

*Клинический научно-
практический центр
специализированных видов
медицинской помощи
(онкологический)
(Россия, Санкт-Петербург)*

*Медико-социальный
институт
(Россия, Санкт-Петербург)*

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РАКА

К.В. Шелехова, А.С. Константинов

MORPHOLOGICAL METHODS OF MALIGNANT TUMORS INVESTIGATION

К.В. Шелехова

*Доктор медицинских наук,
и.о. заведующего, профессор кафедры патологической анатомии,
факультет дополнительного профессионального образования,
Медико-социальный институт,
заведующая патологоанатомическим отделением,
ГБУЗ «СПбКНПЦСВМП(о)».
197758, Россия, Санкт-Петербург, Песочный, ул. Ленинградская, 68А.
Тел.: 8 (905) 256-11-42,
E-mail: kshelekhova@mail.ru.*

А.С. Константинов

*Врач-патологоанатом,
патологоанатомическое отделение,
ассистент кафедры патологической анатомии,
факультет дополнительного профессионального образования.
Тел.: 8 (931) 369-46-28,
E-mail: konstantinov2007@gmail.com.*

К.В. Shelekhova

*Doctor of Medicine,
Head of Pathology Department,
Clinical Research and Practical Center for Specialized Oncological Care,
Professor of Pathology Department,
Saint Petersburg Medico-Social Institute.
197758, Russia, Saint Petersburg, pos. Pesochnyi, Leningradskaya str., 68A.
E-mail: kshelekhova@mail.ru.*

A.S. Konstantinov

*Pathologist in Pathology Department,
Assistant of Pathology Department.
E-mail: konstantinov2007@gmail.com.*

В обзоре обсуждаются морфологические методы исследования опухолей в историческом аспекте. Практика показывает, что понимание различных технологий, применяемых в патологической анатомии, становится важной частью информации, необходимой для клиники. Молекулярно-генетическая информация включена в диагностические алгоритмы для различных нозологических форм, а также используется в повседневной практике для принятия терапевтических решений. Уделяется внимание достижениям в молекулярно-патологическом профилировании опухолей, необходимом для прогнозирования течения заболевания и индивидуализации лечения пациентов.

Ключевые слова: морфология, методы, прогностические биомаркеры, иммуногистохимия, FISH, ISH.

This review discusses the morphological methods of tumors' investigation in its historical aspect. Practice shows that the understanding of different technologies increasingly used in pathology is nowadays a very important part for clinical management. Molecular-genetic information has been incorporated in a diagnostic algorithm for various entities and is widely used for therapeutic decisions. Special attention is paid to the achievements in molecular pathological tumor profiling that allows an effective approach to prognostic and/or predictive biomarkers.

Keywords: *morphology, methods, prognostic and predictive biomarkers, immunohistochemistry, FISH, ISH.*

В начале 19 века морфологический метод диагностики опухолей ограничивался преимущественно описанием макроскопического распространения новообразования. Но все резко изменилось во второй половине 19 столетия с внедрением в практику Рудольфом Вирховым (1821–1902) – «отцом современной патологии» – световой микроскопии. После этого стало возможным исследовать микроскопическую структуру опухолей, создавая принципиально новые классификации. Следующим большим шагом вперёд стала новаторская работа в области (гинекологической) цитологии Джоржа Н. Папаниколау в 1902 году. Данный метод позволяет обнаружить даже предопухолевые процессы шейки матки, в тот момент, когда они полностью излечимы. Далее, с развитием биопсийных технологий, патоморфологические находки становятся все более актуальными для клинического лечения онкологических пациентов: теперь становится возможным получить объективную информацию об опухоли перед хирургическим вмешательством, тем самым избегая ненужных вмешательств в случае доброкачественного процесса или слишком запущенного состояния. Онкологические исследования также продемонстрировали, что прогноз заболевания и адекватное клиническое лечение пациентов с онкологическими заболеваниями были связаны с гистологическими данными: нозологической формой опухоли, распространением новообразования в лимфатические узлы и другие органы, состоянием края резекции.

С развитием лучевой терапии в первой половине и ростом современной химиотерапии во второй половине 20 века стало очевидным, что различные морфологические подтипы опухолей одинаковой локализации по-разному реагируют на лучевую и/или химиотерапию. Эти данные фундаментально изменили цель и задачи патологической анатомии.

Рост так называемой «прецизионной (точной) медицины» начался в 1980-х годах с развития иммуногистохимии. Этот метод позволил патологам сравнительно легко исследовать экспрессию различных белков на гистологических препаратах, полученных от хирургических образцов. Впоследствии эти уровни экспрессии окажутся значимыми для субклассификации опухолей, что не было доступно только при помощи световой микроскопии.

*«Если ты хочешь понять что-либо,
узнай, как оно возникло»*

Б.Ф. Поршнев

Первым важным этапом для введения иммуногистохимии в практическую морфологию была разработка метода мечения антител ферментами, реагирующими с нефлуоресцирующими хромогенами, такими как диаминобензидин (DAB) [1, 2]. Это позволило использовать обычный световой микроскоп взамен флуоресцентного и одновременно наблюдать локализацию антигена в контексте гистологической архитектоники ткани. Введение так называемого метода немеченых антител, или техники пероксидаза-антипероксидаза (PAP), Штернбергом в 1970 году позволило значительно увеличить чувствительность метода. Еще большая чувствительность была достигнута с использованием авидин-биотиновых комплексов взамен PAP-комплексов [1, 2]. Следующий важный прорыв стал возможен с введением моноклональных антител, которые возможно использовать в срезах тканей с парафиновых блоков; это обеспечило теоретически безграничный доступ к высокоспецифичным антителам для конкретных антигенов, представленных в тканях. Открытие техники демаскировки эпителиев, сначала с помощью ферментов в 1976 году, а в дальнейшем с помощью нагревания в 1991 году, было еще одним революционным шагом использования иммуногистохимии в фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканях, включая архивный материал, который может храниться десятилетиями [1–4]. Улучшение систем детекции и появление автоматизированных техник позволяет быть уверенным, что этот метод останется неотъемлемой частью патоморфологии и в ближайшем будущем.

Для понимания сути применения иммуногистохимического метода, а также хода мысли патолога, использующего его на практике целесообразно рассмотреть типичные изменения нормальных клеточных антигенов, связанные с опухолевой трансформацией. В целом они проявляются в антигенном упрощении опухолевых клеток в результате утраты или значительного снижения синтеза части нормальных антигенов; в антигенной реверсии, т.е. ресинтезе антигенов, характерных для эмбрионального этапа развития данной ткани; и вантгенной дивергенции – появлении «гетероорганных антигенов», свойственных нормальным тканям, не гомологичным опухолевой.

Все опухолевые антигены условно подразделяют на 2 большие группы: опухолеспецифические и опу-

холеассоциированные [5]. К *опухолеспецифическим* антигенам относятся уникальные и общие мутантные антигены, синтезирующиеся только в неопластических клетках и происходящие из-за изменения нормального белка в результате генных перестроек; а также вирусные антигены, связанные с инфицированием вирусом – этиологическим фактором данной опухоли. Антиген может называться уникальным только в том случае, если он никогда не обнаруживался в других опухолях, но на практике понимают, что антиген очень редко выявляется в тех или иных опухолях. Таким образом, уникальность мутантных опухолеспецифических антигенов в большинстве случаев относительна. К примеру, первым выявленным мутантным опухолевым антигеном был MUM-1, также к этой группе относят p53, b-catenin, CDK4 и другие. Следует отметить, что наличие в опухоли уникальных опухолеспецифических антигенов в большинстве случаев ассоциировано с благоприятным для пациента прогнозом, кроме этого они рассматриваются в качестве привлекательных специфических мишеней для иммунотерапии.

Яркими примерами вирусных антигенов, широко применяемых на практике для диагностики новообразований, являются HHV8 – к саркоме Капоши, p16 – к вирусу папилломы человека, EBV – к вирусу Эпштейна-Барр.

В группе *опухолеассоциированных* антигенов выделяют 3 подгруппы. Первая – это дифференцировочные (тканеспецифические) антигены соответствующей нормальной ткани, характерные для определенного этапа ее развития. В опухолевых клетках экспрессия этих маркёров обычно повышается. В данную подгруппу относят также онкофетальные (эмбриоспецифические) антигены. Это практически все опухолевые маркёры, используемые для диагностики, и к настоящему времени, по данным Human Protein Atlas, их насчитывается более 600. Иммунофенотипирование опухолей по дифференцировочным антигенам позволяет диагностировать, классифицировать, определять прогноз их течения и даже тактику лечения. Следует отметить, что выбор диагностической панели антител неразрывно связан с гистологической архитектурой опухоли и клиническим контекстом. Однако необходимо помнить, что злокачественная трансформация клеток, особенно эпителиальных новообразований, сопровождается так называемым «антигенным упрощением», т.е. утрачивается часть (а иногда большая часть) тканеспецифических антигенов. Это создаёт значительные трудности при верификации опухоли, особенно в условиях отсутствия клинической информации. К примеру, тканеспецифические антигены меланомы связаны с синтезом меланина данным типом ткани, однако в процессе опухолевой прогрессии может наблюдаться снижение или полная их утрата, при этом частичное морфологическое сходство первич-

ной опухоли и метастаза в большинстве случаев сохраняется и выступает в таких ситуациях основным диагностическим инструментом.

Вторую подгруппу составляют гетероорганнные антигены, т.е. нормальные клеточные антигены, являющиеся специфичными для других тканей, не гомологичных опухолевой. Как правило, они возникают при активации генов, «молчащих» в нормальных клетках данного типа ткани. Этот феномен известен как «феномен антигенной дивергенции», впервые описанный Day в 1965 году, который обнаружил в клетках первичных гепатом крыс антигены, присущие нормальным тканям почки и селезенки, а не печени. Гетероорганнные антигены выявляются в различных опухолях человека, что может создавать значительные диагностические трудности, особенно в случаях метастазов неясной первичной локализации. Так, в карциномах легкого могут обнаруживаться антигены, характерные для почек, мочевого пузыря, поджелудочной железы и даже головного мозга.

Наибольший интерес для клинических специальностей представляют гетероорганнные антигены, проявляющие иммуногенность и вызывающие при этом определенную симптоматику. Представителями этой группы являются, к примеру, онконевральные антигены, которые представляют собой нейрональные белки, эктопически синтезируемые клетками ряда опухолей, таких как мелкоклеточный рак легкого, тимомы, нейробластомы, карциномы женских половых органов и другие. С экспрессией этих антигенов патогенетически связаны паранеопластические неврологические синдромы, например, дегенерация мозжечка при раке молочной железы или раке яичников, связанная с наличием у пациента антител к ДНК-связывающему белку клеток Пуркиньи. Опухлеассоциированная ретинопатия может наблюдаться у больных мелкоклеточным раком с наличием антител против фоторецепторного антигена. При этом антитела против онконевральных антигенов могут появляться в крови пациентов задолго до обнаружения опухоли и служить тем самым сверххранним диагностическим признаком.

И третью подгруппу составляют амплифицированные/ гиперэкспрессируемые и универсальные опухолевые антигены, сверхэкспрессия которых является необходимой для онкогенного процесса. Экспрессия таких антигенов в нормальных тканях происходит, но на низком уровне и может быть зарегистрирована лишь методом полимеразной цепной реакции. Примером может служить амплификация гена n-тус, количество копий которого достигает 200 в нейробластомах и ретинобластомах. Другим примером является хорошо известный онкоген Her2/neu, гиперэкспрессия которого наблюдается в опухолях молочной железы, кишечника, желудка, яичника и др. Изучение этих антигенов позволило вновь резко изменить ситуацию в онкологии. Появилась таргетная

терапия, позволяющая воздействовать на определенные белки, определяемые иммуногистохимически: если соответствующий протеин экспрессируется, терапия показана; если необходимый уровень экспрессии не обнаруживается, данный метод не применяется. В частности, сверхэкспрессия HER2/neu ассоциирована с плохим прогнозом течения заболевания и резистентностью к химио- и лучевой терапии, но высокой чувствительностью к таргетному препарату.

Кроме диагностической ценности, иммуногистохимические приемы незаменимы для оценки прогностических и предиктивных показателей. Многие биологические процессы и белковые альтерации, которые могут быть выявлены с помощью иммуногистохимии, имеют прогностическую ценность. К примеру, определение пролиферативной активности может стать индикатором времени удвоения опухолевой массы. Объективно оценить процент клеток опухоли, находящихся в процессе деления, возможно при помощи индекса Ki67. Выявление метастазов в регионарных лимфоузлах – один из наиболее значимых прогностических маркеров для большинства карцином. Часто небольшие метастазы трудно обнаружить в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Однако, применение иммуногистохимических окрасок позволяет выявить даже единичные опухолевые клетки, что особенно часто используется в случаях оценки статуса «сторожевых» лимфоузлов при опухолях молочной железы и меланомах.

Некоторые опухоли, включая карциномы молочной железы, предстательной железы, матки и яичников, часто чувствительны к гормонам. Эта особенность используется для назначения препаратов изменяющих уровень гормонов или блокирующих рецепторы к ним в опухолевых клетках. Стероидные гормоны связываются с высокоспецифичными и высокоафинными внутриклеточными рецепторами, контролирующими транскрипцию ряда генов, ответственных за клеточный рост. Выявление рецепторов к эстрогену и прогестерону иммуногистохимическим методом позволяет определить ответ опухоли на гормональную терапию или назначение тамоксифена.

Следует отметить, что антигенный профиль опухоли не является стабильным ни качественно, ни

количественно на разных стадиях неопластического процесса. Этот феномен остаётся серьезной проблемой как для диагностики, так и для лечения новообразований человека. Тем не менее, методы иммуногистохимии продолжают эволюционировать, область их применения в диагностических и исследовательских целях расширяется. Вместе с развитием технологий, появляются новые панели маркеров, дающие возможности для новых открытий, углубляя наши познания биологии опухолевого роста.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*, или метод FISH, позволяет выявить наличие или отсутствие специфических ДНК последовательностей в хромосомах. Для этого используются специально окрашенные метки (зонды), соединяющиеся с определёнными участками генов, представляющими объект изучения. Зонды гибридизируются (связываются) с соответствующими участками ДНК и, благодаря тому, что они несут флуоресцентную метку, возможно видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом (рис. 1) [1].

Анализ опухолевых тканей с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации – широко используемый метод для идентификации генетических aberrаций, таких как изменение количества копий гена или транслокация. Метод использовался как исследовательский инструмент в течение более 20 лет и, благодаря диагностической, прогностической и предсказательной ценности некоторых FISH-маркеров, получил широкое распространение в онкоморфологии. Возможность количественного анализа результатов FISH сделала этот метод ценным дополнением, а в ряде ситуаций альтернативой иммуногистохимическому анализу при совместной оценке с экспрессией некоторых опухолевых маркеров. В частности, современная диагностика и лечение опухолей мягких тканей невозможны без FISH-анализа. Саркома Юинга, дающая хороший ответ на химиотерапию и лучевую терапию, а также таргетную терапию ингибиторами рецептора инсулино-подобного фактора 1 (IGF1R), должна быть подтверждена наличием специфической транслокации -t (11; 22) (q24; q12). Поскольку выделены саркомы, похожие на саркому Юинга, если при диагностике ограничиться обзорной гистоло-



Рис. 1. Принцип флуоресцентной гибридизации *in situ*

гической окраской и иммуногистохимическим исследованием, но имеющие отличное биологическое поведение и чувствительность к терапии. Так, Юингоподобная саркома, несущая транслокацию C1C-DUX4 (C1C-DUX4 саркома) отличается крайне агрессивным поведением и низкой чувствительностью к цитотоксической терапии. Низкодифференцированная синовиальная саркома (t (X; 18) (p11; q11)) имеет худший прогноз по сравнению с бифазной и монофазной, даёт умеренный ответ на химиотерапию и таргетную терапию пазопанибом. Для лечения светло-клеточной саркомы (меланомы мягких тканей), подтверждаемой обнаружением транслокации t (12; 22) (p13; q12) или t (2; 22) (p33, q12), применяют терапию тивантинибом, кабозантинибом [6].

Недавно была разработана новая методика – хромогенная гибридизация *in situ* (CISH), основанная на сигналах хромогена вместо флуоресцентного сигнала. Методика проведения CISH, как альтернатива FISH, описана в 2004 году. С этого момента опубликовано множество статей, сравнивающих CISH и FISH. Исследователи сошлись во мнении, что CISH – точный, воспроизводимый метод, имеющий большое сходство с FISH. Чувствительность метода не только не уступает чувствительности FISH, но и имеет ряд преимуществ, упрощающих применение данного метода, что обуславливает рост его популярности:

1. Результаты CISH легко интерпретируются с помощью светового микроскопа, имеющегося в любой лаборатории.

2. Сигнал CISH не выцветает, что делает возможным хранение препаратов в архиве и ретроспективный пересмотр стекол.

3. CISH, как и иммуногистохимическое исследование (в отличие от FISH), позволяет использовать рутинные методы окраски ткани, в частности, гематоксилином для визуализации структурных компонентов ткани.

Результаты ряда исследований показали, что CISH может применяться наравне с FISH и дополнять иммуногистохимический метод определения HER2-статуса рака молочной железы. Исследование HER2 проводится в рамках руководства ASCO-CAP, сегодняшняя тенденция заключается в использовании FISH HER2 при неоднозначном результате иммуногистохимического исследования. Оценка HER2 методом CISH с позиций прогностической и диагностической значимости метода позволяет включить его в ряд стандартов для выявления HER2.

Другой подход применения световой микроскопии – гибридизация в тканях с металлографией. При использовании данного метода метка визуализируется с помощью праймера или антитела, осаждающего метал селективно, в зависимости от места связывания. Один из методов металлографии – гибридизация

в ткани с осаждением серебром (silverenhanced *in situ* hybridization, SISH). В основе SISH лежит тот же принцип, что и в CISH, но сигнал метки при SISH имеет черный цвет, обусловленный реакцией преципитации серебра.

Ещё одной перспективной технологией морфологии может стать массовая спектроскопия [7]. Это методика, находящаяся в стадии разработки, позволяет исследовать экспрессию сотен белков одновременно на гистологических срезах образцов опухолей, фиксированных в формалине. Данные некоторых лабораторий, которые уже применяют эту методику, показывают, что первые результаты по крайней мере сопоставимы с таковыми стандартной иммуногистохимии. Однако основной вопрос – можно ли повысить чувствительность и разрешение масс-спектропии на основе морфологии – ещё остаётся открытым.

Молекулярное профилирование опухолей (определение набора прогностических и предиктивных маркеров новообразования), проводимое с помощью различных методов морфологии (оценки экспрессии белков, генов, мРНК и др.), является эффективным подходом для определения потенциальных мишеней и выбора наиболее эффективных методов лечения, что подтверждается увеличением выживаемости без прогрессирования заболевания. В частности, активно разрабатываются молекулярно-патологические классификации различных форм опухолей. Карцинома молочной железы может быть классифицирована на 4 подгруппы (в порядке от лучшего прогноза к худшему): люминальный А, люминальный В, HER2- и базально-подобный). Уротелиальную карциному по LUND-классификации подразделяют на 6 молекулярных подтипов: уротелиальный А, уротелиальный В, генетически нестабильный, базально-подобный, мезенхимально-инфильтративный и мелкоклеточно-нейроэндокринно-подобный, различающихся прогнозом и ответом на те или иные виды терапии. На стадии исследования находятся молекулярные классификации рака эндометрия, желудка, предстательной железы и других локализаций.

Таким образом, понимание различных технологий, применяемых в патологической анатомии, становится важной частью информации, необходимой для клиники. Молекулярно-генетическая информация включена в диагностические алгоритмы для различных нозологических форм, а также используется в повседневной практике для принятия терапевтических решений. Хотя индивидуализированный подход к лечению пациентов давно общепризнан, молекулярно-патологическое профилирование только начало помогать прогнозировать клиническую пользу препарата, идентифицируя наиболее чувствительную подгруппу пациентов.

Список литературы

1. *Bancroft J.D., Gamble M.* Theory and practice of histological techniques. 6-ed, Elsevier, 2008.
2. *Kumar G.L., Rudbeck L.* Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. 5th ed, Dako, 2009.
3. *Torlakovic E.E., Francis G., et al.* Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations from the International Ad Hoc Expert Panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* – April 2014. – Vol. 22, №4. – P. 241–252.
4. *Torlakovic E.E., Nielsen S., et al.* Standardization of Positive Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* – January 2015. – Vol. 23, №1. – P. 1–18.
5. *Тюряева И.И.* Опухолевые антигены. *Цитология.* – 2008. – С.189–209.
6. *Noujaim J., Thway K., Sheri A., Keller C., Jones R.L.* Histology-Driven Therapy: The Importance of Diagnostic Accuracy in Guiding Systemic Therapy of Soft Tissue Tumors. *Int J Surg Pathol.* 2016. – Vol. 24, №1. – P. 5–15.
7. *Park Y., Yeom J., Kim Y., Lee H.J., Han K.C., Lee S., Lee C., Lee J.E.* Identification of plasma membrane glycoproteins specific to human glioblastoma multiforme cells using lectin arrays and LC-MS/MS. *Proteomics.* 2017 Nov, 14.

References

1. *Bancroft J.D., Gamble M.* Theory and practice of histological techniques. 6-ed, Elsevier, 2008.
2. *Kumar G.L., Rudbeck L.* Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. 5-ed, Dako, 2009.
3. *Torlakovic E.E., Francis G., et al.* Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations from the International Ad Hoc Expert Panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014 Apr; 22(4): 241-252.
4. *Torlakovic E.E., Nielsen S., et al.* Standardization of Positive Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015 Jan; 23(1): 1-18.
5. *Тюряева И.И.* Tumor antigens. *Cytology.* 2008; 189-209. (in Russ).
6. *Noujaim J., Thway K., Sheri A., Keller C., Jones R.L.* Histology-Driven Therapy: The Importance of Diagnostic Accuracy in Guiding Systemic Therapy of Soft Tissue Tumors. *Int J Surg Pathol.* 2016; 24(1): 5-15. doi: 10.1177/1066896915606971. Epub 2015 Sep 22.
7. *Park Y., Yeom J., Kim Y., Lee H.J., Han K.C., Lee S., Lee C., Lee J.E.* Identification of plasma membrane glycoproteins specific to human glioblastoma multiforme cells using lectin arrays and LC-MS/MS. *Proteomics.* 2017 Nov; 14. doi: 10.1002/pmic.201700302. [Epub ahead of print].