

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА В КРУПНОМ РЕГИОНАЛЬНОМ ОНКОЛОГИЧЕСКОМ УЧРЕЖДЕНИИ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ<sup>1</sup>

Семен Венедиктович Петров<sup>1,2\*</sup>, Тимур Рустэмович Ахметов<sup>1,2</sup>, Надежда Васильевна Балатенко<sup>2</sup>,  
Фарида Марсовна Мазитова<sup>2</sup>, Алексей Германович Сабиров<sup>2</sup>, Марат Венерович Галеев<sup>2</sup>,  
Дарианна Олеговна Загвозкина<sup>2</sup>, Марат Гордиевич Гордиев<sup>2</sup>, Рустем Шамильевич Хасанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет,

<sup>2</sup>Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Казань

### Реферат

**Цель.** Подвести итоги 19-летней работы лаборатории иммуногистохимической диагностики опухолей Республиканского онкологического диспансера Министерства здравоохранения Республики Татарстан.

**Методы.** На основе собственного опыта и данных литературы обсуждаются возможности и ограничения современных молекулярных технологий в диагностике новообразований человека.

**Результаты.** В Республиканском клиническом онкологическом диспансере в повседневном режиме с целью индивидуального подхода к терапии (customized therapy) и для создания «молекулярного портрета» опухоли с 1996 г. применяют анализ в опухолевых клетках ряда молекулярных мишеней (в частности, рецепторов факторов роста, дифференцировочных антигенов). Общее число опухолей, исследованных нами с применением иммуногистохимического метода, планомерно увеличивалось со 150 в 1996 г. до 5910 в 2014 г. При этом в отношении каждого новообразования оценивают экспрессию от 1 до 12 и более антигенов (как правило, 4–5). С 2007 г. проводятся молекулярно-цитогенетические исследования потенциальных мишеней для терапии рака молочной железы, желудка и лёгкого. Для выявления амплификации онкогена HER2 в 2007–2011 гг. выполнено 894 анализа с применением хромогенной *in situ* гибридизации, в 2011–2014 гг. — 1064 исследования с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации. С ноября 2014 г. проводят последнее исследование для выявления транслокации ALK-EML4 в аденокарциномах лёгкого, за последний месяц 2014 г. выполнено 38 исследований. За два десятилетия в лаборатории, ставшей референсной (контрольно-консультативной) по Приволжскому федеральному округу, верифицирован диагноз новообразований у 32 тыс. пациентов: 55% составили опухоли молочной железы (где исследовали прогностические маркеры). Из оставшихся наблюдений 18% были лимфопролиферативными процессами, 15% — анапластическими раковыми новообразованиями и метастазами без выявленного первичного очага, 12% составляли мягкотканые опухоли. Частота ошибочных иммуногистохимических заключений составила 2,6%, и они касались чаще опухолей центральной нервной системы, лимфом и метастазов опухолей без выявленного первичного очага.

**Вывод.** Современная морфологическая верификация новообразований уже много лет позволяет обеспечивать высокое качество диагностики и лечения опухолевых больных в Республике Татарстан.

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, патологическая анатомия, онкология, диагностика новообразований, показание к противоопухолевой терапии, организация здравоохранения.

### MOLECULAR DIAGNOSIS OF CANCER IN THE LARGE REGIONAL ONCOLOGY CENTER: POSSIBILITIES AND LIMITATIONS FOR USE IN CLINICAL ONCOLOGY

S.V. Petrov<sup>1,2</sup>, T.R. Akhmetov<sup>1,2</sup>, N.V. Balatenko<sup>2</sup>, F.M. Mazitova<sup>2</sup>, A.G. Sabirov<sup>2</sup>, M.V. Galeev<sup>2</sup>, D.O. Zagvozkina<sup>2</sup>, M.G. Gordiev<sup>2</sup>, R.Sh. Khasanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia,

<sup>2</sup>Tatarstan Regional Clinical Cancer Centre, Kazan, Russia

**Aim.** To summarize the results of 19-year activity in laboratory of immunohistochemical tumor diagnosis of Tatarstan Regional Cancer Centre of Ministry of Health, Republic of Tatarstan.

**Methods.** Advantages and limitations of modern molecular techniques for the diagnosis of human tumors are discussed based on our own experience and the literature data.

**Results.** A number of tumor cells molecular targets (e.g., growth factor receptors, differentiation antigens) are being determined in Tatarstan Regional Cancer Centre since 1996 on the daily basis for creating a «molecular portrait of tumor» and customized therapy adjustment. The total number of tumors investigated using immunohistochemistry, systematically increased from 150 in 1996 to 5910 in 2014, and for each tumor 1 to 12 (usually 4–5) or more antigens expression is evaluated. Since 2007, molecular cytogenetic studies of potential targets for the treatment of breast cancer, stomach and lung are investigated. To identify HER2 oncogene amplification performed 894 assays were performed in 2007–2011 using chromogenic *in situ* hybridization and 1064 assays using fluorescence *in situ* hybridization were performed in 2011–2014. Since November 2014 we are using fluorescence *in situ* hybridization to detect ALK-EML4 translocation in lung adenocarcinomas, during the last month of the 2014 38 tests were performed. For two decades, the laboratory, which has a reference status in the Volga region of Russian Federation, has verified the diagnosis in 32 thousand patients, among them 55% cases of breast cancer (prognostic markers), 18% — lymphoproliferative processes, 15% — anaplastic tumors and metastatic cancers of unknown primary source, 12% were soft tissue tumors. Error rate for immunohistochemical diagnosis was 2.6%, mainly involving central nervous system tumors, lymphomas, and metastatic cancers of unknown primary source.

**Conclusion.** Modern morphological tumor verification provides high quality diagnosis and treatment of cancer patients in the Republic of Tatarstan for many years.

**Keywords:** immunohistochemistry, pathology, oncology, diagnosis of tumors, indications for anti-tumor therapy, health care management.

Адрес для переписки: semyonp@mail.ru

<sup>1</sup>Посвящается 150-летию начала преподавания патологической анатомии в Казани.

Появление и рост злокачественной опухоли относятся к самым тяжёлым заболеваниям человека, помимо того, данная патология остаётся до настоящего времени одним из самых загадочных биологических явлений. Это в значительной мере связано с тем, что каждая опухоль, несмотря на общие механизмы существования, является уникальным событием, и развитие, рост новообразования определяется особенностями повреждённого генома конкретного человека, у которого возникла опухоль. По этой причине обнаружения универсального маркёра для диагностики любой злокачественной опухоли ожидать не приходится.

В то же время мы вправе отметить, что в последние годы онкологами достигнут значительный прогресс в понимании молекулярно-биологических особенностей опухолевой клетки. Открыты многие механизмы контроля клеточного деления и гибели, поддержания генетической стабильности, путей передачи сигнала от рецепторов в ядро. На сегодняшний день известно более сотни повреждённых белков и/или генов, характерных для злокачественных новообразований.

Определение в опухоли ряда генетических и молекулярно-биологических маркёров этих нарушений даёт дополнительную диагностическую информацию — данные о причинных факторах, биологическом поведении новообразования, скорости роста, способности к инвазии и метастазированию, чувствительности и устойчивости к лекарственному или лучевому лечению, а также о клеточном происхождении. Основные методы

определения таких маркёров в ткани основаны на двух подходах: выявлении изменений на уровне гена (например, амплификация, точковые мутации) или на белковом уровне (сверх-экспрессия белка, экспрессия мутантного белка).

Таким образом, произошло становление нового направления в онкологии — молекулярной диагностики, в основе которой лежит использование молекулярно-биологических маркёров для определения стратегии и тактики лечения, индивидуального подбора лекарственных средств, контроля эффективности противораковой терапии, а также прогнозирования течения злокачественного процесса.

В настоящее время химиотерапию при определённом типе раковой опухоли назначают, как правило, по протоколам, разработанным после многолетних исследований противоопухолевых препаратов. При этом зачастую не учитывают генетические особенности, метаболизм клеток конкретной опухоли, и, как результат, наблюдается не очень высокая эффективность химиопрепаратов. В свете этого сегодня существенное внимание онкологов всего мира привлекают новые терапевтические подходы, базирующиеся на достижениях молекулярной биологии. Разработаны препараты так называемой «таргетной» (target — англ. мишень), или целенаправленной терапии, направленной на избирательное блокирование в опухолевых клетках белков-продуктов онкогенов, а также путей внутриклеточной регуляции жизнедеятельности раковой клетки.

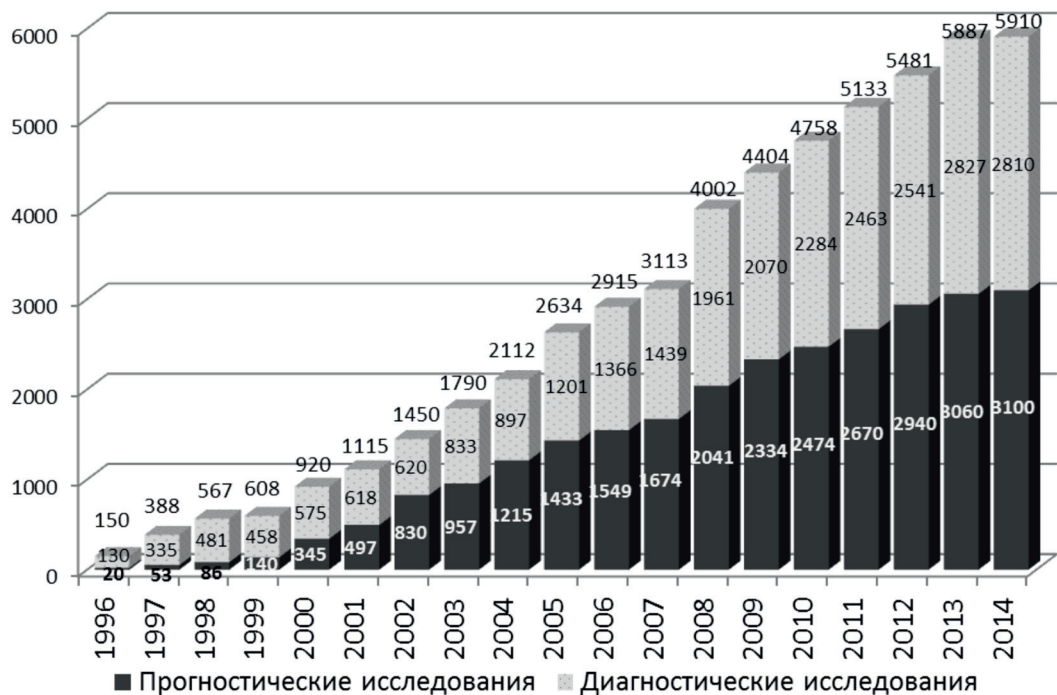


Рис. 1. Количество диагностических и прогностических исследований с применением иммуногистохимического метода в лаборатории иммуногистохимической диагностики опухолей Республиканского клинического онкологического диспансера в 1996–2014 гг. Над каждым из столбцов указано общее число исследований в соответствующем году.

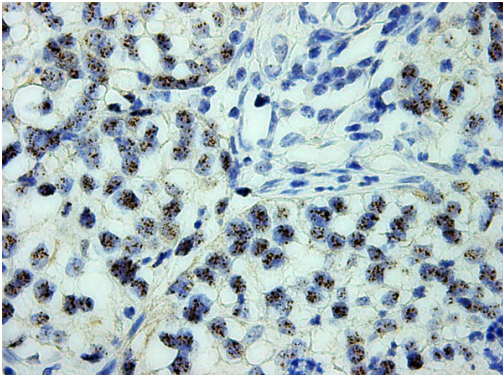


Рис. 2. Амплификация гена HER2/NEU в раке молочной железы (каждая тёмная метка в ядре соответствует одной копии гена), хромогенная *in situ* гибридизация (CISH), увеличение  $\times 900$ .

В Республиканском клиническом онкологическом диспансере Министерства здравоохранения Республики Татарстан (РКОД МЗ РТ) в повседневном режиме с целью индивидуализации терапии (customized therapy) и для создания «молекулярного портрета» опухоли применяют иммуногистохимический (ИГХ) анализ в опухолевых клетках ряда молекулярных мишеней. Это относится прежде всего к таргетной противоопухолевой терапии, направленной против рецепторов факторов роста, дифференцировочных антигенов и т.п. В генетической лаборатории РКОД у больных раком лёгкого и толстой кишки исследуют те гены, в которых присутствуют ключевые мутации, предсказывающие будущую эффективность или резистентность таргетной терапии (например, мутации в генах RAS, EGFR и др.). В лаборатории иммуногистохимии для этих целей анализируют также рецепторы стероидных гормонов, белки онкогенов и генов-супрессоров (p53, Her2,

s-kit), транслокации в генах ALK-EML4 и др.

Второй раздел молекулярной онкологии, который нашёл практическое применение в РКОД, — молекулярная морфологическая верификация опухолей любой локализации. Как известно, онкологический диагноз зиждется на точной морфологической диагностике опухолевого процесса, и от её достоверности зависят дальнейшее лечение и прогноз течения заболевания. Приблизительно в 25% случаев злокачественного роста рутинная гистологическая диагностика чрезвычайно затруднена или даже невозможна. Обусловлено это сложными морфогенетическими процессами в опухолях, приводящими к упрощению структуры и исчезновению в них специфических черт. Согласно современным стандартам, обязательным является ИГХ-анализ лимфом, мягкотканых сарком, рака молочной железы, рака лёгкого, простаты, щитовидной железы и ряда других опухолей [7, 12, 13].

С 1996 г. в РКОД МЗ РТ проводятся широкомасштабные диагностические работы с применением современных иммуногисто(cito)химических и молекулярно-цитогенетических методов, основанных на выявлении в раковых клетках ряда генов и/или специфических белковых молекул [9, 10].

Общее число опухолей, исследованных нами с применением ИГХ-метода, планомерно увеличивалось со 150 в 1996 г. до 5910 в 2014 г., при этом для каждого новообразования оценивается экспрессия от 1 до 12 (как правило, 4-5) и более антигенов (рис. 1).

С 2007 г. проводятся генетические исследования потенциальных мишеней для терапии рака молочной железы, желудка и лёгкого. С целью выявления амплификации онкогена HER2 в 2007-2011 гг. выполнено 894 анализа с применением хромогенной *in situ* гибридизации (CISH, рис. 2), в 2011-2014 гг. — 1064 исследования с примени-

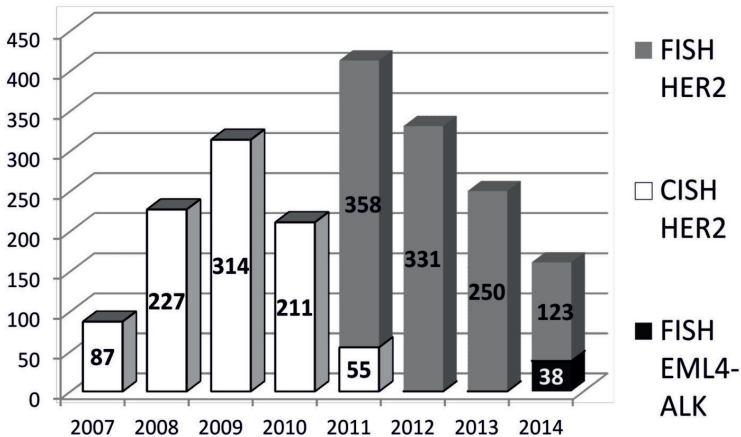


Рис. 3. Количество молекулярно-цитогенетических исследований рака молочной железы, желудка и лёгкого в лаборатории молекулярной диагностики опухолей Республиканского клинического онкологического диспансера: хромогенная (CISH) и флуоресцентная *in situ* (FISH) гибридизация. FISH EML4-ALK — выявление химерного гена в результате транслокации 2p21 и 2p23 со слиянием EML4 и ALK в немелкоклеточном раке лёгкого с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации.

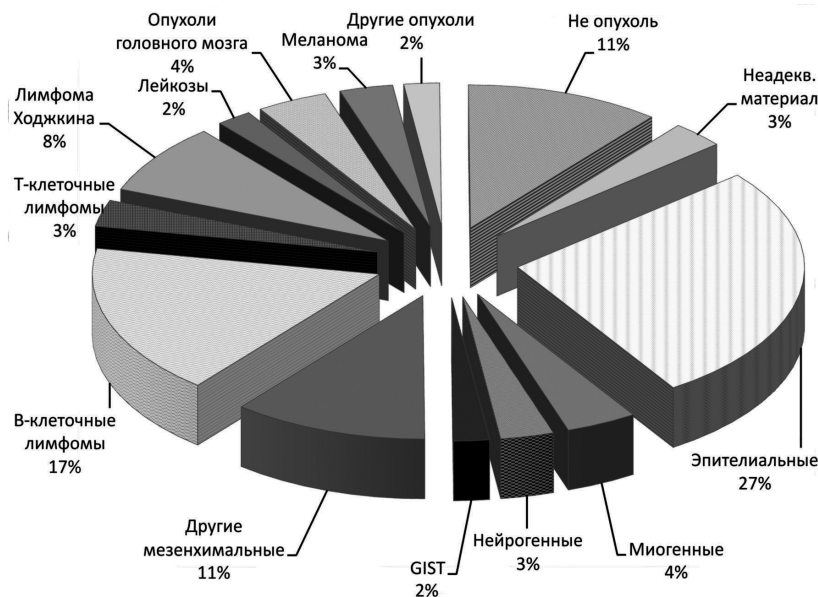


Рис. 4. Структура диагностических ответов по результатам иммуногистохимического исследования в Республиканском клиническом онкологическом диспансере в 2013 г. (всего 2827 случаев). GIST – гастроинтестинальная стромальная опухоль.

ем флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). С ноября 2014 г. проводится FISH для выявления транслокации генов EML4-ALK в немелкоклеточном раке лёгкого, за последний месяц 2014 г. выполнено 38 исследований (рис. 3).

За 19 лет практического применения иммуногистохимии в нашей лаборатории разработан и постоянно совершенствуется алгоритм диагностики опухолей, основные положения которого приводим ниже.

Для ИГХ-анализа опухолей и их метастазов применяем широкий набор маркёров, которые можно разделить на тканеспецифичные (компоненты базальной мембраны, рецепторы, белки промежуточных филаментов и др.), цитоспецифичные (факторы транскрипции, лейкоцитарные CD-антигены, тиреоглобулин и др.), маркёры пролиферации (Ki-67), опухолеассоциированные антигены (CA 19-9, CA-125 и др.), онкофетальные антигены [ $\alpha$ -фетопроtein, раковый эмбриональный антиген (РЭА) и др.], гормоны, ферменты, а также белки клеточных онкогенов и генов-супрессоров (PTEN, Rb, p53, p16), вирусных онкогенов.

Для ИГХ-анализа анапластических опухолей человека в настоящее время наиболее часто применяют антитела к белкам промежуточных филаментов и факторы транскрипции. Принято считать, что промежуточные филаменты играют в клетке больше механическую, чем динамическую роль, и взаимодействуют с плазматической мембраной и оболочкой ядра. Самая большая группа белков промежуточных филаментов – цитокератины (ЦК, синоним – кератины). Для различных вариантов эпителия характерны особые наборы ЦК, спектр синтезируемых ЦК в эпителиальных

клетках зависит от типа дифференцировки и положения клетки в эпителиальном пласте.

В опухолях человека отмечены определённые закономерности экспрессии белков промежуточных филаментов, что активно используется нами в практической работе.

1. Тканеспецифическая экспрессия генов белков промежуточных филаментов сохраняется как в опухолях, так и в их метастазах (ЦК – в раковых опухолях, десмин – в мышечных саркомах, кислый глиальный фибриллярный белок – в глиомах и т.д.).

2. Синтез специфических ЦК коррелирует с гистологической дифференцировкой раковой опухоли.

3. Раковые опухоли разделяются по их происхождению и уровню дифференцировки согласно имеющемуся набору ЦК.

Эти маркёры используют для исследования низкодифференцированных новообразований, метастазов с одинаковыми морфологическими характеристиками по той причине, что информация, полученная при ИГХ-анализе белков промежуточных филаментов, независима от морфологических данных.

Мы рекомендуем для практической работы разделять диагностику анапластических опухолей на ряд этапов [6, 7]. На первом из них используем четыре антитела, которые помогают получить важную информацию о тканевом происхождении опухоли. Здесь мы используем моноклональные антитела к виментину, ЦК, белку S100, общему лейкоцитарному антигену. Подобный ИГХ-анализ первичных низкодифференцированных опухолей, проведённый в нашей лаборатории, позволил во всех случаях установить тканевое происхождение опухолей (рис. 4).

Если ИГХ-реакция оказалась везде положительной или везде отрицательной, это расценивают как артефакт, и исследование проводят повторно. При положительной реакции только на виментин опухоль может оказаться саркомой, в некоторых случаях – лимфомой. Если обнаружена яркая реакция на виментин и белок S100, то диагнозом может быть меланома или липосаркома. Если положительная окраска на виментин сочеталась с реакцией на общий лейкоцитарный антиген и, в редких случаях, низкомолекулярные ЦК, то предполагается лимфома. При положительной реакции на ЦК и, в редких случаях, виментин, можно думать о низкодифференцированном раке, герминоме, а также раке щитовидной железы, почки, яичников.

На следующем этапе можно разделить ЦК-положительные низкодифференцированные опухоли на плоскоклеточный, переходноклеточный, нейроэндокринный рак, аденокарциному и мезотелиому, таким образом определить цити/или органоспецифические характеристики [7].

- Если положительная реакция на ЦК, характерные для плоского эпителия (ЦК-НМВ или №5, 6, 19), сочетается с положительной реакцией на ЦК, присущие однослойным (простым) эпителиям (ЦК №7, 8, 18, 19, в совокупности – «ЦК-прост.»), «молекулярный портрет» соответствует переходноклеточному раку, некоторым протоковым аденокарциномам.

- Иммунофенотип опухоли «ЦК-НМВ (+), ЦК-прост. (-)», указывает на плоскоклеточный рак влагалища, кожи, ротоглотки, пищевода либо гортани.

- Если положительная реакция на ЦК широкого спектра сочетается с окрашиванием на виментин, проводят дифференциальную диагностику между мезотелиомой, синовиальной и эпителиоидной саркомами, а также рядом раковых опухолей – щитовидной железы, почки, яичника и более редкими новообразованиями.

- В случаях коэкспрессии ЦК-прост. с общим лейкоцитарным антигеном предполагается анапластическая крупноклеточная лимфома. Диагноз последней уточняем с помощью антител к CD30, эпителиальному мембранному антигену, гранзиме-В, антигену ALK (CD246).

- Если положительная реакция на ЦК-прост. сочетается с негативной окраской на ЦК-плоск., то эта опухоль является аденокарциномой, которую в дальнейшем исследуем на виллин, РЭА.

- При позитивной реакции на РЭА необходимо в первую очередь исключить рак толстой кишки, желудка, лёгкого, поджелудочной железы, жёлчных протоков. Слабая реакция на РЭА может встречаться при раке мочевого пузыря, некоторых карциномах молочной железы, шейки матки, лёгкого (плоскоклеточном крупноклеточном варианте). Отрицательное окрашивание на РЭА наблюдается в клетках аденокарцином предстательной железы, почки, печени, опухолях желточного мешка, яичников (серозный рак), щитовидной железы (из А-клеток), а также

во многих нейроэндокринных опухолях.

Третий этап заключается в дальнейшей диагностике с целью определения органной локализации анапластической опухоли с иммунофенотипом «РЭА (+), ЦК-прост. (+)» и проводится с помощью уже органоспецифических маркёров.

При раке предстательной железы выявляются белок гена ERG, специфический антиген простаты (PSA), щелочная фосфатаза, специфичная для простаты (PAP), АМАСР (или рацемаза); при раке щитовидной железы – тиропероксидаза, тиреоглобулин, хромогранин, кальцитонин, TTF-1; при печёночноклеточном раке –  $\alpha$ -фетопротеин и антиген, специфичный для гепатоцитов; при раке яичника – WT-1, OC125; при хорионэпителиоме – хорионический гонадотропин,  $\beta$ -гликопротеин беременных. В эндокринноклеточных опухолях лёгкого, щитовидной железы (медуллярный рак), островковой части поджелудочной железы, передней доли гипофиза, парашитовидной железы экспрессируются антиген CD56, синаптофизин, хромогранин, нейронспецифическая енолаза (NSE) и соответствующие специфические пептидные гормоны. Последующая идентификация опухолей с фенотипом «ЦК-прост. (+), РЭА (+)», таких как рак молочной железы, проводится с помощью набора антител к белку HER2, рецепторам эстрогенов/прогестерона, маммаглобину, антигену BSA-225, антигену GCDFP-15 и другим молекулам.

Около 70% аденокарцином лёгкого и 90% мелкоклеточных раков лёгкого дают ядерную реакцию на тиреоидный фактор транскрипции (TTF-1). Уротелиальными маркёрами являются антиген CD10, тромбомодулин, уроплакины. Пока не существует органоспецифических маркёров рака желудка, шейки матки, поджелудочной железы, билиарного тракта.

Если анапластические опухоли дают реакцию на виментин, то они могут быть подразделены на лимфомы (Т-, В-, НК-клеточные), меланому (реагирует с антителами к белку S100, MART-1, HMB-45, тирозиназе, MITF), мышечные саркомы (с позитивной реакцией на гладкомышечный актин, десмин, миогенин, миоглобин), ангиосаркомы (окрашиваются антителами к CD31, CD34, фактору VIII свёртывания крови, фасцину), злокачественную фиброзную гистиоцитому (экспрессирует  $\alpha_1$ -антитрипсин, фактор XIIIa, CD68, лизоцим,  $\alpha$ -антихимотрипсин, иногда белок S100), фибросаркому (реагирует с виментином, CD34 при отсутствии белка коллагена IV в каркасе вокруг клеток). Плеоморфная липосаркома, шванномы, хондросаркома в ряде случаев, кроме виментина, экспрессируют протеин S100. Лейо- и рабдомиосаркомы можно дифференцировать при помощи антител к гладкомышечному актину, калдесмону, кальпонию (окрашивают клетки лейомиосаркомы) и антител к миоглобину, миогенину (выявляют клетки рабдомиосаркомы). Альвеолярная саркома мягких тканей окрашивается на виментин и (в некоторых случаях) на десмин.

Необходимо отметить, что в новообразованиях мягких тканей зачастую не сохраняется фенотип, присущий нормальному клеточному аналогу, и иногда экспрессируются молекулы, не отражающие предполагаемое направление дифференцировки новообразования (например, мышечные маркёры в злокачественной фиброзной гистиоцитоме, ЦК в неэпителиальных опухолях). По этой причине диагноз мягкотканной злокачественной опухоли всегда должен ставиться с осторожностью и основываться на:

- клинических данных (возраст, пол, локализация и характер роста новообразования, данные специальных радиологических методов);
- специфических морфологических признаков;
- ИГХ-фенотипе;
- если это возможно, на данных цитогенетики.

Очень часто в дифференциальную диагностику анапластических опухолей включают лимфомы [1, 2, 4, 5]. По морфологическим признакам крупноклеточная лимфома может напоминать меланому или рак. Анапластические крупноклеточные (CD30<sup>+</sup>, а также ALK-позитивные) лимфомы трудны для диагностики ещё и потому, что значительная часть из них может окрашиваться на эпителиальный мембранный антиген и ЦК. Лимфомы, состоящие из небольших по размерам клеток, нередко имитируют ряд мелкоклеточных опухолей (например, нейроэндокринный рак в желудке, лёгком и т.д.). Иммуногистохимия играет определяющую роль в их классификации по критериям Всемирной организации здравоохранения [12, 13].

Иммуногистохимия помогает в разграничении злокачественного роста и реактивных изменений в лимфатическом узле. Равномерное окрашивание на bcl-2 герминативных центров лимфоидных фолликулов указывает на фолликулярную лимфому, в то время как негативная реакция таких центров свидетельствует о доброкачественном гиперпластическом процессе. Другим примером служит ИГХ-доказательство моноклональной пролиферации плазматических клеток или лимфоидных элементов в некоторых лимфомах (на основании подавляющего преобладания  $\lambda$ - или  $\kappa$ -цепей иммуноглобулинов). Необходимо помнить, что некоторые лимфомы могут быть негативны на общий лейкоцитарный антиген (или CD45), а ряд опухолей, не относящихся к лимфомам, может давать положительную окраску на этот маркёр. В свете этого при позитивной реакции на общий лейкоцитарный антиген необходимо дополнительно использовать T- и V-клеточные маркёры. Опухолевые клетки Рид-Штернберга при лимфоме Ходжкина характеризуются специфической экспрессией CD15, CD30, BLA36, фасцина, PAX-5, MuM-1 и, как правило, отрицательной реакцией на общий лейкоцитарный антиген, факторы транскрипции Oct-2, BOB-1, антигены CD20, CD79 $\alpha$ , CD43, ЭМА, CD246 [4, 5].

В качестве маркёров меланомы используют антитела к HMB-45, Melan-A, тирозиназе, S100. Последний для меланомы менее специфичен и выявляется в клетках ряда других опухолей (липосарком, хондросарком, шванном, нейрофибром, а также в новообразованиях слюнных и молочных желёз). Необходимо отметить, что по отношению к клеткам меланомы антитела к HMB-45 (по сравнению с S100) являются более специфичными, но менее чувствительными. По этой причине в практической работе рекомендуют использовать сочетание ряда (лучше двух-трёх) меланоцитарных маркёров. Следует учитывать, что вышеперечисленные антитела не позволяют отличить меланоцитарную дисплазию от меланомы.

Иммуногистохимия (в частности, применение антител к ЦК широкого спектра) позволяет визуализировать очаги микроинвазии и микрометастазы в лимфатических узлах или костном мозге. Что касается диагностики метастазов без известного первичного очага, то, по нашим данным, органную/клеточную принадлежность опухолевых клеток с применением только рутинной гистологии удаётся определить не более чем в 30% случаев.

В связи с тем, что для ИГХ-исследования в настоящее время доступно множество антител, неудачный выбор из 150–200 реагентов может приводить к замедлению диагностического процесса. В конечном счёте, полезную для диагностики информацию, обычно даёт выявление двух-трёх антигенов, причём более ценной является позитивная, нежели негативная реакция. Выбор исследуемых антигенов определяется клиническими данными, полом, возрастом больных, морфологической характеристикой опухоли, результатами рентгенологического и биохимического исследований, а также данными о частоте различных новообразований подобной локализации. К примеру, у молодых пациентов с недифференцированной опухолью средостения в первую очередь проводят дифференциальную диагностику герминогенного новообразования и лимфомы. При костных метастазах у пожилых мужчин наиболее вероятной первичной локализацией опухоли бывает предстательная железа.

Необходимо помнить, что аккуратно выполненное ИГХ-исследование с последующим точным диагнозом в ряде случаев делает целесообразным проведение дополнительных дорогостоящих диагностических процедур (таких, как позитронно-эмиссионная томография, компьютерная и магнитно-резонансная томография, скинтиграфия и пр.), помогает раньше начать лечение и существенно сократить число койко-дней.

В качестве иллюстрации применения вышеизложенного алгоритма ИГХ-диагностики можно привести структуру диагностических ответов в нашей лаборатории за 2013 г. В общей сложности в 2013 г. проведено ИГХ-исследование 5587 опухолей, из них 3060 определений прогностически

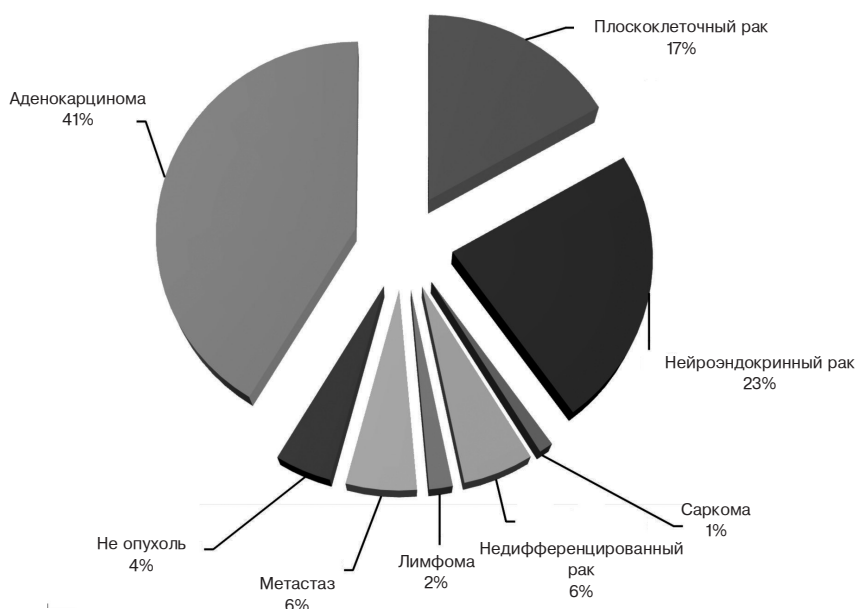


Рис. 5. Структура диагностических ответов при исследовании опухолей лёгкого в 2013 г. (всего 270 случаев).

значимых маркёров (в том числе мишеней для терапии) и 2827 исследований для верификации диагноза (см. рис. 4).

Отметим, что в 311 (11%) случаях диагноз злокачественного новообразования был исключён (при таких нозологиях, как внутрипротоковая гиперплазия, папилломатоз и склерозирующий аденоз в молочной железе, нодозная гиперплазия предстательной железы, невусы, реактивная гиперплазия лимфоидной ткани, хронический гастрит и др.). При диагностических исследованиях ИГХ-метод применяли для верификации не только нозологической формы опухоли, но и её варианта, что имеет ключевое значение при подборе терапии пациентам с лимфоидными новообразованиями, опухолями головного мозга и лёгкого (рис. 5).

Несмотря на широкие возможности, для иммуногистохимии существуют определённые ограничения [6, 7, 11]. К трудностям, обусловленным биологией опухолевого роста, можно отнести следующие:

- коэкспрессию маркёрных белков, что даёт «смешанный» иммунофенотип опухоли (например, ЦК (+), виментин (+), нейрофиламенты (+), эпителиальный мембранный антиген (+), синаптофизин (+) в группе примитивных нейроэктодермальных опухолей – PNET (от англ. primitive neuroectodermal tumors), а также в десмопластической мелко-крупноклеточной опухоли);

- низкий уровень экспрессии (или его снижение) искомым антигенов при прогрессировании новообразования (в метастазах и рецидивных опухолях);

- посттрансляционную модификацию и/или блокирование синтеза маркёрных белков на разных этапах роста опухоли;

- отсутствие для некоторых мягкотканых опухолей специфических маркёров (фибросаркома, альвеолярная саркома и др.);

- смешанный клеточный состав (В-клеточная лимфома с выраженной инфильтрацией Т-лимфоцитами и/или гистиоцитами, некоторые варианты лимфомы Ходжкина и др.);

- изменение спектра выявляемых маркёров при лечебном патоморфозе (например, отмечены постлучевые изменения фенотипа клеток Ходжкина и Рид-Штернберга).

Кроме того, во многих случаях ИГХ-анализ не позволяет подтвердить или отвергнуть злокачественный либо доброкачественный характер опухоли.

Ограничения технического плана связаны с дефектами выполнения многоэтапного процесса подготовки материала, приводящими к ложнонегативным, ослабленным реакциям, а также фоновому окрашиванию. К артефактам могут приводить деформация, коагуляция и высыхание материала при заборе или вырезке, несвоевременная формалиновая фиксация (а также использование спиртовой фиксации, некачественного формалина), применение горячего парафина. Большинство современных наборов реактивов может эффективно окрашивать опухолевые клетки только после проведения демаскировки антигенов в соответствии с указаниями фирмы-производителя антител (нагревание в водяной бане в цитратном буфере или обработка протеолитическим ферментом). Для подтверждения надлежащего исполнения ИГХ-окраски необходимо параллельно проводить контрольные исследования (внутренний или внешний контроль с эталонной реактивностью) [7].

ИГХ-анализ не только позволяет определить



Рис. 6. Лаборатории иммуногистохимической диагностики опухолей, открытые врачами, обучающимися в Республиканском клиническом онкологическом диспансере Министерства здравоохранения Республики Татарстан.

чувствительность опухолей к терапии, но и оценить степень их клинической агрессивности [8, 11]. С этой целью исследуют следующие маркеры: белки онкогенов и генов-супрессоров (p53, pRb, bcl-2 и др.), белки, связанные с клеточным циклом (Ki-67, циклины, p16, топоизомераза-2a и др.), каспазы, молекулы адгезии (CD44, кадгерин и др.), инвазивности и метастазирования (металлопротеиназы и др.), а также ангиогенеза (факторы роста сосудов, их рецепторы и др.). Для ряда маркеров существуют полуколичественные критерии оценки, позволяющие стандартизировать методику (например, система счёта рецепторов гормонов по С. Allred, оценка экспрессии белка HER2 – HercepTest). Иммуногистохимию для целей «таргетной» терапии следует применять только в хорошо оборудованных лабораториях, где персонал врачей и лаборантов использует последние общемировые критерии оценки.

За РКОД МЗ РТ заслуженно закреплён российский приоритет внедрения в практику этих высокотехнологичных методов верификации злокачественных новообразований человека, что проявилось приданием ИГХ-лаборатории статуса референсной (контрольно-консультативной) по Приволжскому федеральному округу.

Так, за два последних десятилетия выполнена референсная ИГХ-верификация новообразований у 32 тыс. пациентов [7, 9, 10]. Из них 55% случаев составили опухоли молочной железы, которые исследовались на прогностические маркеры. Из оставшихся наблюдений 18% были лимфопролиферативными процессами, 15% – анапластическим раком и метастазами без выявленного первичного очага, 12% – мягкотканными опухолями.

Частота ошибочных диагностических ИГХ-заключений составила 2,6%, и они касались первичных опухолей центральной нервной системы, лимфом и метастазов без выявленного первичного очага. Среди причин неточных диагнозов следует назвать отсутствие у патолога результатов клинического исследования, узкую панель применённых антител, неправильную трактовку данных ИГХ-анализа и гистологической структуры, технические проблемы.

При сопоставлении объёма нашей диагностической работы с результатами, изложенными в публикациях ряда зарубежных авторов [11, 14, 15], оказалось, что лаборатория ИГХ-диагностики опухолей РКОД МЗ РТ находится на уровне наиболее активно работающих отделений патологии крупных европейских и американских онкологических центров.

РКОД МЗ РТ осуществляет обучение специалистов – патологоанатомов и онкологов – со всей России. За период с 1997 по 2014 гг. проведено восемь всероссийских школ по иммуногистохимической диагностике опухолей, а также пять тематических школ-семинаров. После обучения в казанской лаборатории учениками профессора С.В. Петрова в России открыто 29 лабораторий ИГХ-диагностики опухолей (рис. 6).

В заключение нужно отметить ежегодный рост в РКОД МЗ РТ числа ИГХ-исследований и ряда молекулярно-цитогенетических, молекулярно-биологических исследований (гибридизации *in situ* с её вариантами, полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой и др.), что обусловлено требованиями современной онкологической клиники.



## ВЫВОД

Подобный рост высокотехнологичной диагностики требует чёткой и слаженной работы сотрудников онкологического диспансера, начиная от администрации и до лаборантской службы. Современная морфологическая верификация новообразований уже много лет позволяет обеспечивать высокое качество диагностики и лечения опухолевых больных в Республике Татарстан.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Атлас опухолей лимфатической системы / Под ред. А.И. Воробьёва, А.М. Кременецкой. — М.: Ньюдиамед, 2007. — 294 с. [*Atlas opukholey limfaticheskoy sistemy*. (Atlas for lymphatic tissue tumors.) Ed. by A.I. Vorob'ev, A.M. Kremenetskaya. Moscow: N'yudiamed. 2007; 294 p. (In Russ.)]
2. Биопсии костного мозга / Под ред. Ю.А. Криволапова. — М.: Практическая медицина, 2014. — 528 с. [*Biopsii kostnogo mozga*. (Bone marrow biopsies.) Ed. by Yu.A. Krivolapov. Moscow: Prakticheskaya meditsina. 2014; 528 p. (In Russ.)]
3. Иммуногистохимические методы: Руководство / Под ред. G.L. Kumar и др.: ДАКО / Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. — М., 2011. — 224 с. [*Immunohistochemical staining methods*. Fifth ed. Ed. by G.L. Kumar, L. Rudbeck. Dako North America, Carpinteria, California. 2009; 172 p. (In Russ.)]
4. Ковригина А.М., Пробатова Н.А. Лимфома Ходжкина и крупноклеточные лимфомы. — М.: МИА, 2007. — 214 с. [Kovrigina A.M., Probatova N.A. *Limfoma Khodzhkina i krupnokletochnye limfomy*. (Hodgkin's lymphoma and giant-cell lymphomas.) Moscow: MIA. 2007; 214 p. (In Russ.)]
5. Криволапов Ю.А., Леенман Е.Е. Морфологическая диагностика лимфом. — СПб.: КОСТА, 2006. — 208 с. [Krivolapov Yu.A., Leenman E.E. *Morfologicheskaya diagnostika limfom*. (Morphological diagnosis of lymphoma.) Saint Petersburg: KOSTA. 2006; 208 p. (In Russ.)]
6. Райхлин Н.Т., Петров С.В. Способность опухолевых клеток к специфической дифференцировке как основа для иммуногистохимической диагностики опухолей человека // *Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина.* —

1998. — Т.9, №3. — С. 3–10. [Raichlin N.T., Petrov S.V. The tumor cell ability of specific differentiation as the basis for immunohistochemical diagnosis of human tumors. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN*. 1998; 9 (3): 3–10. (In Russ.)]

7. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 4-е изд. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. — Казань, 2012. — 624 с. [*Rukovodstvo po immunogistokhimicheskoy diagnostike opukholey cheloveka*. 4-e izd. (Guidelines on immunohistochemical diagnosis of human tumors.) Ed. by S.V. Petrov, N.T. Raykhlin. Kazan. 2012; 624 p. (In Russ.)]

8. Франк Г.А. Руководство по HER2 тестированию при раке желудка, пищеводно-желудочного перехода. — М.: Боргес, 2012. — 54 с. [Frank G.A. *Rukovodstvo po HER2 testirovaniyu pri rake zheludka, pishchevodno-zheludochnogo perekhoda*. (Guidelines on HER-2 testing of gastric and esophagogastric junction cancer.) Moscow: Borges. 2012; 54 p. (In Russ.)]

9. Хасанов Р.Ш. 1-я всероссийская школа-семинар по иммуногистохимической диагностике опухолей // *Казанский мед. ж.* — 1998. — Т. 79, №4. — С. 317–319. [Khasanov R.Sh. 1<sup>st</sup> all-Russia seminar on immunohistochemical diagnosis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 1998; 79 (4): 317–319. (In Russ.)]

10. Хасанов Р.Ш. 6-я всероссийская школа-семинар по иммуногистохимической диагностике опухолей человека // *Арх. патол.* — 2009. — Т. 71, №4. — С. 59–61. [Khasanov R.Sh. 6<sup>th</sup> all-Russia seminar on immunohistochemical diagnosis. *Arkhiv patologii*. 2009; 71 (4): 59–61. (In Russ.)]

11. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. 3rd ed. — Edinburgh: Churchill Livingstone, 2010. — 673 p.

12. Fletcher C.D.M., Bridge J.A., Hogendoorn P., Mertens F. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. Fourth ed. — Switzerland: WHO Press, IARC, 2013. — 468 p.

13. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Fourth ed. — Switzerland: WHO Press, IARC, 2008. — 441 p.

14. Yaziji H., Taylor C.R., Goldstein N.S. et al. Consensus recommendations on estrogen receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morph.* — 2008. — Vol. 16. — P. 513–520.

15. Buesa R.J. Staffing benchmark for histology laboratory // *Ann. Diagn. Pathol.* — 2010. — Vol. 14. — P. 182–193.