

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
 Д.Л. Пиневиц  
2015 г.

Регистрационный № 110-1015

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АГРЕССИВНОСТИ  
НЕМЫШЕЧНО-ИНВАЗИВНОГО ПЕРЕХОДНО-КЛЕТОЧНОГО  
РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:**

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

**Авторы:**

Набебина Т.И., д.м.н., профессор Красный С.А., д.б.н. Смолякова Р.М., к.м.н.  
Ролевич А.И., к.м.н. Дубровский А.Ч.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

04.11.2015

Регистрационный № 110-1015

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АГРЕССИВНОСТИ  
НЕМЫШЕЧНО-ИНВАЗИВНОГО ПЕРЕХОДНО-КЛЕТОЧНОГО  
РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Т.И. Набебина, д-р мед. наук, проф. С.А. Красный, д-р биол. наук  
Р.М. Смолякова, канд. мед. наук А.И. Ролевич, канд. мед. наук А.Ч. Дубровский

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения биологической агрессивности немышечно-инвазивного переходно-клеточного рака мочевого пузыря (РМП) путем комплексной оценки морфологических и молекулярно-биологических характеристик опухоли, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по диагностике и лечению рака мочевого пузыря.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-онкологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим переходно-клеточным раком мочевого пузыря без мышечной инвазии.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Автомат для гистологической обработки ткани.
2. Парафинозаливочная станция.
3. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
4. Водяная баня с датчиком температуры.
5. Термостат.
6. Таймер.
7. pH-метр.
8. Лабораторная посуда (стеклянные емкости для фиксации материала, контейнеры для предметных стекол, кассеты и емкости для изготовления парафиновых блоков, автоматические дозаторы и наконечники к ним объемом 1–10; 20–200; 100–1000 мкл).
9. Предметные, силанизированные предметные и покровные стекла,
10. Реагенты для гистологической проводки тканей, изготовления парафиновых блоков, приготовления микропрепаратов, окрашенных гематоксилином-эозином, иммуногистохимического исследования: (ИГХ) (формалин, этанол, ксилол, парафин, воск, гематоксилин, эозин, глицерин, соляная кислота, аммиак, перекись водорода 3%, Tris-HCl отмывочный буфер, pH = 7,5, цитратный буфер для демаскировки антигенов, pH = 6,0, буфер для демаскировки антигенов, pH = 6,0, буфер для демаскировки антигенов, pH 9,0, первичные антитела к p53, СК 5/6 (для использования на формалин-фиксированных парафинизированных тканях), система визуализации, диаминобензидин (ДАБ), монтирующая среда для покровных стекол, карандаш для ИГХ, гематоксилин Майера).
11. Световой микроскоп.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Немышечно-инвазивный переходно-клеточный рак мочевого пузыря.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### 1. Определение гистологической степени злокачественности переходноклеточного рака мочевого пузыря без мышечной инвазии

#### 1.1. Балльная оценка

Определение гистологической степени злокачественности проводится с учетом наличия признаков тканевой и клеточной атипии с присвоением диагностического индекса от 0 до 4 в зависимости от степени выраженности конкретной характеристики либо наличия/отсутствия признака (таблица 1).

#### 1.2. Суммирование баллов для определения общего индекса

Последовательный анализ нижеперечисленных признаков позволяет провести систематизированную оценку папиллярной переходноклеточной опухоли без мышечной инвазии и определить общий индекс, что позволит с высокой степенью точности установить степень злокачественности новообразования (таблица 2).

Таблица 1 — Оценка морфологических признаков (баллы)

Признак	Проявления признака	Балл
Увеличение количества слоев клеток (>7)	Нет	0
	Да	1
Поверхностные зонтичные клетки	Присутствуют	0
	Частично отсутствуют	1
	Отсутствуют	2
Полярность/общая архитектура	Нормальная	0
	Слабые нарушения	1
	Умеренные нарушения	2
	Выраженные нарушения	3
Дискомплексаия	Отсутствует	0
	Слабая	1
	Умеренная	2
	Выраженная	3
Просветление цитоплазмы	Да	1
	Нет	2
Размер ядра	Нормальные	0
	Слабо увеличенные	1
	Умеренно увеличенные	2
	Заметно увеличенные	3
Ядерный полиморфизм	Однообразные, слегка вытянутые, Овальные	0
	Округло-овальные со слабой вариабельностью формы и контуров	1
	Умеренный	2
	Выраженный	3
Ядерная гиперхромазия	Слабая	0
	Умеренная	1
	Выраженная	2
Ядерные бороздки	Присутствуют	0
	Отсутствуют	1

Окончание таблицы 1

Ядрышки	Отсутствуют	0
	Слабо заметны	1
	Увеличенные, хорошо заметны	2
	Множественные, хорошо заметны	3
Митозы	Отсутствуют	0
	Редкие, базальной локализации (не более 1 в 10 полях зрения x400)	1
	Могут присутствовать на любом уровне (1–5 в 10 полях зрения x400)	2
	Хорошо заметные, частые, атипичные (более 5 в 10 полях зрения x400)	3
Слияние папилл	Нет	0
	Да	1
Новообразование сосудов и воспаление в подлежащих тканях	Да	0
	Нет	1
Стромальная инвазия	Да	0
	Нет	1

Таблица 2 — Определение степени злокачественности переходно-клеточного рака с использованием общего индекса

Признак \ Степень злокачественности	Grade I/ PUNLMP (ВОЗ 1973/ ВОЗ 2004)	Grade II/ LGPUC (ВОЗ 1973/ВОЗ 2004)	Grade III /HGPUCa (ВОЗ 1973/ ВОЗ 2004)
Увеличение количества слоев клеток (>7)	1 Да	0–1 Вариабельно	0–1 Вариабельно, часто <7 слоев
Поверхностные зонтичные клетки	0–1 Присутствуют/ частично отсутствуют	1–2 Частично отсутствуют/отсутствуют	1–2 Обычно отсутствуют
Полярность общая архитектура	0 Нормальная	1 Слабые нарушения	2–3 Умеренные/выраженные
Дискомплексаия	0 Отсутствует	0-1 Отсутствует/слабая	1–3 Слабая/умеренная/выраженная
Просветление цитоплазмы	0 Может присутствовать	0 Может присутствовать	0–1 Обычно отсутствует
Размер ядра	0–1 Нормальные или слегка увеличены	1–2 Слабо/умеренно увеличены	2–3 Умеренно/заметно увеличены

Окончание таблицы 2

Ядерный полиморфизм	0–1 Ядра однообразные, слегка вытянутые овальные	1 Ядра округло- овальные со слабой вариабельностью формы и контуров	2–3 Умеренный/ выраженный
Ядерная гиперхромазия	0 Слабая	0–2 Слабая/умеренная	2–3 Умеренная/ выраженная
Ядерные бороздки	0 Присутствуют	0 Присутствуют	1 Отсутствуют
Ядрышки	0–1 Отсутствуют или слабо заметны	1 Слабо заметны	2–3 Увеличенные, хорошо заметные/ множественные, хорошо заметны
Митотические фигуры	0–1 Отсутствуют/ редкие базальной локализации (не более 1 в 10 полях зрения x400)	2 Могут присутствовать на любом уровне (1–5 в 10 полях зрения x400)	2–3 Хорошо заметные, частые, атипичные (более 5 в 10 полях зрения x400)
Слияние папилл	0 Отсутствует	1 Да (редко)	1 Да (часто)
Новообразование сосудов и воспаление в подлежащих тканях	0–1 Редко	0–1 Редко	1 Часто
Стромальная инвазия	0 Нет	0–1 Редкая	0–1 Часто присутствует
<b>Общий индекс</b>	<b>1–7</b>	<b>8–16</b>	<b>17–29</b>
<p>Примечания:</p> <p>1 — ВОЗ 1973, ВОЗ 2004 — Гистологическая классификация опухолей мочевого пузыря, принятые Всемирной организацией здравоохранения в 1973 и 2004 гг. соответственно.</p> <p>2 — Grade — степень злокачественности.</p> <p>3 — PUNLMP — папиллярная переходно-клеточная опухоль с низким злокачественным потенциалом.</p> <p>4 — LGPUC — папиллярный переходно-клеточный рак низкой степени злокачественности.</p> <p>5 — HGPUC — папиллярный переходно-клеточный рак высокой степени злокачественности.</p>			

## 2. Определение уровня инвазии подслизистого слоя

### 2.1. Критерии инвазии

При световой микроскопии признаком инвазии является абсолютно очевидное наличие в подслизистом слое изолированных опухолевых клеток и мелких, с неправильными контурами, гнезд клеток, иррегулярно инвазирующих подслизистый слой и вызывающих стромальный фиброзный ответ.

Следует с осторожностью высказываться о наличии инвазии подслизистого слоя при высокодифференцированном переходно-клеточном раке, тангенциальных

срезах опухолевой ткани, инвазии «широким фронтом» (наличие в подслизистом слое солидных четко очерченных очагов роста, при выраженном воспалении и реактивных изменениях в образце. В трудных случаях возможно использовать иммуногистохимические реакции (панцитокератин) для идентификации эпителиальной природы подозрительных клеток.

## 2.2. Субстадирование категории *T1*

Проводится по системе, которая различает *T1*-микроинвазивную (*T1m*) и *T1*-широкоинвазивную (*T1e*) опухоль. *T1m* — единичный очаг инвазии собственной пластинки, меньший либо равный 0,5 мм (в пределах одного поля зрения  $\times 400$ ), *T1e* — очаг инвазии собственной пластинки более 0,5 мм либо множественные микроинвазивные поля (рисунок 1).

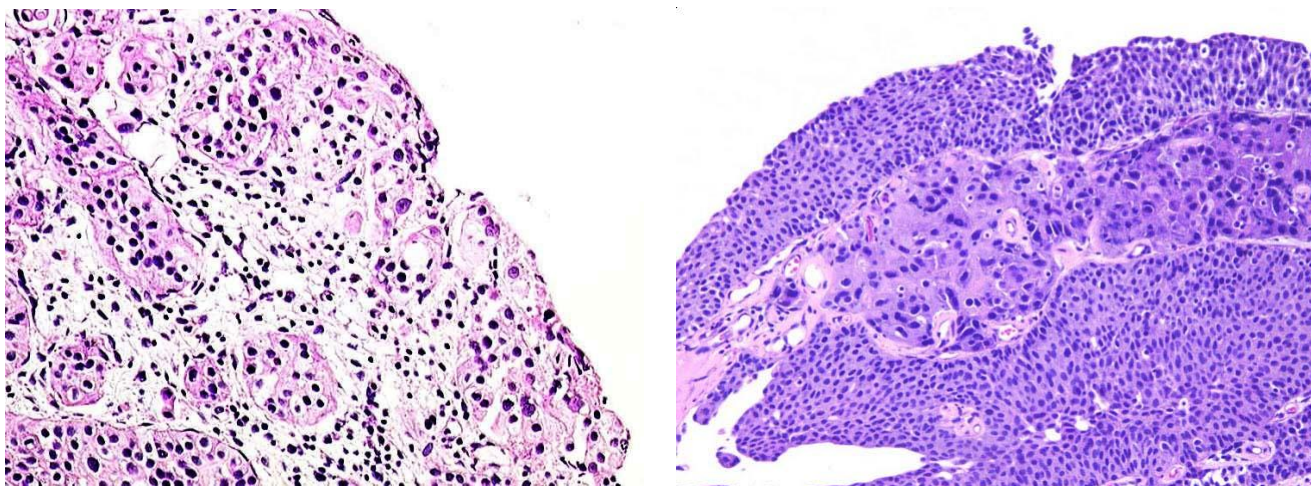
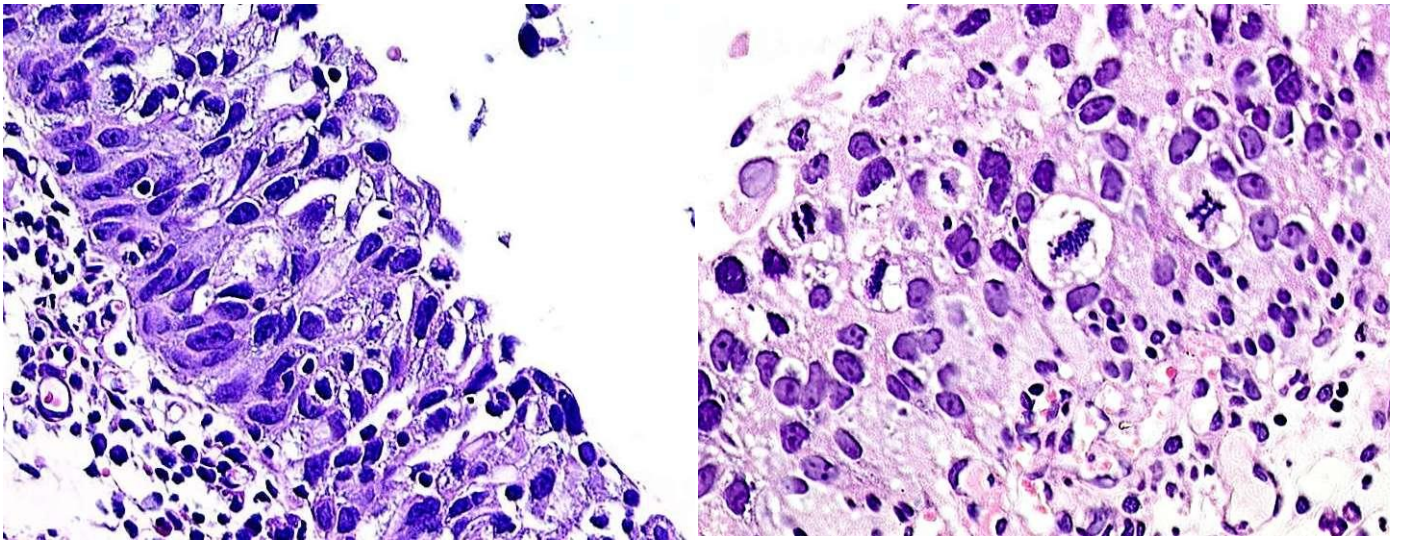


Рисунок 1 — Инвазия подслизистого слоя, *pT1e*.  
Окраска гематоксилином-эозином,  $\times 200$ ,  $\times 100$

## 3. Определение наличия внутриуротелиального рака (рак *in situ*)

Для внутриэпителиального рака характерны следующие признаки: количество слоев переходного эпителия, как правило, меньше семи, поверхностные зонтичные клетки отсутствуют, определяется нарушение полярности и дисконфлексация переходного эпителия, ядра опухолевых клеток заметно увеличены в размерах, выражен ядерный полиморфизм, отмечается наличие внутриядерных включений, ядрышек, митотические фигуры хорошо заметны, частые, атипичные, имеет место сопутствующее воспаление и новообразование сосудов в подлежащих тканях (рисунок 2).





**Рисунок 2 — Внутриуротелиальный рак (рак *in situ*).  
Окраска гематоксилином-эозином, х400**

#### **4. Выполнение иммуногистохимического исследования**

##### **4.1. Приготовление рабочих разведений реагентов**

1. Демаскировочный буферный раствор для бани: развести концентрат (*Target Retrieval Solution*, *pH 6,0* или *pH 9,0* (10x)) дистиллированной водой в соотношении 1:10, *pH* раствора  $6,0 \pm 0,6$ .

2. *Tris-HCl* — отмывочный буфер *pH 7,5*: готовить согласно спецификации.  
Срок годности — 1 сут.

##### **4.2. Депарафинирование и обезвоживание материала**

Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две емкости с ксилолом по 10 мин; в три емкости с этанолом 96° по 3 мин; промыть срезы в трех емкостях с дистиллированной водой по 2 мин.

##### **4.3. Демаскировка антигенов**

Для обеспечения восстановления структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин, поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером *pH 6,0* или *pH 9,0* и погрузить на 20–30 мин на водяную баню при  $t^{\circ}=95-99^{\circ}\text{C}$ ; оставить срезы в емкости с демаскировочным буфером при комнатной температуре на 20 мин; промыть срезы в трех емкостях с дистиллированной водой и поместить последовательно в две емкости с дистиллированной водой по 5 мин; поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин; промыть в дистиллированной воде трижды по 2 мин.

##### **4.4. Иммуногистохимическая реакция**

Срезы обвести карандашом для ИГХ; нанести первичное специфическое антитело в рабочем разведении и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин; слить со срезов жидкость; срезы промыть в *Tris*-буфере 2 раза по 5 мин; нанести на срезы визуализирующую систему на 30 мин; промыть в *Tris*-буфере 2 раза по 5 мин; нанести раствор *DAB* (раствор приготовить в соответствии с рекомендациями изготовителя) и инкубировать 6–10 мин; слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой; срезы докрасить гематоксилином Майера



(время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и составляет 40–60 с); промыть дистиллированной водой.

#### **4.5. Просветление и заключение срезов**

Обезвоживание в одной порции этанола 96° 5 мин; просветление в одной порции ксилола 5 мин; заключение в канадский бальзам.

#### **5. Оценка результатов иммуногистохимического исследования**

Результаты иммуногистохимической реакции оцениваются при световой микроскопии в зависимости от характера экспрессии (позитивная окраска ядра опухолевой клетки — для *p53*, позитивная окраска цитоплазмы клеток, характерная для цитокератинов *CK5/6*). Интенсивность окраски для всех изучаемых параметров оценена полуколичественным методом — слабая, умеренная, выраженная (1, 2, 3 балла соответственно).

Количество позитивно окрашенных клеток определяется в пяти различных полях зрения при увеличении  $\times 400$  (окуляр  $\times 10$ , объектив  $\times 40$ ). Для подсчета выбираются поля зрения, демонстрирующие различную частоту окраски ядер или цитоплазмы опухолевых клеток, обязательно включая поле зрения с максимальным количеством позитивных клеток и интенсивностью окрашивания. Подсчитывается количество позитивно окрашенных клеток и общее число опухолевых элементов в каждом выбранном поле зрения, определяется процентное соотношение числа позитивных клеток к общему числу опухолевых элементов. Окончательный результат — среднее арифметическое полученных пяти значений, округленное до целого числа, результат выражен в процентах.

Интенсивность окрашивания оценивается с применением «правила увеличения». Окрашивание, легко определяемое при увеличении объектива  $\times 5$ , имеет выраженную интенсивность окраски. Умеренная реакция четко идентифицируется при увеличении объектива  $\times 20$ . Окрашивание, заметное только при увеличении объектива  $\times 40$ , оценивается как слабое.

При определении количества позитивных клеток как с ядерным, так и цитоплазматическим окрашиванием, используется следующая система определения баллов: 0 — реакция в менее чем 10% клеток, 1 — реактивность в 10–30% клеток, 2 — реактивность в 31–49% клеток, 3 — реактивность в 50% или более клеток опухоли.

При определении фенотипа опухоли как «базально-клеточный» учитывается позитивное окрашивание с антителами к *CK 5/6* равное или более чем в 50% клеток опухоли.

#### **6. Определение биологической агрессивности переходно-клеточного рака и вероятности прогрессирования опухоли**

При наличии у пациента первичного или рецидивного рака мочевого пузыря выполняют его цистоскопическое исследование, в ходе которого производится оценка клинических факторов риска прогрессирования и трансуретральная резекция (возможно, полная) опухоли. В ходе гистологического исследования материала определяется степень злокачественности переходно-клеточного рака, местной распространенности опухоли, наличие сопутствующего рака *in situ*.

Выявляют риск прогрессирования опухоли по критериям EORTC (методика доступна <https://www.eortc.be/tools/bladdercalculator>).

У пациентов с высоким риском прогрессирования выполняется иммуногистохимическое исследование опухолевого материала с антителами к p53, CK5/6.

При наличии в переходно-клеточном раке позитивной ядерной реакции с антителами к p53 в 50% или более клеток и/или позитивной цитоплазматической реакции с антителами к СК 5/6 в 50% или более клеток опухоли прогноз в отношении прогрессирования считается абсолютно неблагоприятным. Данной группе пациентов рекомендуется выполнение радикальной цистэктомии (рисунок 3).



Рисунок 3 — Алгоритм определения вероятности прогрессирования рака мочевого пузыря

### ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

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 тканевого материала (недостаточное или чрезмерное время фиксации, применение кислого, а не рН-нейтрального формалина), нарушениях технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим).

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