



Подготовка образцов к молекулярно-генетическому исследованию

Введение

Для выработки правильной тактики лечения пациента с меланомой кожи необходимо провести молекулярно-генетическое исследование (МГИ) образцов опухоли. Выявление в биопсийном или операционном материале опухолевых клеток с определенными мутациями позволяет использовать терапию, направленную на мутантные белки. Например, в случае выявления мутации в гене *BRAF* при меланоме кожи для лечения можно применять таргетную терапию ингибиторами BRAFi и MEKi¹.

Очень важно соблюдать правила отбора, подготовки, хранения, транспортировки образцов опухоли. Нарушение этих правил может привести к неправильной интерпретации результатов диагностики².

В целом, правила подготовки образцов ткани к МГИ совпадают с правилами подготовки к патоморфологическому исследованию (ПМИ). Образцы, взятые и подготовленные к ПМИ, впоследствии могут быть использованы для МГИ².

Материал для молекулярно-генетического исследования

Для МГИ может быть использован биопсийный или операционный опухолевый материал, полученный от первичной опухоли или метастазов. Можно исследовать архивные парафиновые блоки².

Еще 30—35 лет назад большинство специалистов относились с недоверием к результатам, полученным при МГИ архивных образцов. Считалось, в процессе хранения ДНК и РНК образца могут частично деградировать, а белки утратить свою активность. Многочисленные исследования показали, что даже после длительного хранения анализ материала парафиновых блоков позволяет получить качественные результаты и достоверные данные. В настоящее время анализ архивных тканей стал стандартом МГИ².

Однако при прогрессировании меланомы предпочтительнее использовать для МГИ свежие образцы опухолевой ткани (из метастазов), поскольку, согласно литературным данным, при развитии меланомы возможно изменение BRAF-статуса³.

Все этапы забора образцов, их подготовки и фиксации тканей важны для точной молекулярно-генетической диагностики. И если выбор фиксатора, его качество и последующие манипуляции с материалом зависят преимущественно от квалификации патологоанатома и лаборанта-гистолога, то на первом этапе основная ответственность за правильный забор материала и его сохранность лежит на враче. Врач должен помнить, что от правильности его действий может зависеть точность будущей диагностики, определение стратегии лечения и, возможно, конечный терапевтический результат⁴.

Забор образцов для молекулярно-генетического исследования

- **Необходимо заранее оценить объем материала, который потребуется для ПМИ и МГИ**

Объем необходимого для забора материала рекомендуется заранее обсудить с морфологом. Он может учесть все планируемые лабораторно-диагностические манипуляции при определенной разновидности опухолевого процесса и оценить объем аналитического материала, необходимого для каждого исследования².

- **С удаляемой тканью следует обращаться аккуратно**

Небрежное обращение с удаляемой тканью может привести к механическим, термическим и химическим повреждениям. Особенно чувствительной к механическому воздействию (сдавливанию) является лимфоидная ткань⁴.

- **Необходимо минимизировать время тепловой и холодовой ишемии**

Время тепловой и холодовой ишемии — это период времени, в течение которого ткань лишена кислорода при температуре тела или ниже температуры тела соответственно⁴.

Тепловая ишемия тканей начинается с момента перевязки питающих артерий в процессе операции². Считается, что время тепловой ишемии не влияет на изменения в структуре ДНК или РНК, но может сказываться на экспрессии определенных белков². Воздействие тепловой ишемии при сборе биоматериала контролировать невозможно⁴.

Напротив, время холодовой ишемии находится под контролем персонала, занимающегося отбором и подготовкой к фиксации биологических образцов.

Этот показатель является контролируемым, его продолжительность напрямую связана с сохранностью материала и должна быть по возможности сокращена⁴.

Фиксация образцов для молекулярно-генетического исследования

Image



- Рекомендуется начинать процесс фиксации в течение 1 часа после иссечения опухоли⁴.
- Фиксацию проводят в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина^{4,5}.



pH 7,0–7,6

Раствор формалина должен быть нейтральным и забуференным, чтобы сохранять оптимальный pH для качественной фиксации⁶



1:10

Оптимальное соотношение объемов фиксируемой ткани и раствора формалина⁵



30–60 минут

Рекомендуемое время от забора материала до фиксации формалином^{4,5}

Формалин проникает в фиксируемую ткань со скоростью 1 мм/час. В глубоких слоях тканей эта скорость может быть еще меньше. Очень важно выдерживать образец в формалине достаточное время, чтобы фиксация произошла по всей толщине образца. Так, время полной фиксации в формалине образца ткани толщиной 3 мм составляет не менее 6–8 часов².

Один из самых важных моментов для проведения качественного МГИ — высокое содержание в образце опухолевых клеток. Разные виды исследований требуют разного минимального уровня содержания опухолевого материала в образце. Важно, что сведения о содержании опухолевых клеток в образце должны быть доведены (указаны в сопровождающей документации) до специалиста по МГИ. Это позволит выбрать оптимальный метод исследования².

Для «концентрации» в образце опухолевых клеток выполняют процедуру микродиссекции.

Как выполняется микродиссекция?

Существуют разные техники микродиссекции. Например, патолог может окрасить один из срезов гематоксилином и эозином, после чего отмечает зоны с высоким содержанием опухолевых клеток. Затем другие (неокрашенные) срезы накладываются на окрашенный срез и зоны, совпадающие с зонами с высокой концентрацией опухолевых клеток, соскабливаются и используются в дальнейшем для МГИ².

Считается, что именно неправильно выполненная микродиссекция чаще всего приводит к неверным результатам МГИ².

Отправка образцов на анализ

Для проведения МГИ желательно предоставить один парафиновый блок с тканью опухоли и одно стекло, полученное непосредственно из этого блока и окрашенное

гематоксилином-эозином².

Транспортировка образцов

Температура при транспортировке образцов не должна превышать комнатную (во избежание расплавления парафиновых блоков)².

Хранение образцов

Сохранность ДНК и РНК в образцах, предназначенных для молекулярно-генетического исследования, зависит от многих факторов, в том числе от времени холодной ишемии, температуры хранения, оттаивания и повторного замораживания в процессе хранения².

Специалисты по молекулярной диагностике рекомендуют следующие условия хранения биоматериала, предназначенного для проведения молекулярно-генетических исследований⁶:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2-8 °С — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С — длительно.

Содержание протокола исследования материала

Мы обсудили основные требования к отбору биологического материала, его подготовке, фиксации, особенности транспортировки и хранения. Конечной целью всех этих действий является качественно проведенное исследование.

Подготовленный материал можно использовать и для патоморфологического, и для молекулярно-генетического исследования. Врач получит результаты исследования и будет ориентироваться на них при установлении точного диагноза, определении стадии заболевания и назначении оптимальной терапии. Какая информация должна содержаться в протоколе исследования?

Если мы говорим о ПМИ, то в нем важна следующая информация:

Image

Параметр	Почему важно
Толщина опухоли по Бреслоу	Важно для установления стадии по классификации TNM и определения показаний к проведению биопсии сторожевых лимфатических узлов
Изъязвление	Важно для установления стадии по классификации TNM
Лимфо-сосудистая инвазия	Показатель имеет прогностическую ценность
Состояние краев резекции	Показатель важен для определения показаний к проведению повторной расширенной резекции

В протоколе МГИ образцов меланомы кожи должно быть указано, обнаружена ли в клетках мутация BRAF, и если обнаружена, то должен быть определен ее подтип.

Почему так важен подтип мутации? Может показаться, что главное — это само наличие мутации BRAF. Ведь одно это дает возможность назначения таргетной терапии (ТТ). Эффективность ТТ в отношении меланомы кожи с наиболее часто встречающимися мутациями BRAF V600E и V600K доказана в клинических исследованиях^{1, 7, 8}. Вместе с тем эффективность ТТ при редких мутациях BRAF может сильно варьировать⁹.

Сроки выполнения прижизненных патолого-анатомических исследований

При выполнении прижизненных патолого-анатомических исследований необходимо придерживаться следующих сроков⁵:

- для интраоперационного биопсийного (операционного) материала — не более 20 минут на один тканевой образец;
- для биопсийного (операционного) материала, не требующего декальцинации и (или) дополнительных окрасок (постановок реакций, определений), — не более 4 рабочих дней;
- для биопсийного (операционного) материала, требующего декальцинации и (или) применения дополнительных окрасок (постановок реакций, определений), изготовления дополнительных парафиновых срезов, — не более 10 рабочих дней;
- для биопсийного (операционного) материала, требующего проведения дополнительных иммуногистохимических методов исследования с применением более 5 маркеров, — не более 15 рабочих дней;

- для биопсийного (операционного) материала, требующего проведения дополнительных электронно-микроскопических методов исследования, — не более 7 рабочих дней;
- для биопсийного (операционного) материала, требующего проведения дополнительных молекулярно-биологических методов исследования, — не более 10 рабочих дней;
- для биопсийного (операционного) материала, требующего проведения дополнительных генетических методов исследования, — не более 10 рабочих дней.

Выводы: основные требования к отбору, подготовке и фиксации образцов для МГИ

Image

Время от забора материала до фиксации в формалине — не более 30—60 минут^{4, 5}.

Image

Объем забираемого материала рассчитывается с учетом всех запланированных исследований, а также с учетом возможных повторных исследований и исследований для участия в клинических исследованиях².

Image

Минимальное время фиксации образца в формалине рассчитывается с учетом скорости проникновения формалина в ткани (1 мм/час)^{2, 5}.

Image

Важный этап — микродиссекция^{2, 5}.

Image

Необходимо сообщать в лабораторию примерное содержание опухолевых клеток в образце, отправляемом на МГИ, для выбора оптимального метода исследования².

Список сокращений

МГИ — молекулярно-генетическое исследование;

ТТ — таргетная терапия;

ПМИ — патоморфологическое исследование.

Image

[Подготовка гистологического материала PDF 9.1 Мб](#)

[Скачать брошюру](#)

Список литературы

1. Long G. V. et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial //The Lancet. – 2015. – Т. 386. – №. 9992. – С. 444-451.
2. Иванцов А. О. и др. Особенности подготовки опухолевого материала для молекулярно-генетического анализа //Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – №. 2. – С. 351-354.
3. Valachis A., Ullenhag G. J. Discrepancy in BRAF status among patients with metastatic malignant melanoma: A meta-analysis //European Journal of Cancer. – 2017. – Т. 81. – С. 106-115.
4. Шелехова К. В., Хейнштейн В. А. Организационные, технологические и научные вопросы онкоморфологии и молекулярной генетики //Практическая онкология. – 2020. – Т. 21. – №. 2. – С. 75-80.
5. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 24 марта 2016 г. N 179н «О Правилах проведения патолого-анатомических исследований».
6. Методические рекомендации по подготовке срезов.pdf (testgen.ru) Дата

обращения 12 марта 2024 г.

7. Dummer R. et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial //The Lancet Oncology. – 2018. – Т. 19. – №. 5. – С. 603-615.
8. Larkin J. et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma //New England Journal of Medicine. – 2014. – Т. 371. – №. 20. – С. 1867-1876.
9. Menzer C. et al. Targeted therapy in advanced melanoma with rare BRAF mutations //Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2019. – Т. 37. – №. 33. – С. 3142-3151.

11301863/ONCO/DIG/10.24/0

Вам также может быть интересно:



Статья

6 минут

Адъювантная таргетная и иммунотерапия

Статья
- 23 июл 2025

6 минут

Адьювантная таргетная и иммунотерапия

Эффективность и влияние на органоспецифическое метастазирование меланомы III стадии

[See more details](#)

Hide details



Статья

6 минут

Как выявить пациента с высоким риском развития иммуноопосредованных нежелательных явлений

Статья
- 23 июл 2025

6 минут

Как выявить пациента с высоким риском развития иммуноопосредованных нежелательных явлений

[See more details](#)

Hide details



Статья

5 минут

**Последовательность терапии при метастатической меланоме кожи в реальной клинической практике
(Канада, 2022)**

Статья
- 23 июл 2025

5 минут

**Последовательность терапии при метастатической меланоме кожи в реальной клинической практике
(Канада, 2022)**

[See more details](#)

Hide details

Теги

- Онкология

Source URL:

<https://www.pro.novartis.ru/therapeutical-areas/oncology/melanoma/information/podgotovka-obrazcov-k-molekulyarno-geneticheskomu-issledovaniyu>