

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

05.03. 2009 г.

Регистрационный № 134-1108

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д-р биол. наук Р.М. Смолякова, канд. мед. наук А.Ч. Дубровский,
В.В. Вабищевич, Н.М. Егорова, Ю.И. Шершнеф

Минск 2009

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

PMЖ	— рак молочной железы
ИГХ	— иммуногистохимия
Ki-67	— пролиферативный маркер
EGFR (PЭФР)	— рецептор к эпидермальному фактору роста
P53	— мутантный супрессор опухолевого роста
ER (PЭ)	— рецептор эстрогена
PR (PI)	— рецептор прогестерона
C-erbB-2, Her-2/neu	— рецептор 2-го человеческого эпидермального фактора роста

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкция разработана с целью определения экспрессии молекулярно-биологических тканевых маркеров при раке молочной железы.

Область применения: онкология.

Уровень внедрения: специализированные онкологические центры, диспансеры.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Перечень необходимого оборудования:

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
2. pH-метр.
3. Термостат.
4. Автоматические пипетки переменного объема.
5. Баня водяная с датчиком температуры.
6. Микроволновая печь мощностью 750–800 Вт.
7. 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.
5. 96° спирт.
6. Перекись водорода 3%.
7. Tris-HCl — отмывочный буфер, pH 7,5.
8. Цитратный буфер для демаскировки антигенов, pH 6,0.
9. Буфер для демаскировки антигенов, pH 6,0.

10. Буфер для демаскировки антигенов, рН 9,0.
11. Первичные антитела к РЭ, РП, Her-2/neu, P53, Vcl-2, Ki-67, EGFR. Обязательным условием является наличие в спецификации указания на возможность использования на формалин-фиксированных тканях человека.
12. Системы визуализации к мышинным и кроличьим антителам или универсальная (LSAB и EnVision).
13. Диаминобензидин (DAB).
14. Канадский бальзам.
15. Карандаш для ИГХ.
16. Гематоксилин Майера.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак молочной железы.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не выявлены.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ER (КЛОН 1D5), PR (КЛОН PGR 636) С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

Для проведения иммуногистохимического исследования специфичных 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 2 порции ксилола на 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в 3 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 6,0 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 неразведенные первичные антитела (анти-ER, анти-PR) 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. Длительность инкубации с ДАБ устанавливается в каждой лаборатории отдельно, для чего необходимо следить за процессом появления коричневого окрашивания под микроскопом. Время окрашивания считается достаточным, если структуры, подлежащие окрашиванию, приобрели золотисто-коричневый цвет.
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.

Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания проводится с помощью светового микроскопа (увеличение x10, x20, x40). Для всех маркеров необходимо оценивать локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана), интенсивность пероксидазной метки (в области с максимальной экспрессией) и доля 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 оценивали 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) составляли суммарный балл. Опухоль считали *позитивной* по содержанию ER, PR при суммарном балле 3 или более.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ HER-2/NEU (ПОЛИКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в 2 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 цитратным буфером для демаскировки антигенов рН 6,0 и обработать в микроволновой печи в течение 12 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 1:900 в Tris-буфере с 1% БСА первичное антитело (анти-Her-2/neu) 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 Her-2/neu* при отсутствии мембранного окрашивания или при окрашивании менее 10% клеток;

– опухоль оценивать 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).

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

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в 2 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°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 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 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 слабо позитивной — при 6–30%, умеренно позитивной — при 31–70% и сильно позитивной — при 71–100%.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ VCL-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 °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. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.
2. Нанести разведенные 1:75 в Tris-буфере с 1% БСА 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 KI-67 (КЛОН MIB-1)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в 2 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 °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 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.

Рекомендуются следующие критерии оценки маркера **Ki-67**: при исследовании пролиферативной активности опухолевых клеток ядерное окрашивание считать *положительным при окраске более 10% опухолевых клеток*, оценивая в области максимальной экспрессии маркера. Пролиферативную активность опухоли оценивать как процент Ki-67 положительных клеток. Высокая пролиферативная активность опухоли соответствует экспрессии Ki-67 в $\geq 40\%$ клеток, низкая — экспрессии Ki-67 в $< 40\%$ клеток.

Описание технологии использования иммуногистохимического метода определения экспрессии EGFR (Е 30)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в 2 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=6,0 и погрузить на 30 мин в водяную баню при t=98 °С.
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 1:25 в Tris-буфере с 1% БСА первичное антитело (анти-EGFR) 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 **EGFR**:

- опухоль считать *отрицательной по EGFR* при отсутствии мембранного окрашивания или при окрашивании менее 10% клеток;
- опухоль оценивать в 1 балл (1+) при неполном мембранном окрашивании 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.

Представленные иммуногистохимические методики позволяют стандартизировать проводимые исследования в специализированных лечебных учреждениях РБ и выявлять прогностические маркеры при раке молочной железы. В зависимости от уровня экспрессии тканевых молекулярно-биологических маркеров больные раком молочной железы могут быть отнесены к группам низкого и высокого риска опухолевой прогрессии. Неблагоприятными прогностическими факторами при раке молочной железы являются повышение пролиферативной активности опухолевых клеток более 10%, определяемой по экспрессии Ki-67, экспрессия мутантного супрессорного белка P53, снижение экспрессии Vcl-2, гиперэкспрессия EGFR.

В группе больных с низким риском наличие экспрессии P53, Ki-67, Her-2/neu и отсутствие экспрессии Vcl-2 сопряжено со снижением общей выживаемости больных, т.е. данные тканевые показатели являются маркерами неблагоприятного прогноза. Наличие фенотипа P53+ Ki-67+ Her-2/neu + Vcl-2 у больных раком молочной железы группы низкого риска свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания и агрессивности опухолевого процесса, что определяет необходимость иммуногистохимического исследования вышеперечисленных маркеров для получения адекватной характеристики опухоли.

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.