

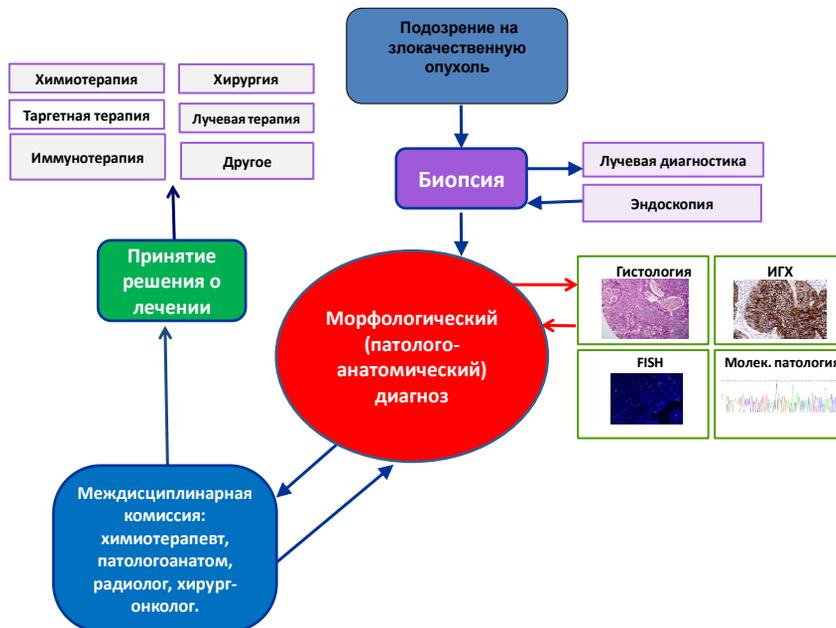
Исследование операционного материала при  
раке  
легкого, основные требования к получению  
образцов опухолевого материала и  
подготовке к молекулярно-генетическому  
тестированию

Раскин Г.А.  
Руководитель лаборатории иммуногистохимии  
ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова»,  
Руководитель патоморфологической службой МИБС,  
д.м.н., профессор кафедры онкологии СПбГУ

21 апреля 2018 года

Казань

**Морфологическая (патологоанатомическая) диагностика – это  
основа для лечения онкологических заболеваний**



## Современная онкоморфология

- В настоящее время нет таких злокачественных опухолей, в которых не требовалось бы проводить дополнительные молекулярные исследования: иммуногистохимия, ISH, ПЦР, секвенирование.
- Крайне важно тщательно соблюдать преаналитический этап: вырезка, фиксация, проводка материала.

## Основные этапы онкоморфологического исследования.

До-лабораторный этап

1. Забор материал.

Лабораторный этап

1. Вырезка материала.
2. Фиксация материала.
3. Проводка материала.
4. Приготовление гисто-препаратов.
5. Исследование гистологических препаратов (постановка диагноза, при необходимости выполняется этап 6).
6. Проведение иммуногистохимического исследования.
7. Интерпретация результатов (при необходимости выполняется этап 8).
8. Молекулярно-генетические исследования (FISH, ПЦР, сиквенс).

## Виды материала для исследований

- Биопсия:
  1. Тонкоигольная биопсия (FNA).
  2. Эндоскопическая биопсия.
  3. Трепан-биопсия.
  4. Инцизионная биопсия.
  5. Эксцизионная биопсия.
- Операционный материал.

## Доставка материала.

- Для начала лабораторного этапа необходима доставка материала в лабораторию (патологоанатомическое отделение).
- Чрезвычайно важна маркировка материала, соблюдение сроков доставки.
- Мелкий материал (до 2 см) должен сразу погружаться в формалин.
- В случаях крупного материала, его можно доставлять в сыром виде в течение 3 часов, если срок доставки >3 часов, то необходимо также поместить его в формалин, предварительно обработав.

## Фиксация материал

- 10 % буферный формалин: 1 часть 40% формалина + 3 части буфера (трис, фосфат). Недопустима нейтрализация формалина щелочами!
- Время фиксации 24 часа (48 часов – критическое значение)
- Толщина куска не должна превышать 1 см.
- Материал должен погружаться в формалин в минимальные сроки (не более 3 часов – для операционного, не более 30 мин – биопсия).
- Вырезку материала желательно проводить на сыром материале, если это невозможно, то материал должен быть разрезан («раскрыт») до толщины 1 см.
- Соотношение материала и формалина должно быть не менее 1: 10.

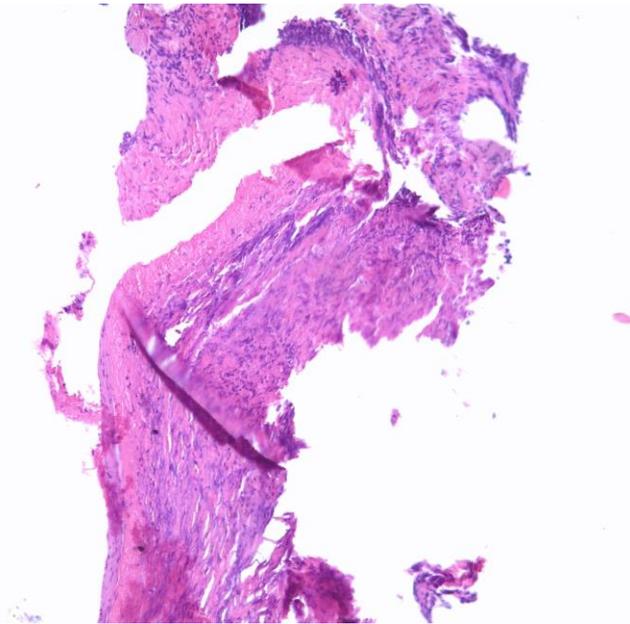
## Правила фиксации материала:

- Формалин способен диффундировать на глубину не более 1 см!
- Если операционный материал без какой-либо обработки сразу погружается в формалин, то он не фиксируется, а подвергается аутолизу.
- При несоблюдении условий фиксации происходит разрушение белков и нуклеиновых кислот (ложно-негативные результаты молекулярно-генетических исследований).

## Клинические наблюдения.

1. В лаборатории несколько дней выходил материал, который практически не подлежал окраски («матовое» стекло), иммуногистохимия на нем не получалась. Ошибка: **фирма-поставщик поставляла формалин, нейтрализованный щелочью.**
2. В клинике выполнена трепан-биопсия предстательной железы (из 14 точек), материал погружен в сухие эппендорфы и доставлен в лабораторию на следующий день. Гистологические препараты, полученные из этого материала, нельзя было интерпретировать. Ошибка: **биопсийный материал не сразу был погружен в формалин.**

Несвоевременное  
погружение в  
формалин



## Клиническое наблюдение.

В клинике две базы, расположенных в разных частях города. Трепан-биопсии молочной железы, выполненные в пятницу, доставлялись в понедельник вечером, запускались в проводку во вторник с утра (ручная проводка). Количество трипл-негативных раков в данном материале резко возрастало. Результат: ложно-отрицательные ИГХ-результаты **Ошибка гиперфиксации материала (более 48 часов).**

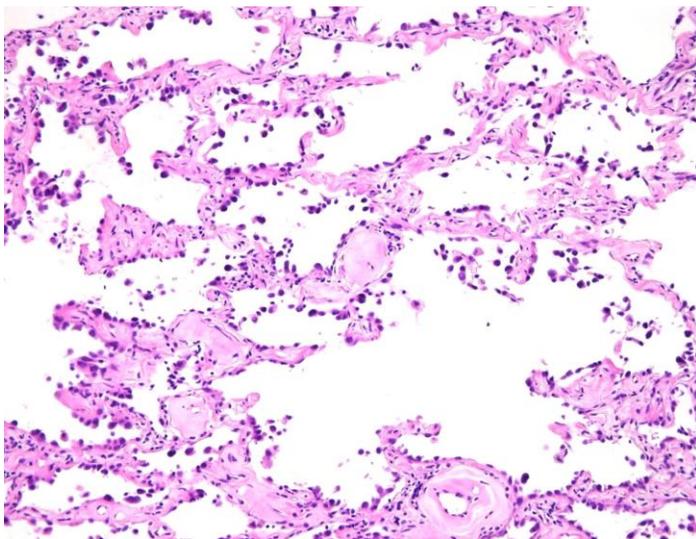
## Описание операционного материала.

- Объем операции (краевая резекция, сегментэктомия, лобэктомия и т.д.).
- Справа или слева.
- Место опухоли: верхняя доля, нижняя доля, средняя доля, главный бронх и т.д.
- Размер опухоли в трех измерениях.

## Аденокарцинома In situ

- Размер <3 см.
- Ограничена альвеолярными структурами.
- Нет стромальной, сосудистой, плевральной инвазии.
- Только чешуйчатый тип.
- Бывший бронхиолоальвеолярный рак.

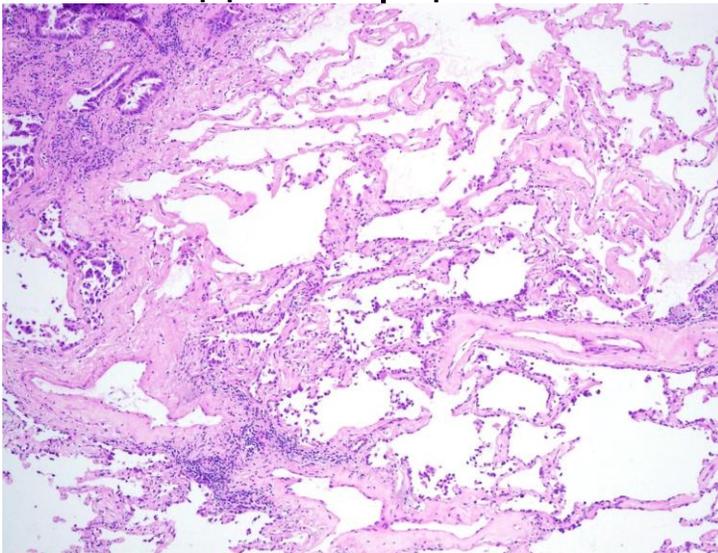
## Аденокарцинома In situ



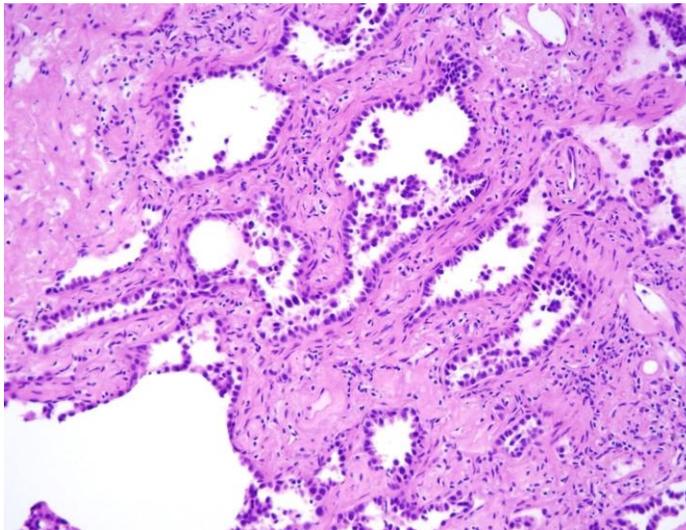
## Минимально инвазивная аденокарцинома.

- Не-муцинозная – 8250/2
- Муцинозная – 8257/3
- Общий размер (с Ca in situ) <3 см, инвазия < 5 мм.
- Инвазия: другие типы строения, чем чешуйчатый или инвазия миофибробластической стромы.

## Минимально инвазивная аденокарцинома.



## Минимально инвазивная аденокарцинома.

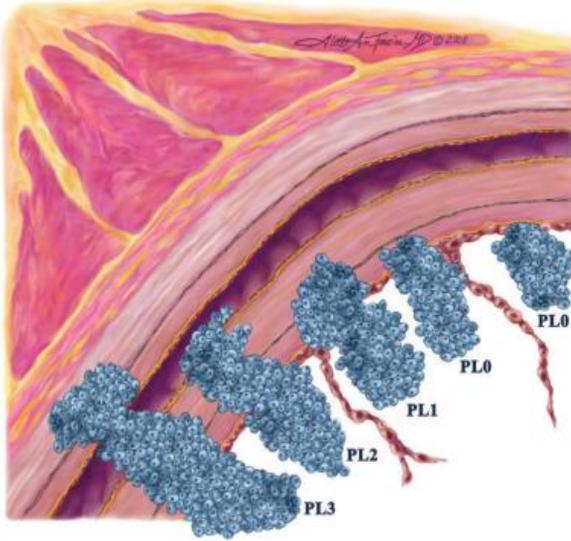


## Описание операционного материала.

- Единичный или множественные узлы.
- Гистологический тип опухоли. В случае инвазивной аденокарциномы преобладание типа (выстилающая, ацинарная, папиллярная, микропапиллярная, солидная) и всех других компонентов, превышающих 5%.
- Grade.
- Инвазия в висцеральную плевру.

CAP, 2017

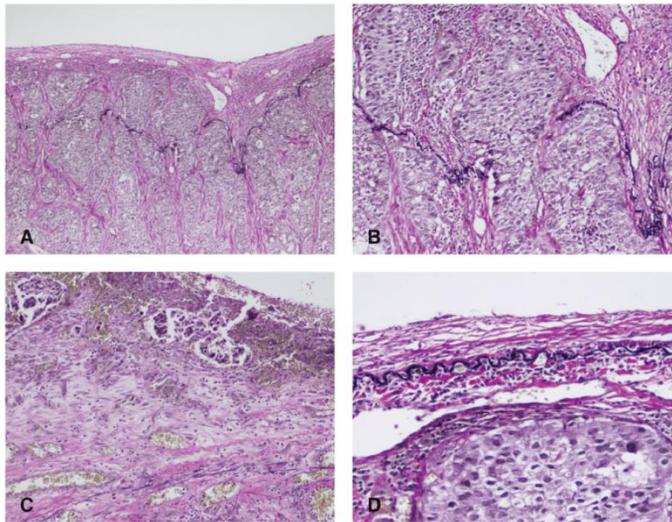
## Инвазия в висцеральную плевру



PL1, PL2 – T2  
PL3 – T3

Travis W.D. et al.,  
2008

## Инвазия в висцеральную плевру



CAP, 2017

## Описание операционного материала

- Лимфоваскулярная инвазия.
- Инвазия в прилежащие структуры: главный бронх, карина, париетальная плевра и т.д.
- Края резекции: бронхиальный, сосудистый, паренхиматозный. Если все не вовлечены, то расстояние до ближайшего края.
- Эффект от лечения: больше 10% опухолевых клеток, менее 10% опухолевых клеток.

CAP, 2017

## Описание операционного материала: pT

- pTx
- pT0 – нет доказательства первичной опухоли.
- pTis – рак in situ
- pT1 – опухоль  $\leq 3$  см в наибольшем измерении, окружена паренхимой легкого или висцеральной плеврой без инвазии далее долевого бронха:
  - pT1mi – минимально-инвазивная аденокарцинома,
  - pT1a – опухоль  $\leq 1$  см или поверхностно-распространяющаяся опухоль, ограниченная стенкой бронха (до главного бронха),
  - pT1b – 1-2 см,
  - pT1c – 2-3 см.

CAP, 2017

## Описание операционного материала: pT (продолжение)

- pT2 – опухоль >3 см, но ≤5 см или вовлекает главный бронх без карины, вовлечение плевры (PL1, PL2), или связана с ателектазом части или всего легкого.
  - pT2a – 3-4 см
  - pT2b – 4-5 см.
- pT3 – опухоль >5 см, но ≤7 см или вовлекает париетальную плевру (PL3), грудную стенку, диафрагмальный нерв, перикард или второй узел в этой же доле.
- pT4 – опухоль >7 см или инвазия в диафрагму, средостение, сердце, крупные сосуды, трахею, пищевод, тело позвонка или карину, или наличие узла в ипсилатеральной доле, отличной от первого узла.

CAP, 2017

## Описание операционного материала: pN (продолжение)

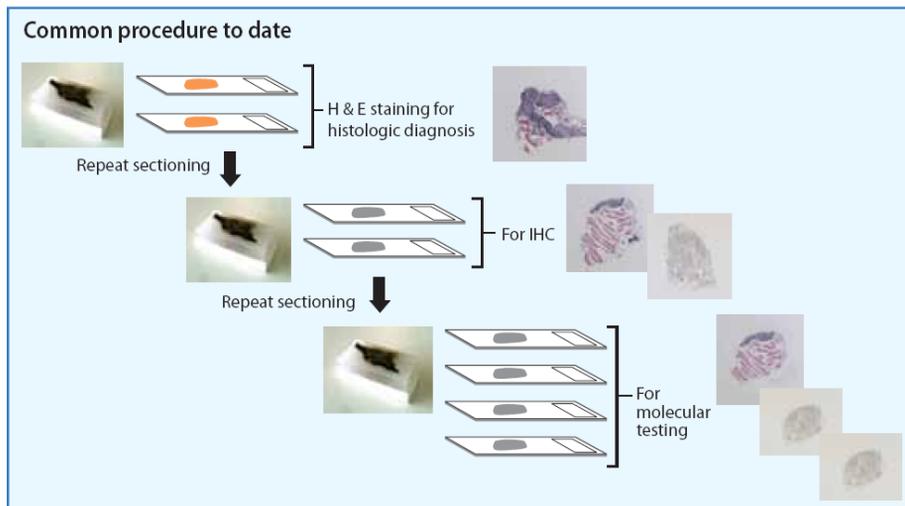
- pNX
- pN0
- pN1 – метастазы в ипсилатеральные перибронхиальные, внутрилегочные, грудные лимфоузлы, включая прямое распространение.
- pN2 – метастазы в ипсилатеральные медиастинальные или трахеобронхиальные лимфоузлы.
- pN3 – метастазы в контролатеральные лимфоузлы

CAP, 2017

## Исследование биопсийного материала

- Весь материал делится на категории сложности. В условиях ОМС материал более высокой категории сложности оплачивается больше.
- Применение дополнительных методов окраски автоматически поднимает уровень сложности до 5 (наивысшего).
- В лабораториях, в которых нет ИГХ практически всегда назначают доп. окраски. Препарат, окрашенный гематоксилином и эозином, в таких лабораториях часто содержит 20 и более срезов.
- После таких исследований материала для молекулярно-генетического исследования может не остаться.

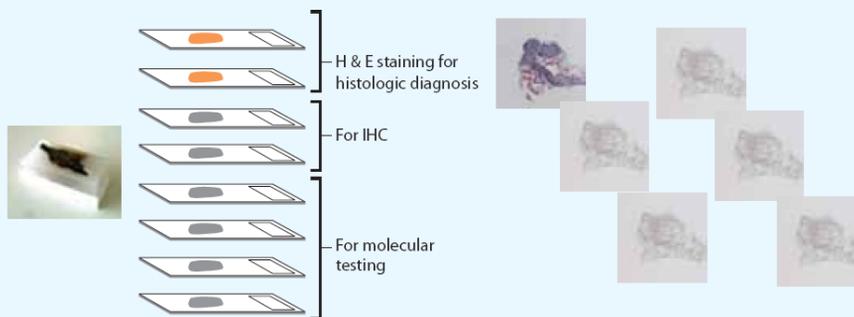
## Обработка биопсийного материала для исследования, «традиционный» способ.



Tsao N.M. et al. IASLK atlas for ALK testing in lung cancer, 2013.

## Обработка биопсийного материала для исследования в условиях развития предиктивных маркеров.

The procedure in era of molecularly targeted drugs



Tsao N.M. et al. IASLK atlas for ALK testing in lung cancer, 2013.

## Гистологический тип опухоли в контексте адъювантной терапии

- В случае, если патологоанатом дает заключение плоскоклеточного рака легкого, пациент лишается возможности таргетной (анти-EGFR) терапии, показанной при аденокарциноме легкого.
- В случае, если вместо крупноклеточного нейроэндокринного рака ставится диагноз аденокарциномы легкого, то пациент может получить неэффективную дорогостоящую анти-ALK терапию.

## Особенности исследования биопсийного материала легкого (рекомендации ВОЗ 2015).

- **Необходимо помнить о необходимости дополнительных исследований, особенно в случае нерезектабельных опухолей. На гистологическое исследование 2-3 среза.**
- Крупноклеточный рак на биопсийном материале не диагностируется.
- Аденокарцинома и плоскоклеточный рак ставятся только в случае очевидной морфологической картины.
- При неясной морфологии не-мелкоклеточного рака необходимо использовать дополнительные методы исследования: PAS, p40 (p63), TTF1.

## Особенности исследования биопсийного материала

- **Нейроэндокринные маркеры:** синаптофизин, хромогранин, CD56 используются только при морфологии нейроэндокринного рака/опухоли.
- Если нельзя решить вопрос о дифференцировке НМРЛ (на г/э и ИГХ), то ставится не-мелкоклеточный рак легкого без уточнения.

## Требования к гистологическому материалу для молекулярно-генетического исследования

- Для тестирования может быть использован как первичная опухоль, так и метастаз.
- Не менее 20% площади образца должны быть опухолевыми клетками (оптимально 50%).
- Может быть использован как биопсийный, так и операционный материал
- Несоблюдение фиксации и проводки, заливки материала может привести к разрушению нуклеиновых кислот.

## Методы обогащения опухолевыми клетками.

- Микродиссекция.
- Лазерная микродиссекция.



