

Иммуногистохимический метод исследования

Выполнила: студентка 6 курса лечебного факультета 1.6.02Б группы







Колдаева Мария Сергеевна

Куратор: профессор, д.м.н., Ракша Александр Петрович

Определения

- **Иммуногистохимия** – это метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с мечеными антителами.
- **Антиген** – любое вещество, которое при попадании в ткани восприимчивого организма вызывает иммунный ответ, в результате которого формируются специфические антитела, связывающиеся с данным веществом.
- **Антитела** – это растворимые гликопротеины глобулиновой фракции сыворотки крови, образующиеся в ответ на проникновение антигена в организм теплокровных.

Тканевая локализация антигенов

Тканевая локализация	Примеры	Окраска
Ядерные	Tdt, TTF-1, ER/PR	
Ядерные и цитоплазматические	S-100, Calretinin	
Цитоплазматические	Cytokeratins, Thyroglobulin	
Мембранные	CD45, C-erb-B2, Villin	
Мембранные и содержащиеся в органеллах	CD30, CD15	
Внеклеточные	IV Collagen, Laminin	

Антитела

- Моноклональные
- Поликлональные

Поликлональные антитела



Моноклональные антитела

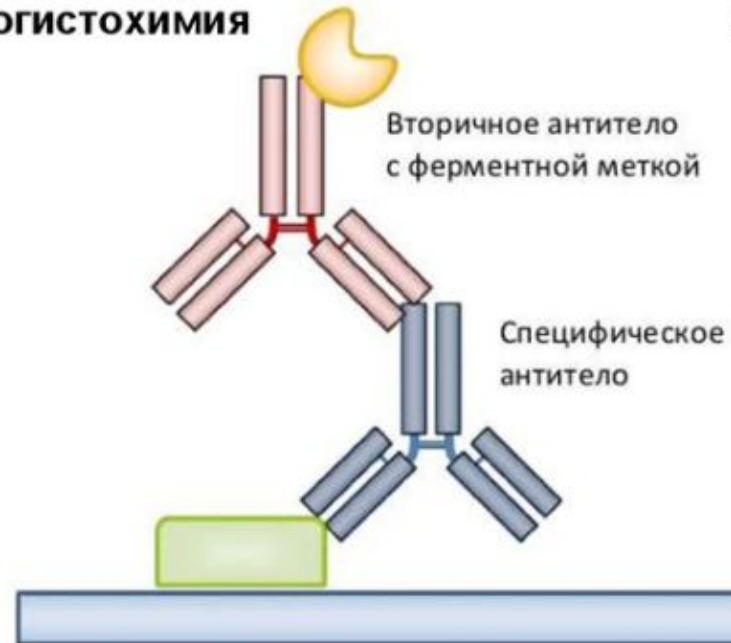


	Моноклональные	Поликлональные
Преимущества	<ul style="list-style-type: none">• Связываются с определённым эпитопом – более специфичны• Меньше фонового окрашивания• Культуры могут поддерживаться независимо• Большая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none">• Легче в производстве• Более распространены• Более чувствительны (против большего числа эпитопов)• Удобны для скрининга
Недостатки	<ul style="list-style-type: none">• Сложнее в производстве• Не такие чувствительные, как поликлональные• Обычно требуют большей концентрации	<ul style="list-style-type: none">• Менее специфичны• Чаще дают фоновое окрашивание• Вариабельны лот от лота• Тренд на моноклоны

Визуализация = детекция

- Прямой метод
- Непрямой метод

**Непрямая
иммуногистохимия**



**Прямая
иммуногистохимия**



Прямой метод

Достоинства	Недостатки
Простота в применении	Сложная технология получения антител □ редкие и дорогие реагенты
Протокол короче	Не все антитела возможно конъюгировать с меткой
Нет перекрёстной реакции	Меньше чувствительность

Непрямой метод

Достоинства	Недостатки
Чувствительность выше	Возможны перекрёстные реакции
Первичные антитела легче проникают в ткани	

Визуализация = детекция

- Флюорохромы
- Ферменты
- Металлы и металлопротеиды
- Радиоизотопы
- Промежуточные связывающие вещества, например, биотин, дигоксин

Ферментная метка

- Иммуноферментные методы основаны на взаимодействии фермента, которым помечены антитела, с субстратом и образовании окрашенного конечного продукта реакции
- Одна молекула ферменты, конъюгированная с антителом, способна «обработать» большое количество молекул субстрата. Образовавшийся нерастворимый краситель накапливается в ткани вокруг фиксированного к антигену антитела

Ферментные метки

- Пероксидаза хрена (HRP)
 - Щелочная фосфатаза (AP)
 - Глюкозооксидаза
-
- ❖ Пероксидаза и щелочная фосфатаза есть и в тканях организма, поэтому иногда можно получить ложноположительные результаты. При окраске активность эндогенных ферментов блокируется добавлением специальных растворов. Обычно они входят в состав системы детекции.

Контроли

- Положительный контроль антигена
- Отрицательный контроль антигена
- Отрицательный контроль антитела

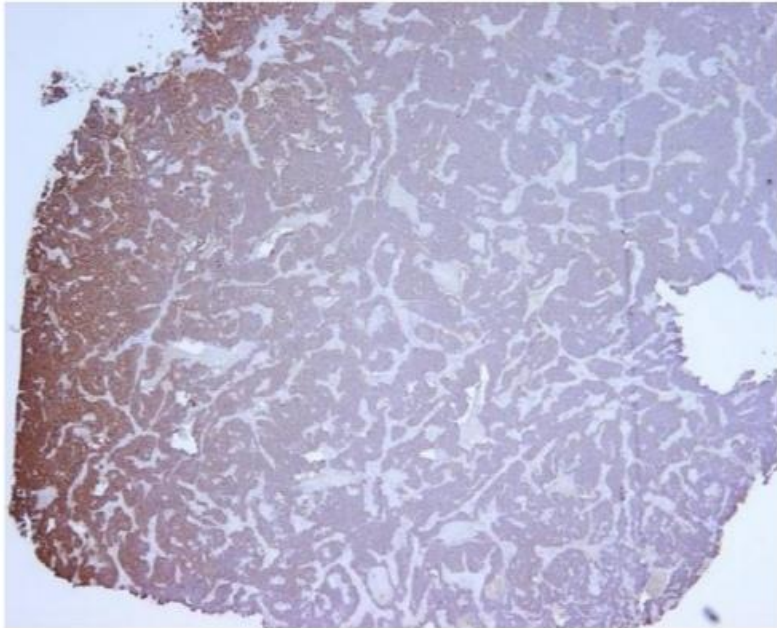
Пробоподготовка

Факторы, влияющие на качество ИГХ-окрашивания:

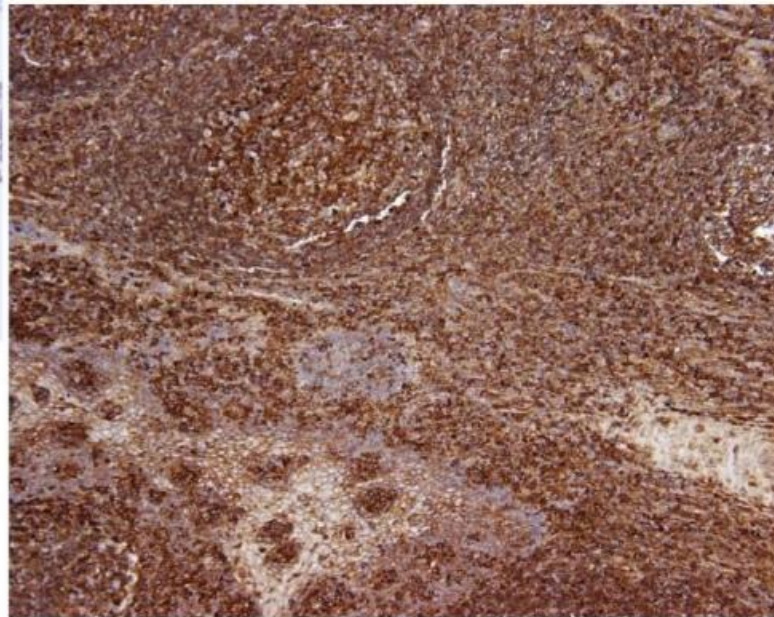
- Фиксация
- Проводка
- Заливка
- Микротомия
- Используемые стёкла и адгизивы
- Условия демаскировки
- Используемые реагенты
- Соблюдений условий протокола

Фиксация

Недофиксированная ткань

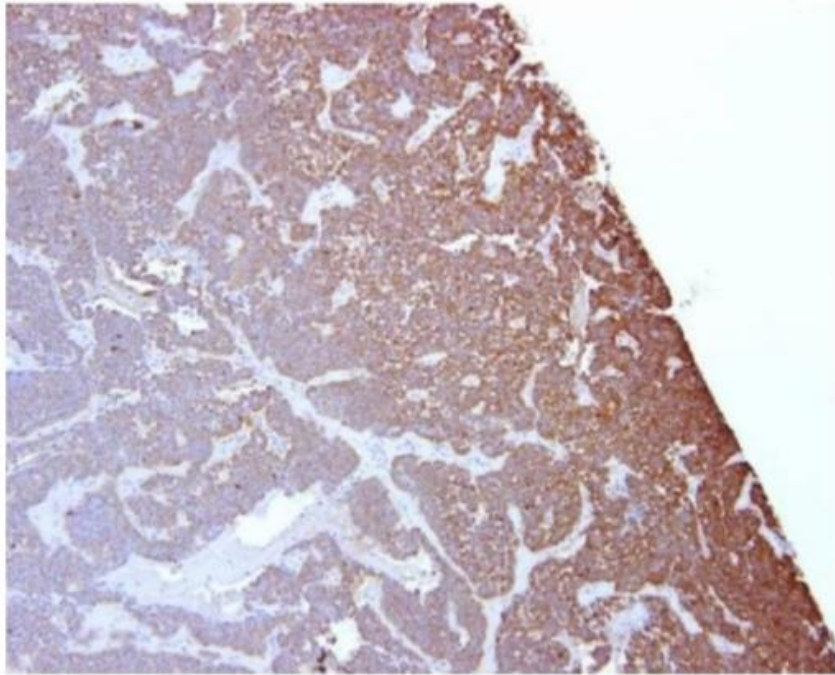


Перефиксированная ткань

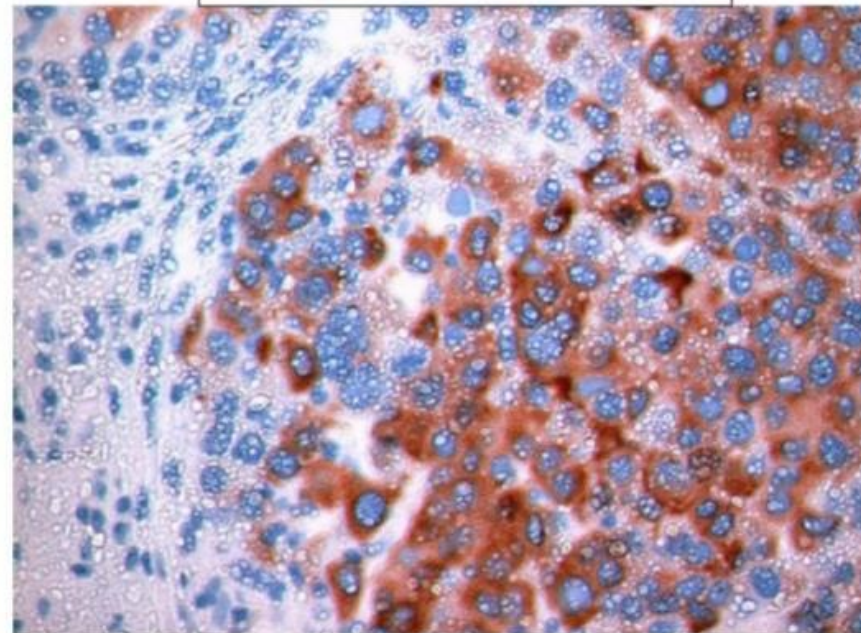


Проводка и заливка

Краевой эффект из-за старого спирта



Эффект «пузырьков» —
парафин низкого качества



Подготовка препарата

Зональный эффект, волны —
артефакты микротомии

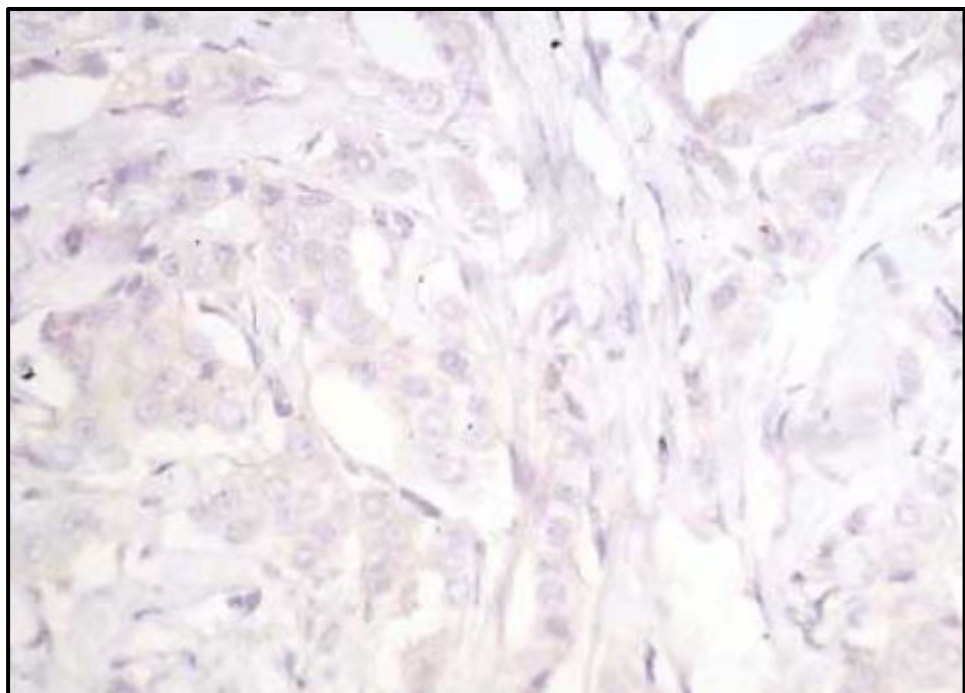


Неправильное адгезивное покрытие стекла

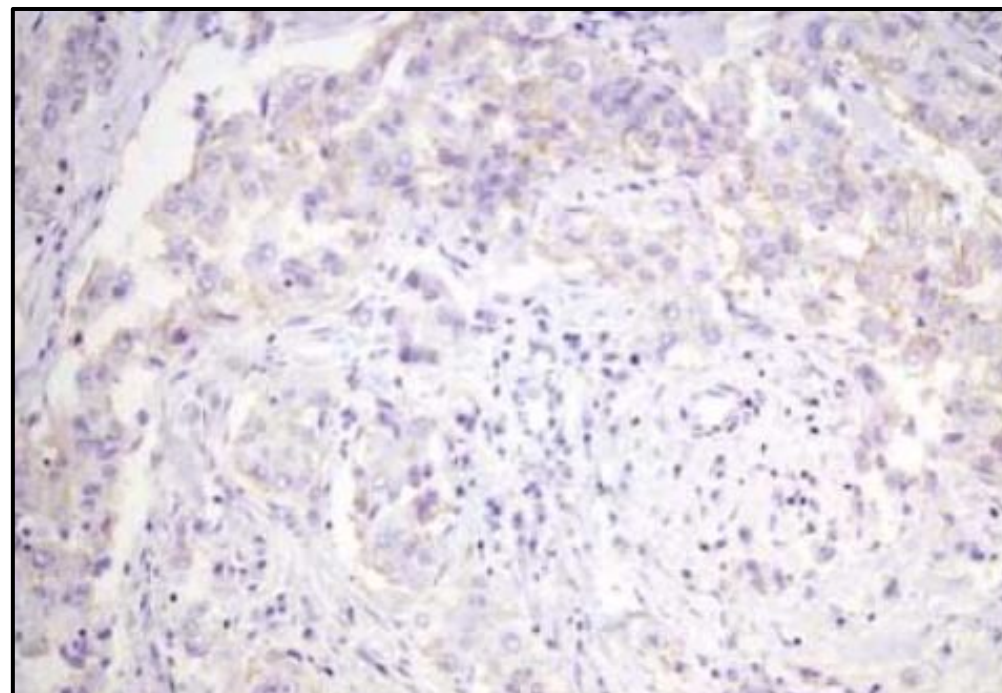


Стандартизированная шкала оценки результатов HER2-статуса при ИГХ анализе инвазивного РМЖ

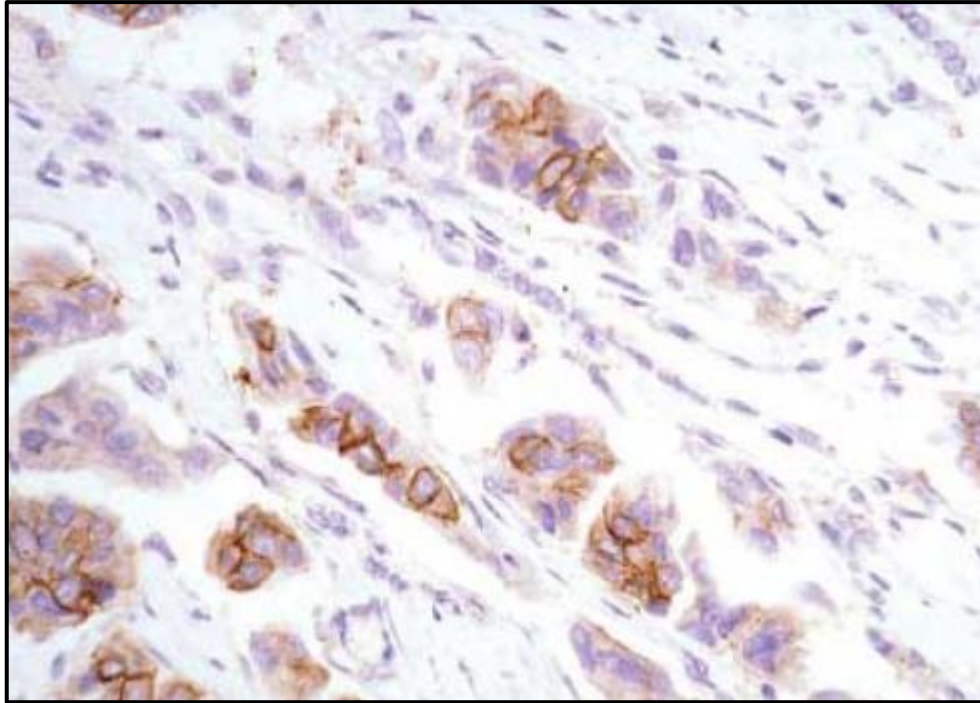
- 0 – при полном отсутствии продукта реакции или выявлении его на мембранах менее чем 10% клеток опухоли.
- 1+ – при незначительном количестве продукта реакции на части мембраны более чем 10% клеток опухоли.
- 2+ – при умеренном количестве продукта реакции на мембранах более чем 10% клеток опухоли.
- 3+ – при наличии ярко выраженного продукта реакции на протяжении всей мембраны клетки при окрашивании более чем 10% клеток опухоли.



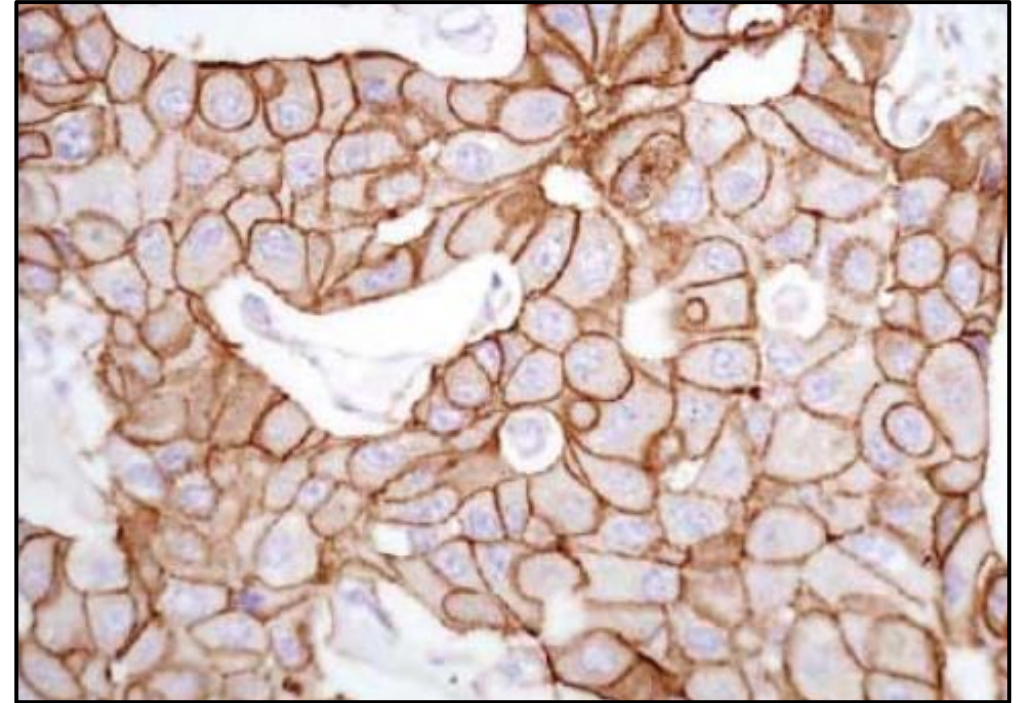
Инвазивный протоковый рак молочной железы. Иммуногистохимическая реакция с антителами HER2/neu. Оценка – 0 баллов.



Инвазивный протоковый рак молочной железы. Иммуногистохимическая реакция с антителами HER2/neu. Оценка – 1+ баллов.



Инвазивный протоковый рак молочной железы. Иммуногистохимическая реакция с антителами HER2/neu. Оценка – 2+ баллов.

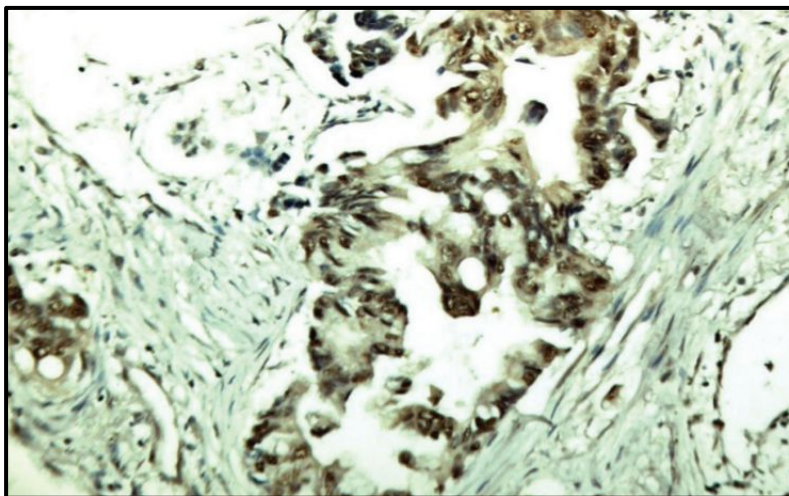


Инвазивный протоковый рак молочной железы. Иммуногистохимическая реакция с антителами HER2/neu. Оценка – 3+ баллов.

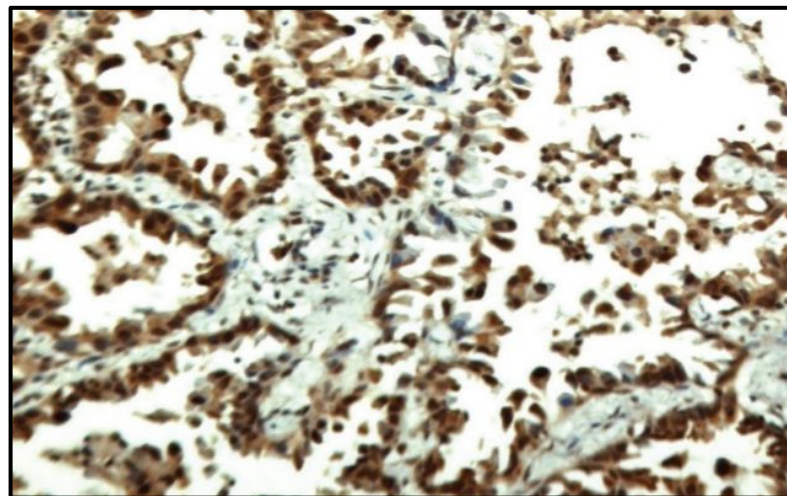
Визуальная шкала оценки экспрессии маркеров

- Низкий уровень экспрессии
- Средний уровень экспрессии
- Высокий уровень экспрессии

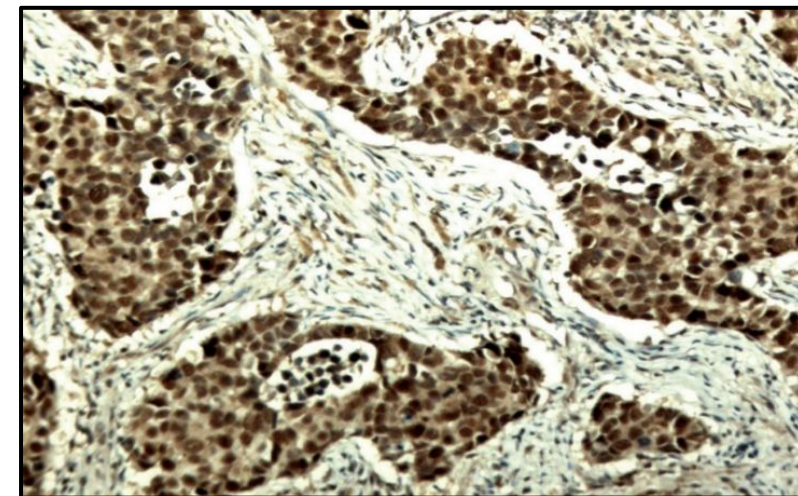
Экспрессия ТС (тимидилатсинтазы) в ткани аденокарциномы легкого



Аденокарцинома легкого.
Иммуногистохимическая
реакция с антителами ТС.
Низкий уровень экспрессии.



Аденокарцинома легкого.
Иммуногистохимическая реакция с
антителами ТС. Средний уровень
экспрессии.



Аденокарцинома легкого.
Иммуногистохимическая реакция с
антителами ТС. Высокий уровень
экспрессии.

Список литературы

- Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: ДАКО / Пер. с англ. под ред. Г.А.Франка и П.Г.Малькова. – М., 2011. – 224 с.
- Значение некоторых иммуноморфологических факторов для определения прогноза аденокарциномы легкого. С.А.Зинькович, Е.М.Непомнящая, С.П.Пыльцин, Т.О.Лаптева, Ю.Н.Лазутин, О.В.Тарнопольская.
- Морфологическое тестирование HER2–статуса при раке молочной железы. Завалишина Л.Э. , Франк Г.А.

Спасибо за внимание!