ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

UDC: 577.27.083.3:616-008.9-092.18
https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(157).2025.48-57

Received: May 22, 2025
Accepted: August 17, 2025

Імуногістохімічне дослідження: теоретичне підгрунтя і практична реалізація

Наталія Невмержицька, Наталія Ритікова

Кафедра гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

Corresponding Author:
Nataliia Nevmerzhytska
E-mail: natalianmu@ukr.net

Анотація: *імуногістохімія (ІГХ) є сучасним і високоефективним методом дослідження тканин, що поєднує морфологічний аналіз із можливістю виявлення специфічних білкових молекул, що експресуються в клітинах. Цей метод ґрунтується на використанні антитіл, які специфічно зв'язуються з відповідними антигенами – білками, вуглеводами або іншими біомолекулами, присутніми в клітинах або тканинах. Основною метою ІГХ є не лише виявлення наявності певного білка, а й оцінка його локалізації (цитоплазматичної, ядерної чи мембранної), інтенсивності експресії та розподілу у тканинах. Імуногістохімія широко використовується в діагностиці пухлин, де дозволяє точно визначити гістогенез новоутворення, встановити його клініко-біологічний підтип, а також оцінити прогностичні та предиктивні маркери. Завдяки широкому спектру застосування, імуногістохімія є незамінним інструментом не лише в клінічній патології, а й у наукових дослідженнях. Вона дозволяє дослідникам вивчати механізми розвитку хвороб, зокрема онкогенез, їх прогресування, відповідь на лікування, а також виявляти нові терапевтичні мішені. Методика ІГХ включає декілька ключових етапів: фіксація та підготовка зразка, демаскування антигена, інкубація з первинним антитілом, застосування вторинного антитіла, пов'язаного з ферментом (зазвичай пероксидазою або фосфатазою), візуалізація за допомогою хромогенів (наприклад, DAB – діамінобензидин), а також контрастне фарбування (гематоксиліном). Для підвищення специфічності та чутливості використовують різні системи ампліфікації сигналу, наприклад полімерні системи або методи біотин-авідинного комплексу. Якість результатів ІГХ значною мірою залежить від правильності підбору антитіл, умов проведення реакції та контролю якості. Контроль включає позитивні та негативні зразки, а також інтерпретацію результатів з урахуванням інтенсивності фарбування, кількості позитивних клітин та локалізації сигналу. Оцінювання ІГХ-реакцій часто виконується вручну патологоанатомом, однак у сучасних лабораторіях все частіше застосовують автоматизовані системи та цифрову патологію для стандартизації та підвищення точності аналізу. Останні досягнення у сфері ІГХ включають мультиплексне фарбування, яке дозволяє одночасно виявляти кілька білкових мішеней у одному зразку, та поєднання з методами просторової транскриптоміки. Таким чином, імуногістохімія є потужним методом морфологічної візуалізації та молекулярної ідентифікації клітин, що дозволяє поєднати класичні гістологічні підходи з сучасними біомолекулярними технологіями. Її важливість у діагностиці, прогнозуванні, виборі терапії та фундаментальних дослідженнях зумовлює її незамінне місце в сучасній медицині та біології.*

Ключові слова: антиген, антитіло, імуногістохімія, епітоп, протокол дослідження.

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

Вступ

Імунохімія є цінним методом специфічного виявлення та просторового розподілу антигенів (зазвичай білків) у клітинах та тканинах [1-3]. Виявлення антигенів є «специфічним» так як воно обумовлено реакцією антиген-антитіло. Імуногістохімія (ІГХ) використовується у різних галузях медичної науки: від ідентифікації інфекційних агентів або характеристики пухлин в клінічній медицині до характеристики клітинних та молекулярних процесів у дослідницьких та експериментальних дослідженнях [4].

Мета

Опис загальновідомих теоретичних понять, пов'язаних з імуногістохімічним дослідженням. Характеристика протоколу імуногістохімічного дослідження (О.М.Грабовий), що проводиться на кафедрі гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця з поясненням особливостей та обгрунтованості кожного етапу.

Матеріали та методи

Виконаний аналіз 47 наукових статей (оглядових та експериментальних) щодо імуногістохімічного досдіження з баз даних Google Academy та PubMed.

Результати та обговорення

Виявлення антигену в гістологічному зрізі тканини – це імуногістохімія. Виявлення антигену в цитологічному препараті – це імуноцитохімія. Існує чотири поширені формати зразків для імунохімії: залиті в парафін, заморожені, вільно плаваючі та цитологічні [3]. Albert Hewett Coons, Hugh J Creech, Norman Jones та Ernst Berliner вперше, в 1941 році, зв'язали антитіло з імунофлюоресцентним барвником і використали його для того, щоб ідентифікувати антиген в тканині за допомогою флюоресцентного мікроскопу [5]. Вони використовували антитіла, мічені ізотіоціанатом флуоресцеїну для локалізації пневмококових антигенів в інфікованих тканинах [6]. З того часу, з удосконаленням та розвитком кон'югації білків, були введені ферментні мітки, такі як пероксидаза та лужна фосфатаза [7].

Реакція антиген – антитіло в імуногістохімії (ІГХ) зазвичай відбувається між двома білковими макромолекулами: **антигеном**, який також може бути глікопротеїном, ліпопротеїном або просто білком, і **антитілом**, яке є глікопротеїном. Якщо бути точнішим – в основі ІГХ лежить фундаментальна реакція антитіло-епітоп.

Антиген – речовина, що має ознаки генетичної відмінності і при введенні в організм викликає специфічну імунну відповідь (вікіпедія). Молекула антигена несе на собі детермінантну групу (епітоп), з якою зв'язується антитіло.

Епітоп (син. антигенна детермінанта) – це частина антигена, яка зв'язується з антитілом\ ділянка молекули антигену, яка розпізнається антигензв'язуючим центром антитіла [6]. Епітоп як правило складається з приблизно 5-6 амінокислот [4]. Всі епітопи поділяються на 2 групи: лінійні (10%) та конформаційні (90%) [6, 8]. Лінійні епітопи складаються з лінійнорозташованих амінокислот, а конформаційні епітопи утворюються в результаті згортання білка [4, 8]. Епітопи можуть бути специфічними для одного білка або декількох білків, наприклад, до гомологічних членів одного сімейства білків. Кожна взаємодія антитіло-епітоп має певні властивості афінності та авидності [4].

Афінність антитіла є кількісною мірою зв'язування антитіла з епітопом, тоді як **авидність** являє собою загальну силу зв'язування антитіла з урахуванням загальної кількості взаємодій антиген-антитіло і залежить від кількості сайтів зв'язування антиген-антитіло [4, 9]. Унікальність епітопу, доступність епітопу у зрізах тканини, на яку впливає метод фіксації тканини, а також афінність та авидність антитіла до епітопів – все це впливає на чутливість та специфічність антитіла в ІГХ-аналізі [4].

Антитіло – це великий білок Y-подібної форми, що належить до родини імуноглобулінів та використовується імунною системою для ідентифікації та нейтралізації чужорідних об'єктів [6, 10]. Частина антитіла, яка зв'язується з антигеном називається **паратоп** [6]. Антитіла складаються з 2х важких та 2х легких ланцюгів, що об'єднані в Y-подібний комплекс [10-12]. У цих ланцюжках мож-

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

на знайти 2 різні типи доменів: постійні або змінні. Варіабельні (змінні) домени відповідають за специфічність зв'язування антитіла з його мішенню [12].

В ІГХ використовують моноклональні та поліклональні антитіла. **Моноклональне антитіло** – антитіло, яке зв'язується з одним епітопом [4, 13]. **Поліклональне антитіло** – антитіло, яке зв'язує декілька епітопів [4].

Поліклональні антитіла отримують шляхом ін'єкції тваринам імуногену разом з ад'ювантом. Ад'юванти використовуються при імунізації тварин для посилення імунної відповіді у останніх [14]. Гідроксид алюмінію $Al(OH)_3$ часто є одним з кращих адьювантів, оскільки він має відносно мало побічних ефектів та ефективно активує вроджену імунну систему, та, зрештою, активує продукцію високих титрів антитіл [14-15]. Найбільш поширеною твариною-господарем для виробництва поліклональних антитіл є новозеландський білий кролик, але для великомасштабного виробництва можуть використовуватись більші тварини (наприклад, коза, вівця та кінь) [14]. Кролячі поліклональні антитіла мають високу афінність та авидність, хорошу імунну відповідь навіть на епітопи малого розміру. Антиген тваринам вводять внутрішньошкірно або підшкірно. Через місяць вводять тваринам імуноген повторно, щоб забезпечити високі титри антитіл [14]. Після імунізації та ревакцинації одержують поліклональні антитіла, що розпізнають різні епітопи антигену. При тривалій імунізації специфічні клони можуть стати домінантними, що підвищує специфічність антитіл [14, 16].

Моноклональні антитіла є продуктом індивідуального клону плазматичних клітин. Антитіла з даного клону є імунохімічно ідентичними та реагують зі специфічним епітопом на антигени, проти якого вони виробляються. Миші в даний час використовуються майже виключно для виробництва моноклональних антитіла [17]. Початкові етапи синтезу моноклональних та поліклональних антитіл аналогічні [14]. Імуноген вводять господареві разом з ад'ювантом, після чого проводять повторні імунізації для посилення імунної відповіді імунізованої тварини. Як описано вище, отримані антитіла є поліклональними, якщо ж є ціль отримання моноклональних антитіл, ізольовані В-клітини, отримані з селезінки чи лімфатичних вузлів імунізованої тварини з'єднують з клітинами мієломи [13]. Окремі клони, що продукують достатню кількість антитіл, ідентифікуються [14, 17] та дають можливість виробляти моноклональні антитіла у необмежених кількостях. Після успішного скринінгу і клонування отримують високоспецифічні моноклональні антитіла [4, 14, 18].

Моноклональні антитіла мають більш високу специфічність, тоді як поліклональні антитіла виявляють більш високу афінність завдяки множині епітопів. Поліклональні антитіла більш схильні до перехресних реакцій з іншими білками, що призводить до неспецифічного фонового фарбування [19]. Для тривалого використання в діагностичних тестах і навіть для наукових досліджень, кращим вибором є, все ж таки, моноклональні антитіла. Поліклональні антитіла можуть бути корисні для швидких досліджень з перевірки концепції [13]. Для науково обґрунтованої роботи чи клінічних діагностичних аналізів необхідні моноклональні антитіла. Однакне всі моноклональні антитіла, спрямовані на антиген, позбавлені проблем зі специфічністю та відтворюваністю, тому необхідно виявляти обережність при виборі кращого моноклонального антитіла, яке завжди має бути перевірено перед використанням [6, 13, 20].

Для використання в ІГХ аналізі антитіло має бути високочутливим і також високоспецифічним до цільового антигену. Найкращі антитіла мають високу афінність і низьку перехресну реактивність [13]. Пересічному вченому чи патологоанатому не завжди легко знайти хороше моноклональне антитіло, спрямоване на білок, який цікавить. Починати потрібно зі скринінгу всіх комерційних антитіл, доступних для цільової групи. З цієї причини можна використовувати веб-портали BenchSci та Antibodypedia [13, 22-23]. Ці портали надають інформацію про те, які антитіла були протестовані та використані іншими дослідниками. BenchSci є джерелом опублікованої літератури, в якій використовувалося дане

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

комерційне антитіло, а Antibodypedia надає «оцінку перевірки» для комерційних антитіл у контексті конкретних аналізів. Після того, як звузили варіанти до кількох, вибираємо одне антитіло, яке демонструє найкраще поєднання успішного використання в опублікованій літературі та доказів валідації для ІГХ аналізів [13].

Преаналітичні фактори. На результат імуногістохімічної реакції впливають такі преаналітичні фактори як, наприклад, холодова (час від моменту забору матеріалу до занурення його у фіксуючий розчин, має бути максимально коротким) ішемія [24], яка може призводити до зміни структури епітопів або індукції ферментативної деградації білків [4, 25]. Ці ефекти супроводжуються модифікаціями антигенів та їх епітопів [13, 26-27]. Фіксація тканин формаліном перед ІГХ забезпечує їх довготривалу стабільність шляхом хімічної модифікації біомолекул (утворюються поперечні метиленові зв'язки між сусідними білками, а також руйнуються водневі зв'язки), що запобігає їх подальшій деградації та зберігає морфологію тканин [1, 26-27, 29]. Слід однак відмітити, в результаті цієї модифікації подальший аналіз локалізації білка у фіксованих зразках часто ускладнений через зміну конфігурації білків, та, як результат останнього – маскування цільових епітопів [1, 28-29]. Фіксація в спиртах також змінює структуру білків та сприяє маскуванню епітопів [6]. Обробка тканин та заливання в парафін тканин, фіксованих формаліном, є наступним преаналітичним фактором, який може вплинути на антигени та доступність епітопів [28]. При обробці тканин воду видаляють градуйованими розчинами спирту до 100%, а потім спирт замінюють неполярними розчинниками (наприклад, ксилолом або замінником ксилолу), що дозволяє просочити тканини розплавленим парафіном (при температурі 55-70°С), для подальшого виконання гістологічних зрізів [6]. Під час обробки тканини для ІГХ перехід при підвищеній температурі з водного середовища в гідрофобне, а потім назад у водне, призводить до розгортання (рефолдингу) білків. На ці згортання впливають поперечні зв'язки, що виникають при фіксації формаліном [27, 30]. Це породжує досить складні та важко передбачувані сценарії взаємодії кількох преаналітичних факторів, які можуть заважати зв'язуванню антитіл з епітопами, що також називають маскуванням епітопів [6]. З цієї причини деякі антитіла, що виробляються до ізольованих антигенів, не розпізнають свої антигени в зрізах тканини [19, 27]. Тривале зберігання матеріалу в блоках, а також зберігання попередньо розрізаних зрізів тканини може призвести до появи ще однієї преаналітичної змінної, яка по-різному впливає на різні антигени та епітопи [27-28, 31]. Це може мати особливе значення для ретроспективного аналізу зразків пацієнтів для включення до клінічних досліджень при рецидиві захворювання або програм виявлення біомаркерів, у яких використовуються старі архівні тканини [27-28]. На чутливість та специфічність також впливає дизайн аналізу та метод вилучення\демаскування антигену [4, 25].

Протокол імуногістохімічного дослідження (ручний метод) (кафедра гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця, О.М.Грабовий)

1. Депарафінізація зрізів у ксилолі 2 порції (по 2 – 3 хвилини) та ізопропіловому спирті 2 порції (по 2 – 3 хвилини). Ксилол та ізопропіловий спирт видаляють надлишки парафіну з зрізів для полегшення активації антигену;

2. Демаскування (вилучення, активація, розкриття) антигену шляхом теплової обробки зрізів у цитратному буфері (pH=6,0) при 98°С протягом 20 хвилин.

Існує два основних підтипи демаскування антигену [32]:

I. Високотемпературне демаскування (HIER, Heat Induced Epitope Retrieval)

а) Томлення на водяній бані при 95˚С

б) Комплексна обробка під тиском та температурою вище 95˚С і до 120˚С

II. Ферментативне демаскування (PIER, Protease Induced Epitope Retrieval) [32]. Хімічне розщеплення альдегідних зшивок під впливом різних ферментів (трипсин, протеїназа К, проназа, фіцин і пепсин є ферментами, що найчастіше використовуються в PIER) [32]. Вибір способу демаскування залежить

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

від тривалості фіксації тканини, природи антигену та підбирається індивідуально у кожному конкретному випадку.

Вилучення\демаскування\активація антигену (antigen retrieval) – це процес, що застосовується для руйнування метиленових зв'язків\містків, що підвищує чутливість виявлення білків [29]. Спочатку (в 70х роках 20 століття) антигени демаскували протеолітичними ферментами, такими як проназа [27, 33]. Ферменти ініціювали розщеплення білка, це частково протидіяло поперечним зв'язкам, що виникали при фіксації формаліном [27]. Однак проблема з ферментативним пошуком антигену полягала в тому, що ферментативну активність необхідно добре контролювати, щоб запобігти несприятливому впливу на морфологію [6, 27]. Таким чином, великим проривом стало використання методу демаскування антигену, індукованого нагріванням, який дозволяє уникнути використання ферментів [27, 34]. Принцип методу полягає у додані до тканини енергії (зазвичай у вигляді тепла) у присутності розчину буферів, які денатурують білки, видаляють метиленові містки, утворені формаліном, та зменшують хімічні сили, які потенційно можуть заважати зв'язуванню антитіл з цільовим антигеном [6, 21, 27]. Існує два стандартні варіанти буферів: один на основі цитратного буфера, а інший – на буфері з високим pH, що містить ЕДТА [21]. В літературі також описані дослідження «незшиваючих» фіксаторів через їхню здатність зберігати морфологію та біомолекули краще, ніж формалін [35-36]. Прикладом нешвиваючих фіксаторів є PAXgene Tissue System [27].

3. Блокування ендогенної пероксидази (для попередження фонового фарбування) за допомогою обробки зрізів 3 % розчином перекису водню протягом 10 хвилин. Ендогенна пероксидаза присутня в тканинах і є причиною неспецифічного фонового фарбування [37]. Блокування пероксидази особливо важливе в тканинах з великою кількістю еритроцитів або численними мієлоїдними клітинами, таких як кістковий мозок і селезінка, а також в таких органах, як нирки, які особливо активно експресують ендогенну пероксидазу, яка потенційно може каталізувати не специфічні хромогенні реакції, керовані останньою [21].

4. Інкубація з первинними антитілами: на зрізи наносити, попередньо розведені антитіла та залишати у вологій камері (для попередження висихання антитіл, нанесених на зрізи) при кімнатній температурі на 60 хвилин. Антитіла наносити дозатором. Перед нанесенням первинних антитіл зріз обводять спеціальним гідрофобним олівцем для попередження витікання рідини за межі зрізу. Первинне антитіло слід титрувати до відповідної концентрації, яка зберігає специфічність забарвлення, видаляючи при цьому будь-який фоновий сигнал або неспецифічне фарбування тканини [6]. Антитіла, які використовуються в дуже високих концентраціях можуть призвести до нецільового фарбування [6]. Хоча часто використовується визначення відношення сигнал/шум «на око», для об'єктивності це слід робити кількісно. Використання антитіл в оптимальній концентрації призводить до підвищення точності та відтворюваності [21]. Для оптимізації результатів ІГХ дослідження бажано збільшити співвідношення сигнал/шум [21]. Цього можна досягти декількома способами, наприклад, за рахунок збільшення часу інкубації антитіл, що може дозволити знизити концентрацію первинних антитіл при збереженні специфічності фарбування. Якщо сигнал занадто слабкий або аналіз недостатньо чутливий, збільшення часу виявлення антигену може виявитися корисним, хоча необхідно бути обережним, щоб уникнути неспецифічного фарбування [21, 38].

5. Інкубація з вторинними антитілами: на зрізи наносити вторинні антитіла та залишати у вологій камері при кімнатній температурі на 10 хвилин. Бажано обирати вторинні антитіла, вироблені до імуноглобулінів того виду тварин, з якого було отримано первинні антитіла [38].

6. Інкубація зрізів з хромогеном до появи чіткої кольорової реакції для візуалізації реакції антиген-антитіло (на кафедрі гістології та ембріології використовують розчин діамінобензидину (DAB)). Для ІГХ можуть вико-

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

ристовуватися різні хромогени: аміноетилкарбазол (АЕК) [39] і 3,3'-діамінобензидин (DAB) [40], які перетворюються на червоні і коричневі водонерозчинні кінцеві продукти відповідно під дією ферменту пероксидази хрону (HRP) для світлового мікроскопічного аналізу білків [21, 39, 41]. 3,3'-діамінобензидин явно є більш чутливим хромогеном, ніж АЕК, для пероксидазно-залежного ІГХ-продукування водонерозчинного забарвленого продукту реакції [39]. Ще однією перевагою DAB є те, що фарбування є постійним, тоді як фарбування АЕС з часом зникає [39]. Останнім часом спостерігається сплеск нових хромогенів, які є субстратами або HRP, або лужної фосфатази, ферментів, які зазвичай використовуються в системах виявлення. До цих кольорів відносяться фіолетовий, червоний, бірюзовий, жовтий, зелений, синій та сріблястий [21]. Хоча більшість хромогенних ІГХ досліджень, як правило, мають одиночне забарвлення, на одному предметному склі можна проводити кілька хромогенних ІГХ з різними хромогенами [21].

7. Дофарбування зрізів розчином гематоксиліну Gill для фарбування ядер. Зрізи поміщають у ємність з гематоксиліном Gill, рішення щодо тривалості експозиції приймають в кожному випадку індивідуально залежно від очікуваних результатів.

8. Зневоднення, просвітлення, та заключення зрізів у бальзам Histofluid (Marienfeld, Німеччина).Зневоднення проводять для того, щоб видалити зайву вологу з зрізів та виконують його за допомогою спиртів або діоксану [38]. Просвітлення препаратів необхідно для того, щоб препарати були прозорими. Для просвітлення можуть використовуватись водорозчинні (гліцерин, гліцерин-желатина, суміш Апаті) або водонерозчинні речовини (ксилол, толуол). Суттєвим недоліком водорозчинних середовищ є важкість або неможливість довготривалого (впродовж багатьох місяців і років) збереження препаратів. Тому на сьогоднішній день водорозчинні середовища використовують набагато рідше, ніж водонерозчинні [38]. Заключення зрізів у бальзам необхідно для довготривалого зберігання зрізів.

9. Інтерпретація результатів. Для правильної інтерпретації результатів дослідження і щоб переконатися, що всі етапи імуногістохімічного протоколу фарбування були виконані правильно необхідно враховувати безліч можливих основних причин неспецифічного маркування [4, 6, 42]. Це створює внутрішню проблему ІГХ дослідження: а саме, часто неможливо остаточно довести, що антитіло зв'язується тільки з білком, що цікавить, а не з нецільовими речовинами в зрізах тканини [6]. Для вирішення цієї проблеми використовується наукова література, валідаційні дослідження та засоби контролю [6, 34] для отримання сукупності доказів, що підтверджують чи спростовують специфічність ІГХ маркування [4].

Слід відмітити, що перед проведення кожного етапу імуногістохімічного дослідження потрібно ретельне (дворазове) промивання зрізів в натрій-фосфатному промивному буфері «Wash PBS» (Dako) по 2 хвилини, та видалення зайвої вологи фільтрувальним папером. Це потрібно для підтримування оптимального рівня зволоження зрізів на протязі всієї процедури ІГХ дослідження, так як пересушування зрізів може їх пошкодити. Також проміжні етапи промивання видаляють сліди реагентів попередніх інкубацій. У класичній методиці застосовуються промивні фосфатно-сольові (PBS) та трис-буфери (TBS). Додавання адитиву Твін 20 (Tween 20) в буферні розчини підвищує властивості буферів, що промивають, збільшуючи змочуваність поверхні предметного скла та зразка, що забезпечує зниження фонового забарвлення та в сумі підвищує якість реакції.

Традиційна імуногістохімія (ІГХ) зазвичай використовується як діагностичний метод у клінічній медицині, але, не дивлячись на значні досягнення в оптимізації ІГХ протоколів, має певні обмеження. Найбільш важливим із них є те, що цей метод дозволяє маркувати лише один маркер на зріз тканини [41]. Це призводить до втрачених можливостей отримати важливу прогностичну та діагностичну інформацію із зразків пацієнтів. Технології мультиплексної імуногістохімії/ імунофлуоресценції дозволяють одночас-

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

но виявляти кілька маркерів на одному зрізі тканини, були впроваджені та прийняті як у дослідницьких, так і в клінічних умовах у відповідь на зростання попиту на покращені методів діагностики [21, 41, 43]. В даний час існують ряд технологій мультиплексної візуалізації тканин, які дозволяють проводити комплексні дослідження клітинного складу [44-46]. Ці нові методи візуалізації засновані на циклічній імунофлуоресценції, мультиплексної імуногістохімії/імунофлуоресценції на основі тираміду [47], мас-спектрометрії, спрямованої на епітоп або виявленні РНК [41]. Такі методи забезпечують всебічне уявлення про розподіл маркерів та склад тканин та здатні вирішити основні питання, пов'язані з патогенезом різних складних захворювань [43]. Можливість маркувати кілька маркерів одному зрізі має особливе значення щодо зразків, узятих від рідкісних донорів, де тканини можуть бути малодоступними [41, 43].

Висновки. Незважаючи на високу інформативність імуногістохімічного дослідження існує багато «перепон» на кожному етапі проведення ІГХ протоколу до отримання якісного та інформативного імуногістохімічного препарату, який чітко дасть відповідь на конкретне наукове чи клінічне запитання. Це і вибір оптимального антитіла на етапі планування наукової роботи, і утворення метиленових містків та/або вплив інших вищеперерахованих преаналітичних факторів на етапі фіксації, і особливості проведення етапу демаскування антигену та блокування ендогенної пероксидази, і раціональне розведення первинних антитіл та вибір оптимального часу інкубації з останніми, і обдуманий вибір вторинного антитіла та, звісно, кваліфікована інтерпретація отриманих результатів. Безперечною умовою отримання якісного результату імуногістохімічного дослідження є чітке дотримання етапів, техніки та експозиції описаного протоколу.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним на нашу думку є вдосконалення протоколів застосування та використання мультиплексної та флюоресцентної імуногістохімії для потреб теоретичної та клінічної медицини, підготовка висококваліфікованих кадрів для технічного виконання та професійної інтепретації отриманих результатів.

Фінансування

Дане дослідження не отримало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Відсутній.

Згода пацієнта

Від пацієнтки було отримано письмову інформовану згоду на публікацію цього звіту про випадок і супровідних зображень.

Внески авторів

(A, B, D) Nataliia Rytikova 0000-0002-5378-2267 (C, E, F) Nataliia Nevmerzhytska

A – Research concept and design, B – Collection and/or assembly of data, C – Data analysis and interpretation, D – Writing the article, E – Critical revision of the article, F– Final approval of article.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dunkenberger L., Del Valle L. (2022). Antigen retrieval and signal amplification. Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Methods and Protocols, 65-74.

2. Hira VVV, de Jong AL, Ferro K, Khurshed M, Molenaar RJ, Van Noorden CJF. [Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry]. Acta Histochem. 2019;121(2):125-134. doi:10.1016/j.acthis.2018.10.011

3. Renshaw S. [Immunohistochemistry and immunocytochemistry]. Immunohistochemistry and immunocytochemistry: essential methods. 2017; 35-102.

4. Webster JD., Solon M, Gibson-Corley KN. Validating Immunohistochemistry Assay Specificity in Investigative Studies: Considerations for a Weight of Evidence Approach. Veterinary pathology, 2021; 58(5), 829–840. https://doi.org/10.1177/0300985820960132

5. Polak JM, Van Noorden S, Polak DJ, Van Noorden S. [Introduction to immunocytochemistry]. Taylor & Francis. Garland Science. 2023;192 ISBN1003423825, 9781003423829

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

6. Cartun RW, Taylor CR, Dabbs DJ. [Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. Diagnostic Immunohistochemistry E-Book: Theranostic and Genomic Applications], 1, 2021.

7. Del Valle L, author; Del Valle L editor. [Immunohistochemistry and Immunocytochemistry]. [Internet]. Methods in Molecular Biology. Springer US; 2022. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3

8. Collatz M, Mock F, Barth E, Hölzer M, Sachse K, Marz M. [EpiDope: a deep neural network for linear B-cell epitope prediction]. Bioinformatics. 2021;37(4):448-455. doi:10.1093/bioinformatics/btaa773

9. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. [Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR J. 2005;46(3):258-268. doi:10.1093/ilar.46.3.258

10. Zahavi D, Weiner L. [Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy]. Antibodies (Basel). 2020;9(3):34. Published 2020 Jul 20. doi:10.3390/antib9030034

11. Ruffolo JA, Sulam J, Gray JJ. [Antibody structure prediction using interpretable deep learning. Patterns (N Y)]. 2021;3(2):100406. Published 2021 Dec 9. doi:10.1016/j.patter.2021.100406

12. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. J Pharm Sci. 2020;109(1):169-190. doi:10.1016/j.xphs.2019.08.009

13. MacNeil T, Vathiotis IA, Martinez-Morilla S, et al. Antibody validation for protein expression on tissue slides: a protocol for immunohistochemistry. Biotechniques. 2020;69(6):460-468. doi:10.2144/btn-2020-0095

14. Trier N, Hansen P, Houen G. Peptides, Antibodies, Peptide Antibodies and More. Int J Mol Sci. 2019;20(24):6289. Published 2019 Dec 13. doi:10.3390/ijms20246289

15. Trier NH, Güven E, Skogstrand K, Ciplys E, Slibinskas R, Houen G. Comparison of immunological adjuvants. APMIS. 2019;127(9):635-641. doi:10.1111/apm.12976

16. Islam T, Naik AD, Hashimoto Y, Menegatti S, Carbonell RG. [Optimization of Sequence, Display, and Mode of Operation of IgG-Binding Peptide Ligands to Develop Robust, High-Capacity Affinity Adsorbents That Afford High IgG Product Quality]. Int J Mol Sci. 2019;20(1):161. Published 2019 Jan 4. doi:10.3390/ijms20010161

17. Boenisch T. [Handbook on Immunohistochemical Staining Methods], 3rd ed. DAKO Corporation, Carpinteria, 2001, 67.

18. Valdarnini N, Holm B, Hansen P, Rovero P, Houen G, Trier N. [Fine Mapping of Glutamate Decarboxylase 65 Epitopes Reveals Dependency on Hydrophobic Amino Acids for Specific Interactions]. Int J Mol Sci. 2019;20(12):2909. Published 2019 Jun 14. doi:10.3390/ijms20122909

19. Libard S, Cerjan D, Alafuzoff I. [Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry]. Histochem Cell Biol. 2019;151(1):91-96. doi:10.1007/s00418-018-1742-1

20. Bradbury ARM, Trinklein ND, Thie H, et al. [When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions]. MAbs. 2018;10(4):539-546. doi:10.1080/19420862.2018.1445456

21. Taube JM, Akturk G, Angelo M, et al. [The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation [published correction appears in J Immunother Cancer]. 2020 Jun;8(1):e000155corr1. doi: 10.1136/jitc-2019-000155corr1]. J Immunother Cancer. 2020;8(1):e000155. doi:10.1136/jitc-2019-000155

22. Antibodypedia. https://www.antibodypedia.com

23. BenchSci. https://www.benchsci.com

24. Khoury T. [Delay to Formalin Fixation (Cold Ischemia Time) Effect on Breast Cancer Molecules]. Am J Clin Pathol. 2018;149(4):275-292. doi:10.1093/ajcp/aqx164

25. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, et al. [Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine]. Arch Pathol Lab Med. 2019;143(11):1346-1363. doi:10.5858/arpa.2019-0009-SA

26. Guerin CJ. [Using Antibodies in Microscopy: A Guide to Immunohistochemistry. Part 3: Post-Embedding Electron Microscopy Techniques]. Microscopy Today. 2023; 31(4), 53-55. https://doi.org/10.1093/mictod/qaad050

27. Stumptner C, Pabst D, Loibner M, Viertler C, Zatloukal K. The impact of crosslinking and non-crosslinking fixatives on antigen retrieval and immunohistochemistry. N Biotechnol. 2019;52:69-83. doi:10.1016/j.nbt.2019.05.003

28. Muniz Partida C, Walters E. A novel immunohistochemical protocol for paraffin embedded tissue sections using free-floating techniques. Front Neuroanat. 2023;17:1154568. Published 2023 May 10. doi:10.3389/fnana.2023.1154568

29. Denti V, Piga I, Guarnerio S, et al. Antigen retrieval and its effect on the MALDI-MSI of lipids in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2020; 31(8), 1619-1624.

30. Scalia CR, Boi G, Bolognesi MM, et al. Antigen Masking During Fixation and Embedding, Dissected. J Histochem Cytochem. 2017;65(1):5-20. doi:10.1369/0022155416673995

31. Ehinger A, Bendahl PO, Rydén L, Fernö M, Alkner S. Stability of oestrogen and progesterone receptor antigenicity in formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissue over time. APMIS. 2018;126(9):746-754. doi:10.1111/apm.12884

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

32. Torga T, Suutre S, Kisand K, et al. Comparison of Antigen Retrieval Methods for Immunohistochemical Analysis of Cartilage Matrix Glycoproteins Using Cartilage Intermediate Layer Protein 2 (CILP-2) as an Example. Methods and Protocols, 2024; 7(5), 67.

33. Denk H, Radaszkiewicz T, Weirich E. Pronase pretreatment of tissue sections enhances sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) technique. J Immunol Methods. 1977;15(2):163-167. doi:10.1016/0022-1759(77)90027-8

34. Shidham VB, Layfield LJ. Cell-blocks and immunohistochemistry. Cytojournal. 2021;18:2. Published 2021 Jan 30. doi:10.25259/Cytojournal_83_2020

35. Högnäs G, Kivinummi K, Kallio HML, et al. Feasibility of Prostate PAXgene Fixation for Molecular Research and Diagnostic Surgical Pathology: Comparison of Matched Fresh Frozen, FFPE, and PFPE Tissues. Am J Surg Pathol. 2018;42(1):103-115. doi:10.1097/PAS.0000000000000961

36. Urban C, Buck A, Siveke JT, et al. PAXgene fixation enables comprehensive metabolomic and proteomic analyses of tissue specimens by MALDI MSI. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2018;1862(1):51-60. doi:10.1016/j.bbagen.2017.10.005

37. Міщенко ІВ. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів під час підготовки до практичного заняття та на занятті. Полтава 2020. 11.

38. Варенюк ІМ, Дзержинський МЕ. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. Київ: Інтерсервіс, 2019, 256.

39. Hira VVV, Wormer JR, Kakar H, et al. Periarteriolar Glioblastoma Stem Cell Niches Express Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche Proteins. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2018;66(3):155-173. doi:10.1369/0022155417749174

40. Breznik B, Limbaeck Stokin C, Kos J, et al. Cysteine cathepsins B, X and K expression in peri-arteriolar glioblastoma stem cell niches. J Mol Histol. 2018;49(5):481-497. doi:10.1007/s10735-018-9787-y

41. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. Cancer Commun (Lond). 2020;40(4):135-153. doi:10.1002/cac2.12023

42. Miller RT. Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry—important technical aspects that every pathologist should know. Semin Diagn Pathol. 2019;36(5):312–335.

43. Harms PW, Frankel TL, Moutafi M, et al. Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. Mod Pathol. 2023;36(7):100197. doi:10.1016/j.modpat.2023.100197

44. Mejías-Badillo L, Jeanty J, Khalid K, Bhalla A, Salem N, Thomas S, et al. Dual-color immunocytochemistry (Ki-67 with LCA) for precise grading of pancreatic neuroendocrine tumors with applicability to small biopsies and cell-blocks. Cytojournal. 2020;17:6. doi: 10.25259/Cytojournal_92_2019

45. Boisson A, Noël G, Saiselet M, et al. Fluorescent Multiplex Immunohistochemistry Coupled With Other State-Of-The-Art Techniques to Systematically Characterize the Tumor Immune Microenvironment. Front Mol Biosci. 2021;8:673042. Published 2021 Sep 21. doi:10.3389/fmolb.2021.673042

46. Akturk G, Sweeney R, Remark R, Merad M, Gnjatic S. Multiplexed Immunohistochemical Consecutive Staining on Single Slide (MICSSS): Multiplexed Chromogenic IHC Assay for High-Dimensional Tissue Analysis. Methods Mol Biol. 2020;2055:497-519. doi:10.1007/978-1-4939-9773-2_23

47. Yeong J, Lim JCT, Lee B, et al. High Densities of Tumor-Associated Plasma Cells Predict Improved Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. Front Immunol. 2018;9:1209. Published 2018 May 30. doi:10.3389/fimmu.2018.01209

Immunohistochemical Study: theoretical background and practical implementation

Nataliia Nevmerzhytska, Nataliia Rytikova

Associate professor, Histology and Embriology Department, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Corresponding Author:

Nataliia Nevmerzhytska

E-mail: natalianmu@ukr.net

Abstract: *Immunohistochemistry (IHC) is a modern and highly effective method of tissue analysis that combines morphological examination with the ability to detect specific protein*

ISSN 2786-6661
eISSN 2786-667X

molecules expressed in cells. This technique is based on the use of antibodies that specifically bind to corresponding antigens—proteins, carbohydrates, or other biomolecules—present in cells or tissues. The main objective of IHC is not only to detect the presence of a specific protein but also to assess its localization (cytoplasmic, nuclear, or membranous), the intensity of expression, and its distribution within tissues. Immunohistochemistry is widely used in tumor diagnostics, where it enables precise identification of the histogenesis of neoplasms, determination of their clinico-biological subtypes, and evaluation of prognostic and predictive markers. Due to its broad range of applications, IHC is an indispensable tool not only in clinical pathology but also in scientific research. It allows researchers to study disease development mechanisms, particularly oncogenesis, disease progression, response to treatment, and to identify new therapeutic targets. The IHC protocol involves several key steps: fixation and preparation of the tissue sample, antigen retrieval, incubation with the primary antibody, application of a secondary antibody conjugated with an enzyme (typically peroxidase or phosphatase), visualization using chromogens (e.g., DAB—diaminobenzidine), and counterstaining (usually with hematoxylin). To enhance specificity and sensitivity, various signal amplification systems are employed, such as polymer-based systems or biotin-avidin complex methods. The quality of IHC results strongly depends on the correct selection of antibodies, proper reaction conditions, and quality control. Control procedures include the use of positive and negative samples, as well as careful interpretation of results considering staining intensity, the proportion of positive cells, and signal localization. While IHC staining evaluation is often performed manually by a pathologist, modern laboratories increasingly rely on automated systems and digital pathology to standardize and improve the accuracy of analysis. Recent advances in the field of IHC include multiplex staining, which allows simultaneous detection of multiple protein targets within a single sample, and integration with spatial transcriptomics techniques. Thus, immunohistochemistry is a powerful method for morphological visualization and molecular identification of cells, enabling the integration of classical histological approaches with modern biomolecular technologies. Its importance in diagnostics, prognostication, therapeutic decision-making, and fundamental research ensures its indispensable role in contemporary medicine and biology.

Keywords: Antigen, Antibodies, Immunohistochemistry, Epitope, Research Protocol.

Copyright: © 2025 by the authors; licensee USMYJ, Kyiv, Ukraine. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).