

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ»
Первый заместитель Министра
Часнойть
« // » 2008г.
Регистрационный номер 050-0508



СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО РИСКА РАННЕГО ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Учреждение «Гомельский областной клинический онкологический диспансер», Иностранное предприятие «ИВА-Гомель».

АВТОРЫ: к.м.н., доцент, заведующий лабораторией клинических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» Надыров Эльдар Аркадьевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением онкомамологии ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова» Путырский Леонид Алексеевич, врач Гомельского областного клинического онкологического диспансера Тимофеенко Елена Сергеевна, инженер программист ИП «ИВА-Гомель» Шкуратов Василий Николаевич, заведующий отделением патологической анатомии Гомельского областного клинического онкологического диспансера Ачинович Сергей Леонидович, ведущий инженер программист ИП «ИВА-Гомель» Ставров Владимир Васильевич.

Гомель, 2008

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники и др.:

- Реактивы для фиксации, обезвоживания и заливки в парафин образцов тканей: 10 % раствор нейтрального формалина, спирт этиловый, хлороформ, парафин; микротом роторный;
- Реактивы для депарафинирования гистологических срезов: ксилен, спирт этиловый, вода дистиллированная;
- Реактивы для окраски и получения готового препарата гематоксилином и эозином: ксилол, карбол-ксилол, спирт этиловый, гематоксилин, эозин, предметные и покровные стёкла, полистирол;
- Набор лабораторной посуды;
- Реактивы для иммуногистохимических исследований (DAKO corporation): система для визуализации (Universal LSAB2 kit/ HRP Rb/Mo), моноклональные антитела к эстрогену и прогестерону Mo a Hu Estrogen receptor, Clone 1 D5, Ready-to-use, Hu Progesteron receptor, 1A6 Ready-to-use), буферный раствор (Tris-Buffered NaCl Solution with Tween 20 (TBST), pH 7.6, Concentration x 10, раствор для демаскировки антигенов (Target Retrieval Solution, Concentration x 10, 500 мл), стекла силанизированные (Silanized slides), покровные стёкла, среда для заключения Permanent Mounting Medium, фильтровальная бумага;
- Оборудование для иммуногистохимического исследования: набор лабораторной посуды, pH-метр, мешалка магнитная ПЭ-6100, дозаторы механические ВЮНИТ 1-1000 µl, весы лабораторные (предел взвешивания 1200 г, цена деления 1мг), контейнеры для стекол, микроволновая печь).

Показания к применению: определение послеоперационного риска раннего прогрессирования рака молочной железы.

Противопоказания: нет.

Описание технологии используемого метода:

Предлагаемая модель используется для определения риска возникновения раннего (до 3-х лет) прогрессирования рака молочной железы.

Этапы приготовления иммуногистохимических препаратов:

- Материал фиксируется в 10 % растворе формалина в течении 12 - 20 часов, далее удаляют избытки фиксатора в проточной воде (8 - 12 часов);
- Материал обезвоживают в спиртах восходящей крепости (70 %, 80 %, 96 %, 100 % по 4 - 6 часов в каждом);
- Материал после обезвоживания переносят в смесь спирт 100 % - хлороформ на 4 - 6 часов, а затем в смесь хлороформ - парафин при $t = 37^{\circ}\text{C}$ на 4 - 6 часов для подготовки к пропитыванию парафином;
- Полученные кусочки материала пропитывают парафином при $t = 56^{\circ}\text{C}$ в течении 2 часов и подвергают заливке в парафин;
- Парафиновые блоки режутся с помощью микротома для получения срезов толщиной 4-5 мкм;
- Для определения иммуногистохимических маркеров (рецепторы эстрогена и прогестерона):
- Срезы помещают в две порции О-ксилола на 15 мин. каждая для удаления парафина;
- Избытки жидкости вокруг среза удаляют фильтровальной бумагой и помещают гистологические стекла в батарею спиртов нисходящей крепости: 96 % - 1 мин., 96 % - 1 мин., 70 % - 1 мин., 70 % - 4 мин.;
- Излишки жидкости удаляют фильтровальной бумагой, стекла помещают в дистиллированную воду на 2 мин. и помещают в раствор для демаскировки антигенов;

Приготовление раствора для демаскировки антигенов:

- Раствор состоит из 1 части концентрата (Target Retrieval Solution, Concentration x 10) и 9 частей дистиллированной воды (pH = 6,1). Препараты погружают в раствор и подвергают термической обработке на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры препараты промывают 2-3 раза в растворе 0,005 М Tris-HCl (или TBS pH 7,2 – 7,6);

Блокада пероксидазы.

- Излишки жидкости удаляют вокруг среза ткани и просушивают срезы фильтровальной бумагой. После срезы обводят специальным карандашом (ДАКО Pen) для предотвращения растекания растворов реактивов. Далее добавляют 3 % раствор H₂O₂, чтобы покрыть препарат (экспозиция 5 мин). После осторожно промывают дистиллированной водой и помещают в ванночку с буфером (0.005 М Tris-HCl) 2 раза по 5 минут;

- Используются первичные моноклональные антитела к эстрогену и прогестерону (Mo a Nu Estrogen receptor, Clone 1 D5, Ready-to-use, Nu Progesteron receptor, 1A6 Ready-to-use). Излишки буфера удаляют и стекла подсушивают вокруг среза. После добавляют первичные антитела из расчета 100 мкг на один срез (экспозиция 30-35 мин.), осторожно промывают в буфере и помещают в ванночку с раствором свежего буфера 2 раза по 5 минут;

Связывание с вторичными антителами.

- Излишки буфера удаляют, срезы просушивают, после добавляют несколько капель вторых антител (Link) , чтобы покрыть срез (экспозиция 30 - 35 мин), осторожно промывают в буфере 0,005 М Tris-HCl (или TBS pH 7,2 – 7,6) и помещают в ванночку со свежим раствором буфера 2 раза по 5 минут;

Обработка комплексом стрептавидин-пероксидаза.

- Удаляют излишки буфера и просушивают срезы. Добавляют несколько капель из расчета 100 мкл на 1 срез из флакона со стрептавидином (экспозиция 30 мин). После срезы осторожно промывают в буфере и помещают в ванночку со свежим раствором буфера 2 раза по 5 минут; Специфическое связывание комплекса антиген-антитело с хромагеном.

- Приготавливают рабочий раствор хромагена (диаминобензидин) из расчета 1 капля диаминобензидина на 1 мл азидного буфера;

- Удаляют излишки буфера и просушивают пространство вокруг срезов. Срезы покрывают рабочим раствором диаминобензидина из расчета 100 мкл на 1 срез (экспозиция 5-10 мин). Далее промывают осторожно в дистиллированной воде;

Окрашивание гематоксилином.

- Срезы помещают в ванночку с гематоксилином Майера (от 30 сек. до 5 мин.). Для дифференцировки срезы помещаются в раствор аммиачной воды на 15-30 сек. и промываются дистиллированной водой в течение 2 мин.;

- Аммиачная вода готовится путем растворения 2,5 мл 15 М концентрированного нашатырного спирта в 1 литре воды;

- Срезы заключаются в среду (Mounting Medium, Glycerol – ДАКО).

Специфический продукт реакции окрашивается в коричневый цвет разной интенсивности. Подсчитывается количество клеток, имеющих специфически окрашенные искомые антигены.

Анализ экспрессии половых гормонов проводится с помощью модифицированного метода W. Remelle et al., 1986.

Оценивается:

1. Интенсивность окраски SI (Staining Intensity)

0 - окраска отсутствует.

1 - слабая окраска.

2 - умеренная окраска.

3 - выраженная интенсивность окраски.

2. Процент позитивно окрашенных клеток.

0 - позитивно окрашенные клетки отсутствуют.

1 - менее 10 % позитивно окрашенных клеток.

2 - 10-50 % позитивно окрашенных клеток.

3 - 51-80 % позитивно окрашенных клеток.

4 - более 80 % позитивно окрашенных клеток.

Максимальное количество баллов IRS (immune reactivity score):

$$3 \cdot 4 = 12.$$

Исследование проводится при увеличении микроскопа 400. В процессе исследования в поле зрения микроскопа изучается до 1000 клеток.

Клинические данные получают путем проведения стандартных процедур физикального и инструментального обследования, сбора анамнеза: возраст и менструальный статус пациентки, объем проведенной операции, локализация опухоли в молочной железе, количество опухолевых узлов, стадия по классификации TNM.

Морфологические характеристики определяются путем проведения стандартного гистологического исследования опухоли по традиционной окраске гематоксилином и эозином. При этом учитывается гистологический тип опухоли, количество опухолевых эмболов в сосудах, выраженность лимфоплазмочитарной инфильтрации на периферии опухоли, количество лимфатических узлов, пораженных метастазами, степень злокачественности. Иммуногистохимические характеристики определяются по методике, указанной выше. Определяется экспрессия рецепторов к эстрогену и прогестерону. Опухоли считаются рецептор-положительными при значениях IRS 2 и более. Для получения клинических характеристик опухоли используется стандартное обследование, включающее сбор анамне-

за, пальпацию по общепринятой методике и маммографию. Математическая обработка первичных данных и статистический анализ проводится с помощью пакета статистических программ MATHCAD PLUS 5.0.

Возможные ошибки и осложнения:

Возможна математическая погрешность при небольшом размере обучающей выборки. Для получения более точного результата все морфологические параметры должны анализироваться в одном лечебном учреждении, по одним гистологическим и иммуногистохимическим методикам и, в оптимальном варианте, ограниченным количеством врачей-патологоанатомов.