

ФГУ НИИ онкологии
им проф. Н. Н. Петрова
Росздрава,
Санкт-Петербург

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ В ПРАКТИЧЕСКОЙ ОНКОМОРФОЛОГИИ

Д. Е. Мацко, К. В. Шелихова

Онкоморфология после определенной стагнации открыла в себе «новое дыхание» и в последние 20-25 лет пополнилась такими знаниями, которые без преувеличения можно назвать революционными. Это связано с достижениями молекулярной биологии и внедрением в научную и практическую деятельность патологов соответствующих методов исследования, которые еще совсем недавно являлись прерогативой лишь очень крупных, преимущественно западных, научных центров

Современная патологическая анатомия, и ее важнейшая составляющая – онкоморфология после определенной стагнации открыла в себе «новое дыхание» и в последние 20-25 лет пополнилась такими знаниями, которые без преувеличения можно назвать революционными. Во многом (если не во всем) это связано с достижениями молекулярной биологии и внедрением в научную и практическую деятельность патологов соответствующих методов исследования, которые еще совсем недавно являлись прерогативой лишь очень крупных, преимущественно западных, научных центров.

Очевидно, что новое всегда базируется на фундаменте, поставленном предшественниками, и поэтому под современными методами мы понимаем не только ультрановые методики (порой еще малодоступные отечественному врачу), а весь комплекс приемов, используемых повседневно как в рутинной деятельности морфолога, так и в научной среде. Лучшей иллюстрацией к этому тезису служит то обстоятельство, что человечество более чем за 150 лет не смогло изобрести замену гематоксилину и эозину. Эта окраска, покорившая лаборатории всего мира, по своей важности, востребованности, незаменимости по праву может считаться самой современной.

Несколько иначе обстоит дело с другими (дополнительными) окрасками. С внедрением иммуногистохимии (ИГХ) их значимость несколько снизилась. Однако на сегодняшний день не все лаборатории обладают возможностями для проведения ИГХ исследований, и в то же время даже в прекрасно оборудованных лабораториях по-прежнему используются окраски на соединительную ткань (по ван-Гизон, по Маллори). Также, например, при диагностике липосарком бывает незаменимой окраска на жир (суданом III или IV), а верификация солидных аденокарцином легких или анализ биоптатов желудочно-кишечного тракта не обходится без окрасок на слизь (рис. 1).

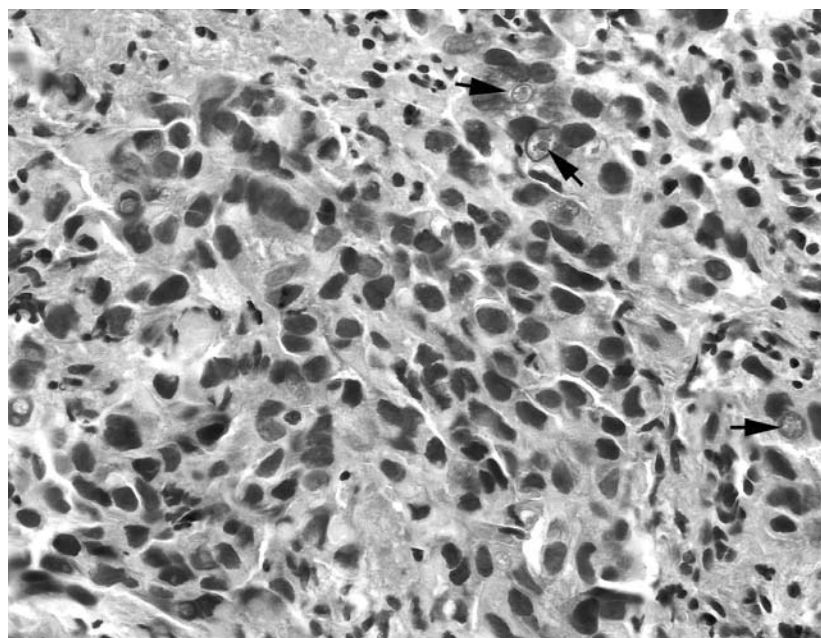


Рис. 1. Сolidная аденокарцинома легкого. Адекватная диагностика возможна только при выявлении внутриклеточных капель слизи (стрелки). Муцикармин.

В последнем (четвертом) издании классификации опухолей ВОЗ (2007) [7], каждая, представленная в ней, нозологическая единица характеризуется 8-15 рубриками, включающими в себя определение с синонимами, краткой историей, кодом по МКБ-О, эпидемиологическими данными (частота, пол, возраст), краткой клинической характеристикой, классическими в патологии макро- и микроскопическими описаниями, ИГХ и ультраструктурной характеристикой, степенью пролиферативной активности, дифференциальным диагнозом, сведениями по генетическим особенностям, гистогенезу, факторам прогноза и предрасположенности.

Эпидемиология опухолей уже выделяется в отдельную специальность, подходы к макро- и микроскопическому описанию стандартны и, как и прежде, изобилуют образными сравнениями («каштан Цюльха», «булыжная мостовая»). При этом, необходимо упомянуть, что в последние годы в связи с достижениями молекулярной генетики, все чаще появляются новые нозологические единицы (стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта, папиллярная глионейрональная опухоль, ангиоцентрическая глиома и т.д.) и переименовываются ранее хорошо известные опухоли (гемангиобластома вместо ангиоретикулома, злокачественная опухоль периферического нервно-го ствола вместо нейрогенной саркомы), уходят в прошлое давно привычные термины (менингеальная саркома, монстроклеточная саркома). Так, только за 7 лет, прошедших с выпуска третьего издания классификации опухолей ЦНС [5], в последнем издании (2007) [7] появились 4 новых нозологических единицы, а в 6-ти прежних произошли те или иные изменения/дополнения.

Здесь мы приближаемся к тому методу, который в последние десятилетия стал неотъемлемым в работе онкоморфолога – к методу ИГХ исследования, основанного на создании гибридной технологии, предложенного лауреатами Нобелевской премии Г. Й. Ф. Келлером и С. Мильштейном.

Суть ИГХ метода заключается в проводимой на обычном гистологическом срезе реакции антиген-антитело, при этом антитело метится либо флюорохромом, либо ферментом, выявляемым с помощью гистохимической реакции (пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза). Если искомым антиген (опухолевый, вирусный, микробный, аутоантиген и т.д.) присутствует в исследуемой ткани или клетках, то образующийся комплекс антигенантитело указывает на его локализацию. Для усиления реакции используют биотин и стрептавидин. Особо ценным при использовании ИГХ метода является возможность использования материала после обычной фиксации в формалине, стандартной проводки и заливки в парафин [2].

Метод ИГХ позволяет:

- 1) осуществлять гистогенетическую диагностику опухолей;
- 2) определять нозологический вариант новообразования;
- 3) выявлять первичную опухоль по метастазу с неизвестным первичным очагом;

- 4) определять прогноз опухолевого заболевания;
- 5) определять злокачественную трансформацию клеток;
- 6) определять возможности таргетной терапии;
- 7) выявлять как резистентность, так и чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам;
- 8) определять чувствительность опухолевых клеток к лучевой терапии.

Для достижения перечисленных целей используют тканеспецифические антигены (эпителиальные – семейство цитокератинов, EMA; лимфоцитарные – семейство CD, TdT; нейроглиальные – NSE, Syn, GFAP, NF; меланоцитарные – HMB-45, тирозиназа, мелан А, белок S-100; мезотелиальные – мезотелин, кальретинин), органоспецифические (молочная железа – ER, PGR; предстательная железа – PSA, PAP; щитовидная железа – тиреоглобулин, кальцитонин, TTF-1; печень – гепатоцитарный антиген; легкое – сурфактант, TTF-1; герминогенные опухоли – PLAP, HCG), онкогены, гены-супрессоры и онко-белки (c-cerbB2/HER-2, p53, bcl-2, c-myc), определяют факторы неопластического ангиогенеза (CD31, CD34, VEGF, тимидинфосфорилаза); маркеры пролиферации (Ki-67) и др.

Особое значение для диагностики имеет коэкспрессия антител, например цитокератинов и виментина, и различные варианты экспрессии разных представителей внутри одной и той же группы. Так, различные сочетания экспрессии или ее отсутствия CK7 и CK20 позволяют разделить все эпителиальные опухоли на 4 группы, внутри которых производить диагностику становится значительно легче.

Что касается прогностических и предсказательных (вероятность ответа на специфическую адьювантную терапию) факторов, то определение экспрессии белка HER2 при раке молочной железы (определение прогноза и целесообразности назначения герцептина) (рис. 2, а-б) и выявление c-kit при стромальных опухолях (таргетное лечение гливеком) (рис. 3, а-б) желудочно-кишечного тракта постепенно становится тривиальным методом исследования в современной патологической анатомии. В этом же ряду находится определение мутированного гена-супрессора p53, экспрессия которого является фактором плохого прогноза и неэффективности адьювантной терапии при раке молочной железы, желудочно-кишечного тракта, легких, мочевого пузыря и предстательной железы.

Нельзя переоценить определение рецепторов эстрогенов и прогестерона для назначения гормонотерапии при лечении опухолей репродуктивных органов. ИГХ методики определения этих рецепторов были разработаны лишь в последние 15 лет, но уже стали обязательными в практике онкоморфологов (рис. 4-5.). Несмотря на то, что определение рецепторов эстрогенов и прогестерона носит полуколичественный характер (ранее в баллах, совсем недавно – в процентах), их прогностическое и предсказательное значение весьма отчетливо.

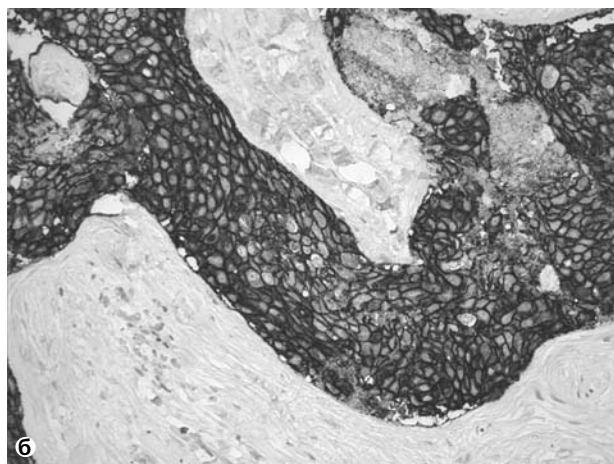
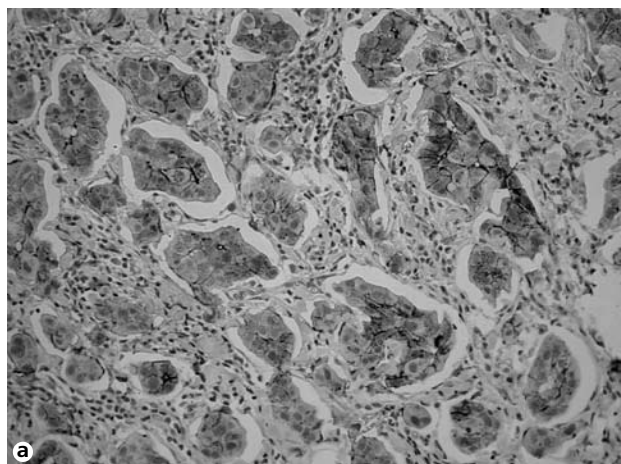


Рис. 2. Герцептест. а – слабо выраженная экспрессия HER2 (1+; тест отрицательный); б – сверхэкспрессия HER2 (3+; тест положительный). Мембранное окрашивание.

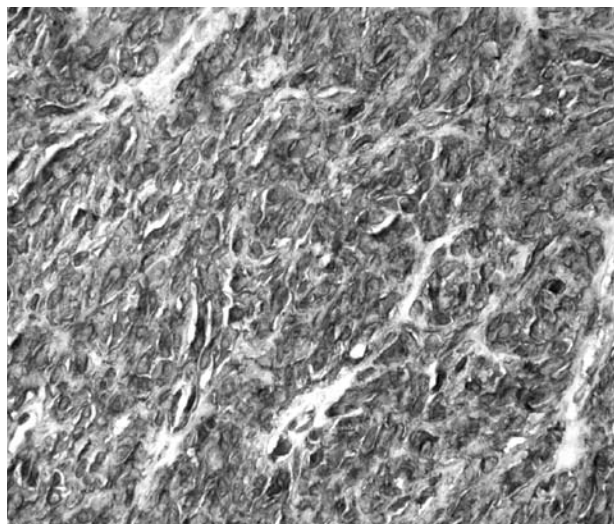
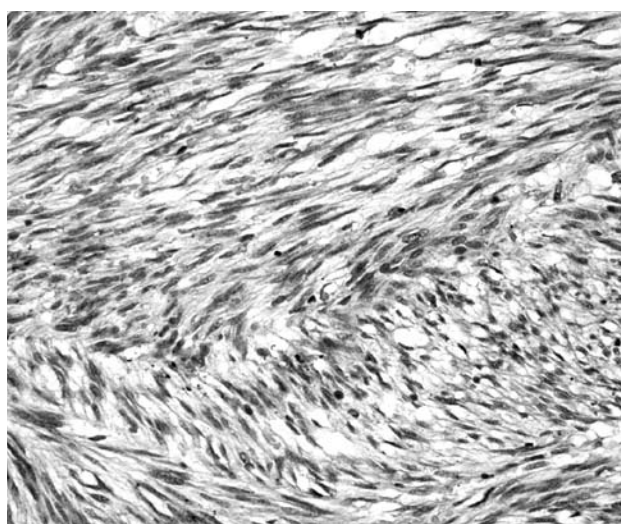


Рис. 3. Диагностика стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта. а – веретеноклеточная опухоль неясного гистогенеза. Г-э.; выраженная экспрессия CD117 (смешанное окрашивание), указывающая на стромальную опухоль.

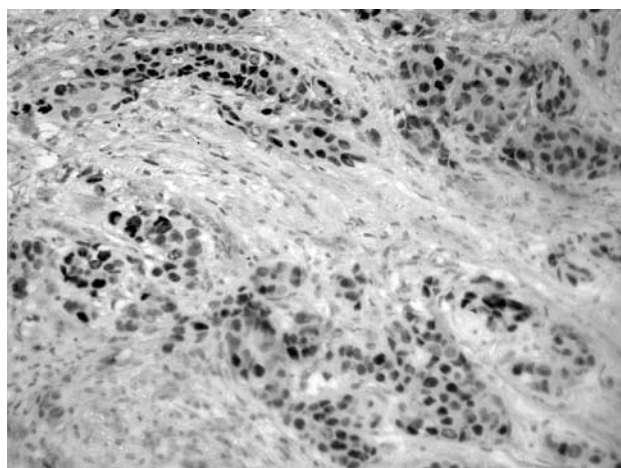


Рис. 4. Экспрессия рецепторов к эстрогенам. Ядерное окрашивание.

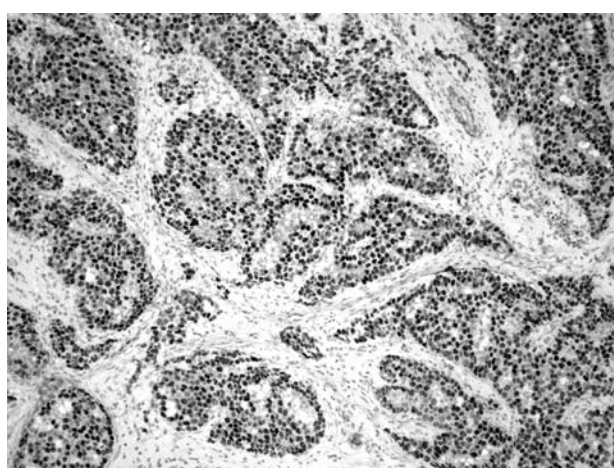


Рис. 5. Экспрессия рецепторов к прогестерону. Ядерное окрашивание.

В современной онкоморфологической диагностике чрезвычайно важным является определение маркеров пролиферации, отражающих пролиферативную активность как фактора злокачественной трансформации клетки, так и в последующем поведении уже развившихся опухолей. Среди них на первое место выдвинулся антиген Ki-67, экспрессирующийся во всех фазах митотического цикла. На основании многочисленных исследований определено, что индекс пролиферации в самых разных опухолях является независимым прогностическим фактором, определяющим вероятность возникновения рецидива, общую и безрецидивную выживаемость. Кроме этого представляется возможным использовать этот маркер и как показатель лечебного патоморфоза. Так нами было показано, что после проведения химиолучевой неоадьювантной терапии рака прямой кишки число клеток, экспрессирующих Ki-67 в операционном материале, значительно снизилось по сравнению с их экспрессией в первичном (до лечения) биопсийном материале (рис. 6, а-б) [1].

Кроме вышеперечисленных антигенов в последнее время изучаются соединения, регулирующие прохождение клеток по митотическому циклу – циклины, циклин-зависимые киназы и их ингибиторы (p21, p27), факторы ангиогенеза (сведения противоречивы), выявляются возможности определения злокачественной трансформации клеток (высокомолекулярные цитокератины, AMACR).

Проточная цитофлуорометрия позволяет производить качественный и количественный анализ физических и биологических параметров клеток, фенотипирование опухолевых лимфоцитов, ДНК-анализ; широко используется, прежде всего, в диагностике лимфом и других заболеваний крови.

Популярность электронной микроскопии, включающей в себя просвечивающую, сканирующую и высоковольтную, в морфологических дисциплинах в последние десятилетия стала значительно ниже по сравнению с 60-80 годами XX столетия. Это связано как с трудоемкостью, так и с дороговизной метода. В современной практической морфологии применение электронной микроскопии оправданно лишь в тех случаях, когда конкретную задачу невозможно решить никакими другими методами. Например, для дифференциальной диагностики опухолей мягких тканей, особенно в тех случаях, когда опухоль утратила антигенную структуру, или для проведения дифференциального диагноза среди опухолей с идентичным иммунопрофилем. К примеру, для дифференциального диагноза между периневриомой и low grade фибромиксоидной саркомой, поскольку обе опухоли, имея схожую морфологическую картину, могут экспрессировать эпителиальный мембранный антиген (рис. 7-8).

В настоящее время в хорошо оснащенных лабораториях все шире и интенсивнее внедряются молекулярно-генетические методы диагностики (блоттинг и его

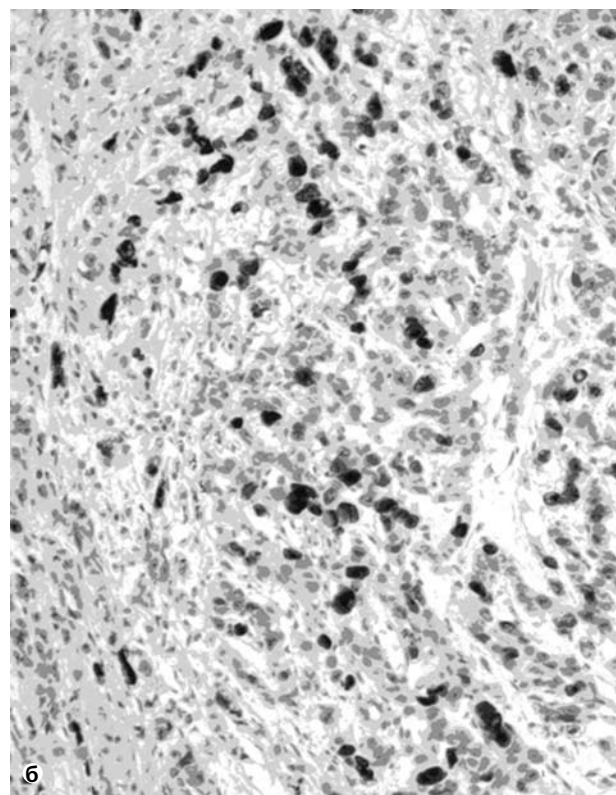
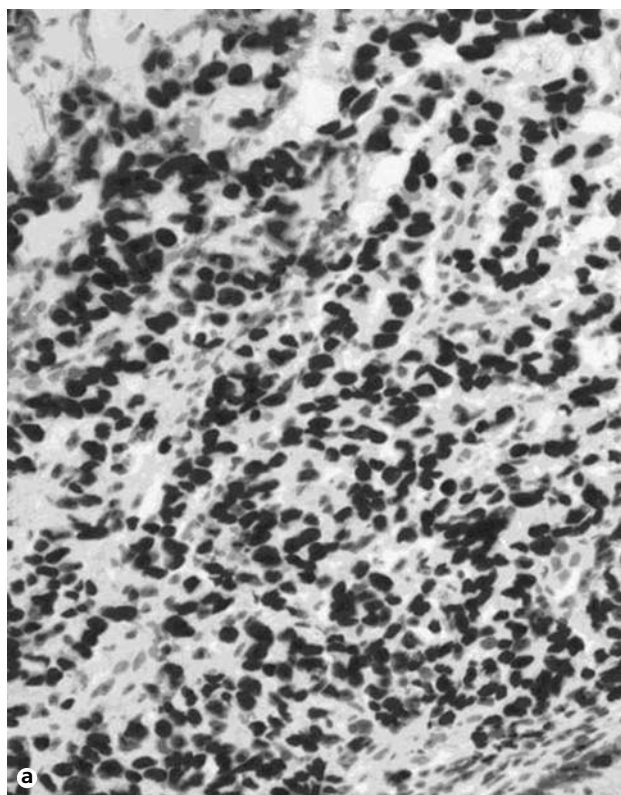


Рис. 6. Изменение пролиферативной активности (Ki-67) в раке прямой кишки при неоадьювантном химио-лучевом лечении. а – до лечения; б – после лечения.

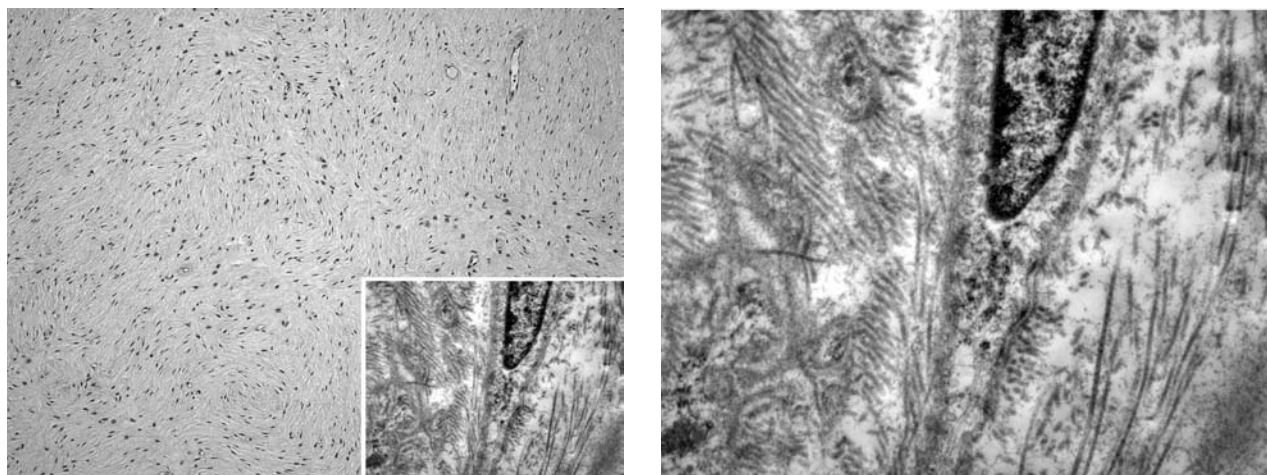


Рис. 7. Периневриома. Г-э. На вставке биполярная веретеновидная клетка с фрагментированной наружной пластинкой вокруг цитолеммы, многочисленными пиноцитозными пузырьками в цитоплазме. Электронограмма. (см. рис. 8).

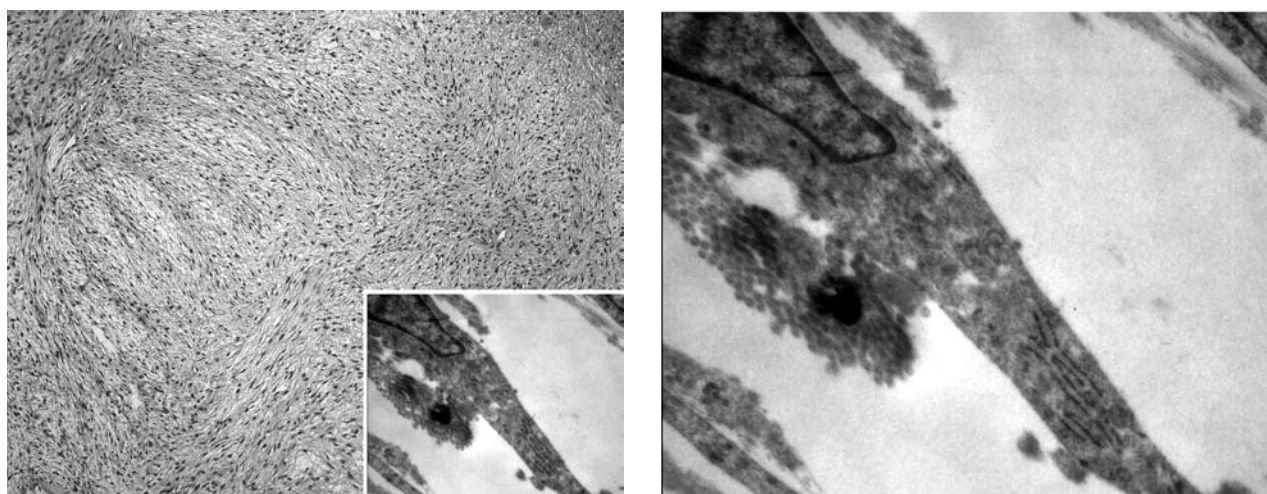


Рис. 8. Low grade фибромиксоидная саркома. Г-э. На вставке веретеновидная клетка с признаками фибробластической дифференцировки. Наружная пластинка, пиноцитозные пузырьки отсутствуют. Хорошо развит шероховатый эндоплазматический ретикулум. Электронограмма. (см. рис. 7).

разновидности, сравнительная геномная гибридизация (CGG – comparative genomic hybridization), флюоресцентная гибридизация in situ (FISH – fluorescence in situ hybridization, CISH (chromogenin in situ hybridisation), методы, в основе которых лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР).

На практике наибольший интерес представляют FISH, CISH и ПЦР.

FISH анализ идеален для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей в клетке. Выделяют in situ ДНК гибридизацию, где объектом исследования является ДНК, а в качестве зонда можно использовать целую хромосому или ген(ы), и in situ РНК гибридизацию, где объектом выступает мРНК [3].

В отличие от CGG, FISH анализ имеет большие разрешающие способности. Эта методика позволяет идентифицировать многочисленные различные хромосомные аномалии, включая изменение числа хромосом, транслока-

ции, делеции, дупликации и перестройки. FISH также позволяет анализировать отдельные гены [3, 4].

Для данной методики необходим флюоресцирующий нуклеотидный зонд. Последовательность таких нуклеотидных зондов комплементарна части генома и скрещивается согласно стандартным правилам спаривания оснований нуклеиновых кислот по принципу комплементарности Watson-Crick. Зонды могут быть специфичны одному гену, плечу хромосомы или центромере в зависимости от интересующего вопроса. Затем, меченые клетки подсчитываются во флюоресцентном микроскопе. Например, если были использованы флюоресцирующие нуклеотидные зонды к p53 при исследовании опухоли и идентифицируется только одно пятно, то следует считать, что имеет место делеция гена p53 в другой аллели [3, 4].

FISH анализ успешно применяется в диагностике лимфом. Например, фолликулярная лимфома характе-

ризуется t(14;18), а лимфома из клеток мантии – t(11;14) (q13;q32). Для последней диагностическая чувствительность метода составляет около 95% [6].

Также FISH анализ нашел широкое применение в оценке HER2 статуса больных раком молочной железы (рис. 9).

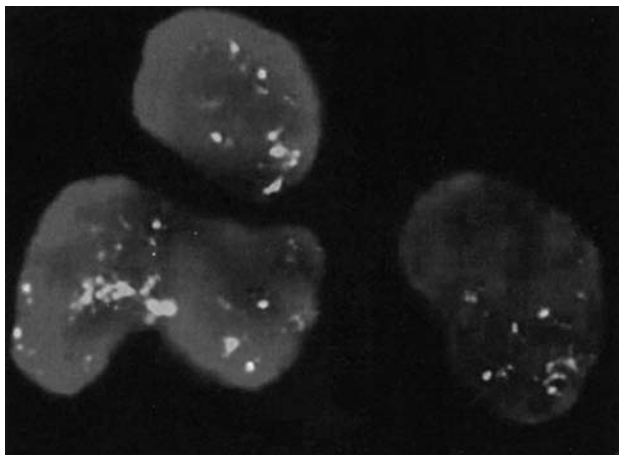


Рис. 9. FISH-анализ. Выявление амплификаций HER2 в раке молочной железы.

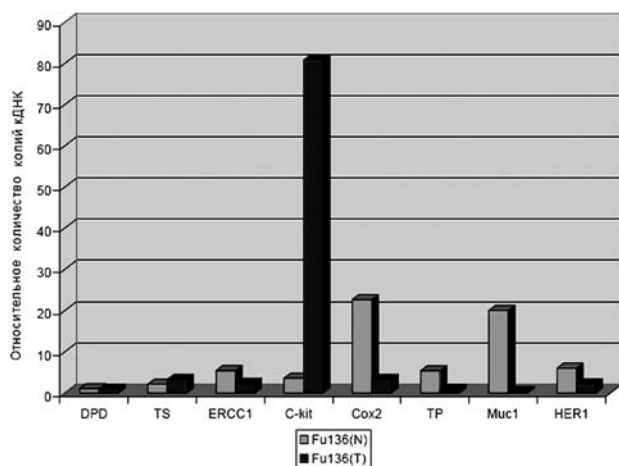


Рис. 10. ПЦР в режиме реального времени. Экспрессия гена c-kit в опухолевой (Т) и нормальной (N) ткани.

CISH метод в целом аналогичен FISH. Однако при проведении методики используются меченные хромогеном нуклеотидные зонды, которые могут быть визуализированы в обычном световом микроскопе (в режиме яркого света). Объектом исследования также могут быть кусочки ткани, клетки, отдельные хромосомы. Метод является весьма объективным в оценке генного статуса в опухолевой ткани.

Данная модифицированная методика наиболее широкое применение нашла для определения уровня амплификации HER2 гена в раке молочной железы. С этой целью CISH анализ может быть выполнен двумя путями: с использованием только HER2 зонда или с использованием HER2 зонда и зонда хромосомы 17. CISH имеет большое преимущество перед FISH, поскольку использование пероксидазы, меченной хромогеном, в отличие от флюоресцирующих аналогов, позволяет определять HER2 статус одновременно с рутинным морфологическим исследованием.

Методы, в основе которых лежит ПЦР (микросателлитный анализ, ПЦР в режиме реального времени и др.) благодаря своей скорости и чувствительности широко применяются в диагностике различных опухолей и патологических состояний. Например, в диагностике лимфом, опухолей мягких тканей, для выявления циркулирующих в крови опухолевых клеток, в частности клеток рака предстательной железы [3, 4, 6]. Наш опыт (совместно с лабораторией биохимии – зав. проф. Е. Н. Имянитов) показал высокую диагностическую значимость ПЦР при диагностике как c-kit-позитивных, так и, что более важно, CD117-негативных стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта (рис. 10).

Метод tissue microarray – достаточно новый метод анализа тканевых структур с высокой пропускной способностью и использованием иммуногистохимии и гибридизации in situ. Он требует специального дорогостоящего оборудования [3, 4].

Все вышесказанное показывает, насколько в последние годы расширились возможности современного онкоморфолога с одной стороны, и как существенно повысилась его роль уже не только как диагноста, но и как участника лечебного процесса с другой.

Литература

1. Корытов О.В., Мельников О.Р., Мацко Д.Е. и соавт. // Вопр. Онкологии. – 2005. – № 4. – С. 498.
2. Dabbs D.J. Diagnostic Immunohistochemistry. 2-nd ed. Elsevier, 2006, 828 p.
3. El-Naggar A.K. Methods in molecular surgical pathology // Semin. Diagn. Pathol. – 2002. – P.56-71.
4. O'Connor S.L., Cho J.H., McDonnell T.J. The application of molecular techniques to solid tumors // Semin. Diagn. Pathol. – 2002. – P.94-103.
5. Pathology and genetics of tumours of the nervous system / eds. P. Kleihues, W. K. Cavenee / IARC: Lyon, 2000. – 314 p.
6. Sen F, Vega F, Medeiros L.J. Molecular genetic methods in the Diagnosis of hematologic neoplasm. – Semin Diagn Pathol. – 2002. – P.72-93.
7. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System / eds. D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee / IARC: Lyon, 2007. – 309 p.