

ИМУНОХИСТОХИМИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ - ОСНОВЕН МЕТОД ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ НОВООБРАЗОВАНИЯ. РОЛЯ НА МЕДИЦИНСКИЯ ЛАБОРАНТ В ПАТОХИСТОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА

Красимира Динкова, Калоян Върляков, Павлина Тенева

*Катедра „Здравни грижи“, Медицински колеж,
Тракийски университет – Стара Загора*

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES: A BASIC METHOD FOR DIAGNOSING MALIGNANT NEOPLASMS. THE ROLE OF THE MEDICAL LABORATORY TECHNICIAN IN PATHOHISTOLOGICAL DIAGNOSIS

Krasimira Dinkova, Kaloyan Varlyakov, Pavlina Teneva

Department of Health Care, Medical College, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Патохистологичната диагноза е важен етап от диагностично-лечебния процес на всеки пациент. Тя се поставя от лекар патолог, който на базата на различни хистологични изследвания определя наличие или не на злокачествено новообразование, стадий, степен на инвазия, наличие на метастази. Всички тези изследвания се извършват от патохистологичния лаборант.

Имунохистохимичното изследване (ИХХ) е задължително за диагностицирането на редица туморни заболявания, като в много случаи е и определящо за лечението на пациента. Това изследване е дълъг и многоетапен процес, като от лаборанта се изисква познаване на всеки един детайл от него. Фиксацията на материала, обработката до парафиново блокче, антигенното възстановяване, инкубацията на анти тяло - всички тези етапи са рискови за протичането на имунохистохимичната реакция.

Познаването на анти телата, както и на търсените антигени е ключово за избора на протокол за работа. Лошото съхранение на анти телата, както и неправилното им разреждане е предпоставка за получаване на фалшиво отрицателни или фалшиво положителни резултати. При обработката на тъканите за подготовка на микроскопските препарати те преминават през фиксиращ разтвор, най-често формалин, който „маскира“ по-голяма част от антигените в тъканите. Термичното възстановяване е неиз-

ABSTRACT

Pathohistological diagnosis is a critical stage in the diagnostic and treatment process for every patient. It is performed by a pathologist who, based on various histological examinations, determines the presence or absence of a malignant neoplasm, its stage, degree of invasion, and the presence of metastases. These studies are facilitated by the pathohistological laboratory technician.

Immunohistochemical examination is essential for diagnosing many tumor diseases and is often decisive for determining the patient's treatment. This research involves a long and multi-stage process, requiring the laboratory technician to have detailed knowledge of each step. Fixation of the material, processing it into a paraffin block, antigenic recovery, and antibody incubation are all critical stages that can impact the success of the immunohistochemical reaction.

Knowledge of the antibodies and the antigens being targeted is crucial for selecting the appropriate protocol. Poor storage of antibodies or their improper dilution can lead to false-negative or false-positive results. During tissue processing for microscopic preparation, tissues are passed through a fixing solution, most commonly formalin, which “masks” many antigens. Thermal recovery is a necessary step for unmasking such antigens. Using an inappropriate antigen retrieval buffer can result in incorrect results. The incubation time of the antibody and the temperature at which the reaction occurs must align with both the antibody's sensitivity and specificity.

бежен етап при търсенето на такива антигени. Използването на неподходящ буфер за антигенно възстановяване може да доведе до неправилно отчетени резултати. Времето за инкубация на анти тялото и температурата, при която ще протече реакцията, трябва да е съобразено както с чувствителността на анти тялото, така и с неговата специфичност.

Визуализацията на имунохистохимичната реакция се извършва най-често с 3,3'-диаминобензидин тетра хлорид (DAB) хромоген, който дава кафява оцветка. Препоръчително е извършване на контрастно оцветяване с хематоксилин, който оцветява ядрата в синьо. Използването на алкохол в този финален етап може да доведе до загуба на реакцията, затова се прилага оцветяване с хематоксилин, който не съдържа спирт в състава си, най-често хематоксилин на Майер.

Целта на настоящият обзор е да се разгледат основните етапи при извършването на имунохистохимичните изследвания, като се обърне внимание на най-често допусканияте грешки и се предложат различни варианти за тяхното отстраняване или недопускане.

Ключови думи: имунохистохимия, анти тяло, антигенно възстановяване, визуализация

ВЪВЕДЕНИЕ

Имунохистохимичните методи днес са сред основните в морфологичната диагностика. Напредъкът в области като имунология и молекулярна биология предоставят и нови възможности пред хистопатологичната диагностика. Имунохистохимията представлява сложно съчетаване на хистологията с химия и имунология, при което на базата на реакцията „антиген-анти тяло“ селективно се откриват протеини или молекули с антигенни свойства. Това дава възможности както за диагностициране на злокачествени новообразувания, така и за определяне на стадий на развитие на туморния процес, степен на инвазия, метастазиране. Днес все по-често имунохистохимията служи и за определяне на терапията на пациента, като предоставя възможности и за персонализирано лечение. Всичко това определя ИХХ като ценен инструмент в ръцете на лекаря патолог. Прецизното извършване на тези изследвания е гарант за поставяне на точна диагноза и е предпоставка за прилагане на максимално подходящата терапия. Във връзка с това ключови се

Visualization of the immunohistochemical reaction is most commonly performed using 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) chromogen, which produces a brown color. Counterstaining with hematoxylin, which stains nuclei blue, is recommended. The use of alcohol in this final stage can cause the loss of the reaction. Therefore, hematoxylin without alcohol in its composition, such as Mayer's hematoxylin, is preferred.

The purpose of this review is to examine the main stages involved in immunohistochemical studies, highlighting common errors and offering potential solutions for their prevention or correction.

Keywords: immunohistochemistry, antibody, antigen retrieval, visualization

явяват знанията и уменията на хистологичните лаборанти.

Развитие на ИХХ

Изготвянето на хистологичен препарат и провеждането на ИХХ е дълъг процес, обхващащ редица етапи, при които тъканите са подложени на различни химични влияния. На първо място е фиксирането на тъканта, което позволява запазване на прижизнената структура, но в същото време потиска активността на антигените. Качеството на ИХХ реакцията в много голяма степен зависи от степента на увреждането на антигените, както и от възможностите за тяхното повторно активиране. През 90-те години на XX век се разработват техники за възстановяване на антигенната активност, които се подобряват и до днес (3). Познаването на различните техники за антигенно възстановяване (AR), плюсовете и минусите при тяхното използване предоставя големи възможности за откриване на почти неограничен брой антигени в тъканите. Изборът на метод за AR зависи както от търсения антиген, така и от предварителната обработка на изследваната тъкан. Това се отнася до вида на из-

ползвания фиксатор, както и неговото рН, колко време биопсията е престояла след вземането, преди да бъде фиксирана, както и времето, което тъканта е престояла във фиксатора. Всички тези изисквания поставят въпроса за въвеждане на стандартизация при обработката на биопсични материали за имунохистохимични изследвания (13). Най-често използваният фиксатор в хирургичната практика е 10% формалин. Препоръчително е използването на неутрално буфериран формалин в болничните заведения, което ще даде възможност за относително уеднаквяване степента на увреждане на антигените в изследваните материали, независимо от мястото на тяхната обработка. Продължителността на фиксацията също трябва да е в определени граници - от 6 до 72 часа. Минимумът от 6 часа е времето, за което формалинът прониква в тъканите, денатурира белтъците и настъпват химически промени, които предпазват тъканите от вредно въздействие на микроорганизми. Престой по-дълъг от 72 часа прави материала по-твърд и трошлив, което влошава качеството на изготвените впоследствие микроскопски препарати, а също така може да доведе до необратимо увреждане на тъканните антигени (1). Днес в практиката успешно се прилагат два метода за антигенно възстановяване - ензимно антигенно възстановяване (PIER) и термично антигенно възстановяване (HIER).

Ензимното антигенно възстановяване се прилага при фиксирани с формалин тъкани. Под въздействието на алдехидите в тъканите се образуват кръстосани връзки между протеините. Използването на протеолитични ензими способства прекъсването на тези връзки, възстановявайки антигенната активност. Две от най-важните условия за успешно протичане на тази реакция са температурата, при която протича инкубационният процес, и времето за инкубация. Обичайната температура за активация на протеолитичните ензими варира между 25°C и 37°C. Времето за инкубация е доста вариабилно, като е в пряка зависимост от продължителността на фиксацията. При тъкани, фиксирани в рамките на 6–12 часа, са необходими 5 минути, но времето за инкубация може да се удължи до 30 минути при тъкани, фиксирани над 72 часа (4). Единият от недостатъците на PIER е свързан именно с този факт - невъзможност да се прилага при ретроспективни проучвания, тъй като няма методика, с която да се определи времето, за което тъканите са били подложени на въздействие на алдехиди (8). Друг съществен недостатък е невъзможността за прилагане на този метод при

тъкани, фиксирани с алкохол. Ензимното антигенно възстановяване, съчетано с алкохолна фиксация, води до лизиране на протеините и почти пълна загуба на срезите върху предметното стъкло (11).

Тези недостатъци подтикваат учените към търсенето на други методи. Такъв се явява термичното антигенно възстановяване, при който под влияние на висока температура се разрушават напречните връзки между протеините и антигенната активност в тъканите се възстановява. Този метод е приложим както за светлинна микроскопия на фиксирани с формалин и включени в парафин тъкани за (FFPET), така и за тъкани, фиксирани в неалдехидни фиксатори, а също така и за електронна микроскопия, ин ситу хибридизация (ISH) и флуоресцеинова ин ситу хибридизация (FISH) (20). При термичното антигенно възстановяване депарафинираните срези се поставят в буферен разтвор и се загряват до температура от около 96–98°C, без да се позволява завиране на течността. В зависимост от търсения антиген производителите на антигела препоръчват използване на различни буфери, като най-често се използва цитратен буфер с рН 6 или TRIS буфер с рН 9. Използването на дестилирана вода не се препоръчва, тъй като се получава силно неспецифично оцветяване (5,6,12,17).

Загряването на буфера при термичното антигенно възстановяване може да се извърши в различни уреди, в зависимост от оборудването в съответната лаборатория. Може да се използва обикновен котлон с тенджерата с вода, в която се поставя кюветата с буфер и предметните стъкла. При тази ситуация за правилното протичане на целия процес на възстановяване се изисква много време и постоянен контрол на температурата от страна на лаборанта.

По-малко времеемко, но нуждаещо се от изключително внимание е използването на микровълнова печка. В този случай кюветата с буфера и предметните стъкла се поставя директно, без водна баня. Проблемът е в това, че трудно може да се контролира процесът на загряване, без да се допусне завиране. Освен това тук също се изисква и постоянен контрол на температурата, без да се допуска падане под 93°C. Рискът от извирание на течността при този метод на HIER е голям, а това може да доведе до опорочаване на получените резултати (9,12,15).

Много фирми вече предлагат специални уреди за AR, при които загряването става автоматично, температурата се контролира чрез програмиране, а времето за възстановяване се отчи-

та отново автоматично от апарата, след достигане на зададената температура.

Производителите на антитела дават препоръки относно киселинността/алкалността на буфера за антигенно възстановяване, но те не посочват продължителността на процеса. Това се дължи на факта, че различните уреди изискват различно време, и се налага всяка лаборатория да оптимизира на времето за AR.

Познаването на антителата, формите на производство и начините на тяхното съхранение е задължително за хистологичния лаборант. На пазара се срещат три основни форми на антитела:

1. Готов за употреба разтвор. Това е най-удобната форма за лаборанта, тъй като при него не се изисква допълнително разреждане, т.е. не съществува риск от грешка. Като недостатък можем да посочим по-краткия срок на

голям е рискът от неправилно първично разреждане, което обрича всички проби, извършени с тази изходна концентрация (14,18).

Тъй като реакцията „антиген-антитяло“ е „невидима“, се налага пробите да преминат през допълнителни детекционни реагенти, които след взаимодействие със специфичен хромоген образуват цветна утайка на мястото на реакцията. В зависимост от използваната детекционна система се подбира и съответният хромоген. При ИХХ реакциите най-често използваните детекционни системи са на базата на HRP (хрян-пероксидазен ензим) или алкална фосфатаза. При всяка от тях има риск от реакция с ендogenous ензимни активности, което ще доведе до фалшиво положителна реакция (10). За избягването на тази грешка се прилагат блокиращи реактиви, които потискат съответните активности (табл. 1).

Табл. 1. Потискане на ендogenous активности в тъканните срези

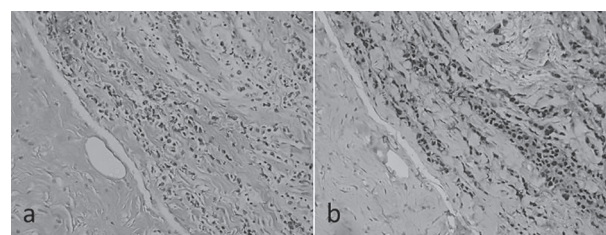
Ензимна активност	Блокиращ реактив
Ендogenous пероксидаза	4% H_2O_2 в метанол
Ендogenous алкална фосфатаза	Левамизол
Ендogenous биотин	Авидин
Неспецифични протеинови свързвания	Говежди неимунен серум Желатин Обезмаслено мляко

годност на такъв тип разтвор.

2. Концентриран разтвор. Антителата са придружени с инструкция за разреждане, но съгласно нея то може да варира в широки граници - от 1:20 до 1:1000. В зависимост от стила си на работа всяка лаборатория прави по 3 експериментални разреждания, като избира оптималното, което дава добро оцветяване с нисък фон. Тези форми на производство на антителата имат по-голям срок на годност и се предпочитат, когато се касае за по-рядко използвани антитела в съответната лаборатория. Недостатъкът при тях е възможността лаборантът да допусне грешка при разреждането, в резултат на което се получават неточни резултати.
3. Лиофилизирани антитела. Тези антитела имат много голям срок на годност преди първото им разреждане. Освен това те са много удобни за транспортиране, защото нямат изисквания към температурата, при която се съхраняват в това състояние. Тук недостатъкът е, че съществува двоен риск от допускане на грешка при разреждането, като особено

Предпоставки за възникване на грешки

Правилният подбор на метод за AR, както и подходящ буфер при HIAR е от съществено значение за качеството на ИХХ реакцията и нейното отчитане (2). При AR в неподходяща среда се получава непълно антигенно разкриване, което води до фалшиво отрицателна реакция (фиг.1).

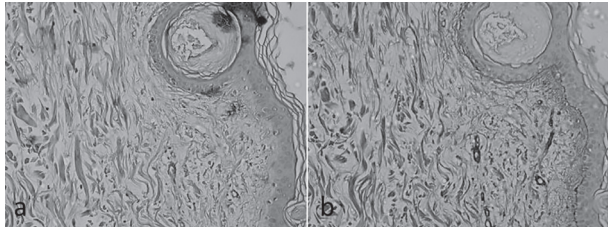


Фиг. 1

На фиг. 1 наблюдаваме проба от пациент с рак на гърдата, изследван за естрогенен рецептор. На фиг. 1a на пробата е приложено термично антигенно възстановяване с неподходящ буфер и реакцията, която се наблюдава е видимо по-слаба от реакцията на фиг. 1b, където AR е извършено с препоръчания от фирмата буфер. При такава грешка, допусната от лаборанта, лекарят непра-

вилно отчита резултатите, в резултат на което на пациента се прилага неподходящо лечение.

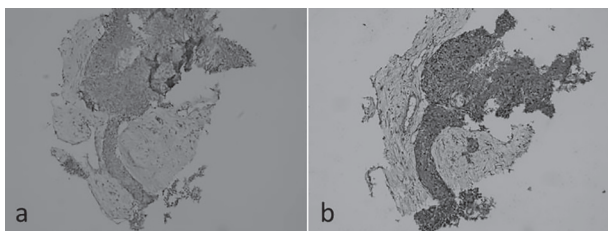
Изборът на термично или ензимно антигенно възстановяване също е критично за резултата от ИХХ реакцията (2). Въпреки че по-голямата част от антигените се повлияват по-добре от HIER, има някои антигени, при които е задължително използването на PIER (фиг. 2).



Фиг. 2

На фиг. 2а наблюдаваме резултата от термично възстановяване на Collagen IV, където реакцията е видимо по-слаба от фиг. 2b, с приложението по изискванията ензимно антигенно възстановяване.

При провеждане на ИХХ реакция в търсене на слабо експресирани антигени се препоръчва използването на високочувствителни детекционни системи (фиг. 3).



Фиг. 3

Фиг. 3 демонстрира експресия на BrCA в тъканта, като на фиг. 3а е използвана по-слабо чувствителна детекционна система и се открива слаба експресия на антигена, докато при фигура 3b с използването на система за усиление на сигнала се отчита силно положителна реакция, което води до откриване на метастаза от мамарен карцином в черния дроб.

Финалният етап от ИХХ изследването е контрастирането. То се прилага с цел да се улесни микроскопирането, като подпомага не само доброто фокусиране, а и позволява на патолога бързо и лесно да се ориентира в търсените участъци от пробата. В този етап рискът от страна на лаборанта е непознаване на хромогена, с който се работи. Най-често използваният хромоген - 3,3'-диаминобензидин тетрахлорид (DAB), е спиртно разтворим. Ако проба, финализирана с DAB, бъде обработена впоследствие със спиртнораз-

творима контраоцветяваща боя, същинската реакция ще се размие и пробата ще бъде погрешно отчетена като негативна. Тъй като DAB дава кафява оцветка на реакцията, препоръчително е използването на хематоксилин като контрастираща боя, което оцветява ядрата в син цвят. Използването на контрастираща боя в цвят близък до цвета на същинската реакция ще доведе до сливане на структурите и затруднение при отчитане на резултатите.

В табл. 2 обобщаваме някои от на-често срещаните проблеми при извършване на ИХХ изследвания, причините за тяхното възникване и ще предложим варианти за справяне с тях (7,10,16,19).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имунохистохимията е често срещано допълнение в патологията за морфологична диагноза, изследователска дейност и изучаване на патогенезата на туморите. Правилната интерпретация на имунохистохимичния анализ е от изключително значение, но тя е пряко зависима от техниката на изпълнение на всяка проба. Компетентният хистологичен лаборант трябва да познава добре често възникващите различни проблеми и да притежава богат набор от компетенции, които позволяват тяхното отстраняване или предотвратяване. От съществено значение е знанията за качеството на използваните реактиви и антителата, както и имунохистохимичните техники да бъдат оптимизирани, както и постоянно осъвременявани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Наредба № 18 от 6 август 2002 г. За утвърждаване на медицински стандарт „Клинична патология“. Министерство на здравеопазването, раздел VI, т. 3.4.1.
2. Динкова, К. Осигуряване на качеството в патохистологичните лабораторни изследвания – имунохистохимия и имунофлуоресценция [дисертация]. Стара Загора: Тракийски университет; 2024.
3. Brown C. Antigen retrieval methods for immunohistochemistry. *Toxicol Pathol.* 1998;26(6):830-1. doi: 10.1177/019262339802600618. PMID: 9864103.
4. Dunkenberger L, Del Valle L. Antigen retrieval and signal amplification. *Methods Mol Biol.* 2022;2422:65-74. doi: 10.1007/978-1-0716-1948-3_5.
5. Emoto K, Yamashita S, Okada Y. Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: does pH or

Таблица 2. Причини за някои често срещани проблеми и тяхното отстраняване

Проблем	Причина	Отстраняване
Липсваща или слаба реакция	Слаба активност на анти тялото	Изпробване на нова партида от същото анти тяло
		Оптимизиране на условията за съхранение на анти телата
		При концентрирани анти тела - подготовка на аликвотни части за еднократно разреждане
		Избягване на многократно размразяване/замразяване на партидите
	Неподходящ титър на анти тялото	Контролни проби с поне 3 различни титъра при първоначално въвеждане в употреба на всяко анти тяло с цел оптимизиране спрямо останалите работни условия
		Експериментално инкубиране при различни температури (стайна, 37°C, 4°C) и време (от 20 минути до 24 часа, ако е наложително - и повече)
	Слаба експресия на търсения антиген	Използване на положителна контрола
		Използване на по-чувствителни визуализиращи системи с усилване на сигнала
	Увредени епитопи	Смяна на буферния разтвор при прилагане на HIER
		Смяна на техниката за AR- PIER срещу HIER
Неспецифично или високо фонов оцветяване	Висока концентрация на анти тялото	Контролни проби с поне 3 различни титъра при първоначално въвеждане в употреба на всяко анти тяло, с цел оптимизиране спрямо останалите работни условия
		Експериментално инкубиране при различни температури (стайна, 37°C, 4°C) и време (от 20 минути до 24 часа, ако е наложително - и повече)
	Неспецифични свързвания	Удължаване на времето на инкубация с блокиращия разтвор
		Подбор на подходящ блокиращ буфер спрямо използваната детекционна система
		Използване на положителна и отрицателна контролна тъкан
		Оптимизиране на измиването на пробите след всяка инкубация
Нарушена клетъчна морфология	Увреждане по време на антигенното възстановяване	При използване на HIER техника - оптимизиране на pH на буфера за AR, температурата и времето на варене
		При използване на PIER техника - смяна на протеолитичния ензим, промяна на времето за инкубация с ензима
	Неясна тъканна структура	Оптимизиране на времето за фиксиране на тъканните проби или вида на фиксатора
		Стриктно спазване на протоколите за изготвяне на FFPET
		Изготвяне на срези от парафиново блокче с дебелина не повече от 4-5 µm

ionic strength of the solution play a role for refolding antigens? J Histochem Cytochem. 2005;53(11):1311-21. doi: 10.1369/jhc.5C6627.2005. PMID: 16009962.

- George B, Haque A, Sahu V, Joldoshova A, Singh Y, Quinones JE, et al. Enhancing antigen retrieval to unmask signaling phosphoproteins in formalin-fixed archival tissues. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2022;30(5):333-9. doi: 10.1097/PAI.0000000000001022.
- Gown AM. Diagnostic immunohistochemistry: what can go wrong and how to prevent it. Arch

Pathol Lab Med. 2016;140(9):893-8. doi: 10.5858/arpa.2016-0119-RA.

- Huang SN. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. Lab Invest. 1975;33(1):88-95.
- Kajiya H, Takekoshi S, Takei M, Egashira N, Miyakoshi T, Serizawa A, et al. Selection of buffer pH by the isoelectric point of the antigen for the efficient heat-induced epitope retrieval: re-appraisal for nuclear protein pathobiology. Histochem Cell Biol. 2009;132(6):659-67. doi: 10.1007/s00418-009-0635-8.

10. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. J Pathol Transl Med. 2016;50(6):411-8. doi: 10.4132/jptm.2016.08.08.
11. McClellan P, Jacquet R, Yu Q, Landis WJ. A method for the immunohistochemical identification and localization of Osterix in periosteum-wrapped constructs for tissue engineering of bone. J Histochem Cytochem. 2017;65(7):407-20. doi: 10.1369/0022155417705300.
12. Namimatsu S, Ghazizadeh M, Sugisaki Y. Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. J Histochem Cytochem. 2005;53(1):3-11. doi: 10.1177/002215540505300102.
13. Otali D, Stockard CR, Oelschlager DK, Wan W, Manne U, Watts SA, et al. Combined effects of formalin fixation and tissue processing on immunorecognition. Biotech Histochem. 2009;84(5):223-47. doi: 10.3109/10520290903039094. PMID: 19886759; PMCID: PMC2903968.
14. Packer D. The history of the antibody as a tool. Acta Histochem. 2021;123(4):151710. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151710. PMID: 33721607.
15. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. J Pathol. 1997;183(1):116-23. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199709)183:1<116::AID-PATH1087>3.0.CO;2-2.
16. Ramos-Vara JA, Webster JD, DuSold D, et al. Immunohistochemical evaluation of the effects of paraffin section storage on biomarker stability. Vet Pathol. 2013. doi: 10.1177/0300985813476067.
17. Shi SR, Shi Y, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. J Histochem Cytochem. 2011;59(1):13-32. doi: 10.1369/jhc.2010.957191.
18. Ward JM, Rehg JE. Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting. Vet Pathol. 2014;51(1):88-101. doi: 10.1177/0300985813503571. PMID: 24078006.
19. Wong NA, Melegh Z. Antigen retrieval and primary antibody type affect sensitivity but not specificity of CD117 immunohistochemistry. Histopathology. 2009;54(5):529-38. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03272.x.
20. Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. Prog Histochem Cytochem. 2007;41(3):141-200. doi: 10.1016/j.proghi.2006.09.001. PMID: 17197287.

Калоян Върляков
 Медицински колеж,
 ул. „Армейска“ 9
 Стара Загора, 6003
 e-mail: kaloyan.varlyakov@trakia-uni.bg