

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
27 июня 2008 г.
Регистрационный № 088-1107

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПРОГНОЗА
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРОСТАТЫ НА ОСНОВЕ
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ В ОПУХОЛИ
БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Е.Д. Черствый, канд. мед. наук, доц.
Т.А. Летковская, канд. мед. наук А.С. Портянко, В.А. Захарова

Минск 2008

Данная инструкция разработана с целью прогнозирования послеоперационного течения рака предстательной железы на основе определения экспрессии в опухоли биомолекулярных маркеров.

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

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 4 мкм

Микроволновая печь с максимальной мощностью 750–800В.

Антитела к Ki67, хромогранину А, CD34, рецепторам андрогенов, p53, бах, Е-кадгерину, β-катенину, CD44, АМАСR. Обязательным условием для применения антител является наличие в спецификации указания на возможность использования на формалин-фиксированных тканях человека.

3% раствор перекиси водорода или фирменный блокатор пероксидазы.

0,05% раствор сапонины.

Трис-буфер рН 7,6.

Буфер для демаскировки антигенов рН 6,0.

Модифицированный буфер для демаскировки антигенов рН 6,0.

Буфер для демаскировки антигенов рН 9,0.

Буфер для демаскировки антигенов рН 10,0.

1% раствор БСА.

Карандаш для иммуногистохимии (ИГХ).

Система визуализации на полимерной основе к мышинным и кроличьим антителам или универсальная.

Диаминобензидин (ДАБ).

Гематоксилин Майера.

Ксилол.

96° спирт.

Канадский бальзам.

Предметные стекла для ИГХ (или предметные стекла, предварительно обработанные поли-L-лизинном или силаном).

Покровные стекла.

Лабораторные стаканы.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак предстательной железы.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Не выявлены

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Готовые гистологические срезы поместить в термостат на ночь (37 °С).

1. Опустить срезы на несколько секунд последовательно в две смены ксилола.
2. Опустить срезы на несколько секунд последовательно в две смены 96° спирта.
3. Промыть в воде.
4. Обработать в микроволновой печи с демаскировочным буфером при максимальной мощности 750-800W (рН буфера, время процедуры для различных антител указаны в табл. 1).
5. Для антител к молекулам адгезии Е-кадгерину, β-катенину и CD44 срезы опустить в 0,05% раствор сапонины на 30 мин, для других антител этот этап пропускается.

Таблица 1

Параметры обработки срезов в микроволновой печи для первичных антител

Название антитела	рН демаскировочного буфера	Время процедуры
Анти-Ki-67	6,0	16 мин
Анти-хромогранин А	6,0	16 мин
Анти-CD34	10,0	16 мин
Анти-рецепторы андрогенов	6,0	16 мин
Анти-p53	6,0	16 мин
Анти-bax	9,0	20 мин
Анти-Е-кадгерин	9,0	16 мин
Анти-β-катенин	9,0	16 мин
Анти-CD44	6,0	16 мин
Анти-P504S	9,0	16 мин

6. Промыть в отмывочном буфере 2 раза по 5 мин.
7. Опустить в 3% 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 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.
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 время инкубации для первичных антител

Название антитела	Разведение антитела	Время инкубации
Анти-Ki-67	1:100	30 мин
Анти-хромогранин А	1:100	30 мин
Анти-CD34	1:200	12 ч
Анти-рецепторы андрогенов	1:50	30 мин
Анти-p53	Без разведения	30 мин
Анти-vaх	1:50	12 ч
Анти-Е-кадгерин	1:200	12 ч
Анти-β-катенин	1:100	12 ч
Анти-CD44	1:25	12 ч
Анти-P504S	1:250	30 мин

Для контроля активности первичных антител в каждой серии необходимо проведение одного отрицательного и одного положительного контрольного окрашивания. С целью отрицательного контрольного

окрашивания срезы вместо инкубации с первичным антителом покрывают 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве положительного контроля для антител к Ki-67, CD34, p53 могут быть использованы случаи рака любой локализации с известной высокой экспрессией данных маркеров; для антител к хромогранину А, Е-кадгерину, β-катенину и CD44 — фрагменты слизистой оболочки тонкой кишки; для антител к рецепторам андрогенов — ткань нормальной предстательной железы; для антител к P504S — случай 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 окрашивании в положительном контрольном препарате.

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

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 (ИПА) рака простаты. Определение ИПА 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 их процентного соотношения:

$$\text{ИПА} = \frac{\text{число иммунопозитивных клеток}}{\text{общее число опухолевых клеток}} \times 100.$$

Повышение ИПА опухолевых клеток выше 5% является неблагоприятным прогностическим фактором при раке простаты (чувствительность прогноза равна 80%, специфичность — 95,3%).

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. При количественном анализе все хромогранин-положительные клетки в пределах выделенной области опухоли (1 см²) подсчитываются, и экспрессия оценивается в баллах (1 балл — менее 10 клеток, 2 балла — 11-50 клеток, 3 балла — 51–100 клеток, 4 балла — 101 клеток и более).

Нейроэндокринная дифференцировка (2–4 балла) является неблагоприятным прогностическим фактором при раке простаты (относительный риск прогрессии опухоли в данной группе пациентов составляет 15,5). Поскольку у пациентов с метастатическим раком простаты увеличение сывороточного уровня *хромогранина А* предшествует росту содержания ПСА, при обнаружении выраженной нейроэндокринной дифференцировки следует использовать *хромогранин А* в качестве раннего маркера прогрессии опухоли простаты.

Экспрессия *CD34* обнаруживается в виде четко окрашенных в коричневый цвет стенок сосудов, а также в виде отдельно расположенных иммунореактивных эндотелиальных клеток коричневого цвета.

Микрососуды, маркированные *CD 34*, подсчитываются на большом увеличении микроскопа (объектив $\times 40$) в области максимальной плотности (наиболее васкуляризированных участках), в так называемой «горячей точке» (англ. — *hot spot*). Подсчет производится в 4-х полях зрения. Любую иммунореактивную эндотелиальную клетку, которая отделена от смежных микрососудов, считают «исчисляемым» сосудом. При этом большие интра- и пери-простатические сосуды служат положительным контролем. Оценка ангиогенеза: общее количество сосудов в 4-х полях зрения 1–50 — низкая плотность микрососудов; 51–90 — средняя плотность микрососудов; ≥ 91 — высокая.

Плотность микрососудов в опухоли свыше 50 в 4-х полях зрения является неблагоприятным прогностическим фактором при раке простаты (относительный риск прогрессии опухоли в данной группе составляет 6,1).

Экспрессия *рецепторов андрогенов* обнаруживается в виде разной степени интенсивности окрашивания ядер опухолевых клеток в коричневый цвет.

Результаты ИГХ-реакции с антителами к *андроген-рецепторам* оцениваются по пропорции и интенсивности положительно окрашенных клеток. Пропорция положительных клеток определяется в баллах, применяя следующие критерии: 0 баллов — 0; 1 балл — более 0–1/100; 2 балла — более 1/100–1/10; 3 балла — более 1/10–1/3; 4 балла — более 1/3–2/3; 5 баллов — более 2/3–1. Критерии балльной оценки степени интенсивности окрашивания: 0 баллов — негативное окрашивание; 1 балл — слабая интенсивность; 2 балла — умеренная интенсивность; 3 балла — сильная интенсивность. Высчитывается общий балл (*total score* — *TS*), равный сумме первого и второго балла, который составлял: 0, 2–8.

Снижение содержания *рецепторов андрогенов* до 2/3 и менее раковых клеток является независимым неблагоприятным прогностическим фактором при раке простаты (чувствительность прогноза — 95%, специфичность — 93,7%).

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.

Наличие экспрессии *p53* является независимым неблагоприятным прогностическим признаком при раке простаты (чувствительность прогноза — 57,5%, специфичность — 98,4%).

Результат ИГХ-реакции с антителами к *bax* 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 (+), 2 балла — умеренная интенсивность (++), 3 балла — сильная интенсивность (+++).

Снижение экспрессии *bax* опухолевыми клетками является независимым неблагоприятным прогностическим признаком при раке простаты (чувствительность прогноза — 77,5%, специфичность — 98,4%).

Экспрессия *E-кадгерина* имеет внутрицитоплазматическую, а также мембранную локализацию в виде четкой ровной линии, очерчивающей границы опухолевых клеток.

Критерии оценки экспрессии такие же, как для *bax*.

Снижение экспрессии *E-кадгерина* опухолевыми клетками является неблагоприятным прогностическим признаком при раке простаты (чувствительность прогноза — 77,5%, специфичность — 93,7%).

Экспрессия *β -катенина* имеет внутрицитоплазматическую, а также мембранную локализацию в виде четкой ровной линии, очерчивающей границы опухолевых клеток.

Критерии оценки экспрессии такие же, как для *bax*.

Снижение экспрессии *β -катенина* опухолевыми клетками является неблагоприятным прогностическим признаком при раке простаты (чувствительность прогноза — 70%, специфичность — 92,2%).

Экспрессия *CD44* имеет внутрицитоплазматическую, а также мембранную локализацию в виде четкой ровной линии, очерчивающей границы опухолевых клеток.

Критерии оценки экспрессии такие же, как для *bax*.

Снижение экспрессии *CD44* опухолевыми клетками является неблагоприятным прогностическим признаком при раке простаты (чувствительность прогноза — 72,5%, специфичность прогноза — 95,3%).

Продукт ИГХ-реакции с антителами к *P504S* определяется в виде гранулярного, апикального или цитоплазматического окрашивания опухолевых клеток, хорошо видимого при малом увеличении микроскопа.

Критерии оценки экспрессии такие же, как для *bax*.

Снижение интенсивности (0, +, ++) окрашивания опухолевых клеток с антителами к *P504S* является неблагоприятным прогностическим признаком при раке простаты (относительный риск прогрессии опухоли в данной группе составляет 26,8).

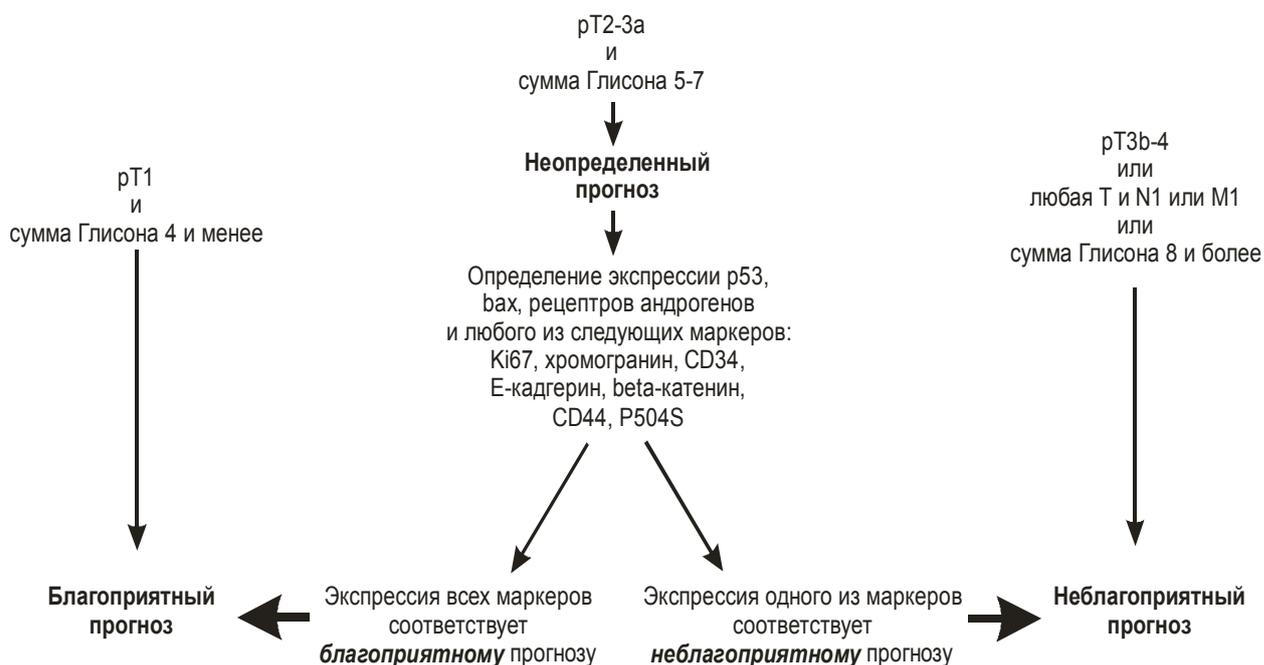
В зависимости от полученных уровней экспрессии биомолекулярных маркеров пациентов относят к группам низкого и высокого риска опухолевой прогрессии (табл. 3). Комплекс биомолекулярных маркеров, которые необходимо исследовать в каждом конкретном случае, зависит от клинических и морфологических характеристик опухоли и определяется в соответствии с приведенным ниже алгоритмом. Это позволит выделять прогностические классы среди больных, у которых прогноз течения заболевания не может быть установлен на основании категории TNM и суммы Глисона.

Таблица 3

Прогностические группы больных раком предстательной железы в зависимости от иммунофенотипических характеристик опухоли

Иммунофенотипические признаки опухоли	Группа благоприятного прогноза	Группа неблагоприятного прогноза
Ki-67 (% позитивных ядер)	<5	≥5
Хромогранин (количество позитивных клеток в 1 см ² опухоли)	≤10	>10
CD34 (количество микрососудов в 4-х полях зрения с использованием объектива х40)	≤50	>50
Рецепторы андрогенов (доля позитивных клеток)	>2/3	≤2/3
P53 (% позитивных ядер)	<5	≥5
Онкобелок <i>bax</i> (доля позитивных клеток)	>3/4	≤3/4
Молекулы адгезии E-кадгерин, β-катенин и CD44 (доля позитивных клеток)	>3/4	≤3/4
Онкобелок <i>P504S</i> (интенсивность окрашивания)	+++	0, +, ++

Алгоритм принятия решения о прогнозе послеоперационного течения рака предстательной железы по данным исследования иммуногистохимических маркеров



Алгоритм определения иммуногистохимических прогностических маркеров при раке предстательной железы

Использование иммуногистохимических прогностических маркеров целесообразно у группы пациентов с неопределенным по морфологическим данным прогнозом – группа пациентов с категорией pT2 и 3a (при N0M0), у которых сумма Глисона находится в диапазоне от 5 до 7 включительно. В этой группе для определения вероятного прогноза течения заболевания необходимо иммуногистохимическое исследование прогностических маркеров: комплекса из трех независимых (p53, bax и рецепторы андрогенов) и любого из «зависимых» (Ki67, хромогранин, CD34, E-кадгерин, β-катенин, CD44, P504S). В том случае, если полученные показатели всех определенных маркеров будут соответствовать «благоприятному» течению, пациента следует отнести к группе с благоприятным прогнозом. Если значение хотя бы одного из определенных маркеров будет соответствовать «неблагоприятному» течению, то послеоперационное ведение такого пациента следует проводить по программе для лиц с неблагоприятным прогнозом.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

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

– при использовании реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся;

– неправильном разведении реактивов, несоблюдении временного и температурного режима при выполнении методики.

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