. Поліклональні антитіла складаються із суміші різних антитіл до різних епітопів антигену.

Важливим етапом ІГХД є візуалізація реакції «антиген-антитіло». Незв'язані антитіла змиваються з поверхні зрізу. Зафарбовані продукти реакції нерозчинні, вони залишаються на місці. Для виявлення цих комплексів використовуються різноманітні мітки – ферменти, флюорохроми, біотин, метали.

Сучасні системи детекції ІГХД використовують кон'югати різних полімерів. До великої молекули полімеру приєднується велика кількість ферменту, що робить метод високочутливим. Також вони мають декілька видів кольору візуалізації, завдяки чому можливе виявлення водночас на одному зрізі від 1 до 3 різних антигенів.

Одним із ключових моментів ІГХД є вибір титру антитіл, тобто те максимальне розведення сироватки, за якого спостерігається виразне специфічне фарбування без неспецифічного (фонового) фарбування тканин довкола. Для спрощення цього етапу випускаються різноманітні антитіла, готові до ужитку. Також є готові препарати деяких фірм для оцінки якості реакції.

Весь технологічний процес ІГХД умовно поділяється на три стадії:

- преаналітична (забір, доставка, прийом матеріалу, фіксація, забір, проводка, заливка в парафін, мікротомія);
- аналітична (депарафінізація, проведення реакції, введення препарату під покривне скло);
- постаналітична (оцінка якості фарбування, оцінка контролів, дослідження зрізів, формування висновку, видача звіту про дослідження).

Як правило, преаналітична частина проходить в інших патологоанатомічних відділеннях (ПАВ), бюро, лабораторіях, після цього матеріал надходить на ІГХД. Тому часто якість преаналітичної стадії перебуває поза впливом (на предмет оцінки якості її проведення) лабораторії, що виконуватиме ІГХД. За алгоритмічною побудовою процес ІГХД складається з таких восьми етапів:

- 1) звернення пацієнта, лікаря-куратора;
- 2) прийом матеріалу в роботу;
- 3) оцінка якості та достатності матеріалу;
- 4) перегляд препаратів та визначення панелі антитіл;
- 5) підготовка блоків до ІГХД;
- 6) проведення ІГХД;
- 7) аналіз результатів дослідження;
- 8) формулювання висновку.

Необхідно постійно контролювати процеси, впроваджувати нові та кращі технології, виявляти та виправляти помилки, розробляти та покращувати процедуру попередження ризиків. І хоча з кожним роком зростає потреба в ІГХД, реальні економічні умови роблять очевидною необхідність оптимізації витрат шляхом глибокого аналізу, покращення якості процесів та оптимізації використання матеріальних, кадрових, інформаційних ресурсів.

Для проведення ІГХД та отримання якісної реакції необхідно забезпечити якість блоків, тобто постає питання уніфікації, стандартизації преаналітичного етапу.

Найважливішим фактором, що впливає на виявлення антигену, є фіксація. Результат недофіксації у формаліні та коагуляції в етанолі може призвести до хибних результатів ІГХД.

Лікар-патологоанатом переглядає гістологічні препарати з оглядовими методиками фарбування, робить попередні висновки щодо характеру процесу. Потім вибирає слайд з необхідним для ІГХД зрізом, обводить його олівцем та відбирає блок, що підлягає імуногістохімічному дослідженню. Далі на основі розроблених експертами методик та таблиць формує панель первинних антитіл для імуногістохімічного дослідження, за необхідності уточнює панель за даними довідників фахової літератури чи у постачальника.

Наголосимо, що складання панелі антитіл повністю у компетентності лікаря-патологоанатома, проводиться з огляду на можливості лабораторії, конкретно поставлені задачі, потреби діагностичного процесу та ґрунтується на рекомендаціях експертів.

Для вірної інтерпретації ІГХД та відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO 31000 (ризик-менеджмент – принципи та керівництво) водночас із досліджуваними зрізами обов'язково присутність таких контролів:

- позитивний контроль антигену;
- негативний контроль антигену;
- негативний контроль АТ.

Відсутність окреслених типів контролю неминуче призведе до хибного висновку, непередбачуваних матеріальних та нематеріальних втрат.

Обов'язковою є процедура уточнення у старшого лаборанта алгоритму проведення ІГХД, звірка с рекомендаціями виробника та внутрішніми інструкціями.

Для отримання стандартизованих, протокольних, контрольованих, відтворюваних результатів ІГХ реакцій вже досить давно використовуються автоматичні системи, імуностейнери. Програмне забезпечення та апаратне використання штрих-кодів відстеження блоків, слайдів, реагентів можуть заощадити час і допомогти в ідентифікації помилок.

Реакція вважається якісною, якщо правильно фарбовані всі типи контролів, а в досліджуваному матеріалі рівне фарбування (без плям) з найменшим фоновим фарбуванням.

За наявності артефактів, виразного фонового фарбування, неналежної якості контролів слід визначити, чи можливо впевнено оцінити реакцію. Якщо ні – реакція визнається неякісною, про що повідомляється старшому лаборанту та завідувачу лабораторією (відділення).

Контроль цього етапу починається з дотримання основних правил зберігання реагентів та поводження з ними. Перевірка стосується і умов використання імуногістохімічних реагентів. Для забезпечення якості досліджень необхідно, крім рутинних внутрішніх контролів якості, брати участь у зовнішніх програмах та контролях якості.

Є типи реакцій, що можуть завадити якісному дослідженню. До них належать такі:

- хибно-позитивна реакція (за довгої чи надлишкової інкубації, високої концентрації первинних АТ або ж як особливість тканини, яка не залежить від дослідника – реакція зі схожим епітопом);
- фонові реакції (неспецифічна, як результат довгої інкубації, високої концентрації первинних АТ);
- хибно-негативна реакція (виникає за надлишкової фіксації, руйнації антигену за неадекватного проведення чи заливки в парафін, низької чутливості методу);
- аберантна реакція (незвичайна експресія антигену, якого не повинно бути, наприклад, в метастазах інвазивних протокових карцином молочної залози (G3) та муцинозної карциноми може виявлятися високий рівень експресії CK20, віментин + низькодиференційований рак);
- втрата експресії діагностично значущих епітопів метастазів (порівняно з первинною пухлиною).

Універсальної системи оцінки ІГХ фарбування немає. Розроблені різноманітні програми та системи для автоматичного підрахунку кількості фарбованих клітин.

Під час аналізу результатів дослідження слід пам'ятати, що ставити діагноз лише на «негативних» результатах реакцій непрофесійно. Обов'язково враховується практичне значення діагнозу. Висновок може бути кінцевим чи ймовірним (з вказівкою на необхідність дообстеження, проведення диференційного діагнозу з іншими патологічними процесами). У разі, якщо встановлення заключного висновку без молекулярно-генетичного дослідження або електронної мікроскопії неможливе, це окремим пунктом відображається у висновку.

***Л.Г. Роша. Оптимизация иммуногистохимических исследований. – Статья.***

***Аннотация.*** Статья основана на том, что главной предпосылкой для проведения качественных иммуногистохимических исследований является адекватная материально-техническая база, опытные квалифицированные специалисты, достаточный объем исследований, оптимальная организация исследований и совершенная нормативно-правовая база.

***Ключевые слова:*** иммуногистохимические исследования, патогистология, контроль качества.

***L. Roshka. Optimization of immunohistochemistry research. – Article.***

***Summary.*** The article is based on the fact that An essential prerequisite for conducting qualitative immunohistochemical studies is adequate material and technical base, experienced qualified specialists, sufficient research volume, optimal organization of research and perfect regulatory framework.

***Key words:*** immunohistochemical research, pathologistology, quality control.