

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

20.12.2011 г.

Регистрационный № 113-1111

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО I–IIВ СТАДИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

Д-р. мед. наук, проф. В.В. Жарков, д-р. биол. наук Р.М. Смолякова,
д-р. мед. наук В.П. Курчин, В.А. Матусевич, И.М. Мишута, О.В. Готько,
Т.И. Набебина, А.Н. Курченков

Минск 2011

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ИГХ — иммуногистохимия
НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого
РЛ — рак легкого
bcl-2 — белок-ингибитор апоптоза
p53 — супрессор опухолевого роста
Ki-67 — ядерный антиген пролиферативной активности

Инструкция разработана с целью определения экспрессии молекулярно-биологических тканевых маркеров при раке легкого для определения прогноза прогрессирования заболевания и индивидуализации тактики лечения.

Область применения: онкология, патологическая анатомия, молекулярная биология, медицинская генетика.

Уровень внедрения: специализированные онкологические центры; диспансеры; патологоанатомические отделения, бюро; молекулярно-генетические лаборатории.

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.
7. Таймер.

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.
5. 96° спирт.
6. Перекись водорода 3%.
7. Tris-HCl — отмывочный буфер рН 7,5.
8. Буфер для разведения специфических антител.
9. Буфер для демаскировки антигенов рН 9,0.

10. Первичные антитела к p53, bcl-2, Ki-67. Обязательным условием является наличие в спецификации указания о возможности использования на формалин-фиксированных тканях человека.

11. Системы визуализации к мышинным и кроличьим антителам или универсальная система.

12. Диаминобензидин (DAB).

13. Канадский бальзам.

14. Карандаш для ИГХ.

15. Гематоксилин Майера.

16. Деионизированная вода.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак легкого.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не выявлены.

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

При иммуногистохимическом исследовании специфичных тканевых маркеров необходимо использовать фиксированные в формалине и заключенные в парафин опухолевые блоки, полученные при рутинной патологоанатомической работе.

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

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

2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° на 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. Иммуногистохимическая реакция

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.

2. Нанести разведенное 1:300 в Tris-буфере с 1% БСА 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 мышечных 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.

Критерии оценки маркера p53:

- опухоль считается *негативной по экспрессии тканевого антигена p53*, если в ткани опухоли отсутствует ядерная реактивность с антителами или количество окрашенных клеток менее 5%;
- опухоль считается *позитивной по экспрессии тканевого антигена p53*, если окрашено более 5% ядер опухолевых клеток, слабопозитивной — при реакции 6–30%, умеренно позитивной — 31–70% и сильнопозитивной — 71–100%.

Описание технологии использования иммуногистохимического метода определения экспрессии bcl-2 (клон 124)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола на 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° на 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 $t = 98\text{ }^{\circ}\text{C}$.
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. Иммуногистохимическая реакция

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.
2. Нанести разведенное 1:75 в Tris-буфере с 1% БСА первичное антитело (анти-bcl-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.

Критерии оценки маркера bcl-2:

- опухоль считается *негативной по экспрессии антиапоптотического протеина bcl-2*, если в ткани отсутствует цитоплазматическая реактивность с антителами;
- опухоль считается *позитивной по маркеру* при окрашивании цитоплазмы в более 10% опухолевых клеток.

Описание технологии использования иммуногистохимического метода определения экспрессии Ki-67 (клон М1В-1)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола на 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° на 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 рН 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. Иммуногистохимическая реакция

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.

2. Нанести разведенное 1:100 в Tris-буфере с 1% БСА первичное антитело (анти-Ki-67) 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.

Критерии оценки маркера Ki-67:

- пролиферативную активность опухоли оценивают как процент Ki-67-позитивных клеток;
- опухоль считается *негативной по экспрессии тканевого антигена Ki-67*, если в ткани отсутствует ядерное окрашивание с антителами или количество окрашенных клеток менее 10%;
- при исследовании пролиферативной активности опухолевых клеток ядерное окрашивание считается *позитивным при окраске более 10% ядер опухолевых клеток* (оценка в области максимальной экспрессии маркера); высокая пролиферативная активность соответствует экспрессии Ki-67 в $\geq 40\%$ опухолевых клеток, низкая пролиферативная активность — в $<40\%$ ядер опухолевых клеток.

Иммуногистохимическая оценка уровней экспрессии тканевых антигенов в опухолевой ткани позволяет выделить группу пациентов с высоким риском прогрессирования заболевания в целях патогенетически обоснованной индивидуализации схем адьювантной терапии больных НМРЛ I–IIВ стадии при:

- 1) выявлении сильнопозитивной (71–100% окрашенных ядер опухолевых клеток) иммунологической реактивности супрессорного апоптотического онкопротеина p53;
- 2) определении *позитивной* (более 10% опухолевых клеток, имеющих цитоплазматическое окрашивание) реакции по экспрессии антиапоптотического протеина bcl-2;
- 3) детекции уровня высокой пролиферативной активности (окрашивание в $\geq 40\%$ ядер опухолевых клеток) антигена Ki-67.

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.