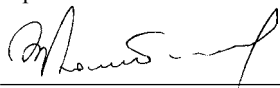


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

11 апреля 2003 г.

Регистрационный № 14–0103

**КОМПЛЕКСНАЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ  
ДИАГНОСТИКА МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА  
ЛЕГКОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТОВОЙ  
МИКРОСКОПИИ И ИММУНОГИСТОХИМИИ**

Инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:** ГУ «Научно-исследовательский институт онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

**Авторы:** д-р мед. наук, проф. В.В. Жарков, канд. мед. наук В.П. Курчин, канд. мед. наук П.И. Моисеев, канд. мед. наук А.Ч. Дубровский, Е.И. Юневич

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Разработанный метод комплексной гистологической диагностики мелкоклеточного рака легкого (МКРЛ) предназначен для морфологической верификации диагноза по биопсийному или операционному материалу.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАГЕНТОВ**

Световой микроскоп, краситель гематоксилин-эозин, 3% раствор  $H_2O_2$  в метаноле, 0,01 моль цитратный буфер PH 6,0, 0,1% раствор трипсина в TBS- $CaCl_2$  буфере, моноклональные и поликлональные антитела Synaptophysin (SYN, 1:50, DAKO), Chomogranin A (CGA, 1:50, DAKO), Cytokeratin High Molecule Weight (CK34bE12, 1:50, DAKO), Neural Cell Adhesion Molecule NCAM (CD 56, 1:50, MONOSAN), Leucocyte Common Antigen (LSA, 1:50, DAKO), Cytokeratin 8 (CAM 5,2, 1:50, DAKO), стрептавидин-биотин-пероксидазный комплекс (Strept ABC/HRP Kit, DAKO), 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорид (DAB, DAKO) в качестве хромогена, гематоксилин Harygs's (Sigma).

## **ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО МЕТОДА**

Метод включает оценку в срезах опухоли микроскопической картины и обнаружение специфических иммуногистохимических маркеров.

Учитываются следующие морфологические критерии при стандартной окраске гематоксилин-эозином: форма ядра; ядерно-цитоплазматическое соотношение; характер распределения хроматина, визуализация ядрышка; объем некроза в опухоли; наличие розеткоподобных структур ((-) — отсутствуют; (+) — единичные в одном поле зрения ( $\times 20$ ); (++) — не менее 2 в одном поле зрения ( $\times 10$ ), (+++) — более 2 розеток в одном поле зрения ( $\times 10$ )), а также лимфоцитарная инфильтрация в строме опухоли.

Для иммуногистохимического исследования депарафинированные и дегидратированные срезы обрабатывают 3% раствором  $H_2O_2$  в метаноле для инактивации эндогенной пероксидазы. Для восста-

новления антигенной специфичности и увеличения антигенных свойств белка применяется технология микроволновой предобработки срезов в 0,01 моль цитратном буфере pH 6,0 и протеолитическая предобработка 0,1% трипсином в TBS-CaCl<sub>2</sub> буфере. Срезы инкубируют с моноклональными и поликлональными антителами, указанными выше, в течение 1 ч во влажной камере при комнатной температуре. Для выявления иммунного окрашивания используется стандартный метод: стрептавидин-биотин-пероксидазный комплекс (Strept ABC/HRP Kit, DAKO) с 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлоридом (DAB, DAKO) в качестве хромогена. Ядра докрашивают гематоксилином Hargys's (Sigma). Результаты иммуногистохимической реакции оцениваются по наличию специфического продукта — желтовато-коричневого окрашивания ядра, цитоплазмы и цитоплазматической мембраны: (–) — нет специфической окраски, (+/-) — 1–2 клетки позитивно окрашены, (+) — 1–10% позитивно окрашенных клеток, (++) — 10–50% позитивно окрашенных клеток, (+++) — >50% позитивно окрашенных клеток.

### **Основные диагностические критерии МКРЛ**

Основными диагностическими параметрами МКРЛ при световой микроскопии являются: форма ядра, характер распределения хроматина в ядре, ядерно-цитоплазматическое соотношение, митотическая активность и наличие розеткоподобных структур.

Для *овсяноклеточного типа* МКРЛ характерны округлые, овальные или чуть веретеноподобные ядра с диффузным хроматином и скудной цитоплазмой в виде узкого, слабо контурируемого ободка; ядрышки не видны или очень маленькие; обширный некроз; высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Для *промежуточного типа* характерны округлые, полигональные ядра с мелкозернистым хроматином и более выраженной цитоплазмой; наличие в ядре крупных клеток эозинофильного ядрышка; некроз менее 50%; более низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Минимальная диагностическая панель МКРЛ должна быть представлена следующими иммуногистохимическими маркерами: CD 56 как сохраняющего высокую экспрессию антигена даже в поврежденных опухолевых клетках; SYN и CGA, которые могут

быть использованы в дифференциальной диагностике типов МКРЛ, проявляя наиболее высокую экспрессию при овсяноклеточном типе; высокомолекулярный цитокератин СК34bE12 для дифференциальной диагностики низкодифференцированного плоскоклеточного рака и МКРЛ; LSA для исключения неходжкинской лимфомы; низкомолекулярный цитокератин САМ 5,2, специфичный для нейроэндокринной карциномы.

Применение разработанного метода позволяет повысить точность гистологической диагностики МКРЛ на 9,2%.

*Диагностический алгоритм* заключается в следующем: проведение световой микроскопии с выявлением основных параметров, позволяющих предполагать МКРЛ, затем иммуногистохимическое исследование с применением CD 56, SYN и CGA. При получении позитивной реакции продолжается микроскопическое исследование для окончательного заключения с указанием типа МКРЛ. В сомнительных случаях проводится реакция с СК34bE12, LSA, САМ 5,2.

*Возможные ошибки:* ошибочные результаты при проведении комплексной гистологической диагностики МКРЛ могут быть получены в результате нарушения условий подготовки исследуемого материала. Необходимо соблюдение следующих требований: достаточная «вырезка» материала и адекватная фиксация в формалине (в крайнем случае — хранение в холодильнике до фиксации не более 5 ч). Нарушение этих требований затрудняет интерпретацию результатов иммуногистохимического исследования вследствие диффузии и разрушения антигена.

*Противопоказания к применению метода:* не выявлены.