

## Техника изготовления и анализ тканевых матриц

**Храмцов А.И.** - научный сотрудник кафедры гематологии и онкологии Чикагского Университета, США, г. Чикаго; **Храмцова Г.Ф.** - к. м. н., научный сотрудник кафедры гематологии и онкологии Чикагского Университета, США, г. Чикаго; **Н.М. Хмельницкая** - заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии с курсом цитологии Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования, г. Санкт-Петербург

### Construction and analysis of tissue microarrays

**Khramtsov A. I., Khramtsova G.F., Khmel'nitskaya N.M.**

#### Резюме

Технология тканевых матриц позволяет одновременно определить экспрессию протеинов на множественных тканевых образцах, что дает возможность не только получить более точные результаты, но и значительно удешевить само исследование. Этот высокотехнологичный метод может стать путем разрешения многих научных и диагностических проблем. Знание особенностей техники изготовления и возможных методов анализа данных может значительно облегчить процесс внедрения этой технологии в рутинную практику патоморфолога. Настоящая работа посвящена практическим аспектам построения множественно-тканевых блоков, вариантам анализа и статистической обработки данных, полученных с помощью этого метода.

**Ключевые слова:** тканевые матрицы, анализ тканевых матриц, гистологическая техника

#### Summary

Tissue microarray technology allows investigators to detect expression of proteins on multiple tissue samples, which helps to obtain more precise results as well as reduce the cost of the study. This high throughput technique can become an effective way to solve many scientific and diagnostic problems. Knowledge of preparation and various data analysis techniques may facilitate introduction of this method in routine practice pathologist. This review presents practical aspects of construction of tissue microarray blocks, validation of the data, and statistical analysis using this method.

**Key words:** Tissue microarray, analysis of tissue microarrays, histotechniques

#### Введение

В отечественной литературе англоязычный термин "tissue microarray" [1] имеет несколько синонимов. Наиболее часто встречаются: "тканевая матрица", "множественно-тканевый парафиновый блок", "мастер-блок", "тканевой чип" [2, 3, 4]. Для построения тканевых матриц (ТМА) может быть использован замороженный тканевый материал, клеточные линии или, как это бывает в большинстве исследований, материал, фиксированный в формалине и залитый в парафин. В настоящей работе мы будем обсуждать ТМА, которые строятся с использованием материала залитого в парафин.

ТМА блок – это парафиновый блок-реципиент в который встроены множественные тканевые цилиндры, извлеченные из стандартных парафиновых блоков-

доноров. Организованы эти цилиндры в порядке точно соответствующем системе координат на заранее подготовленной карте. Процесс изготовления мастер-блока – многостадийный процесс и включает в себя несколько этапов: сбор и подготовку парафиновых блоков-доноров и соответствующих им гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином или другими рутинными окрасками; планирование типа матрицы и создание карты расположения тканевых образцов с использованием программы Microsoft Excel; подготовку незаполненного блока-реципиента; построение (конструирование) тканевой матрицы; выравнивание и закрепление тканевых образцов в изготовленной тканевой матрице; микротомию и прикрепление парафиновых срезов на предметные стекла (рис. 1). Каждый из этих этапов имеет свои особенности, которые необходимо учитывать при попытке успешно внедрить данную технологию в исследовательскую или диагностическую работу. Игнорирование даже самых мелких на первый взгляд деталей может обернуться потерей ценных тканевых ресурсов, а в некоторых случаях разочарованием в самой методике.

Самый длительный и ответственный этап построения ТМА это этап сбора и подготовки блоков-доноров и

Ответственный за ведение переписки -  
Храмцов А.И.,

Кафедра гематологии и онкологии  
Чикагского Университета, Чикаго, Иллинойс,  
США, 60615.

Электронная почта: practpath@marod.ru

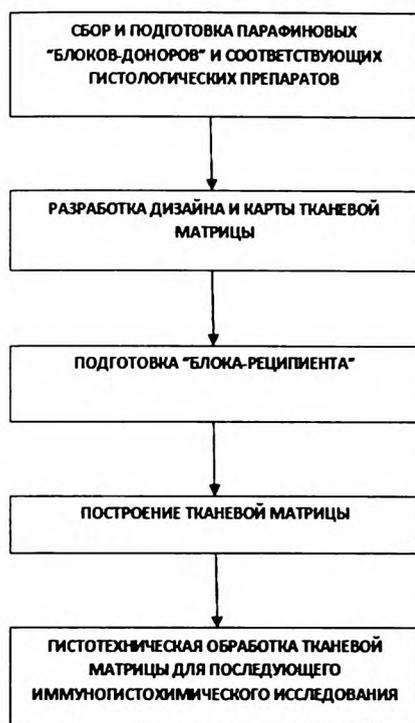


Рис.1. Схема изготовления ТМА

их разметка (рис. 2а). Именно на этом этапе необходима работа квалифицированного патолога, исследующего гистологические препараты и выбирающего материал, который будет использован для построения ТМА. Необходимо помнить, что ткань в парафиновых блоках-донорах должна иметь толщину не менее 2 мм (оптимальная толщина 3-4 мм) для дальнейшего извлечения тканевых цилиндров достаточной высоты [5]. Рекомендуется подбирать блоки примерно одинаковой толщины. Точную толщину ткани в составе парафинового блока можно измерять, используя радиографический метод с применением системы "Faxitron X-ray" [6]. Однако широкого применения, на наш взгляд, такая методика не нашла. Поэтому в практике можно использовать обычное увеличительное стекло (лупу) и измерительную линейку. Гистологические срезы соответствующих блоков, окрашенные гематоксилином и эозином, рекомендуется использовать в качестве ориентира для определения представительных участков ткани. Выбирать следует несколько репрезентативных участков из различных отделов. При выборе участков желательнее отдавать предпочтение периферическим отделам ткани, доступным для проникновения формалина во время фиксации, структурам без некроза, а также с минимальным количеством соединительной ткани. Следует также учитывать трехмерную структуру ткани [7, 8]. Области интереса следует обводить на поверхностях покровных стекол микропрепаратов и парафиновых блоков в точном соответствии друг другу, с последующей проверкой под контролем лупы (рис. 2б).

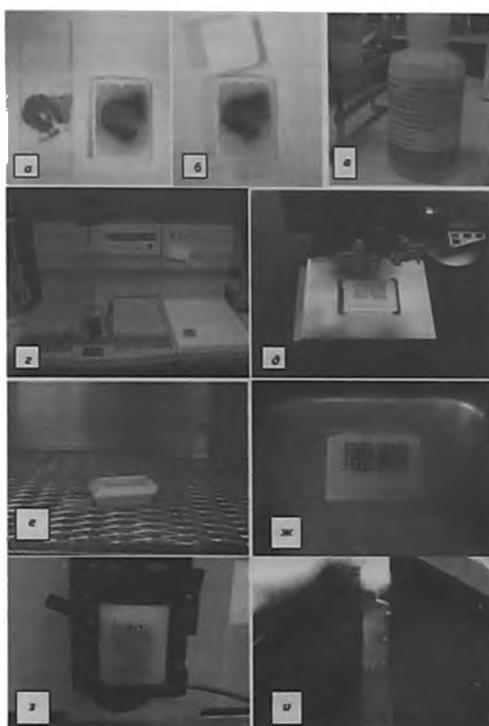
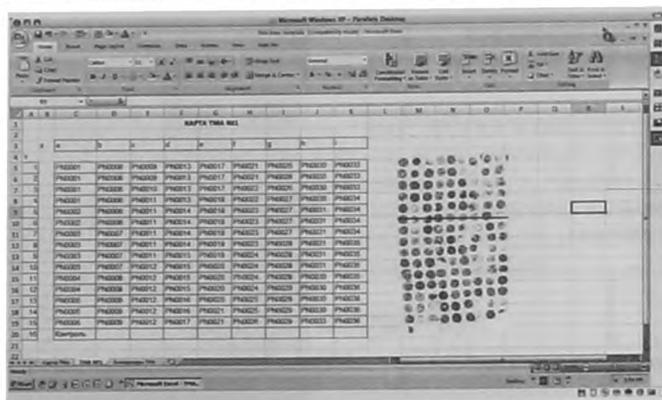


Рис.2. Основные этапы изготовления тканевой матрицы (ТМА). а - исследование гистологических препаратов и выбор блоков, которые будут использованы для построения ТМА; б - использование гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином для определения представительных участков ткани и разметка блоков; в - подготовка предметных стекол и покрытие их полилизинном; г - изготовление блока-реципиента на модульной системе для заливки парафином; д - построение ТМА-блока с использованием ручного инструмента; е - выравнивание и закрепление тканевых столбиков в ТМА-блоке проводимое в термостате с использованием предметного стекла; ж - охлаждение мастер-блока на льду и снятие стекла; з - микротомия ТМА с использованием ротационного микротома; и - расправление ленты парафиновых срезов ТМА в водяной бане с последующим переносом их на предметные стекла с полилизинновым покрытием.

Для разметки удобно пользоваться цветными перманентными маркерами для письма на стеклянных и твердых поверхностях.

Разработка дизайна ТМА обычно является начальным этапом в работе и зависит от целей и задач исследования. На этом этапе определяется какой материал и в каком количестве будет использоваться для построения ТМА. Составляется предварительная карта его расположения. Однако после исследования собранных гистологических препаратов и уточнения имеющихся в наличии тканевых ресурсов патоморфолог вносит коррективы и составляет окончательный вариант "карты ТМА" или как



**Рис. 3.** Карта расположения тканевых образцов в тканевой матрице составленная с использованием программы Microsoft Excel. Цифровой слайд среза ТМА блока. *Расположение каждого тканевого образца точно соответствует расположению на карте и легко находится в системе координат XY.*

ее часто называют в англоязычной литературе "map". Эта карта в дальнейшем используется при построении ТМА блока, а также является неотъемлемой частью процесса полукolicественного и количественного анализа данных (рис. 3).

Особенностью изготовления блока-реципиента является использование парафина или заливочной среды с температурой плавления 56-58°C и гистологической пластиковой заливочной формы. Мы отдаем предпочтение форме размерами 37x24x10 мм. Все остальные процедуры следует производить по стандартной методике с применением модульной системы заливки парафином с использованием гистологических кассет (рис. 2 г). Блоки-реципиенты с мейшими дефектами в виде воздушных пузырей или трещин отбраковываются и не используются для построения мастер-блока.

Непосредственно конструирование ТМА-блока состоит из нескольких циклически повторяющихся этапов:

- пробивание пустого блока-реципиента иглой-пробойником цилиндрической формы;
- извлечение парафинового цилиндра из блока-реципиента с целью создания полого отверстия;
- извлечение тканевого цилиндра из парафинового блока-донора;
- перенос и вставка тканевого цилиндра в заготовленное отверстие блока-реципиента;
- продолжение цикла с целью перемещения следующего тканевого цилиндра из нового блока-донора в новое отверстие блока-реципиента в соответствии координатами на карте ТМА.

Для извлечения тканевых цилиндров удобно использовать металлические иглы-пробойники с внутренним зондом (в виде биопсийной иглы с внутренним проводником). Выбор диаметра пробойника, расстояние между тканевыми образцами следует определить на этапе планирования ТМА с учетом типа и количества исследуемого материала. Диаметр столбиков может быть от 0,6 до 2,0 мм. Высота столбиков также варьирует в зависимости от толщины блока-донора. Количество тканевых

цилиндров в матрице может варьировать от 50 до 1000 и определяется целями и задачами исследования (рис. 2 д) [9].

В качестве стратегии сохранения тканевых ресурсов при гистологической обработке ТМА необходимо использовать специальные технические подходы. Одним из них является выравнивание и закрепление тканевых образцов в изготовленной тканевой матрице. Выступающие на различную высоту тканевые столбики над поверхностью блока следует выравнивать легким нажатием предметного стекла. Для дальнейшего выравнивания поверхности ТМА и закрепления тканевых столбиков блок необходимо поместить в термостат (37-40 °С, 10 минут) с этим стеклом (рис. 2 е). Стекло следует снять после охлаждения блока на льду (рис. 2 ж).

Другим немаловажным моментом является микротомия ТМА и прикрепление парафиновых срезов на предметные стекла. Одни исследователи для микротомии используют специальную систему переноса срезов на стекло с использованием полимерной ленты [5, 10]. Другие предпочитают использовать обычный способ изготовления срезов (рис. 2 з, рис. 2 и) [11]. Особенно является необходимо использовать позитивно заряженных предметных стекол с полилизининовым покрытием (рис. 2 в) [2].

Важным является способ хранения и использования стекол с парафиновыми неокрашенными срезами. Стекла с неокрашенными срезами ТМА лучше использовать для иммуногистохимического (ИГХ) исследования сразу или в течение нескольких дней, поскольку антигенные свойства для многих биомаркеров со временем могут ухудшаться. В современной литературе описана методика длительного хранения стекол ТМА с парафиновым покрытием в десикаторе и в атмосфере с повышенным содержанием азота [12, 13]. Однако, на наш взгляд, такая необходимость возникает редко. Если срезы не были использованы для ИГХ экспериментов сразу, следует хранить их в плотно закрытых пластиковых коробках при температуре - 20°C. При необходимости лучше дорезать

блок и изготавливать не более 15-20 срезов за один раз на ротационном микротоме, предназначенном только для работы с ТМА.

Окрашивание ТМА срезов следует производить по стандартным протоколам, применяемым в рутинной работе иммуногистохимической лаборатории. Следует учитывать, что количество используемых антител и реагентов при окрашивании ТМА срезов уменьшается в несколько раз и позволяет получить дополнительные материальные ресурсы, которые могут быть в дальнейшем использованы на внедрение новых технологий.

Несомненно, оптимальным методом исследования гистологических ТМА стекол является компьютеризованный анализ цифровых изображений, полученных при использовании сканирующих систем [14]. Такой подход позволяет, не только получить более точные данные с применением компьютерных программ для анализа цифровых изображений, но и дает возможность пересылать эти данные для консультирования с помощью сети интернет и облегчает процесс сотрудничества различных медицинских учреждений. Если такой метод не доступен, рекомендуется полуколичественная оценка с использованием обычного светового микроскопа. Для объективизации исследования оценка результатов ИГХ должна быть произведена независимо несколькими морфологами. Возникшие разногласия могут быть разрешены при дополнительном совместном пересмотре ТМА микропрепаратов [11]. Полуколичественную оценку ИГХ окрашивания следует проводить в соответствии со стандартами, разработанными для каждого маркера. Системы полуколичественного анализа, как правило, основываются на оценке интенсивности ИГХ реакции и проценте (пропорции) положительно окрашенных клеток. Так, например, для анализа уровня экспрессии к рецепторам гормонов в раке молочной железы используются "Allred score", "H-score" в зависимости от принятых в лаборатории стандартов и целей исследования [15, 16]. Для оценки уровня экспрессии онкобелка HER-2/neu используется стандарт "HercepTest" [17].

Однако, каждый исследователь знает, что мало получить достоверные результаты, их еще надо правильно проанализировать. Данные, полученные при исследова-

нии множественных биомаркеров с использованием ТМА, характеризуются высокой степенью аналитической сложности, и, также как и результаты, полученные при исследовании уровня экспрессии десятков и сотен тысяч генов при использовании технологии генных микрочипов, требуют применения методов статистики и биоинформатики. Для обработки такого количества данных может быть применен кластерный анализ. Кластерные методы используются в анализе экспрессии множественных генов [18]. Методами кластерного анализа (таксономии, классификации, кластеризации) решается задача разделения множества объектов, таким образом, чтобы все объекты, принадлежащие одному кластеру, были более похожи друг на друга, чем на объекты других кластеров.

В онкологических молекулярных исследованиях широкое применение нашел иерархический кластерный алгоритм, позволяющий выявить молекулярные профили опухолей [19, 20, 21, 22, 23]. Разработаны программы GeneCluster [18] и Java TreeView [24], которые позволяют проводить сложный иерархический кластерный анализ. Эти программы просты в обращении и могут быть использованы даже исследователями, не обладающими значительными познаниями в области статистического программирования. Необходимо также создание электронных баз данных и библиотек цифровых изображений микропрепаратов ТМА с ИГХ окрашиванием различными биомаркерами для клинико-морфологических сопоставлений.

В настоящее время исследователи имеют огромное количество показателей, которые могут помочь в диагностике, прогнозировании заболеваний, выборе терапии. Однако, большинство молекулярно-биологических маркеров пока еще не вошли в рутинную практику, что определяется высокой стоимостью исследований и сложностью интерпретации полученных данных. Сегодня основной задачей является определение такого набора показателей, который позволил бы при минимальной стоимости обследования обеспечить максимальную эффективность лечения каждого пациента. Решить такого рода проблему может внедрение в клиническую и патологоанатомическую практику новой технологии ТМА в сочетании с ИГХ и использование компьютерных программ для статистического и кластерного анализа. ■

## Литература:

1. Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4 (7): 844-847.
2. Криволапов Ю.А., Храмов А.И. Применение тканевых матриц в иммуногистохимии. *Арх. пат.* 2005; 67(2): 48-50.
3. Пальцев М.А., Бондарев Н.Э., Бондарев И.Э. и соавт. Прогрессивные исследования в морфологии - тканевые матрицы. *Молекулярная медицина*. 2009; 4: 4-12.
4. Петров С.В., Мачадо И., Булычева И.В. и соавт. Новые подходы в диагностике мелко-крупноклеточных опухолей костей и мягких тканей. *Арх. пат.* 2009; 71 (1): 34-39.
5. Schweizer M.S., Schumacher L., Rubin M.A. Constructing tissue microarrays for research use. *Curr Protoc Hum Genet* 2004; Chapter 10: Unit 10.7.
6. Kong X., Zhao Y., Ksionsk M et al. Radiographic determination of tissue thickness in paraffin blocks: application to the construction of tissue microarrays. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15 (1): 108-112.
7. Callagy G., Cattaneo E., Daigo Y. et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol* 2003; 12 (1): 27-34.
8. Dhir R. Tissue microarrays: an overview. *Methods Mol Biol* 2008; 441: 91-103.

9. Radhakrishnan R., Solomon M., Satyamoorthy K., Martin L.E., Lingen M.W. Tissue microarray - a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med* 2008; 37 (3): 166-176.
10. Skacel M., Skilton B., Pettay J.D., Tubbs R.R. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10 (1): 1-6.
11. Kajdacsy-Balla A., Geynisman J.M., Macias V. et al. Practical aspects of planning, building, and interpreting tissue microarrays: the Cooperative Prostate Cancer Tissue Resource experience. *J Mol Histol* 2007; 38 (2): 113-121.
12. DiVito K.A., Charette L.A., Rimm D.L., Camp R.L. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest* 2004; 84 (8): 1071-1078.
13. Henson D.E. Loss of p53-immunostaining intensity in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88 (15): 1015-1016.
14. Marinelli R.J., Montgomery K., Liu C.L. et al. The Stanford Tissue Microarray Database. *Nucleic Acids Res* 2008; 36 (Database issue): D871-877.
15. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11 (2): 155-168.
16. McCarty K.S., Szabo E., Flowers J.L. et al. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res* 1986; 46 (8 Suppl): 4244-4248.
17. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (1): 118-145.
18. Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (25): 14863-8.
19. Perou C.M., Surlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406 (6797): 747-752.
20. Datta S., Datta S. Comparisons and validation of statistical clustering techniques for microarray gene expression data. *Bioinformatics* 2003; 19 (4): 459-466.
21. Datta S., Datta S. Evaluation of clustering algorithms for gene expression data. *BMC Bioinformatics* 2006; 7 Suppl 4: S17.
22. Makretsov N.A., Huntsman D.G., Nielsen T.O. et al. Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (18 Pt 1): 6143-6151.
23. Huo D., Ikpat F., Khramtsov A. et al. Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27 (27): 4515-21.
24. Saldanha A.J. Java Treeview-extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 2004; 20 (17): 3246-3248.