

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»

Медицинский институт. Кафедра онкологии

**Г. А. Раскин, А. С. Каурцева, М. С. Мухина,
А. Э. Протасова, Р. В. Орлова**

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ В ОНКОЛОГИИ: ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ВОЗМОЖНОСТИ

Учебное пособие

Санкт-Петербург
2024

УДК: 616-006.6

ББК: 55.6

Г. А. Раскин, А. С. Каурцева, М. С. Мухина, А. Э. Протасова, Р. В. Орлова.

Патологическая анатомия в онкологии:
основные методы и возможности — СПб., 2024. — 31 с.

Раскин Г. А. — доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии Санкт-Петербургского государственного университета, заместитель главного врача по лабораторной медицине МИБС, главный патоморфолог ГКОД.

Каурцева А. С. — врач-патологоанатом ПАО МИБС.

Мухина М. С. — кандидат медицинских наук, врач КЛД патологоанатомического отделения МИБС.

Протасова А. Э. — доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии Санкт-Петербургского государственного университета.

Орлова Р. В. — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой онкологии Санкт-Петербургского государственного университета.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Руководитель лаборатории иммуногистохимии Республиканского клинического онкологического диспансера МЗ РТ, профессор кафедры патологии Казанского государственного медицинского университета, д. м. н., профессор **Петров С. В.**

Заведующий отделением общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, д. м. н., профессор **Вторушин С. В.**

Утверждено
в качестве учебного пособия Ученым советом
ФГБУ ВО СПбГУ
протокол №05/2.1/30-03-15 от 28.11.2024

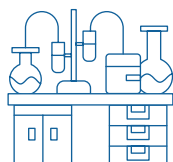
Типография «Майер»
Тираж: 500 экз.



© Коллектив авторов, 2024 г.

СОДЕРЖАНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ЗАДАЧИ И МЕТОДЫ В ОНКОПАТОЛОГИИ:	5
1. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ	7
2. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ	8
3. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	11
4. ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU (FISH, CISH, SISH).....	17
5. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ	18
6. ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ	21
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	26
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ	27
ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ	29
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	30



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения.

МГИ — молекулярно-генетическое исследование.

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

РНК — рибонуклеиновая кислота.

FISH — флуоресцентная гибридизация in situ.

CISH — хромогенная гибридизация in situ.

NGS — высокопроизводительное секвенирование.

ИГХ — иммуногистохимия.

ВВЕДЕНИЕ

Патологическая анатомия давно вышла за рамки секционной части своей деятельности. Прижизненная диагностика на основе биопсий и операционного материала в настоящее время становится преобладающей в работе врача-патологоанатома. В основном это касается онкопатологий, где сформулированное патологоанатомом заключение, а также оценка предиктивных маркеров являются основой для последующего назначения лечения (Рисунок 1).

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ (ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКАЯ) ДИАГНОСТИКА – ЭТО ОСНОВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

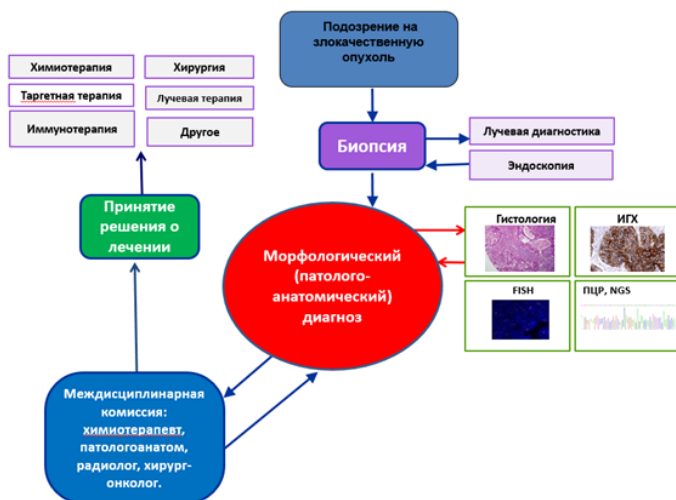


Рисунок 1. Место патологической анатомии в онкологии

ЗАДАЧИ И МЕТОДЫ В ОНКОПАТОЛОГИИ

Основные задачи, которые решает патологическая анатомия в онкологии:

1. Определение нозологии.
2. Определение тактики лечения.
3. Исследование прогностических факторов.
4. Изучение причины смерти пациента.

В настоящем пособии мы не будем рассматривать четвертую задачу, так как она является предметом классической аутопсийной патологической анатомии.

Первая задача — определение нозологии — осуществляется врачом-патологоанатомом в соответствии с актуальной **классификацией ВОЗ**, которая насчитывает в настоящее время (2024 год) 14 томов и является пятым пересмотром. Каждый том, за исключением книг, посвященных наследственным синдромам и педиатрическим новообразованиям, представляет собой классификацию опухолей, характерных для конкретной системы органов (например, желудочно-кишечного тракта, женской половой системы и т. п.), в которой освещены эпидемиологические, морфологические и молекулярно-генетические особенности каждой из нозологий. Необходимо отметить, что данная классификация не является статичной, а постоянно подвергается пересмотру — примерно раз в 8 лет она переиздается.

Несмотря на многообразие нозологий, имеются общие правила кодировки новообразований, известной как **код ICD-O** (International Classification of Diseases for Oncology, Международная классификация онкологических болезней). Код состоит из пяти цифр. Первые четыре цифры обозначают гистологическое наименование опухоли и, конечно, плохо поддаются интерпретации без надлежащего справочника. Однако через косую черту имеется цифровая градация опухолевого процесса от 0 до 3, где 0 — доброкачественная опухоль, 3 — злокачественная, 2 — преимущественно характеризуют рак *in situ*, а 1 — опухоль с неопределенным потенциалом злокачественности (ближе к доброкачественной), которая может давать локорегиональные рецидивы [1]. Такая кодировка позволяет клиническим специалистам и патологам быстро понять биологический потенциал опухоли.

Вторая задача — определение тактики лечения — является, с одной стороны, следствием первой задачи, т. к. нозология часто определяет тактику лечения пациента, с другой стороны, — интраоперационная, так называемая «срочная гистология» позволяет в ряде случаев определять объем оперативного вмешательства. Кроме того, определение предиктивных маркеров, необходимых для назначения таргетной терапии и иммунотерапии, так же прочно вошли в повседневную практику врача-патологоанатома.

Третья задача — определение прогноза течения заболевания — напрямую зависит от правильного установления нозологической единицы, которая зачастую определяет агрессивное или индолентное течение болезни. Также в рамках этой задачи изучаются прогностические факторы (например, наличие или отсутствие инвазии в лимфатические сосуды, или *BRAF*-мутация, которая не только в ряде нозологий является предиктивным фактором, но и определяет агрессивное течение опухолевого процесса).

Для решения вышеописанных задач в арсенале врача-патологоанатома есть следующие методы:

1. Цитологический.
2. Гистологический.
3. Иммуногистохимический.
4. Гибридизация *in situ* (FISH, CISH, SISH).
5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).
6. Высокопроизводительное секвенирование (NGS).

1. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитологический метод исследования заключается в изучении материала, состоящего только из клеточных элементов. Материал может быть получен либо при помощи специальной щеточки (браш-биопсия), что часто используется при скрининге рака шейки матки, также может выполняться при эндоскопических методах исследования (ФЭГДС, ФБС); либо посредством аспирации тонкой иглой (FNA, тонкоигловая биопсия) изучаемого объекта, является методом предоперационной диагностики новообразований щитовидной железы, может быть использован в качестве первоначального метода исследования при поражениях лимфоузлов, молочной железы.

Материал выпотных жидкостей также является прерогативой цитологического метода, однако в настоящее время все большее применение находит приготовление **цитоблоков** из осадка, получаемого при центрифугировании асцитических и плевральных жидкостей, приближая тем самым цитологическое исследование к гистологическому. Мазки-отпечатки часто дополняют гистологическое исследование и особенно полезны при гематологических процессах.

Помимо того, что клеточная суспензия может сразу наноситься на стекло, в настоящее время также существует жидкостная цитология, которая наиболее распространена при обследовании шейки матки. При жидкостной цитологии полученный материал вначале вносится в специальную транспортную среду, а затем при помощи специальной центрифуги наносится на стекло. Данная методика позволяет стандартизовать цитологические образцы, упрощает их оценку за счет формирования монослоя из оцениваемых клеток (Рисунок 2).

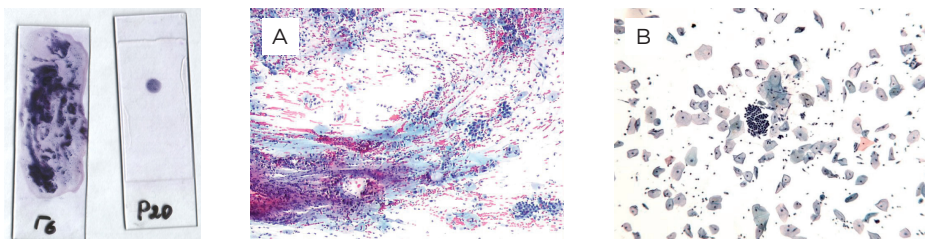


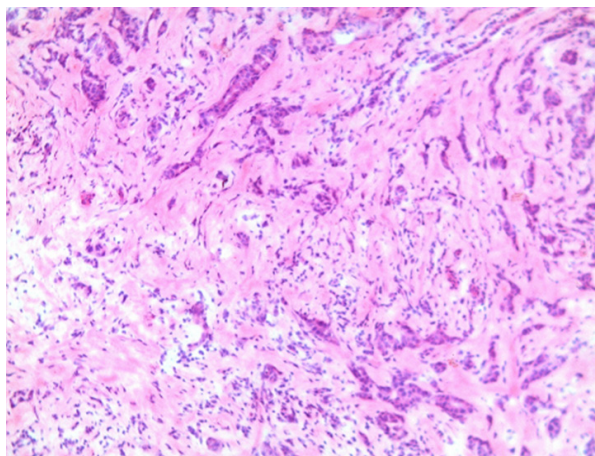
Рисунок 2. Жидкостная цитология (P20, b) в сопоставлении с «традиционно» приготовленным мазком (Г6, а), полученных из материала браш-биопсии шейки матки

2. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Данный метод заключается в микроскопическом исследовании тканевого материала, полученного или в ходе биопсии изучаемого образования, или в результате оперативного удаления опухоли. Исследование может носить так называемый «срочный» или «плановый» характер. «Срочная гистология» выполняется интраоперационно. Время, затрачиваемое на нее, не должно превышать 20 минут. Приготовление препарата осуществляется при помощи микротом-криостата, в котором происходит заморозка гистологического образца при температуре -60°C . Далее осуществляется нарезка образца с получением срезов толщиной 5-6 микрон, размещение их на предметные стекла, а также их окраска гематоксилином и эозином.

«Срочное» гистологическое исследование выполняется только в случае, если оно может изменить ход операции.

Важно учитывать, что заморозка образца ткани приводит к разбуханию клеточных элементов, сглаживанию границ между ними и стромой (Рисунок 3).



*Рисунок 3. Препарат «срочного» гистологического исследования.
Инвазивный протоковый рак молочной железы, увеличение X 100*

Таким образом, врач-патологоанатом имеет для оценки препарат «низкого качества», который он должен изучить в максимально короткие сроки и сформулировать свое заключение. Очевидно, что данная ситуация может приводить либо к ошибкам, либо к тому, что лаборатория не может охарактеризовать патологический процесс. Кроме того, заморозка материала деформирует его и может приводить к разрушению антигенов и ДНК. Таким образом, количество «срочных» гистологических исследований необходимо минимизировать за счет предоперационных обследований, в том числе, выполнения биопсии.

Так называемая «плановая гистология» может выполняться на биопсийном и операционном материале.

Биопсия может быть получена в результате эндоскопического исследования (щипцовая), либо забор тканевого материала осуществляется при помощи специального пистолета и толстой иглы (трепан-биопсия). Также биопсия может быть выполнена острым путем (скальпелем). В этом случае, если иссекается часть образования, то это **инцизионная биопсия**, если всё образование —

эксцизионная биопсия. Отличие эксцизионной биопсии от операционного материала заключается в том, что при первой не ставятся лечебные задачи, такие как, удаление в пределах здоровых тканей, а выполняется она с целью определения характера патологического процесса.

Если материал объемный (операционный), то чаще всего он не весь подлежит исследованию, а только его часть. Классическим правилом является взятие 1-2 фрагментов на каждый сантиметр опухоли. Также обязательно изучаются все удаленные лимфоузлы, края резекции.

Полученный материал вначале фиксируется в 10% буферном формалине (*соотношение формалина к фиксируемому объекту должно быть не менее 10:1*) в течение 24 часов (предельный срок нахождения материала в формалине — 72 часа). Затем обезживается в изопропиловых спиртах, либо в этиловом спирте и ксилоле. После чего пропитывается парафином и заливается в кассету, в которой он проходил все вышеописанные процедуры. Таким образом формируется парафиновый блок, с которого выполняются срезы на микротоме с нанесением на предметные стекла. Полученные препараты далее можно покрасить гематоксилином и эозином, которые врач-патологоанатом оценивает под микро-



Рисунок 4. Схема гистологического исследования от момента забора материала до приготовления гистологического препарата

скопом, что и является итогом гистологического исследования (Рисунок 4).

Кроме того, с полученного парафинового блока также могут быть выполнены срезы для иммуногистохимического исследования, *in situ* гибридизации, либо помещены в эппендорф для МГИ.

Задачами гистологического исследования являются: определение типа опухоли, стадии (pTN, когда возможно — M), степени злокачественности новообразования, изучение краев резекции, периневральной и сосудистой инвазии.

Необходимо помнить об ограничениях гистологического метода. Например, в ряде случаев определение типа опухолевого процесса невозможно без проведения иммуногистохимического исследования, а в последнее время — и без МГИ. Степень злокачественности при нейроэндокринных опухолях невозможно определить без расчета пролиферативного индекса Ki-67.

3. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Этот метод помогает визуализировать белки. Белки могут находиться как в самой опухолевой клетке — в мембране, цитоплазме или ядре, так и в окружающей ее нормальной или реактивно-измененной ткани. Исходя из того, где находится искомый белок, в результате иммуногистохимического исследования можно получить, соответственно, разные виды реакций: **мембранную, цитоплазматическую или ядерную.**

Исследование проводится на гистологическом срезе, который помещен на предметное стекло. На этот срез наносятся **антитела**, которые могут быть двух видов:

- **моноклональные антитела** — более специфичные, так как взаимодействуют строго с определенным эпитопом (участком антигена, который распознается антителом) белка;
- **поликлональные антитела** — более чувствительные, так как реагируют с разными участками молекулы, но менее специфичные, в следствие высокой вероятности перекрестной реакции с другими эпитопами.

Антитело состоит из Fab-фрагмента антигенсвязывающего, который обеспечивает его собственную специфичность, и Fc-фрагмента, который является видоспецифичным.

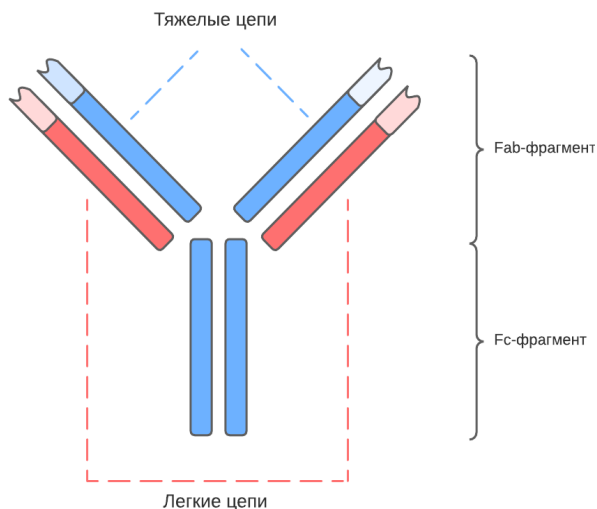


Рисунок 5. Схема строения антитела. Антитело состоит из двух частей – Fab-фрагмента и Fc-фрагмента. Fab-фрагмент состоит из тяжелой и легкой цепей полипептидов, Fc-фрагмент – только из тяжелых цепей

Наиболее часто используемыми диагностическими антителами являются кроличьи и мышинные. Для того, чтобы увидеть реакцию антиген-антитело, используется **система визуализации**. Нет необходимости подбирать систему для каждого иммуноглобулина, достаточно иметь универсальный комплекс, который взаимодействует с видоспецифичными Fc-фрагментами антител кролика и мыши, что и используется в повседневной практике.

Система визуализации представляет собой полимер (молекула декстрана), к которому присоединены анти-мышинные и анти-кроличьи антитела, а также фермент — **пероксидазу**. В данном случае пероксидаза играет двоякую роль. С одной стороны, она служит «мостиком», взаимодействуя с антителом, с другой стороны, — участвует в окислительно-восстановительной реакции с **хромогеном** — цветной меткой. Нанесение хромогена является заключительным этапом иммуногистохимической реакции. В качестве хромогена наиболее часто используется диаминобензидин, который, взаимодействуя с пероксидазой, обуславливает окрашивание препарата (Рисунок 6).

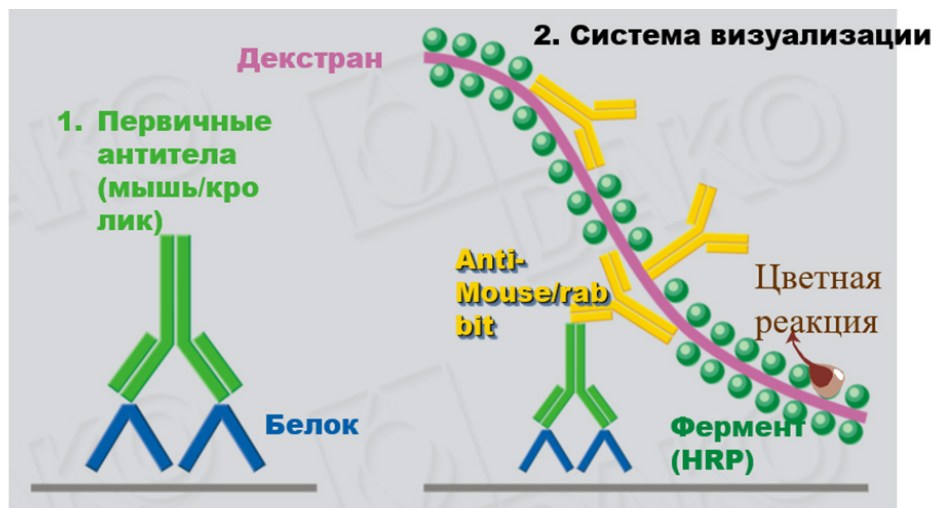


Рисунок 6. Схема иммуногистохимического исследования

Основная задача иммуногистохимического исследования — это помочь врачу-патологоанатому в определении типа опухоли, когда это невозможно сделать при рутинной окраске гематоксилином и эозином. Из этого вытекают два следствия:

- ИГХ — это продолжение гистологического исследования, и оно не может быть рассмотрено отдельно от него;
- ИГХ — это инструмент, с помощью которого патологоанатом прежде всего подтверждает свои догадки, возникшие при изучении анамнеза пациента, клинических данных и данных лучевых методов исследования, изучения гистологического препарата, окрашенного рутинной окраской.

В редких ситуациях, когда имеется недифференцированная опухоль, и на основании вышеописанных данных какие-то выводы сделать невозможно, предпринимается последовательное использование так называемых **панелей антител**.

Первая панель включает в себя виментин, цитокератин-пан (СК-Ран), CD45, s100. Эта панель схематично «разделяет» разные типы тканей. Например, виментин в большей мере присущ мягкотканым опухолям (саркомам), цитокератины — элементы цитоскелета эпителиальных новообразований (раков), CD45 — характерен

для лимфом, s100 — опухолям из нервного гребня (меланомы). Конечно, в клинической практике все не так просто, и существует множество исключений: виментин, как примитивный элемент цитоскелета, может выявляться в любой недифференцированной опухоли, а ряд лимфом негативны на CD45 и т. д. Однако в большинстве случаев данная панель позволяет сузить дифференциальный диагноз и направить патологоанатома в диагностическом поиске.

После оценки результатов первой панели часто приходится использовать вторую панель, которая помогает уточнить происхождение опухоли. Например, выясняется, что опухоль — саркома. В этом случае используются преимущественно маркеры, характерные для тканей, из которых предположительно произошла опухоль — гладкие или поперечнополосатые мышцы, сосуды, нервы, жир. Однако существуют антигены, которые в нормальной ткани не должны определяться или экспрессируются на низком уровне (Таблица 1).

Таблица 1. Маркеры, используемые для определения тканеспецифичности сарком [2]

ВТОРАЯ ПАНЕЛЬ. САРКОМА

Маркеры	Нормальные ткани	Опухоли
SMA, десмин, миогенин	Мышцы	Лейомиосаркома, рабдомиосаркома
S100, SOX10	Нервный гребень	Меланома, светлоклеточная саркома, опухоль из оболочек периферических нервов
CD34, CD34, ERG	Сосуды	Ангиосаркома, гемангиоэндотелиома
TLE1	Базальные клетки эпидермиса, эндотелий, периневрий	Синовиальная саркома
TFE3	Высокий уровень экспрессии в норме не наблюдается	Альвеолярная саркома мягких тканей
CD117, DOG1	Итерстициальные клетки Кахаля, ткань слюнной железы и др.	Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST)
STAT6	Высокий уровень экспрессии в норме не наблюдается	Солитарная фиброзная опухоль
CDK4, mdm4	Единичные клетки — многие органы и ткани. Диффузно не наблюдается	Солитарная фиброзная опухоль
SATB2	Остеобласты, кишечный эпителий	Остеосаркома

В настоящее время становится ясно, что многие мягкотканые опухоли имеют характерное — драйверное — молекулярно-генетическое событие, чаще всего транслокацию гена. При этом ИГХ оказывается неэффективной, и для постановки диагноза требуется молекулярно-генетическое исследование (МГИ).

Вторая панель антител также используется для диагностики эпителиальных опухолей и лимфом. Последние можно разделить на В-клеточные и Т-клеточные при помощи маркеров CD20 и CD3, соответственно. Во второй панели для раков могут быть применены p63 или p40 для определения плоскоклеточной дифференцировки; синаптофизин, хромогранин А, INSM1 — для нейроэндокринной. В случае диагностирования аденокарциномы с неизвестным первичным очагом, возможно применение органоспецифических маркеров (обычно, факторов транскрипции), характерных для конкретных органов и систем (Таблица 2) [2].

Таблица 2. Органоспецифические маркеры

ОРГАНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Маркеры	Органы
TTF1	Легкие, щитовидная железа
Pax8	Яичники, почки, щитовидная железа
Gata 3	Молочная железа, придатки кожи, слюнная железа, уротелий
SATB2	Толстая кишка
CDX2	Желудочно-кишечный тракт
WT1	Яичник, мезотелий
Melan A	Надпочечник
Hep-Par	Печень

Такой последовательный подход в использовании панелей антител имеет как преимущества, так и недостатки. К положительным особенностям можно отнести более бережное расходование материала, экономическую эффективность. Основной же недостаток заключается в длительности данного подхода, так как при некоторых нозологиях скорость постановки диагноза крайне важна.

Вторая задача иммуногистохимического исследования — это дифференциальная диагностика злокачественных опухолей от доброкачественных процессов. В большинстве случаев определение злокачественного потенциала опухоли осуществляется уже на этапе гистологического исследования с применением рутинных окрасок, а иммуногистохимия в решении данного вопроса неэффективна. Однако, в ряде ситуаций ИГХ может быть полезной и даже необходимой. Это касается визуализации миоэпителия при опухолях молочной и предстательной желез (Рисунок 7).

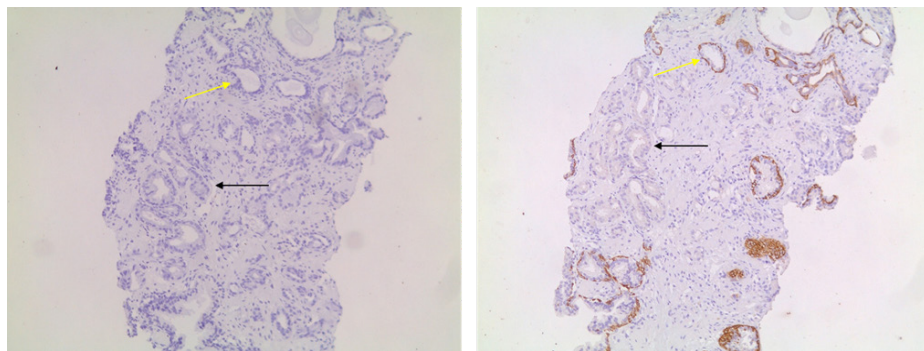


Рисунок 7. Трепан-биопсия предстательной железы. Справа на рисунке представлена ткань предстательной железы, окраска гематоксилином и эозином; слева — тот же участок с иммуногистохимической окраской на СКНМВ. Желтой стрелкой указана нормальная структура — при иммуногистохимическом исследовании СКНМВ визуализируется интактный миоэпителий (коричневое окрашивание вокруг желез). Черной стрелкой указана раковая структура, при ИГХ видно отсутствие миоэпителия вокруг опухоли (нет коричневого окрашивания), $\times 100$

Так же иммуногистохимическое исследование эффективно при дифференциальной диагностике фолликулярной гиперплазии и лимфомы (Bcl2), высокодифференцированной липосаркомы (CDK4). В ряде случаев может помочь ИГХ исследование p53, так как мутация в этом гене означает злокачественную трансформацию клеток.

Третьей задачей иммуногистохимии является определение предиктивных маркеров. В настоящее время нет злокачественных опухолей, для которых не требовалось бы определение маркеров, позволяющих назначить таргетную или иммунотерапию. Иммуногистохимически возможно определение части из них. Это может быть прямая оценка экспрессии, как в случае исследования эстро-

геновых рецепторов и прогестероновых рецепторов, так и косвенная оценка мутаций/транслокаций/амплификаций генов. В последнем случае иммуногистохимически определяется либо потеря экспрессии, либо сверхэкспрессия гена. Это такие маркеры как Her2, ALK, p53, MMR (MSH2, MSH6, PMS2, MLH1).

4. ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU (FISH, CISH, SISH)

Данный метод основан на взаимодействии праймеров с ДНК. Прикрепляемая к праймеру метка определяет разновидность гибридизации in situ: флуоресцентная (FISH), хромогенная (CISH), хромогенная с серебрением (SISH). Чаще всего применяются два праймера, в случае определения транслокации гена — соседние участки ДНК, если изучается амплификация гена, то одна метка маркирует изучаемый ген, а вторая — центромеру хромосомы, на которой он располагается.

Исследование выполняется на предметном стекле, чаще всего на срезе с парафинового блока (в гематологии используют цитологические образцы). Оценка производится под микроскопом, в случае FISH — со специальным модулем, необходимым для улавливания флуоресценции. Исследование на транслокацию чаще всего изучает **разрыв гена** (break-apart), таким образом, при ее обнаружении два сигнала должны быть рядом, а два — отдельно. При **амплификации гена** количество меток, его визуализирующих, должно превышать сумму сигналов центромеры соответствующей хромосомы, где ген располагается (Рисунок 8).

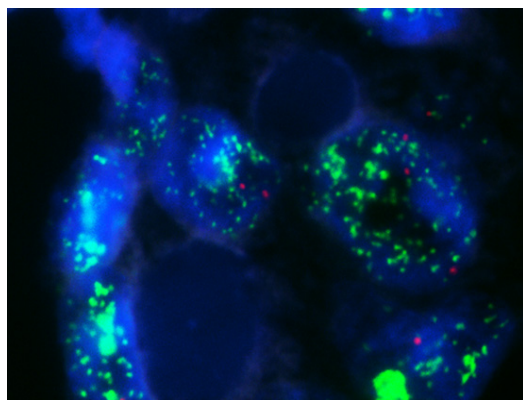


Рисунок 8. FISH-исследование гена *FGFR2*. Зеленые сигналы визуализируют ген *FGFR 2*, красные — центромеру 10 хромосомы. Выявляется выраженная амплификация гена (80 зеленых сигналов в одном ядре)

In situ гибридизация может быть использована как для диагностических целей, так и для предиктивных. К диагностическим относится выявление генетических альтераций, характерных для определенных опухолей. Так в основе синовиальной саркомы лежит транслокация $t(X;18)(p11;q11)$, результатом которой является возникновение химерного гена SS18-SSX. В рутинной практике используется исследование на разрыв SS18, чего достаточно для верификации синовиальной саркомы. Сложнее ситуация с геном EWSR1. Впервые описанная транслокация была для саркомы Юинга, далее выяснилось, что альтерации, связанные с этим геном, могут возникать при широком спектре опухолей, включающих светлоклеточную саркому, миэпителиому, EWSR1-PATZ1 саркому и т. д. Таким образом, определение разрыва гена может не привести к постановке правильного диагноза [3]. Из-за этого специалисты все больше приходят к выводу о необходимости секвенирования РНК для выявления основных химерных генов патогномоничных для опухолей (в первую очередь, новообразований мягких тканей).

В предиктивных целях изучается амплификация HER2, когда при иммуногистохимическом исследовании получается сомнительный результат (2+), ROS1 — при выявлении позитивной реакции при ИГХ и т. д.

5. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Полимеразная цепная реакция, ПЦР (polymerase chain reaction, PCR) — метод, позволяющий получить множество копий определенного участка ДНК in vitro. ПЦР была разработана Кэри Муллисом в начале 1980-х годов, и в 1993 году он стал лауреатом Нобелевской премии по химии за это открытие. В настоящее время ПЦР стала рутинным методом диагностики в патологии, позволяющим обнаружить различные инфекционные агенты, мутации и транслокации генов.

Перед проведением ПЦР с парафинового блока необходимо исследовать гистологический препарат с этого блока, чтобы избежать ошибочных результатов. В отличие от иммуногистохимического метода, при проведении ПЦР исследователь не видит напрямую, что он оценивает. Поэтому, на этапе отбора материала для исследования необходимо оценить следующие параметры:

- **наличие или отсутствие опухолевого субстрата** в данном парафиновом блоке. Проведение ПЦР «вслепую» может привести к ложноотрицательному результату исследования;
- **качество** ткани в препарате. На преаналитическом этапе образец ткани подвергается сначала холодовой ишемии, затем фиксации в растворе 10%-ого нейтрального формалина. При нарушении допустимых временных рамок холодовой ишемии ткани, в том числе опухолевые, подвергаются аутолизу, что в конечном итоге приводит к разрушению ядра клетки вместе со всей генетической информацией. Если превышено время фиксации в формалине (более 72 часов), качество препарата также снижается. В обоих случаях выделение ДНК становится затруднительным или даже невозможным;
- **количество** опухолевого субстрата. Необходимо оценить, какой процент от выбранного участка образца занимает опухоль, так как малый процент опухолевого субстрата также затрудняет выделение ДНК;
- наличие или отсутствие **некрозов опухолевой ткани и лимфоидной инфильтрации**. Некротизированная (мертвая) ткань непригодна для анализа и только мешает выделению ДНК, поэтому следует избегать попадания клеточного детрита в образец для ПЦР-исследования. Также мешают выделению опухолевой ДНК лимфоциты и другие воспалительные элементы, так как каждая из этих клеток несет свою генетическую информацию.

Базовые принципы полимеразной цепной реакции:

- двухцепочечные ДНК-мишени становятся одноцепочечными ДНК вследствие нагревания;
- добавляются два олигонуклеотида — праймера. Праймеры связываются с 3'-концом комплементарной им цепи ДНК;
- цепь ДНК удлиняется с помощью ДНК-полимеразы (*Taq*-полимеразы). Этот фермент вставляет нуклеотиды в цепь ДНК;
- цикл повторяется 20-30 раз.

Основные этапы полимеразной цепной реакции

Определенный участок ДНК амплифицируется с помощью пары ДНК-праймеров, термостойкого фермента ДНК-полимеразы и нуклеотидов (Рисунок 9).

Денатурация: двухцепочечные ДНК становятся одноцепочечными под воздействием высокой температуры;

Отжиг: праймеры для прямой и обратной цепей ДНК связываются с комплементарным им 3'-концом;

Расширение: термостойкие ДНК-полимеразы захватывают нуклеотиды и удлиняют с их помощью каждую из цепей ДНК в направлении от 3'-конца к 5'-концу [4].

Обязательные составляющие для проведения полимеразной цепной реакции:

- **праймеры** — искусственно созданные фрагменты цепи ДНК, которые комплементарны 3'-концу целевой ДНК. Праймеры обычно состоят из 20-30 нуклеотидов;
- **ДНК-полимераза** (Taq-полимераза) — фермент, который удлиняет цепь ДНК. ДНК-полимераза присоединяется к свободному концу праймера и последовательно добавляет новые нуклеотиды к цепи.

Для получения одноцепочечной ДНК необходима высокая температура (94°C). Обычные ДНК-полимеразы разрушаются в таких экстремальных условиях. Однако Taq-полимераза обладает свойством сохранять свою активность при высоких температурах. Этот фермент выделяется из бактерий *Thermus aquaticus*, которые обитают в горячих источниках, что и обуславливает уникальные свойства этого белка;

- **дезоксинуклеотид трифосфаты (dNTPs)** — исходный материал для удлинения цепи ДНК, включает в себя dATP, dCTP, dGTP, и dTTP. Taq-полимераза захватывает эти нуклеотиды и присоединяет их к свободному 3'-концу праймера;

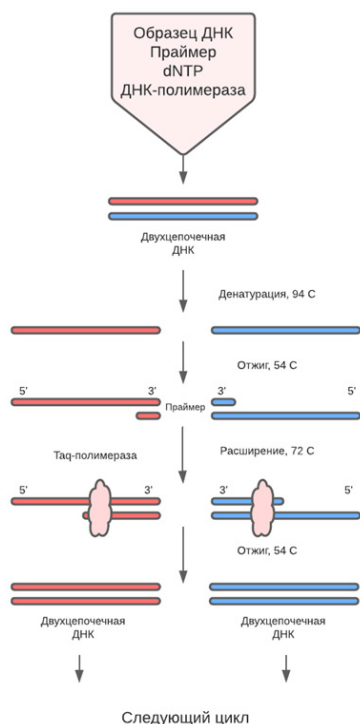


Рисунок 9. Схема ПЦР

- **целевая ДНК**, выделенная из образца ткани;
- **буферный раствор**, который обеспечивает оптимальную химическую среду для протекания реакции;
- **хлорид магния**, который выступает кофактором для *Taq*-полимеразы.

Основная ниша ПЦР в онкологии — это определение известных точечных мутаций, таких как: k-Ras, NRAS, bRaf, EGFR и др. Несомненным преимуществом метода является простота интерпретации результата, скорость исследования и относительно невысокая стоимость. Кроме того, в отличие от FISH-исследования, где в основном определяется разрыв гена, при помощи ПЦР выявляются химерные гены, то есть выявляется фьюжн-партнер транслоцированного гена. Это имеет важное значение, например, для дифференциальной диагностики мягкотканых опухолей. Рассмотрим две различные нозологические единицы — десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль и саркому Юинга. Эти две опухоли имеют свои клинико-эпидемиологические и иммуногистохимические черты, однако без этих данных схожая гистологическая картина, особенно на малом объеме биопсийного материала, может ввести в заблуждение — в обоих случаях определит наличие транслокации гена *EWSR1*, не помогая отличить одну опухоль от другой. Однако при проведении ПЦР в случае с десмопластической мелкокруглоклеточной опухолью будет определяться химерный ген *EWSR1-WT1*, а в случае с саркомой Юинга в большинстве случаев — химерный ген *EWSR1-FLI1* или *EWSR1-ERG*.

ПЦР — доступный, быстрый и удобный молекулярно-генетический метод. Однако его использование ограничено узкой панелью известных мутаций. Для обнаружения редких генетических альтераций или необычных фьюжн-партнеров используется высокопроизводительное секвенирование.

6. ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Высокопроизводительное секвенирование или секвенирование нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS) — молекулярно-генетическое исследование, позволяющее прочесть широкую часть генома (или геном полностью) в относительно

короткие сроки путем одновременного секвенирования миллионов участков ДНК. NGS позволяет определять широкий спектр генетических повреждений, таких как инсерции («вставка» лишнего нуклеотида) и делеции («потеря» нуклеотида), изменения числа хромосом, амплификация (умножение) генов, а также реаранжировка генов со слиянием и образованием химерных генов [5].

Первый метод секвенирования ДНК, известный как секвенирование по Сэнгеру, был описан в 1977 году и считается методом секвенирования первого поколения [6]. Он позволяет провести только одно прочтение за раз, что делает этот метод затратным по времени и финансам. Чтобы решить эти проблемы, были разработаны секвенирование второго и третьего поколений [7, 8].

В настоящее время термин «высокопроизводительное секвенирование» объединяет различные технологии секвенирования: полное геномное секвенирование, полное экзомное секвенирование, таргетное секвенирование генов.

Геном человека состоит примерно из 3×10^9 азотистых оснований, которые организованы в кодирующие области (экзоны) и не кодирующие области (интроны, промоторы, регуляторные и структурные элементы). Секвенирование всех этих элементов называется **полным геномным секвенированием** (whole-genome sequencing, **WGS**). WGS, несмотря на большой объем получаемой из него информации, не всегда требуется. Если не нужна, например, информация о регуляторных элементах, лучше использовать секвенирование только кодирующих участков генома — **полное экзомное секвенирование** (whole-exome sequencing, **WES**). Для данного исследования требуется секвенирование только 2% всего генома [9], что будет быстрее и дешевле, а также обеспечит большую глубину прочтения. Кроме того, возможно прочтение определенных генов или даже «горячих точек» в этих генах — **таргетное секвенирование**. Например, точечное исследование 9 и 20 экзонов гена *PIK3CA*, 15 экзонов гена *BRAF*, с 18 по 21 экзоны гена *EGFR*, или 12 и 14 экзонов гена *JAK2*. Схематичное сравнение этих методов представлено на рисунке 10.

Методом NGS может исследоваться не только геном, но и **транскриптом** — совокупность всех молекул РНК, включая матричную РНК, микроРНК, рибосомальную РНК и т. д. Это исследование известно как RNA-Seq.

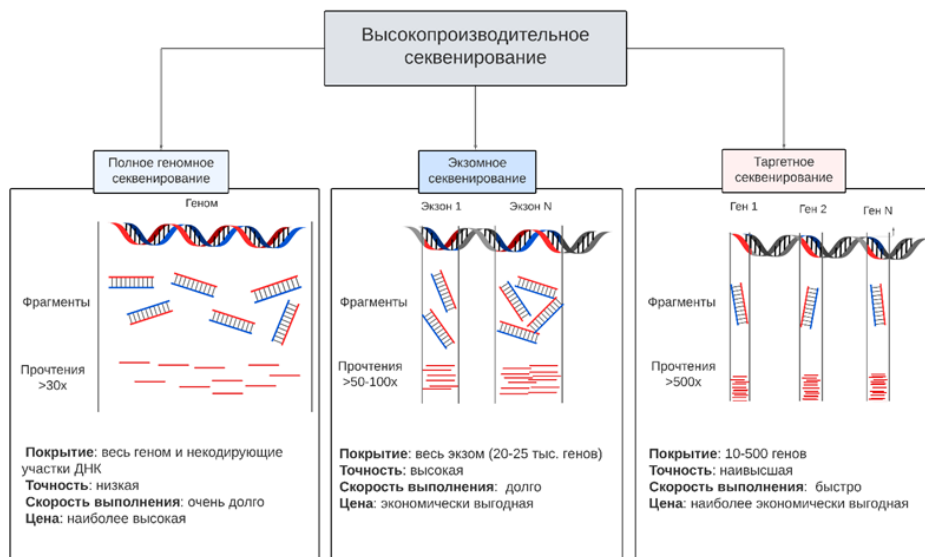


Рисунок 10. Схема различных вариантов секвенирования

Процесс NGS исследования состоит из трех этапов: создание библиотеки, секвенирование и анализа результатов [10].

Создание библиотеки

Библиотека NGS представляет собой фрагменты ДНК одинакового размера с известными адаптерами — короткими участками ДНК, которые прикрепляются к интересующим фрагментам ДНК для объединения с праймерами.

Создание библиотеки состоит из двух основных шагов: **фрагментация** образца ДНК до подходящего размера (обычно, до 200-500 bp, base pair, пар оснований), и **присоединение** специально модифицированных **адаптеров** ДНК, позволяющих осуществить реакцию секвенирования и идентифицировать происхождение образца. Перед секвенированием библиотека должна пройти как точный количественный анализ, так и контроль качества.

Фрагментацию можно осуществлять с использованием различных методов, включая физические методы (обработка ультразвуком), ферментативные методы (использование эндонуклеазы) и, для одноцепочечной РНК, химические методы

(нагрев с двухвалентными ионами). Размер фрагментов зависит от платформы, на которой производится секвенирование.

Затем полученные фрагменты ДНК фосфорилируют и «заглушают» их концы, чтобы обеспечить **присоединение адаптера**. Адаптеры содержат нуклеотидные последовательности, позволяющие проводить ПЦР-амплификацию во время секвенирования.

Секвенирование

Первый этап секвенирования заключается в преобразовании полученной библиотеки в одноцепочечную ДНК. Сигнал, излучаемый при секвенировании одной молекулы, не будет обнаружен с помощью доступных в настоящее время химических методов, и поэтому каждая отдельная молекула должна быть «клонально амплифицирована», чтобы получить достаточный для обнаружения сигнал. Для этого вторым этапом совершается ПЦР-амплификация этих молекул [11, 12].

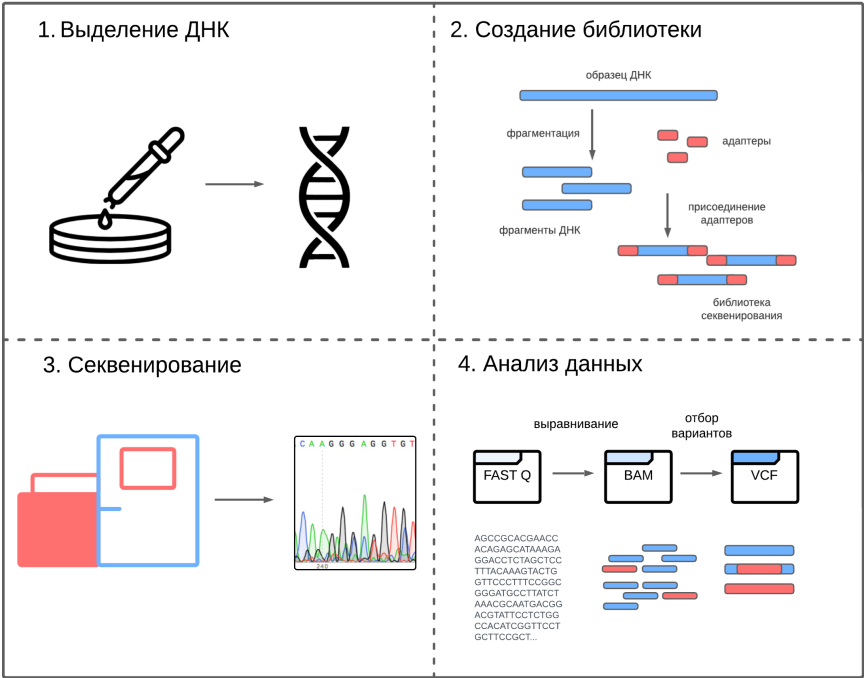


Рисунок 11. Схема этапов высокопроизводительного секвенирования

Анализ результатов

В результате NGS-исследования формируется огромное количество информации, правильная интерпретация которой является серьезной проблемой. В настоящее время доступно множество различных пакетов программного обеспечения, которые позволяют анализировать данные [13]. С их помощью полученные последовательности будут автоматически выровнены и картированы с использованием методов биоинформатики. В результате этого создаются файлы BAM (binary alignment/map). Они содержат информацию о последовательности и ее местоположении относительно эталонной последовательности нуклеотидов.

Обнаруженные генетические альтерации не всегда являются патогенными, они могут быть доброкачественными или вовсе не иметь известного клинического значения. Наиболее распространенной является классификация генетических альтераций, разработанная Американским колледжем клинических генетиков, ACMG/AMP (American College of Medical Genetics/Association for Molecular Pathology) [14]:

- 5 — патогенная;
- 4 — вероятно патогенная;
- 3 — неопределенное значение — VUS (Variant of unknown significance);
- 2 — вероятно доброкачественная;
- 1 — доброкачественная.

Основываясь на рекомендациях ESMO, рутинное использование нетаргетных панелей NGS рекомендуется только для пациентов с распространенным неплоскоклеточным немелкоклеточным раком легкого, раком предстательной железы и яичников, а также холангиокарциномой для выявления генетических альтераций уровня I по ESCAT [15].

Таблица 3. Европейское общество клинических онкологов –
клиническое значение таргетных мутаций (ESCAT)

Уровень I	Сочетание «альтерация — препарат» связано с улучшением прогноза в клинических исследованиях
Уровень II	Сочетание «альтерация — препарат» связано с противоопухолевой активностью, но не известно
Уровень III	Сочетание «альтерация — препарат» связано с улучшением прогноза в клинических исследованиях для других опухолей с такой же альтерацией
Уровень IV	Доклинические доказательства эффективности
Уровень V	Сочетание «альтерация — препарат» связано с объективным ответом, но без клинической выгоды
Уровень X	Нет доказательств эффективности

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологическая анатомия давно вышла за рамки гистологического исследования. Молекулярные методы, направленные на выявление ткане- и органоспецифических белков, транслокаций генов, стали неотъемлемой частью диагностического процесса. Необходимо правильное применение различных методов исследования для точной диагностики патологического процесса и назначения эффективного лечения.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Раствор для фиксации материала.

- 1) 40% формальдегид.
- 2) 10% формалин.
- 3) 100% формалин.
- 4) Этиловый спирт.

2. Метод, направленный на выявление белков клетки.

- 1) ПЦР.
- 2) NGS.
- 3) Цитология.
- 4) Иммуногистохимия.

3. К «первой панели» антител при последовательном иммуногистохимическом исследовании относят все, кроме:

- 1) Melan A.
- 2) S100.
- 3) CK-Pan.
- 4) CD45.

4. Маркер, характерный для эпителиальных опухолей.

- 1) CD45.
- 2) S100.
- 3) CK-Pan.
- 4) CD20.

5. Наиболее длительным по времени является метод.

- 1) NGS.
- 2) ПЦР.
- 3) FISH.
- 4) ИГХ.

6. Преимуществом NGS над ПЦР является все, кроме:

- 1) Выявляются только патогенные мутации.
- 2) Выявление всех возможных мутаций.
- 3) Одновременное исследование большой панели генов.
- 4) Выявление редких мутаций.

7. Метод, для интерпретации результатов которого требуется флуоресцентный микроскоп.

- 1) ИГХ.
- 2) FISH.
- 3) ПЦР.
- 4) Гистохимия.

8. В задачи FISH-исследования входит.

- 1) Определение экспрессии генов.
- 2) Определение точечных мутаций.
- 3) Определение транслокаций и амплификаций генов.
- 4) Определение активности энзимов.

9. Срочное гистологическое исследование должно выполняться только при условии.

- 1) Изменения хода операции в зависимости от результата.
- 2) Выписки пациента на следующий день.
- 3) Необходимости молекулярных методов исследований.
- 4) Отсутствия результатов лучевых методов исследования.

10. Методом выбора для изучения мутации BrafV600E является.

- 1) ПЦР.
- 2) Иммуногистохимия.
- 3) NGS.
- 4) FISH.

11. Методом выбора для оценки HER2/neu при раке молочной железы является.

- 1) ПЦР.
- 2) Гистохимия.
- 3) Иммуногистохимия.
- 4) NGS.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

Номер задания	Номер ответа
1	2
2	4
3	1
4	3
5	1
6	1
7	2
8	3
9	1
10	1
11	3

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://tumourclassification.iarc.who.int/home>.
2. <https://www.pathologyoutlines.com/>.
3. Raskin G. A., Pozharisski K. M., Iyevleva A. G., Rikov I. V., Orlova R. V., Imyanitov E. N. Unusual clinical presentation of gastrointestinal clear cell sarcoma. *Gastrointestinal tumors*, 2015, N2, P.83-88.
4. Dey, P. (2018). Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_20
5. Cappello F, Angerilli V, Munari G, Ceccon C, Sabbadin M, Pagni F, Fusco N, Malapelle U, Fassan M. FFPE-Based NGS Approaches into Clinical Practice: The Limits of Glory from a Pathologist Viewpoint. *J Pers Med*. 2022 May 5;12(5):750. doi: 10.3390/jpm12050750.
6. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
7. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2013;6:287-303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628
8. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021 Nov;82(11):801-811. doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.
9. Ecker JR, Bickmore WA, Barroso I, Pritchard JK, Gilad Y, Segal E. Genomics: ENCODE explained. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):52-5. doi: 10.1038/489052a.
10. Ilyas M. Next-Generation Sequencing in Diagnostic Pathology. *Pathobiology*. 2017;84(6):292-305. doi: 10.1159/000480089.
11. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2013;6:287-303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.
12. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46. doi: 10.1038/nrg2626.
13. Ulahannan D, Kovac MB, Mulholland PJ, Cazier JB, Tomlinson I. Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. *Br J Cancer*. 2013 Aug 20;109(4):827-35. doi: 10.1038/bjc.2013.416.

14. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017 Jan;19(1):4-23. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.
15. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, Normanno N, Scarpa A, Robson M, Meric-Bernstam F, Wagle N, Stenzinger A, Bonastre J, Bayle A, Michiels S, Bièche I, Rouleau E, Jezdic S, Douillard JY, Reis-Filho JS, Dienstmann R, André F. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020 Nov;31(11):1491-1505. doi: 10.1016/j.annonc.2020.07.014.

ЦЕНТР ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ МИБС

— это иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования опухолей для нужд клинических онкологов, назначающих и корректирующих таргетную терапию и иммунотерапию.

ПЯТЬ ПРИЧИН НАЧАТЬ СОТРУДНИЧЕСТВО С МИБС УЖЕ СЕГОДНЯ:

- весь спектр методов (ИГХ, ПЦР, FISH, NGS) с минимальными сроками исследований (7 дней для ИГХ/ПЦР/FISH, месяц — NGS);
- современное оборудование в собственной лаборатории Онкологической клиники МИБС в Санкт-Петербурге;
- берем логистику на себя — препараты для исследований принимаются в любом из почти 80 региональных диагностических центров МИБС в РФ;
- большинство исследований может быть выполнено не только на платной основе, но и за счет средств ОМС без привязки к региону;
- реализация молекулярной классификации рака эндометрия, в том числе за счет средств ОМС: MMR/MSI, p53, ER, HER2 — иммуногистохимически, POLE (98% мутаций) — ПЦР.

КАКИЕ ДОКУМЕНТЫ НУЖНЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗА СЧЕТ ОМС?

Для проведения иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования необходимо вместе с гистологическими препаратами («стеклами») и/или парафиновыми блоками с опухолью передать в любой из диагностических центров сети МИБС:

- оригинал направления по форме 14У МЗ РФ с обозначением направляющего учреждения в верхней части направления (прямоугольная печать), и треугольной или круглой печатью внизу (приложение);
- форма 57 также возможна, но не включает пересмотр препаратов;
- копию полиса ОМС с обеих сторон;
- копию СНИЛС;
- копию паспорта (основная страница и регистрация);
- копию выписки из истории болезни (эпикриза) и/или любых других документов с клинической информацией о заболевании.



Медицинский институт имени Березина Сергея (МИБС) представляет собой сеть лечебно-диагностических учреждений по всей Российской Федерации, специализирующихся на патоморфологических и молекулярно-генетических исследованиях, лучевой диагностике, ядерной медицине, лучевой терапии, в том числе протонной, лекарственном лечении онкологических заболеваний, хирургии и нейрохирургии.

**ПОЛУЧИТЬ КОНСУЛЬТАЦИЮ ИЛИ ОТВЕТЫ НА ЛЮБЫЕ ВОПРОСЫ
О СОТРУДНИЧЕСТВЕ С МИБС В ВОПРОСАХ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МОЖНО ПО ТЕЛЕФОНУ:**

+7 (812) 244-06-31

**Вместе с МИБС современная диагностика
доступна в большинстве регионов РФ!**

ЗАМЕТКИ

This image shows a full page of a document template. It consists of approximately 30 horizontal blue dotted lines spaced evenly across the page, providing a guide for handwriting or typing. The background is plain white, and there are no margins, headers, or footers visible.

ЗАМЕТКИ

This image shows a full page of a document template. It consists of approximately 30 horizontal blue dotted lines spaced evenly across the page, providing a guide for handwriting or typing. The lines are light blue and extend from the left margin to the right edge of the page. There are no margins, text, or other markings present.

This image shows a full page of a document template. It consists of approximately 30 horizontal blue dotted lines spaced evenly across the page, providing a guide for handwriting or typing. The lines are light blue and extend from the left margin to the right edge of the page. There are no margins, text, or other markings present.