

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«28» июля 2019 г.

Регистрационный № 077-0519



**АЛГОРИТМ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
БИОПТАТА ОПУХОЛИ ПРИ  
В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОМАХ**

Инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»,

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

**АВТОРЫ:** канд. мед. наук Давыдов Д.А., Рукша К.Г., Пашкова О.Л.,  
канд. биол. наук Дорошенко Т.М., д-р мед. наук Портянко А.С.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен алгоритм патологоанатомических исследований биоптата опухоли при В-клеточных лимфомах, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику опухолей данной группы.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-патологоанатомов, врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим В-клеточными лимфомами, в стационарных и/или амбулаторных условиях и/или в условиях отделений дневного пребывания.

### **Перечень условных обозначений**

БДУ	без дополнительных уточнений
БКЛБТК/Г	В-клеточная лимфома, богатая Т клетками/гистиоцитами
ГЦ	герминативный центр
ДБКЛ	диффузная В-крупноклеточная лимфома
ИГХ	иммуногистохимия, иммуногистохимический
КЛХ	классическая лимфома Ходжкина
ЛБ	лимфома Беркитта
ЛИ	лимфоидное истощение
ЛМЗ	лимфома из клеток маргинальной зоны
ЛМЛ/ХЛЛ	лимфома из малых лимфоцитов/хронический лимфоцитарный лейкоз
МКЛ	мантийноклеточная лимфома
НЛХЛП	нодулярная лимфома Ходжкина с лимфоидным преобладанием
НС	нодулярный склероз
ФДК	фолликулярные дендритные клетки
ФЛ	фолликулярная лимфома
ХРШ	клетки Ходжкина и Рид-Штернберга
ЦНС	центральная нервная система
FISH	флуоресцентная гибридизация in situ

### **Определения основных терминов**

**Злокачественный инфильтрат** – морфологический субстрат лимфомы, состоящий из опухолевых и фоновых клеток.

**Опухолевые клетки** – собственно злокачественные клетки, обуславливающие биологическое поведение лимфомы и обладающие типичными фенотипическими и молекулярно-генетическими признаками, положенными в основу классификации.

**Фоновые клетки** – неопухолевый компонент злокачественного инфильтрата, формирующийся в результате (1) активной мобилизации клеток микроокружения опухолевыми клетками посредством сигнальных молекул, а также представленный (2) резидуальными клеточными популяциями, типичными для соответствующей локализации процесса.

**Содержание опухолевых клеток в инфильтрате** – доля собственно злокачественных клеток в инфильтрате. Низким содержанием следует считать долю опухолевых клеток <10% от количества клеток инфильтрата. При неполном замещении структуры лимфоузла инфильтратом оценку содержания опухолевых клеток следует выполнять только в репрезентативных полях зрения.

**Диффузный инфильтрат** – вариант строения инфильтрата, при котором опухолевые и фоновые клетки в репрезентативных полях зрения распределены относительно равномерно, не образуют фолликулоподобных или узловых структур.

**Нодулярный инфильтрат** – вариант строения инфильтрата, при котором за счет соседства гетерогенных клеточных популяций или за счет фиброза наблюдаются гистоархитектурно обособленные зоны инфильтрата (часто округлых очертаний).

**Фолликулярный инфильтрат** – вариант строения инфильтрата, при котором формируются опухолевые фолликулы, имеющие морфологическое сходство со вторичными фолликулами лимфоузла.

## **1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Диагностика наиболее распространенных В-клеточных лимфом (С81 – С83, С85, С88.4 по МКБ-10).

## **2. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Отсутствуют.

## **3. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАГЕНТОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

**Медицинские изделия:**

- 1) микротом гистологический
- 2) термостол
- 3) охлаждающий столик
- 4) микроскоп световой с флуоресцентной осью
- 5) водяная баня
- 6) термостат (t=35-70°C)
- 7) холодильник бытовой

- 8) вытяжной шкаф
- 9) таймер электронный
- 10) емкости Коплина стеклянные
- 11) устройство для демаскировки
- 12) планшет для иммуногистохимического окрашивания
- 13) дозаторы пипеточные одноканальные (1-1000 мкл)

**Реагенты, реактивы и расходные материалы:**

- 1) лезвия для микротомов одноразовые
- 2) предметные стекла с адгезивным электростатическим покрытием
- 3) покровные стекла
- 4) наконечники полимерные одноразовые к дозаторам пипеточным со штативом
- 5) 3%-ый раствор перекиси водорода или блокатор пероксидазы
- 6) гематоксилин Майера
- 7) среда для монтирования покровного стекла
- 8) деионизированная вода
- 9) ксилол
- 10) этиловый спирт 96°
- 11) маркер гидрофобный для ограничения зоны нанесения реагентов
- 12) марлевые салфетки
- 13) фильтровальная бумага
- 14) одноразовые латексные перчатки
- 15) буферные растворы для демаскировки антигенов
- 16) промывочный буфер
- 17) безсывороточная система растворов для устранения неспецифического фонового окрашивания (протеиновый блок)
- 18) первичные антитела
- 19) дилуент для разведения первичных антител
- 20) универсальная система детекции (визуализации) к мышинным и кроличьим антителам
- 21) диаминобензидин
- 22) полимерные пробирки с защелкивающейся крышкой (1,0-1,5 мл)

## 4. ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

4.1 После извлечения из организма пациента ткань следует в максимально короткий срок (до 10 минут) поместить в 10% нейтральный забуференный формалин. Продолжительность фиксации в формалине от 6 до 24 часов в зависимости от объема образца. Лимфоузлы размером более 5 мм рекомендуется рассекать вдоль продольной оси. При наличии возможности выполнения вспомогательных молекулярно-биологических исследований или криоконсервации ткани согласовать технические аспекты манипуляций со свежей тканью с профильным подразделением. При условии наличия достаточного для морфологического исследования объема материала ткань до помещения в формалин может быть разделена на две части: для гистологического/иммуногистохимического исследования (поместить в формалин) и для вспомогательных молекулярно-биологических исследований (в специализированную среду в зависимости от методики). После фиксации гистологическая проводка и изготовление парафиновых блоков осуществляются по стандартной методике.

4.2 Изготовить гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Толщина среза ткани с парафинового блока не должна превышать 3 мкм. Не следует делать больше двух серийных срезов с одного блока для окрашивания гематоксилином и эозином.

4.3 Определить наличие потенциального морфологического субстрата злокачественного лимфопролиферативного процесса – злокачественного инфильтрата.

Микроскопические признаки, указывающие на необходимость включения лимфомы в дифференциальный диагноз:

4.3.1 Лимфоузлы, селезенка:

4.3.1.1 увеличение, исчезновение или замещение отдельных компартментов при сохранении общего плана строения, в т.ч. появление единичных клеток, нетипичных для конкретного компартмента лимфоузла или селезенки;

4.3.1.2 частичное или полное замещение структуры лимфоузла или селезенки инфильтратом.

4.3.2 Экстранодальные локализации:

4.3.2.1 наличие инфильтрата, клеточный состав которого не соответствует типичному для данной локализации воспалительному процессу;

4.3.2.2 строение и клеточный состав инфильтрата не объясняется наличием нормальных структур лимфоидной ткани в данном органе;

4.3.2.3 наличие инфильтрата в локализациях, для которых воспалительные инфильтраты нетипичны;

4.3.2.4 мономорфный состав инфильтрата;

4.3.2.5 разрушение, замещение эпителиальных структур клетками инфильтрата.

4.4 При наличии инфильтрата оценить характер его строения (обзорное увеличение) и клеточный состав (увеличение x200-x400).

4.5 На основании данных о строении инфильтрата и его клеточном составе выбрать необходимый диагностический алгоритм (таблица 1). Рекомендуемая минимальная панель иммуногистохимических маркеров: LCA, CD20, CD3, Ki-67, CyclinD1, CD10, bcl-2, bcl-6.

Вышеуказанная панель может быть изначально модифицирована в соответствии с выбранным диагностическим алгоритмом, либо дополнена по результатам оценки окрашивания. Пример протокола иммуногистохимического окрашивания приведен в разделе 4.9. Конкретные условия зависят от характеристик применяемых в лаборатории реагентов и расходных материалов, что требует предварительной отработки методики на контрольных образцах ткани.

4.6 Если результаты иммунофенотипирования позволяют установить нозологический диагноз, повторно оценить морфологию инфильтрата на предмет соответствия рассматриваемой нозологической форме лимфомы (типичные морфологические черты приведены в таблицах 2-6).

Таблица 1 – Базовые параметры, для выбора диагностического алгоритма

Параметр	Значение параметра				
	Мелкие	Средние/крупные			
Размер опухолевых клеток					
Строение инфильтрата	Диффузный/ нодулярный	Фолликулярный	Диффузный	Нодулярный/ диффузный	Нодулярный/ диффузный
Содержание опухолевых клеток в инфильтрате	Высокое	Высокое	Высокое	Низкое	Низкое
LCA, CD20	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+
Алгоритм	Мелкоклеточные В-лимфомы	ФЛ	ДБКЛ, БДУ/ЛБ	КЛХ	НЛХЛП/ БКЛБТК/Г

Таблица 2 – Диагностический алгоритм «мелкоклеточные В-лимфомы»

Шаг 1	Опухолевые клетки: CD3-, CD10-, bcl-6-		
Шаг 2	CD5+		CD5-
Шаг 3	CD23+, CyclinD1-, LEF1+ (доп.)	CD23-, CyclinD1+	CD23-, CyclinD1-, SOX11+, CD43+/-
Шаг 4	ЛМЛ/ХЛЛ	МКЛ	ЛМЗ
Шаг 5	<p>В 80% случаев – полное замещение структур лимфоузла злокачественным инфильтратом. Опухолевые клетки мелкие, хроматин мелкоглыбчатый, ядрышки обычно не видны, цитоплазма скудная. В инфильтрате могут встречаться параиммунобласты. Последние могут группироваться и образовывать центры пролиферации (более светлого оттенка на основном темно-базофильном фоне).</p>	<p>Помимо диффузного характера роста реже может иметь место изолированное вовлечение мантийных зон, а также нодулярный рост. Опухолевые клетки мелкие, хроматин мелкоглыбчатый, ядрышки обычно не видны, контур ядра может иметь неровности, зубрины, расщепления, цитоплазма скудная. В опухолевом инфильтрате обычно присутствуют эпителиоидные макрофаги, расположенные поодиночке. Среди инфильтрата могут определяться гиалинизированные сосуды мелкого калибра. Возможна плазмноклеточная или моноцитоидная дифференцировка части опухолевых клеток. Описан бластоидный и плеоморфный варианты.</p>	<p>При экстранодальной локализации:                      1) опухолевые лимфоциты маргинальной зоны (мелкие, неровный контур ядер, конденсированный хроматин, хорошо различимая светлая цитоплазма);                      2) переменное количество иммунобластоподобных и центробластоподобных клеток;                      3) плазмциты поликлональные либо моноклональные;                      4) лимфоэпителиальные поражения;                      5) реактивно измененные герминативные центры.                      При нодальной локализации инфильтрат окружает резидуальные ГЦ, а затем полностью замещает структуру лимфоузла. Необходимо исключить первичное экстранодальное поражение.</p>

Таблица 3 – Диагностический алгоритм «фолликулярная лимфома»

Шаг 1	CD10+, bcl-6+, bcl-2-
Шаг 2	ИГХ доп.: LMO2+, HGAL+, CD5-
Шаг 3	Хорошо определяемая сеть ФДК (CD21+, CD23+)
Шаг 4	FISH: транслокация <i>BCL2</i> [t(14;18)(q21;q32)]
Шаг 5	ФЛ
Шаг 6	<p>Инфильтрат образует фолликулы (могут сливаться). Опухолевые фолликулы обычно меньше по размеру и имеют менее выраженную мантийную зону по сравнению с реактивными фолликулами. В фолликулах отсутствуют макрофаги с окрашиваемыми тельцами в цитоплазме. Во многих случаях присутствует диффузный компонент инфильтрата. Преобладание диффузного компонента инфильтрата над фолликулярным не исключает фолликулярную лимфому. Опухолевые клетки: centroциты и центробласты. Определение грейда ФЛ:                      1 – 0-5 центробластов/1 п.з. x400;                      2 – 6-15 центробластов/1 п.з. x400;                      3 – более 15 центробластов/1 п.з. x400;                      3a – присутствует некоторое количество centroцитов;                      3b – centroциты отсутствуют.                      Учитывается среднее значение по 10 полям зрения.</p> <p><b>Морфологические варианты</b></p> <p><b>Перстневидноклеточная лимфома:</b> накопление иммуноглобулина в цитоплазме centroцитов.</p> <p><b>ФЛ с плазмноклеточной дифференцировкой:</b> атипичные плазмциты, клонально связаны с другими опухолевыми клетками.</p> <p><b>ФЛ с дифференцировкой в направлении клеток маргинальной зоны:</b> опухолевые фолликулы окружены ободком моноцитоидных клеток.</p> <p><b>Флоральный вариант:</b> опухолевые фолликулы крупные, опухолевые клетки группируются в небольшие кластеры, окруженные скоплениями неопухолевых мантийных клеток.</p>



## Нозологические варианты ФЛ

### ФЛ педиатрического типа

Опухолевые фолликулы крупные, с высоким индексом пролиферативной активности (>30%), часто неправильных очертаний. Опухолевые клетки имеют бластоидную морфологию (не свидетельствует о высокогредном процессе). Иммунофенотип: CD10+, bcl-6+, bcl-2-, MUM1-. Отсутствует типичная для классической ФЛ транслокация *BCL2*. Характерно индолентное течение.

### ФЛ с реаранжировкой *IRF4*

Иммунофенотип: CD10+, bcl-6+, bcl-2+/-, MUM1+. Отсутствует типичная для классической ФЛ транслокация *BCL2*. Необходима демонстрация реаранжировки *MUM1/IRF4* посредством FISH.

### Первичная кожная лимфома из клеток центров фолликулов

Инfiltrат формирует фолликулы в дерме при отсутствии контакта с эпидермисом или распространяется диффузно. Иммунофенотип: CD10+, bcl-6+, bcl-2-/+ . Для дифференциального диагноза с кожной фолликулярной лимфоидной гиперплазией часто необходимо подтвердить клональные реаранжировки генов иммуноглобулинов.

### ФЛ дуоденального типа

Иммунофенотип: CD10+, bcl-6+, bcl-2+. Ассоциация с инфекцией *H.pylori*. Следует отличать от лимфоматозного полипоза, связанного с ФЛ, который почти всегда сопровождается вовлечением мезентериальных лимфоузлов.

Таблица 4 – Диагностический алгоритм «ДБКЛ БДУ/лимфома Беркитта»

Шаг 1	Ki-67			
	~95-100%		<95%	
Шаг 2	CD10+, bcl-6+, bcl-2- с-тус+ (в большинстве ядер)	CD10+	CD10-, bcl-6+ MUM1-      MUM1+	CD10-, bcl-6-
Шаг 3	Опухолевые клетки напоминают центробласты темной зоны ГЦ, присутствуют макрофаги с окрашиваемыми тельцами в цитоплазме (картина «звездного неба»), искусственные «щели» между клетками	Варианты морфологии опухолевых клеток: центробластоподобные, иммунобластоподобные, анапластические (плеоморфные)		
Шаг 4	FISH: <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> , <i>BCL6</i> *			
Шаг 5	Реаранжировка <i>MYC</i> при отсутствии реаранжировок <i>BCL2</i> и <i>BCL6</i> – лимфома Беркитта	Отсутствует реаранжировка <i>MYC</i> ДБКЛ, БДУ из клеток ГЦ		ДБКЛ, БДУ из активированных В-клеток
Шаг 6	При отсутствии реаранжировки <i>MYC</i> и выполнении всех вышеперечисленных критериев оценить наличие aberrаций 11q При наличии aberrаций 11q – Беркитт-подобная лимфома с aberrацией 11q При наличии реаранжировок <i>MYC</i> и <i>BCL2</i> и/или <i>BCL6</i> – высокогредная В-клеточная лимфома с перестройками <i>MYC</i> и <i>BCL2</i> и/или <i>BCL6</i> (double-hit/triple-hit)			

\*определение реаранжировок *BCL2* и *BCL6* показано при наличии подтвержденной реаранжировки *MYC*.



## **Нозологические варианты В-крупноклеточных лимфом Первичная ДБКЛ ЦНС**

Опухоль, **первично** вовлекающая головной, спинной мозг, мозговые оболочки, структуры глаза. Морфология клеток схожа с таковой при ДБКЛ БДУ, чаще имеют морфологию центробластов, реже иммунобластов. Инfiltrат диффузный с тенденцией к периваскулярной локализации. Иммунофенотип: CD20+, CD79a+, PAX5+, CD10-/+, bcl-6+/-, MUM1+, bcl-2+ (50% случаев), EBV-.

### **Первичная кожная ДБКЛ, ножной тип**

Опухоль инфильтрирует кожу и подкожную клетчатку, представлена диффузными полями средних и крупных клеток с морфологией центробластов и иммунобластов без примеси centroцитов. Ядра характерной округлой формы. Эпидермис не вовлекается, отделен от инfiltrата интактной зоной. Иммунофенотип: CD20+, CD79a+, PAX5+, bcl-2+, MUM1+, CD10-, bcl-6+/-, EBV-.

### **Эпштейн-Барр вирус-позитивная ДБКЛ, БДУ**

Инfiltrат может быть как полиморфным, так и мономорфным (в т.ч. в пределах одного образца). Опухолевые клетки иммунобластоподобные и Ходжкин-Рид-Штернберг-подобные. Участки с полиморфным инfiltrатом содержат фоновые малые лимфоциты, плазмоциты, гистиоциты, эпителиоидные клетки. Типичны географические некрозы. Иммунофенотип: CD20+, CD79a+, PAX5+, CD10-, bcl-6-, MUM1+, CD30+ (75% случаев), CD15-, PD-L1+ (часто), EBV+ (более 50% опухолевых клеток).

### **Эпштейн-Барр вирус-позитивная слизистокожная язва**

Четко ограниченное поверхностное изъязвление, связанное с инfiltrатом полиморфного состава: крупные атипичные иммунобластоподобные и Ходжкин-Рид-Штернберг-подобные клетки. Фон: малые лимфоциты, плазмоциты, гистиоциты. Инfiltrат обычно четко ограничен, с ободком малых лимфоцитов в основании язвы. Иммунофенотип: CD30+, CD20+, CD79a+, PAX5+, CD15+/-, CD10-, bcl-6-, MUM-1+. Фоновые клетки: CD3+, CD4+, EBV+ (опухолевые и фоновые клетки).

### **ДБКЛ, связанная с хроническим воспалением**

Морфологически неотличима от ДБКЛ, БДУ. Опухолевые клетки обычно имеют иммунобластную морфологию. Редко наблюдается плазмочитарная дифференцировка или крупные анапластические клетки. Опухолевый инfiltrат может быть представлен разрозненными клетками на фоне воспаления и фиброза, либо единичными клетками, окруженными фибрином (в случаях, ассоциированных с протезированием сосудов/клапанов сердца). Иммунофенотип: CD20+,

CD79a+, PAX5+, CD10-, bcl-6-, MUM1+, CD138-/+, CD30+/-, EBV+, HHV8-.

### Первичная медиастинальная БКЛ

Поля крупных и средних центробластоподобных клеток. Ядра могут быть дольчатыми, опухолевые клетки нередко напоминают клетки Ходжкина и Рид-Штернберга. Как правило имеет место склероз стромы, обуславливающий феномен компартиментализации опухолевых клеток. Иммунофенотип: CD20+, CD79a+, PAX5+, CD10-/+, bcl-6+ (50% случаев), bcl-2+ (75% случаев), MUM1+ (75% случаев), Oct-2+, BOB.1+, CD30+/- (часто очагово), CD15-, LCA+, CD23+ (70% случаев), PD-L1+ (70% случаев), EBV-, MAL+.

### Интраваскулярная БКЛ

Опухолевые центробластоподобных клеток в просветах мелких сосудов. Инфильтрат вне сосудов часто отсутствует. Иммунофенотип: CD20+, CD79a+, PAX5+, CD5-/+, CD10-/+, bcl-6-/+, MUM1+, bcl-2+, CD30-/+, EBV-/+.

### ALK-позитивная БКЛ

Иммунобластоподобные крупные округлые клетки обычно тяготеют к синусам лимфоузла. Часто имеет место плазмобластная дифференцировка, могут встречаться Рид-Штернтерг-подобные клетки или анапластические многоядерные клетки. Часто -присутствуют очаги некроза. Иммунофенотип: CD20-, CD79a-, CD2-, CD3-, CD5-, CD7-, CD8-, CD4-/+, LCA-/+, CD138+, EMA+, CD30-/+, ALK+, EBV-, HHV8-.

Таблица 5 – Диагностический алгоритм «классическая лимфома Ходжкина»

Шаг 1	CD30+, CD15+, PAX5+ (интенсивность ниже, чем в фоновых В-клетках), bcl-6-, LCA-, CD20-/+			
Шаг 2	ИГХ доп.: fascin+, MUM-1+, Oct-2-, BOB.1-/+ низкая интенсивность			
Шаг 3	<b>КЛХ</b>			
Шаг 4	Нодулярный склероз	Смешанноклеточный	Богатый лимфоцитами	Лимфоидное истощение
	Обязательно наличие прослоек соединительной ткани (выраженность варьиабельна, не менее 1 прослойки), ограничивающих узловые структуры. Преобладающий тип опухолевых клеток – лакунарные. Классические клетки Рид-Штернберга встречаются нечасто. Могут присутствовать очаги некроза. Редко опухолевые клетки формируют сливные поля – синцитиальный вариант НС. Клеточный состав фона полиморфный, типично обилие эозинофилов, макрофагов.	Обычно инфильтрат диффузный, признаки фиброза отсутствуют. Клеточный состав фона полиморфный. Преобладающие типы опухолевых клеток: классические клетки Рид-Штернберга и клетки Ходжкина. Редко встречаются лакунарные клетки.	Обычно нодулярный характер роста (реже диффузный). В составе фона преобладают малые лимфоциты. Некроз, фиброз отсутствуют. Преобладающий тип опухолевых клеток: классические клетки Рид-Штернберга.	Распад малых лимфоцитов (снижено их кол-во в фоновом инфильтрате). Ретикулярный тип ЛИ – гиперклеточность, обилие плеоморфных крупных клеток. скудный фоновый инфильтрат, некрозы. ЛИ по типу диффузного фиброза – гипоклеточность, выраженный фиброз без формирования узлов, некрозы.

Таблица 6 – Диагностический алгоритм «нодулярная лимфома Ходжкина с лимфоидным преобладанием/В-клеточная лимфома, богатая Т клетками/гистиоцитами»

Шаг 1	CD30-, CD15-, PAX5+ (интенсивность сопоставима с фоновыми В-клетками), bcl-6+, bcl-2-, LCA+	CD30-/+ , CD15-, PAX5+ (интенсивность сопоставима с фоновыми В-клетками), bcl-6+/-, LCA+
Шаг 2	ИГХ доп.: fascin-, Oct-2+, VOB.1+, MUM-1+/-, EMA+	ИГХ доп.: fascin-, Oct-2+, VOB.1+, MUM-1+/-, EMA-/+
Шаг 3	Фоновые клетки: CD3+, PD-1+ розетки вокруг опухолевых клеток. В узлах присутствует распространенная сеть ФДК (CD21+, CD23+, CD35+).	Фоновые клетки: преимущественно CD3+ и/или CD68+. Малые CD20+ клетки отсутствуют или единичны. Не определяются остатки ФДК (CD21, CD23, CD35).
Шаг 4	<b>НЛХЛП (NLRPL)</b>	<b>БКЛБТК/Г (ТС/HRVCL)</b>
Шаг 5	Инfiltrат формирует крупные узлы без фиброза по периферии. Некрозы отсутствуют. Опухолевые клетки крупные с дольчатым ядром (LP-клетки, попкорн-клетки). Классические клетки Ходжкина или Рид-Штернберга отсутствуют. Фоновые клетки: малые лимфоциты, гистиоциты. Эозинофилы и плазмциты отсутствуют или немногочисленны.	Инfiltrат диффузный (иногда нодулярный с нечеткими контурами узлов). Более 90% клеток инfiltrата – малые Т-лимфоциты и неэпителиоидные гистиоциты. Опухолевые клетки крупные, атипичные, часто с дольчатым ядром, выраженность ядрышек варьирующа. Могут быть морфологически неотличимы от LP-клеток или классических клеток Ходжкина или Рид-Штернберга.

4.7 При соответствии иммунофенотипа возможному морфологическому варианту рассматриваемой нозологической формы лимфомы, отразить диагноз в заключении. Заключению в обязательном порядке должны предшествовать: подробное микроскопическое описание гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, а также описание иммунофенотипа. В описании иммунофенотипа необходимо отразить принадлежность клеток, экспрессирующих тот или иной маркер, к популяции опухолевых или фоновых клеток.

4.8 При несоответствии иммунофенотипа возможным морфологическим вариантам рассматриваемой нозологической формы лимфомы, обратиться к альтернативным диагностическим алгоритмам (см. также раздел 5).

#### 4.9 Определение экспрессии $\beta_{III}$ -тубулина в опухолевых клетках при ДБКЛ, БДУ

В большинстве неопухолевых лимфоидных клеток  $\beta_{III}$ -тубулин не экспрессируется. В нормальном лимфоузле экспрессия  $\beta_{III}$ -тубулина определяется в центробластах темной зоной ГЦ. Экспрессия  $\beta_{III}$ -тубулина в опухолевых клетках при ДБКЛ, БДУ указывает на их иммунофенотипическое сходство с центробластами ГЦ. Окрашивание опухолевых клеток с антителом к  $\beta_{III}$ -тубулину вне зависимости от распространенности и интенсивности ассоциировано с более высокой общей выживаемостью пациентов с ДБКЛ, БДУ.

Образец протокола иммуногистохимического окрашивания с антителами к  $\beta_{III}$ -тубулину

1. На микротоме с использованием одноразовых лезвий изготовить парафиновые срезы толщиной не более 3 мкм.
2. Срезы поместить на предметные стекла с адгезивным электростатическим покрытием.
3. Подсушить на термостойке при температуре не более 45°C, затем поместить на ночь в термостат при температуре 37°C.
4. Поместить стекла в ксилол на 5 минут.
5. Промыть срезы в 96° этаноле - ёмкость I, а затем поместить срезы последовательно в 96° этаноле (ёмкость II, ёмкость III), по 5 минут в каждый.
6. Промыть срезы не менее чем в трех порциях деионизированной воды по 2 минуты в каждой.
7. Демаскировка антигенов в нагреваемой барокамере 30 с. или в водяной бане в течение 30 мин. в демаскировочном буфере с pH 9,0.
8. Блокирование эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода – 20 мин.
9. Промыть в отмывочном буфере (2 раза по 5 минут).
10. Нанести на срезы реагент для устранения неспецифического фонового окрашивания (протеиновый блок). Время инкубации в соответствии с рекомендациями производителя.
11. Инкубация с первичным антителом к  $\beta_{III}$ -тубулину: разведение 1:800, в течение 30 мин. при комнатной температуре.
12. Промыть в отмывочном буфере (2 раза по 5 минут).
13. Визуализация результата реакции посредством полимерной системы детекции в соответствии с рекомендациями производителя.
14. Промыть под проточной водой.
15. Окрасить срезы гематоксилином Майера.
16. Промыть срезы под проточной водой.

17. Просушить срезы фильтровальной бумагой и поместить в чаши Коплина с 96° этанолом на 5 мин.

18. Просушить срезы фильтровальной бумагой и поместить в чаши Коплина с ксилолом на 5 мин.

19. ЗаклЮчить срезы под покровное стекло при помощи среды для монтирования покровного стекла.

В качестве внутреннего позитивного контроля следует использовать эндотелиальные клетки и/или нервные стволИки. При правильно подобранных условиях данные структуры будут иметь интенсивную окраску.

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

### ***1. Избыточная толщина среза, препятствующая оценке морфологии клеток инфильтрата.***

Описание: при тонкой регулировке резкости посредством микровинта микроскопа в поле зрения определяется несколько слоев клеток.

Путь устранения: изготовить срезы меньшей толщины с парафинового блока.

### ***2. Низкое качество пробоподготовки ткани, заключенной в парафиновый блок.***

Описание: наличие выраженных искусственных изменений ткани, делающих оценку морфологических деталей опухолевых клеток невозможной.

Путь устранения: при невозможности морфологической интерпретации и иммунофенотипирования, повторить биопсию. Перед началом повторной пробоподготовки материала проверить (и при необходимости скорректировать) используемые в лаборатории условия и продолжительность фиксации, вырезки, проводки, заливки в парафин, нарезки и окраски материала.

### ***3. Малый объем материала, недостаточный для проведения необходимого количества иммуногистохимических исследований.***

Описание: при изготовлении серийных срезов с парафинового блока площадь интересующего фрагмента ткани прогрессивно уменьшается до полного исчезновения. Полученного количества срезов недостаточно для корректного иммунофенотипирования.

Путь устранения: изготовить дополнительные срезы с парафинового блока, содержащего ткань данного пациента с аналогичной морфологией (если применимо). При отсутствии дополнительных парафиновых

блоков повторить биопсию для получения большего количества материала.

#### ***4. Неудовлетворительное качество иммуногистохимического окрашивания.***

Описание: отсутствие ожидаемой экспрессии маркера, неспецифичное окрашивание, окрашивание низкой интенсивности, затрудняющее интерпретацию, отсутствие окрашивания со всеми антителами диагностической панели и т.д.

Путь устранения: повторить окрашивание исследуемой ткани на одном стекле с положительным контролем. При необходимости провести корректировку условий демаскировки антигена, времени экспозиции первичного антитела, его разведения (если применимо), экспозиции компонентов системы детекции, температурного режима лаборатории.

#### ***5. Неправильная интерпретация специфического иммуногистохимического окрашивания с антителами к CD15 и CD30.***

Описание: интерпретация специфического окрашивания с антителами к CD15, присущего гранулоцитам, как окрашивания опухолевых клеток. Интерпретация специфического окрашивания с антителами к CD30, присущего иммунобластам, как окрашивания опухолевых клеток.

Путь устранения: тщательная оценка характера окрашивания (для клеток ХРЩ типичным считается окрашивание мембраны и комплекса Гольджи) и сопоставление со срезами, окрашенными гематоксилином и эозином, а также с другими антителами.

#### ***6. Неправильная идентификация опухолевых и фоновых клеток злокачественного инфильтрата.***

Описание: ошибочное определение принадлежности клеточных популяций злокачественного инфильтрата к опухолевым или фоновым клеткам влечет за собой неверную интерпретацию иммунофенотипа.

Путь устранения: тщательное сопоставление качественных гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, с иммуногистохимически окрашенными срезами. В ряде случаев уверенная идентификация опухолевых и фоновых клеток инфильтрата крайне затруднительна без иммуногистохимического окрашивания.



Приложение 1 к инструкции по применению № 077-0519

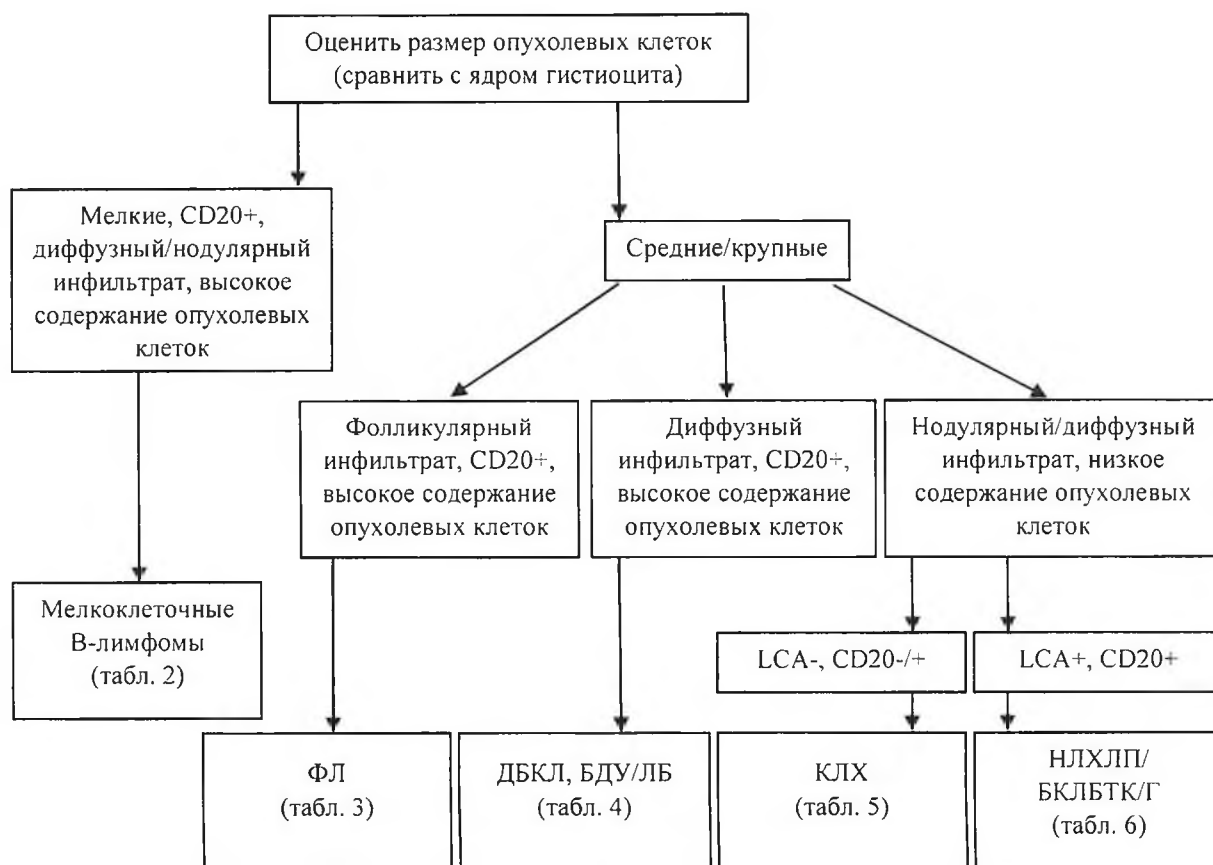


Схема первичной оценки злокачественного инфильтрата при В-клеточных лимфомах для выбора диагностического алгоритма.

## Приложение 2 к инструкции по применению № 077-0519 (справочное)

Таблица – Краткие сведения об иммуноморфологии нормального лимфатического узла

Клеточная популяция	Основная локализация	Морфология	Основные иммунофенотипические черты
Наивные В-клетки	Первичный фолликул, мантия вторичного фолликула	Малые* лимфоциты с компактным хроматином в ядрах и скудной цитоплазмой	CD20+, CD23+ (интенсивность ниже, чем в ФДК)
Центробласты	Герминативный центр, преимущественно темная зона	Крупные клетки, контур ядра ровный, хроматин пузырьковидный, обычно несколько ядрышек, прилежащих к ядерной мембране	CD20+, CD10+, bcl6+, bcl2-  Ki-67 до 100% в темной зоне ГЦ с градиентом убывания в направлении светлой зоны
Центроциты	Герминативный центр, светлая зона	Мелкие клетки с расщепленными ядрами	CD20+, CD10+, bcl6+, bcl2- (за исключением единичных клеток, прошедших положительную селекцию)
В-клетки памяти	Маргинальная зона	Мелкие округлые лимфоциты с умеренным количеством цитоплазмы	CD20+
Плазматические клетки	Медуллярная область	Эксцентричное маленькое округлое ядро (хроматин в виде «спиц колеса»), базофильная цитоплазма с перинуклеарным просветлением	CD20-, CD138+
В-иммунобласты	Паракортикальная зона	Крупные клетки, контур ядра ровный, хроматин пузырьковидный, ядрышко обычно одно, ярко выраженное, расположено центрально	CD30+
Цитотоксические Т-лимфоциты	Паракортикальная зона	Мелкие клетки с компактным ядром и скудной цитоплазмой	CD20-, CD8+, TIA-1+, Granzyme B+
Т-хелперы	Паракортикальная зона	Мелкие клетки с компактным ядром и скудной цитоплазмой	CD20-, CD4+
Фолликулярные Т-хелперы	Герминативный центр	Мелкие клетки с компактным ядром и скудной цитоплазмой	CD20-, CD4+, PD1+, bcl6+, CD10+
НК-клетки	Паракортикальная зона	Мелкие клетки с компактным ядром и скудной цитоплазмой	CD2+, CD56+
Фолликулярные дендритные клетки	Герминативный центр	Пузырьковидные ядра (могут располагаться попарно) отростки неразличимы без ИГХ-окрашивания	CD21+, CD23+, CD35+
Интердигитирующие дендритные клетки	Паракортикальная зона	Овальные ядра с зубринами, умеренное количество цитоплазмы	CD1a+, S100+
Гистиоциты	Герминативный центр	Овальное пузырьковидное ядро, цитоплазма обильная, прозрачная/эозинофильная, гранулярная	CD68+, CD163+
	Паракортикальная зона		CD68+
	Синусы		CD68+

\* суждение о размере клеток основывается на сравнении ядра клетки инфильтрата с ядром гистиоцита в том же срезе. Мелкими клетками следует считать клетки инфильтрата, размер ядер которых меньше размера ядра гистиоцита.