

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)
Отдел учебно-методической работы

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный педиатрический
медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России)
*Кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины
им. проф. Д.Д. Лохова*

**Иванцов А. О., Соколенко А. П., Шестакова А. Д.,
Рогачев М. В., Насыров Р. А., Имянитов Е. Н.**

Диссекция образцов перед молекулярно-генетическим тестированием

Учебное пособие

Санкт-Петербург
2023

УДК:616-006-076:575(07)

ББК:55.6я7

Иванцов А. О., Соколенко А. П., Шестакова А. Д., Рогачев М. В., Насыров Р. А., Имянитов Е. Н. Диссекция образцов перед молекулярно-генетическим тестированием: учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – Санкт-Петербург: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2023. – 56 с.

ISBN 978-5-6048250-0-6

Рецензент: кандидат медицинских наук, доцент Р. В. Деев, заведующий кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

В учебном пособии освещается роль основных методов диссекции (полный соскоб, мануальная макродиссекция, мануальная микродиссекция, лазерная микродиссекция, экспрессионная микродиссекция) перед молекулярно-генетическим тестированием, их преимущества и недостатки.

Учебное пособие предназначено для врачей-патологоанатомов, врачей-онкологов, для врачей, работающих с онкологическими больными, для научных сотрудников, участвующих в процессах изучения различных проблем злокачественных опухолей, а также для обучающихся в системе высшего образования (аспирантура, ординатура, специалитет) и дополнительного профессионального образования (повышение квалификации, профессиональная переподготовка).

Утверждено
в качестве учебного пособия
Ученым советом ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
протокол № 7 от 11 сентября 2023 г.

ISBN 978-5-6048250-0-6

©Иванцов А. О. Коллектив авторов, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Методы макродиссекции	9
1.1. Метод полного соскоба	9
1.2. Мануальная макродиссекция	15
Глава 2. Методы микродиссекции	23
2.1. Мануальная микродиссекция	23
2.2. Лазерная микродиссекция	28
2.3. Экспрессионная микродиссекция	31
Заключение	34
Приложение 1.	
Задачи патологоанатомического исследования микро- препарата перед молекулярным тестированием	35
Приложение 2.	
Алгоритм подготовки тканей парафиновых блоков для молекулярного анализа	40
Контрольные вопросы	42
Тестовые задания	43
Список литературы	48

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГХ	– иммуногистохимическое исследование
ЛПУ	– лечебно-профилактическое учреждение
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ЭВА	– этилен-винилацетат
MSI	– microsatellite instability (микросателлитная нестабильность)
NGS	– next generation sequencing (секвенирование нового поколения)

Введение

Персонализированный подход в медицине оказал существенное влияние на объём и качество патологоанатомических и молекулярно-генетических исследований, необходимых для диагностики онкологических заболеваний человека, предоставления клиническому онкологу предиктивной, прогностической информации для определения оптимальной стратегии лечения.

Поэтому биомолекулярное тестирование (геномика, транскриптомика, протеомика) из образцов удалённых тканей (заключённых в парафиновые блоки) в настоящее время является обязательным компонентом комплекса диагностических мероприятий [34, 48, 49].

Успехи фундаментальной онкологии и реальной клинической практики, внедрение таргетных противоопухолевых препаратов неизбежно привели, в том числе, к совершенствованию экстракции изучаемых веществ (нуклеиновых кислот, белков) из стандартных гистологических образцов (архивного материала патологоанатомических лабораторий).

В течение длительного времени роль прижизненной патологоанатомической диагностики существенно изменялась: от сухой прогностической констатации наличия злокачественных клеток до формирования объёма предиктивной информации необходимой для выбора стратегии лечения.

Патологоанатомы исследуют микропрепараты, полученные из свежезамороженных (срочные интраоперационные исследования) тканей или материала архивных блоков, окрашенных обзорными, гистохимическими, иммуногистохимическими окрасками с целью установления сущности патологического процесса [5, 53].

Парафиновые блоки легко хранить в архиве, с ними удобно работать, транспортировать, что делает их предпочтительным

субстратом для биомолекулярных исследований [21, 24].

Хотя известно, что фиксация формалином вызывает деградацию нуклеиновых кислот, новые способы экстракции способны преодолевать это техническое препятствие [14, 42, 45].

Установлено, что формалин вызывает сшивку и модификацию белков, что может быть исправлено высокотемпературной демаскировкой антигенов [9, 28].

Другие переменные: возраст образца, особенности процедуры выполнения срезов, условия хранения также оказывают влияние на качество и количество извлеченных анализов [7, 10].

Тем не менее, получение достаточного объёма материала для генетического теста из парафинового блока является вполне решаемой процедурой для большинства рутинных тестов [12, 55, 63].

Молекулярно-генетические исследования для пациентов с различными онкологическими заболеваниями выполняют для выявления чувствительности или резистентности опухоли к терапии, определения генетической предрасположенности к онкологическим заболеваниям. В зависимости от варианта генетического нарушения такие исследования выполняются с использованием различных методик: полимеразной цепной реакции, секвенирования по Сэнгеру, фрагментного анализа, секвенирования нового поколения (NGS).

Например, для пациентов с диагнозом рак лёгкого (одна из наиболее распространенных и злокачественных форм опухолей) в соответствии с современными клиническими рекомендациями лаборатория молекулярной онкологии выполняет панель основных генетических тестов: мутации в гене EGFR, BRAF, KRAS, транслокации с участием генов ALK, ROS1, RET, NTRK1, NTRK2, NTRK3, амплификации генов HER2, MET.

Для получения данной критически важной молекулярной

информации существуют различные подходы к обогащению конкретных опухолевых популяций способами диссекции тканей парафиновых блоков, каждый из которых оптимизирован для определенного типа анализа.

Ключевая цель диссекции тканей заключается в удалении любых ненужных неопухолевых элементов тканей с последующим извлечением ДНК, РНК или белков из желаемых областей, тем самым осуществляя обогащение интересующих молекул, гена.

Имеется пять способов диссекции тканей, используемых в рутинной деятельности или фундаментальных исследованиях:

- метод полного соскоба,
- мануальная макродиссекция,
- мануальная микродиссекция,
- лазерная микродиссекция,
- экспрессионная микродиссекция [19, 27, 37, 60].

Благодаря повышению прицельности и точности методы микродиссекции становятся всё более востребованными [19, 40].

Обычно срезы тканей представляют собой гетерогенные комплексы различных клеток, что приводит к более долгому и сложному обнаружению желаемых клеток. Например, микроокружение опухоли содержит множество иммунных клеток, фибробластов, стволовых клеток, сосудов, что приводит к достаточно низкому соотношению опухолевых/неопухолевых клеток [50].

При отсутствии процедуры обогащения процент злокачественных клеток по отношению к доброкачественным может оказаться настолько низким, что количество мутированного аллеля интересующего гена упадёт ниже предела возможностей обнаружения молекулярного метода [21].

Современные системы глубокого секвенирования имеют предполагаемый специфический для анализа минимальный лимит детекции – около 5%, что требует клеточности опухоли – не менее 10%, предполагая аллельную гетерозиготность биомаркера [11].

Рядом исследований установлено, что порог лимита детекции для однонуклеотидных вариантов составляет 3%, что требует, как минимум, 6% клеточности опухоли [51].

Следовательно, специфически захватывая только опухолевые клетки или, по крайней мере, обогащая их, оценка их ДНК в идеале позволит успешно идентифицировать драйверные мутации для эффективного лечения онкологических больных.

Глава 1. Методы макродиссекции

Макродиссекция ткани – вариант диссекции, выполняемый без использования микроскопа или специализированного оборудования. Макродиссекции обычно проводятся на структурно однородных срезах тканей. Например, достаточно чётко очерченные поля опухоли без необходимости обнаружения на большом увеличении микроскопа.

1.1. Метод полного соскоба

Полный соскоб тканей – самый простой метод диссекции. В ходе выполнения процедуры весь срез ткани удаляется с предметного стекла с помощью лезвия или скальпеля (рис. 1) [17, 37].

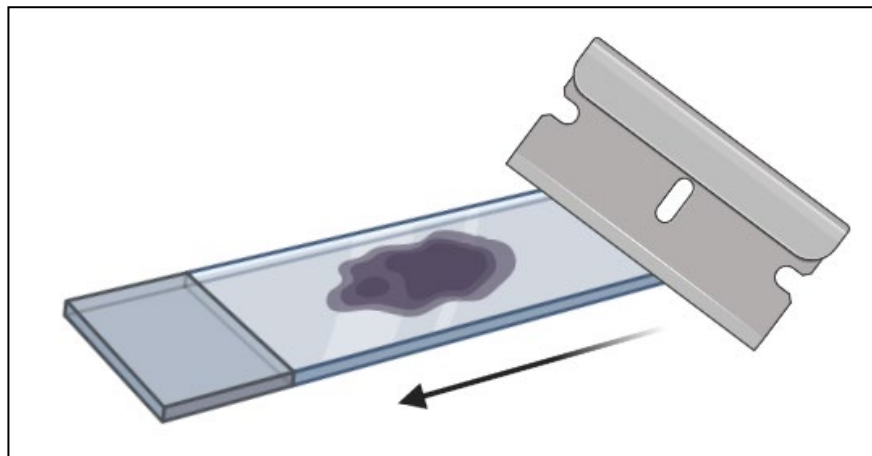


Рис. 1. Метод полного соскоба. 1 этап – лезвием бритвы весь срез ткани (в случае цитологического препарата – скопления клеток), расположенный на предметном стекле, соскабливается с поверхности.

В основном срезанный фрагмент прилипает к лезвию в результате электростатического взаимодействия, но гидростатические силы также могут оказывать влияние [33].

Тканевую скрученную «стружку» переносят в микроцентрифужную пробирку (тип эппендорф) для дальнейшей лабораторной химической обработки (рис. 2).

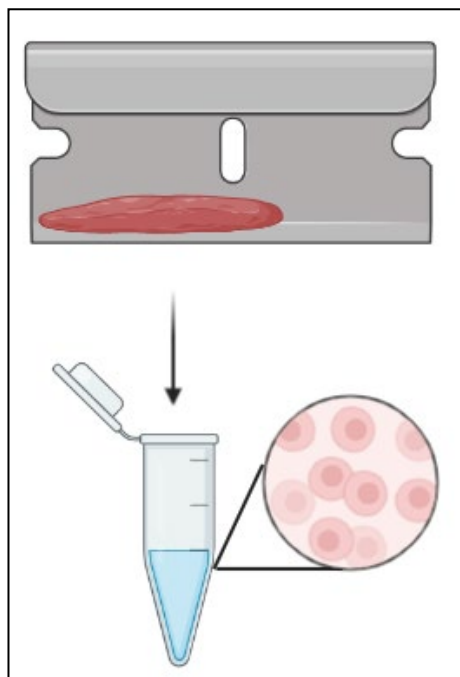


Рис. 2. Метод полного соскоба. 2 этап – удалённая ткань переносится с кромки лезвия бритвы в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей лабораторной обработки.

Некоторые лабораторные техники создают тканевую «стружку» непосредственно из парафинового блока, которую затем, вместо нанесения на предметное стекло, помещают в микроцентрифужную пробирку. Быстрые последовательные движения лезвия ножа санного микротомата без придерживания среза

ткани лаборантом приводит к их сворачиванию в длинную трубку, что облегчает перенос в пробирку.

В настоящее время этот метод является самым быстрым и дешёвым способом выделения клеточных структур из парафинового блока. Установлено, что наибольшее количество нуклеиновых кислот выделяется в результате использования именно этой процедуры [15, 35].

Тем не менее, для большинства востребованных молекулярно-генетических тестов в онкологической практике полный соскоб тканей имеет недостаточную точность и не является лучшим решением, если для исследуемого типа клеток (опухолевые клетки, клетки воспалительного ряда, элементы микроокружения) требуется дальнейшее обогащение [65].

Ещё недавно эта техника получения ДНК для тестирования мутаций в опухолях была широко распространена. В то же время увеличивается потребность в микродиссекции и анализе единичных или немногочисленных групп клеток [40].

Как правило, зачастую срезы тканей представлены гетерогенными структурами или имеют смешанное строение. А собрание всех присутствующих клеток в одну пробирку может скрыть искомую клеточную популяцию и исказить результат молекулярного исследования.

Одна из практических ситуаций, когда оправдано использование полного соскоба тканей – необходимость оценки качества ДНК, РНК, белка перед последующей микродиссекцией [41].

Поскольку сама микродиссекция может оказывать влияние на результат молекулярного теста, важно понять исходное качество исследуемого субстрата, прежде чем пытаться продолжить анализ.

Измерение качества ДНК или РНК, выделенных из клеточ-

ного лизата, может быть проведено методом спектрофотометрии с учетом определённых коэффициентов поглощения.

Метод полного соскоба ежедневно использовался в генетических лабораториях из-за отсутствия в штате генетической лаборатории врача-патологоанатома.

Достоверный результат молекулярного тестирования обеспечивался стечением ряда внешних обстоятельств:

1. Селекция биоматериала на предварительных этапах. 1 парафиновый блок, направляемый на молекулярно-генетическое исследование, как правило, содержит опухолевые клетки, т.к. его посмотрел и отобрал из всех блоков пациента врач-патологоанатом, ответственный за выдачу биоматериала в первом лечебном учреждении. Проблема состояла в том, что на последующих диагностических этапах, в других ЛПУ, с блока могли выполнять повторно срезы. Поэтому опухолевые структуры, расположенные очагами и неравномерно, могли быть изрезаны в блоке полностью.

2. Возможности молекулярных методов: например, для выполнения теста методом цифровой капельной ПЦР доля опухолевых клеток в общей массе может не превышать 1%. И, тем не менее, мутированная аллель будет успешно детектирована.

В настоящее время присутствует диагностическая необходимость обнаруживать единичные опухолевые клетки в образцах удалённых опухолевых очагов после неoadьювантной химиотерапии. Неoadьювантная системная терапия является ключевым методом лечения пациентов до проведения хирургического вмешательства. Выраженность ответа опухоли на неoadьювантную терапию является ключевым фактором оценки прогноза заболевания, эффективности проведённой терапии.

Достижение полного патологоанатомического ответа у пациенток с раком молочной железы является прогностическим фактором долгосрочного исхода со значительно лучшей безрецидивной и общей выживаемостью. Например, для определения выраженности лечебного эффекта химиотерапии в препаратах молочной железы осуществляется патологоанатомическое исследование ложа остаточной опухоли. Это трудоемкая процедура и обнаружение единичных опухолевых клеток на фоне воспалительных и фиброзных изменений может быть серьёзно затруднено.

Для идентификации опухолевого ложа используют радиологические клипсы, обнаруживаемые макроскопически или с помощью рентгенографии. Независимо от размера препарата молочной железы для реконструкции препарата выполняют тщательное картирование, используя фотографирование или создавая диаграмму.

В случаях, если резидуальная опухоль не обнаруживается, исследуют 1 полный поперечный срез-пластину (или 5 репрезентативных срезов для крупных опухолей) области, соответствующей размеру опухоли до лечения через каждый 1 см (1-2 см для крупных опухолей) с максимумом в 25 блоков. Использование ультрачувствительных молекулярных методов позволяет обнаруживать единичные клетки путём детекции драйверных мутаций (например, TP53 в BRCA1-ассоциированном раке молочной железы).

В этом случае взятие биоматериала с парафиновых блоков ложа опухоли выполняется методом полного соскоба, т.к. остаточные опухолевые клетки, если они присутствуют, обычно располагаются в виде инфильтрирующих тяжей, гнёзд и отдельно рассеянных клеток [3, 59].

В качестве материала для молекулярно-генетического исследования могут использоваться самые различные биологические образцы – ткань опухоли, кровь, цитологические мазки-отпечатки, выпотная жидкость и т. д. Использование цитологического материала и клеточных блоков для исследования мутаций гена EGFR в немелкоклеточном раке легкого оказывается успешным при условии применения чувствительных методов тестирования.

Цитологический материал пригоден для всех разновидностей молекулярно-генетического анализа – как ДНК-, так и РНК-тестов. Для проведения молекулярного тестирования может оказаться достаточно всего одного стекла, содержащего не менее 50 опухолевых клеток [2, 46]. И в этом случае взятие клеток с поверхности цитологического микропрепарата выполняется методом полного соскоба.

Необходимость второго мнения в оценке патологоанатомической картины редких злокачественных образований, использование пациентами права выбора медицинской организации в рамках программы государственных гарантий оказания бесплатной медицинской помощи, несоответствие патологоанатомического диагноза клинической картине и течению заболевания иногда может привести к необходимости проведения генетической экспертизы с целью установления принадлежности пациенту биологического материала (парафиновых блоков). В этом случае взятие биоматериала для генетического тестирования с исследуемых парафиновых блоков выполняется методом полного соскоба.

При подозрении на наличие в блоке пациента посторонних биологических включений выполняется микродиссекция всех интересующих участков (рис. 3) [32].

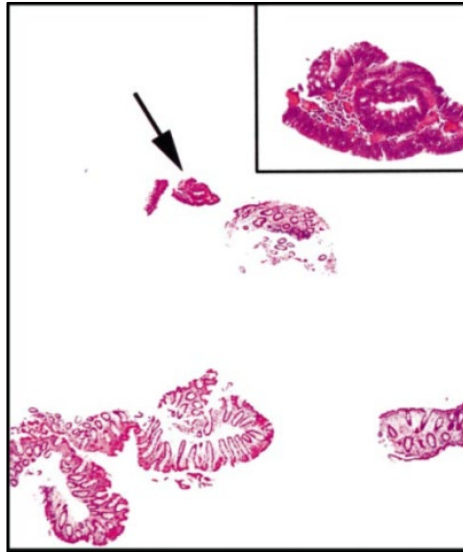


Рис. 3. Биоптаты слизистой оболочки толстой кишки, полученные в ходе плановой процедуры у пациента с хроническим язвенным колитом. Единичный отдельно лежащий фрагмент аденоматозного эпителия толстой кишки (стрелка и вставка), тогда как остальные фрагменты слизистой оболочки толстой кишки с воспалительной инфильтрацией с умеренной активностью (окраска гематоксилином-эозином, $\times 34$ и $\times 320$ [вставка]) (приводится по [32]).

1.2. Мануальная макродиссекция

Другим распространённым методом тканевой диссекции является мануальная макродиссекция. В отличие от полного соскоба тканей, собираются только зоны интереса, а не весь срез ткани.

В данном случае сначала патологоанатом исследует микропрепарат, окрашенный гематоксилином-эозином, очерчивает интересующий участок маркером с целью выделения основной

области обогащения исследуемой группы клеток. Как правило, это выполняется во время рутинной работы с исследуемыми образцами.

Затем размеченный слайд сопоставляется с неокрашенным срезом, расположенным на предметном стекле, после чего зоны интереса удаляются с неокрашенного микропрепарата с помощью лезвия бритвы или скальпеля (рис. 4) [25, 26, 52, 64].

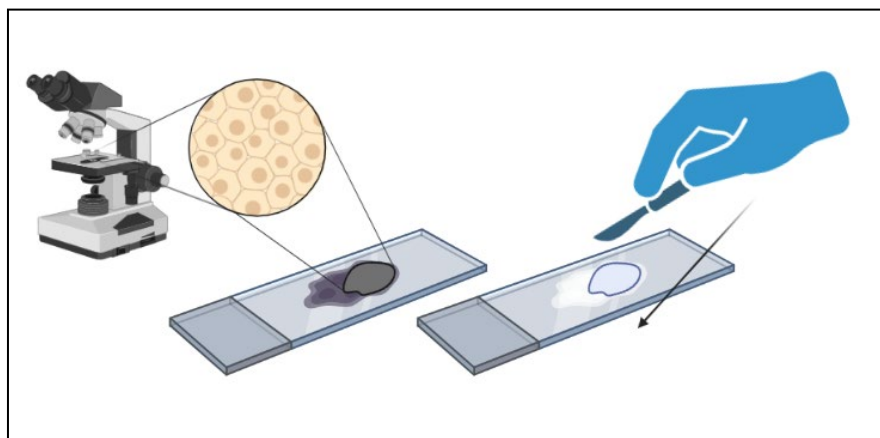


Рис. 4. Метод мануальной макродиссекции. 1 этап – на исследуемом срезе тканей, расположенном на предметном стекле, окрашенном гематоксилином и эозином, маркёром обозначается контур области с максимальным процентом опухолевых клеток. После чего таким образом размеченный микропрепарат сопоставляется с аналогичным серийным неокрашенным срезом на втором предметном стекле, на котором интересующая область удаляется лезвием скальпеля.

После этого удалённая ткань переносится в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей обработки (рис. 5).

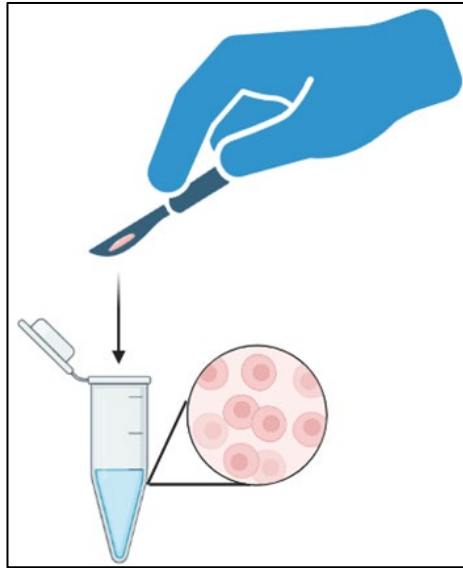


Рис. 5. Метод мануальной макродиссекции. 2 этап – удалённая ткань переносится с кромки лезвия ножа в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей лабораторной обработки.

Мануальная макродиссекция выполняется для большинства удалённых опухолей с достаточно четкими границами и высоким процентом опухолевых клеток по сравнению с неопухолевыми.

Использование этого метода позволяет избежать участков с низким «выходом» (например, зоны некроза), высокой примесью неопухолевых элементов (например, воспаление), прилежащих нормальных полей и участков с пониженной плотностью опухолевых клеток (области фиброза).

Как и полный соскоб тканей, этот метод быстрый, недорогой и генерирует большое количество нуклеиновых кислот. Вместе с тем необходимость патологоанатомического исследования перед диссекцией увеличивает стоимость процедуры,

время выполнения, риск влияния «человеческого фактора» [25, 26, 52, 64].

В референсных центрах парафиновые блоки поступают из других ЛПУ, поэтому рабочий процесс организован таким образом, чтобы вначале материал попал в лабораторию молекулярной онкологии.

После завершения диссекции блоки направляются в патологоанатомическую лабораторию для выполнения прижизненной патологоанатомической диагностики.

Таким образом, поступление материала в генетическую лабораторию, макродиссекция, передача в патологоанатомическое отделение происходит в течение 1 рабочего дня. Время на выполнение процедуры ограничено, а для повторных (если не нуклеиновые кислоты не выделились и т.д.) – не предусмотрено. В этом случае можно применить панч-метод (рис. 6).



Рис. 6. Метод мануальной макродиссекции. Панч-метод (приводится по [47]).

Патологоанатом исследует микропрепарат, маркирует области интереса, после чего инструментом для панч-биопсии извлекает из парафинового блока один или несколько столбиков ткани 1-3 мм диаметром (рис. 7).

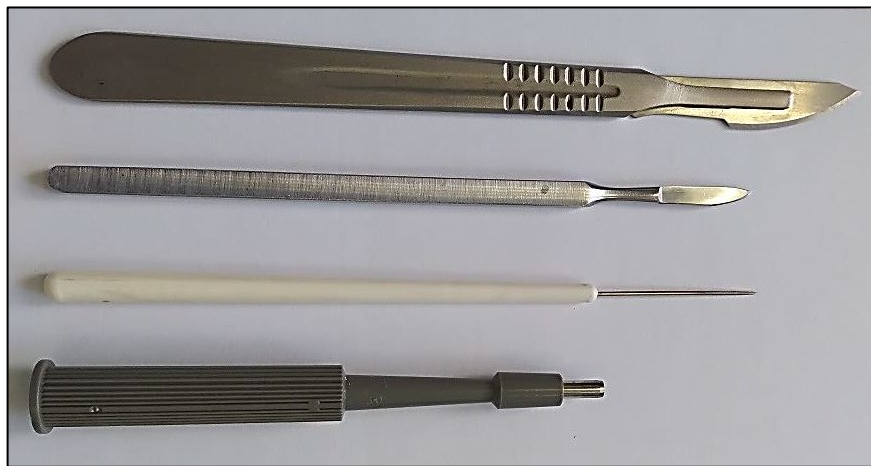


Рис. 7. Инструменты, необходимые для выполнения мануальной макро- и микродиссекции: скальпели, препаровальная игла, панчер.

Затем они могут быть перенесены в микроцентрифужную пробирку и направлены на дальнейшую лабораторную обработку, либо погружены в парафиновый блок-реципиент (рис. 8) с дальнейшей серийной экономной нарезкой на микротоме (рис. 9). В последнем случае материал остаётся доступен для повторного молекулярного и иммуногистохимического тестирования.

В ряде опубликованных научных работ приводятся сведения об эффективном использовании мануальной микродиссекции в исследованиях по оценке мутационного статуса BRAF у пациентов с метастатической меланомой [36], опухолей головного мозга [22].



Рис. 8. Исходный микропрепарат с обведённой зоной опухоли, блок-донор, блок-реципиент со столбиком опухолевой ткани 3 мм диаметром.

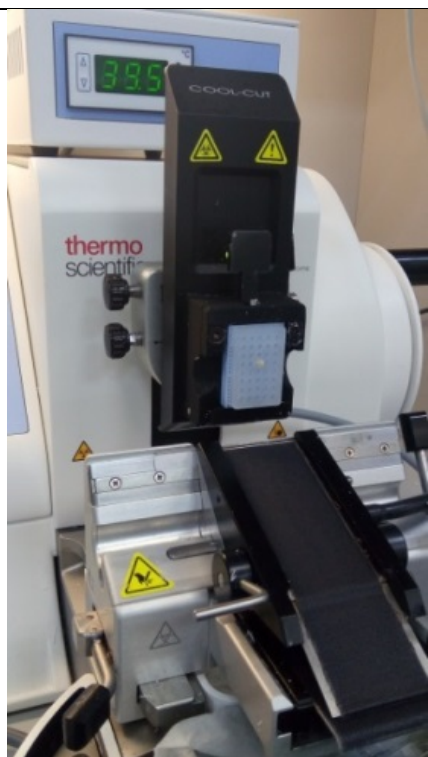


Рис. 9. Выполнение мануальной макродиссекции с использованием блока-реципиента со столбиком опухоли и ротационного микротомата.

J.R. Dijkstra et al. (2013) в серии экспериментов с клеточными линиями KRAS-мутированной колоректальной карциномы установили, что возможность обнаружения мутаций гена KRAS методами секвенирования по Сэнгеру, пиросеквенирования, ПЦР снижается при содержании опухолевых клеток в об-

разце в объеме $\leq 15\%$. А при достижении порога в 2,5% идентификация становится невозможной [16].

По этой причине определение процента опухолевых клеток в гистологических образцах перестаёт быть формальной процедурой. При том, что в рутинной диагностике возможности цифровой патологии малодоступны и определение клеточности выполняется визуально, «на глаз».

K. Dufraing et al. (2018) проанализировали варианты выделения патологоанатомами областей интереса маркёром. Было установлено 6 основных геометрических форм: большой круг, большой квадрат, географический контур опухоли, маленький круг (диаметр < 5 мм), маленький квадрат (сторона < 5 мм), прицельный контур опухоли (область отмечена пунктиром) (рис. 10) [18].

Диагностический порог в исследовании был выбран в 30% опухолевых клеток.

Патологоанатомы, которые использовали методы более точного разграничения (малый круг, малый квадрат, прицельный контур), делали более точные оценки процента опухолевых клеток, чем при использовании грубых методов (большой круг, большой квадрат, географический контур опухоли, полный соскоб стекла).

Авторы исследования отмечают, что большинство патологоанатомов определяют процент опухолевых клеток образца как отношение «опухолевые клетки/все клетки в области избранной для диссекции» (в области с максимальным скоплением опухолевых клеток).

К тому же лишь небольшая часть патологов тщательно указывала увеличения микроскопа, на которых выполнялось исследование, с описанием участков. Ещё реже производился прямой подсчёт клеток.

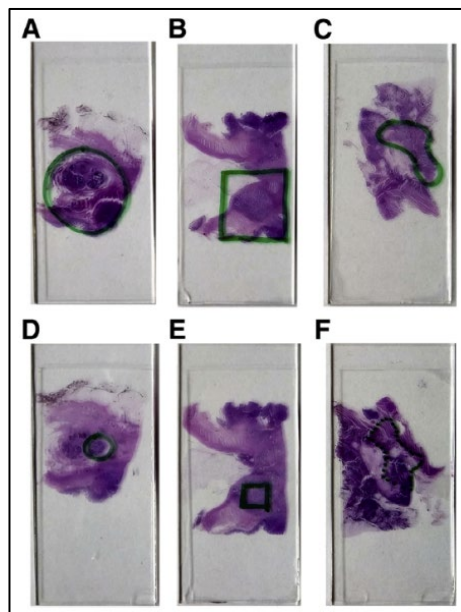


Рис. 10. Метод мануальной макродиссекции. Варианты выделения области интереса: большой круг (А), большой квадрат (В), географический контур опухоли (С), маленький круг (диаметр <5 мм) (D), маленький квадрат (сторона <5 мм) (E), прицельный контур опухоли (область отмечена пунктиром) (F) (приводится по [18]).

Специалисты стремились выбирать область диссекции с учётом степени выраженности воспалительной инфильтрации, типа опухолевого распространения (скопления клеток или разбросанное расположение), наличия десмопластической стромы, некрозов, слизи, жировой ткани. По мнению авторов, внимательное определение процента опухолевых клеток в первую очередь способствует снижению количества ложно-негативных результатов [18].

Глава 2.

Методы микродиссекции

Микродиссекция тканей – способ диссекции, выполняемый с помощью микроскопа и специализированного оборудования. Микродиссекции обычно выполняется на тканях смешанного строения или выраженной гетерогенностью, а также небольших, определенных областях/функциональных единицах (например, клубочки почки).

2.1. Мануальная микродиссекция

Потребность совершенствования методов микродиссекции вследствие неоднородности тканей была обозначена в 1970-х годах О.Н. Lowry et al. (1971) [33].

Мануальная микродиссекция в целом похожа на метод мануальной макродиссекции. Главным отличием является использование микроскопа.

Может быть применён либо составной микроскоп, либо стереомикроскоп. Последний имеет дополнительные преимущества, связанные с большим пространством для перемещения рук и неинвертированным полем зрения [33].

В ходе данной процедуры ранее идентифицированные зоны интереса удаляют путем аккуратного соскабливания иглой, скальпелем или наконечником пипетки (рис. 11).

Затем удалённую ткань переносят в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей лабораторной обработки (рис. 12) [44].

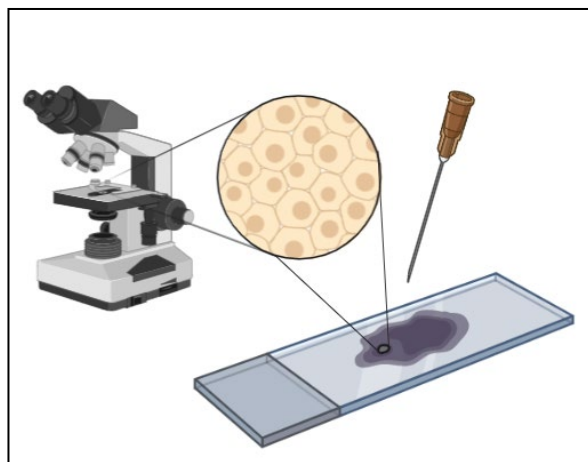


Рис. 11. Метод мануальной микродиссекции. 1 этап – на предварительно исследованном срезе тканей, расположенном на предметном стекле, области интереса удаляются иглой со среза под контролем световой микроскопии.

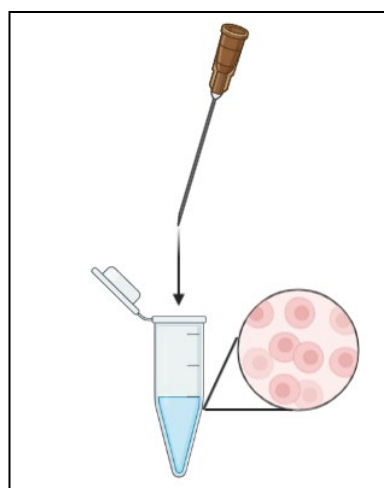


Рис. 12. Метод мануальной микродиссекции. 2 этап – удалённая ткань переносится со среза иглы в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей лабораторной обработки.

Этот метод гораздо более точен, чем два выше рассмотренных способа, поскольку могут быть извлечены конкретные микроскопические тканевые структуры с определёнными архитектурными признаками. В результате такой точности опухолевая ДНК в образцах с высокой степенью гетерогенности может быть обогащена, тем самым преодолевая пределы возможностей макродиссекции.

Данная техника также остается недорогой, поскольку для её проведения не требуется особого специализированного оборудования. Однако клеточный уровень прецизионности (с точностью до клетки) данным методом не достигается. Кроме того, микродиссекция приводит к нарушению целостности исследуемой ткани, что затрудняет проверку точности исполнения процедуры [19]. Определённый компромисс в этом вопросе достигается использованием автоматических режущих инструментов с электронным управлением (например, система AVENIO Millisect System) [25, 52]. Однако эти методы, как правило, являются трудоемкими и требуют некоторой квалификации патологоанатома.

Р.М. Lokhandwala et al. (2019), анализируя онкогенные мутации в меланомах для мануальной микродиссекции, применяли Pinpoint Slide DNA Isolation System (Zymo Research) (рис. 13).

Данный оригинальный подход включает использование коммерческого раствора, который при нанесении на микропрепарат соединяется (сливается) с тканью среза, расплавляя зоны интереса. Кроме того, он представляет транспортировочную среду, которая вместе с необходимыми клетками может быть перенесена в микроцентрифужную пробирку [43].

Мануальная микродиссекция обычно предусматривается для случаев с низким процентом содержания опухолевых клеток в гистологическом образце.

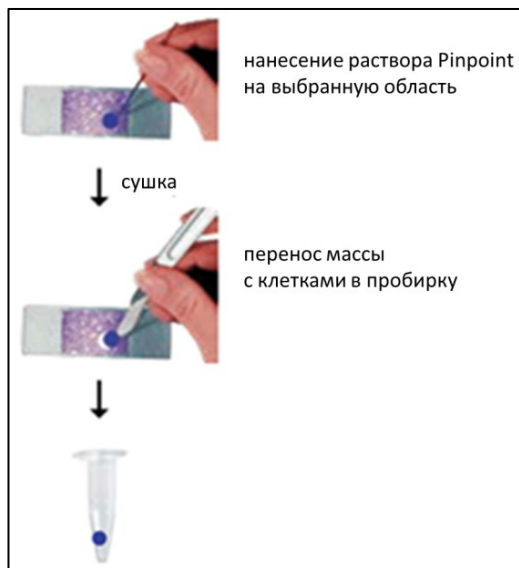


Рис. 13. Метод мануальной микродиссекции с применением Pinpoint Slide DNA Isolation System (приводится по [47]).

Например, N.M. Ardakani et al. (2016) использовали мануальную макродиссекцию для аденокарциномы лёгких с процентом опухолевых клеток $>50\%$ и применяли мануальную микродиссекцию для образцов $<50\%$. В 474 из 493 исследованных образцов наблюдалась достаточная клеточность опухоли для секвенирования гена EGFR (секвенирование Cobas 4800 EGFR Mutation Test и секвенирование по Сэнгеру) [6].

S. Roy-Chowdhuri et al. (2015) изучали молекулярный статус PIK3CA и AKT1 в опухолях молочной железы. Для образцов с клеточностью опухоли $>20\%$ использовали мануальную макродиссекцию, для остальных – мануальную микродиссекцию [56].

Минимальный порог диссекции – соотношение опухоль/не-опухоль существенно варьирует для разных клинических ситуаций. Практические рекомендации по лекарственному лечению

немелкоклеточного рака лёгкого предусматривают для EGFR-позитивных больных при прогрессировании на фоне таргетной терапии тирозинкиназными ингибиторами первого и второго поколений выполнение повторных биопсий с определением мутации вторичной резистентности T790M с помощью молекулярно-генетического исследования.

Обновлённое руководство для генетических лабораторий по селекции больных раком лёгкого для лечения ингибиторами тирозинкиназ Американского колледжа патологоанатомов рекомендует использовать тест-системы для обнаружения мутаций гена EGFR в образцах с содержанием опухолевых клеток 20%, а для EGFR T790M как минимум в 5% жизнеспособных клеток [39].

Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки, ректосигмоидного соединения и прямой кишки указывают, что при исследовании биопсийного материала на наличие микросателлитной нестабильности (MSI) методом ПЦР необходимо оценить содержание опухолевых клеток в образце (их должно быть не менее 50 %) [4].

Межрегиональная организация молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии подчёркивает, что риск пропустить MSI в раке эндометрия увеличивается в случаях исследования образца с содержанием опухолевой ткани 20 % и менее, при выраженной инфильтрации лимфоцитами, при сочетании инвазивного рака и атипической гиперплазии. При невозможности оптимальной диссекции (не менее 50 %) – рекомендация отказаться от проведения исследования молекулярно-генетическим методом [1].

Инструкция сервиса геномного профилирования всех солидных опухолей FoundationOne®CDx предусматривает для гистологического образца оптимальный порог – 30% опухолевых

клеток, минимальный – 20% [23].

A. Smits et al. (2014) изучали воспроизводимость разными патологами оценки процента опухолевых клеток в гистологических образцах. Избранный минимальный диагностический порог для тестирования составлял 20% опухолевых клеток. Оказалось, что в трети наблюдений (38%) с низким содержанием опухолевых клеток (менее 20%) патологоанатомы субъективно оценивали их как $\geq 20\%$. В качестве референса в исследовании применялся прямой подсчёт клеток. Таким образом, авторами подтверждается ключевая опасность при визуальной оценке в преувеличении специалистами соотношения опухоль/неопухоль, что неизбежно приведёт к ложно-негативным результатам генетического тестирования [58].

2.2. Лазерная микродиссекция

Лазерная захватывающая микродиссекция – метод диссекции тканей, применяемый в фундаментальных, поисковых исследованиях. В данном случае режущим инструментом для удаления зон интереса, отдельных клеток с необходимыми характеристиками из среза ткани под микроскопической навигацией выступает инфракрасный или ультрафиолетовый лазерный луч (рис. 14).

Системы лазерной микродиссекции производятся несколькими производителями. Основными компонентами данного прибора являются: инвертированный микроскоп, источник лазерного излучения, блок управления лазерным лучом, механизм управления столиком микроскопа, цифровая камера и монитор для визуализации цели.

Технологии изоляции выбранной области среза ткани в подобных системах обладают рядом особенностей.

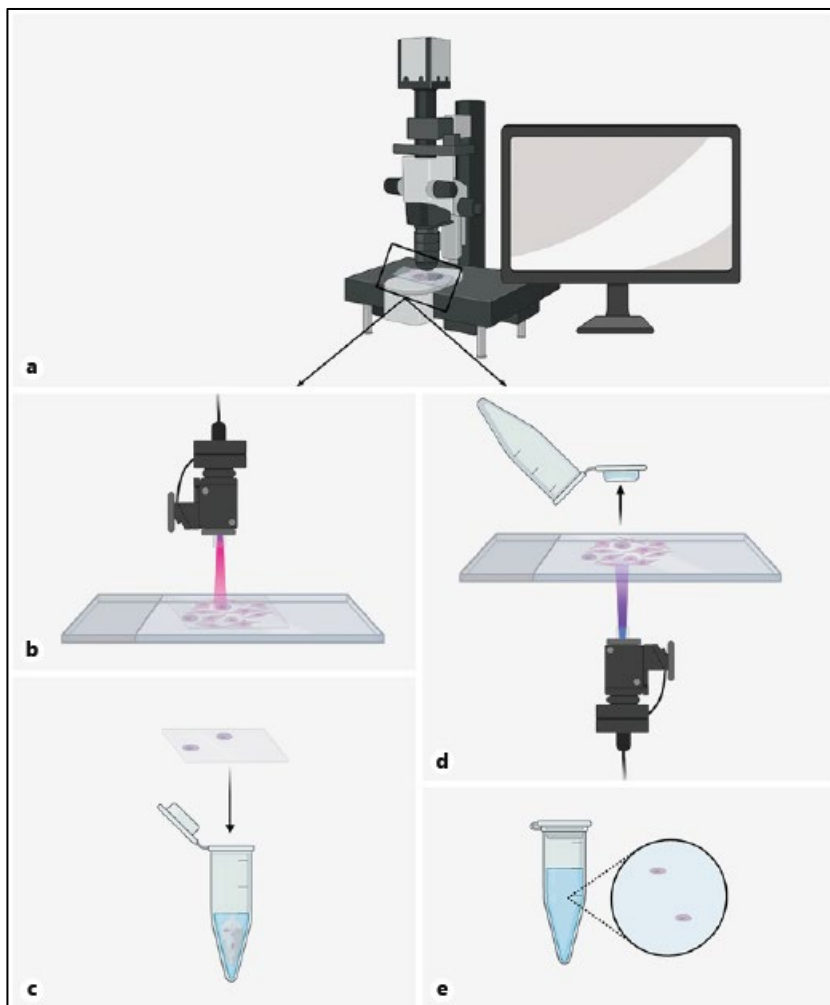


Рис. 14. Метод лазерной микродиссекции. Области интереса выделяются с помощью установленной на микроскоп цифровой камеры (а). Для инфракрасной лазерной микродиссекции необходимые клетки избирательно прилипают к мембране, которая переносится в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей лабораторной обработки (b, c). Для ультрафиолетовой лазерной микродиссекции необходимые клетки вырезаются из среза ткани и отлетают в крышку пробирки (d, e) (приводится по [62]).

В некоторых системах (например, Arcturus, ThermoFisher Scientific, США) инфракрасный лазерный луч используется для расплавления специальной термопластической пленки из этилена-винилацетата (ЭВА) на ткани, тем самым позволяя приподнять выделенный участок, встроенный в полимер, для перенесения в микроцентрифужную пробирку. Адгезия клеток к пленке ЭВА превосходит по силе их адгезию к предметному стеклу, позволяя удалять интересующие области вместе с плёнкой, оставляя при этом оставшуюся окружающую ткань нетронутой [61].

В других системах (например, Leica Microsystems, Германия) реализуется бесконтактный перенос образца – после лазерной диссекции ткань попадает в пробирку только под действием силы тяжести.

В третьих системах (например, PALM Zeiss, Германия) срезы тканей помещают на специальные мембраны или предметные стёкла со специальным покрытием, а лазер применяют для вырезания материала, расположенного за пределами выбранного участка. Затем участок ткани (в некоторых случаях с мембраной) непосредственно помещают в пробирку для последующего молекулярного анализа. Важно учитывать, что продолжительность процедуры микродиссекции $0,5\text{-}1\text{мм}^2$ ткани 1 образца на PALM® Micro Beam microscope (P.A.L.M Microlaser Technologies AG) занимает 30-120 мин [13].

Использование машинного обучения может быть эффективным при определении областей интереса, уменьшая длительность процедуры и снижая субъективизм специалиста. Например, алгоритм Spatially Invariant Vector Quantization (SIVQ) продемонстрировал определённую точность в программном продукте для системы лазерной микродиссекции, увеличив пропускную способность метода [30, 31].

Тем не менее, оборудование для лазерной диссекции, специальные расходные материалы делают стоимость процедуры запредельной для рутинного применения.

2.3. Экспрессионная микродиссекция

Оригинальная форма диссекции тканей – экспрессионная микродиссекция – была впервые представлена М.А. Tangrea et al. в 2004 году [60]. Для этого способа срез ткани сначала окрашивают иммуногистохимическим методом (ИГХ) для выделения искомого типа клеток или вещества, представляющего интерес.

Таким образом, для формирования областей интереса используются предопределённые тканевые и клеточные характеристики. Затем срез ткани покрывается ЭВА плёнкой, а иммуногистохимически окрашенные клетки приклеиваются к плёнке в результате воздействия лазера или мощной фотовспышки. В отличие от лазерной микродиссекции облучается весь срез ткани целиком, что позволяет ЭВА-плёнке избирательно расплавляться непосредственно над пигментированными (ИГХ) клетками.

Пигментированные клетки преобразуют световую энергию в тепловую, поэтому связывание ЭВА-плёнки с необходимыми клетками происходит сильнее, чем соединение остальных клеток, расположенных на срезе. Далее, во время удаления плёнки происходит их перенос со стекла. В завершение процесса плёнка помещается в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей лабораторной обработки (рис 15, 16) [38, 51, 60]. Плёнка ЭВА, используемая для экспрессионной микродиссекции, в отличие от лазерной, не содержит светопоглощающего красителя [60].

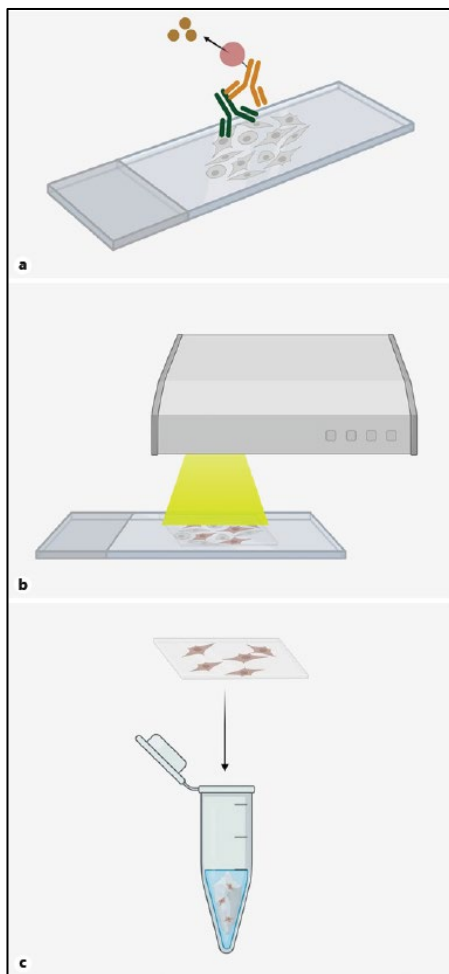


Рис. 15. Метод экспрессионной микродиссекции. Области интереса выделяются иммуногистохимически. Первичное и вторичное антитело связываются молекулой, которая присутствует в изучаемых клетках, а окрашивание производится с помощью пероксидазы хрена (а). Окрашенные клетки привариваются к мембране под влиянием мощной фотовспышки (б). Мембрана с окрашенными клетками переносится в микроцентрифужную пробирку для дальнейшей лабораторной обработки (с) (приводится по [62]).

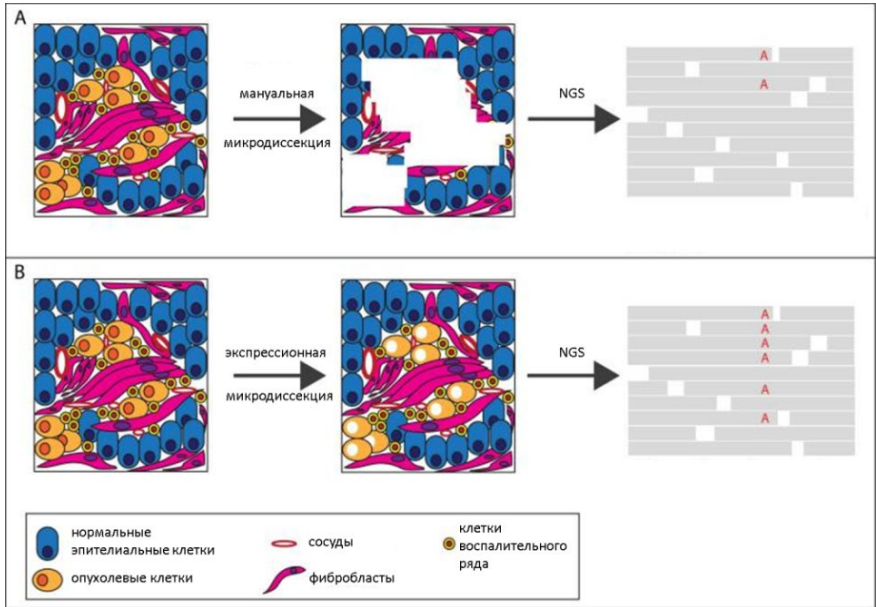


Рис. 16. Влияние выбора микродиссекции (экспрессионная и мануальная) на результат данных NGS (приводится по [54]).

Эта особенность материала обеспечивает возможность фокального плавления ЭВА только на пигментированных клетках [29].

Преимущества экспрессионной микродиссекции заключаются в сочетании скорости и точности, а также исключении возможного влияния человеческого фактора.

Заключение

Определение морфологии новообразований является одной из необходимых задач диагностики онкологических заболеваний человека. В настоящее время геномика, транскриптомика и протеомика определенных клеток, а не всего объема опухолевой ткани, стали ключом к пониманию основных механизмов злокачественной трансформации.

Экстракция желаемых молекул, нуклеиновых кислот из легкодоступных тканей парафиновых блоков, позволяет выполнять востребованные молекулярные тесты. Методы получения биоматериала охватывают диапазон от полного соскоба крупных областей интереса до отдельных клеток.

По мере того, как мы продвигаемся вперед и лучше понимаем генетические вариации, которые управляют злокачественными новообразованиями, совершенствование методов диссекции позволяет получить репрезентативный молекулярный материал и достоверный генетический результат, который необходим каждому онкологическому пациенту.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Задачи патологоанатомического исследования микропрепарата перед молекулярным тестированием

Патологоанатомическое исследование микропрепарата перед молекулярным тестированием включает исследование параметров, оказывающих влияние на результаты генетического анализа:

- 1) определение соответствия гистологического типа опухоли назначенному тесту,
- 2) определение соотношения опухоль/не опухоль для оценки чувствительности молекулярного теста,
- 3) оценку репрезентативности присланного микропрепарата,
- 4) оценку адекватности гистологической обработки образца,
- 5) оценку сопутствующих патологических процессов, затрудняющих молекулярное профилирование,
- 6) оценку выраженности внутриопухолевой гетерогенности (рис. 17-22).

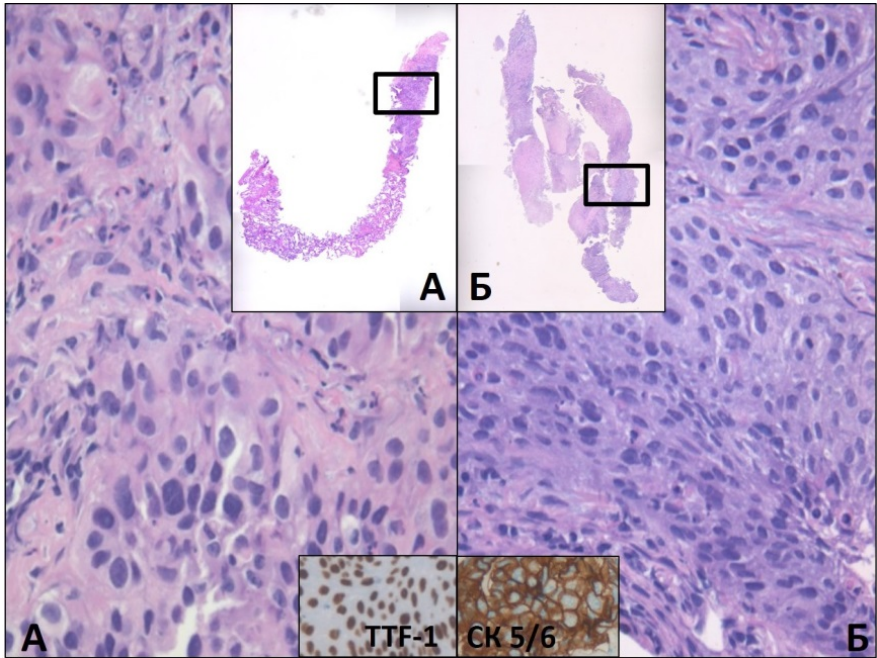


Рис. 17. Определение соответствия гистологического типа опухоли назначенному тесту в биоптатах лёгкого:

А) немелкоклеточная карцинома солидного строения (окраска гематоксилином-эозином, $\times 400$), TTF1 – положительная ядерная экспрессия ($\times 400$), иммунофенотип соответствует аденокарциноме;

Б) немелкоклеточная карцинома солидного строения (окраска гематоксилином-эозином, $\times 400$), CK5/6 – положительная цитоплазматическая экспрессия ($\times 400$), иммунофенотип соответствует плоскоклеточной карциноме.

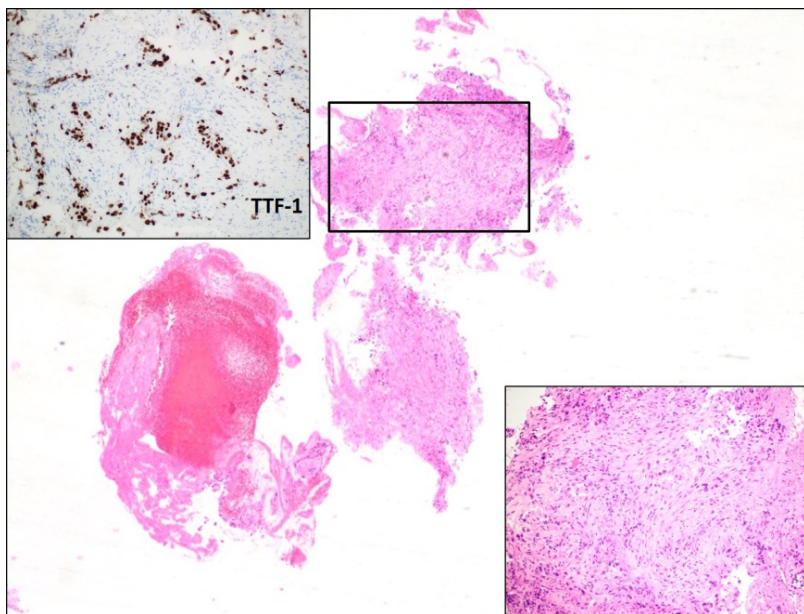


Рис. 18. Определение соотношения опухоль/не опухоль в биоптате лёгкого (окраска гематоксилином-эозином, $\times 25$) с помощью иммуногистохимического исследования TTF1 ($\times 400$).

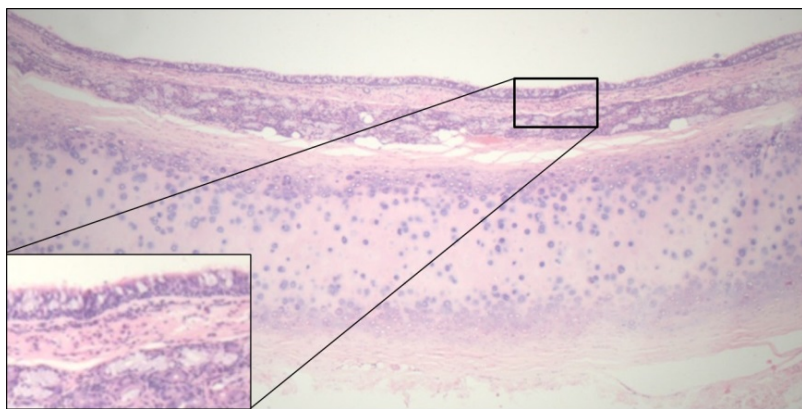


Рис. 19. Оценка репрезентативности присланного микропрепарата. Фрагмент стенки бронха (окраска гематоксилином-эозином, $\times 25$), выстлан респираторным эпителием типового строения ($\times 400$). Опухолевые клетки отсутствуют (материал не пригоден для молекулярного тестирования).

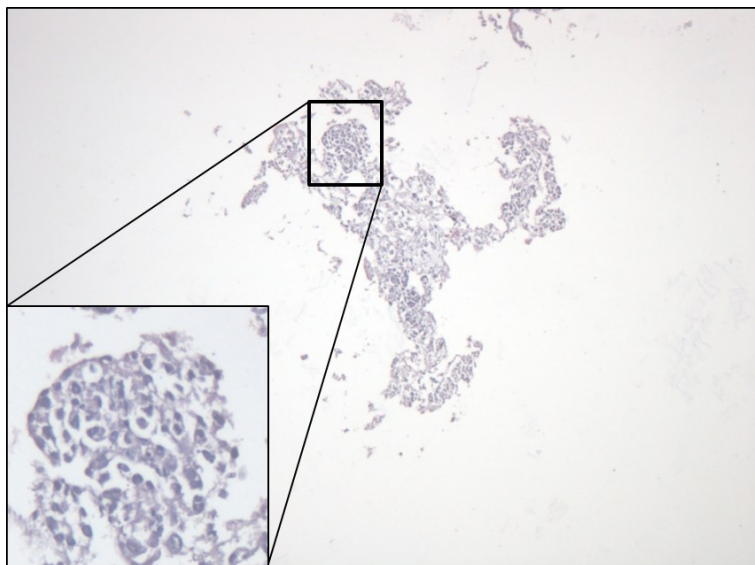


Рис. 20. Оценка адекватности гистологической обработки образца. Биоптат слизистой оболочки бронха (окраска гематоксилином-эозином, $\times 25$) с артефактами проводки и окрашивания.

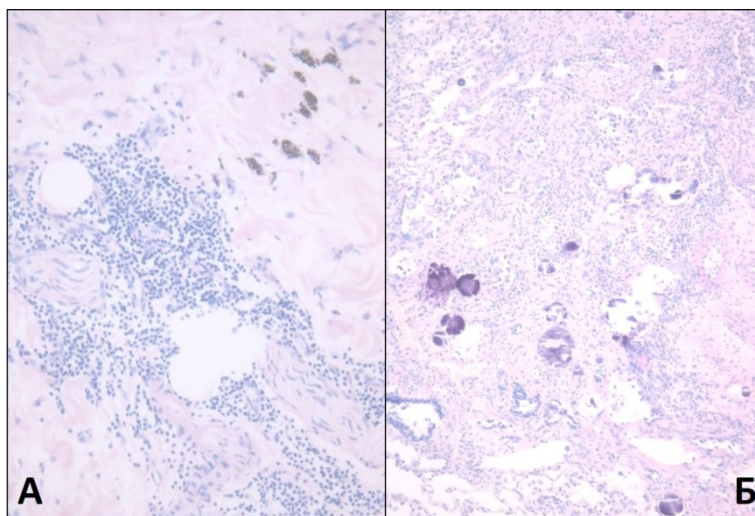


Рис. 21. Оценка сопутствующих патологических процессов, затрудняющих молекулярное профилирование. Фрагмент ткани

яичника после неoadьювантной химиотерапии:

А) с выраженной очаговой лимфомакрофагальной инфильтрацией, фиброзом (окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$),

Б) с очагами некрозов, псаммомными тельцами, единичными структурами серозной карциномы высокой степени злокачественности (окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$).

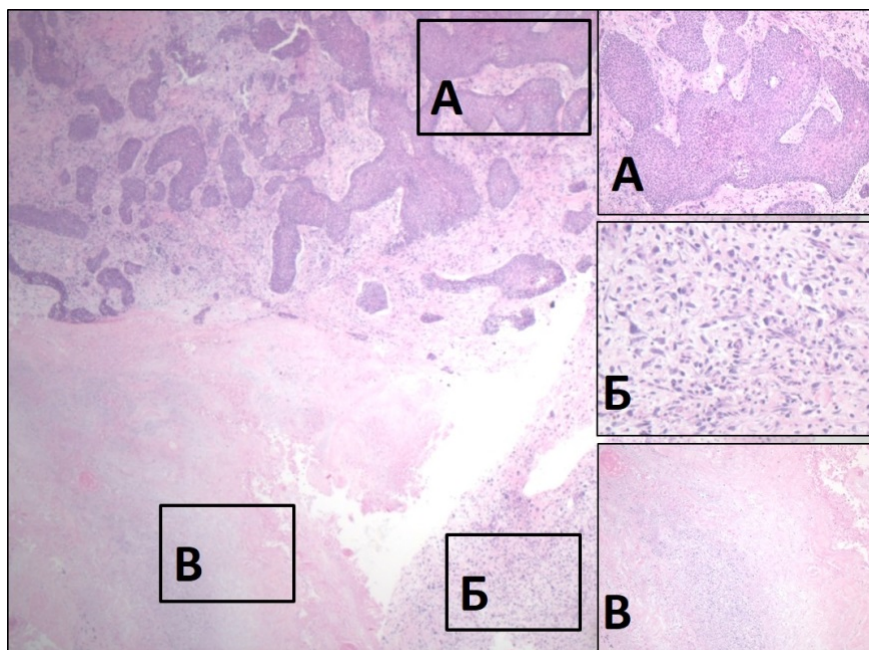


Рис. 22. Оценка выраженности внутриопухолевой гетерогенности. Саркоматоидная карцинома лёгкого (окраска гематоксилином-эозином, $\times 25$):

А) плоскоклеточный компонент опухоли (окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$),

Б) веретеноклеточный компонент опухоли (окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$),

В) поля некрозов (окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$).

**Алгоритм подготовки тканей
парафиновых блоков для молекулярного анализа**

Реагенты
100% этанол
Ксилол
Вода, свободная от РНКаз
Расходные материалы
Непокрытые, незаряженные стёкла
Стерильные перчатки
Одноразовые лезвия для микротомы
Фен

1. Приготовьте все образцы, реагенты, микропробирки.
2. Перед началом работы очистите (протрите) рабочее место, используя чистые стерильные перчатки:
 - А. Уберите все частицы парафина и обрывки срезов тканей с рабочей поверхности вначале феном, затем протрите ксилолом.
 - Б. Протрите все инструменты 100% этанолом (пинцеты, пре-паровальные иглы, скальпели, карандаши и т.д.).
 - В. Замену лезвий на микротоме производите после каждого блока или, как минимум, при смене материала после каждого пациента. Если используются несъёмные лезвия, то проводите их последовательную очистку ксилолом, затем 100% этанолом, в завершение – деионизированной водой.
 - Г. Очистите водяную баню водой, свободной от РНКаз, и наполните деионизированной водой.
3. Сделайте достаточное количество срезов с каждого блока, используя чистые перчатки и чистые инструменты.
 - А. Толщина срезов должна быть 5-10 мкм.
 - Б. Используйте стандартные непокрытые, незаряженные стекла.
 - В. Для лазерной микродиссекции необходимо использовать стёкла, рекомендуемые производителем оборудования.

Г. Немедленно смахивайте с рабочей зоны все неиспользуемые срезы с помощью фена.

Д. Для предотвращения аэрозольной контаминации разговоры должны быть сведены к минимуму.

4. В случае сворачивания срезов в трубки помещайте их в маркированные микропробирки в соответствии с установленным порядком.

5. Очистка рабочей поверхности проводится после работы с каждым блоком. Замена перчаток должна происходить через каждые 5 блоков (если блоки от 1 пациента) или каждый раз при смене пациента.

6. Стекла со срезами используйте как можно скорее. Допускается хранение при комнатной температуре. Не проводите деаэрафикацию среза до процедуры микродиссекции.

Подготовка к микродиссекции требует соблюдения определённых правил, что позволяет избежать загрязнения ткани или ДНК во время работы. Необходимо соблюдать меры предосторожности на рабочем столе: очищать рабочее место и инструменты, выполнять замену одноразовых перчаток и лезвий между процедурами диссекций отдельных образцов. Необходимо учитывать тип фиксирующего раствора.

Срезы должны быть приготовлены с соблюдением мер предосторожности, чтобы минимизировать риск контаминации соседними образцами. Лаборанты-гистологи должны следовать протоколу изготовления срезов для молекулярного анализа с целью обеспечения минимального риска загрязнения. Срезы, приготовленные для молекулярного тестирования, могут храниться при комнатной температуре.

Для избегания перекрестного загрязнения стёкла транспортируют и хранят в контейнерах с раздельным расположением микропрепаратов.

Контрольные вопросы

1. Предмет исследования молекулярно-генетического анализа.
2. Типы биологических образцов, которые могут использоваться в качестве материала для молекулярно-генетического исследования.
3. Способы получения материала для молекулярно-генетического исследования.
4. Спектр использования макродиссекции.
5. Спектр использования микродиссекции.
6. Оборудование для мануальной микродиссекции.
7. Оборудование для лазерной микродиссекции.
8. Длительность процедуры мануальной микродиссекции.
9. Меры предосторожности при выполнении мануальной микродиссекции.
10. Длительность процедуры лазерной микродиссекции.
11. Преимущества метода полного соскоба.
12. Ограничения метода полного соскоба.
13. Преимущества мануальной макродиссекции.
14. Ограничения мануальной макродиссекции.
15. Преимущества мануальной микродиссекции.
16. Ограничения мануальной микродиссекции.
17. Преимущества лазерной микродиссекции.
18. Ограничения лазерной микродиссекции.
19. Преимущества экспрессионной микродиссекции.
20. Ограничения экспрессионной микродиссекции.
21. Возможности использования цитологических препаратов для генетического анализа.
22. Требования к минимальному количеству клеток в цитологическом препарате, необходимых для проведения тестирования.
23. Принципы работы систем лазерной микродиссекции.
24. Задачи патологоанатомического исследования микропрепарата перед молекулярным тестированием.
25. Алгоритм подготовки тканей парафиновых блоков для молекулярного анализа.

Тестовые задания

Инструкция: выберите один или несколько правильных ответов

1. Предмет исследования молекулярно-генетического анализа

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	хромосомальная ДНК	+
б	РНК	+
в	клетка	
г	ткани	

2. Какие биологические образцы могут использоваться в качестве материала для молекулярно-генетического исследования

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ткань опухоли	+
б	кровь	+
в	цитологические мазки-отпечатки	+
г	выпотная жидкость	+

3. Минимальный размер образца для мануальной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	5-10 мкм	
б	10-50 мкм	
в	50-100 мкм	+
г	100-500 мкм	

4. Минимальный размер образца для лазерной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	< 1 мкм	+
б	5-10 мкм	
в	10-50 мкм	
г	50-100 мкм	

5. Спектр использования мануальной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	единичная клетка	
б	мелкие поля клеток (< 50 клеток),	
в	средние клеточные поля (50-1000 клеток)	
г	крупные клеточные поля (> 10 ⁴ клеток)	+

6. Спектр использования лазерной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	единичная клетка	+
б	мелкие поля клеток (< 50 клеток),	+
в	средние клеточные поля (50-1000 клеток)	
г	крупные клеточные поля (> 10 ⁴ клеток)	

7. Оборудование для мануальной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	игла	+
б	скальпель	+
в	бритва	
г	микроманипулятор	

8. Оборудование для лазерной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	игла	
б	скальпель	
в	бритва	
г	микроманипулятор	+

9. Длительность процедуры мануальной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	5-10 секунд	
б	5-10 минут	+
в	15-30 мин	
г	30-60 мин	

10. Преимущества мануальной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	простота	+
б	скорость	+
в	высокая точность	
г	низкий риск контаминации	

11. Преимущества лазерной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	простота	
б	скорость	
в	высокая точность	+
г	низкий риск контаминации	+

12. Ограничения мануальной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	высокий риск контаминации	+
б	неприменимость для мелких объектов	+
в	неприменимость для крупных объектов	
г	высокая стоимость процедуры	

13. Ограничения лазерной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	высокий риск контаминации	
б	неприменимость для мелких объектов	
в	неприменимость для крупных объектов	
г	высокая стоимость процедуры	+

14. Минимальный процент присутствия опухолевой ДНК в препарате, необходимый для секвенирования ДНК по Сэнгеру

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	как минимум 5%	
б	как минимум 10%	
в	как минимум 50%	+
г	как минимум 90%	

15. Минимальный процент присутствия опухолевой ДНК в препарате, необходимый для аллель-специфической ПЦР

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	0,1-1%	
б	1-10%	+
в	10-50%	
г	как минимум, 90%	

16. Пригоден ли цитологический материал для всех разновидностей молекулярно-генетического анализа, как ДНК-, так и РНК-тестов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не пригоден	
б	редко используется	
в	частично пригоден	
г	пригоден	+

17. Допустимые виды цитологических образцов для молекулярного тестирования

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	цитологические стёкла	+
б	цитоблоки	+
в	цитоспины	+

18. Минимальное количество опухолевых клеток на 1 цитологическом препарате, необходимое для проведения молекулярного тестирования

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не менее 1 опухолевой клетки	
б	не менее 5 опухолевых клеток	
в	не менее 50 опухолевых клеток	+
г	не менее 500 опухолевых клеток	

19. Для мануальной микродиссекции предполагается использование

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	электронного микроскопа	
б	оптического светового микроскопа	+
в	инвертированного микроскопа	+
г	зондового микроскопа	

20. Для выполнения микродиссекции рекомендуется использовать

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	иглу с внешним диаметром 0,3 мм	+
б	острый хирургический скальпель	+
в	колеблющиеся иглы	+
г	покровное стекло	

21. Меры предосторожности на рабочем столе между процедурами диссекций отдельных образцов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	очистка рабочего места	+
б	замена одноразовых перчаток	+
в	замена лезвий	+
г	замена этилового спирта	

22. Инструменты, обрабатываемые 100% этанолом перед диссекцией

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	пинцет	+
б	игла	+
в	скальпель	+
г	карандаш	+

23. Основные компоненты системы лазерной микродиссекции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	инвертированный микроскоп	+
б	инфракрасный лазер	+
в	цифровая камера	+
г	монитор для визуализации цели	+

Список литературы

1. Демидова И.А., Филипенко М.Л., Цуканов А.С., Имянитов Е.Н. Микросателлитная нестабильность: нюансы лабораторной диагностики (позиция Межрегиональной организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии) // Вопросы онкологии. – 2023. – Том 69. – № 2. – С. 174-179.

2. Митюшкина Н.В., Иевлева А.Г., Полторацкий А.Н. и др. Оценка пригодности архивных цитологических образцов рака лёгкого для молекулярно-генетических исследований // Вопросы онкологии. – 2015. – Т. 61, № 6. – С. 968-971.

3. Моисеенко Ф., Тюрин В., Левченко Н. и др. Использование молекулярно-генетического теста на транслокацию ROS1 при раке легкого для выявления единичных опухолевых клеток (описание клинического случая) // Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64, № 3. – С. 331-334.

4. Федянин М.Ю., Гладков О.А., Гордеев С.С. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки, ректосигмоидного соединения и прямой кишки. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2. – 2022. – Т. 12. – С. 401-454.

5. Alturkistani H.A., Tashkandi F.M., Mohammedsaleh Z.M. Histological stains: a literature review and case study // Glob. J. Health Sci. – 2015. – Vol. 8(3). – P.72-79.

6. Ardakani N.M., Giardina T., Grieu-Iacopetta F. et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma: Comparing Cobas 4800 EGFR assay with Sanger bidirectional sequencing // Clin. Lung Cancer. – 2016. – Vol. 17(5). – P. e113-119.

7. Bass B.P., Engel K.B., Greytak S.R., Moore H.M. A review

of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2014. – Vol. 138(11). – P.1520-1530.

8. Bevilacqua C., Ducos B. Laser microdissection: a powerful tool for genomics at cell level // Mol. Aspects Med. – 2018. – Vol. 59. – P. 5-27.

9. Buczak K., Kirkpatrick J.M., Truckenmueller F. et al. Spatially resolved analysis of FFPE tissue proteomes by quantitative mass spectrometry // Nat. Protoc. – 2020. – Vol. 15(9).– P. 2956-2979.

10. Carithers L.J., Agarwal R., Guan P. et al. The biospecimen preanalytical variables program: a multiassay comparison of effects of delay to fixation and fixation duration on nucleic acid quality // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2019. – Vol. 143(9). – P. 1106-1118.

11. Chen L., Chen M., Lin J. et al. Identifying a wide range of actionable variants using capture-based ultra-deep targeted sequencing in treatment-naïve patients with primary lung adenocarcinoma // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2020. – Vol. 13(3). – P. 525-535.

12. Chionh F., GebSKI V., Al-Obaidi S.J. et al. VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 single nucleotide polymorphisms and outcomes from the AGITG MAX trial of capecitabine, bevacizumab and mitomycin C in metastatic colorectal cancer // Sci. Rep. – 2022. – Vol. 12(1). – P. 1238.

13. De Bruin E., van de Pas S., Lips E. et al., Macrodissection versus microdissection of rectal carcinoma: minor influence of stroma cells to tumor cell gene expression profiles // BMC Genomics. – 2005. – Vol. 6. – P. 142.

14. De Leng W.W.J., Gadellaa-van Hooijdonk C.G., Barendregt-

Smouter F.A.S. et al. Targeted next generation sequencing as a reliable diagnostic assay for the detection of somatic mutations in tumours using minimal DNA amounts from formalin fixed paraffin embedded material // PLoS One. – 2016. – Vol. 11(2). – P. e0149405.

15. De Marchi T., Braakman R.B.H., Stingl C. et al. The advantage of laser-capture microdissection over whole tissue analysis in proteomic profiling studies // Proteomics. – 2016. – Vol. 16(10). – P. 1474-1485.

16. Dijkstra J.R., Heideman D.A.M., Meijer G.A. et al., KRAS mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance // Virchows Arch. – 2013. – Vol. 462. – P.39-46.

17. Dubeau L., Chandler L.A., Gralow J.R., Nichols P.W., Jones P.A. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens // Cancer Res. – 1986. – Vol. 46(6). – P. 2964-2969.

18. Dufraing K., Hertogh G., Tack V. et al. External Quality Assessment Identifies Training Needs to Determine the Neoplastic Cell Content for Biomarker Testing // J. Mol. Diagn. – 2018. – Vol. 20. – P. 455-464.

19. Eltoum I.A., Siegal G.P., Frost A.R. Microdissection of histologic sections: past, present, and future // Adv. Anat. Pathol. – 2002. – Vol. 9(5). – P. 316-322.

20. Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D. et al. Laser capture microdissection // Science. – 1996. – Vol. 274(5289). – P. 998-1001.

21. Fairley J.A., Gilmour K., Walsh K. Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue // Curr. Drug Targets. – 2012. – Vol. 13(12). – P. 1475-1487.

22. Faulkner C., Ellis H.P., Shaw A. et al. BRAF fusion analysis in pilocytic astrocytomas: KIAA1549-BRAF 15-9 fusions are more frequent in the midline than within the cerebellum // *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* – 2015. – Vol. 74(9). – P. 867-872.

23. FoundationOne®CDx Technical Specifications. – 2018. – <https://www.rochefoundationmedicine.com/flcdxtech>.

24. Gaffney E.F., Riegman P.H., Grizzle W.E., Watson P.H. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research // *Biotech. Histochem.* – 2018. – Vol. 93(5). – P. 373-386.

25. Geiersbach K., Adey N., Welker N. et al. Digitally guided microdissection aids somatic mutation detection in difficult to dissect tumors // *Cancer Genet.* – 2016. – Vol. 209(1-2). – P. 42-49.

26. Goelz S.E., Hamilton S.R., Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – Vol. 130(1). – P. 118-126.

27. Gullo I., Marques A., Pinto R., Cirnes L., Schmitt F. Morphological control for molecular testing: a practical approach // *J. Clin. Pathol.* – 2021. – Vol. 74(5). – P. 331-333.

28. Gustafsson O.J.R., Arentz G., Hoffmann P. Proteomic developments in the analysis of formalin-fixed tissue // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2015. – Vol. 1854(6). – P. 559-580.

29. Hanson J.C., Tangrea M.A., Kim S. et al. Expression microdissection adapted to commercial laser dissection instruments // *Nat. Protocol.* – 2011. – Vol. 6(4). – P. 457-467.

30. Hipp J.D., Cheng J., Hanson J.C. et al. SIVQLCM protocol for the ArcturusXT instrument // *J. Vis. Exp.* – 2014. – Vol. 89. – P. 51662.

31. Hipp J.D., Johann D.J., Chen Y. et al. Computer-aided laser

dissection: a microdissection workflow leveraging image analysis tools // *J. Pathol. Inform.* – 2018. – № 9. – P. 45.

32. Hunt J., Swalsky P., Sasatomi E. et al., Microdissection and Molecular Genotyping Assay to Confirm the Identity of Tissue Floaters in Paraffin-Embedded Tissue Blocks // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2003. – Vol. 127(2). – P. 213-217.

33. Hunt J.L., Finkelstein S.D. Microdissection techniques for molecular testing in surgical pathology // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2004. – Vol. 128(12). – P. 1372-1378.

34. Hussien B.M., Abdullah S.T., Salihi A. et al. The emerging roles of NGS in clinical oncology and personalized medicine // *Pathol. Res. Pract.* – 2022. – Vol. 230. – P. 153760.

35. Klee E.W., Erdogan S., Tillmans L. et al. Impact of sample acquisition and linear amplification on gene expression profiling of lung adenocarcinoma: laser capture micro-dissection cell-sampling versus bulk tissue-sampling // *BMC Med. Genomics.* – 2009. – № 2. – P. 13.

36. Klein O., Clements A., Menzies A.M. et al. BRAF inhibitor activity in V600R metastatic melanoma // *Eur. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 49(5). – P. 1073-1079.

37. Kokkat T.J., Patel M.S., McGarvey D., LiVolsi V.A., Baloch Z.W. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: a valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA and protein // *Biopreserv. Biobank.* – 2013. – Vol. 11(2). – P. 101-106.

38. Lih C.J., Harrington R.D., Sims D.J. et al. Analytical validation of the next-generation sequencing assay for a nationwide signal-finding clinical trial: molecular analysis for therapy choice clinical trial // *J. Mol. Diagn.* – 2017. – Vol. 19(2). – P. 313-327.

39. Lindeman N., Cagle P., Aisner D. et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for

Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2018. – Vol. 142(3). – P. 321-346.

40. Liotta L.A., Pappalardo P.A., Carpino A. et al. Laser capture proteomics: spatial tissue molecular profiling from the bench to personalized medicine // Expert. Rev. Proteomics. – 2021. – Vol. 18(10). – P. 845-861.

41. Liu A. Laser capture microdissection in the tissue biorepository // J. Biomol. Tech. – 2010. – Vol. 21(3). – P. 120-125.

42. Locy H., Correa R.J.M., Autaers D. et al. Overcoming the challenges of high quality RNA extraction from core needle biopsy // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11(5). – P. 621.

43. Lokhandwala P.M., Tseng L.H., Rodriguez E. et al. Clinical mutational profiling and categorization of BRAF mutations in melanomas using next generation sequencing // BMC Cancer. – 2019. – Vol. 19(1). – P. 665.

44. Lowry O.H., Passonneau J.V. Some recent refinements of quantitative histochemical analysis // Curr. Probl. Clin. Biochem. – 1971. – № 3. – P. 63-84.

45. McDonough S.J., Bhagwate A., Sun Z. et al. Use of FFPEderived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods // PLoS One. – 2019. – Vol. 14(4). – P. e0211400.

46. 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.

47. Morlote D., Janowski K., Siniard R. et al., Effects of Improved DNA Integrity by Punch From Tissue Blocks as Compared to

Pinpoint Extraction From Unstained Slides on Next-Generation Sequencing Quality Metrics // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2019. – Vol. 152(1). – P. 27-35.

48. Nair S.R. Personalized medicine: striding from genes to medicines // *Perspect. Clin. Res.* – 2010. – Vol.1(4). – P. 146-150.

49. Nony E., Moingeon P. Proteomics in support of immunotherapy: contribution to model based precision medicine // *Expert Rev. Proteomics.* – 2021. – Vol. 19. – P. 33-42.

50. Pandey V., Storz P. Targeting the tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma // *Expert Rev. Anticancer Ther.* – 2019. – Vol. 19(6). – P. 473-482.

51. Petrackova A., Vasinek M., Sedlarikova L. et al. Standardization of sequencing coverage depth in NGS: recommendation for detection of clonal and subclonal mutations in cancer diagnostics // *Front. Oncol.* – 2019. – № 9. – P. 851.

52. Qi P., Bai Q.M., Yao Q.L., Yang W.T., Zhou X.Y. Performance of automated dissection on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections for the 21-gene recurrence score assay // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2020. – Vol. 19. – P. 1533033820960760.

53. Rosai J., Ackerman L.V. The pathology of tumors, part III: grading, staging & classification // *CA Cancer J. Clin.* – 1979. – Vol. 29(2). – P. 66.

54. Rosenberg A., Armani M.D., Fetsch P.A. et al. High-Throughput Microdissection for Next-Generation Sequencing // *PLoS One.* – 2016. – Vol.11(3). – P. e0151775.

55. Rossouw S.C., Bendou H., Blignaut R.J. et al. Evaluation of protein purification techniques and effects of storage duration on LC-MS/MS analysis of archived FFPE human CRC tissues // *Pathol. Oncol. Res.* – 2021. – Vol. 27. – P. 622855.77.

56. Roy-Chowdhuri S., de Melo Gagliato D., Routbort M.J. et al.

Multigene clinical mutational profiling of breast carcinoma using next-generation sequencing // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2015. – Vol. 144(5). – P. 713-721.

57. Schutze K., Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells // *Nat. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 16(8). – P. 737-742.

58. Smits A., Kummer J., de Bruin P. et al., The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate // *Mod. Pathol.* – 2014. – Vol.27(2). – P. 168-174.

59. Sokolenko A., Moiseyenko F., Iyevleva A. et al., Discrimination between Complete versus Non-Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Therapy Using Ultrasensitive Mutation Analysis: A Proof-of-Concept Study in BRCA1-Driven Breast Cancer Patients // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24(3). – P. 1870.

60. Tangrea M.A., Chuaqui R.F., Gillespie J.W. et al. Expression microdissection: operator-independent retrieval of cells for molecular profiling // *Diagn. Mol. Pathol.* – 2004. – Vol. 13(4). – P. 207-212.

61. Vandewoestyne M., Goossens K., Burvenich C. et al. Laser capture microdissection: should an ultraviolet or infrared laser be used? // *Anal Biochem.* – 2013. – Vol. 439(2). – P. 88-98.

62. Walsh E., Halushka M. A Comparison of Tissue Dissection Techniques for Diagnostic, Prognostic, and Theragnostic Analysis of Human Disease // *Pathobiology.* – 2023. – Vol. 90(3). – P. 199-208.

63. Wang D., Rolfe P.A., Foernzler D. et al. Comparison of two Illumina whole transcriptome RNA sequencing library preparation methods using human cancer FFPE specimens // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2022. – Vol. 21. – P. 15330338221076304.

64. Zhong A., Tian Y., Zhang H., Lai M. DNA hydroxymethyl-

ation of colorectal primary carcinoma and its association with survival // J. Surg. Oncol. – 2018. – Vol. 117(5). – P. 1029-1037.

65. Zhuang Z., Bertheau P., Emmert-Buck M.R. et al. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions < 1 mm in size // Am. J. Pathol. – 1995. – Vol. 146(3). – P. 620-625.

ISBN 978-5-6048250-0-6



Отпечатано в ООО «АРТЕК»,
СПб, 6-я линия В.О., д. 3/10
E-mail: artek-1@mail.ru, т. +7(911) 239-25-32
Подписано в печать 09.10.23
Формат 60x90/16. Тираж 50 экз.