

**МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИИ ПРОСТАТЫ НА ОСНОВЕ
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ
БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ
БАЗАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ОНКОГЕНЕЗА**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» г. Минска

УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер»

Авторы: В. А. Захарова; канд. мед. наук, доц. Т. А. Летковская; канд. мед. наук, доц. А. С. Портянко; д-р мед. наук, проф. Е. Д. Черствый; А. Ф. Пучков; И. Л. Масанский; канд. мед. наук, ассист. М. И. Ивановская; Л. М. Сагальчик

Инструкция разработана с целью улучшения морфологической диагностики патологических процессов предстательной железы с признаками внутрипротоковой и/или ацинарной пролиферации эпителия.

Область применения: патологическая анатомия, онкоморфология, онкоурология.

Уровень внедрения: отделения онкоморфологии и онкоурологии онкодиспансеров, патологоанатомические бюро.

Список сокращений:

БСА — бычий сывороточный альбумин

ИГХ — иммуногистохимия, иммуногистохимический

ДАБ — диаминобензидин

ВМЦ – высокомолекулярный цитокератин (клон 34 β -Е12)

АМАСР — α -метилацил-конзим А рацемаза (АМАСР/Р504S)

Перечень необходимого оборудования:

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 4 мкм.
2. Микроволновая печь с максимальной мощностью 750–800 W.

Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:

1. Антитела к ВМЦ, р63, АМАСР. Обязательным условием для применения антител является наличие в спецификации указания на возможность использования на формалин-фиксированных тканях человека.
2. 3%-ный раствор перекиси водорода или фирменный блокатор пероксидазы.
3. Трис-буфер рН 7,6.
4. Буфер для демаскировки антигенов рН 6,0.
5. Модифицированный буфер для демаскировки антигенов рН 6,0.
6. Буфер для демаскировки антигенов рН 9,0.
7. 1%-ный раствор БСА.
8. Карандаш для ИГХ.
9. Система визуализации на полимерной основе к мышинным и кроличьим антителам или универсальная (к мышинным и кроличьим антителам).
10. Диаминобензидин (ДАБ).
11. Гематоксилин Майера.
12. Ксилол.
13. 96° спирт.
14. Канадский бальзам.
15. Предметные стекла для ИГХ (или предметные стекла, предварительно обработанные поли-L-лизинном или силаном).
16. Покровные стекла.
17. Лабораторные стаканы.

Показания к применению: неопухолевые, предраковые процессы и рак предстательной железы

Противопоказания к применению: не выявлены

Описание технологии использования способа ИГХ выявления биомолекулярных маркеров в ткани предстательной железы при патологических процессах, протекающих с признаками ацинарной и внутрипротоковой пролиферации эпителия

1. Готовые гистологические срезы поместить в термостат на ночь (37 °С).
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 в микроволновой печи с демаскировочным буфером в течение 7 мин при максимальной мощности (750–800 W), затем 15 мин при мощности 300–400 W (рН буфера, время процедуры для различных антител указаны в табл. 1).

Таблица 1

Параметры обработки срезов в микроволновой печи для первичных антител

Название антитела	рН демаскировочного буфера	Время процедуры
Анти-ВМЦ	6,0	22 мин
Анти-р63	6,0	То же
Анти-Р504S	9,0	- // -
Анти-ВМЦ + анти-р63	9,0	- // -
Анти-р63 + анти-Р504S	9,0	- // -
Анти-ВМЦ + анти-р63 + анти-Р504S	9,0	- // -

6. Промыть в отмывочном буфере 2 раза по 5 мин.
7. Опустить в 3%-ный 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%-ный 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. Рекомендуемые разведения первичных антител указаны в табл. 2.

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. Рекомендуемые визуализирующие системы для выявления первичных антител указаны в табл. 2.

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. 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.

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

18. Срезы заключить в канадский бальзам.

Таблица 2

Рекомендуемые разведения и визуализирующие системы для первичных антител

Название антитела	Разведение антитела	Визуализирующая система
Анти-ВМЦ	1:200	Для мышинных антител
Анти-р63	1:200	Для мышинных антител
Анти-Р504S	1:200	Для кроличьих антител
Анти-ВМЦ + анти-р63	1:200 каждого	Универсальная
Анти-р63 + анти-Р504S	1:200 каждого	Универсальная
Анти-ВМЦ + анти-р63 + анти-Р504S	1:200 каждого	Универсальная

Для контроля активности первичных антител в каждой серии необходимо проведение одного отрицательного и одного положительного контрольного окрашивания. В качестве отрицательного контрольного окрашивания срезы вместо инкубации с первичным антителом покрываются 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве положительного контроля для антител к ВМЦ и р63 могут быть использованы случаи доброкачественной аденоматозной гиперплазии или нормальной ткани предстательной железы с известной высокой экспрессией данных маркеров, для антител к АМАСР — случаи высоко- и умеренно диффе-

ренцированного рака предстательной железы с известной высокой экспрессией данного маркера. Окраска расценивается как положительная только при отсутствии окрашивания в отрицательном контрольном препарате и, наоборот, как отрицательная при наличии окрашивания в положительном контрольном препарате.

Интерпретация результатов ИГХ окрашивания биомолекулярных маркеров базальных клеток и онкогенеза при дифференциальной диагностике неопухолевых, Предраковых процессов и рака предстательной железы

ВМЦ Результат ИГХ выявления антигена ВМЦ представлен в виде гомогенного или мелкогранулярного окрашивания цитоплазмы базальных клеток в коричневый цвет различной интенсивности от светло-золотистого до темно-коричневого оттенка.

р63 Результат ИГХ выявления антигена р63 представлен в виде гомогенного окрашивания ядер базальных клеток в коричневый цвет различной интенсивности от светло-золотистого до темно-коричневого оттенка.

По экспрессии ВМЦ и р63 определяется наличие базальных клеток по периферии ацинарных и протоковых структур при неопухолевых и предраковых процессах предстательной железы, в то время как в очагах рака предстательной железы данные маркеры не выявляются. Выявление базальных клеток производится на любом увеличении микроскопа.

Результатом **визуальной оценки ИГХ выявления базальных клеток** может быть:

1) интактный слой базальных клеток на всем протяжении ацинарных и протоковых структур предстательной железы, который может выявляться при гиперпластических и атрофических процессах предстательной железы;

2) очаговая утрата базальных клеток с ИГХ визуализацией прерывистого слоя базальных клеток при предраковых, и некоторых формах гиперпластических и атрофических процессов предстательной железы;

3) отсутствие базальных клеток по периферии *отдельных ацинарных структур* при таких гиперпластических процессах, как атипичная аденоматозная гиперплазия и атипичная мелкоацинарная пролиферация, либо по периферии *всех ацинарных структур* в очагах рака предстательной железы.

Результатом **программного анализа изображения ИГХ выявления базальных клеток** может быть:

- 1) выявление интактного слоя базальных клеток;
- 2) выявление очаговой утраты базальных клеток с определением степени фрагментации слоя базальных клеток в каждом ацинусе и расчетом средней степени фрагментации в поле зрения и/или случае в целом;
- 3) отсутствие базальных клеток в поле зрения и/или случаев в целом.

Наличие фрагментации слоя базальных клеток по периферии ацинарных и протоковых структур при гиперпластических и атрофических процессах предстательной железы в совокупности с признаками цитологической атипии является одним из факторов, свидетельствующих о более агрессивном биологическом потенциале данных процессов в сравнении с доброкачественной аденоматозной гиперплазией предстательной железы.

АМАСР Результат ИГХ выявления антигенов АМАСР представлен в виде гомогенного или мелкогранулярного, преимущественно апикального, окрашивания цитоплазмы секреторного эпителия в коричневый цвет различной интенсивности от светло-золотистого до темно-коричневого оттенка.

Наличие экспрессии онкопротеина АМАСР в ацинарных и протоковых структурах при неопухоловых, предраковых процессах и раке предстательной железы определяется в поле зрения на любом увеличении микроскопа либо пределах патологического процесса в целом в виде наличия АМАСР-позитивных клеток.

Результатом **визуальной оценки ИГХ выявления АМАСР** может быть:

- 1) отсутствие экспрессии АМАСР всеми клетками секреторного эпителия при гиперпластических и атрофических, редко предраковых, процессах предстательной железы в поле зрения или в пределах патологического процесса в целом;
- 2) экспрессия АМАСР в единичных клетках секреторного эпителия, группах клеток либо всех клетках в поле зрения при раке предстательной железы, а также предраковых, реже гиперпластических и атрофических, процессах предстательной железы.

Результат **ИГХ выявления АМАСР с использованием программного анализа изображения** для морфометрии Aperio Image Score оценивается:

- 1) по площади, занимаемой позитивно окрашенными клетками, с помощью показателя позитивности = отношение числа позитивных пикселей эпителиальных структур изображения к общему числу позитивных и негативных пикселей эпителиальных структур;
- 2) по интенсивности окрашивания ИГХ позитивных клеток секреторного эпителия протоковых и ацинарных структур ПЖ с использованием программного обеспечения, автоматически измеряющего интенсивность

коричневой окраски (продуктов реакции диаминобензидин-хромогена), и разделяющая интенсивность ИГХ окрашивания на 3 уровня.

Наличие экспрессии АМАСР клетками секреторного эпителия при неопухолевых процессах предстательной железы, а также увеличение площади и интенсивности экспрессии АМАСР может свидетельствовать о наличии у данных клеток вероятного потенциала к неопластической трансформации.

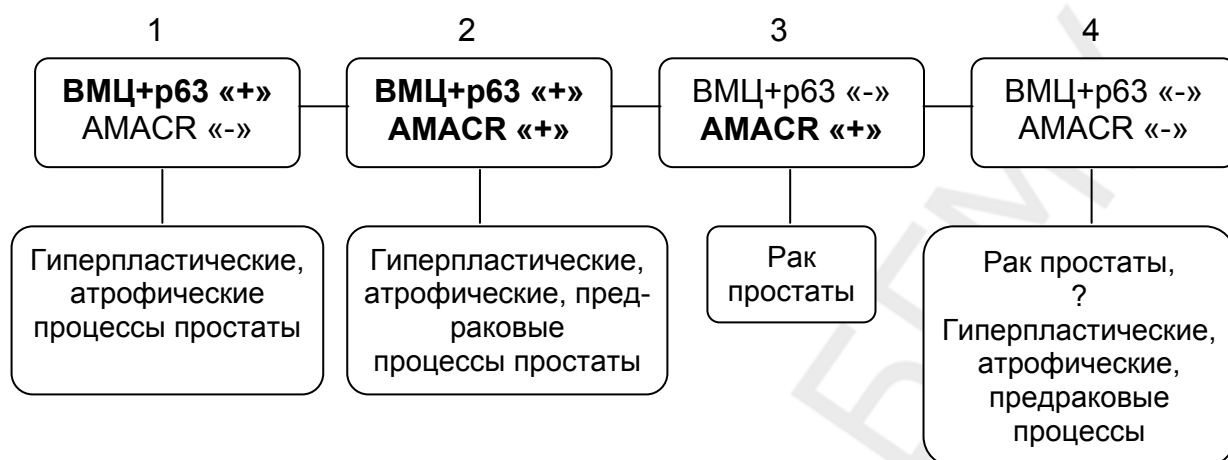
Алгоритм определения иммуногистохимических маркеров базальных клеток и онкогеназа при дифференциальной диагностике неопухолевых, предраковых процессов и рака предстательной железы

Использование иммуногистохимических маркеров базальных клеток (ВМЦ+р63) и онкогеназа (АМАСР) целесообразно у группы пациентов с неопределенным по морфологическим данным диагнозом рака предстательной железы при окраске гистологических препаратов гематоксилином и эозином.

К морфологическим изменениям, подозрительным к раку предстательной железы, относятся процессы с признаками ацинарной и/или внутрипротоковой пролиферации, сомнительными признаками инвазивного роста и переменными проявлениями цитологической атипии, которые объединяют под общим названием атипичная мелкоацинарная пролиферация. У пациентов данной группы для верификации диагноза рака предстательной железы необходимо проведение иммуногистохимического определения базальных клеток и онкопротеина АМАСР:

- 1) выявление одного из маркеров базальных клеток (ВМЦ или р63);
- 2) использование коктейля двух ИГХ маркеров базальных клеток (ВМЦ+р63) на одном гистологическом срезе;
- 3) выявление экспрессии онкопротеина АМАСР и одного (ВМ или р63) или двух маркеров базальных клеток (ВМЦ+р63) в разных гистологических срезах с одного и того же парафинового блока;
- 4) использование коктейля АМАСР с одним (предпочтительно р63+АМАСР) или двумя ИГХ маркерами базальных клеток (ВМЦ+р63+АМАСР) на одном гистологическом срезе.

Алгоритм дифференциальной диагностики неопухолевых, предраковых процессов и рака предстательной железы с использованием иммуногистохимических маркеров



базальных клеток и онкогенеза

1. Интактный на всем протяжении ацинарных и протоковых структур или очагово фрагментированный слой базальных клеток и отсутствие экспрессии AMACR секреторным эпителием может выявляться при гиперпластических и атрофических процессах предстательной железы.

2. Очагово фрагментированный или интактный на всем протяжении ацинарных и протоковых структур слой базальных клеток, а также экспрессия AMACR клетками секреторного эпителия может выявляться при предраковых, реже гиперпластических и атрофических, процессах предстательной железы.

3. Отсутствие базальных клеток и наличие очаговой или тотальной экспрессии AMACR эпителиальными клетками выявляется при раке предстательной железы.

4. Отсутствие базальных клеток, а также отсутствие экспрессии AMACR может говорить как о наличии рака предстательной железы, так и о дефекте ИГХ окрашивания при неопухолевых и предраковых процессах предстательной железы. Поэтому, в случае BMЦ, p63, AMACR-негативного ИГХ окрашивания необходимо проведение повторного ИГХ исследования либо, в случае отсутствия гистологического материала для дорезки в парафиновых блоках, гистологическое заключение должно основываться на морфологической картине в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Наличие фрагментации слоя базальных клеток по периферии ацинарных и протоковых структур и экспрессии AMACR клетками секреторного эпителия при неопухолевых процессах предстательной железы

может свидетельствовать о наличии у данных клеток вероятного потенциала к неопластической трансформации.

Сочетанное выявление цитологической атипии в АМАСР-позитивных клетках наряду с очаговой утратой базальных клеток в ацинарных и протоковых структурах, имеющих АМАСР-позитивные клетки при неопухолевых процессах предстательной железы, может свидетельствовать о более агрессивном биологическом потенциале данных процессов в сравнении с доброкачественной аденоматозной гиперплазией предстательной железы и необходимости динамического наблюдения за данной группой пациентов (с определением уровня сывороточного простатспецифического антигена и проведением мультифокальных пункционных биопсий), а также своевременном устранении такого вероятного патогенетического фактора неопластической трансформации эпителия как активное или хроническое воспаление при его наличии.

Перечень возможных осложнений и ошибок

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.

Для избежания подобных ошибок необходимо при проведении ИГХ исследования строго соблюдать все методические требования.

«УТВЕРЖДАЮ»

руководитель учреждения,
в котором внедрен способ

« ____ » _____ 20__ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Название предложения для внедрения «Метод дифференциальной морфологической диагностики патологии простаты на основе иммуногистохимического выявления биомолекулярных маркеров базальных клеток и онкогенеза»

2. Кем предложено (наименование учреждения-разработчика, автор):
УО «Белорусский государственный медицинский университет», 220116, пр-т Дзержинского, 83; УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» г. Минска, 220116, ул. Семашко, 8/5; УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер», 220046, пр-т Независимости, 64; В. А. Захарова, канд. мед. наук Т. А. Летковская, канд. мед. наук А. С. Портянко, д-р мед. наук Е. Д. Черствый, А. Ф. Пучков, И. Л. Масанский, канд. мед. наук М. И. Ивановская, Л. М. Сагальчик.

3. Источник информации: инструкция по применению, 2009 г.

4. Где и когда внедрено _____

наименование лечебного учреждения, дата начала внедрения

5. Общее количество наблюдений _____

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____

положительные (к-во наблюдений) _____

отрицательные (к-во наблюдений) _____

неопределенные (к-во наблюдений) _____

7. Эффективность внедрения _____

8. Замечания, предложения _____

Дата _____

Ответственные за внедрение

(должность, Ф.И.О., кафедра)

(подпись)

Подписано в печать 19.04.10. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 0,7. Уч.-изд. л. 0,43. Тираж 50 экз. Заказ 225.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

ЛП № 02330/0150484 от 25.02.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.