

**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

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.

**1. Показания к применению:** глиальные опухоли головного мозга у взрослых.

**2. Противопоказания к применению:** отсутствуют.

**3. Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов, расходных материалов и т.п.**

*Перечень необходимых медицинских изделий (молекулярное секвенирование):*

- 3.1. Бокс биологической безопасности 2 класса (тип В2).
- 3.2. Термостат твердотельный с функцией охлаждения (4-100°C).
- 3.3. Вортекс.
- 3.4. Микроцентрифуга (скорость вращения ротора до 14000 об/мин).
- 3.5. Амплификатор (термоциклер) для проведения ПЦР.
- 3.6. Камера электрофоретическая.
- 3.7. Шейкер (скорость перемешивания не менее 2500 об/мин).
- 3.8. Генетический анализатор.
- 3.9. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

- 3.10. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 4 мкм.
- 3.11. рН-метр.
- 3.12. Термостат твердотельный.

- 3.13. Баня водяная с датчиком температуры.  
 3.14. Гибридизер.  
 3.15. Флуоресцентный микроскоп.  
 3.16. Наборы флуоресцентных фильтров.  
 3.17. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

- 3.18. Набор реактивов для выделения ДНК (сорбционный принцип).  
 3.19. Набор реактивов для проведения ПЦР.  
 3.20. 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
<i>IDH2</i>	4 exon	F – GACTCCAGAGCCCACACATT R – CTAGGCGAGGAGCTCCAGT
<i>BRAFV600E</i>	15 exon	F – CAATCATCCACAGAGACCTCTAAT R – ATCCACAAAATGGATCCAGACA
<i>TERT</i>	promoter region	F – AGTGGATTTCGCGGGCACAGA R – CAGCGCTGCCTGAAACTC
<i>ATRX_1</i>	9 exon	F – CAGTTTCCTGAAAGAAGGGAAT R – CAGAGCCAGAACAGGAATCA
<i>ATRX_2</i>	9 exon	F – TGATTCCTGTTCTGGCTCTG R – TGTTCTTTGTTCTCTGTTGGA
<i>ATRX_3</i>	9 exon	F – TGAGCACATGCATCAGAATG R – TGTTTTCTGTCCAAGTCCA
<i>ATRX_4</i>	9 exon	F – TGTGGTCTGAACCCCAAGTT R – ATCTTTCCCCGCCTGAGT
<i>ATRX_5</i>	9 exon	F – AGACTCAGGCGGGGAAAGAT R – ATCAACTGTGCCTTCTGCTG
<i>ATRX_6</i>	9 exon	F – TTCAGCAGAAGGCACAGTTG R – TCGCTCAGGTAACCTTTTCAGTG
<i>TP53_1</i>	5, 6 exon	F – TGTTCACTTGTGCCCTGACT R – TTAACCCCTCCTCCAGAGA
<i>TP53_2</i>	7 exon	F – CTGGCCACAGGTCTCCCCAA R – AGGGGTTCAGAGGCAAGCAGA
<i>TP53_3</i>	8, 9 exon	F – TTGGGAGTAGATGGAGCCT R – AGTGTTAGACTGGAAACTTT
<i>H3F3A</i>	2 exon	F – TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGA R – GGTTTCTTCACCCCTCCAGT

- 3.21. Ксилол.
- 3.22. Спирт этиловый 70%, 96%.
- 3.23. Ацетат аммония 5М.
- 3.24. ЭДТА 0,5М; рН 8,0.
- 3.25. NiDi формаид.
- 3.26. Набор реактивов для проведения реакции секвенирования.
- 3.27. Микропробирки объемом 0,2 и 1,5 мл.
- 3.28. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.
- 3.29. Холодоэлемент или охладитель проб.

*Перечень необходимых реактивов и расходных материалов (FISH):*

- 3.30. Спирт этиловый 100%, 85%, 70%.
- 3.31. Ксилол.
- 3.32. Вода очищенная.
- 3.33. 1N NaSCN.
- 3.34. Пепсин, активность 1:3000-1:3500.
- 3.35. 0,2N HCl; рН 2,0.
- 3.36. Детергент NP-40.
- 3.37. 3M NaCl, 0,3M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>; рН 5,3.
- 3.38. Контрастирующий краситель DAPI, 1000 нг/мл.
- 3.39. Стекла предметные с адгезивным покрытием, стекла покровные.
- 3.40. Микропробирки объемом 1,0 мл.
- 3.41. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.

#### **4. Технология использования предлагаемого метода**

##### **4.1. 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 балъзам» 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 1).

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

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

2. При выставлении гистологического диагноза неуточненной олигодендроглиомы или олигоastroцитомы, помимо определения мутации в генах *IDH*, дополнительно определяется наличие коделеции *1p/19q* с использованием метода FISH. В случае наличия 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 проведения поиска других распространенных мутаций. Так, глиомы средней линии (Grade IV), характеризующиеся в 100 % случаев мутацией *H3K27M*, гистологически неотличимы от астроцитом Grade II/III. В связи с этим при отсутствии мутации в гене *IDH* и локализации в стволовых отделах головного мозга, необходимо определение мутации *H3K27M*. При подозрении на плеоморфную ксантоастроцитому выполняется определение мутации *BRAFV600*.

6. В случае гистологических признаков глиобластомы (приложение 1), проводится тестирование на наличие мутации в гене *IDH* и, при наличии мутации, выставляется диагноз: **«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. В случае гистологических признаков глиобластомы (приложение 1) и отсутствии мутации в гене *IDH* выставляется 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 % случаев).

8. В отсутствии возможности проведения 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 применением молекулярно-генетического тестирования представлен на рисунке 1. Наличие или отсутствие мутаций в указанных генах ассоциируется с определенным прогнозом заболевания в соответствии исследованиями ВОЗ (таблица 2).

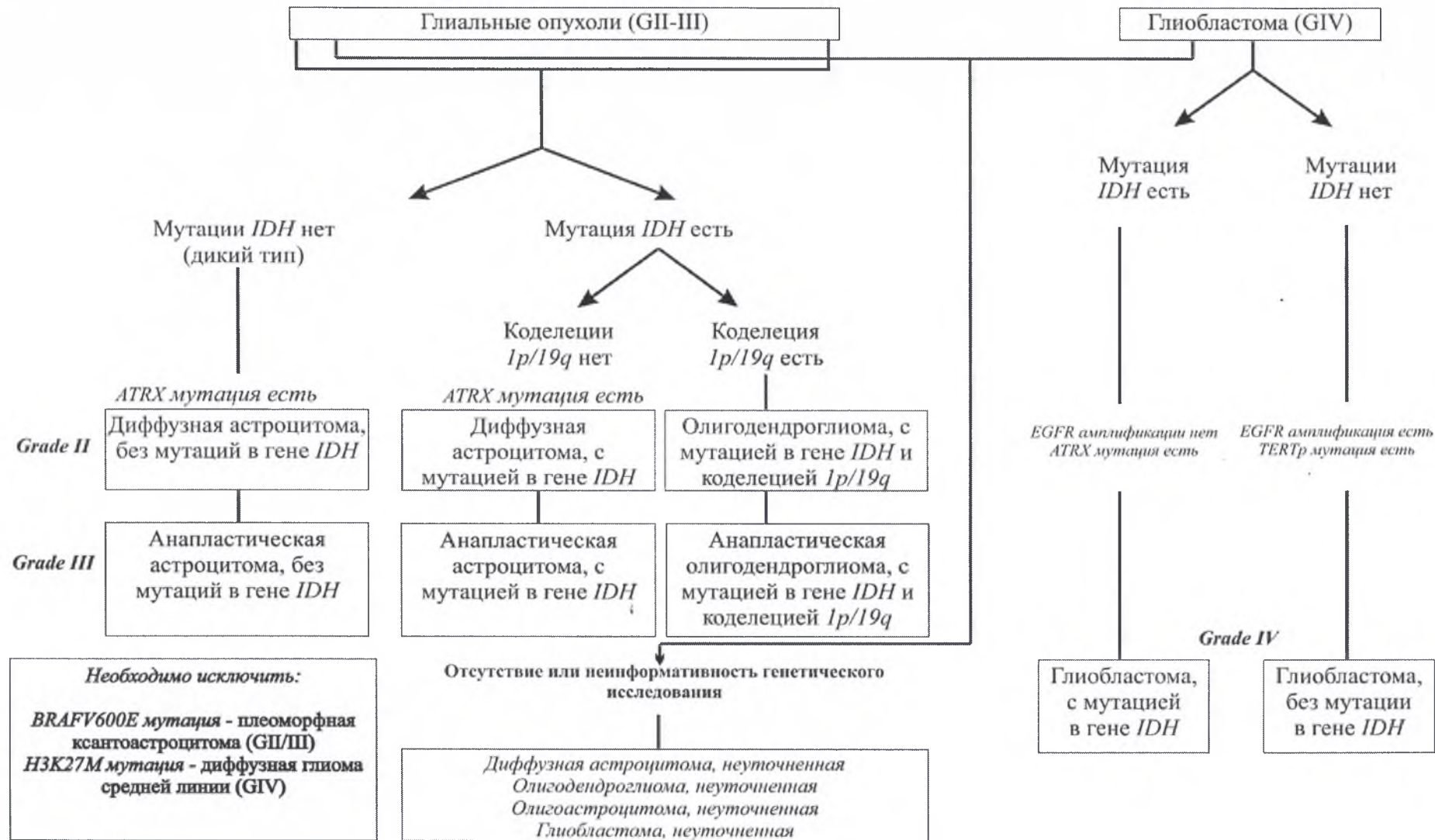


Рисунок 1 – Алгоритм интегрированной диагностики глиальных опухолей у взрослых



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%
Олигодендроглиомы	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 %

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

4.3.1. 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°C в течение 1 месяца, при температуре -70°C – длительное время.

4.3.2. 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 секунд	60° – 35 секунд	72° – 25 секунд	35
<i>IDH2</i>	95° – 20 секунд	60° – 35 секунд	72° – 25 секунд	35
<i>TERT</i>	95° – 25 секунд	64° – 90 секунд	72° – 35 секунд	40
<i>BRAF</i>	95° – 20 секунд	56° – 35 секунд	72° – 25 секунд	35
<i>ATRX</i>	95° – 20 секунд	60° – 40 секунд	72° – 25 секунд	40
<i>TP53</i>	95° – 20 секунд	60° – 40 секунд	72° – 25 секунд	35
<i>H3F3A</i>	95° – 20 секунд	59° – 35 секунд	72° – 25 секунд	35

На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 3-5 мин при температуре 72°C.

#### 4.3.3. 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

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

##### 4.4.1. 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.

##### 4.4.2. Предобработка

Предметные стекла помещаются на водяную баню в предварительно нагретый до 80°C 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°C с последующим промыванием в воде очищенной 2 раза по 3 мин.

##### 4.4.3. 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°C, гибридизация – 16-24 часов при 37°C).

#### 4.4.4. 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°C 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.

#### 4.4.5. Визуализация гибридизации

На предметные стекла со срезами наносится 15 мкл контрастирующего красителя DAPI и накрывается покровным стеклом. Оценивается амплификация в 100 интервальных 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 соотношение 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.

### **5. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении метода и пути их устранения**

5.1. 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.

5.2. При отсутствии мутаций в гене IDH, а также коделеции 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: проведение дополнительных тестов (мутации *ATRX*, *TERTp*, амплификация *EGFR*, мутации *BRAFV600E*, *H3K27M*).

5.3. 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.

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

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.

Приложение к инструкции по применению «Метод диагностики глиальных опухолей центральной нервной системы с использованием гистологических и молекулярно-генетических критериев»

Таблица – 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 (<math>\times 40</math>)</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 – <math>\geq 5</math> митозов в 10 полях зрения (<math>\times 40</math>), 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>