

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть

26 марта 2010 г.

Регистрационный № 025-0310

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

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный  
медицинский университет», УЗ «Городское клиническое  
патологоанатомическое бюро», 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 М.И. Ивановская, Л.М. Сагальчик

Минск 2010

Инструкция разработана с целью улучшения морфологической диагностики патологических процессов предстательной железы с признаками внутритрипотоковой 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 $\beta$ -Е12)

АМАСР —  $\alpha$ -метилацил-коэнзим А рацемаза (АМАСР/Р504S)

ПЖ — предстательная железа

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

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 4 мкм.

2. Микроволновая печь с максимальной мощностью 750–800 Вт.

3. Антитела к ВМЦ, р63, АМАСР. Обязательным условием для применения антител является наличие в спецификации указания на возможность использования на формалин-фиксированных тканях человека.

4. 3%-й раствор перекиси водорода или фирменный блокатор пероксидазы.

5. Трис-буфер рН 7,6.

6. Буфер для демаскировки антигенов рН 6,0.

7. Модифицированный буфер для демаскировки антигенов рН 6,0.

8. Буфер для демаскировки антигенов рН 9,0

9. 1%-й раствор БСА.

10. Карандаш для ИГХ.

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

12. Диаминобензидин (ДАБ).

13. Гематоксилин Майера.

14. Ксилол.

15. 96° спирт.

16. Канадский бальзам.

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

18. Покровные стекла.

19. Лабораторные стаканы.

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Неопухолевые, предраковые процессы и рак предстательной железы.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

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 Вт), затем 15 мин при мощности 300–400 Вт (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%-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%-й 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%-м 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 АМАСR — случаи высоко- и умеренно дифференцированного 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. Базальные клетки выявляются 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 данных 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 неопухолевых, 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, поражениях 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 Scope 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.

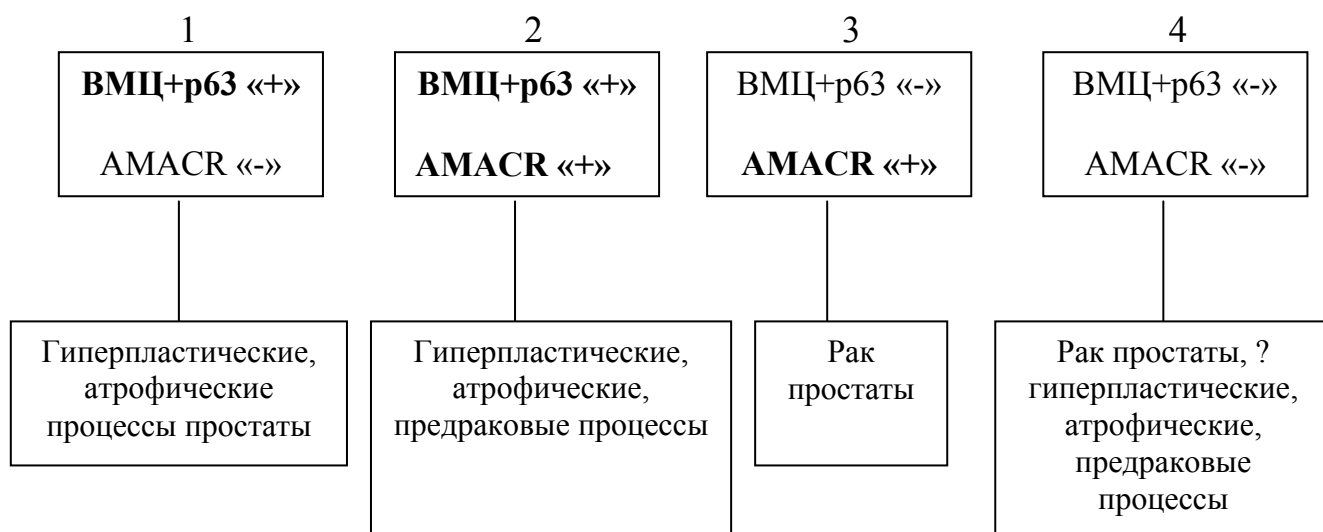
**Алгоритм определения иммуногистохимических маркеров базальных клеток и онкогена при дифференциальной диагностике неопухолевых, предраковых процессов и рака предстательной железы**

Использование ИГХ маркеров базальных клеток (ВМЦ+р63) и онкогена (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 в отношении рака предстательной железы, относятся процессы с признаками ацинарной и/или внутрипротоковой пролиферации, сомнительными признаками инвазивного роста и вариабельными проявлениями цитологической атипии, которые объединяют под общим названием «атипическая мелкоацинарная пролиферация»<sup>2</sup>. У пациентов данной группы для верификации диагноза рака предстательной железы необходимо иммуногистохимическое определение 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 онкогена**



1. Интактный на всем протяжении ацинарных и протоковых структур или очагово фрагментированный слой базальных клеток и отсутствие экспрессии АМАСR 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 АМАСR клетками секреторного эпителия может выявляться при предраковых, реже гиперпластических и атрофических, процессах предстательной железы.

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

4. Отсутствие базальных клеток, а также экспрессии АМАСR может говорить как о наличии рака предстательной железы, так и о дефекте ИГХ окрашивания при неопухолевых и предраковых процессах предстательной железы. Поэтому в случае ВМЦ, p63, АМАСR-негативного ИГХ окрашивания необходимо повторное ИГХ-исследование 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 АМАСR 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 ПЖ и необходимости динамического наблюдения за данной группой пациентов (с определением уровня сывороточного простат-специфического антигена и проведением мультифокальной пункционной биопсии), а также своевременном устранении такого вероятного патогенетического фактора неопластической трансформации эпителия, как активное или хроническое воспаление при его наличии.

### **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.