

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный № 147-1115

**МЕТОДЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И  
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**  
инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного  
образования»,

ГУ «Республиканский научно-практический центр  
трансфизиологии и медицинских биотехнологий»

Авторы:

к.м.н. Портянко А.С., д.м.н. Горгун Ю.В., к.м.н. Неровня А.М.,  
к.м.н. Бич Т.А., Межеевский А.Б., к.б.н. Дорошенко Т.М., к.б.н.  
Акалович С.Т.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложены методы морфологической диагностики и прогнозирования течения колоректального рака, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и лечение опухолевых заболеваний толстой и прямой кишки.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим опухолевыми заболеваниями колоректальной области.

**Показания к применению:** полип прямой кишки (K62.0), злокачественные новообразования ободочной кишки, ректосигмоидного соединения, прямой кишки (C18 – C20), доброкачественные новообразования ободочной и прямой кишки (D12.0 – D12.8), карцинома *in situ* ободочной кишки, ректосигмоидного соединения, прямой кишки (D01.0 – D01.2), болезнь Крона толстой кишки (K50.1), язвенный колит (K51.2 – K51.4), синдром раздраженного кишечника (K58).

**Противопоказания к применению:** отсутствуют.

#### **Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и расходных материалов**

Медицинские изделия:

1) микроскоп; 2) микротом; 3) нагреваемая барокамера или микроволновая печь; 4) тканевой процессор; 5) заливочный центр; 6) холодильник; 7) вытяжной шкаф; 8) таймер.

Расходные материалы:

1) автоматические дозаторы и наконечники к ним объемом 1-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, лабораторная посуда (стеклянные емкости

для фиксации материала, стаканы, контейнеры для предметных стекол, инструментарий для приготовления гистологических препаратов, кассеты и емкости для изготовления парафиновых блоков, предметные, силанизированные предметные и покровные стекла);

2) реактивы для гистологической проводки тканей, изготовления парафиновых блоков, приготовления микропрепаратов, окрашенных гематоксилином-эозином (формалин, этапол, ксилол, парафин, воск, гематоксилин, эозин, глицерин, соляная кислота, аммиак, канадский бальзам);

3) реактивы для проведения иммунофенотипирования (ксилол, 96° этиловый спирт, перекись водорода 3%, Tris-HCl отмывочный буфер, pH 7.5, цитратный буфер для демаскировки антигенов, pH 6.0, буфер для демаскировки антигенов, pH 9.0, первичные антитела к MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2, ацетилированному  $\alpha$ -тубулину и  $\beta$ III-тубулину, системы визуализации к мышинным и кроличьим антителам или универсальная система визуализации, хромоген – диаминобензидин (ДАБ), монтирующая среда для покровных стекол, карандаш для ИГХ, гематоксилин Майера).

## **ОПИСАНИЕ МЕТОДА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Морфологическое исследование материала, полученного при эндоскопическом исследовании толстой кишки

1.1. Изготовление гистологических препаратов

Биоптаты кишки дегидратируются в батарее спиртов восходящей концентрации при помощи тканевого процессора, заключаются в парафин с сохранением ориентации с использованием заливочного центра. Намного проще сохранить правильную ориентацию биоптата при наличии в заливочном центре «холодной точки». Из блоков

изготавливаются гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые окрашиваются гематоксилином и эозином и заключаются в «канадский бальзам» или аналогичную среду, покрываются покровным стеклом.

## 1.2. Гистологическая оценка биоптатов

Поводом для дифференциальной диагностики опухолевых доброкачественных или злокачественных процессов является наличие в препарате любого из следующих признаков:

- железы, состоящие из гиперхромных клеток;
- «зубчатый» просвет желез;
- мелкие комплексы эпителиальных клеток;
- десмоплазия собственной пластинки слизистой оболочки;
- перстневидные клетки;
- «озера» слизи.

Железы, состоящие из гиперхромных клеток, могут наблюдаться при ряде состояний:

- 1) В норме клетки дна крипт, а также крипт вблизи лимфоидных фолликулов имеют более гиперхромное ядро, чем другие колоноциты.
- 2) При остром или хроническом колите в очаге воспаления снижается содержание бокаловидных клеток и у регенерирующих колоноцитов увеличивается ядро, а цитоплазма становится амфотрофной или даже базофильной.
- 3) Дисплазия эпителия характеризуется увеличенными гиперхромными ядрами, снижением/исчезновением бокаловидных клеток и муцина, амфотрофностью/базофильностью цитоплазмы.
- 4) Клетки аденокарциномы в большинстве случаев гиперхромны.

Отличительной особенностью «опухолевой гиперхромии», которая и представляет собой истинную дисплазию, является распространение данного гистологического феномена на

поверхностный эпителий. Воспалительная «псевдодисплазия», а также гиперхромный вид определенных нормальных крипт никогда не вовлекают поверхностный эпителий. При невозможности определить данный признак, следует серийно «дорезать» гистологический блок с последующей окраской гематоксилином и эозином с целью визуализации поверхностного эпителия.

#### Признаки реактивного / регенерирующего эпителия:

- 1) Эпителий созревает по направлению к поверхности:
  - а) приобретает больше цитоплазмы, появляется муцин;
  - б) ядра уменьшаются, располагаются базальнее.
- 2) Обычно ассоциирован с активным воспалением.
- 3) Митозы ограничены базальным отделом крипт.

При отсутствии признаков злокачественного роста истинная дисплазия должна классифицироваться как аденома с указанием ряда дополнительных признаков:

- 1) степень дисплазии (низкая или высокая);
- 2) строение аденомы (тубулярная, виллезная, тубуловиллезная);
- 3) возможность отнесения к «продвинутым» аденомам;

#### Дифференциальный диагноз степеней дисплазий.

К дисплазии высокой степени (она же тяжелая дисплазия, cancer in situ) относят участки слизистой оболочки, характеризующиеся следующими признаками:

- 1) выраженный клеточный полиморфизм:
  - а) округлые, налегающие друг на друга клетки, с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением;
  - б) в ядрах «просветленный» хроматин, выраженные ядрышки;
- 2) выраженная ядерная стратификация и потеря полярности: потеря базальной ориентации, ядра смещаются в апикальную половину клетки;

3) повышенная митотическая активность, атипичные митозы;

4) архитектурные аномалии:

- а) иррегулярные железы;
- б) железы «спинка-к-спинке»;
- с) крибриформность;
- д) солидные гнезда.

#### Дифференциальный диагноз аденом различного строения.

Виллезный компонент – вытянутые листовидные (длина как минимум в два раза превышает ширину) выпячивания диспластичного эпителия. Тубулярные аденомы – менее 25% виллезного компонента, тубуловиллезные – 25-75%, виллезные – более 75%.

Критерии продвинутых аденом (наличие хотя бы одного из признаков):

- 1) размер более 1 см;
- 2) тубуловиллезное или виллезное строение;
- 3) наличие дисплазии высокой степени.

#### Примеры гистологического заключения.

Продвинутая (> 1 см) тубуловиллезная аденома толстой кишки с дисплазией низкой степени.

Тубулярная аденома толстой кишки с дисплазией низкой степени.

Мелкий фрагмент слизистой оболочки толстой кишки с неопределенной дисплазией.

Хронический непрерывный диффузный активный колит с воспалительной псевдодисплазией.

«Зубчатый» или «звездчатый» просвет желез может наблюдаться в ряде случаев:

- 1. гиперпластический полип;

2. традиционная зубчатая аденома;
3. зубчатая аденома на широком основании.

Отличительные признаки гиперпластического полипа:

- 1) Строение – вытянутые воронко-образные крипты:
  - а) созревание эпителия по направлению к поверхности;
  - б) толстый слой коллагеновых волокон вокруг крипт;
  - в) внутри просвета крипт – «клубки» эпителия; на поперечном срезе – «зубчатый» или «звездчатый» вид просвета.
  - г) расширение и звездчатость просвета крипт ограничены верхней частью крипт;
  - д) пролиферативная активность ограничена нижней частью крипт;
  - е) митозы – в базальной части крипт, атипичных митозов нет
- 2) Клетки – «гиперзрелость» на поверхности:
  - а) размеры больше, чем в норме;
  - б) наползают друг на друга;
  - в) в основном – абсорбирующие колоноциты, мало бокаловидных клеток;
  - г) в клетках – обильная цитоплазма с многочисленными каплями муцина;
  - д) маленькие, округлые, одинаковые, базально расположенные ядра;
  - е) нет гиперхромии, атипии или стратификации.

Отличительные признаки традиционной зубчатой аденомы:

- 1) Макроскопически – экзофитное образование, полип.
- 2) Расширение и звездчатость просвета крипт – на всем протяжении крипт, включая базальные отделы.
- 3) Митотическая активность в верхней части крипт.
- 4) Гиперэозинофильная цитоплазма, выраженные ядрышки.

5) Нет утолщенного субэпителиального слоя коллагена.

6) Дисплазия поверхностного эпителия:

а) псевдостратифицированные, наползающие друг на друга ядра;

б) незрелый поверхностный эпителий, незрелые бокаловидные клетки.

Отличительные признаки зубчатой аденомы на широком основании:

1) Расширение и звездчатость просвета крипт усиливаются по направлению к основанию крипт.

2) Ветвление и латеральный рост крипт вдоль мышечной пластинки слизистой оболочки: горизонтальные, L- и T-образные основания крипт.

3) Митозы – в верхней части крипт.

4) Нет утолщенного субэпителиального слоя коллагена.

5) Инвертированное созревание: бокаловидные клетки в основании крипт.

6) Снижение содержания муцина в поверхностном эпителии, гиперэозинофилия цитоплазмы.

7) Классическая дисплазия не наблюдается, однако может присутствовать небольшое увеличение размера ядер, везикулярные ядра с выраженными ядрышками, а также очаговая псевдостратификация эпителия в верхней части крипт.

Полноценная дифференциальная диагностика этих образований возможна только при условии правильной ориентации биоптата и исследования удаленного полипа, а не биопсий из полипа. Более того, при морфологической диссекции удаленных полипов следует разрезать полип строго через его основание или ножку и исследовать весь полип, а не выборочные участки.



Единичные эпителиальные клетки, а также мелкие комплексы эпителиальных клеток являются достоверным признаком инвазивного роста и не встречаются при других заболеваниях. Для улучшения визуализации отдельных клеток рекомендуется использовать иммуногистохимическую окраску с антителами к панцитокератину.

Десмоплазия стромы – также важный признак инвазивного роста. Ее следует оценивать при наличии в биоптате дисплазии высокой степени. Также необходимо проявлять осторожность при оценке данного признака у пациентов с активными колитами и после недавней полипэктомии. Десмопластическая реакция вокруг клеток с дисплазией высокой степени – признак инвазивного роста, не встречающийся при других заболеваниях.

Наличие перстневидных свободнолежащих клеток в собственной пластинке слизистой оболочки – гистологический признак перстневидноклеточного рака толстой кишки. К ним не относятся клетки, имеющие морфологическое строение перстневидных, но в пределах эпителиальных структур, например, крипт. В некоторых случаях, особенно, если речь идет о единичных клетках, за перстневидные клетки могут быть приняты макрофаги, активированные плазматические клетки, а также капилляры. В случае сомнения следует использовать дополнительные методы окраски – гистохимическая окраска ШИК, либо иммуногистохимическая окраска с антителами к панцитокератину.

«Озера» слизи – замкнутые полости, заполненные слизью, – достоверный признак слизистого рака, однако, в биопсийном материале не всегда хорошо визуализируется слизь. В случае сомнения следует использовать дополнительные гистологические срезы и окраску ШИК, а также антителами к эндотелиальным клетками (CD31, CD34 и др), и к

эндотелию лимфатических капилляров (D2-40). Важно убедиться, что «полость» не является расширенным кровеносным или лимфатическим сосудом.

Критерии диагностики инвазивной карциномы:

- 1) Признаки инвазивного роста в подслизистую основу:
  - а) десмоплазия вокруг желез с дисплазией высокой степени;
  - б) наличие рядом с диспластичными клетками жировой ткани, кровеносных сосудов среднего калибра, нервных стволиков и лимфатических сосудов;
- 2) Архитектурная и цитологическая атипия:
  - а) единичные эпителиальные клетки или комплексы в строме;
  - б) иррегулярные угловатые контуры желез с зазубренными краями
- 3) Внутри- или внеклеточное накопление муцина:
  - а) перстневидные клетки в строме;
  - б) озера слизи в строме.

## 2. Морфологическое исследование операционного материала

### 2.1. Морфологическая диссекция операционного материала

#### 2.1.1. Подготовка к диссекции

Резецированный фрагмент кишечника должен быть доставлен в патологоанатомическую лабораторию как можно скорее, после операции. В случае отсутствия такой возможности требуется без каких-либо дополнительных манипуляций (например, отрезания краев резекции или вскрытия просвета) опустить материал как можно скорее после извлечения из тела пациента в емкость с 10% забуференным формалином, объем которого в несколько раз превышает бы объем операционного материала.

После доставки в патологоанатомическую лабораторию, кишка должна быть отмыта от каловых масс и визуально обследована на предмет наличия перфораций с последующей документацией этого факта. В случае, если присланный материал является прямой кишкой, то следует выполнить дополнительные манипуляции:

1) определить уровень выполненной эксцизии (по протоколу ARISTOTLE):

а) мезоректальный: вся мезоректальная фасция – гладкая, без повреждений, нет сужения по направлению к дистальному краю; дефекты не глубже 5 мм;

б) интрамезоректальный: отмечается умеренная неровность мезоректальной поверхности, мышечная оболочка не видна (кроме области пересечения с поднимающей мышцей в области дистального края); умеренное сужение по направлению к дистальному краю;

в) *muscularis propria*: значительная площадь отсутствия мезоректальной ткани, глубокие надрезы и надрывы до мышечной оболочки.

2) с использованием специального маркера для макроматериала пометить неперитонезированную поверхность кишки вокруг опухоли (циркулярный край резекции).

Циркулярный край резекции также рекомендуется отмечать для опухолей восходящей и нисходящей кишки.

Теперь кишка может быть вскрыта по передней поверхности за исключением области самой опухоли, а также 10-20 мм дистальнее и проксимальнее от нее. В просвет, окруженный опухолью, следует провести полоску марли или фильтровальной бумаги, чтобы обеспечить проникновение туда фиксирующего раствора. Допускается вскрытие

кишки над опухолью в случаях небольших и полиповидных, но не циркулярных, образований.

Вскрытый объект может быть прикреплен к пробковой доске или пластине полистирола и помещен в достаточный объем формалина. Рекомендуемое время фиксации до последующей диссекции гистологических блоков – 24-48 часов. После фиксации объект промывают проточной водой.

Диссекцию начинают с идентификации апикального (самого высокого) лимфоузла. Для этого надо найти перевязанный сосуд (-ы) и серийно разрезать этот сосуд с окружающей клетчаткой, продвигаясь по направлению к кишке. Первый обнаруженный таким образом лимфоузел и является апикальным. Если опухоль располагается между двумя основными артериями, целесообразно идентифицировать оба апикальных лимфоузла. Для идентификации лимфоузлов брыжейки последнюю можно отделить от образца с последующими поперечными серийными разрезами с шагом около 1 мм. При условии адекватной фиксации лимфоузлы легко выделяются.

Кишка с опухолью, а также 30 мм дистальнее и проксимальнее от нее, прилежащая клетчатка и брыжейка поперечно разрезаются на «кольца» толщиной 3-4 мм, которые будут содержать опухоль, прилежащие лимфоузлы, брюшину и неперитонизированный край. Рекомендуется последовательно уложить полученные «кольца» на соответствующую поверхность и сфотографировать.

Для дальнейшего гистологического исследования необходимо выбрать следующий материал для гистологических блоков:

- 1) не менее четырех блоков опухоли, содержащих следующие области:
  - а) наиболее глубокой инвазии стенки кишки;

- б) наиболее близко прилежащие к серозной поверхности (не менее двух блоков);
  - в) инвазию вен (мелкие бледные полосы, исходящие от опухоли перпендикулярно к инвазивному краю.);
  - г) вовлечение прилежащих органов;
- 2) область наиболее близкого расположения опухолевой ткани (самой опухоли либо опухоли в составе депозитов или метастазов) к циркулярному краю резекции;
  - 3) проксимальный и дистальный края резекции, если опухоль располагается на расстоянии менее 30 мм от них;
  - 4) блок опухоли с прилежащей неопухолевой слизистой оболочкой;
  - 5) блок с «нормальной» слизистой оболочкой толстой кишки;
  - 6) все найденные лимфоузлы (апикальный лимфоузел маркируется отдельно) – более 4 см в диаметре можно разрезать вдоль длиннейшей оси;
  - 7) любые аномалии, идентифицированные макроскопически;
  - 8) блок с аппендиксом, если таковой есть.

Медиана количества обнаруживаемых лимфоузлов является показателем качества работы отделения в целом и морфолога в частности. Этот показатель не должен быть ниже 12 лимфоузлов на пациента.

В макроскопическом описании следует отметить следующие основные характеристики опухоли:

- 1) локализацию опухоли;
- 2) максимальный диаметр опухоли (вместе с просветом);
- 3) расстояние от опухоли до ближайшего продольного (дистального либо проксимального) края резекции;

- 4) наличие перфорации опухоли (классифицируется как pT4a) – важный фактор прогноза течения КРР [уровень доказательности A];
- 5) расстояние до циркулярного (неперитонизированного) края резекции;
- 6) только для опухолей прямой кишки:
  - а) отношение к перитонеальной складке (выше, ниже или на уровне) влияет на вероятность локорегионального рецидива [уровень доказательности A];
  - б) уровень выполненной экцизии (по протоколу ARISTOTLE) влияет на вероятность локорегионального рецидива [уровень доказательности A].

Все измерения указываются в миллиметрах.

Также можно отметить дополнительные характеристики:

- 1) размеры объекта;
- 2) точная локализация вовлечения циркулярного края по квадрантам;
- 3) толщина и протяженность (длина вдоль кишки) опухоли.

## 2.2. Изготовление гистологических препаратов

Фрагменты кишки дегидратируются в батарее спиртов восходящей концентрации с при помощи тканевого процессора, заключаются в парафин с сохранением ориентации с использованием заливочного центра. Намного проще сохранить правильную ориентацию биоптата при наличии в заливочном центре «холодной точки». Из блоков изготавливаются гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые окрашиваются гематоксилином и эозином и заключаются в «канадский бальзам» или аналогичную среду, покрываются покровным стеклом.

## 2.3. Гистологическое заключение

Основные опухолевые характеристики, которые должны быть отмечены в гистологическом описании:

- 1) гистологический тип опухоли;
- 2) степень дифференцировки;
- 3) максимальный уровень локальной инвазии (pT);
- 4) края резекции (продольный и циркулярный);
- 5) статус лимфоузлов (количество обнаруженных, количество вовлеченных, состояние апикального лимфоузла, pN);
- 6) венозная инвазия;
- 7) степень ответа на предоперационную терапию;
- 8) наличие гистологически подтвержденных отдаленных метастазов;
- 9) другие аномалии.

Гистологический тип опухоли (Классификация опухолей пищеварительной системы, ВОЗ, 2010). Более 90% опухолей КРР – аденокарциномы, большинство из которых экспрессируют цитокератин 20 и фактор транскрипции CDX2, а также негативны к цитокератину 7. Часть опухолей негативны к цитокератину 20. [Гистологический тип опухоли имеет важное значение для лечения и прогноза – уровень доказательности С].

К слизистым аденокарциномам относятся опухоли, более, чем на 50%, состоящие из внеклеточного муцина. Аденокарциномы, содержащие менее 50% экстрацеллюлярной слизи классифицируются как «содержащие слизистый компонент».

Перстневидноклеточный рак – вариант аденокарциномы, более 50% клеток которой представлены перстневидными клетками (большое количество внутриклеточной слизи, смещающее ядро на периферию клетки). Аденокарциномы, содержащие менее 50% перстневидных

клеток, классифицируются как «содержащие перстневидноклеточный компонент».

Медуллярный рак – редкий вариант КРР, характеризующийся полями злокачественных клеток с везикулярным ядром с выраженным ядрышком и обильной эозинофильной цитоплазмой.

Зубчатая аденокарцинома – редкий вариант КРР, характеризующийся строением, напоминающим зубчатую аденому (зубчатость желез и низкое ядерно-цитоплазматическое отношение).

Крибриформная комедо-карцинома – редкий вариант аденокарциномы, напоминающий аналогичный вид рака молочной железы за счет преобладания большой крибриформных желез с некротическими массами в центре.

Микропапиллярная аденокарцинома - редкий вариант КРР, построенный из мелких кластеров опухолевых клеток, отделенных от стромы пространством, что создает впечатление массивной инвазии в лимфатические сосуды.

Аденосквамозный рак – необычная опухоль, построенная из двух злокачественных компонентов: аденокарциномы и плоскоклеточного рака. Следует отличать этот вариант от аденокарциномы с мелкими очагами плоскоклеточной дифференцировки.

Веретеновидноклеточный рак – бифазная карцинома с веретеновидноклеточным саркоматоидным компонентом, при этом имеется хотя бы фокальная иммунопозитивность к цитокератину.

Недифференцированная карцинома – редкая ситуация, при которой в эпителиальной злокачественной опухоли отсутствуют морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические признаки, по которым можно было бы ее субклассифицировать.



Другие редкие варианты КРР:

- 1) светло-клеточная карцинома;
- 2) папиллярная аденокарцинома, богатая клетками Панета.

Степень дифференцировки. Традиционно степень дифференцировки аденокарцином определялась по сохраненной способности опухоли формировать железы: более 95% опухоли состоит из желез – хорошо дифференцированная, 50-95% – умеренно дифференцированная, менее 50% – плохо дифференцированная опухоль. Тем не менее, с клинических позиций более адекватными сейчас считаются термины «высокой» и «низкой степени злокачественности». С классической точки зрения, к низко злокачественным относятся опухоли высокой и умеренной степеней дифференцировки, а к высоко злокачественным – плохо дифференцированные аденокарциномы, а также недифференцированные раки. Следует также учитывать, что наличие плохо дифференцированных участков в инвазивном фронте не является достаточным для установления низкой степени дифференцировки всей опухоли. [Степень дифференцировки опухоли имеет важное значение для прогноза – уровень доказательности А].

Для определения степени злокачественности особых форм КРР может потребоваться установления статуса микросателлитной нестабильности (МСН) либо иммуногистохимически (см. ниже), либо методами молекулярной биологии. Так, слизистые, перстневидноклеточные раки и зубчатые аденокарциномы с высоким уровнем МСН относятся к низко злокачественным опухолям, тогда как низкий уровень МСН соответствует высоко злокачественной карциноме. Медуллярный рак почти всегда имеет высокий уровень МСН и относится к низко злокачественным опухолям. В

крибриформной комедо-карциноме обычно обнаруживается низкий уровень МСН. [Уровень МСН опухоли имеет важное значение для лечения и прогноза – уровень доказательности А].

Максимальный уровень локальной инвазии определяет категорию pT. Важно помнить, что критерием для pT4 является либо вовлечение серозной оболочки (pT4a), либо опухолевая инфильтрация прилежащих органов (pT4b). Макроскопически идентифицированная перфорация опухоли автоматически считается вовлечением серозной оболочки и классифицируется как pT4a. Вовлечение брюшины считается таковым, если опухолевые клетки «прорываются» через нее и обнаруживаются непосредственно на поверхности брюшины или лежат свободно со стороны брюшной полости.

Непосредственное прорастание первичной опухоли в серозную оболочку классифицируется как pT4a, тогда как опухолевые депозиты в брюшине (канцероматоз брюшины) в TNM7 рассматривается как отдаленные метастазы (pM1).

Следует также учитывать, что вовлечение прилежащих органов подразумевает прорастание через стенку, а «продольное» распространение, например, на тонкую кишку, на категорию pT не влияет.

[Глубина локальной инвазии определяет прогноз течения и вероятность рецидива КРР – уровень доказательности А].

#### Края резекции.

Если продольный край резекции не исследовался (см. выше) в заключении это указывается. Циркулярный край резекции считается вовлеченным, если расстояние между опухолевой тканью (не имеет значения, первичная ли это опухоль, опухолевый депозит или метастаз в лимфоузле) и перитонизированной поверхностью образца составляет

1 мм и менее. В таком случае выставляется категория R1. [Вовлечение циркулярного края резекции имеет важное значение для прогноза течения опухоли и риска возникновения локорегионального рецидива – уровень доказательности A].

Статус лимфоузлов. Не рекомендуется использовать множественные или серийные срезы, а также иммуногистохимическое исследование, так как нет достаточных данных о какой-либо клинической роли выявленных таким образом микрометастазов. Экстракапсулярная инвазия также не требует отдельного упоминания в гистологическом описании.

Лимфатические узлы отличаются от экстрамуральных лимфоидных агрегатов по наличию периферического синуса. Экстрамуральные опухолевые депозиты без остаточных признаков лимфатического узла рассматриваются как метастазы в лимфоузлы при размере 3 мм и более в диаметре. Аналогичные депозиты меньшего размера при отсутствии метастазов в лимфоузлы классифицируются как N1c (N1a – метастаз в одном региональном лимфоузле, N1b – в 2-3). Отдельно указывается статус апикального лимфоузла. [Статус лимфоузлов определяет прогноз – уровень доказательности A].

Степень ответа на предоперационную терапию (для раков прямой кишки после проведенной лучевой и/или адьювантной терапии) определяется по четырех-ступенчатой схеме:

- 0 – полная регрессия, опухолевые клетки не визуализируются;
- 1 – единичные клетки или мелкие комплексы опухолевых клеток в массивных полях фиброза;
- 2 – остаточные поля опухолевых клеток, но фиброз преобладает;
- 3 – нет признаков регрессии, опухолевые клетки преобладают над фиброзом.

[Степень регрессии в раках прямой кишки имеет важное значение для прогноза течения опухоли – уровень доказательности В].

### 3. Дополнительные методы гистологической окраски

#### 3.1. Определение статуса МСН

Статус МСН следует определять не только в опухоли, но и в неопухолевых фрагментах кишки. Для этого следует взять блок области перехода опухолевой ткани в неопухолевую, либо использовать два блока (опухоли и продольных краев отсечения), причем в таком случае срезу с обоих блоков лучше смонтировать на одно стекло.

В качестве маркеров МСН выступают 4 белка: MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2. Критерием высокого статуса МСН является потеря экспрессии в опухоли одного или двух вышеуказанных белков по сравнению с нормальной тканью.

Показания для иммуногистохимического определения статуса МСН у пациентов с КРР:

- 1) возраст пациента менее 50 лет;
- 2) наличие синхронных или метасинхронных колоректальных или других опухолей, ассоциированных с синдромом наследственного неполипозного колоректального рака (раки эндометрия, желудка, яичников, поджелудочной железы, тонкой кишки, почечной лоханки, мочеточника, билиарного тракта, глиобластома при синдроме Туркота, аденомы слюнных желез, кератоакантомы при синдроме Мюир—Торре);
- 3) гистология, соответствующая высокому статусу МСН (межэпителиальные лимфоциты в опухоли, Кроноподобная реакция, муцинозный, медуллярный или перстневидноклеточный тип аденокарциномы), у пациентов моложе 60 лет;

4) наличие у родственника первой (родители, братья, сестры, дети) или второй линии (бабушки, дедушки, тети, дяди, племянники) родства опухолей, ассоциированных с синдромом наследственного неполипозного колоректального рака.

Если в неопухолеевой ткани отсутствует один или два маркерных белка, рекомендуется провести генетическое тестирование.

### 3.2. Определение прогноза течения и чувствительности к химиотерапии

Изменение экспрессии  $\beta_{III}$ -тубулина и ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в значительной мере ассоциированы с течением КРР в общем и чувствительностью к химиотерапии в частности.

#### 3.2.1. Определение экспрессии $\beta_{III}$ -тубулина в КРР.

В неопухоловом эпителии слизистой оболочки толстой кишки  $\beta_{III}$ -изотип тубулина отсутствует, однако в большинстве КРР отмечается экспрессия данного белка. Прогностическое значение имеет высокая интенсивность окрашивания опухолевых клеток в области инвазивного фронта в общем и в так называемых «опухоловых почках» (кластеры из пяти и менее эпителиальных клеток в области инвазивного фронта) в частности. Выраженная интенсивность окрашивания инвазивного фронта ассоциирована со снижением как безрецидивной, так и общей выживаемости пациентов с КРР, а яркое окрашивание опухолевых почек – с нечувствительностью к терапии пациентов III и IV стадии.

Образец протокола иммуногистохимического окрашивания с антителами к  $\beta_{III}$ -тубулину:

1. Выдержать в термостате при 37 °С в течение ночи или при 60 °С – 1 час.
2. Депарафинизация в ксилоле.
3. Регидратация в спиртах и воде.

4. Демаскировка антигенов в нагреваемой барокамере 30 сек с демаскировочным буфером с высоким рН (не менее 9).
5. Блокада эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода – 20 мин.
6. Промыть в отмывочном буфере (2 раза по 5 мин).
7. Блокирующий 1% раствор бычьего сывороточного альбумина – 30 мин.
8. Инкубация с первичным анти- $\beta$ <sub>III</sub>-тубулин антителом (клон 5G8): разведение 1:1000, в течение ночи в холодильнике.
9. Промыть в отмывочном буфере (2 раза по 5 мин).
10. Визуализация при помощи полимерной системы визуализации в соответствии с инструкцией производителя.
11. Контрокрашивание гематоксилином Майера.
12. Заключение в канадский бальзам или аналогичную среду.

В качестве внутреннего позитивного контроля следует использовать нервные ганглии и стволы. При правильно подобранных условиях иммуногистохимического окрашивания, они будут окрашиваться ярко позитивно.

### 3.2.1. Определение экспрессии ацетилированного $\alpha$ -тубулина в КРР.

Экспрессия ацетилированного  $\alpha$ -тубулина неопухолевом эпителии слизистой оболочки толстой кишки выявляется в виде диффузного цитоплазматического окрашивания умеренной интенсивности. Для клеток КРР характерно снижение уровня данного белка. Слабая интенсивность окрашивания либо негативное окрашивание клеток опухоли (как самой опухоли, так и инвазивного фронта и опухолевых почек) ассоциировано со снижением безрецидивной и общей

выживаемости, а также нечувствительностью к терапии пациентов III и IV стадии.

Образец протокола иммуногистохимического окрашивания с антителами к ацетилированному тубулину:

1. Выдержать в термостате при 37 °С в течение ночи или при 60 °С – 1 час.
2. Депарафинизация в ксилоле.
3. Регидратация в спиртах и воде.
4. Демаскировка антигенов в нагреваемой барокамере 30 сек с демаскировочным буфером с высоким рН (не менее 9).
5. Блокада эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода – 20 мин.
6. Промыть в отмывочном буфере (2 раза по 5 мин).
7. Блокирующий 1% раствор бычьего сывороточного альбумина – 30 мин.
8. Инкубация в течение ночи в холодильнике с первичным антителом к ацетилированному тубулину (6-11В-1): разведение 1:800.
9. Промыть в отмывочном буфере (2 раза по 5 мин).
10. Визуализация при помощи полимерной системы визуализации в соответствии с инструкцией производителя.
11. Контрокрашивание гематоксилином Майера.
12. Заклочение в канадский бальзам или аналогичную среду.

В качестве внутреннего позитивного контроля следует использовать нервные ганглии и стволы. При правильно подобранных условиях иммуногистохимического окрашивания, они будут окрашиваться ярко позитивно.

## ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

1. Неправильная ориентация препаратов может привести к ошибочной диагностике аденом и зубчатых образований толстой кишки.

2. Отсутствие клинических данных о предшествовавших полипэктомиях и воспалительных заболеваниях толстой кишки может привести к гипердиагностике КРР.

3. Недостаточная тщательность в поиске лимфоузлов в операционном материале приводит к гипостадированию КРР и, как следствие, не адекватному назначению химиотерапии.

4. Невнимание к циркулярному краю резекции влечет за собой недостаточную информированность о риске возникновения локорегионального рецидива у пациента.

5. Невозможность определить статус микросателлитной нестабильности чревата неправильным определением степени злокачественности опухоли.

6. Определение степени дифференцировки по наименее дифференцированному участку ведет к гипердиагностике опухолей высокой степени злокачественности.