

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 050-0518



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА У ВЗРОСЛЫХ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ  
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ**

**Инструкция по применению**

**Учреждение-разработчик:** Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр онкологии и  
медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

**Авторы:** А.М. Пашкевич, К.Г. Рукша, А.В. Медведь, к.м.н. Е.И. Субоч,  
д.м.н. Нат.Н. Антоненкова, д.м.н. А.С. Портянко

Минск 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

01.06.2018

Регистрационный № 050-0518

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ  
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ  
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ**

инструкция по применению

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

Авторы: А. М. Пашкевич, К. Г. Рукша, А. В. Медведь, канд. мед. наук  
Е. И. Субоч, д-р мед. наук Н. Н. Антоненкова, д-р мед. наук А. С. Портянко

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод дифференциальной диагностики диффузных астроцитарных и олигодендроглиальных опухолей головного мозга у взрослых с использованием гистологических и молекулярно-генетических критериев, изложенных в «Классификации опухолей ЦНС» (ВОЗ, 2016).

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-нейрохирургов, врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с глиальными опухолями головного мозга.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

*Перечень необходимых медицинских изделий (молекулярное секвенирование):*

1. Бокс биологической безопасности 2 класса (тип В2).
2. Термостат твердотельный с функцией охлаждения (4–100 °С).
3. Вортекс.
4. Микроцентрифуга (скорость вращения ротора до 14000 об/мин).
5. Амплификатор (термоциклер) для ПЦР.
6. Камера электрофоретическая.
7. Шейкер (скорость перемешивания не менее 2500 об/мин).
8. Генетический анализатор.
9. Автоматические дозаторы переменного объема.

*Перечень необходимых медицинских изделий (флуоресцентная in situ гибридизация (FISH)):*

10. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 4 мкм.
11. рН-метр.
12. Термостат твердотельный.
13. Баня водяная с датчиком температуры.
14. Гибридизер.
15. Флуоресцентный микроскоп.
16. Наборы флуоресцентных фильтров.
17. Автоматические дозаторы переменного объема.

*Перечень необходимых реактивов и расходных материалов (молекулярное секвенирование):*

18. Набор реактивов для выделения ДНК (сорбционный принцип).
19. Набор реактивов для ПЦР.
20. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры) (таблица 1).

Таблица 1. — Перечень необходимых праймеров (F– прямой, R– обратный)

Ген	Анализируемый участок	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
<i>IDH1</i>	4 exon	F – ACCAAATGGCACCATACGA R – GCAAAATCACATTATTGCCAAC

Продолжение таблицы 1

<b>IDH2</b>	4 exon	F – GACTCCAGAGCCCACACATT R – CTAGGCGAGGAGCTCCAGT
<b>BRAFV600E</b>	15 exon	F – CAATCATCCACAGAGACCTCTAAT R – ATCCACAAAATGGATCCAGACA
<b>TERT</b>	promoter region	F – AGTGGATTCGCGGGCACAGA R – CAGCGCTGCCTGAAACTC
<b>ATRX_1</b>	9 exon	F – CAGTTTCCTGAAAGAAGGGAAT R – CAGAGCCAGAACAGGAATCA
<b>ATRX_2</b>	9 exon	F – TGATTCCTGTTCTGGCTCTG R – TGTTCTTTGTTCTCTGTTGGA
<b>ATRX_3</b>	9 exon	F – TGAGCACATGCATCAGAATG R – TGTTTTCTGTCCAAGTCCA
<b>ATRX_4</b>	9 exon	F – TGTGGTCTGAACCCCAAGTT R – ATCTTTCCCCGCCTGAGT
<b>ATRX_5</b>	9 exon	F – ARACTCAGGCGGGGAAAGAT R – ATCAACTGTGCCTTCTGCTG
<b>ATRX_6</b>	9 exon	F – TTCAGCAGAAGGCACAGTTG R – TCGCTCAGGTAACCTTTTCAGTG
<b>TP53_1</b>	5, 6 exon	F – TGTTCACTTGTGCCCTGACT R – TTAACCCCTCCTCCCAGAGA
<b>TP53_2</b>	7 exon	F – CTTGCCACAGGTCTCCCCAA R – AGGGGTCAAGGCAAGCAGA
<b>TP53_3</b>	8, 9 exon	F – TTGGGAGTAGATGGAGCCT R – AGTGTTAGACTGGAACTTT
<b>H3F3A</b>	2 exon	F – TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGA R – GGTTTCTTCACCCCTCCAGT

21. Ксилол.
  22. Спирт этиловый 70 %, 96 %.
  23. Ацетат аммония 5М.
  24. ЭДТА 0,5М; рН 8,0.
  25. NiDi формамид.
  26. Набор реактивов для реакции секвенирования.
  27. Микропробирки объемом 0,2 и 1,5 мл.
  28. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.
  29. Холодоэлемент или охладитель проб.
- Перечень необходимых реактивов и расходных материалов (FISH):*
30. Спирт этиловый 100 %, 85 %, 70 %.
  31. Ксилол.
  32. Вода очищенная.
  33. 1N NaSCN.
  34. Пепсин, активность 1:3000-1:3500.
  35. 0,2N HCl; рН 2,0.
  36. Детергент NP-40.
  37. 3M NaCl, 0,3M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>; рН 5,3.

38. Контрастирующий краситель DAPI, 1000 нг/мл.
39. Стекла предметные с адгезивным покрытием, стекла покровные.
40. Микропробирки объемом 1,0 мл.
41. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Глиальные опухоли головного мозга у взрослых.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Забор биологического материала**

Операционный материал получают во время хирургического вмешательства по поводу опухоли головного мозга. Биологический материал доставляют в лабораторию. Для исследования используется ткань головного мозга — фиксируется 10 % раствором нейтрального формалина и заключается в парафин. Из блоков изготавливаются гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые окрашиваются гематоксилином и эозином и заключаются в «канадский бальзам» или аналогичную среду, покрываются покровным стеклом.

Выбор парафинового блока ткани для молекулярно-генетического исследования проводится врачом-патологоанатомом. В исследуемом материале объем опухолевой ткани должен составлять не менее 50 % от общего объема гистологического препарата (или не менее 100 опухолевых клеток). Для последующего анализа выбирают блок с сохраненной структурой ткани, без некроза и геморрагий.

### ***Гистологическое заключение***

Гистологическое заключение формулируется врачом-патологоанатомом при исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, на основании основных гистологических характеристик глиальных опухолей (приложение).

### **Интегрированное морфологическое заключение на основании гистологических и молекулярно-генетических критериев**

1. При подтверждении подозрения на глиальную опухоль головного мозга обязательным является молекулярно-генетическое исследование для определения статуса генов *IDH*.

2. При установлении гистологического диагноза неуточненной олигодендроглиомы или олигоастроцитомы помимо определения мутации в генах *IDH* дополнительно выявляется наличие коделеции *1p/19q* с использованием метода FISH. При обнаружении коделеции возможными вариантами диагноза с учетом степени дифференцировки опухоли являются «Олигодендроглиома, с мутацией в гене *IDH* и коделецией *1p/19q*» или «Анапластическая олигодендроглиома, с мутацией в гене *IDH* и коделецией *1p/19q*».

3. При наличии мутации в гене *IDH* и отсутствии коделеции *1p/19q* олигодендроглиальное происхождение опухоли не подтверждается. В таком случае возможными вариантами диагноза являются «**Диффузная астроцитома, с мутацией в гене *IDH***», «**Анапластическая астроцитома, с мутацией в гене *IDH***». Наличие мутации в гене *ATRX* также характерно для данных опухолей в 96 % случаев и может являться дополнительным тестом для подтверждения диагноза.

4. При отсутствии мутации в гене *IDH* и коделеции *1p/19q* следует формулировать диагноз следующим образом: «**Диффузная астроцитома, без мутации в гене *IDH***», «**Анапластическая астроцитома, без мутации в гене *IDH***». Наличие мутации в гене *ATRX* может являться дополнительным тестом для подтверждения данных диагнозов.

5. Отсутствие мутации в гене *IDH* и коделеции *1p/19q* в глиальных опухолях Grade II/III является поводом для поиска других распространенных мутаций. Так, глиомы средней линии (Grade IV), характеризующиеся в 100 % случаев мутацией *H3K27M*, гистологически не отличимы от астроцитом Grade II/III. В связи с этим при отсутствии мутации в гене *IDH* и локализации в стволовых отделах головного мозга необходимо выявление мутации *H3K27M*. При подозрении на плеоморфную ксантоастроцитому определяется мутация *BRAFV600*.

6. В случае гистологических признаков глиобластомы (приложение) проводится тестирование на наличие мутации в гене *IDH* и при выявлении мутации диагностируется: «**Глиобластома, с мутацией в гене *IDH***». Дополнительным тестом для подтверждения данного диагноза является определение мутации в гене *ATRX* (присутствует в 90–95 % случаев) и амплификации *EGFR* (отсутствует).

7. При гистологических признаках глиобластомы (приложение 1) и отсутствии мутации в гене *IDH* устанавливается диагноз «**Глиобластома, без мутации в гене *IDH***». Дополнительным тестом для подтверждения диагноза является определение мутации в гене *TERTp* (присутствует в более 80 % случаев) и амплификации *EGFR* (присутствует в 57 %).

8. При отсутствии возможности тестирования, а также наличии неинформативного результата диагноз считается неуточненным и формулируется как: «**Диффузная астроцитома неуточненная**», «**Олигодендроглиома неуточненная**», «**Олигоастроцитома неуточненная**», «**Глиобластома неуточненная**».

Схематический алгоритм диагностики глиальных опухолей головного мозга с молекулярно-генетическим тестированием представлен на рисунке 1. Наличие или отсутствие мутаций в указанных генах ассоциируется с определенным прогнозом заболевания в соответствии с исследованиями ВОЗ (таблица 2).

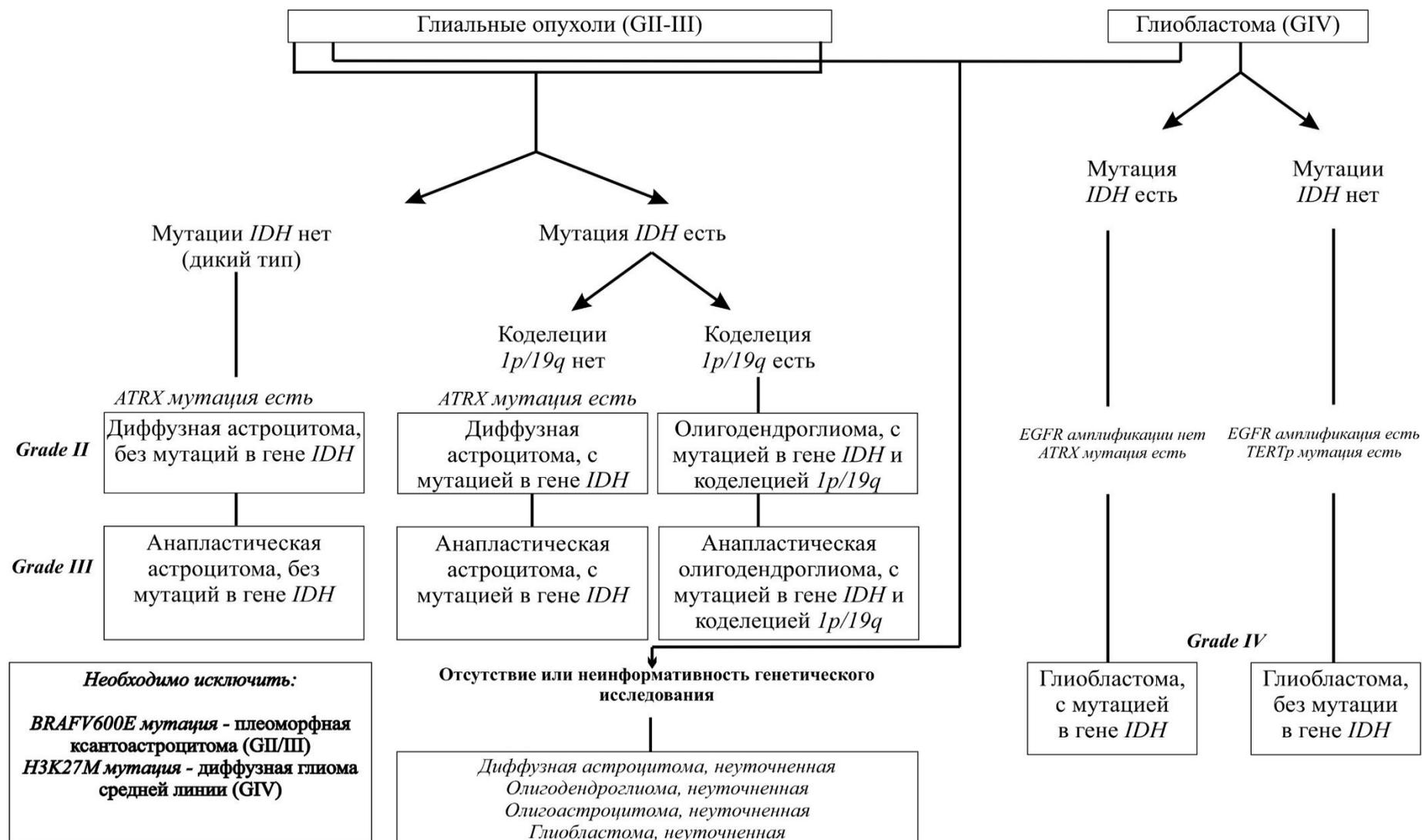


Рисунок — Алгоритм интегрированной диагностики глиальных опухолей у взрослых

Таблица 2. — Частота встречаемости наиболее распространенных мутаций в глиальных опухолях головного мозга и связанный с ними прогноз (ВОЗ, 2016)

	Grade	Прогноз	Генетические aberrации	Частота встречаемости (%)
Астроцитомы	II, III	Благоприятный	<i>IDH</i> мутация	65
			<i>ATRX</i> мутация	96
Глиобластома без мутации <i>IDH</i>	IV	Неблагоприятный	<i>EGFR</i> амплификация	57
			<i>BRAFV600E</i> мутация (эпителиоидная глиобластома)	1–2
			<i>TERTp</i> мутация	>80
Глиобластома с мутацией <i>IDH</i>	IV	Благоприятный (по сравнению с глиобластомой без мутации <i>IDH</i> )	<i>ATRX</i> мутация	90–95
Олигодендроглиома	II, III	Благоприятный	<i>IDH</i> мутация	100
			<i>1p/19q</i> коделеция	100
			<i>TERTp</i> мутация	80–96
Пилоцитарная астроцитомы	I	Благоприятный	<i>BRAFV600E</i> мутация	13–15
Плеоморфная ксантоастроцитомы	II, III	Благоприятный	<i>BRAFV600E</i> мутация	66
Диффузная глиома средней линии с мутацией K27M в гене <i>H3F3A</i>	IV	Неблагоприятный	<i>H3K27M</i> мутация гистона	100

### Определение мутаций в генах *IDH1*, *IDH2*, *TERT*, *BRAF*, *TP53*, *ATRX*, *H3F3A* методом молекулярного секвенирования

1. Выделение ДНК из опухолевой ткани, фиксированной формалином и заключенной в парафин

Для проведения процедуры исследования используются ксилол, спирт этиловый 96 %, набор реагентов для выделения ДНК, основанный на сорбционном принципе, согласно инструкции производителя.

При необходимости допускается хранение ДНК при температуре -20 °С в течение 1 мес., при температуре -70 °С — длительное время.

2. Оценка мутационного статуса генов

Для выявления мутаций в генах *IDH1*, *IDH2*, *TERT*, *BRAF*, *TP53*, *ATRX*, *H3F3A* используется метод молекулярного секвенирования по Сэнгеру согласно стандартному протоколу.

Индивидуальные температурно-временные условия амплификации исследуемых участков генов представлены в таблице 3.

Таблица 3. — Протоколы амплификации

Анализируемый участок/мутация	Условия этапов амплификации			Количество циклов
	денатурация	отжиг	элонгация	
<i>IDH1</i>	95° – 20 с	60° – 35 с	72° – 25 с	35
<i>IDH2</i>	95° – 20 с	60° – 35 с	72° – 25 с	35
<i>TERT</i>	95° – 25 с	64° – 90 с	72° – 35 с	40
<i>BRAF</i>	95° – 20 с	56° – 35 с	72° – 25 с	35
<i>ATRX</i>	95° – 20 с	60° – 40 с	72° – 25 с	40
<i>TP53</i>	95° – 20 с	60° – 40 с	72° – 25 с	35
<i>H3F3A</i>	95° – 20 с	59° – 35 с	72° – 25 сд	35

На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 3–5 мин при температуре 72 °С.

### 3. Анализ результатов

Продукты реакции секвенирования анализируются в генетическом анализаторе. Полученные последовательности ДНК сравниваются с референсными последовательностями, размещенными в электронной базе данных NCBI (таблица 4).

Таблица 4. — Референсные последовательности генов

Анализируемый участок	Референсная последовательность
<i>IDH1</i>	NM_005896,3
<i>IDH2</i>	NM_002168,3
<i>TERT</i>	NM_198253,2
<i>BRAF</i>	NM_004333,4
<i>ATRX</i>	NM_000489,4
<i>TP53</i>	NM_000546,5
<i>H3F3A</i>	NM_002107,4

## 4. Определение коделеции 1p/19q и амплификации гена EGFR методом FISH

### 1. Депарафинизация и дегидратация

Предметные стекла с парафиновыми срезами последовательно помещаются в ксилол и спирты при следующих условиях:

Ксилол: I – 10 мин

II – 10 мин

Спирты: I – 96 % – 2 мин

- II – 96 % – 2 мин
- III – 70 % – 2 мин
- IV – 70 % – 2 мин

Предметные стекла промываются в воде очищенной 2 раза по 3 мин.

## 2. Предобработка

Предметные стекла помещаются на водяную баню в предварительно нагретый до 80 °С буфер 1N NaSCN на 10 мин, затем оставляются для остывания на 20 мин при комнатной температуре с последующим промыванием в воде очищенной 2 раза по 3 мин. На срезы наносится пепсин и проводится инкубация в течение 10 мин при 37 °С с последующим промыванием в воде очищенной 2 раза по 3 мин.

## 3. Гибридизация и ко-денатурация

Проводится дегидратация гистологических срезов при следующих условиях:

- Спирты: I – 70 % – 2 мин
- II – 85 % – 2 мин
- III – 96 % – 2 мин

ДНК-проба наносится в количестве 10 мкл на срез и немедленно накрывается покровным стеклом, края заклеиваются резиновым клеем. Срезы помещаются в гибридизер, и запускается программа ко-гибридизации (денатурация — 5 мин при 73 °С, гибридизация — 16–24 ч при 37 °С).

## 4. Отмывка предметных стекол

Снимаются покровные стекла, предметные стекла со срезами помещаются в промывочный буфер 2·SSC+0,3 % NP-40, предварительно нагретый на водяной бане до 73 °С на 2 мин и промываются при комнатной температуре в течение 10 мин. Повторно предметные стекла со срезами промываются в 2·SSC буфере при комнатной температуре в течение 2 мин.

Проводится дегидратация срезов при следующих условиях:

- Спирты: I – 70% – 2 мин
- II – 85% – 2 мин
- III – 96% – 2 мин

Предметные стекла со срезами высушиваются на воздухе в темноте в течение 5–7 мин.

## 5. Визуализация гибридизации

На предметные стекла со срезами наносят 15 мкл контрастирующего красителя DAPI и накрывают покровным стеклом. Оценивается амплификация в 100 интерфазных ядрах опухолевых клеток по количеству зеленых и красных сигналов на флуоресцентном микроскопе, используя соответствующие наборы фильтров (Spectrum Green, Spectrum Orange).

Исследуемые образцы, имеющие соотношение  $1p36/1q25 < 0,88$  и  $19q13/19p13 < 0,74$ , расцениваются как положительные.

Исследуемые образцы, имеющие соотношение  $EGFR/CEP-7 \geq 2$  или  $\geq 15$  копий гена EGFR на клетку в  $\geq 10$  % клеток, расцениваются как положительные.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

1. Наличие некрозов в опухоли может быть ошибочно расценено как гистологический признак глиобластомы, в то время как они могут быть следствием лучевой терапии при таких глиальных опухолях, как пилоцитарная астроцитома и плеоморфная ксантоастроцитома.

Устранение: учет данных о проведенном лечении при гистологическом исследовании.

2. При отсутствии мутаций в гене IDH, а также делеции 1p/19q могут быть ошибочно установлены диагнозы «диффузная астроцитома, без мутаций в гене IDH», «анапластическая астроцитома, без мутаций в гене IDH» или «глиобластома, без мутаций в гене IDH».

Устранение: дополнительные тесты (мутации *ATRX*, *TERTp*, амплификация *EGFR*, мутации *BRAFV600E*, *H3K27M*).

3. Использование реагентов с истекшим сроком годности или реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности и соблюдать условия их хранения.

4. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.

Таблица 5. — Гистологические характеристики глиальных опухолей головного мозга

Тип опухоли	Гистологические характеристики
<b>Диффузная астроцитома (GII)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• гиперклеточность, гиперхромность и полиморфность ядер</li> <li>• фибриллярный или микрокистозный матрикс, необходимо дифференцировать с реактивным астроцитозом</li> <li>• нет митозов, эндотелиальной пролиферации и некрозов</li> </ul>
<b>Анапластическая астроцитома (GIII)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• отличие от диффузной астроцитомы — есть митозы</li> <li>• нет эндотелиальной пролиферации и некрозов</li> </ul>
<b>Глиобластома (GIV)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• клеточный плеоморфизм, митозы</li> <li>• сосудистая пролиферация, формирование гломерулоподобных структур</li> <li>• коагуляционные некрозы</li> <li>• псевдопалисады</li> </ul>
<b>• гигантоклеточная глиобластома</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• гигантские многоядерные клетки причудливой формы</li> <li>• выраженная ретикулиновая сеть</li> <li>• атипичные митозы</li> </ul>
<b>• эпителиоидная глиобластома</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• комплексы из компактно расположенных эпителиоидных и рабдоидных клеток</li> <li>• микрососудистая пролиферация, некрозы</li> <li>• митозы</li> </ul>
<b>• глиосаркома</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• злокачественная бифазная опухоль с участками глиальной и мезенхимальной дифференцировки</li> </ul>
<b>Олигодендроглиома (GII)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• мелкие округлые клетки, ядра с «гало»-эффектом</li> <li>• очаги кистозной дегенерации</li> <li>• ветвящиеся капилляры</li> <li>• митотическая активность отсутствует или низкая</li> </ul>
<b>Анапластическая олигодендроглиома (GIII)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• отличие от олигодендроглиомы — очаги микрососудистой пролиферации и некрозы</li> <li>• более 6 митозов на 10 полей зрения (×40)</li> </ul>
<b>Пилоцитарная астроцитома (GI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• формирование гломерулоподобных структур (кровеносный сосуд с несколькими просветами)</li> <li>• бифазный паттерн: компактные клетки с розенталевскими волокнами чередуются с рыхловолокнистыми участками из многоотростчатых клеток с микрокистами</li> </ul>
<b>Плеоморфная ксантоастроцитома (GII)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• плеоморфные и многоядерные клетки, эозинофильные гранулярные тельца</li> <li>• плотная ретикулиновая сеть</li> <li>• нет митозов и некрозов</li> </ul>
<b>Анапластическая плеоморфная ксантоастроцитома (GIII)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• отличие от плеоморфной ксантоастроцитомы – ≥5 митозов в 10 полях зрения (× 40), некрозы</li> <li>• отличие от эпителиоидной глиобластомы — эозинофильные гранулярные тельца</li> </ul>
<b>Субэпендимарная гигантоклеточная астроцитома (GI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• локализуется в стенке боковых желудочков и ассоциируется с туберозным склерозом</li> <li>• периваскулярные псевдорозетки</li> <li>• кальцинаты, гиалинизированные сосуды</li> </ul>