



# 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 MEKi<sup>1</sup>.

Очень важно соблюдать правила отбора, подготовки, хранения, транспортировки образцов опухоли. Нарушение этих правил может привести к неправильной интерпретации результатов диагностики<sup>2</sup>.

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 МГИ<sup>2</sup>.

## 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 блоки<sup>2</sup>.

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 МГИ<sup>2</sup>.

Однако при прогрессировании меланомы предпочтительнее использовать для МГИ свежие образцы опухолевой ткани (из метастазов), поскольку, согласно литературным данным, при развитии меланомы возможно изменение BRAF-статуса<sup>3</sup>.

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 результат<sup>4</sup>.

## **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 исследования<sup>2</sup>.

- **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 ткань<sup>4</sup>.

- **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 соответственно<sup>4</sup>.

Тепловая ишемия тканей начинается с момента перевязки питающих артерий в процессе операции<sup>2</sup>. Считается, что время тепловой ишемии не влияет на изменения в структуре ДНК или РНК, но может сказываться на экспрессии определенных белков<sup>2</sup>. Воздействие тепловой ишемии при сборе биоматериала контролировать невозможно<sup>4</sup>.

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 сокращена<sup>4</sup>.

## **Фиксация образцов для молекулярно-генетического исследования**

Image

- Рекомендуется начинать процесс фиксации в течение 1 часа после иссечения опухоли<sup>4</sup>.
- Фиксацию проводят в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина<sup>4,5</sup>.



**pH 7,0—7,6**

Раствор формалина должен быть нейтральным и забуференным, чтобы сохранять оптимальный pH для качественной фиксации<sup>6</sup>



**1:10**

Оптимальное соотношение объемов фиксируемой ткани и раствора формалина<sup>5</sup>



**30—60 минут**

Рекомендуемое время от забора материала до фиксации формалином<sup>4,5</sup>

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 часов<sup>2</sup>.

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 исследования<sup>2</sup>.

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 МГИ<sup>2</sup>.

Считается, что именно неправильно выполненная микродиссекция чаще всего приводит к неверным результатам МГИ<sup>2</sup>.

## **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-эозином<sup>2</sup>.

## Транспортировка образцов

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

## Хранение образцов

Сохранность ДНК и РНК в образцах, предназначенных для молекулярно-генетического исследования, зависит от многих факторов, в том числе от времени холодовой ишемии, температуры хранения, оттаивания и повторного замораживания в процессе хранения<sup>2</sup>.

Специалисты по молекулярной диагностике рекомендуют следующие условия хранения биоматериала, предназначенного для проведения молекулярно-генетических исследований<sup>6</sup>:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2-8 °C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °C — 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                                                                                                                   |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Толщина опухоли по Бреслоу</b> | Важно для установления стадии по классификации TNM и определения показаний к проведению биопсии сторожевых лимфатических узлов |
| <b>Изъязвление</b>                | Важно для установления стадии по классификации TNM                                                                             |
| <b>Лимфо-сосудистая инвазия</b>   | Показатель имеет прогностическую ценность                                                                                      |
| <b>Состояние краев резекции</b>   | 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<sup>1, 7, 8</sup>. Вместе с тем эффективность ТТ при редких мутациях BRAF может сильно варьировать<sup>9</sup>.

## Сроки выполнения прижизненных патолого-анатомических исследований

При выполнении прижизненных патолого-анатомических исследований необходимо придерживаться следующих сроков<sup>5</sup>:

- 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<sup>4, 5</sup>.

Image

Объем забираемого материала рассчитывается с учетом всех запланированных исследований, а также с учетом возможных повторных исследований и исследований для участия в клинических исследованиях<sup>2</sup>.

Image

Минимальное время фиксации образца в формалине рассчитывается с учетом скорости проникновения формалина в ткани (1 мм/час)<sup>2, 5</sup>.

Image

Важный этап — микродиссекция<sup>2, 5</sup>.

Image

Необходимо сообщать в лабораторию примерное содержание опухолевых клеток в образце, отправляемом на МГИ, для выбора оптимального метода исследования<sup>2</sup>.

## 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](http://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.

11561804/onco/web/12.25/0

**Вам также может быть интересно:**



---

Статья

6 минут

**Адъювантная таргетная и иммунотерапия**

Статья

- 23 Июл. 2025

6 минут

## **Адъювантная 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://pro.novartis.ru/therapeutical-areas/oncology/melanoma/information/podgotovka-obrazcov-k-molekulyarno-geneticheskomu-issledovaniyu>