

Виды биопсий. Молекулярно-
генетические методы
диагностики в онкологии

Подготовила студентка 6 курса
Клакоцкая Анна Анатольевна

Биопсия (от греч. *bios* – жизнь и *opsis* – зрительное восприятие, рассмотрение) – иссечение каких-либо тканей из живого организма с последующим морфологическим исследованием иссеченного материала (биоптата) в целях определения характера патологического процесса.

Задачи биопсии:

- ✓ уточнение клинического диагноза,
- ✓ установление диагноза в клинически неясных случаях,
- ✓ определение начальных стадий заболевания (наиболее ранних признаков болезни),
- ✓ дифференциальная диагностика различных по форме и этиологии воспалительных, гиперпластических и опухолевых процессов,
- ✓ определение радикальности проведенных операций,
- ✓ изучение структурных изменений, возникающих в тканях под влиянием лечения.

Виды биопсий

По способу получения материала

Для гистологического
исследования

- эксцизионная биопсия
- инцизионная биопсия
- щипковая биопсия
- трепан-биопсия
- кор-биопсия
- скарификационная биопсия
- петлевая биопсия

Для цитологического
исследования

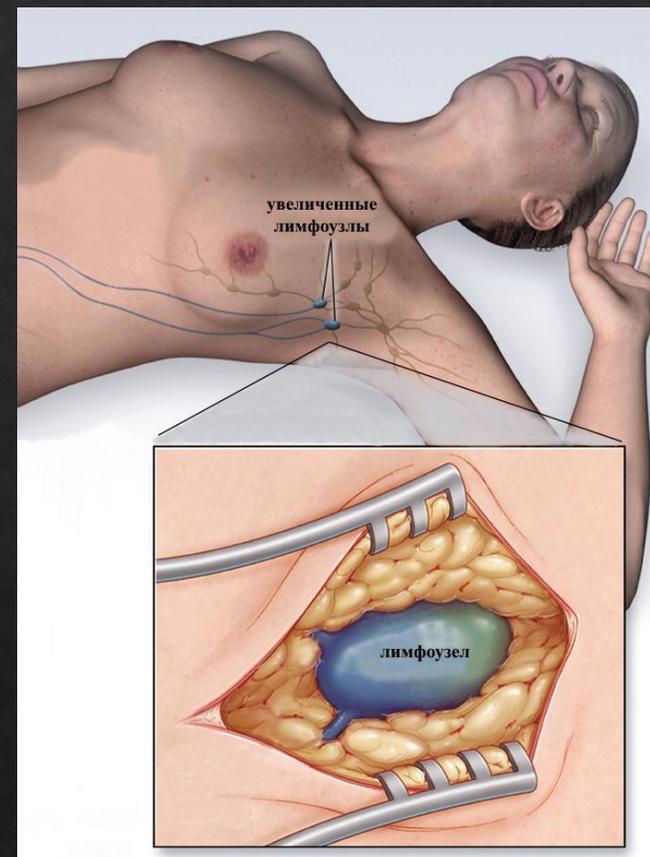
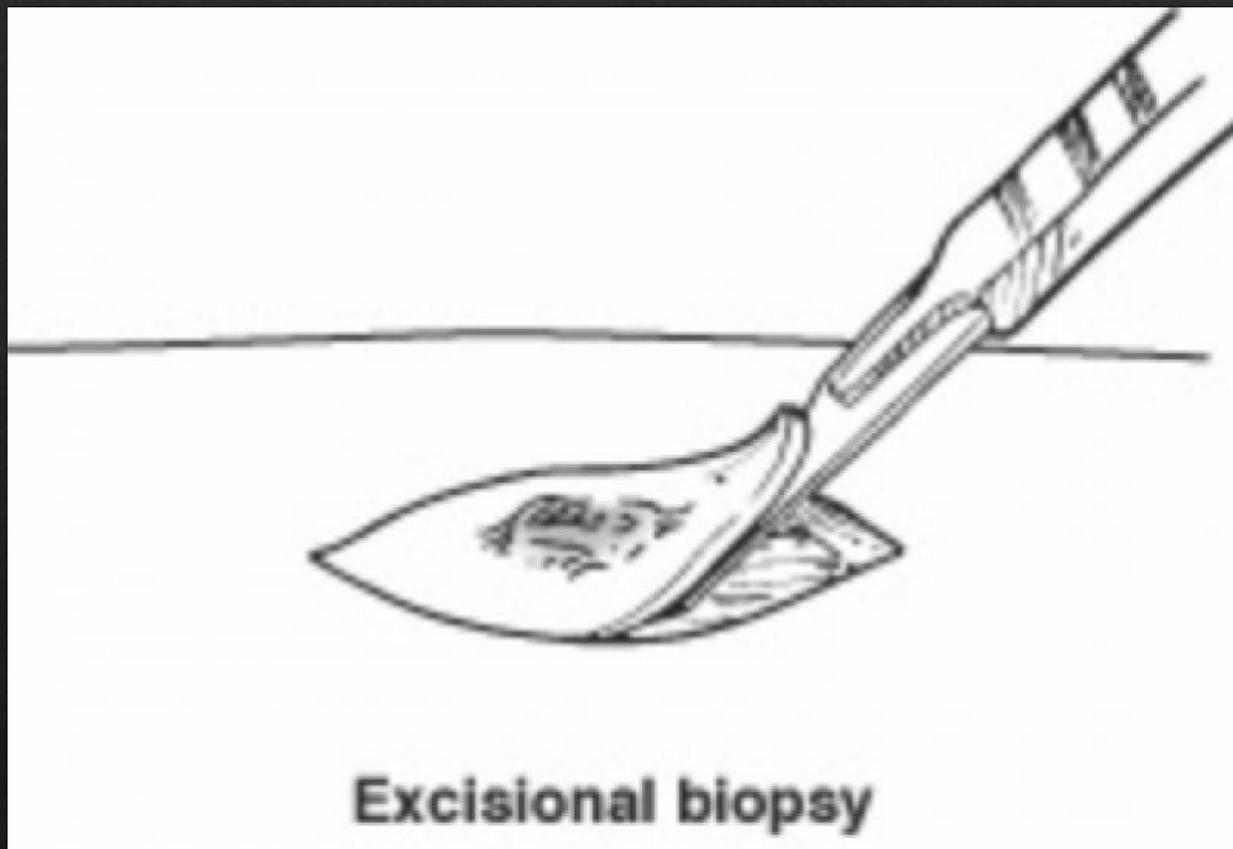
- отпечаток
- мазок-отпечаток
- тонкоигольная
аспирационная биопсия
- аспирационная биопсия

По контролю точности

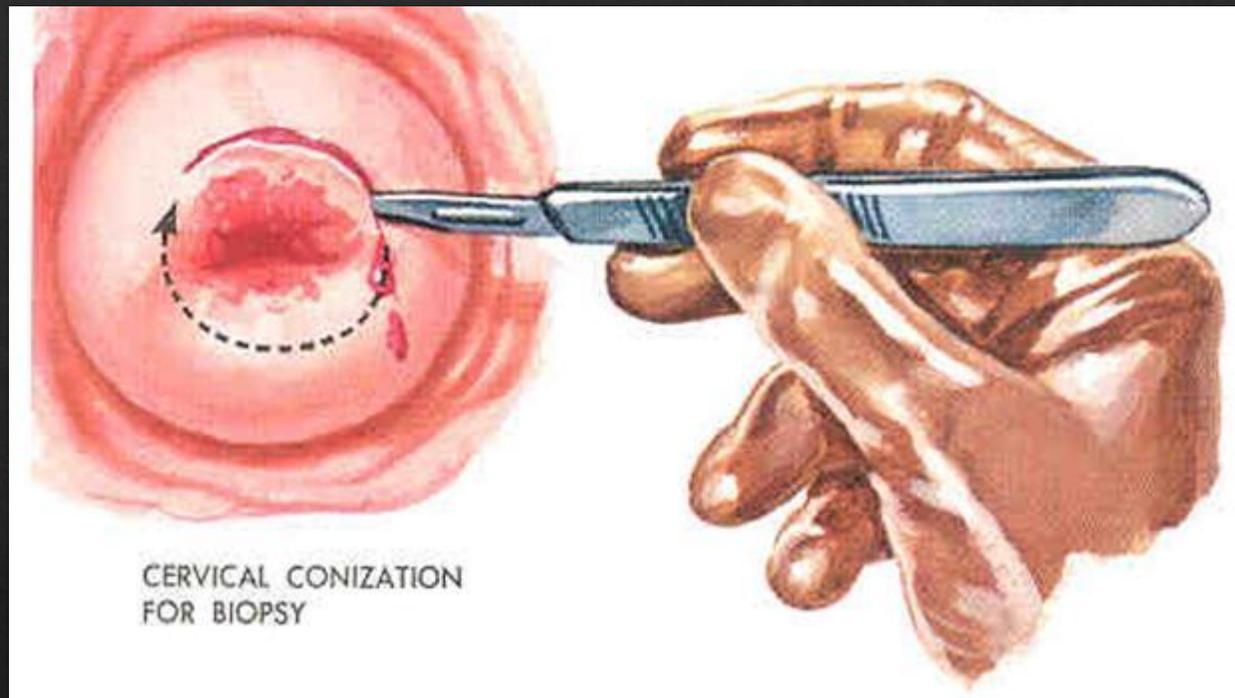
- Классическая биопсия.
Прицельная биопсия:
- эндоскопическая
 - под контролем УЗИ
 - под рентгенологическим
контролем
 - стереотаксическая биопсия

Забор материала для гистологического
исследования

Эксцизионная биопсия

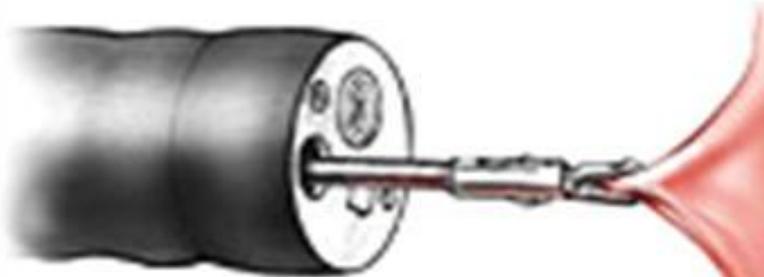
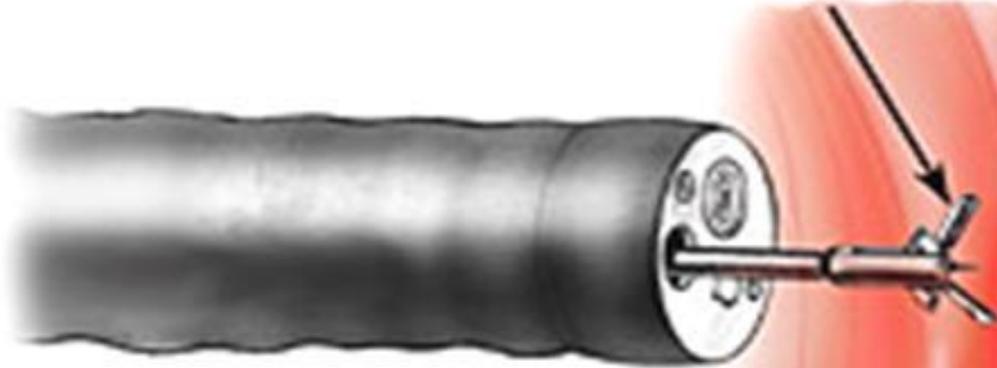


Инцизионная биопсия



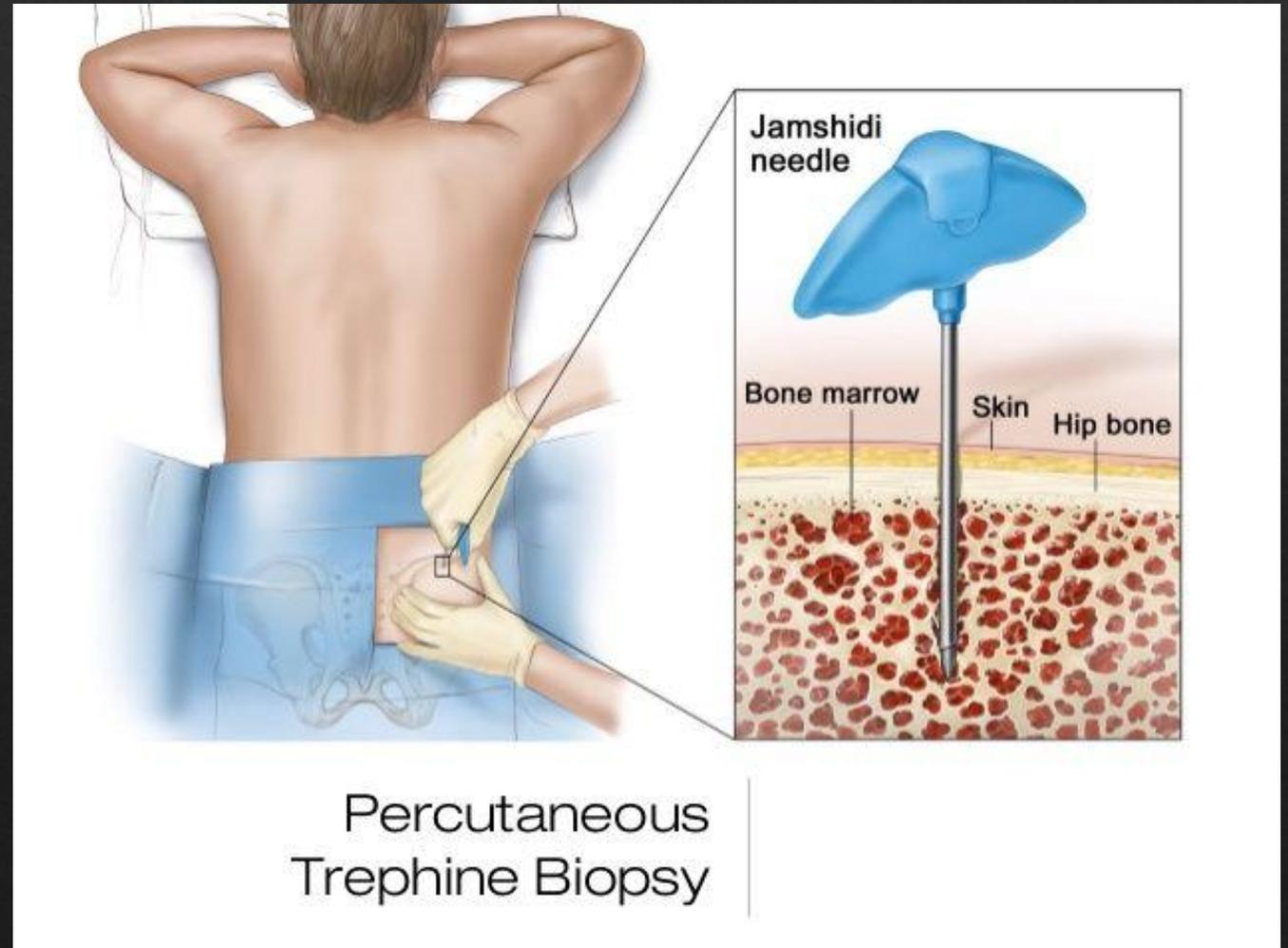
Щипковая биопсия

Биопсийная щипка

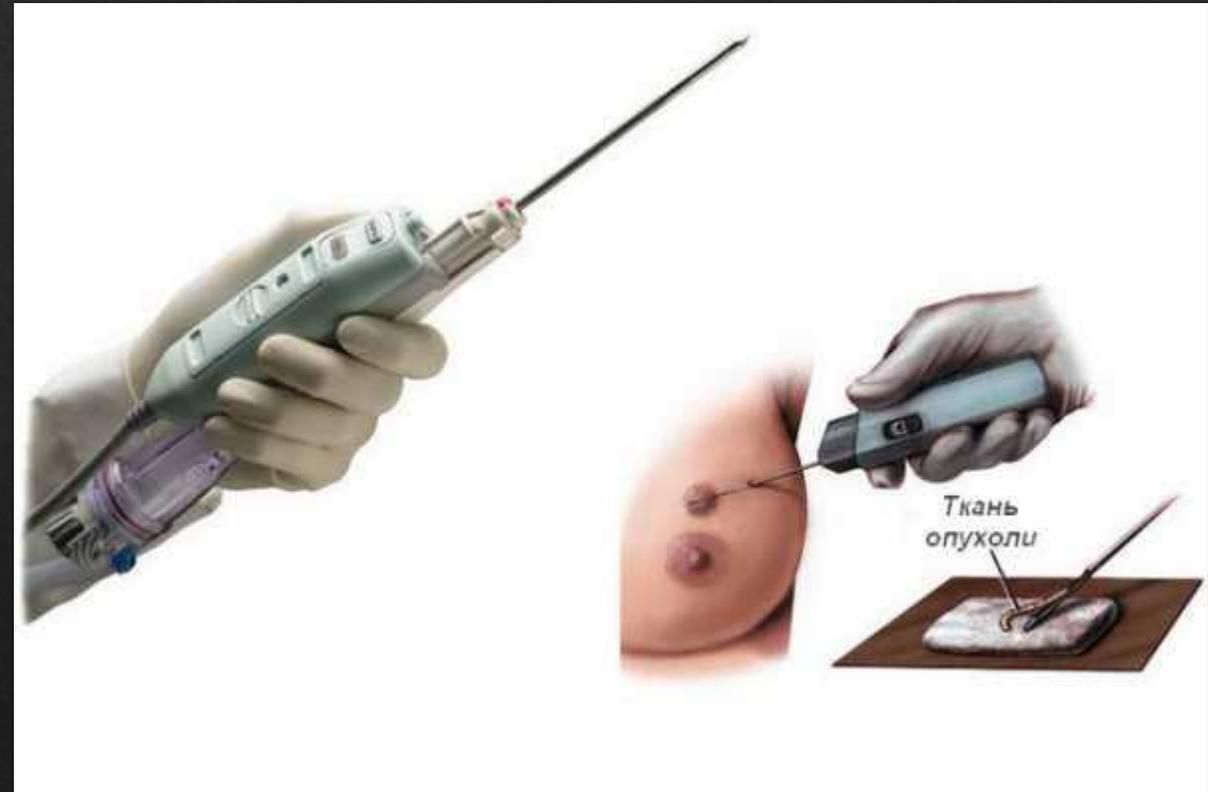
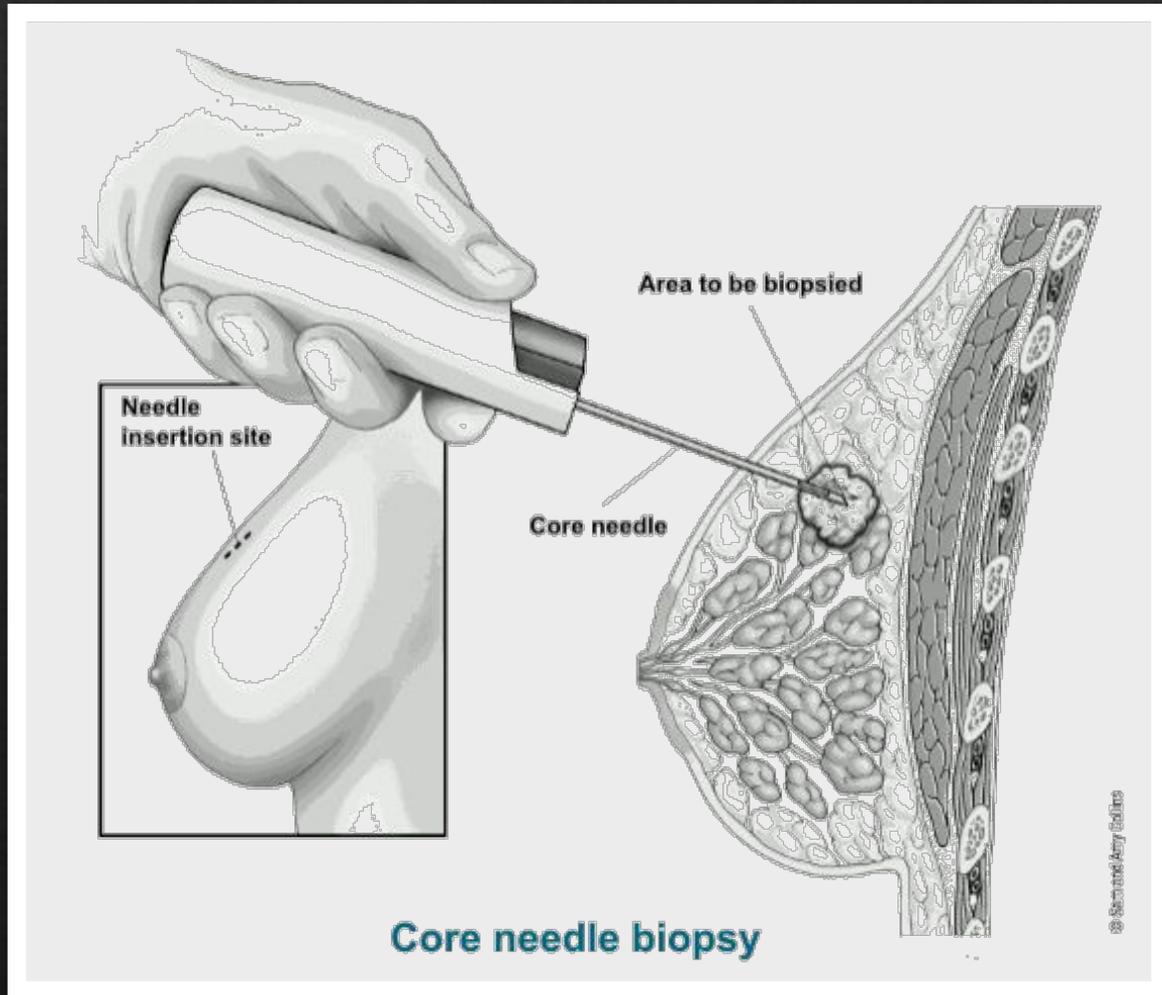


Взятие материала
для морфологического
исследования

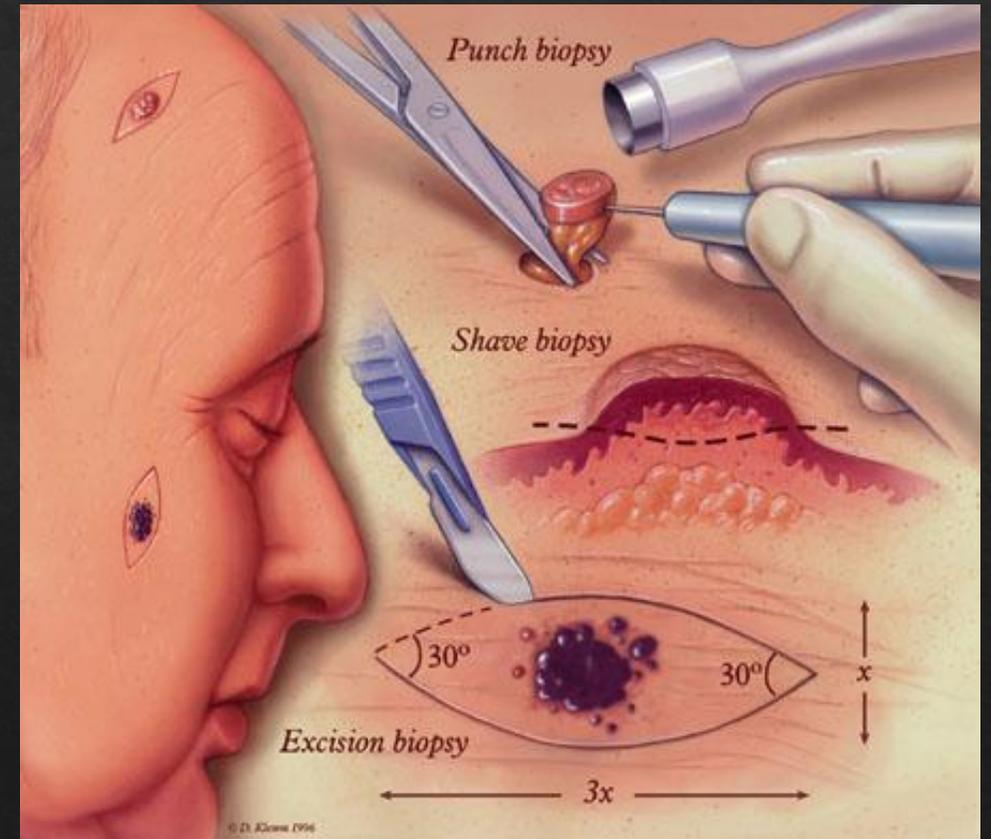
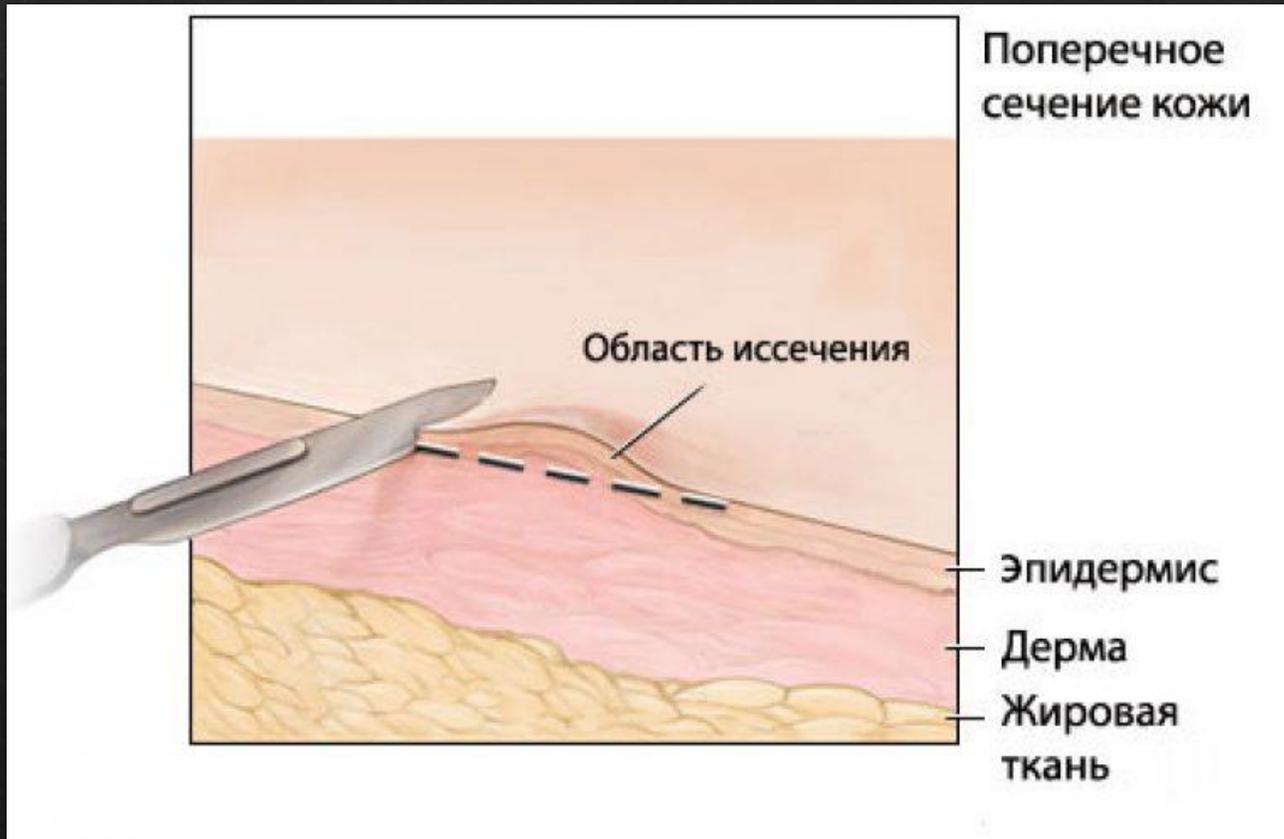
Трепан-биопсия



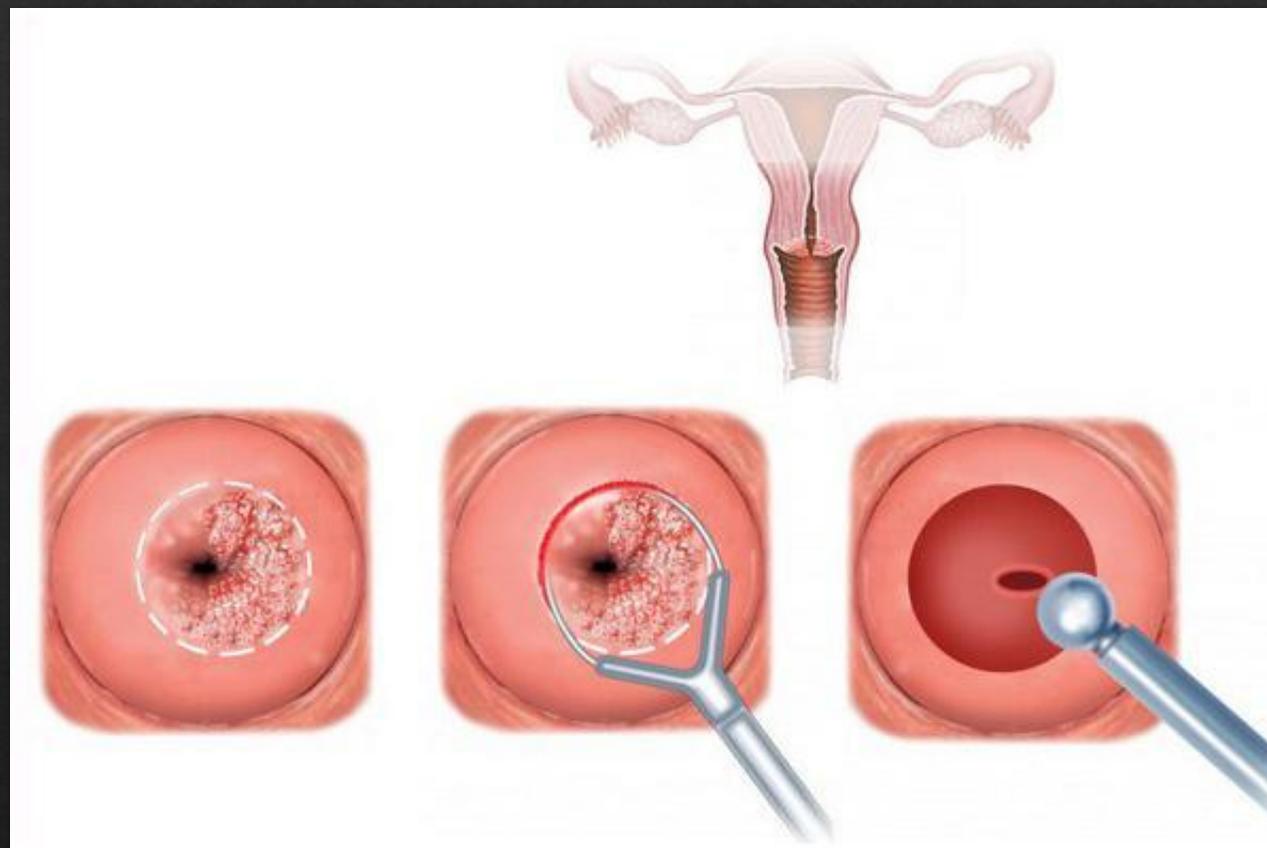
Кор-биопсия



Скарификационная биопсия

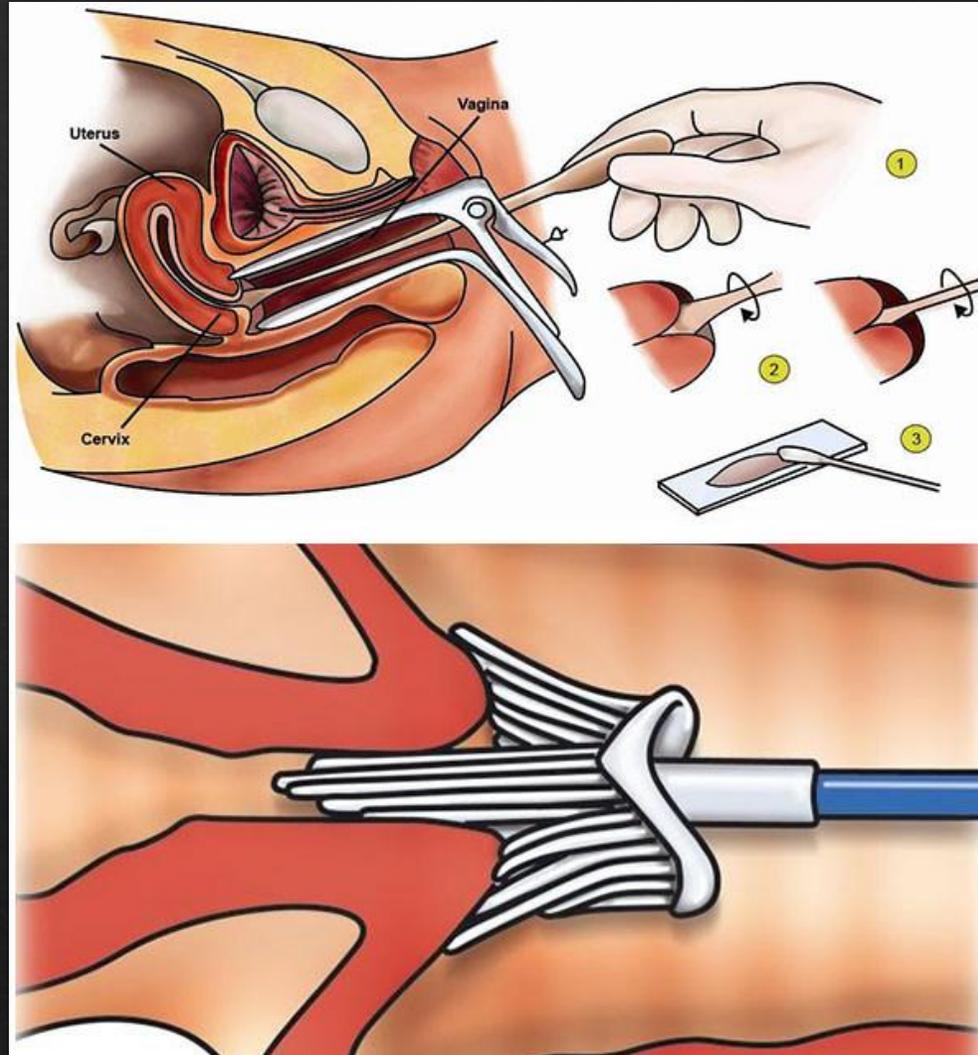


Петлевая биопсия

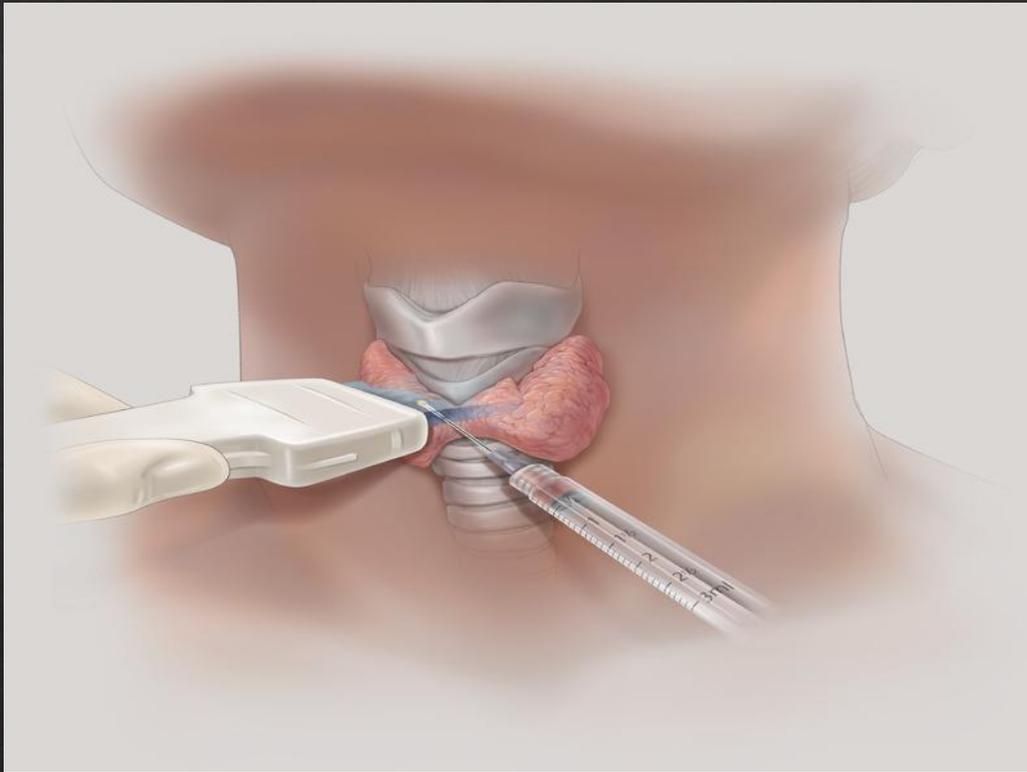


Забор материала для цитологического исследования

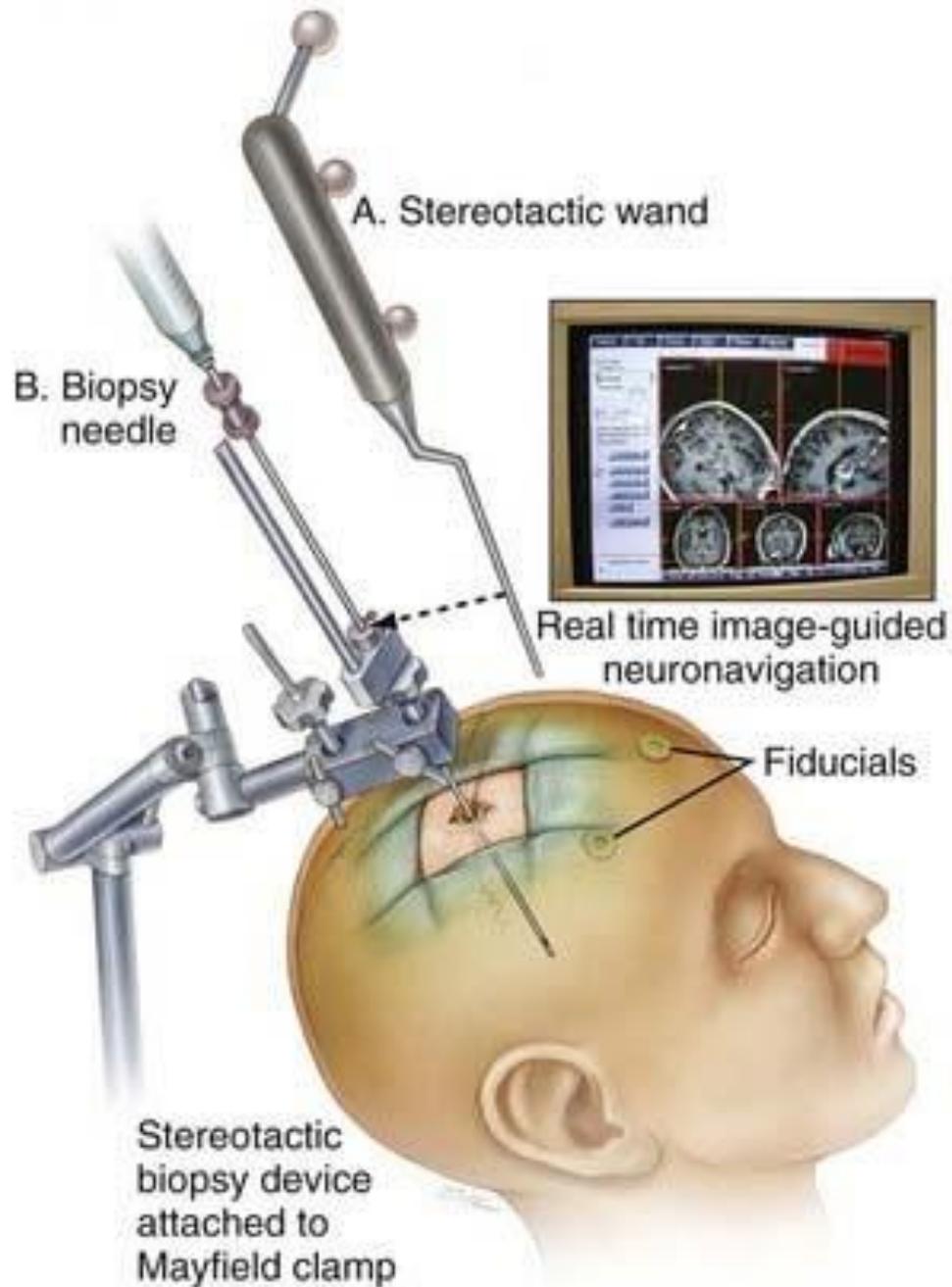
Отпечаток и мазок-отпечаток



Тонкоигольная аспирационная биопсия (FNAB)



Стереотаксическая биопсия



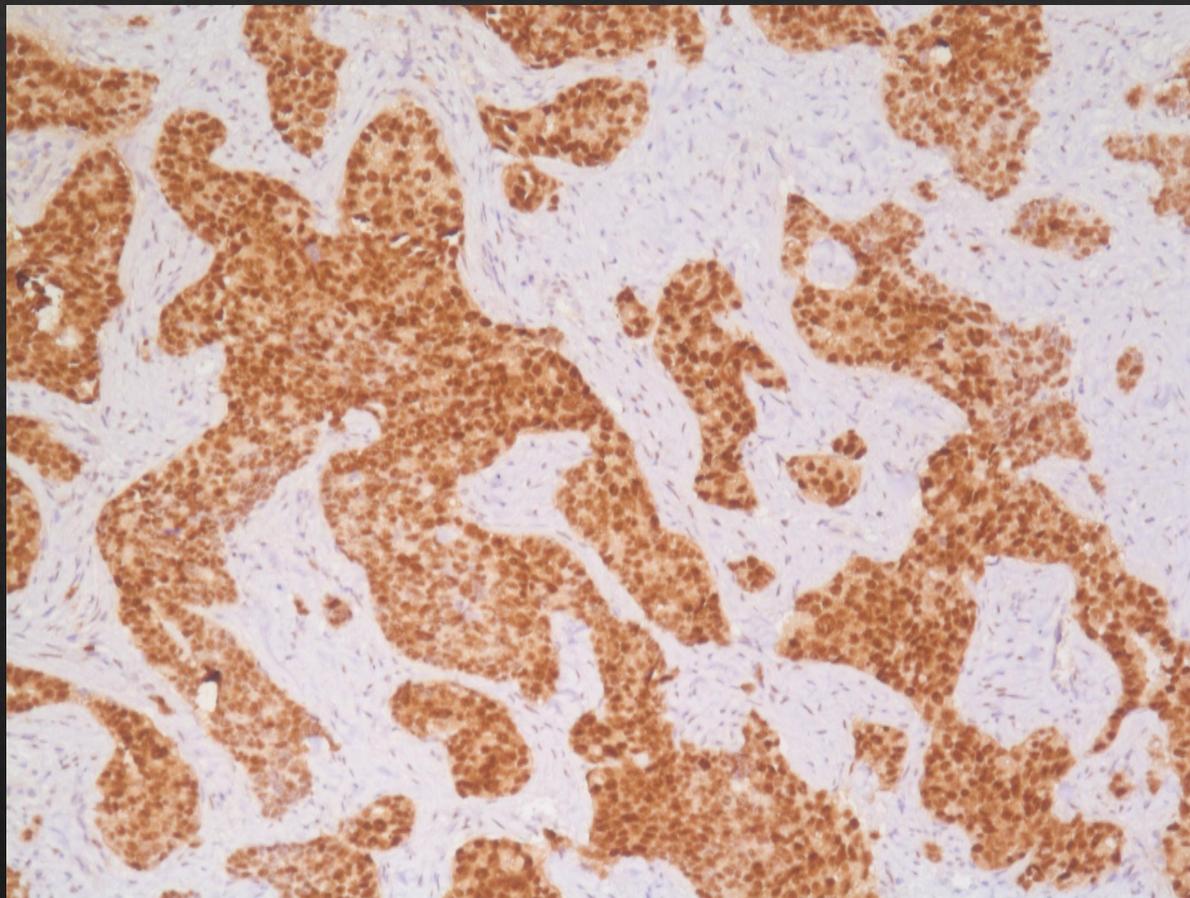
Электронная микроскопия

- трудоемкий и дорогостоящий метод, его применяют только в тех случаях, когда другие методы исчерпали себя. Чаще всего такая необходимость возникает в онкоморфологии и вирусологии для диагностики определенных видов гистиоцитов, например, гистиоцитоза-Х - опухоли из отростчатых эпидермальных макрофагов, маркером которых являются гранулы Бирбека. Другой пример, рабдомиосаркома, маркером ее являются Z-диски в опухолевых клетках. Существуют два основных метода ЭМ: трансмиссионная и сканирующая. Трансмиссионная ЭМ – микроскопия в проходящем пучке электронов – позволяет получить изображение, подобное светооптическому, но с гораздо большим увеличением (в тысячи и десятки тысяч раз). Сканирующая ЭМ основана на эффекте отражения пучка электронов от поверхности объекта, что позволяет изучить его рельеф и трехмерную структуру на ультрамикроскопическом уровне.

Иммуногистохимия

Изучая конкретные молекулы, мы можем получить информацию о функциональном состоянии клетки, ее взаимодействии с микроокружением, определить фенотип клетки, установить ее принадлежность к определенной ткани, что имеет решающее значение в диагностике опухолей, оценке дифференцировки клеток, гистогенезе.

Иммуногистохимические методы служат также для оценки экспрессии клеточных генов по соответствующим белковым продуктам в тканях и клетках, кодируемых данными генами.



Гибридизация на месте

— цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах *in situ*. Кроме того, FISH используют для выявления специфических мРНК в образце ткани. В последнем случае метод FISH позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в клетках и тканях.

Преимуществом данного метода является возможность не только идентификации нуклеиновых кислот, но и корреляции с морфологическими данными.

При флуоресцентной гибридизации *in situ* используют ДНК-зонды (ДНК-пробы), которые связываются с комплементарными мишенями в образце. В состав ДНК-зондов входят нуклеозиды, меченные флюорофорами (прямое мечение) или такими конъюгатами, как биотин или дигоксигенин (непрямое мечение). При прямом мечении связавшийся с мишенью ДНК-зонд можно наблюдать при помощи флуоресцентного микроскопа сразу по завершении гибридизации. В случае непрямого мечения необходима дополнительная процедура окрашивания, в ходе которой биотин выявляют при помощи флуоресцентно-меченного авидина или стрептавидина, а дигоксигенин — при помощи флуоресцентно-меченых антител. Хотя непрямой вариант мечения ДНК-проб требует дополнительных реактивов и временных затрат, этот способ позволяет добиться обычно более высокого уровня сигнала за счёт присутствия на молекуле антитела или авидина 3—4 молекул флюорохрома. Кроме того, в случае непрямого мечения возможно каскадное усиление сигнала.

Типы зондов:

- **локус-специфичные** зонды, связывающиеся с определенными участками хромосом. Данные зонды используются для идентификации имеющейся короткой последовательности выделенной ДНК, которая используется для приготовления меченого зонда и его последующей гибридизации с набором хромосом,
- **альфоидные или центромерные** зонды-повторы представляют собой повторяющиеся последовательности центромерных областей хромосом. С их помощью каждая хромосома может быть окрашена в различный цвет, что позволяет быстро определить число хромосом и отклонения от нормального их числа,
- **зонды на всю хромосому** являются набором небольших зондов, комплементарных к отдельным участкам хромосомы, но в целом покрывающими всю ее длину. Используя библиотеку таких зондов можно "раскрасить" всю хромосому и получить дифференциальный спектральный кариотип индивида. Данный тип анализа применяется для анализа хромосомных aberrаций, например транслокаций, когда кусочек одной хромосомы переносится на плечо другой.

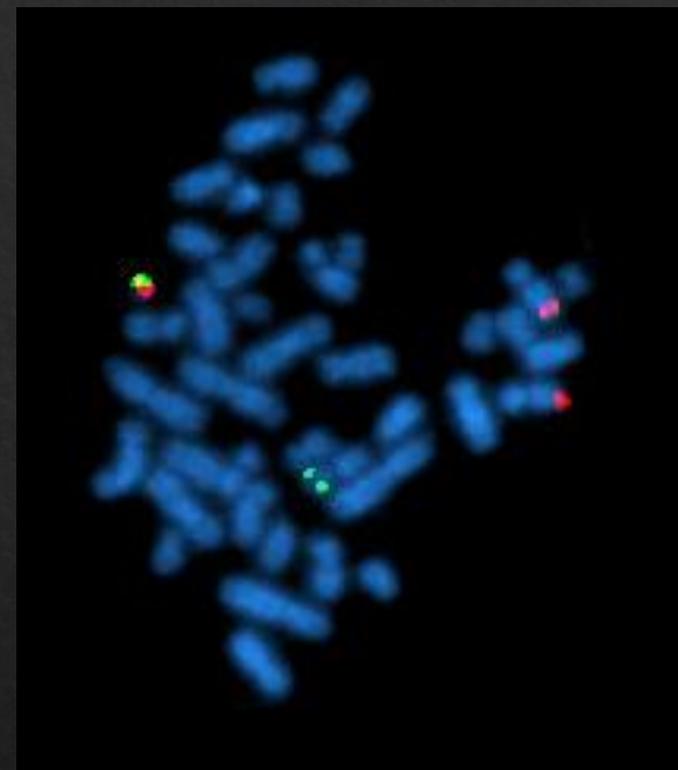
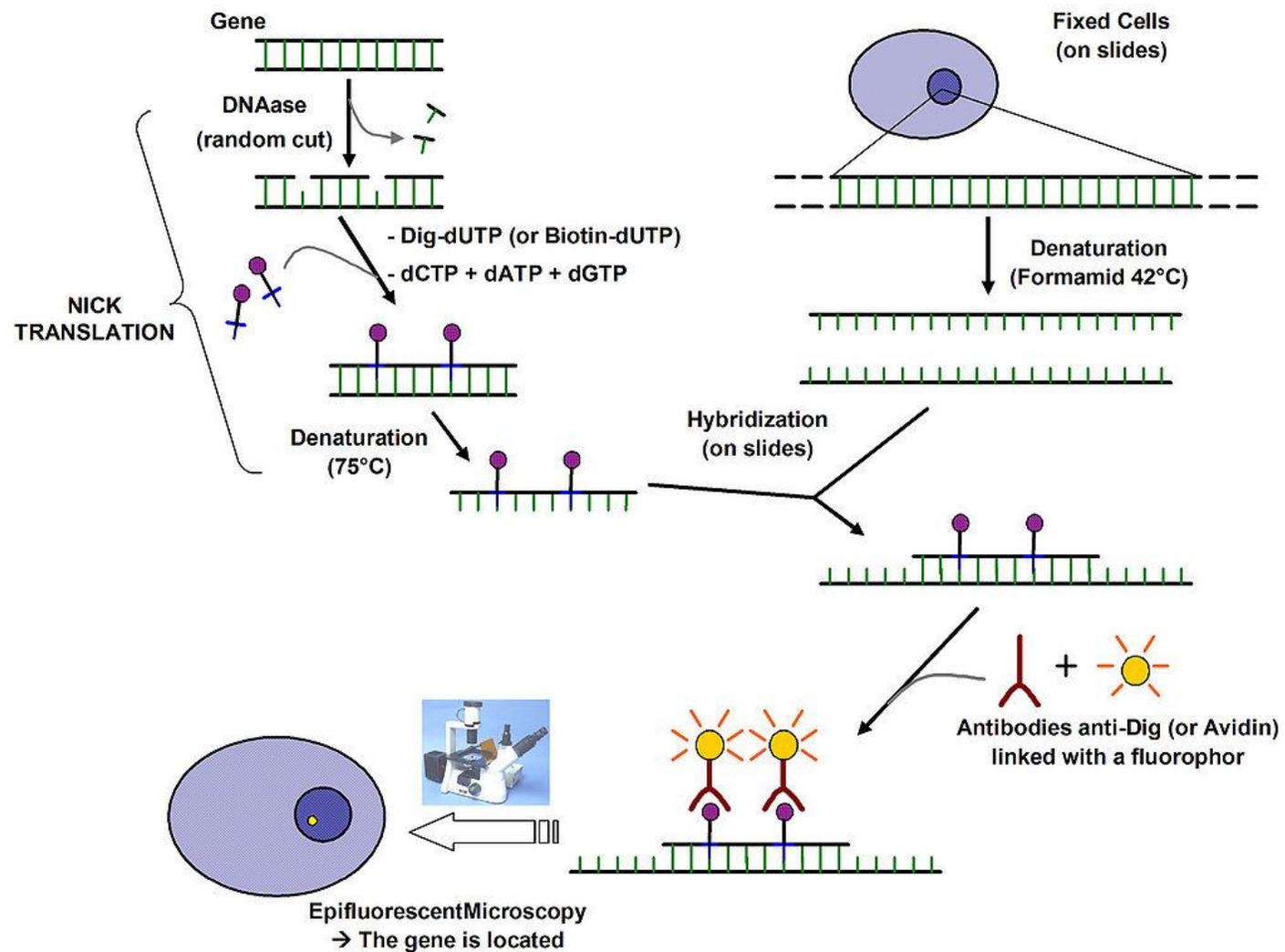
На первом этапе происходит конструирование зондов. Размер зонда должен быть достаточно большим для того, чтобы гибридизация происходила по специфическому сайту, но и не слишком большой (не более 1 тыс. п. о.), чтобы не препятствовать процессу гибридизации. При выявлении специфических локусов или при окраске целых хромосом надо заблокировать гибридизацию ДНК-проб с неуникальными повторяющимися ДНК-последовательностями путём добавления в гибридизационную смесь немеченой ДНК повторов (например, Cot-1 DNA). Если ДНК-зонд представляет собой двуцепочечную ДНК, то перед гибридизацией её необходимо денатурировать.

На следующем этапе приготавливают препараты интерфазных ядер или метафазных хромосом. Клетки фиксируют на субстрате, как правило, на предметном стекле, затем проводят денатурацию ДНК. Для сохранения морфологии хромосом или ядер денатурацию проводят в присутствии формамида, что позволяет снизить температуру денатурации до 70 °С.

Далее к препарату добавляют зонды и осуществляют гибридизацию около 12 часов. Затем проводят несколько стадий отмывок для удаления всех негибридизовавшихся зондов.

Визуализацию связанных ДНК-зондов проводят при помощи флуоресцентного микроскопа. Интенсивность флуоресцентного сигнала зависит от многих факторов — эффективности мечения зондом, типа зонда и типа флуоресцентного красителя.

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



Спасибо за внимание!

