

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

27.12.2013

Регистрационный № 233-1213

**МЕТОД ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ЭТАПЕ ДООПЕРАЦИОННОЙ
МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный
медицинский университет», УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое
бюро» г. Минска, УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Т.А. Летковская, канд. мед. наук В.А. Захарова, д-р
мед. наук, проф. Е.Д. Черствый, А.Ф. Пучков, Н.В. Корнев, канд. мед. наук, доц.
М.И. Ивановская, И.Л. Масанский, Л.М. Сагальчик

Минск 2013

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА — бычий сывороточный альбумин

ИГХ — иммуногистохимия, иммуногистохимический

ДАБ — диаминобензидин

ВМЦ — высокомолекулярный цитокератин (клон34 β -Е12)

ПЖ — предстательная железа

EGFR — epidermal growth factor receptor

ERG — ETS-related gene (erythroblast transformation-specific)

VEGF — vascular endothelial growth factor

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью определения экспрессии биомолекулярных маркеров ERG, p53, Ki-67, EGFR, VEGF, Vcl2, Вах и хромогранина А в биопсийных образцах рака предстательной железы для прогнозирования неблагоприятных патоморфологических признаков (распространение рака за пределы органа и наличие метастазов в лимфоузлах) и риска прогрессирования заболевания.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, а также врачей-онкологов и врачей-урологов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Микроскоп.
2. Цифровая камера.
3. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 4 мкм.
4. Нагреваемая барокамера или микроволновая печь с максимальной мощностью 750–800 Вт.
5. Лабораторная посуда.
6. Холодильник.
7. Вытяжной шкаф.
8. Таймер.
9. Антитела к ВМЦ, p63, p53, Ki-67, EGFR, VEGF, Vcl 2, Вах, хромогранину А, ERG. Обязательным условием для применения антител является наличие в спецификации указания на возможность использования на формалин-фиксированных тканях человека.
10. 3%-й раствор перекиси водорода или фирменный блокатор пероксидазы.
11. Трис-буфер рН 7,6.
12. Буферы для демаскировки антигенов рН 6,0, рН 9,0 и модифицированный буфер рН 6,0.
13. 1%-й раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА).
14. Карандаш для иммуногистохимии (ИГХ).
15. Система визуализации на полимерной основе к мышинным и кроличьим антителам или универсальная (к мышинным и кроличьим антителам).
16. Диаминобензидин (ДАБ).
17. Гематоксилин Майера.

18. Ксилол.
19. 96° спирт.
20. Канадский бальзам.
21. Предметные стекла для ИГХ (или предметные стекла, предварительно обработанные поли-L-лизинном или силаном).
22. Покровные стекла.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Прогнозирование неблагоприятного течения рака предстательной железы при морфологическом исследовании материала мультифокальных биопсий.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Готовые гистологические срезы поместить в термостат на ночь (37°C).
2. Опустить срезы на несколько секунд последовательно в две смены ксилола.
3. Опустить срезы на несколько секунд последовательно в две смены 96° спирта.
4. Промыть в воде.
5. Обработать срезы в нагреваемой барокамере в рекомендуемом буфере при температуре 125°C и давлении 25 psi в течение 30 с или в микроволновой печи с демаскировочным буфером в течение 7 мин при максимальной мощности (750–800 Вт), затем 15 мин при мощности 300–400 Вт (оптимальная процедура демаскировки, рН буфера для различных антител указаны в таблице).
6. Промыть в отмывочном буфере 2 раза по 5 мин.
7. Опустить в 3%-й раствор перекиси водорода на 20 мин.
8. Промыть в отмывочном буфере 3 раза по 5 мин.
9. Срезы обвести карандашом для ИГХ (отступить от края среза 4–5 мм).
10. Нанести на срезы 1% раствор БСА на 30 мин, после чего раствор слить.
11. На срезы нанести первичное антитело, разведенное в 1% БСА из расчета 100 мкл разведенного антитела на 1 срез среднего размера. Срезы разместить горизонтально в герметичной емкости, дно которой покрыть фильтровальной бумагой, смоченной водой. Емкость поставить на горизонтальную плоскость и инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре или если время инкубации составляет 12 ч, поместить в холодильник на ночь. Рекомендуемые разведения первичных антител и время инкубации указаны в таблице.

Таблица — Характеристика антител и особенности обработки материала

| Антитело | рН демаскировочного буфера | Рекомендуемый характер использования антитела | Разведение антитела | Время инкубации | Визуализирующая система |
|---------------|----------------------------|--|---------------------|-----------------|-------------------------|
| p53 | 9,0 | в составе коктейля с ВМЦ+р63 в разведении ВМЦ-1:200 р63-1:200- | 1:100 | 30 мин | универсальная |
| Ki-67 | 9,0 | -//- | 1:200 | | -//- |
| EGFR | 9,0 | -//- | 1:100 | 12 ч | -//- |
| VEGF | 9,0 | -//- | 1:100 | 12 ч | -//- |
| Bcl 2 | 6,0 | -//- | 1:100 | 30 мин | -//- |
| Vax | 9,0 | -//- | 1:50 | -//- | -//- |
| хромогранин А | 9,0 | -//- | 1:100 | -//- | -//- |
| ERG | 9,0 | самостоятельно | 1:100 | -//- | для кроличьих антител |

12. Слить со срезов жидкость.

13. Срезы промыть в отмывочном буфере 2 раза по 5 мин.

14. На срезы нанести визуализирующую систему для мышинных или кроличьих антител или универсальную на 30 мин.

15. Промыть в отмывочном буфере 2 раза по 5 мин.

16. Нанести на срезы ДАБ. Раствор ДАБ приготовить в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы.

17. Длительность инкубации в ДАБ устанавливается в каждой лаборатории индивидуально, для чего необходимо наблюдать процесс появления коричневого окрашивания под микроскопом. Время окрашивания считается достаточным, если структуры, подлежащие окрашиванию, приобрели ярко-золотисто-коричневый цвет, в то время как фоновое окрашивание стромальных компонентов отсутствует.

18. Докрасить гематоксилином Майера. Время контрокрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально.

19. Срезы заключить в канадский бальзам.

Интерпретация результатов ИГХ-окрашивания биомолекулярных маркеров с указанием прогностически значимых уровней их экспрессии для рака предстательной железы

Антитела к p53, Ki-67, EGFR, VEGF, Bcl 2, Vax, хромогранину А рекомендуется применять в составе коктейлей ВМЦ+р63, что позволяет оценить

экспрессию маркеров только в раковых структурах, которые отличаются отсутствием слоя базальных клеток, маркированных в доброкачественных железах антителами к VMЦ+p63 (гомогенное или мелкогранулярное окрашивание цитоплазмы и ядер базальных клеток в коричневый цвет различной интенсивности от светло-золотистого до темно-коричневого оттенка).

Результат ИГХ-выявления гена-супрессора p53 представлен в виде окрашивания ядер опухолевых клеток в коричневый цвет разной степени интенсивности (от светлого до очень темного оттенка). Степень экспрессии p53 оценивается, исходя из процента окрашенных ядер: менее 5% окрашенных ядер — 0 баллов; 5–20% — 1 балл, 20–50% — 2 балла, более 50% — 3 балла.

Результат ИГХ-выявления антигена Ki-67 представлен в виде окрашенных в коричневый цвет ядер с более интенсивным окрашиванием ядрышек, а также отчетливым окрашиванием митотических фигур. По экспрессии Ki-67 определяется индекс пролиферативной активности клеток РПЖ. Определение экспрессии производится в 4–9 случайных полях зрения на большом увеличении микроскопа (объектив x40), где подсчитывается общее число опухолевых клеток (не менее 1000) и количество иммунопозитивных клеток к Ki-67 с последующим вычислением индекса пролиферативной активности ИПА = число иммунопозитивных клеток / общее число опухолевых клеток × 100.

Экспрессия EGFR имеет цитоплазматическую и мембранную локализацию. Критерии оценки маркера: опухоль считается отрицательной при отсутствии мембранного окрашивания или при окрашивании менее 10% клеток; экспрессия 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.

Результат ИГХ-выявления VEGF представлен в виде окрашивания цитоплазмы позитивных клеток в коричневый цвет. Интенсивность окрашивания опухолевых клеток оценивается в сравнении с окраской полиморфноядерных нейтрофильных лейкоцитов (внутренний позитивный контроль). Критерии балльной оценки степени интенсивности окрашивания: 0 баллов — негативное окрашивание, 1 балл — слабая интенсивность (1+), 2 балла — умеренная интенсивность (2++), 3 балла — сильная интенсивность (3+++).

Результат ИГХ-выявления Vcl 2 представлен в виде окрашивания цитоплазмы позитивных клеток в коричневый цвет. Критерии оценки маркера Vcl 2: опухоль считается негативной по экспрессии Vcl 2, если в ткани отсутствует цитоплазматическая реактивность с антителами или окрашивается менее 20% опухолевых клеток; опухоль считается позитивной по маркеру при окрашивании цитоплазмы в более 20% опухолевых клеток.

Результат ИГХ-реакции с антителами к Вах определяется в виде цитоплазматического окрашивания опухолевых клеток. Оценка экспрессии производится, исходя из процента и интенсивности положительно окрашенных опухолевых клеток. Процент (n) положительно окрашенных клеток отражает степень экспрессии маркера, выраженную в баллах (отсутствие экспрессии — 0 баллов, n <50% — 2 балла, n 50–75% — 4 балла, n >75% — 6 баллов). Критерии

балльной оценки степени интенсивности окрашивания: 0 баллов — негативное окрашивание, 1 балл — слабая интенсивность (1+), 2 балла — умеренная интенсивность (2++), 3 балла — сильная интенсивность (3+++).

Результат ИГХ-выявления хромогранина А представлен в виде очень четко окрашенных в коричневый цвет цитоплазмы и ядер клеток. Опухоль считают хромогранин-негативной, если не обнаруживается ни одной положительной клетки или единичные положительные клетки рассеяны в пределах опухоли, и хромогранин-позитивной, если по крайней мере один фокус кластеров неопластических клеток проявляет нейроэндокринную дифференцировку или если в опухоли выявляются многочисленные положительные клетки.

Экспрессия ERG имеет ядерную локализацию. Критерии балльной оценки степени интенсивности иммуногистохимического окрашивания: 0 баллов — негативное окрашивание, 1 балл — слабая интенсивность, видимая только на большом увеличении (+), 2 балла — умеренная интенсивность, видимая на малом увеличении (++), 3 балла — сильная интенсивность, видимая на малом увеличении в виде яркого окрашивания ядер (+++). Окрашивание ядер эндотелиальных клеток используется в качестве внутреннего позитивного контроля. В случае гетерогенности окрашивания, за результат принимается самый высокий уровень экспрессии.

Высокий риск *местного распространения* (распространение за пределы капсулы и/или метастазы в регионарные лимфоузлы):

- наличие более 10% Ki-67-позитивных клеток;
- наличие более 5% p53-позитивных клеток;
- наличие более 20% Vcl 2-позитивных клеток;
- при умеренной и высокой экспрессии VEGF (2++, 3+++).

Высокий риск *развития биохимического рецидива и/или клинического прогрессирования*:

- наличие более 10% Ki-67-позитивных клеток;
- наличие нейроэндокринной дифференцировки (экспрессия хромогранина А);
- наличие более 20% p53-позитивных клеток;
- снижение экспрессии Vax (менее 75% клеток и/или уменьшение (до 1+) интенсивности окрашивания);
- при высокой экспрессии EGFR (3+++);
- при высокой экспрессии ERG (3+++).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. Ошибки в осуществлении метода могут обуславливаться:

- использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся;
- неправильным разведением реактивов, несоблюдением временного и температурного режима при выполнении методики.

Во избежание подобных ошибок необходимо при проведении ИГХ исследования строго соблюдать все методические требования.