

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

17.09. 2009 г.

Регистрационный № 082-0909

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛИ ПРИ
РАСПРОСТРАНЕННОМ РАКЕ ЯИЧНИКОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова»

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ:

д-р биол. наук Р.М. Смолякова, д-р мед. наук, проф. Н.И. Крутилина,
А.В. Мойсей, канд. мед. наук В.М. Бычков, канд. Мед. наук А.Ч. Дубровский

Минск 2009

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

РЯ	— рак яичников
ИГХ	— иммуногистохимия
PCNA	—пролиферативный маркер
p53	— мутантный супрессор опухолевого роста
Vaх	— проапоптотический тканевый маркер
Vcl-2	— антиапоптотический маркер
VEGF	— фактор роста эндотелия сосудов

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкция разработана с целью определения экспрессии молекулярно-биологических тканевых маркеров при распространенном раке яичников III–IV стадий.

Область применения: онкология.

Уровень внедрения: специализированные онкологические центры, диспансеры, патологоанатомические бюро.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Перечень необходимого оборудования:

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
2. рН-метр.
3. Термостат.
4. Автоматические пипетки переменного объема.
5. Баня водяная с датчиком температуры.
6. Световой микроскоп.

Реактивы и расходные материалы:

1. Силанизированные предметные стекла.
2. Покровные стекла.
3. Лабораторная посуда (колбы, пробирки, стеклянные палочки, воронки, стаканы, контейнеры для предметных стекол).
4. Ксилол.
4. 96° спирт.
5. Перекись водорода 3%.
6. Tris-HCl — отмывочный буфер, рН 7,5.
7. Буфер для разведения специфических антител.
8. Буфер для демаскировки антигенов, рН=6,0.
9. Буфер для демаскировки антигенов, рН=9,0.
10. Первичные антитела к Vaх, PCNA, p53; Vcl-2, VEGF. Обязательным условием является наличие в спецификации указания на возможность использования на формалин-фиксированных тканях человека.

11. Системы визуализации к мышинным и кроличьим антителам или универсальная система (En Vision и En Vision+).
12. Диаминобензидин (DAB).
13. Канадский бальзам.
14. Карандаш для ИГХ.
15. Гематоксилин Майера.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак яичников.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не выявлены.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ P53 (КЛОН DO-7)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола по 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° по 4 мин.
3. Промыть 3 раза по 2 мин в дистиллированной воде.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.

1. Поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером pH 9,0 и погрузить на 30 мин в водяную баню при $t=98^{\circ}\text{C}$.
2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.
3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.
4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.
5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции.

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.
2. Нанести разведенное в буфере 1:300 первичное антитело (анти-p53) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.
3. Слить со срезов жидкость.
4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
5. Нанести на срезы визуализирующую систему для мышинных антител на 30 мин.
6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
7. Нанести раствор ДАБ. Приготовить ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.
8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.

9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально (1 мин).

10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов.

1. Обезвоживание в спиртах.

2. Просветление в ксилоле.

3. Заключение в канадский бальзам.

Рекомендуются следующие критерии оценки маркера **p53**: опухоль считать *отрицательной по p53*, если в ткани опухоли отсутствует ядерная реактивность с антителами или количество окрашенных клеток менее 5%; *положительной по p53*, если окрашено более 5% ядер опухолевых клеток, причем слабопозитивной — при 6–30%, умереннопозитивной — при 31–70% и сильнопозитивной — при 71–100% клеток.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ VCL-2 (КЛОН 124)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в 2 порции ксилола по 10 мин.

2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° по 4 мин.

3. Промыть 3 раза по 2 мин в дистиллированной воде.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.

1. Поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером pH=9,0 и погрузить на 30 мин в водяную баню при t=98°C.

2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.

3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.

4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.

5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции.

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.

2. Нанести разведенное в буфере 1:75 первичное антитело (анти-Vcl-2) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.

3. Слить со срезов жидкость.

4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

5. Нанести на срезы визуализирующую систему для кроличьих антител на 30 мин.

6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

7. Нанести раствор ДАБ. Приготовить ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.
8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.
9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально (1 мин).
10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов.

1. Обезвоживание в спиртах.
2. Просветление в ксилоле.
3. Заключение в канадский бальзам.

Опухоль считать *отрицательной по Vcl-2*, если в ткани отсутствует цитоплазматическая реактивность с антителами, *положительной по маркеру* при окрашивании более 10% опухолевых клеток.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ВАХ (ПОЛИКЛОНАЛЬНОЕ КРОЛИЧЬЕ АНТИТЕЛО)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола по 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° по 4 мин.
3. Промыть 3 раза по 2 мин в дистиллированной воде.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.

1. Поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером pH=9,0 и погрузить на 30 мин в водяную баню при t=98°C.
2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.
3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.
4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.
5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции.

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.
2. Нанести разведенное в буфере 1:250 первичное антитело (анти-Вах) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.
3. Слить со срезов жидкость.
4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
5. Нанести на срезы визуализирующую систему для мышиных антител на 30 мин.
6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
7. Нанести раствор ДАБ. Приготовить ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.
8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.

9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально (1 мин).

10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов.

1. Обезвоживание в спиртах.

2. Просветление в ксилоле.

3. Заключение в канадский бальзам.

Рекомендуются следующие критерии оценки маркера **Vax** — опухоль считать *отрицательной по Vax* при отсутствии цитоплазматической реактивности окраски: 0 — нет; *положительной по Vax* при интенсивности окраски: 1 — слабая, 2 — умеренная, 3 — сильная.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ PCNA (КЛОН PC 10)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола по 10 мин.

2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° по 4 мин.

3. Промыть 3 раза по 2 мин в дистиллированной воде.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов не требуется.

1. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.

2. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции.

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.

2. Нанести готовое в рабочем разведении первичное антитело (анти-PCNA) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.

3. Слить со срезов жидкость.

4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

5. Нанести на срезы визуализирующую систему для кроличьих антител на 30 мин.

6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

7. Нанести раствор ДАБ. Приготовить ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.

8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.

9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально (1 мин).

10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов.

1. Обезвоживание в спиртах.

2. Просветление в ксилоле.

3. Заключение в канадский бальзам.

Рекомендуются следующие критерии оценки маркера: опухоль считать *отрицательной по PCNA* при отсутствии ядерного окрашивания — 0; *положительной по PCNA* при ядерном окрашивании: 1 — слабая интенсивность, 2 — умеренная, 3 — сильная; по проценту окрашенных клеток: 0 — 0%, 1 — 1–25%, 2 — 26–50%, 3 — более 50%. По сумме баллов (score) оценивали уровень экспрессии: низкий — 2–3 балла, высокий — 4–5 баллов, максимальный — 6 баллов.

Описание технологии иммуногистохимического метода определения экспрессии VEGF (клон VG 1)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в 2 порции ксилола по 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в 3 порции этанола 96° по 4 мин.
3. Промыть 3 раза по 2 мин в дистиллированной воде.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.

1. Поместить срезы в емкость с буфером для демаскировки антигенов pH=6,0 и обработать в микроволновой печи в течение 20 мин при максимальной мощности 750–800 Вт.
2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.
3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.
4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.
5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции.

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.
2. Нанести разведенное в буфере 1:25 первичное антитело (анти-VEGF) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.
3. Слить со срезов жидкость.
4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
5. Нанести на срезы визуализирующую систему для мышинных антител на 30 мин.
6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
7. Нанести раствор ДАБ. Приготовить ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.
8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.
9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально (1 мин).
10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов.

1. Обезвоживание в спиртах.
2. Просветление в ксилоле.
3. Заключение в канадский бальзам.

Рекомендуются следующие критерии оценки маркера: опухоль считать *отрицательной по VEGF* при интенсивности цитоплазматической и/или мембранной окраски: 0 — нет; *положительной по маркеру*: 1 — слабая, 2 — умеренная, 3 — сильная; по проценту положительных клеток при цитоплазматическом и/или мембранном окрашивании: 0 — 0%, 1 — 1–25%, 2 — 26–50%, 3 — более 50% окрашенных клеток.

Score: 2–3 — низкий уровень экспрессии, 4–5 — высокий, 6 — максимальный.

Представленные иммуногистохимические методики позволяют стандартизировать проводимые исследования в специализированных лечебных учреждениях РБ и выявлять высокую экспрессию тканевых маркеров, характеризующих химиорезистентные и химиочувствительные формы опухоли у больных распространенным раком яичников III–IV стадий. В зависимости от уровня экспрессии тканевых молекулярно-биологических маркеров больные распространенным раком яичников III–IV стадий могут быть отнесены к химиорезистентной (прогрессирование заболевания выявлено в сроки менее 6 мес. от окончания лечения) или химиочувствительной (прогрессирование заболевания наблюдалось спустя 6 мес.) группам.

При сравнительном анализе выживаемости распространенным раком яичников химиорезистентной и химиочувствительной групп методом Каплан–Майера выявлены статистически значимые различия ($p_{\log\text{-rank}} < 0,0001$). Медиана жизни больных химиорезистентной группы составила 0,158 (95% ДИ [0,12; 0,188]), химиочувствительной — 0,445 (95% ДИ [0,46; 0,59]).

Химиорезистентный вариант опухоли у больных распространенным раком яичников III–IV стадий характеризовался высоким уровнем экспрессии опухолью мутантного p53, при этом статистически значимы значения score 3 и 5 ($p_{\text{логистическая регрессия}} = 0,02$ и $0,04$ соответственно), слабой и сильной интенсивностью его окраски ($p_{\text{логистическая регрессия}} = 0,03$ и $0,01$ соответственно).

Факторами, влияющими на развитие химиорезистентности опухоли у больных распространенным раком яичников III–IV стадий, у которых на первом этапе лечения проводилась неоадьювантная полихимиотерапия, являлись муцинозный морфотип ($p_{\text{логистическая регрессия}} = 0,03$), остаточный размер опухоли более 1 см ($p_{\text{логистическая регрессия}} = 0,02$), высокий уровень экспрессии мутантного p53, при score 5 и сильной интенсивности окрашивания ($p_{\text{логистическая регрессия}} = 0,04$ и $0,009$ соответственно).

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Ошибочные результаты при исследовании тканевых маркеров иммуногистохимическим методом могут быть получены при:

- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неточном дозировании реагентов;
- неправильном заборе и фиксации патоморфологического материала;

– нарушениях в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

С целью повышения специфичности иммуногистохимической реакции необходимо включение в число тестируемых образцов при каждой процедуре анализа положительных и отрицательных контролей.