

UDC: 616-072.5:577.27:004.932

<https://doi.org/10.32345/SUPPLEMENT.2.2025.307-313>

Received: May 13, 2025

Accepted: June 11, 2025

Об'єктивізація оцінки імуногістохімічних реакцій

Грабовий Олександр, Наталія Ритікова

Національний медичний університет імені О.О.Богомольца, Київ, Україна

Corresponding Author:

Olexandr Grabovyi

angrabovoy@gmail.com

Анотація: імуногістохімія (ІГХ) за останні 50 років зробила колосальний ривок у розвитку. Вона стала рутинним, а в значній кількості випадків обов'язковим, методом діагностики у медицині, а також є найціннішим і вельми інформативним методом наукових досліджень. Сьогодні ІГХ часто потребує просто виявлення того чи іншого маркера виявляється недостатнім, необхідним стає ще й градація його експресії. Мета роботи – презентувати методи об'єктивного визначення результатів ІГХ-реакцій для оцінки їх відмінності у групах об'єктів, що порівнюються. Матеріали – пошук першоджерел літератури був виконаний за інформаційними системами Scopus, Medline, PubMed Central, Google Scholar. Для оцінки відносної частки масиву клітин, які експресують певний маркер, ми використовували протокол Crowe AR, Yue W. (2019) з вільно доступним програмним забезпеченням ImageJ для проведення деконволюції та низхідного аналізу. Це дозволило з високим рівнем відтворюваності визначити питомий рівень мембранної та/або цитоплазматичної експресії низки маркерів у регенераційних невромах у щурів. Але, недоліком цього способу була вкрай обмежена можливість визначення інтенсивності експресії маркерів, які досліджуються. Для порівняння безпосередньої оцінки інтенсивності експресії ІГХ-реакції в різних об'єктах був запропонований спосіб визначення питомої щільності забарвлення, що виникає при проведенні ІГХ-реакції за умов стандартизації параметрів її проведення. Для цього на цифровому зображенні гістологічного препарату проводимо визначення оптичної щільності обраних об'єктів з використанням програми ImageJ (Wayne Rasband (NIH), USA). Визначено перелік умов для проведення ІГХ-дослідження, які стандартизують його і дозволяють порівнювати результати у різних групах. 1. Товщина зрізів повинна бути максимально стандартизована. Це досягається за рахунок якісного ущільнення матеріалу в парафін та використання високоякісного мікротому. 2. Проведення ІГХ-реакції для послідовного порівняння результатів повинно проводитися з одним і тим же антитілом (з одної отриманої порції). 3. Умови проведення ІГХ-реакції повинні бути стандартизовані за часом інкубації та температурою. Ми досягали цього шляхом одночасної обробки зрізів декількох експериментальних груп інкубацією з первинними та вторинними антитілами у термостаті при 24°C (температура у лабораторії була 20-22°C) протягом 10-20 хвилин, або при температурі 40°C у холодильнику протягом 16-24 годин. Другий варіант показав кращі результати. 4. Перед постановкою ІГХ-реакції доцільно провести титрування первинного антитіла і визначити його розведення, яка буде визначати оптимальну інтенсивність забарвлення (перш за все вона не повинна бути надмірною). 5. Мікрофото препаратів повинно здійснюватися при стандартизованому освітленні, експозиції та роздільній здатності цифрової камери. Автоматичний режим фото неприпустимий. Висновок: імуногістохімія та цифрові технології внесли колосальний вклад у розвиток медицини та біології. Їх поєднання за останні 30 років дали безпрецедентний за значимістю інструмент для дослідників. Але він вимагає дотримання низки технологічних умов, які є необхідними для отримання достовірних та відтворюваних результатів.

Ключові слова: імуногістохімія, кількісна оцінка результатів ІГХ, кольорова деконволюція, оптична щільність, цифрові технології, ImageJ.

Вступ

Імуногістохімія (ІГХ) за останні 50 років зробила колосальний ривок у розвитку. Вона стала рутинним, а в значній кількості випадків обов'язковим, методом

діагностики у медицині [1], а також є найціннішим і вельми інформативним методом наукових досліджень.

На початку, да часто й сьогодні, ІГХ використовується для визначення присутності певного антигену

в клітинах чи тканині. Відповідно оцінка результатів у такому випадку визначатися як його наявність/відсутність. Тобто імуногістохімічно виявляється маркер того чи іншого явища. Наприклад, походження метастазів пухлини епітеліальної природи у мозок визначається за експресією цитокератинів. Але сьогодні просто виявлення того чи іншого маркера часто виявляється недостатнім, необхідним стає ще й градація рівня його експресії.

Слід зазначити, що для оцінки експресії маркера клітиною враховується не тільки кількість (інтенсивність забарвлення) продуктів ІГХ-реакції, а і якісні параметри, такі як їх локалізація у клітині – мембранна, цитоплазматична, ядерна.

Мета

Презентувати методи об'єктивного визначення результатів ІГХ-реакцій для оцінки їх відмінності у групах об'єктів, що порівнюються

Матеріали та методи

Пошук першоджерел літератури був виконаний за інформаційними системами Scopus, Medline, PubMed Central, Google Secular.

Огляд і обговорення

Найпростіший спосіб оцінки виразності експресії антигену при ІГХ – це візуальний напівкількісний. Загальноприйнятим при цьому є визначення експресії як: відсутня (0), низька (1+), помірна (2+) та висока (3+). Отримані данні при необхідності можуть піддаватися статистичній обробці. Досвідчений фахівець може проводити таку оцінку з високим рівнем точності та відтворення.

Досить розповсюдженим способом при ІГХ дослідженнях є підрахунок мічених клітин, мічених ядер, а також їх відносного представництва серед клітин, які вивчаються. Типовим прикладом цього є визначення мітотичного індексу за експресією Ki67.

В окремих випадках оцінка експресії маркера може носити складний характер, з оцінкою розповсюдженості експресії серед масиву клітин. Найбільш яскравим прикладом є визначення HER2/neu статусу при раку грудей заснована на ІГХ дослідженні [2]. Результати граднуються в такий спосіб: 0 – відсутність фарбування, або 1+ – негативний результат, слабе фарбування мембрани у невеликому відсотку клітин пухлини; 2+ – проміжний результат, що потребує додаткового дослідження; 3+ – позитивний результат, інтенсивне та повне фарбування мембрани, часто фарбування цитоплазми у значній частині клітин пухлини (10% і більше).

Але візуальна оцінка все ж таки несе у собі об'єктивні та суб'єктивні помилки, а її точність та відтворюваність не може задовольнити дослідницькі потреби. Для цього можна було б використовувати цитоспектрофотометри, які були розроблені для кіль-

кісної оцінки гістохімічних реакцій [3]. Натомість, розвиток комп'ютерних технологій та цифрових зображень відкрили можливості значно підвищити якість кількісної оцінки ІГХ-реакцій.

За останні 5 років у РМС понад представлено 90 тисяч статей присвячених методам кількісної оцінки імуногістохімічних реакцій (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc> – immunohistochemistry quantification methods). У дослідницьких роботах використовується колосальна кількість різноманітних підходів, методів, використаних апаратних та математичних методів. В основу практично всіх з них покладено оцінку аналізу цифрових зображень [4].

Для вирішення питання порівняння результатів ІГХ-реакцій в тканинах матеріалу отриманому від тварин різних експериментальних груп ми для себе найбільш зручними визначили техніки пов'язані з використанням програмного забезпечення ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA).

Для оцінки відносної частки масиву клітин, які експресували певний маркер ми використовували протокол Crowe AR, Yue W. [5] з вільно доступним програмним забезпеченням ImageJ для проведення деконволюції та низхідного аналізу. Це дозволило з високим рівнем відтворюваності визначити питомий рівень мембранної та цитоплазматичної експресії низки маркерів у регенераційних невромах у щурів (Рис. 1). Але, недоліком цього способу була вкрай обмежена можливість визначення інтенсивності експресії маркерів, які досліджуються.

Для порівняння безпосередньої оцінки інтенсивності експресії ІГХ-реакції в різних об'єктах був запропонований спосіб оцінки питомої щільності забарвлення, що виникає при проведенні ІГХ-реакції за умов стандартизації параметрів її проведення [6]. Для цього на цифровому зображенні гістологічного препарату проводимо визначення оптичної щільності обраних об'єктів. Для цього використовуємо програму Imag J (Wayne Rasband NIH, USA) за наступним алгоритмом:

1. У головному меню Imag J обираємо пункт **File** і у підменю вибираємо пункт **Open**, вибираємо і завантажуюємо файл цифрової фотографії – відкривається вікно з зображенням (Рис. 2а, Рис. 3. Послідовність зображень: зліва направо, зверху вниз.).
2. У головному меню ImagJ вибираємо пункт Image, потім послідовно **Type** та **8 bit** – зображення трансформується у 8-бітне (Рис. 2б, Рис. 3).
3. У головному меню ImagJ вибираємо пункт Analyze та послідовно: Calibrate → Function → Pixel inverter → (Рис. 2в) Ok → з'являється вікно яке закриваємо.

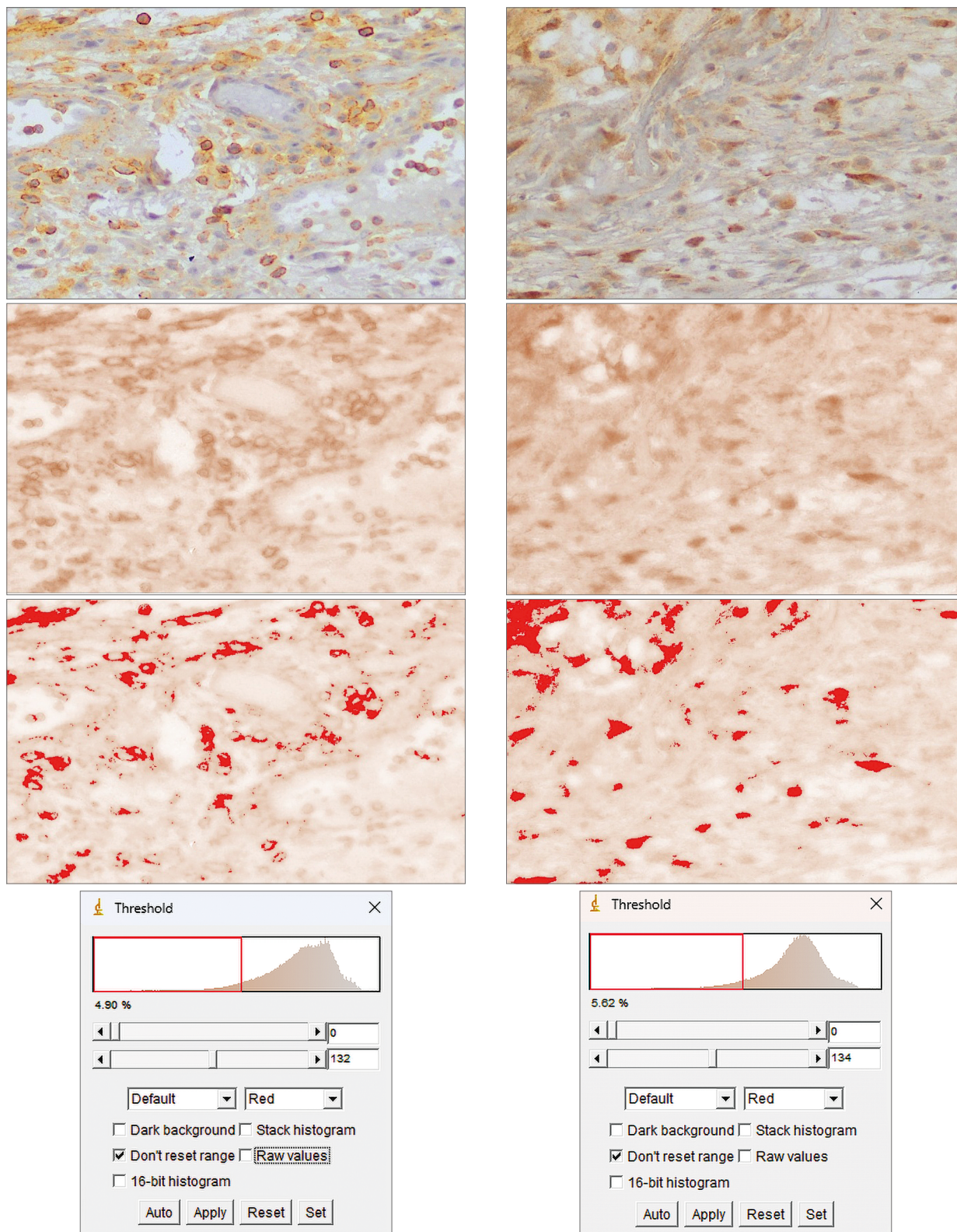


Рис. 1. Оцінка шляхом деконволюції та низхідного аналізу питомої щільності в невромі клітин, що виявляють мембранну експресію CD44 (зліва) та цитоплазматичну GFAP (з права). Верхні фото – похідні цифрові зображення, ІГХ (DAB), гематоксилін, x400; другий рядок – зображення після деконволюції зі забарвленням DAB та гематоксилін; третій рядок – червоним позначені клітини з високою експресією маркерів шляхом підбору порогу (Threshold – четвертий рядок).

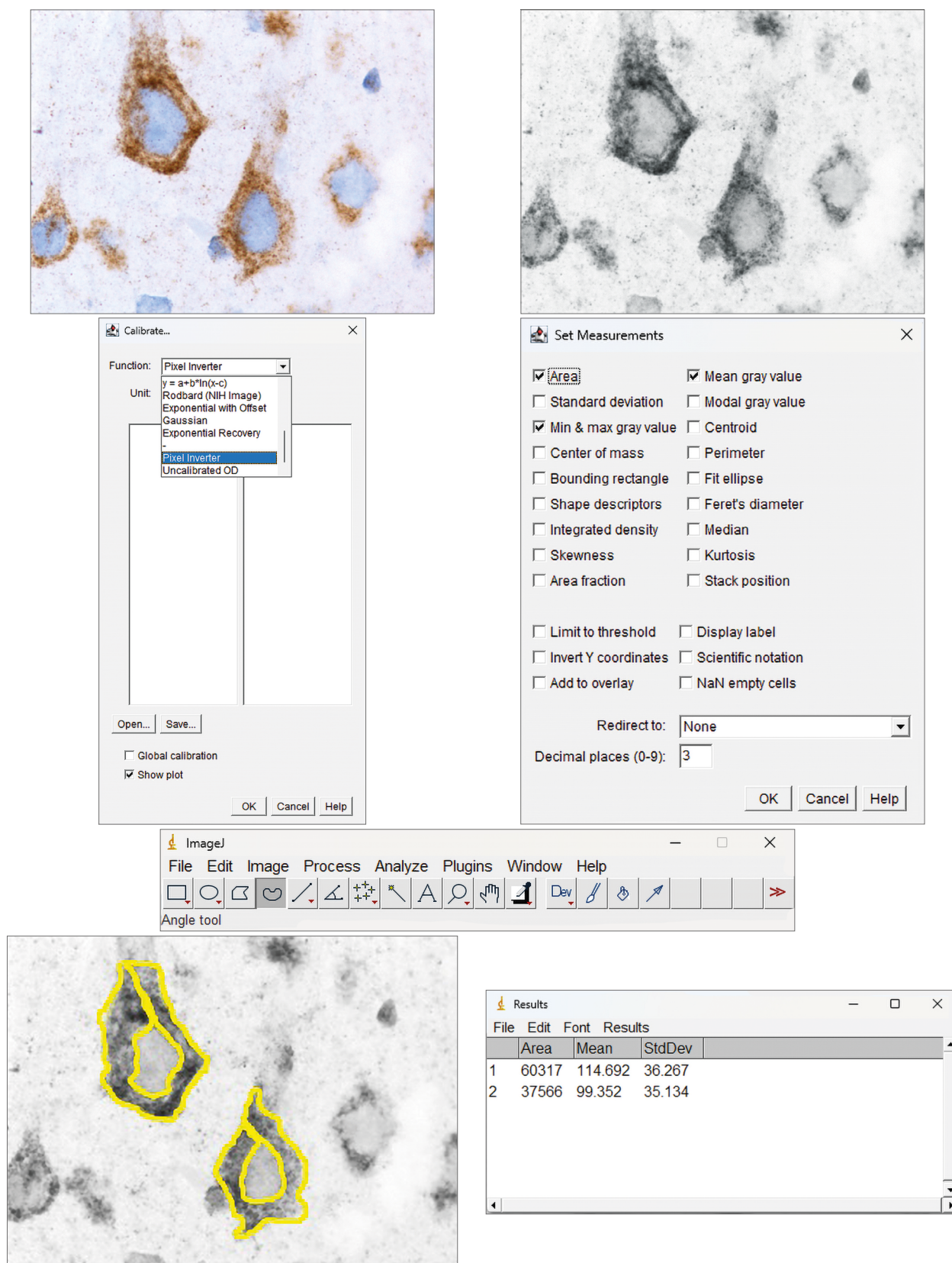


Рис. 2. Приклад визначення оптичної щільності результатів ІГХ-реакції з цитоплазматичною експресією антигену. Мікрофото нейронів головного мозку, реакція з антитілами проти актину, DAB та гематоксилін, x1000. Дивись опис у тексті – зліва направо, зверху униз.

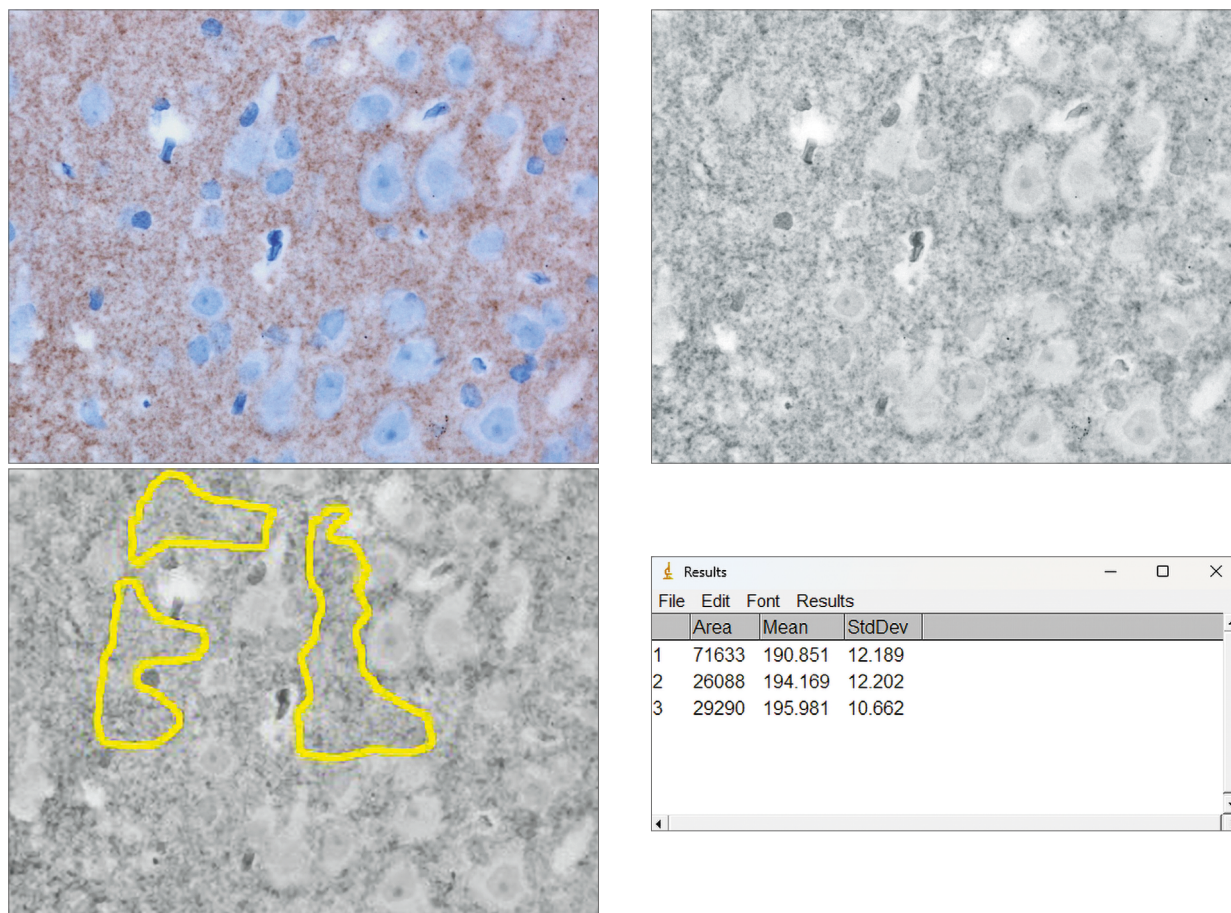


Рис. 3. Приклад визначення оптичної щільності результатів ІГХ-реакції з експресією антигену в нейропілі кори великих півкуль. Мікрофото кори головного мозку, реакція з антитілами проти синаптофізину, DAB та гематоксилін, x400. Дивись опис у тексті вище.

- У головному меню ImagJ вибираємо пункт Analyze та послідовно: → Set measurements → відмічаємо віконця (mean gray value, Area, min and ma gray value) → Ok (Рис. 2г).
- У головному меню ImagJ вибираємо піктограму що зображує неправильну фігуру зі згладженими кутами (Рис. 2д), четверта піктограма зліва).
- Курсором виділяємо на зображенні ділянку, оптичну щільність якої будемо визначати (Рис. 2е, Рис. 3) і натискаємо клавішу «М/Ь» – з’являється вікно з результатами вимірювання (Рис. 2є, Рис. 3).

На одній мікрофотографії можна вибрати декілька ділянок для оцінки. Результати будуть додаватися у таблицю. При необхідності можна отримати середні значення отриманих цифрових даних, для чого у головному меню ImagJ вибираємо пункт Results і потім Summarize. У таблиці з’являються рядки зі середніми значеннями. Результати вимірювання представляють оптичну щільність зображення у діапазоні від 0 до 255, де 0 представляє самий світлий відтінок, а 255 – самий темний, що пропорційне кількості хромогену

та, відповідно, кількості антигену. Дані з таблиці результатів ImagJ можуть бути збережені у файл або перенесені у Excel для подальшої обробки.

Отже, обробка цифрових зображень при порівнянні результатів ІГХ-реакцій є досить простою та легко відтворюваною. На практиці основні складності виникають зі стандартизацією умов проведення реакцій та відтворюваності їх результатів. Аналізуючи хід власних досліджень [7; 8] та досвід інших дослідників [9,10, та інші] ми склали перелік умов для проведення ІГХ-дослідження, які стандартизують його і дозволяють порівнювати результати у різних групах.

- Товщина зрізів повинна бути максимально стандартизована. Це досягається за рахунок якісного ущільнення матеріалу в парафін та використання високоякісного мікротому.
- Проведення ІГХ-реакції для послідовного порівняння результатів повинно проводитися з одним і тим же антитілом, з достатньою кількістю розчину для одночасної обробки всіх зрізів матеріалу груп, що будуть порівнюватися (з одної отриманої порції).

3. Умови проведення ІГХ-реакції повинні бути стандартизовані за часом та температурою інкубації. Ми досягали цього шляхом одночасної обробки зрізів декількох експериментальних груп інкубацією з первинними та вторинними антитілами у термостаті при 24°C (температура у лабораторії була 20-22°C) протягом 10-20 хвилин, або при температурі 4°C у холодильнику протягом 16-24 годин. Другий варіант показав кращі результати.
4. Перед постановкою ІГХ-реакції доцільно провести титрування первинного антитіла і визначити його розведення, яка буде визначати оптимальну інтенсивність забарвлення (перш за вона не повинна бути надмірною).
5. Мікрофото препаратів повинно здійснюватися при стандартизованому освітленні, експозиції та роздільній здатності цифрової камери. Автоматичний режим фото неприпустимий.

Висновок

Імуногістохімія та цифрові технології внесли колосальний вклад у розвиток медицини та біології за

останні 30 років. Їх поєднання дали безпрецедентний за значимістю інструмент для дослідників. Але він вимагає дотримання низки технологічних умов, які є необхідними для отримання достовірних та відтворюваних результатів.

Фінансування

Дане дослідження не отримало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Відсутній.

Згода на публікацію

Автори дали згоду на публікацію цього рукопису.

ORCID ID

та внесок авторів:

[0000-0001-5705-9909](https://orcid.org/0000-0001-5705-9909) (A, B, C, D, E, F) Olexandr Grabovyi

[0000-0002-6044-0433](https://orcid.org/0000-0002-6044-0433) (B, D) Natalia Rytikova

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article

ЛІТЕРАТУРА

1. Dabbs DJ (Ed.). Diagnostic immunohistochemistry e-book: theranostic and genomic applications. 6 edition. Elsevier Health Sciences. 2022. 1211 p. ISBN-13: 978-0323-72172-1
2. Rakha EA, Tan PH, Quinn C, Provenzano E, Shaaban AM, Deb R, et al. UK recommendations for HER2 assessment in breast cancer: an update. J Clinical Pathology. 2023;76(4):217-227. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208632>
3. Garlov PE, Kuzik VV. The Involvement and Functional Role of the Fish Nonapeptidergic Preoptico-Hypophysial Neurosecretory System in Spawning Migrations. J Evol Biochem Phys. 2022;8:700–714. <https://doi.org/10.1134/S0022093022030073>
4. Bankhead P. Developing image analysis methods for digital pathology. J Pathol. 2022; 257(4):391–402. [doi: 10.1002/path.5921](https://doi.org/10.1002/path.5921)
5. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. Bio Protoc. 2019;9(24): e3465. [doi: 10.21769/BioProtoc.3465](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3465).
6. Грабовий О. М., Яременко Л. М. Спосіб кількісної оцінки імуногістохімічних реакцій. 2021. Патент на копію модель 147216. <https://iprop-ua.com/inv/zlndy4s9/>
7. Grabovoy A, Yaremenko L, Shepelev S. Expression of synaptophysin and VEGF in the sensorimotor cortex during the carotid artery ligation, the brain antigen sensitization and their combinations. Wiadomości Lekarskie. 2022;LXXV(9,p.2):2256-2261. doi:10.36740/WLek202209214
8. Grabovyi OM, Nevmerzhytska NM, Alyokhin AB, et al. Modulation of the tissue composition of regenerative neuroma by dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor. Pathologia. 2023;20(2):118-25. <https://pat.zsmu.edu.ua/article/view/285124>
9. Mebratie DY, Dagnaw GG. Review of immunohistochemistry techniques: Applications, current status, and future perspectives. Semin Diagn Pathol. 2024;41(3):154-160. doi:10.1053/j.semmp.2024.05.001. PMID: 38744555.
10. Serkad CPV, Attuluri AK, Basavaraj C, Adinarayan M, Krishnamoorthy N, Ananthamurthy SB, et al. Validation of CanAssist Breast immunohistochemistry biomarkers on an automated platform and its applicability in tissue microarray. Int J Clin Exp Pathol. 2021;14(10):1013-1021. PMID: 34760037; PMCID: PMC8569307.

Objective Assessment of Immunohistochemical Reactions

Olexandr Grabovyi, Natalia Rytikova

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Corresponding Author:

Olexandr Grabovyi

angrabovoy@gmail.com

Abstract: Immunohistochemistry (IHC) has made a huge leap in development over the past 50 years. It has become a routine, and in a significant number of cases, a mandatory diagnostic method in medicine, and is also the most valuable and highly informative method of scientific research. Today, IHC often requires simply detecting a particular marker, which is insufficient; gradation of its expression also becomes necessary. The purpose of the work is to present methods for objectively determining the results of IHC reactions to assess their differences in groups of objects being compared. Materials – the search for primary sources of literature was performed using the information systems Scopus, Medline, PubMed Central, Google Scholar. To assess the relative proportion of the cell array expressing a certain marker, we used the Crowe AR, Yue W. (2019) protocol with the freely available ImageJ software for deconvolution and downstream analysis. This allowed us to determine with a high level of reproducibility the specific level of membrane and/or cytoplasmic expression of a number of markers in regenerative neuromas in rats. However, the disadvantage of this method was the extremely limited ability to determine the intensity of expression of the markers under study. To compare the direct assessment of the intensity of expression of the IGH reaction in different objects, a method was proposed for determining the specific density of staining that occurs when performing the IGH reaction under the conditions of standardization of its parameters. To do this, we determine the optical density of selected objects on a digital image of a histological preparation using the ImageJ program (Wayne Rasband NIH, USA). A list of conditions for conducting an IGH study has been determined, which standardize it and allow comparing the results in different groups. 1. The thickness of the sections should be standardized as much as possible. This is achieved by high-quality compaction of the material in paraffin and the use of a high-quality microtome. 2. The IGH reaction for subsequent comparison of results should be carried out with the same antibody (from one portion obtained). 3. The conditions for the IGH reaction should be standardized in terms of incubation time and temperature. We achieved this by simultaneously processing sections of several experimental groups by incubation with primary and secondary antibodies in a thermostat at 24°C (the temperature in the laboratory was 20–22°C) for 10–20 minutes, or at 4°C in a refrigerator for 16–24 hours. The second option showed better results. 4. Before performing the IGH reaction, it is advisable to titrate the primary antibody and determine its dilution, which will determine the optimal color intensity (first of all, it should not be excessive). 5. Microphotographs of preparations should be carried out under standardized lighting, exposure and resolution of the digital camera. Automatic photo mode is unacceptable. Conclusion: Immunohistochemistry and digital technologies have made a tremendous contribution to the development of medicine and biology. Their combination over the past 30 years has provided an unprecedentedly valuable tool for researchers. However, it requires compliance with a number of technological conditions that are necessary to obtain reliable and reproducible results.

Key words: color deconvolution, digital technology, quantitative evaluation of IHC results, ImageJ, immunohistochemistry, optical density.



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/>).