

Vannak-e új lehetőségek az immunmorfológiában?

Szekeres György

Hisztopatológia KFT, Pécs

Az immunológiai fajlagosságon alapuló immundiagnosztikus módszertan legismertebb, könnyen reprodukálható, költség- és környezetkímélő csoportját alkotja az immunmorfológia, melybe elsősorban az immunhisztokémia és az immunocitokémia eljárásait soroljuk. Több mint 60 éves története során mind a technológia, mind pedig az alkalmazás folyamatosan fejlődött. Ez nagymértékben járult hozzá a különböző, elsősorban a rosszindulatú daganatos kórfolyamatok pontosabb kórismézéséhez, biológiai paramétereik jobb megismeréséhez. A jelen összefoglaló – a teljesség igénye nélkül – felkívánja sorolni azokat a legjelentősebb lépéseket, melyek hozzájárultak az immunmorfológia előrehaladásához. *Magyar Onkológia 48:21–25, 2004*

Immunomorphology, including immunohistochemistry and immunocytochemistry, forms a category of well known, reproducible, cost- and environment-saving immunodiagnostic methods based on immunological specificity. Both the accurate diagnosis and a better knowledge of biological parameters of diseases, especially of malignant tumors, result from the continual development of technologies and applications concerning at least 60 years of history of immunostaining. This review attempts to summarize the most important steps of development of immunomorphology. *Szekeres G. Are there new possibilities in immunomorphology? Hungarian Oncology 48:21–25, 2004*



Bevezetés

A különböző megbetegedések kórisméjének pontos meghatározása igen sok esetben elképzelhetetlen kórszövettani és/vagy citológiai vizsgálatok nélkül. Ezen belül kitüntetett helyen állnak a rosszindulatú daganatos kórfolyamatok, melyek diagnosztizálása csak szövettani minták fénymikroszkópos morfológiai értékelésével lehetséges. A kórszövettani és citológiai rutin módszertant hasznosan egészíti ki az immunmorfológia (immunhisztokémia és immunocitokémia), mely egyrészt a kórisme pontosítását teszi lehetővé, de emellett a kórfolyamat kiterjedtségét is segít meghatározni, újabbban pedig a kóros sejtek olyan biológiai paramétereinek megítélését biztosítja, melyek a várható kórlefolyással, a megbetegedés kimenetelével (prognózis) állnak szoros kapcsolatban, és vizsgálatukkal közvetlen és/vagy közvetett következtetések vonhatók le a prognózisra vonatkozóan (8, 17, 20).

Közlésre érkezett: 2003. szeptember 15.
Elfogadva: 2004. január 9.

Levelezési cím: Dr. Szekeres György,
Hisztopatológia KFT, 7608 Pécs, Pf.: 5.
Tel/fax: 72 516 490, E-mail: histopat@mail.datanet.hu
A jelen közlemény a Biomedica Kft. támogatásával, a „Patológiai vizsgálatok az új évezredben” tárgyú szakmi továbbképző ülésen elhangzott előadás alapján készült.

Vannak-e új lehetőségek az immunmorfológiában?

A kérdésre lehet úgy is válaszolni, hogy nincsenek, mert az immár több mint 60 éves módszertan, az alkalmazás és értékelés alapja az immunológiai fajlagosság és az antigén-antitest reakció. Ennek ellenére az egyre újabb diagnosztikus kihívások mindhárom területen jelentős előrelépéseket eredményeztek a közelmúltban.

1. Módszertan:

- A legkorábban megismert, és mind a mai napig jól alkalmazható eljárás az immunfluoreszcencia (IF), mely fluorokrómhoz kapcsolt specifikus ellenanyagok reakcióján alapul (6). Előnye a magas érzékenység, ami lehetővé teszi, hogy direkt módszerrel, konjugált elsődleges antitestek egy lépésben történő alkalmazásával is jól értékelhető jelet kapjunk, valamint ez az áramlási citometria jelölési eljárásának alapja is. A legmegbízhatóbb kettősjelölési eredmények is e módszerrel nyerhetők több különböző fluorokróm alkalmazásával. Hátránya, hogy speciális, fluoreszcens mikroszkópot igényel, nehéz a fluoreszcens jel mellett a szöveti-citológiai struktúra megítélése (sötét látótér), továbbá a jel instabil, a leggon-

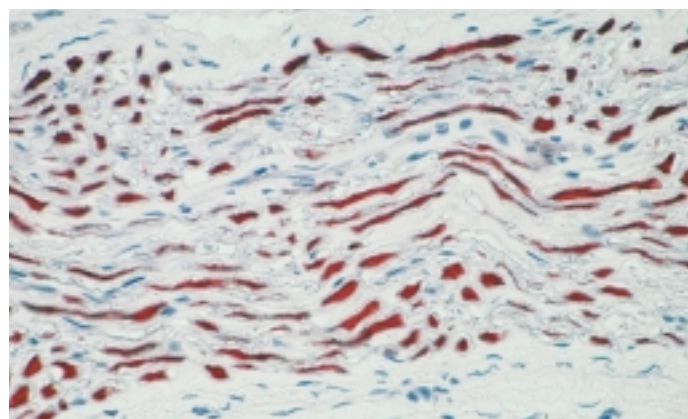
dosabb tárolás (sötét, hűtött helyen) folyamán is csökken a jel intenzitása.

- Az egyik legjelentősebb előrelépés az immunperoxidáz reakció bevezetése volt (26, 34), mely lehetővé tette a megfestett szövettani metszetek, kenetek hosszú idejű tárolását szobahőmérsékleten, de a legjelentősebb értéke, hogy a jel egyszerű fénymikroszkópos értékelése közvetlenül a vizsgált szövetek/sejtek morfológiai megítélésével együttesen történhet (1. ábra). Kevésbé érzékeny, mint az IF eljárások, de a jelet felerősítő immunfestési eljárások (indirekt, háromlépcsős indirekt, peroxidáz-anti-peroxidáz, PAP) szenzitivitását közelítik azokéhoz. Hátránya az endogén enzimaktivitás lehet,

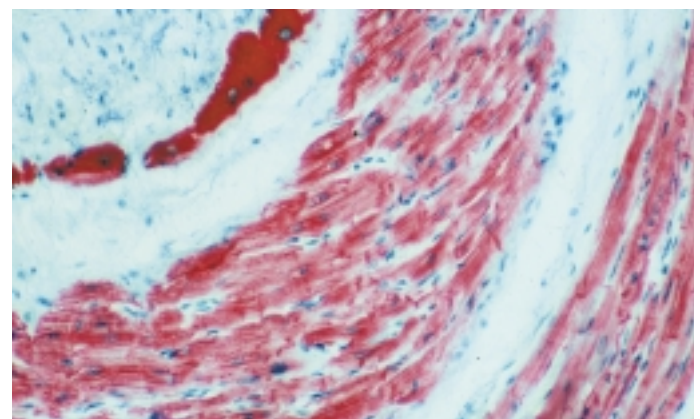
mely azonban vagy könnyen gátolható, vagy más enzim alkalmazásával kivédhető probléma.

- Szintén nagy előrelépés volt az immunenzimatikus módszerek területén a peroxidáz mellett más jelölő enzimek bevezetése, melyek közül az immun-alkalikus foszfatáz (7, 18) lett a legismertebb az immunmorfológiában (2. ábra); elsősorban az endogén peroxidáz okozta problémák kivédése, ill. kettősjelölés igénye során hasznos. Leginkább, mint alkalikus foszfatáz – anti-alkalikus foszfatáz módszer alkalmazzák (APAAP).
- Mind a módszertan, mind az alkalmazás és értékelés vonatkozásában igen jelentős a monoklonális ellenanyagok megjelenése (15). Az

1. ábra. Perifériás idegrost-átmetszet, fixált-beágyazott metszet, neurofilamentum immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilín magfestés, 250x



2. ábra. Szívizom, fixált-beágyazott metszet, dezmin immunalkalikus foszfatázos kimutatása. Fast red kromogén, hematoxilín magfestés, 150x



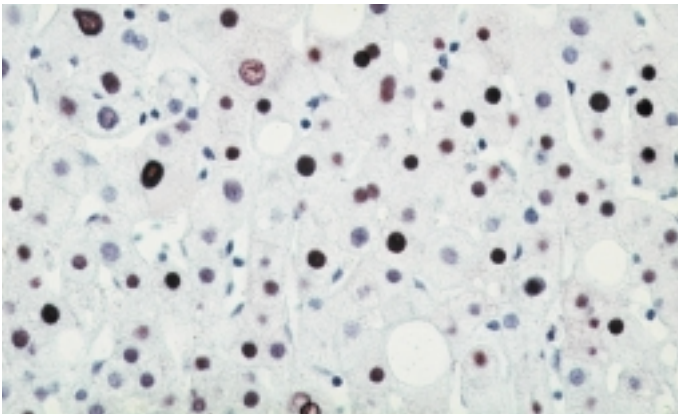
1. táblázat. A legismertebb immunfestési eljárások

Módszer	Módszer alapja	Előny	Hátrány
Direkt	Jelölt elsődleges antitest	Gyors, olcsó	Alacsony érzékenység
Indirekt	Jelöletlen elsődleges antitest és jelölt másodlagos reagens (elsődleges antitestre fajlagos ellenszérum)	Gyors, olcsó, valamivel érzékenyebb	Monoklonális antitestek kötődési helyeinek detektálására nem eléggé érzékeny
Indirekt 3 lépésben	Ugyanazon enzimmel jelölt másodlagos és harmadik (a másodlagos ellenszérum immunglobulinjára fajlagos) ellenszérum	Olcsó, érzékenyebb, monoklonális antitestek többsége is detektálható fixált-beágyazott metszeteken is	Jelentős a nem-specifikus háttérfestődés kockázata
Enzim-anti-enzim (PAP, APAAP) (5, 8)	Nem-konjugált reagensek alkalmazása	Jól kontrollálható lépések, monoklonális antitestek többsége detektálható, háttérfestődés gyakorlatilag kizárható, érzékenysége növelhető	Gyakran hosszú inkubációs időket igényel
Avidin/streptavidin-biotin módszerek (13)	Avidin/streptavidin és biotin magas affinitású kapcsolódása, a biotinhoz kapcsolt másodlagos ellenszérum és a biotinált enzim közötti kapcsolatot avidin vagy streptavidin biztosítja	Magas érzékenység, gyors reaktivitás	Endogén biotin háttérfestődést okozhat
Jelölt polimer (14)	Polimerhez kapcsolt másodlagos antitest és enzim	Gyors, kétlépcsős immunfestés, magas érzékenység, könnyebb kettősjelölési eljárás	Magasabb ár

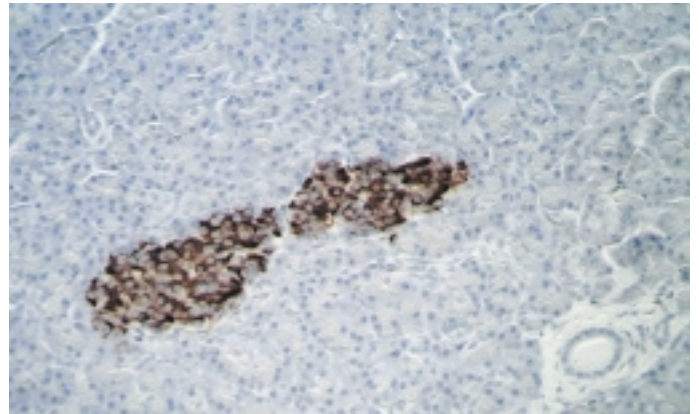
epitóp-fajlagos jel érzékenyebb detektáló rendszerek bevezetését igényelte (avidin/streptavidin-biotin, jelölt polimer), melyek segítségével jelentősen csökkenthető a nem-specifikus, ún. háttérfestődés és a sejtbiológiában ismert legjelentősebb, a különböző sejtalkotókhoz, sejtfunkciókhoz kapcsolt molekulák (antigének) és azok speciálisan kiválasztott szakaszai (epitópok) tehetőek láthatóvá.

- Új immunizálási eljárások kerültek bevezetésre. A monoklonális, elsősorban egérben és patkányban indított immunizálási és hibridóma-technológia során már számos antigén előre meghatározott epitópja került immunogénként alkalmazásra, mely növelte a kívánt specificitás előre meghatározottságát (1, 23, 27). Kifejlesztésre kerültek a nyúl immunglobulinokat termelő sejtvonalak, melyek legje-

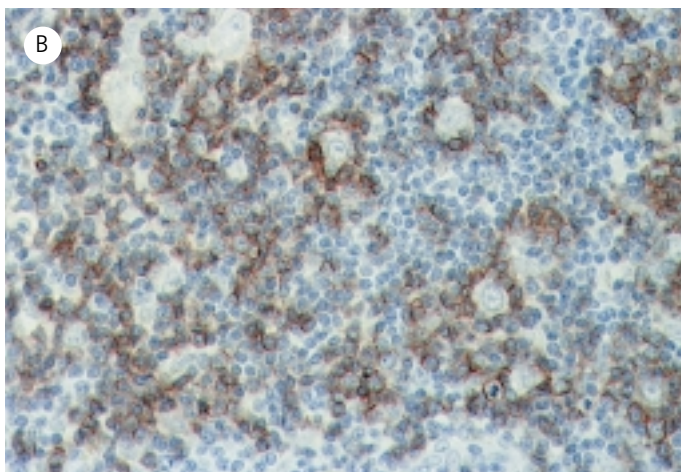
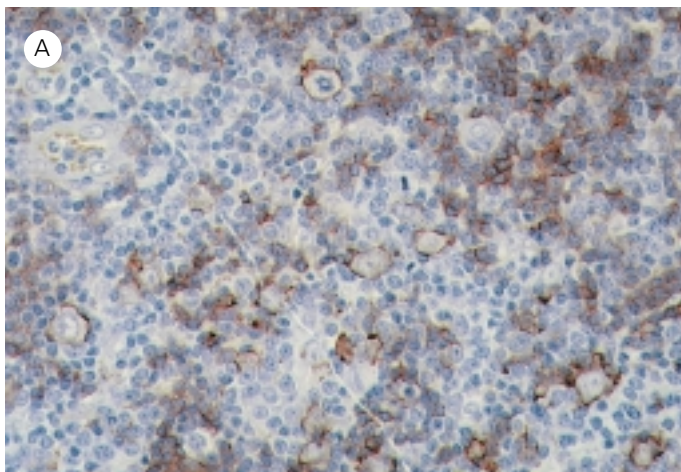
3. ábra. Máj, fixált-beágyazott metszet, Hbc immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilin magfestés, 250x



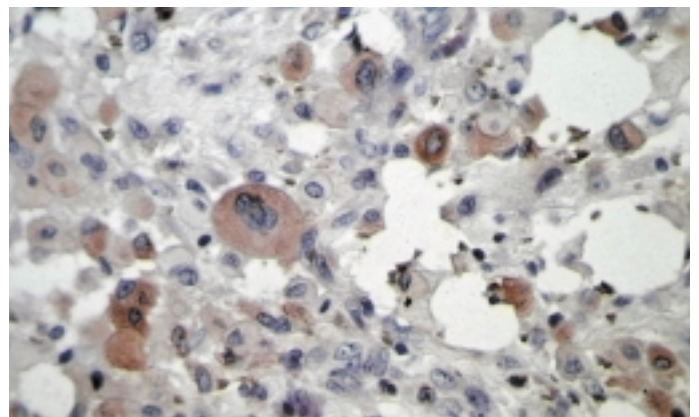
5. ábra. Hasnyálmirigy, fixált-beágyazott metszet, inzulin immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilin magfestés, 150x



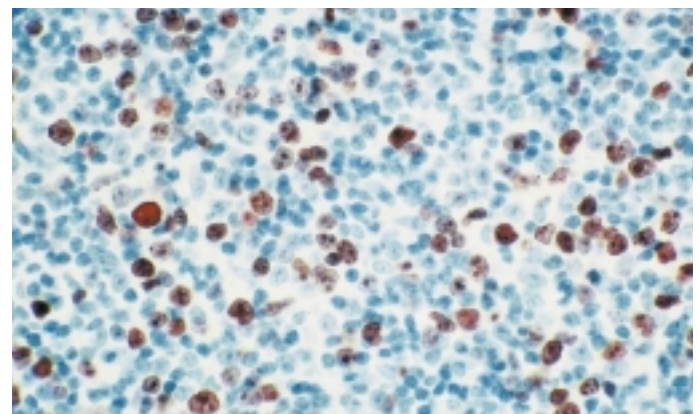
4. ábra. Nyirokcsomó, reaktív immunoblaszt- és T-sejt-prolifерáció, fixált-beágyazott metszet, CD20 (A) és CD3 (B) antigének immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilin magfestés, 250x



6. ábra. Granulomatózus makrofág-prolifерáció, fixált-beágyazott metszet, TNF-alfa immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilin magfestés, 250x



7. ábra. Kifejezett malignitású B-sejtes limfóma, fixált-beágyazott metszet, Ki-67 immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilin magfestés, 200x



lentősebb előnye magas érzékenységük mellett több antigén immunogén viselkedésének kihasználása.

- Az immunfestési eljárások (jel detektálása) történeti fejlődése jól ismert folyamat, ami az 1. táblázatban lett felsorolva (a teljesség igénye nélkül).
- Új metszet-előkezelések váltak ismertté, a korábban széles körben alkalmazott enzimes előemésztések (2, 13) átadják helyüket a fixált-beágyazott metszetekben egyre nagyobb számú antigén kimutathatóságát és az immunfestés érzékenységének növelését biztosító hővel történő előkezeléseknek (24).

2. Alkalmazás és értékelés:

- A klasszikus immunmorfológia különböző kórokozók (korábban baktériumok, majd vírusok) azonosítását szolgálta a rájuk jellemző antigének kimutatásával (3. ábra).
- Jelentős szerepe az immunmorfológiának az elsősorban a daganatos kórfolyamatokat alkotó sejtek/sejtpopulációk eredetének igazolása (4-5. ábra), reziduális tumorsejt-csoportok detektálása (pl. mikrometasztázisok), sejtek funkcionális állapotának (pl. aktivitás, 6. ábra) meghatározása (8, 17, 19, 20).

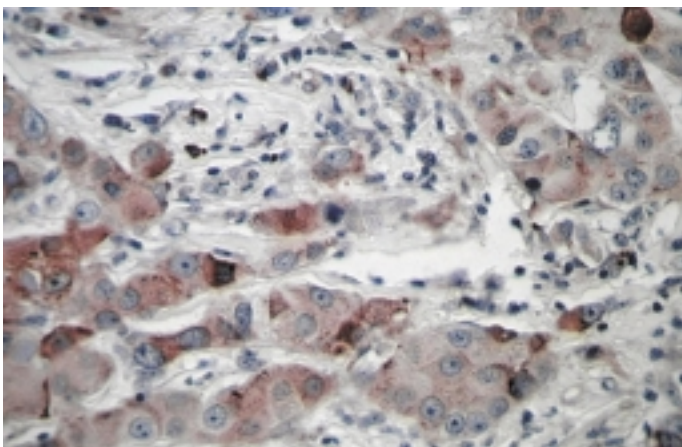
- A sejtciklus és a sejtproliferáció vizsgálata a Ki-67 antigén (7. ábra) kimutatásán alapul (5, 9). Ezen antigén funkciójának vizsgálati jelentős mértékben visszahatottak az immunhisztokémia módszertani megközelítésére, mint arra korábbi vizsgálataink is utalnak (3, 28, 30, 31, 33).
- Igen elterjedt a szteroidhormon-receptorok (8. ábra) immunmorfológiai kimutatása (1, 10, 32).
- További, immunmorfológiai vizsgálatok eredményeivel a rosszindulatú daganatos megbetegedések kórlefolysának megítélését segítő biológiai paraméterek: apoptózis (14), onkogének és anti-onkogének (4, 16), sejtadhézió és jelátvitel (4, 29), transzmembrán transzportfolyamatok (21) (9. ábra).

A legtöbb itt felsorolt alkalmazási terület igényli az egyszerű igen-nem (pozitív-negatív) jellegű értékelés helyett a részben mennyiségi meghatározást is (Ki-67 index, hormonreceptor-státus, stb.).

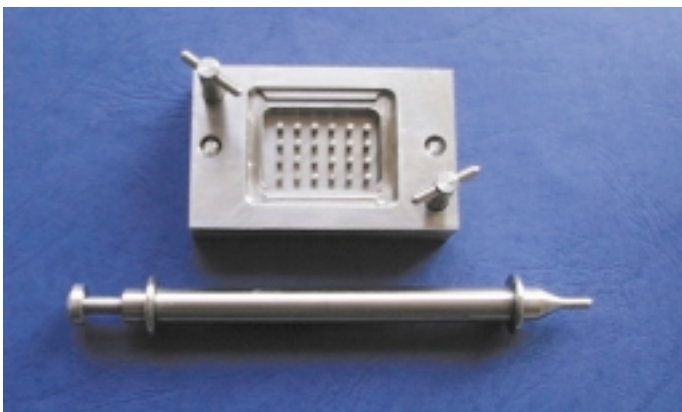
Szöveti mikrosorozatok használata

Ahogy a molekuláris biológiában a DNS-chip technológia a különböző gének komplex vizsgálatát teszi lehetővé (16), úgy az antigének kimuta-

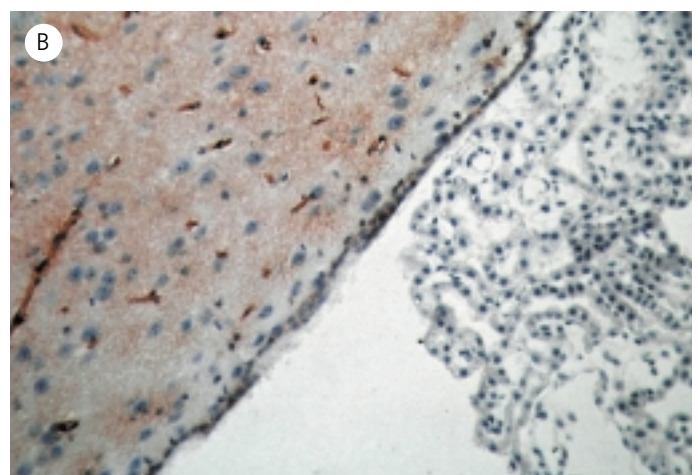
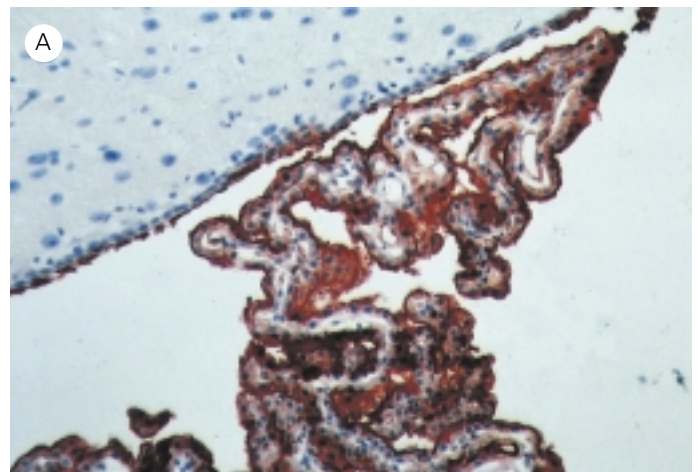
8. ábra. Emlőrák, fixált-beágyazott metszet, glukokortikoid-receptor (GCR) immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilín magfestés, 200x



10. ábra. Szöveti mikrosorozatok készítésére alkalmas laboratóriumi kéziműszerkészlet



9. ábra. Agy, fixált-beágyazott metszet, aquaporin 1 (AQP1, A) és 4 (AQP4, B) immunperoxidázos kimutatása. AEC kromogén, hematoxilín magfestés, 200x



tása a szöveti mikrosorozatok (Tissue Microarray, TMA, 10. ábra) bevezetésével kapott új leldületet (11, 25).

A dolgozat anyaga elhangzott a Biomedica Kft és a Hisztopatológia KFT által Visegrádon, 2002. október 24-25-én tartott Patológus Továbbképző Ülésen.

A dolgozatban ismertetett kutatás-fejlesztést az Oktatási Minisztérium OMFB-00555/2003 sz. tárcaszintű kutatási szerződése tette lehetővé.

Irodalom

- Al Saati T, Clamens S, Cohen-Knafo E, et al. Production of monoclonal antibodies to human estrogen-receptor protein (ER) using recombinant ER (RER). *Int J Cancer* 55:651-654, 1993
- Battifora H, Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *J Histochem Cytochem* 34:1095-1100, 1986
- Benfares J, Le Tourneau A, Audouin J, Szekeres G. Effect of ribonuclease A and deoxyribonuclease I on immunostaining of Ki-67 in cultured melanoma cells. *Pathol Oncol Res* 2:63-65, 1996
- Campbell RJ, Pignatelli M. Molecular histology in the study of solid tumours. *Mol Pathol* 55:80-82, 2002
- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-363, 1992
- Coons AH, Creech JH, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol* 47:200-202, 1941
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-complexes). *J Histochem Cytochem* 32:219-229, 1984
- DeLellis RA, Dayal Y. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of poorly differentiated malignant neoplasms. *Semin Oncol* 14:173-192, 1987
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715, 1984
- Hendricks JB, Stephen CA, Wilkinson EJ, Szekeres G. Estrogen receptor specific ER1D5 preservation in paraffin section. *J Histotechnol* 19:23-25, 1995
- Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 158:1245-1251, 2001
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am J Clin Pathol* 75:816-821, 1981
- Huang SN, Minassian H, More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest* 35:383-390, 1976
- Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade: morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)*. 200:1-18, 1999
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497, 1975
- Kopper L, Timár J. A génexpressziós profil a szolid tumorkok diagnosztikájában és prognosztikájában. *Magyar Onkológia* 46:3-9, 2002
- Mason DY, Gatter KC. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J Clin Pathol* 40:1042-1054, 1987
- Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labeling of cellular constituents. *J Clin Pathol* 31:454-460, 1978
- Merz H, Rickers O, Schrimel S, et al. Constant detection of surface and cytoplasmic immunoglobulin heavy and light chain expression in formalin-fixed and paraffin-embedded material. *J Pathol* 170:257-264, 1993
- Miettinen M. Immunohistochemistry in tumour diagnosis. *Ann Med* 25:221-233, 1993
- Nagy G, Szekeres G, Kvell K, et al. Development and characterisation of a monoclonal antibody family against aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 4 (AQP4). *Pathol Oncol Res* 8:115-124, 2002
- Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, et al. The EnVisionTM+ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. *J Clin Pathol* 51:506-511, 1998
- Sano T, Cantor CR. Expression of a cloned streptavidin gene in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci (Wash)* 87:142-146, 1990
- Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741-748, 1991
- Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens. *Appl Immunohistochem Molec Morphol* 10:1-6, 2002
- Sternberger LA, Hardy PA, Cuculis JJ, et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 18:315-333, 1970
- Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130, 1986
- Szekeres G, Audouin J, Le Tourneau A. Is immunolocalization of antigens in paraffin sections dependent on method of antigen retrieval? *Appl Immunohistochem* 2:137-140, 1994
- Szekeres G, Battyáni Z. A malignus melanoma immunodiagnosztikája. *Magyar Onkológia* 47:45-50, 2003
- Szekeres G, De Giacomoni P. Ki-67 and p53 expression in cutaneous Bowen's disease. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 74:95-97, 1994
- Szekeres G, Le Tourneau A, Benfares J, et al. Effect of ribonuclease A and deoxyribonuclease I on immunostaining of Ki-67 in fixed-embedded sections. *Pathol Res Pract* 191:52-56, 1995
- Szekeres G, Lutz Y, Le Tourneau A, Delaage M. Steroid hormone receptor immunostaining on paraffin sections with microwave heating and trypsin digestion. *J Histotechnol* 17:321-324, 1994
- Szekeres G. Detection of the Ki-67 antigen in fixed proliferating cells. *Anal Cell Pathol* 5:249-250, 1993
- Taylor CR, Burns J. Immunohistological detection of intracellular immunoglobulin containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase labelled antibody. *J Clin Pathol* 27:14-20, 1974