

ТЪКАННА МАТРИЦА – МОСТ МЕЖДУ НАУКА И ДИАГНОСТИКА

Д. Ташкова¹, С. Бачурска¹, Д. Стайков¹, Ц. Михалкова¹, П. Рашев² и В. Беловеждов¹

¹Отделение по клинична патология, Катедра по обща и клинична патология, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ – Пловдив

²Секция “Имунобиология на репродукцията”, Институт по биология и имунология на размножаването, БАН – София

TISSUE MICROARRAY – A BRIDGE BETWEEN SCIENCE AND DIAGNOSTICS

D. Tashkova¹, S. Bachurska¹, D. Staykov¹, C. Mihalkova¹, P. Rashev² and V. Belovezhdiv¹

¹Department of General and Clinical Pathology, Medical University – Plovdiv

²Section “Immunobiology of Reproduction”, Institution of Biology and Immunology of Reproduction, BAS – Sofia

<p>Резюме:</p> <p>Ключови думи:</p> <p>Адрес за кореспонденция:</p>	<p>Тъканната матрица (ТМ) е новият, ефективен и икономичен метод в туморната и молекулярната патология, скрининга, качествения контрол в диагностичната имунохистохимия. Тази методика дава възможност за едновременното изследване на десетки до стотици проби от еднакви или различни тъкани по едно и също време, при едни и същи условия с използването на стандартните протоколи за различните анализи. Настоящата статия има за цел да представи правилата за изготвяне на ТМ, подбора на оптималния дизайн, както и да изтъкне предимствата и ограниченията на метода.</p> <p>тъканна матрица, конструкция, дизайн</p> <p><i>Д-р Десислава Ташкова, Отделение по клинична патология, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ, бул. „Васил Априлов“ № 15А, 4000 Пловдив, тел. 0886 613211, сл. тел. 032 602 387, e-mail: desi.tashkova@abv.bg</i></p>
<p>Summary:</p> <p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p>Tissue microarray (TMA) is the new, high-throughput technology widely used as a tool for quality control of diagnostic immunohistochemistry, in oncology, molecular pathology and screening of diseases. This method combines tens to hundreds of specimens of different tissues onto a single slide for investigation at the same time, at the same conditions, using the standard protocols for all the different analysis. The aim of this review was to describe the construction and the optimal design of TMA, as well as to show the main advantages and disadvantages of this method.</p> <p>tissue microarray, TMA, construction, design</p> <p><i>Desislava Tashkova, M. D., Department of General and Clinical Pathology, Medical University, 15A Vasil Aprilov Blvd., Bg – 4000 Plovdiv, tel. +359 886 613211, +359 32 602 387, e-mail: desi.tashkova@abv.bg</i></p>

ВЪВЕДЕНИЕ

Терминът тъканна матрица (ТМ) е въведен през 1998 г. от Кополен и сътр. [11]. Това е бърз, надежден и икономичен метод, широко използван както в рутинната диагностична практика, така и в научноизследователската дейност [2, 17]. Чрез използването на ТМ е възможно едновременно изследване на десетки или стотици тъканни проби, при спазване на основните изисквания на имунохистохимичната диагностика – еднакви условия на работа с тъканните срези.

Изработените образци са подходящи както за автоматизирани системи, така и за мануална обработка [15]. ТМ е основен метод в туморната и молекулярната патология, скрининга, качествения контрол в диагностичната имунохистохимия, обучението [5]. Освен това се прилага достатъчно успешно и в борбата с редица инфекциозни заболявания [12].

Първата концепция за оформянето на парафиново блокче, съдържащо множество тъканни проби, е описана от Battifora през 1986 г. Идеята

е доразвита от Wan една година по-късно. Той създава база данни от включени в парафин „корове“ от различни тъкани с цел изследването на нови моноклонални антитела и съпоставка на тяхната експресия [12]. Създадената от Koponen и сътр. ТМ, която познаваме и днес, притежава редица предимства в сравнение с описаните преди това. Тази техника дава възможност за изработването на блокче реципиент, съдържащо до 1000 тъканни проби с взети от блокчета донори пънчове, подредени по определен начин, което позволява тяхното прецизно изследване, анализиране и документиране [9].

ВИДОВЕ ТМ

Матриците се разделят на няколко вида. В зависимост от използвания материал те биват:

1. Парафинови матрици, получени от включени в парафин проби от различни органи – нормални или патологично променени, наречени просто tissue microarrays [12].

2. Клетъчни матрици – получени от включени в парафин клетъчни култури от нормални или туморни клетки. Използват се предимно за доказване на клетъчни протеини [14].

3. Криостатни матрици – получени от замразени, нефиксирани тъкани. Поради използването на ниски температури за изготвянето им, значително се уврежда тяхната морфология и структура, но се запазва конформационната структура на клетъчните протеини и нуклеиновите киселини. Това прави този вид матрици особено подходящи при изследването на различни генетични биомаркери [18].

Най-широко използвани са парафиновите матрици. Те намират приложение в различни области на науката и практиката, предимно в имунохистохимичната и *in situ* хибридизационната диагностика. Отделните видове ТМ трябва да отговарят на един-единствен въпрос – Каква е тяхната цел? [11].

Основната цел на тъканната матрица е: обработката на голям брой проби при еднакви лабораторни условия с намален разход на антитела и реактиви.

Едновременната стандартизирана обработка позволява пряка съпоставка на експресията на различни протеини и гени в отделните стадии на развитие на туморния процес в даден орган. Например при изучаване на генезата на карцинома на дебелото черво може да бъде изработена тъканна матрица с включени проби от нормална дебелочревна лигавица, от аденоми с ниска и високостепенна дисплазия на епитела,

от карциноми с различна степен на диференциация; при проследяване карцинома на простатната жлеза – тъкани от пациенти с бенигна хиперплазия, с ниско и високостепенен ПИН, карциноми преди и след терапия и т.н. [9, 11].

Тъканните матрици се прилагат и при изследването на различни прогностични биомаркери, свързани с клиничното протичане, прогнозата, риска от рецидиви и метастази, както и ефекта от дадена терапия, например при определяне на експресията за HER2 при карцинома на млечната жлеза [11, 12].

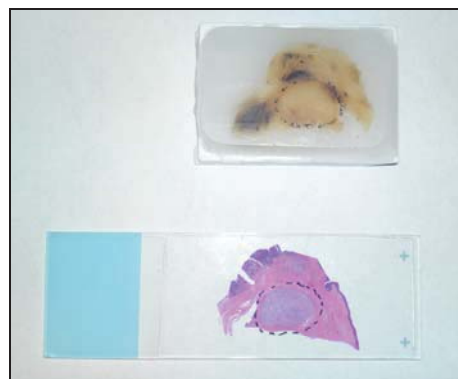
ТМ намират приложение и при разработването и валидизирането на нови моноклонални антитела, чрез изследване експресията на протеини не само в патологично променени, но и в нормални тъкани. Те са основен метод за качествен контрол в имунохистохимичните лаборатории. Могат да бъдат използвани и с обучителна цел, особено при рядко срещани заболявания [12].

Все още не са напълно проучени всички възможни приложения на тъканната матрица. Благодарение на този метод е възможно в бъдеще архивът на всяка патологична лаборатория да бъде трансформиран в „тъканен чип“ [11].

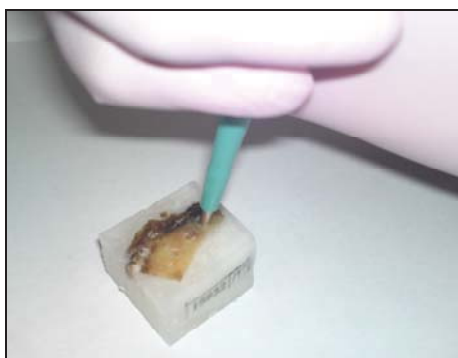
ДИЗАЙН И КОНСТРУКЦИЯ НА ТМ

Подготовка на блокче донор

Целта на проучването определя до голяма степен изграждането и оформянето на „дизайна“ (брой на тъканните „корове“, разпределение и др.) на тъканната матрица. След като изберем парафиновите блокчета донори, е необходимо от тях да се изготвят нови срези, оцветени по стандартна методика (хематоксилин и еозин). Всеки срез се анализира на светлинен микроскоп, зоната, представляваща интерес, се огражда за последващото ѝ отделяне [12] (снимка 1 и 2).



Снимка 1. Парафиново блокче донор и хистологичен срез, оцветен с хематоксилин-еозин (H-E)



Снимка 2. Отделяне на късче тъкан от блокчето донор

След това трябва да бъдат решени два важни въпроса:

Първо, колко броя "пънчета" е необходимо да се вземат от всяко едно блокче донор, за да могат получените чрез тъканната матрица резултати да са съпоставими с тези, които биха се получили при изследване на площта на цял срез. Широко прието е становището, че три е оптимален за целта брой, което дава 98% съпоставими резултати [7, 8, 16]. Има проучвания обаче, доказващи, че монтиране на един-единствен „кор“ има идентичен процент [3], както и такива, че са необходими четири проби за постигане на достоверни резултати [6]. Предимствата на по-големия брой са: по-малък риск от загуба на материал и по-голямо количество тъкан, достъпна за анализ; недостатък е по-малкият брой на случаите, възможни за включване в матрицата.

Вторият важен въпрос е диаметърът на пънчетата. В момента са достъпни няколко фабрично изготвени апарати за конструиране на матрици, които предлагат биопсични игли с диаметър от 0,6 mm до 3-4 mm. По-малкият диаметър позволява включването на по-голям брой тъканни „корове“, но площта е доста ограничена, а и рискът от загуба на материал е по-голям. По-големият диаметър на пънчето дава възможност да се обхванат различни хистологични структури (както при гастробиопсиите например от мукоза до сероза), да се вземе материал от гефрирното блокче, но ограничава бройката на случаите за всяка матрица [12].

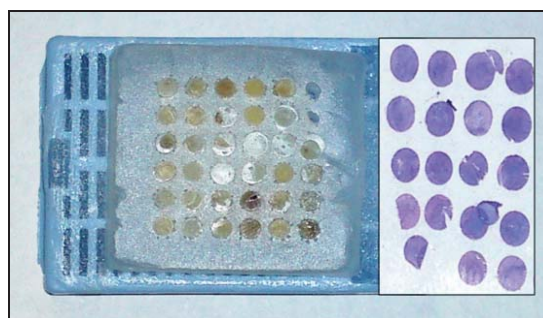
Изготвяне на блокче реципиент

Съществуват няколко методики за изготвяне на блокче реципиент. За целта могат да се използват фабрично предлагани апаратчета за матрици (Breecher, Veridiam, Unitma) или ръчно направени [1]. И в двата случая се изготвя парафиниво блокче с цилиндрични отвори за поставяне на пънчета, взети от блокче донор. Тези отвори могат да се отсекаят едно по едно

(ръчно или автоматично), но това не позволява да се направи прецизно отстояние между отделни отвори. За преодоляване на този недостатък понастоящем се използват синтетични матрици за изготвяне на блокче реципиент [13] (снимка 3 и 4).



Снимка 3. Синтетична матрица и блокче реципиент



Снимка 4. Готово блокче реципиент и хистологичен срез, оцветен с хематоксилин-еозин (H-E)

Дизайн на матрицата

На една матрица могат да се монтират от 100 до 1000 пънчета [10]. Зависимостта между броя на късчета от тъканите, както и възможността за загубата на някои от тях по време на техническата изработка правят изключително отговорно решението за избора на схемата на матрицата. Много важно е също как се разполагат позитивните и негативните контроли. Добре подбраната схема на матрицата би трябвало да позволи лесно ориентиране дори при загубата на някои от пробите [12, 13].

Построяване на блокче реципиент

Построяването на тъканната матрица се изразява в монтиране на взетите от блокчета донори късчета тъкан в предварително оформени кухи цилиндри в блокче реципиент. Важен елемент на този процес е правилно подбраният и прецизно взет тъканен цилиндър със строго определена височина. Монтирането на пънчета с различни височини на една и съща матрица ще

доведе до ненужна загуба на тъкан при изравняване на блокчето. От друга страна, прекалено тънкото блокче донор също представлява препятствие за технически правилното построяване на матрицата. Този недостатък може да бъде преодолян чрез идентифицирането на няколко зони на интерес в блокчето донор, след което пънчетата, взети от тези зони, да се поставят едно върху друго в кухия цилиндър на блокчето реципиент, като по този начин се запълни цялата височина на цилиндъра [13, 14].

След като блокчето реципиент е готово, то се поставя за определен период в термостат за подобро и равномерно вграждане на парафиновите цилиндри в кухините на приемащото ги парафиново блокче. След охлаждането от него могат да се изработят до 200 среза както за рутинно оцветяване с хематоксилин-еозин, така и за имунохистохимично изследване, флуоресцентна *in situ* хибридизация и др. [12, 15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бурното развитие на съвременната наука налага въвеждането на нови, едновременно високоспецифични и икономични методи за изследване. Тъканната матрица е точно такава методика, позволяваща извличането на максимален обем информация при използването на определено количество тъкан, при минимален човешки и финансов ресурс. Въпреки някои слабости, широкото приложение на ТМ ще затвърди нейното място в практиката и в бъдеще ще даде възможност за рутинното изследване на редица прогностични маркери.

Библиография

1. Порязова, Е. и З. Запрянов. Тъканната матрица – ефективен и икономичен метод при имунохистохимични проучвания в онкологичната практика. – Мед. преглед, 45, 2009, № 2, 67-71.
2. Милчев, Н., И. Баташки, Д. Старибратова и З. Запрянов. Трофобластна експресия на епидермален растежен фактор (EGFR) в плаценти с преeklampсия. – Акуш. и гинекол., 45, 2006, № 2, 21-24.

3. Camp, R. L., L. A. Charette et D. L. Rimm. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. – *Lab. Invest.*, 80, 2000, 1943-1949.
4. Chung, G. G. et al. β -Catenin and p53 analyses of a breast carcinoma tissue microarray. – *Cancer*, 100, 2004, № 10.
5. Equiluz, C. et al. Multitissue array review: chronological description of tissue array techniques, applications and procedures. – *Pathol. Res. Pract.*, 202, 2006, № 8, 261-268.
6. Goethals, L. et al. A new approach to the validation of tissue microarrays. – *J. Pathol.*, 208, 2006, 607-614.
7. Hoos, A. et al. Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis – *Clin. Cancer Res.*, 8, 2002, 3841-3849.
8. Hoos, A. et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. – *Am. J. Pathol.*, 158, 2001, № 4, 1245-1251.
9. Jordan, F. et al. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, hMSH2 immunohistochemical expression. – *Virch. Arch.*, 443, 2003, 115-121.
10. Kallioniemi, O. P. et al. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. – *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2001, 657-662.
11. Nocito, A. et al. Tissue microarrays (TMAS) for high-throughput molecular pathology research. – *Int. J. Cancer*, 94, 2001, 1-5.
12. Parsons, M. et H. Grabsch. How to make tissue microarray. – *Diag. Histopathol.*, 15, 2009, № 3, 142-150.
13. Peerwani, Z. Tissue microarrays. – In: *Cell and tissue based molecular pathology*. R. R. Tubbs et M. H. Stoler. (Eds.). Philadelphia, Elsevier, 2009, 91-103.
14. Saxena, R. et S. Badve. Tissue microarray – construction and quality assurance. – In: *Immunohistochemical (IHC) staining methods*. J. L. Kumar et L. Rudbeck. (Eds.). Education guide. 5th ed., Dako, 2009, 43-50.
15. Takikita, M., J. Y. Chung et S. M. Hewitt. Tissue microarrays enabling high-throughput molecular pathology. – *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, 2007, № 4, 318-325.
16. Thororst, J. et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. – *Am. J. Pathol.*, 159, 2001, № 6.
17. Vogel, U. F. Depositing archived paraffin tissue core biopsy specimens in paraffin tissue microarrays using a paraffin tissue punch modified with a countersink. – *J. Clin. Pathol.*, 60, 2007, 206-207.
18. Zhou, L. et al. New tissue microarray technology for analyses of gene expression in frozen pathological samples. – *Bio Tech.*, 43, 2007, 101-105.

Постъпил за печат на 11 ноември 2013 г.