

Министерство здравоохранения Республики Беларусь



УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

Д.Л. Пиневиц

16 декабря 2016 г.

Регистрационный № 117-1216

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ**

Инструкция по применению

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

Авторы: д.м.н., проф. Э.А. Жаврид, д.м.н. Н.Н. Антоненкова, М.В. Дечко,
И.С. Дулинец

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

16.12.2016

Регистрационный № 117-1216

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Э.А. Жаврид, д-р мед. наук Н.Н. Антоненкова, М.В. Дечко, И.С. Дулинец

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на его диагностику.

Метод предназначен для врачей-онкологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациенткам, страдающим раком молочной железы, в стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
2. pH-метр.
3. термостат;
4. Автоматические пипетки переменного объема.
5. RT-Module.
6. Световой микроскоп.
7. Таймер.
8. Силанизированные предметные стекла.
9. Покровные стекла.
10. Лабораторная посуда (колбы, пробирки, стеклянные палочки, воронки, стаканы, контейнеры для предметных стекол).
11. Ксилол.
12. 96° этиловый спирт (этанол).
13. Перекись водорода 3 %.
14. Tris-буфер.
15. Жидкость для разведения специфических антител.
16. Буфер для демаскировки антигенов, pH = 6,0.
17. Буфер для демаскировки антигенов, pH = 9,0.
18. Цитратный буфер для демаскировки антигенов, pH = 6,0.
19. Первичные антитела, позволяющие использовать их на формалин-фиксированных тканях человека.
20. Системы визуализации к мышинным и кроличьим антителам или универсальные.
21. Диаминобензидин (ДАБ).
22. Канадский бальзам.
23. Карандаш для иммуногистохимии (ИГХ).
24. Гематоксилин Майера.
25. Дистиллированная вода.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак молочной железы.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Получение материала для иммуногистохимического исследования (трепан-биопсия опухоли, операция).

2. Определение экспрессии основных маркеров рака молочной железы (рецепторы эстрогена — ER, рецепторы прогестерона — PR, онкобелок Her2/neu, пролиферативный индекс Ki-67) иммуногистохимическим методом.

Для иммуногистохимического исследования специфичных тканевых маркеров необходимо использовать фиксированные в формалине и заключенные в парафин опухолевые блоки, полученные при рутинной патологоанатомической работе. Процедура иммуногистохимического исследования проводится при комнатной температуре.

2.1. Метод определения экспрессии рецепторов к эстрадиолу и прогестерону
I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Помещают стекла с парафиновыми срезами последовательно в 2 порции ксилола на 10 мин.

2. Стекла помещают последовательно в 3 порции этанола 96° на 4 мин.

3. Промывают 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. Помещают срезы в емкость с демаскировочным буфером pH = 9,0 и погружают на 20 мин в RT-Module при температуре +98 °С.

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

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

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

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

III этап. Иммуногистохимическая реакция

1. Срезы обводят карандашом для ИГХ.

2. Наносят разведенные, или готовые к употреблению, первичные антитела (анти-ER, анти-PR) и инкубируют срезы при комнатной температуре 30 мин.

3. Сливают со срезов жидкость.

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

5. Наносят на срезы визуализирующую систему на 30 мин.

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

7. Наносят раствор ДАБ. Приготавливают ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы. Длительность инкубации с ДАБ составляет 5 мин.

8. Сливают со срезов жидкость и промывают дистиллированной водой.

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

10. Промывают дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов

1. Обезвоживание в спиртах.

2. Просветление в ксилоле.

3. Заключение в канадский бальзам.

Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания проводится с помощью светового микроскопа (увеличение $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$). Для всех маркеров необходимо оценивать локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана), интенсивность пероксидазной метки (в области с максимальной экспрессией) и долю окрашенных клеток. Результат ИГХ-определения ER и PR представлен в виде окрашенных в коричневый цвет ядер с различной интенсивностью окраски. Экспрессию рецепторов ER и PR оценивают по балльной системе. Доля окрашенных опухолевых клеток (0–5 баллов; 0 баллов — отсутствие окрашивания; 1 балл — количество окрашенных клеток >0 , но меньше $1/100$; 2 балла — от $>1/100$ до $1/10$; 3 балла — от $>1/10$ до $1/3$; 4 балла — от $>1/3$ до $2/3$; 5 баллов — от $>2/3$ до 1) и интенсивность окраски (0–3 балла) составляют суммарный балл. Опухоль считают позитивной по содержанию ER, PR при суммарном балле 3 или более.

2.2. Метод определения экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста Her2/neu

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции

1. Срезы обводят карандашом для ИГХ.

2. Наносят разведенное 1:500 в жидкости для разведения первичное антитело (анти-Her2/neu) и инкубируют срезы при комнатной температуре 30 мин.

3. Сливают со срезов жидкость.

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

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

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

7. Наносят раствор ДАБ. Приготавливают ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.

8. Сливают со срезов жидкость и промывают дистиллированной водой.

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

10. Промывают дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов

Используют следующие критерии оценки маркера:

- опухоль считается отрицательной по Her-2/neu при отсутствии мембранного окрашивания или при окрашивании менее 10 % клеток;
- опухоль оценивается в 1 балл (1+) при неполном окрашивании мембран у более 10 % клеток;
- в 2 балла (2+) — при интенсивности окраски мембран от слабой до умеренной у более 10 % клеток;
- в 3 балла (3+) — при полном окрашивании мембран более 10 % клеток. При оценке экспрессии Her-2/neu в 2+ по результатам иммуногистохимического окрашивания необходимо определение уровня амплификации гена методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

2.3. Метод определения экспрессии Ki-67

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции

1. Срезы обводят карандашом для ИГХ.
2. Наносят разведенное 1:500 в жидкости для разведения первичное антитело (анти-Ki-67) и инкубируют срезы при комнатной температуре 30 мин.
3. Сливают со срезов жидкость.
4. Срезы промывают в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
5. Наносят на срезы визуализирующую систему для мышинных антител на 30 мин.
6. Промывают в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
7. Наносят раствор ДАБ. Приготавливают ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.
8. Сливают со срезов жидкость и промывают дистиллированной водой.
9. Срезы докрашивают гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально (1 мин).
10. Промывают дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов

Используют следующие критерии оценки маркера Ki-67: при исследовании пролиферативной активности опухолевых клеток ядерное окрашивание считается положительным при окраске более 20 % опухолевых клеток, оценивая в области максимальной экспрессии маркера. Пролиферативную активность опухоли оценивают как процент Ki-67 положительных клеток. Высокая пролиферативная активность опухоли соответствует экспрессии Ki-67 в >20 % клеток, низкая — экспрессии Ki-67 в ≤20 % клеток.

Интерпретация полученных результатов согласно сочетаниям показателей основных маркеров

Интерпретация результатов иммуногистохимического исследования основана на сочетаниях показателей основных иммуногистохимических маркеров опухоли (ER, PR, Her2/neu и Ki-67).

1. Люминальный А подтип считается таковым при следующих сочетаниях маркеров:

ER = 1 % и более;
PR = 20 % и более;
отсутствие гиперэкспрессии Her2/neu;
Ki-67 = 0–20 %.

2. Люминальный В (Her2-негативный) подтип считается таковым при следующих сочетаниях маркеров:

ER = 1 % и более;
отсутствие гиперэкспрессии Her2/neu;
PR = 0–19 % и/или Ki-67 = 21 % и более.

3. Люминальный В (Her2-позитивный) подтип считается таковым при следующих сочетаниях маркеров:

ER = 1 % и более;
гиперэкспрессия Her2/neu;
любые значения PR и Ki-67.

4. Her2-негативный (нелюминальный) подтип считается таковым при следующих сочетаниях маркеров:

ER = менее 1 %;
PR = менее 1 %;
гиперэкспрессия Her2/neu;
любое значение Ki-67.

5. Триплет-негативный подтип считается таковым при следующих сочетаниях маркеров:

ER = менее 1 %;
PR = менее 1 %;
отсутствие гиперэкспрессии Her2/neu;
любое значение Ki-67.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибочные результаты при исследовании могут быть получены при:

- плохом качестве срезов;
- плохом центрировании микроскопа, несоответствии системе фильтров;
- использовании жесткого режима отмытки гистологического препарата;
- чрезмерно длительной или короткой фиксации материала.