

*А.О. Иванцов, М.А. Клещев, О.В. Ивко, Н.В. Митюшкина, А.Г. Иевлева,
Е.Ш. Кулигина, Е.Н. Имянитов*

Особенности подготовки опухолевого материала для молекулярно-генетического анализа

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова», Санкт-Петербург

Молекулярно-генетический анализ стал неотъемлемым компонентом современной диагностики опухолей. Преаналитический этап молекулярного исследования – комплексный процесс, требующий хорошего взаимодействия хирургов, патологов и молекулярных генетиков. В настоящей работе рассмотрены ключевые аспекты морфологической пробоподготовки биологического материала для ДНК- и РНК-тестирования.

Ключевые слова: молекулярно-генетический анализ, микродиссекция, архивные ткани

Молекулярно-генетический анализ стал неотъемлемым компонентом современной диагностики опухолей. Он подразумевает анализ нуклеотидной последовательности определённых генов и может использовать в качестве матрицы как хромосомальную ДНК, так и генные транскрипты – РНК. Многие разновидности молекулярно-генетических исследований выполняются на грани возможного – это связано с использованием крайне сложной аппаратуры, многокомпонентностью применяемых методик, необходимостью работать с минимальными количествами биологического материала, риском контаминации и т.д. В то время как технологические проблемы, сопряжённые с анализом ДНК и РНК, являются общепризнанными, вклад морфологов в этот процесс остаётся менее заметным. Тем не менее, именно погрешности морфологической пробоподготовки биологического материала зачастую являются решающими факторами при получении ошибочных результатов [12].

В качестве материала для молекулярно-генетического исследования могут использоваться самые различные биологические образцы – ткань опухоли, кровь, цитологические мазки-отпечатки, выпотная жидкость и т.д. Наиболее часто анализ выполняется непосредственно на фрагментах опухолевой ткани, полученных в ходе операции или биопсии. Существенно, что большинство молекулярно-генетических тестов полностью адаптировано к стандартным про-

цедурам обращения с операционным или биопсийным материалом, применяемым в каждой патоморфологической лаборатории. Сразу после забора биологические ткани обычно фиксируются формалином для предотвращения аутолиза. Затем образцы проводятся в спиртах восходящей плотности и заключаются в парафин – в таком виде они десятилетиями хранятся в архивах патологоанатомических отделений.

До конца 1990-х гг. большинство специалистов относилось с определённым недоверием к результатам, полученным посредством молекулярно-генетического анализа архивных тканей. Действительно, нуклеиновые кислоты могут значительно деградировать при фиксации и хранении биологических образцов, что создаёт определённые трудности для анализа ДНК и РНК. Именно поэтому подавляющее большинство молекулярных биологов длительное время предпочитало использовать свежзамороженные ткани – участки опухолей, подвергнутые немедленной заморозке жидким азотом и хранящиеся при низких температурах вплоть до выделения ДНК или РНК. Использование свежзамороженного материала сопряжено с целым рядом очевидных ограничений – организационными и техническими трудностями, ассоциированными с забором, хранением и транспортировкой образцов, а также с визуализацией и диссекцией непосредственно опухолевых клеток. На протяжении прошедшего десятилетия именно анализ архивных тканей стал не только стандартом медико-биологических исследований, но и компонентом рутинной диагностики [11]. Сравнительные характеристики пригодности свежзамороженного и архивного материала для молекулярно-генетических исследований представлены в табл. 1.

Проведение молекулярного анализа возможно только на основе чёткого морфологического исследования опухоли. При этом морфолог обязан учитывать весь комплекс предстоящих лабораторных манипуляций (иммуногистохимическое исследование, флюоресцентная гибридизация *in situ*, молекулярный анализ и т.д.) и попытаться рассчитать количество (массу, объем) опухоле-

вых тканей, необходимых для каждой аналитической процедуры. Существенно, что наличие репрезентативного архивного материала может потребоваться также на случай включения пациента в клинические испытания. Именно морфолог должен хорошо ориентироваться в лабораторно-диагностических мероприятиях, ассоциированных с той или иной разновидностью опухолевого процесса, и обсуждать с лечащими врачами требования к индивидуальному забору материала.

На сохранность нуклеиновых кислот в биологическом образце могут оказывать влияние целый ряд факторов. Процессы аутолиза могут начинаться непосредственно с момента перевязки питающих артерий в ходе операции. Период после перевязки питающих артерий, в течение которого ткань остаётся в организме пациента (т.е. при температуре 37°C), называется временем тепловой ишемии. Его длительность значительно зависит от объёма операции, технических условий её проведения, а также навыков хирургической бригады. Для тканей мозга, молочной железы, кожи время тепловой ишемии, как правило, невелико, в то время как для лёгкого, желудка, щитовидной железы оно обычно варьирует от 30 минут до 1 часа. Время тепловой ишемии может не влиять на целостность РНК как таковую [10], но при этом отражаться на уровне экспрессии определённых генов. Например, Dash et al. [3] изучали влияние времени тепловой ишемии на ткань предстательной железы и идентифицировали несколько генов со статистически значимым увеличением экспрессии, наблюдаемым спустя 1 час после перевязки сосудов.

После хирургического удаления образец переносят из операционной в патологоанатомическую лабораторию для макроскопического исследования. Этот временной интервал зависит от внутренней организации операционного блока. Считается, что период от момента забора материала до его фиксации формалином не должен превышать 30 минут, однако в условиях реальной клинической практики его длительность иногда измеряется часами. Задержка фиксации может непредсказуемо влиять на результаты молекулярно-генетического исследования, особенно на уровень экспрессии РНК-транскриптов некоторых генов.

Фиксация тканей формалином необходима для предотвращения аутолитических процессов, возникающих в образце. Проникновение формалина в поверхность образца происходит достаточно быстро (1 мм/час), однако в более глубоких участках ткани фиксация наступает лишь спустя несколько часов. Оптимальное соотношение объёмов формалина и ткани должно со-

ставлять не менее 10:1 [6]. Минимальное время экспозиции в формалине фрагмента толщиной 3 мм составляет 6–8 часов [5].

Проводка тканей в спиртах восходящей плотности направлена на удаление воды из образца с последующим его насыщением парафином – эта процедура позволяет получать тонкие срезы, необходимые для визуализации гистологического препарата. Длительная проводка тканей обеспечивает лучшее качество РНК, а остаточная вода в тканях приводит к её гидролизу [2]. Следует отметить, что костные ткани перед проводкой в спиртах восходящей плотности обычно обрабатываются кислотой с целью декальцинации. Данная методика значительно повреждает нуклеиновые кислоты, поэтому материал из костей обычно не подходит для молекулярно-генетического анализа.

Биологические ткани являются сложными трёхмерными структурами и состоят из разных типов клеток. Поскольку интересующая исследователей группа клеток может представлять малую долю от общего объёма ткани, проблема клеточной гетерогенности являлась основным барьером на пути молекулярного анализа опухолевой и неопухолевой тканей. Именно поэтому техника тканевой микродиссекции является связующим звеном морфологии и молекулярного анализа. В целом, различные варианты диссекции могут применяться в отношении замороженных срезов, парафиновых блоков, а также цитологических препаратов. Продуктом микродиссекции являются скопления «очищенных» опухолевых клеток с минимальным загрязнением неопухолевыми ядерными элементами. Наиболее часто применяются либо ручная, либо лазерная микродиссекция – их сравнительные характеристики представлены в табл. 2.

Для ручной микродиссекции необходимы скальпели, микропрепарат с исследуемой тканью, микроскоп. Патолог исследует срез, окрашенный гематоксилином и эозином, и отмечает зоны с содержанием опухолевых клеток более 80%. Затем берут один или несколько срезов, непосредственно прилегающих к гематоксилин-эозиновому препарату. Микродиссекция выполняется посредством наложения неокрашенного среза поверх среза, окрашенного гематоксилином и эозином, после чего зоны опухолевых клеток соскабливаются со стекла. Количество срезов, предназначенных для диссекции опухолевых клеток зависит от потребностей молекулярно-генетического анализа. Обычно используют материал, полученный из 5-20 срезов толщиной 5 мкм. Если необходимо максимально предотвратить контаминацию образца неопухолевыми элементами, используют дополнительные манипуляции [1,4,8].

Таблица 1.
Пригодность архивного и свежемороженого материала для молекулярно-генетических исследований

Особенности	Ткани, заключённые в парафин	Свежемороженые ткани
Доступность	Высокая	Есть ограничения
Доступность полных клинических данных, включая сведения об отдалённых результатах лечения	Доступна ретроспективная клиническая информация	Есть ограничения
Возможности морфологической визуализации исследуемых участков опухоли	Достаточные	Есть ограничения
Возможности для диссекции опухолевых клеток	Достаточные	Есть ограничения
ДНК	Частично деградирована	Хорошая сохранность
РНК	Частично деградирована	Хорошая сохранность
Белки	Образование различных модификаций, утрата биологической активности	Хорошая сохранность; биологическая активность белков зачастую необратимо утрачивается в процессе заморозки, поэтому функциональный анализ ферментов требует работы со свежим материалом

Таблица 2.
Типы микродиссекции

Характеристики	Ручная микродиссекция	Лазерная микродиссекция
Минимальный размер образца	50-100 мкм	<1 мкм
Спектр использования	Крупные клеточные поля (>104 клеток)	Мелкие поля (<50 клеток), единичные клетки
Оборудование	Игла, скальпель	Микроманипулятор
Длительность процедуры	5-10 мин для >104 клеток	От нескольких секунд до 10 мин. для 1-10 клеток; получение большого количества клеток требует значительных трудозатрат
Стоимость	Низкая	Высокая
Преимущества	Простота, скорость	Высокая точность, низкий риск контаминации
Ограничения	Высокий риск контаминации, трудно использовать для опухолевых очагов (< 50 клеток)	Высокая стоимость

Считается, что каждая молекулярно-генетическая лаборатория может самостоятельно устанавливать минимальные требования к количеству и пропорции опухолевых клеток в образце. Многие методы, например секвенирование ДНК по Сэнгеру, требуют как минимум 50%-ого присутствия опухолевой ДНК в препарате. Более чувствительные разновидности молекулярно-генетического анализа, например аллель-специфическая ПЦР, позволяют работать с материалом, содержащим всего 1-10% трансформированных клеток, но подобные протоколы имеют ограничения в отношении спектра анализируемых генетических событий. Сведения о соотношении нормальных и опухолевых клеток должны быть исчерпывающим образом доведены до специалистов по молекулярной генетике – от этих данных зависит выбор метода исследования, и, следовательно, получение правильного результата [7]. Наши исследования демонстрируют, что именно ошибки микродиссекции являются основным источником погрешностей ДНК- и РНК-анализа [12].

Молекулярно-генетическая диагностика абсолютно совместима с транспортировкой архивных биологических образцов. Для обеспе-

чения сохранности материала его упаковывают в закрывающийся пластиковый пакет или в коробку с защитным наполнителем. Гистологические стёкла должны быть защищены плотной бумагой, либо находиться в специальных контейнерах. Температура при транспортировке не должна существенно превышать комнатную, иначе парафиновые блоки могут расплавиться. В большинстве случаев для выполнения молекулярного анализа необходим только один парафиновый блок с опухолевым материалом. В направлении на молекулярный анализ необходимо в обязательном порядке указывать идентификационные номера архивных препаратов. В случае одновременной транспортировки образцов от нескольких пациентов материал каждого больного укладывают в отдельную промаркированную коробку. Оптимальным для выполнения молекулярного анализа является предоставление комплекта, состоящего из одного парафинового блока с тканью опухоли и одного стекла – при этом подразумевается, что стекло получено непосредственно из этого блока и окрашено гематоксилином-эозином. Если ожидаются трудности с возвратом биологического материала, то вместо цельного парафинового блока можно

отправлять 5–10 серийных неокрашенных срезов опухоли (толщина 3–5 мкм), расположенных на непокрытых стёклах.

Наши работы убедительно показывают, что цитологический материал, как правило, также пригоден для всех разновидностей молекулярно-генетического анализа – как ДНК-, так и РНК-тестов [9]. Цитологические образцы могут быть представлены в виде окрашенных цитологических стёкол, цитоблоков, цитоспинов и т.д. Для проведения молекулярного тестирования обычно достаточно всего 1 стекла, содержащего не менее 50 опухолевых клеток [9]. В затруднительных ситуациях рекомендуется направлять на исследование несколько цитологических стёкол.

Таким образом, преаналитический этап молекулярного исследования в онкологии – многоэтапный комплексный процесс, требующий хорошего взаимодействия между хирургами, патологами и молекулярными генетиками.

Работа поддержана грантом РФФ 14-25-00111.

ЛИТЕРАТУРА

1. Camp R., Charette L., Rimm D. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma // *Lab Invest.* – 2000. – Vol. 80 (12). – P. 1943-1949.
2. Chung J., Braunschweig T., Williams R. et al. Factors in Tissue Handling and Processing That Impact RNA Obtained From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue // *J Histochem Cytochem.* – 2008. – Vol. 56 (11) . – P. 1033–1042.
3. Dash A., Maine I., Varambally S. et al. Changes in differential gene expression because of warm ischemia time of radical prostatectomy specimens // *Am J Pathol.* – 2002. – Vol. 161 (5) . – P. 1743-1748.
4. Goethals L., Perneel C., Debucquoy A. et al. A new approach to the validation of tissue microarrays // *J Pathol.* – 2006. – Vol. 208 (5) . – P. 607-614.
5. Goldstein N., Ferkowicz M., Odish E. et al. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma // *Am J Clin Pathol.* – 2003. – Vol. 120 (1). – P. 86-92.
6. Helander K. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue // *Biotech Histochem.* – 1994. – Vol. 69 (3) . – P. 177-179.
7. Leighl N., Rekhman N., Biermann W. et al. Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the study of lung cancer/association for molecular pathology guideline // *J Clin Oncol.* – 2014. – Vol. 32 (32) . – P. 3673-3679.
8. M seide K., Pintilie M., Kandel R., Hill R. Can sparsely and heterogeneously expressed proteins be detected using tissue microarrays? A simulation study of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX (CA IX) in human soft tissue sarcoma // *Pathol Res Pract.* – 2008. – Vol. 204 (3) . – P. 175-183.
9. Mitiushkina N., Iyevleva A., Poltoratskiy A. et al. Detection of EGFR mutations and EML4-ALK rearrangements in lung adenocarcinomas using archived cytological slides // *Cancer Cytopathol.* – 2013. – Vol. 121 (7). – P. 370-376.
10. Ohashi Y., Creek K., Pirisi L. et al. RNA degradation in human breast tissue after surgical removal: a time-course study // *Exp Mol Pathol.* – 2004. – Vol. 77 (2) . – P. 98-103.
11. Stanta G. Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues // Springer Berlin Heidelberg. – 2011. – P. 323.
12. Yanus G., Belyaeva A., Ivantsov A. et al. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients // *Med Oncol.* – 2013. – Vol. 30 (3). – P. 686.

Поступила в редакцию 25.12. 2015 г.

*A.O.Ivantsov, M.A.Kleshchev, O.V.Ivko,
N.V.Mityushkina, A.G.Ievleva, E.Sh.Kuligina,
E.N. Imyanitov*

Processing of morphological material for molecular genetic tests

N.N.Petrov Research Institute of Oncology
St. Petersburg

Molecular genetic analysis has become a mandatory component of cancer diagnostics. Preanalytical step for DNA and RNA analysis is a complex process requiring tight interaction between surgeons, pathologists and molecular geneticists. This article discusses key aspects of handling of the tissues before DNA- and RNA-testing.

Key words: molecular genetic analysis, microdissection, archival tissue