

Ярославский государственный медицинский университет



# **Иммуногистохимия**

*в изучении структуры  
клеток, тканей и органов*

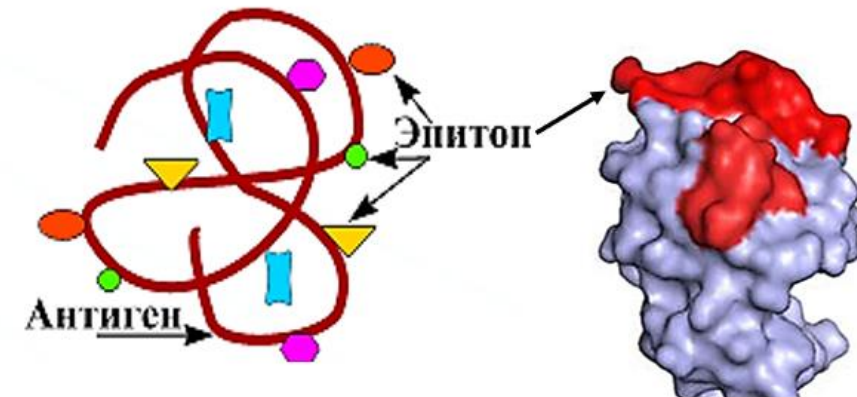
Профессор **А.В.ПАВЛОВ**



## ❖ Иммуногистохимия: принцип метода



- **Многоэтапный метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена - протеина), позволяющий определить местоположение антигенов (протеинов) в клетках тканей помощью иммунологических и гистохимических реакций**
  - **В основе любой иммунологической реакции лежит взаимодействие антигена с антителом, которое приводит к формированию комплекса «антиген - антитело»**
- 
- **Антигены** - корпускулярные частицы и молекулы, которое при попадании в организм вызывают иммунный ответ, в результате которого формируются специфические вещества - **антитела**
    - антигенами являются высокомолекулярные белки и полисахариды, реже - полипептиды, липиды и нуклеиновые кислоты
    - небольшой участок антигена, с которым будет связываться антитело, называется **эпитоп**
  - **Антитела** - иммуноглобулины, способные специфически связываться с только с тем антигеном, на который выработаны



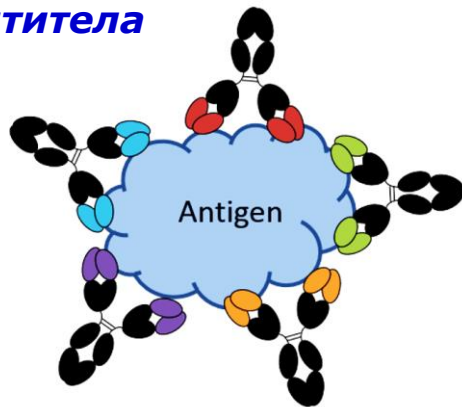


## ❖ Получение поликлональных антител

- Антитела, которые используются в иммунологических методиках, получают путем повторной иммунизации различных животных (мышей, кроликов, крыс, овец, лошадей и др.) определенным антигеном
  - После выработки антител у иммунизированного животного берут сыворотку крови и очищают ее от других сывороточных протеинов



### Поликлональные антитела



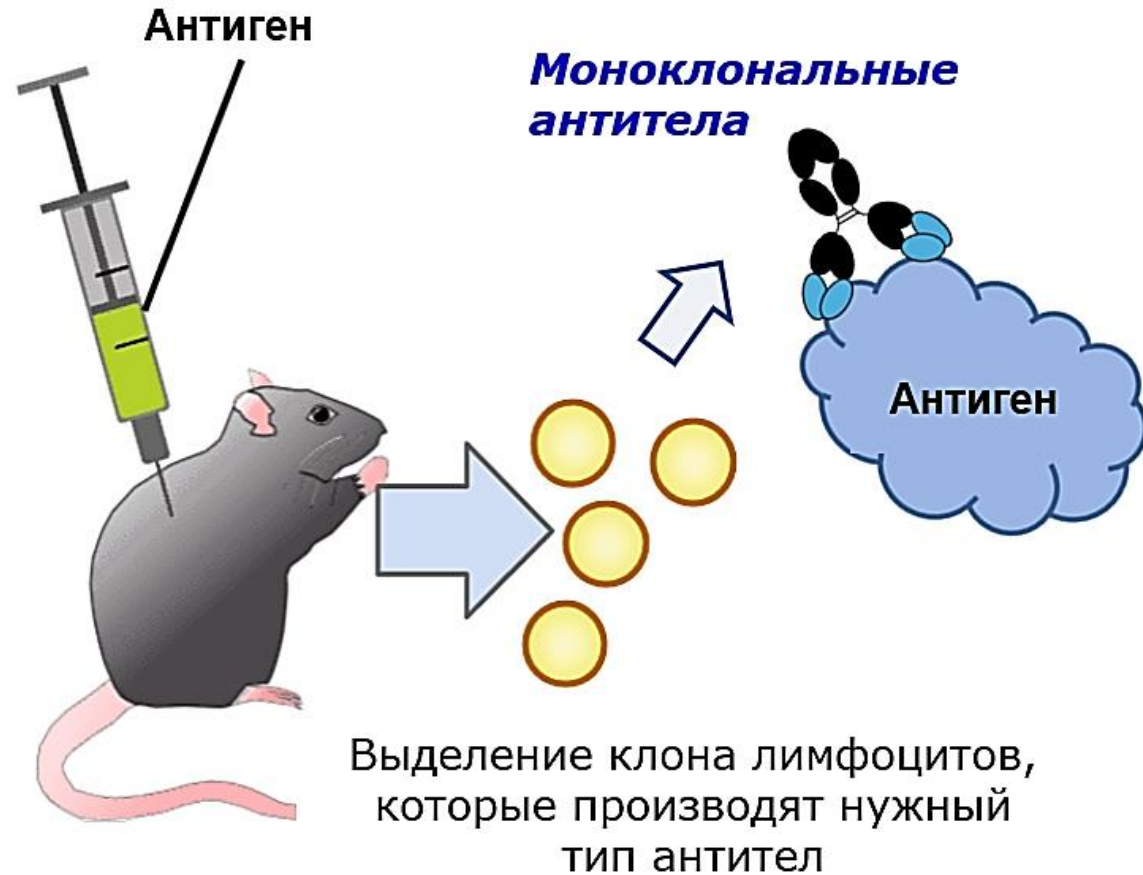
- Поскольку большие молекулы антигена могут иметь несколько эпитопов, они стимулируют несколько клонов В-лимфоцитов, которые синтезируют несколько видов антител (по количеству эпитопов)
- Получаемые антитела называют **поликлональными**: они образованы разными клонами В-лимфоцитов и являются смесью антител к различным эпитопам одного антигена



## ❖ Получение моноклональных антител

### ▪ Моноклональные антитела:

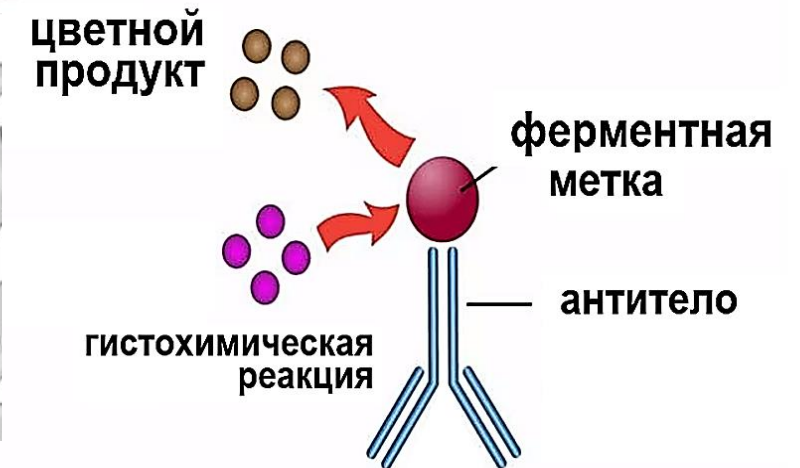
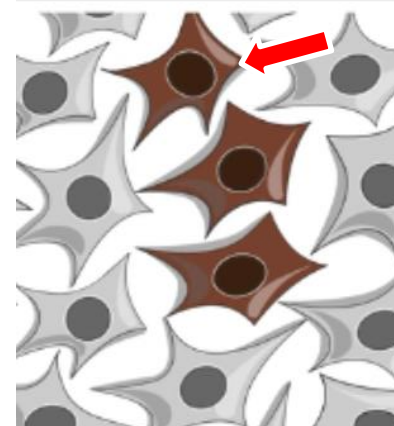
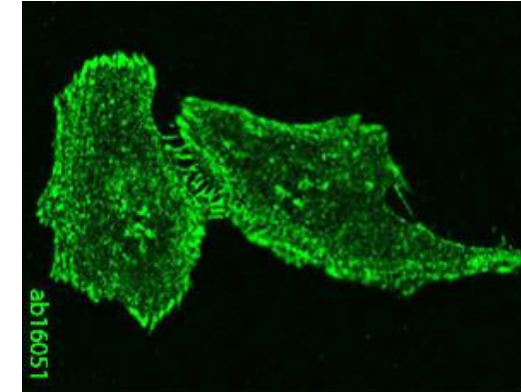
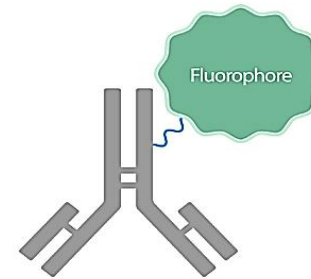
- продукт одного клона В-лимфоцитов (плазматических клеток)
- все антитела являются иммунологически идентичными и реагируют с **одним эпитопом** антигена, к которому они были получены
- обеспечивают высокую селективность выявления антигенов





## ❖ Визуализация комплекса «антиген-антитело»

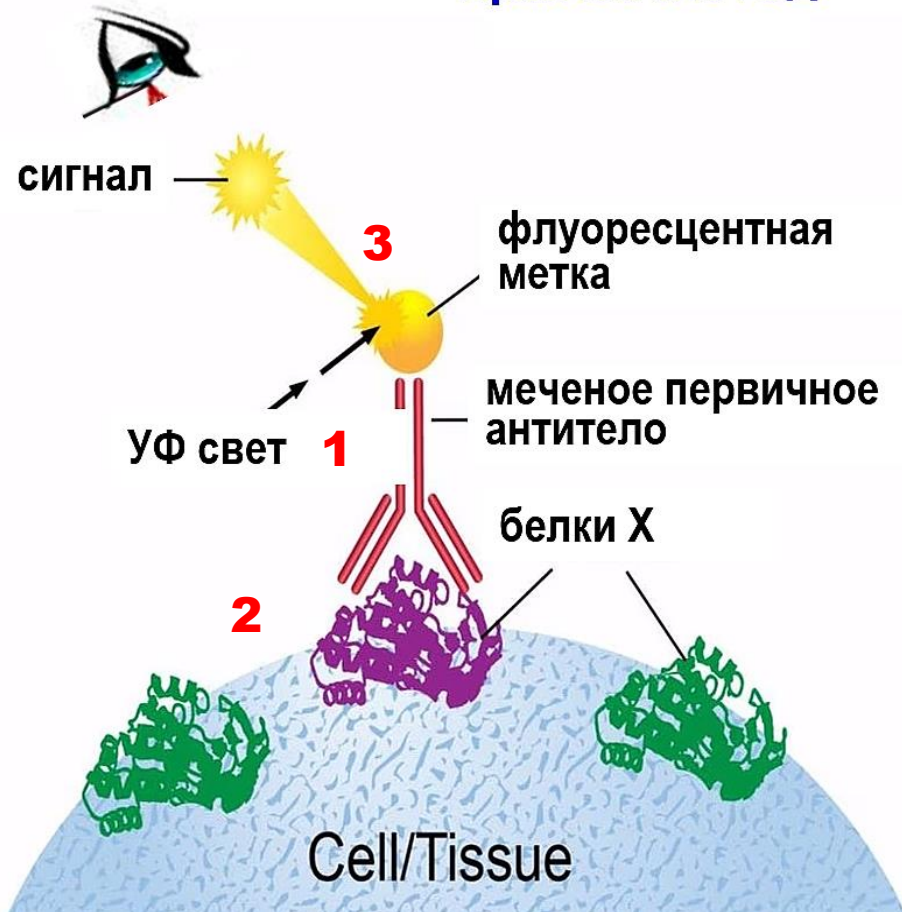
- Ключевым этапом любого иммуногистохимического метода является **визуализация результатов реакции «антиген-антитело»**
- Для маркировки антител, связавшихся с антигеном, используют различные метки:
  - флюорохромы (люминесцентная микроскопия)
  - ферменты (выявляются гистохимически с образованием цветного продукта)
  - металлы и металлопротеиды (электронная микроскопия)
  - радиоизотопы (авторадиография)
  - промежуточные связующие вещества (биотин, дигоксин, дигоксигенин)
- Наиболее часто используются **флуоресцентная и ферментная метки**



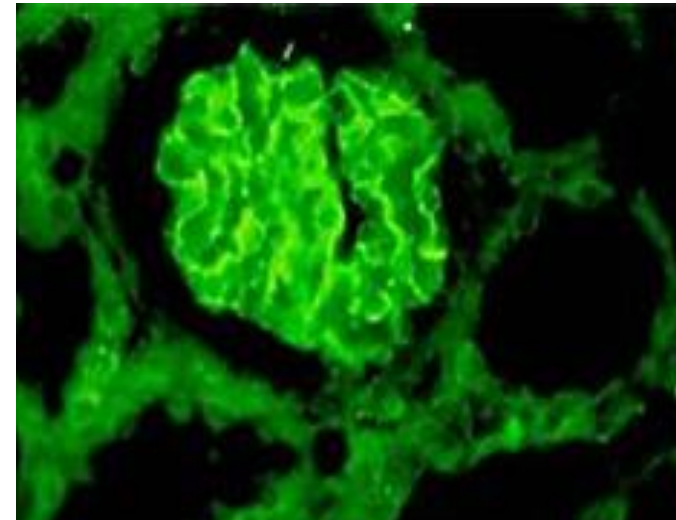


## ❖ Прямой иммуногистохимический метод: флуоресцентная метка

### ▪ Прямой метод



1. Срезы инкубируют в растворе, содержащем **меченые антитела** к **белку x** ;
2. Антитела, маркированные флуоресцентной меткой, связываются с **белком x** ;
3. Меченые структуры, содержащие **белок x**, визуализируются микроскопически (люминесцентная, лазерная конфокальная микроскопия, методы суперразрешения)

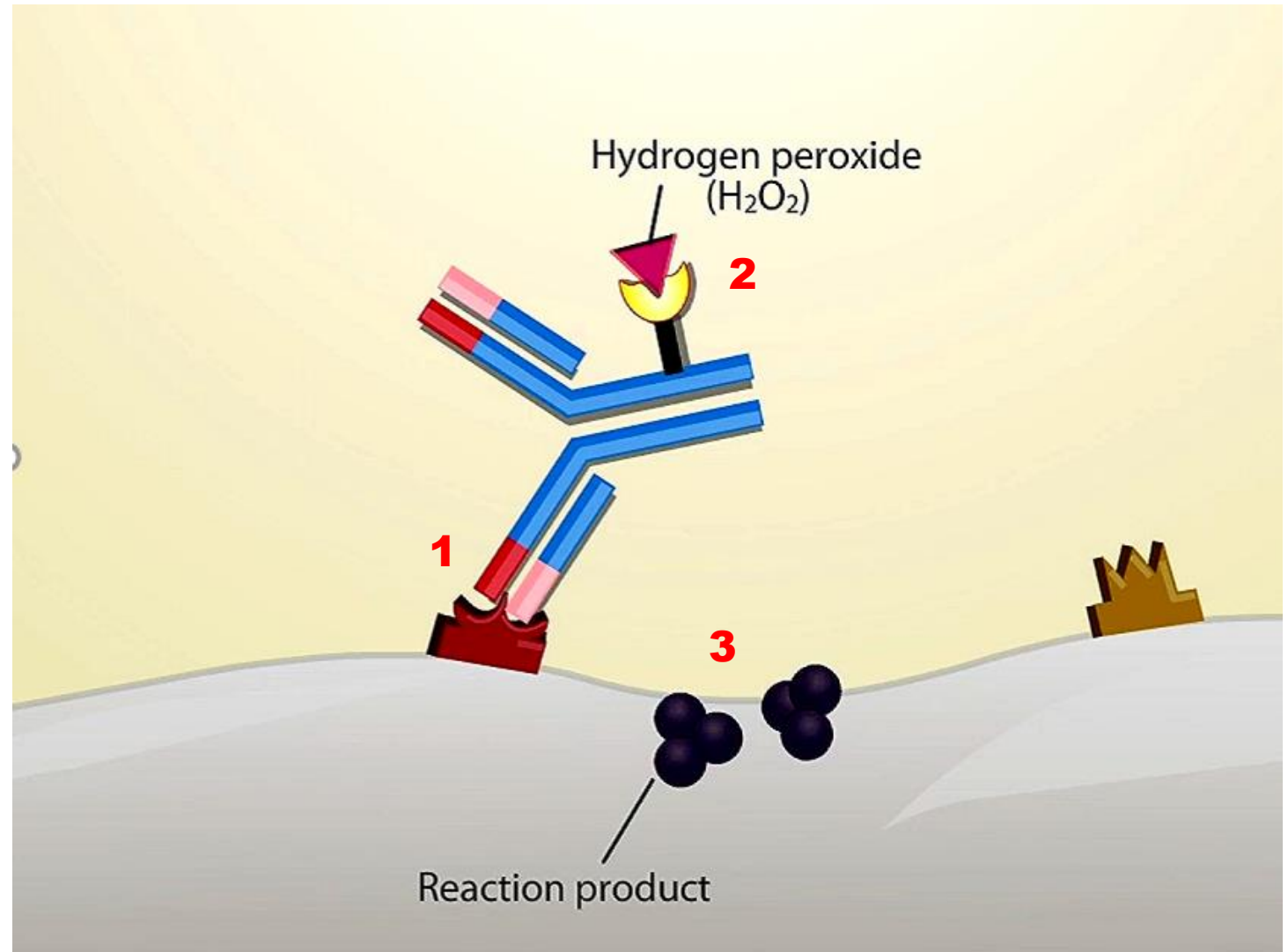


▪ Почечное тельце, подоциты



## ❖ Прямой иммуногистохимический метод: ферментная метка

1. Антитела, маркированные ферментной меткой (*пероксидаза, ЩФ*), связываются с **белком х**
2. Фермент выявляется гистохимически с образованием цветного продукта
3. Меченые структуры, содержащие **белок х**, визуализируются микроскопически (*светлое поле*)

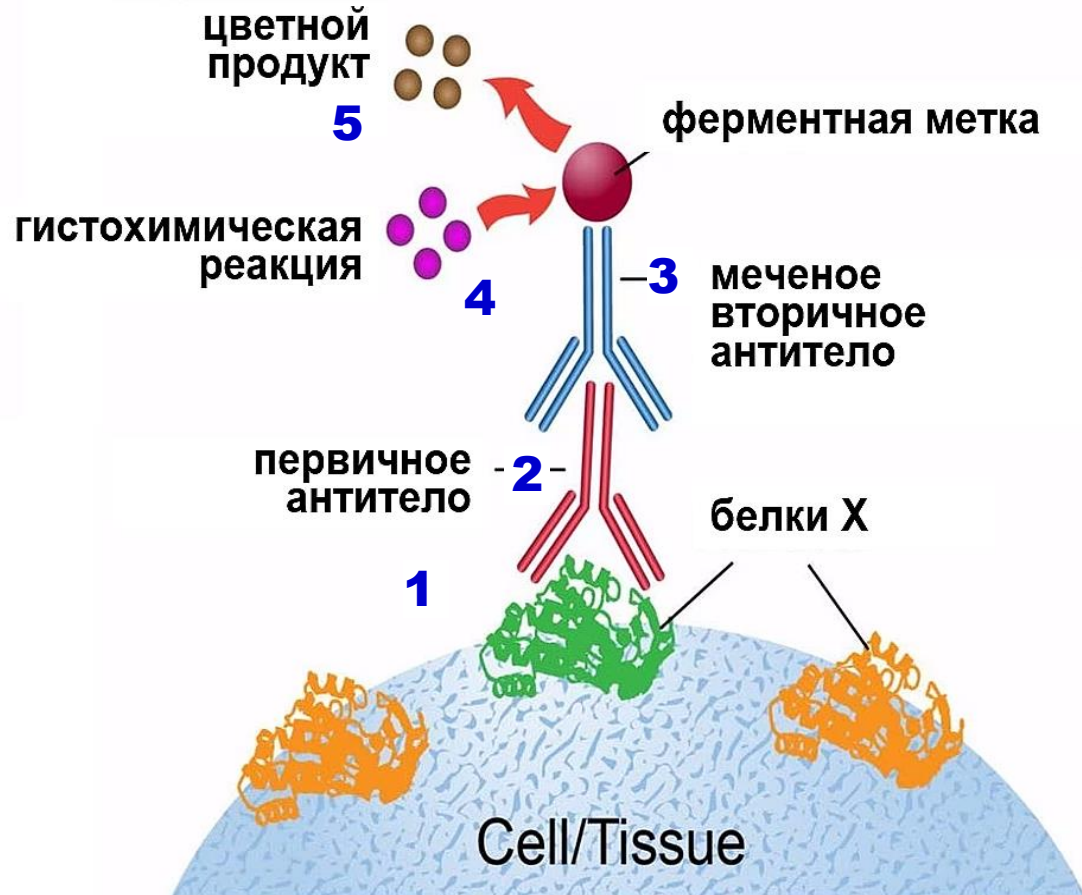




## ❖ Непрямой иммуногистохимический метод



- **Непрямой метод** обладает более высокой чувствительностью и воспроизводимостью



1. Срезы инкубируют в растворе, содержащем **немаркированные первичные антитела** к **белку x** ;
2. Первичные антитела связываются с **белком x** ;
3. Комплекс "белок x - первичные антитела" обрабатывают **мечеными вторичными антителами** к первичным антителам;
4. Связанные вторичные антитела выявляются гистохимически (ферментная метка) с образованием цветного продукта
5. Меченые структуры, содержащие **белок x**, визуализируются микроскопически



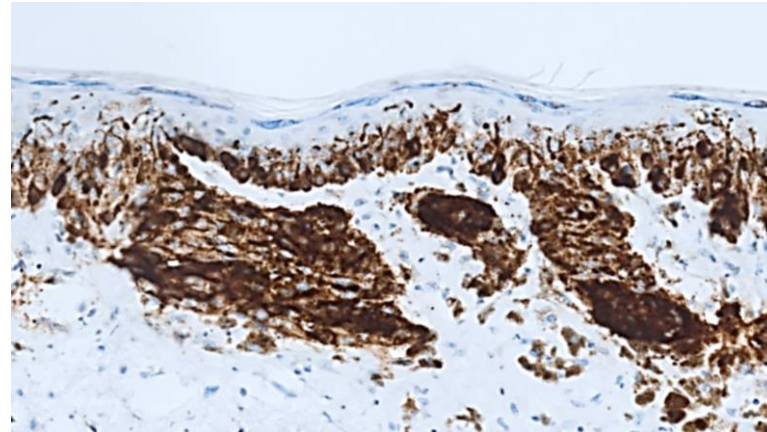


## ❖ Области применения иммуногистохимии

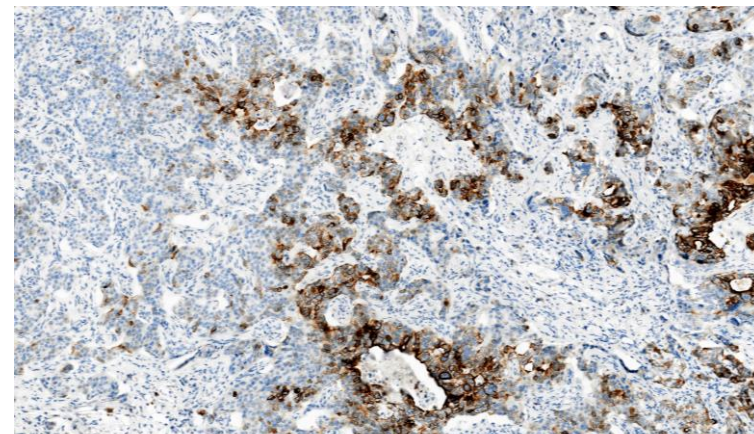
- **Методы ИГХ вносят существенный вклад в исследования в области клеточной биологии и совершенствование диагностики в медицине**

- **Диагностическое значение:**

- исследование опухолей человека с целью определения их гистогенеза
- определение источников развития недифференцированных опухолевых образований и отдаленных метастазов
- назначение эффективной терапии
- прогностическая оценка дальнейшего течения заболевания



HMB-45 в коже (меланома in situ)



Цитокератин 20 (СК20) в лимфатическом узле (метастаз колоректального рака)

Антигены	Диагноз
<b>Белки промежуточных филаментов</b>	
Цитокератины	Опухоли эпителиального происхождения
Глиальный фибриллярный кислый белок	Опухоли из некоторых глиальных клеток
Виментин	Опухоли соединительной ткани
Десмин	Опухоли мышечной ткани
<b>Другие белки</b>	
Белковые и полипептидные гормоны	Опухоли, продуцирующие белковые и полипептидные гормоны
Раково-эмбриональный антиген (РЭА)	Опухоли желез, преимущественно пищеварительного тракта и молочной железы
Рецепторы стероидных гормонов	Опухоли протоков молочной железы
Антигены, вырабатываемые вирусами	Специфические вирусные инфекции