

ТКАНЕВЫЕ МАТРИЦЫ: НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОГИНЕКОЛОГИИ

Академик РАМН АЙЛАМАЗЯН Э. К.¹, КВЕТНОЙ И. М.¹, БОНДАРЕВ Н. Э.^{2,3},
БОНДАРЕВ И. Э.³, КОСТЮЧЕК И. Н.¹

¹ГУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН», Санкт-Петербург,

²Санкт-Петербургский ГУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург,

³Кафедра акушерства и гинекологии Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Айламазян Э. К., Кветной И. М., Бондарев Н. Э., Бондарев И. Э., Костючек И. Н. Тканевые матрицы: новые технологии повышения эффективности диагностики в онкогинекологии // Мед. академ. журн. 2009. Т. 9. № 4. С. 18–26. ГУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН», Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3; Санкт-Петербургский ГУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург, 197022; Кафедра акушерства и гинекологии Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044.

Метод тканевых матриц активно развивался и модернизировался в последние 20 лет. Изучены многие аспекты этого метода, а именно: соответствие результатов матричной технологии результатам стандартных исследований, трудозатраты по созданию матрицы, варианты оценки результатов исследования, сохранение антигенности тканей и т. д.

В настоящей статье метод тканевых матриц использован для изучения злокачественных опухолей женской репродуктивной системы у большого контингента больных. Оцененные на практике высокая пропускная способность, возможность быстрого стандартизованного обследования большого количества пациентов на различные маркеры, экономичность и адекватность метода позволяют рекомендовать его для широкого внедрения в практику. Применение тканевых матриц в клинической гистологии существенно расширяет возможности диагностики различных видов патологии и способствует становлению предиктивной медицины.

Скорость, с которой новые прогностические факторы, определяющие модальность терапии, генерируются и переносятся в клиническую практику, требует новых методологических подходов, дающих возможность своевременной или ретроспективной оценки этих клинически значимых факторов у большого количества пациентов. Широкое использование тканевых матриц в ближайшее время должно стать интегральной частью ежедневной работы при проведении научных и рутинных клинических исследований.

Ключевые слова: тканевая матрица, иммуногистохимическое исследование, гистологическая техника, онкогинекология.

Aylamayan E. K., Kvetnoy I. M., Bondarev N. E., Bondarev I. E., Kostujchek I. N. Tissue matrices: New technologies to increase the diagnostic efficiency in oncogynecology // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 4. P. 18–26. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg; Sity Clinical oncologic dispensary, St. Petersburg, 197022; Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044.

The method of tissue microarrays (TMA), invented by H. Battifora [1], was developing actively and modernized during last 20 years. Many aspects of this method have been studied: validation of the results of TMA technology to the results of the standard research methods, the expenses of TMA creation, variants of the estimation of the results of TMA research, tissue antigenicity preservation etc [4, 5, 17]. Recently research of paraffin tissue banks in the aim of retrospective search for new tumor markers was considered as «a titanic work». Today TMA method makes this work a reality [12].

The authors of the present publication have used TMA method for studying of malignant gynecologic tumors in big cohorts of patients. High-throughput, estimated in practice, an opportunity of the fast standardized analyses of numerous patients for various biomarkers, economy and adequacy of TMA method allow to recommend this method for practical use.

Application of TMA method in clinical histology expands the diagnostic opportunities for different kinds of pathology essentially and promotes the foundation of predictive medicine [14].

The speed with which new prognostic factors, defining the modality of therapy, are generated and transferred into clinical practice, demands the new methodological approaches enabling real-time or retrospective estimation of these clinically significant factors in numerous patients.

Wide use of TMA method will become an integrative part of work for scientific and routine clinical research in future.

Key words: tissue microarray, immunohistochemistry, histological technique, oncogynecology.

В настоящее время иммуногистохимические исследования являются неотъемлемой частью патоморфологической диагностики в онкологии. Исследование рецепторного статуса злокачественных опухолей эндометрия, некоторых видов сарком матки стало стандартом обследования для определения целесообразности проведения гормонотерапии в комплексном лечении онкологических больных.

Научные исследования, направленные на поиск новых мишеней таргетной терапии, индивидуальную морфофункциональную оценку злокачественной опухоли, а также проведение рутинного скринингового иммуногистохимического обследования больших когорт пациентов требуют значительных материальных и трудовых затрат. Использование высокотехнологичных методик, обладающих высокой пропускной способностью, позволяет сократить время проведения исследования и снизить его стоимость.

Одним из методов, позволяющих оптимизировать проведение серийных иммуногистохимических исследований, является метод тканевой матрицы, разработка которого интенсивно ведется в течение последних 20 лет.

Автором идеи тканевой матрицы является американский патолог Н. Battifora [1, 2]. Он разработал новый метод тестирования антител – «многоопухолевый тканевой блок» (multitumor tissue block), суть которого заключалась в технологии расположения на одном предметном стекле множества образцов тканей. Такая технология позволяла получать бесконечное множество абсолютно идентичных многокомпонентных тканевых срезов. Battifora вырезал с поверхности парафиновых блоков исследуемых опухолей длинные тонкие бруски тканей, депарафинизировал их, складывал бруски от различных образцов вместе «в пучок» и заливал парафином весь образец целиком (рис. 1). Один срез с парафинового пучка, изготовленного таким образом, мог содержать до 100 фрагментов различных тканей и позволял оценить качество антител для иммуногистохимического исследования на многих образцах путем обработки реагентом лишь одного предметного стекла. Одним из важнейших преимуществ методики явились абсолютно одинаковые условия окрашивания антителом множества различных тканей.

Идея создания многокомпонентного тканевого блока получила дальнейшее развитие в работах группы ученых под руководством W. H. Wan [16]. Усовершенствованная методика представляла собой выполнение миниатюрной трепан-биопсии донорских исследуемых блоков (рис. 2) и размещение полученных биоптатов в одном донорском блоке в определенном порядке (multi-tissue straw of paraffin-embedded tissue cores). При этом количество распознаваемых образцов на одном микропрепарате достигло 120.

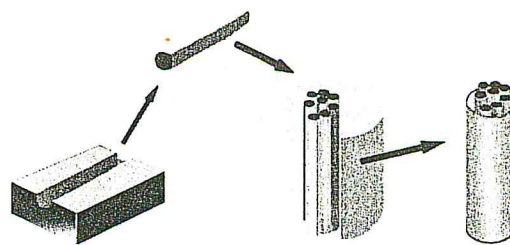


Рис. 1. Схема изготовления тканевого блока по Н. Battifora

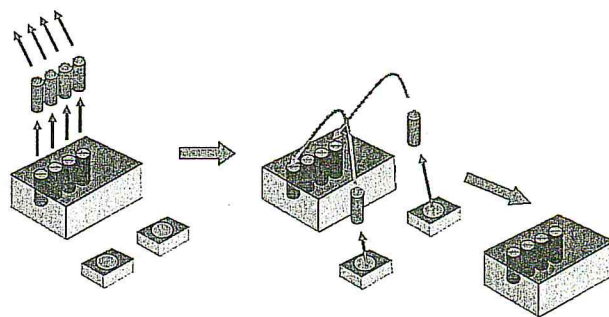


Рис. 2. Схема изготовления тканевого блока по W. H. Wan

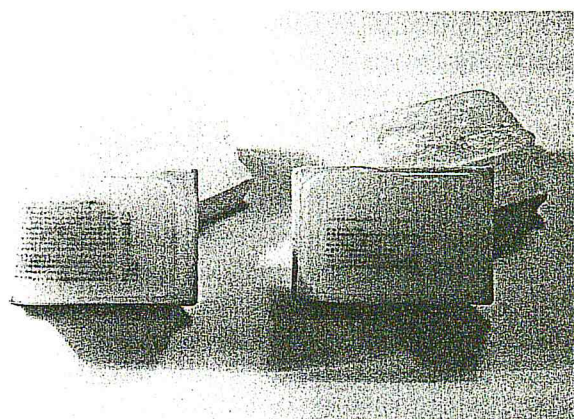


Рис. 3. Тканевой блок, изготовленный по методу J. Koponen

Большое количество работ было посвящено модификации и усовершенствованию тканевых матриц, что привело к разработке в 1998 г. J. Koponen с сотрудниками [8] методики, которая позволяет с использованием микротехники создавать матрицу, содержащую более 1000 микрообразцов тканей, расположенных на матрице в системе координат X-Y (рис. 3). Эта методика и является в настоящее время наиболее широко применяемой в практике. Эта же группа ученых впервые ввела термин tissue microarray – «тканевая матрица», который получил всеобщее признание.

Термин «тканевая матрица» объединяет в себе все методики, обеспечивающие расположение множества тканевых образцов на одном микропрепарате.

Метод тканевых матриц (Tissue MicroArrays – ТМА) позволяет прицельно переносить фрагменты ткани из обычного парафинового блока (донорного блока) в так называемую «тканевую матрицу» (матричный блок), которая представляет собой множество вмонтированных в один парафиновый блок тканевых фрагментов.

Тканевая матрица может быть изготовлена из нативных, свежемороженых [15], фиксированных в формалине, парафинизированных или депарафинизированных тканей [1, 2]. Матрицы, содержащие замороженные тканевые образцы, могут быть использованы для иммуногистохимических исследований, верификации РНК методом гибридизации *in situ*. Существуют модификации методов создания матриц для мини-образцов тканей, получаемых стандартизованным путем: тонкоигольчатых биопсий, клеточных суспензий (аспирационных образцов костного мозга, клеток крови, ликвора, экссудатов или трансудатов, клеточных культур) [11].

Было доказано, что многие белки сохраняют свою антигенность в парафиновых блоках более 60 лет [4, 7, 13]. Это делает возможным создание парафиновых матриц из архивного материала. Тем не менее сохранение антигенных свойств тканей зависит от вида фиксации, особенностей создания донорских и матричных парафиновых блоков и получения микропрепаратов, условий хранения и т. п. Сам процесс создания тканевой матрицы не влияет на антигенность исследуемых тканей [2].

Необходимо подчеркнуть, что создание тканевой матрицы не влияет на качество исходных «донорских» парафиновых блоков, которые остаются доступными для традиционных видов исследований. Абсолютные потери тканевого образца при включении в матрицу незначительны и составляют менее 1 мм³ ткани. Метод тканевых матриц позволяет выполнять амплификацию и при необходимости – консервацию малых по объему тканевых образцов.

Формирование и хранение тканевых матриц имеет свои особенности, что требует создания и поддержания в лаборатории необходимых условий (температурный режим, влажность и т. п.).

В зависимости от цели создания тканевые матрицы могут быть тестовыми, исследовательскими, архивными и обучающими.

Тканевые матрицы могут изготавливаться с использованием различных подручных средств (иглы разного диаметра, спицы, скальпели, резиновые или пластиковые формочки для парафина) или промышленных аппаратов. Аппараты для подготовки материала по технологии множественнотканых парафиновых блоков (Tissue Arrayer – «тканевой арреер») состоят из оптической системы увеличения, электронно-контролируемого подвижного предмет-

ного столика, смещаемых штативов для донорского образца и собираемой парафиновой матрицы, системы перфораторов-эстракторов для забора и переноса микрообразцов тканей. В современных приборах все механические этапы приготовления матрицы автоматизированы.

Изготовление тканевой матрицы начинается с этапа планирования. Определяются цель и практические задачи, для решения которых создается матрица, вычисляется качественный и количественный состав исследуемых микрообразцов, изыскивается материал для отрицательных и положительных контролей. Следующим шагом является создание табличной карты поверхности матрицы в системе координат X-Y, где исследуемый и контрольный материал группируется по зонам (в зависимости от органной принадлежности, вида опухоли и т. д.), рассчитываются расстояния между образцами в зонах и между зонами.

Из практических соображений стабильности собранной матрицы, материал рекомендуется располагать не ближе чем в 3–4 мм от края рабочей поверхности матрицы; расстояние между образцами должно быть не менее половины диаметра микрообразца. Для устранения проблем с ориентацией срезов с матрицы в пространстве материал в матрице следует располагать асимметрично. Необходимо учитывать, что каждый исследуемый образец должен быть представлен в матрице как минимум 2–3 микрообразцами-повторами. Проведенные исследования показали, что если ткань на матрице представлена 3 тканевыми цилиндрами с диаметром не менее 600 мкм, то данные, полученные при исследовании этой ткани в матрице, не будут статистически различаться с данными, полученными при оценке всего исходного донорского блока [5].

После составления табличной карты матрицы каждому исследуемому образцу присваивается порядковый номер, состоящий, как правило, из буквы (столбец) и цифры (ряд). Полезным является предварительное создание электронной базы данных для тканевой матрицы (рис. 4), характеризующей каждый донорский блок, вносимый в матрицу: вид ткани, морфологическая характеристика образца, диагноз, стадия заболевания, при необходимости – информация о пациенте: пол, возраст, проведенное лечение и т. д.

Качество изготовленной матрицы напрямую зависит от тщательности отбора донорских блоков. Повторный анализ микропрепаратов позволяет убедиться в наличии искомой ткани в блоке, выделить «зоны интереса» для выполнения пункционного забора материала. Было установлено, что наиболее информативным является материал, полученный с периферии донорского блока, а не из его центра [12].

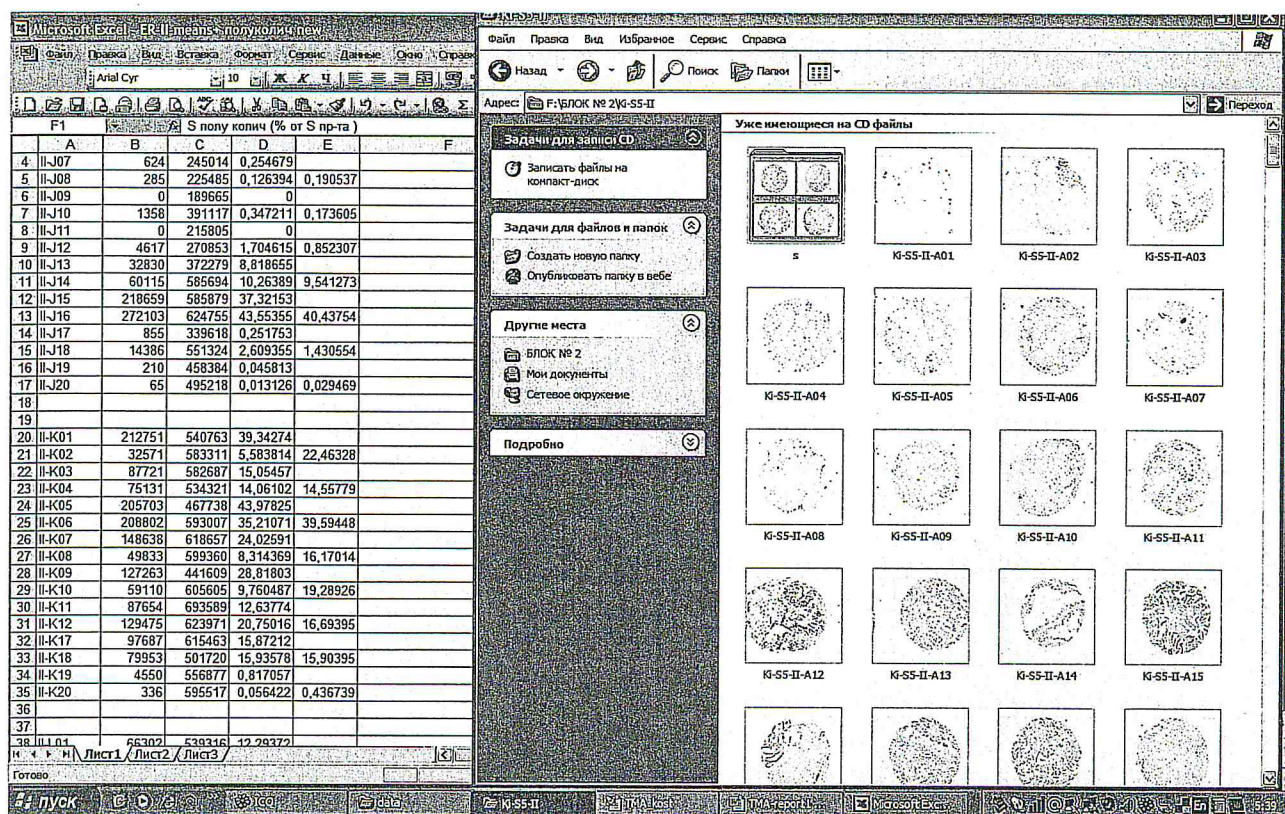


Рис. 4. Электронная база данных для тканевой матрицы

Схематично сам процесс создания матрицы состоит из многократного повторения следующего цикла действий: из пронумерованного донорского блока в «зоне интереса» перфоратором вырезается парафиновый цилиндр, содержащий «ткань интереса»; на поверхности матрицы, в месте, установленном графической схемой матрицы, вторым перфоратором вырезается и удаляется парафиновый цилиндр – в матрице остается свободная лунка; в свободную лунку матрицы с помощью системы переноса и экстрактора помещается «ткань интереса» из первого перфоратора.

При использовании современной техники тканевая матрица может содержать до 1000 микрообразцов ткани. Ограничением количества образцов в матрице является собственно размер стандартного предметного стекла. Высота тканевых цилиндров, получаемых из донорских парафиновых блоков, составляет 3–4 мм, что позволяет выполнить с тканевой матрицы более 200 полноценных рабочих срезов.

Тканевые матрицы предназначены для исследования экспрессии разнообразных биомаркеров, таких, как факторы роста, гормоны и их рецепторы, белки-регуляторы пролиферации и апоптоза и т. д. Основными преимуществами ТМА являются: возможность исследования большого объема материала, параллельное исследование опытной и контрольной группы, единообразие эксперимента, что позволяет

стандартизировать процесс изготовления препарата и проводить количественную оценку результатов.

Тканевые матрицы применяются как в научных целях, так и в клинической практике в качестве скринингового метода, для определения прогностических маркеров при исследовании опухолей. Метод применим в фармакологических исследованиях, особенно касающихся изучения действия химиопрепаратов.

ТМА могут быть изготовлены исследователем или созданы промышленным путем. Последние содержат стандартный набор тканевых образцов и необходимы для поиска новых прогностически значимых биомаркеров.

Несмотря на длительную историю существования метода тканевых матриц, его внедрение в практику проходит период становления.

Учитывая широкие разносторонние возможности метода тканевых матриц, с целью выработки собственного отношения к использованию ТМА, нами с 2002 г. начат сбор материала для коллекции злокачественных опухолей женских половых органов. Парафиновые блоки изготавливались по стандартной методике из нативных макробиоптатов злокачественных опухолей, полученных интраоперационно.

В настоящее время в собранной коллекции представлены различные морфологические виды злокачественных опухолей яичников, эндометрия, шейки матки, вульвы, варианты сарком матки; имеются биопсии первичных и метастатических злокачест-

венных опухолей, выполненные до начала и на фоне проведения специального химио-лучевого лечения, а также аутопсии прогрессирующих и рецидивных опухолей. Комплексная морфофункциональная оценка собранного материала позволит судить об изменении биологических свойств опухолевых клеток в различных стадиях течения раковой болезни.

Продолжающееся по настоящее время пополнение коллекции позволило с 2004 г. приступить к созданию в научных целях тканевых микроарреев — тканевых матриц. Изготовленные матрицы возможно охарактеризовать как исследовательские поисковые прогрессивные парафиновые матрицы, собранные из парафинизированного материала. В настоящем исследовательском проекте использовался промышленный механический микроарреер (Beecher Instruments Inc., США). Диаметр вмонтированных в матрицу образцов составил 600 мкм; расстояние между образцами — не менее 300 мкм; каждый опухолевый образец был представлен в матрице не менее чем в двух повторах.

Для создания одной тканевой матрицы требовалось от 1 до 4 рабочих дней. Для выполнения работы по созданию парафиновых матриц специальной переподготовки персонала не требовалось.

Имеющиеся микроарреи содержат информацию от 60 до 170 онкологических пациентов каждый (рис. 5); минимальное количество тканевых фрагмен-

тов на матрице составило 150, максимально матрицы включали в себя до 340 опухолевых фрагментов.

Серии микросрезов с тканевой матрицы изготавливали с помощью роторного микротомы Microm HM340E (Microm, Германия) и помещали их на простые и обработанные полилизинном предметные стекла (Menzel, Германия). Первый микросрез тканевой матрицы окрашивался по стандартной методике гематоксилином и эозином. Визуально оценивалось присутствие микрообразцов на срезе, наличие злокачественной ткани и качество материала в каждом микрообразце. Уровень информационных потерь в изготовленных матрицах не превышал стандартных значений [6].

В реальных условиях процесс считывания информации с микросрезов тканевой матрицы проводится специалистом визуально, что не позволяет полностью исключить субъективные девиации в заключении морфологического исследования. Более того, учитывая размеры каждого стандартного микрообразца матрицы площадью 0,280 мм², количество микрообразцов в матрице — в среднем от 100 до 300 на одном микросрезе, уровень информационных потерь при работе с матрицей — 5–10%, вероятность возникновения технических ошибок считывания возрастает. Для исключения ошибок подобного рода, упрощения считывания, архивирования и унификации обработки информации нами были использова-

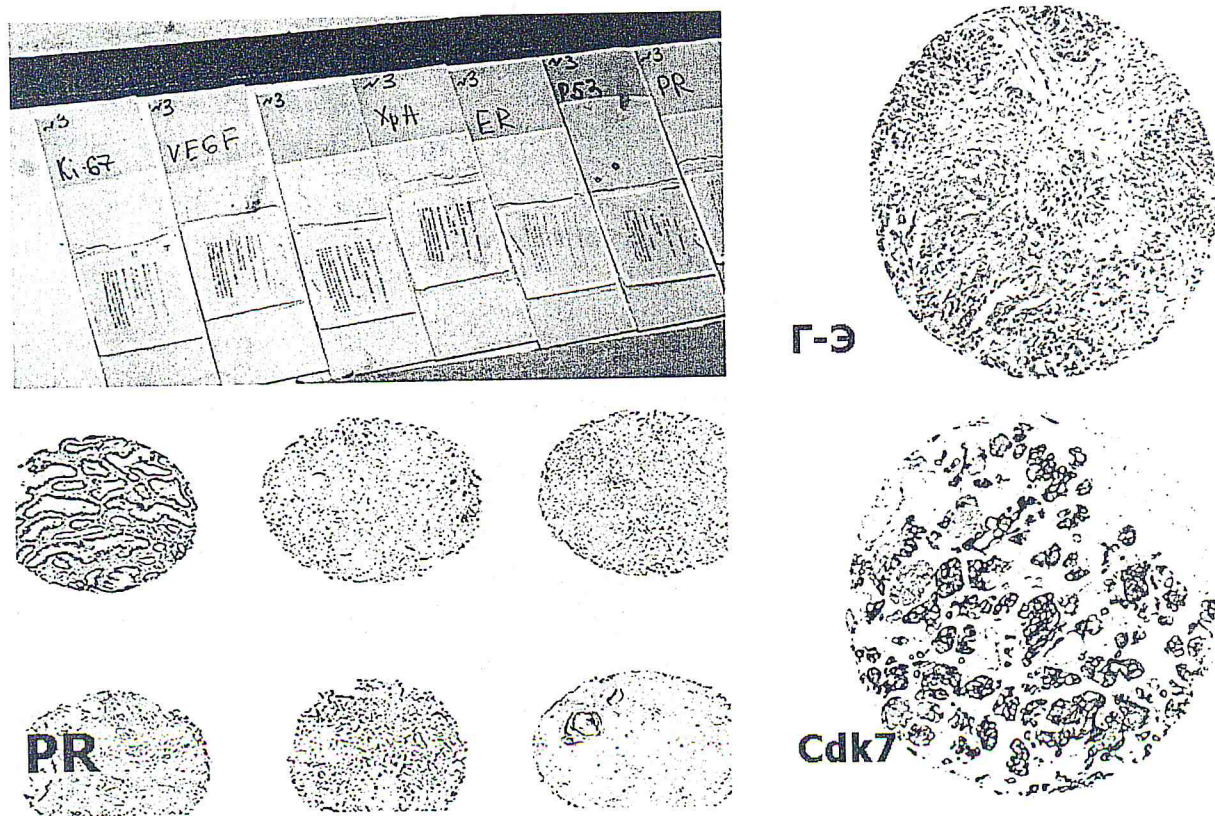


Рис. 5. Гистологические препараты микроаррея

ны компьютерные технологии. Выполнено цифровое фотографирование каждого микрообразца в окрашенных срезах тканевых матриц с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений Nikon-3200 и занесением полученных материалов в компьютерную базу данных.

Проведено стандартное иммуногистохимическое исследование, рутинно применяемое в онкогинекологии: определение гормонорецепторного статуса злокачественных опухолей эндометрия. В нашем распоряжении имеется тканевая парафиновая матрица, содержащая микрообразцы злокачественных опухолей эндометрия 140 пациенток. Общее количество тканевых микрообразцов в матрице составляет 340 штук.

Первоначально оценивался микрослайд, окрашенный гематоксилином-эозином, с целью определения наличия или потери биоптатов в приготовленном препарате, а также наличия или отсутствия ткани злокачественной опухоли в каждом биоптате. Из 340 образцов 5 отсутствовали на слайде, в других 5 биоптатах материал был представлен некротизированной тканью и в 15 биоптатах ткань злокачественной опухоли отсутствовала. Таким образом, уровень информационных потерь матрицы составил 7,35%, что говорит об адекватном качестве парафиновой тканевой матрицы.

Следующие 2 микросреза с матрицы окрашивались по иммуногистохимической методике: авидин-биотиновым методом с использованием монокло-

нальных мышиных антител к рецепторам прогестерона и эстрогенам (Dako, Дания).

Выполнено цифровое фотографирование всех микрообразцов 3 исследуемых микропрепаратов и занесение видеоизображений в базу данных.

Методом случайной выборки решено оценить гормонорецепторный статус злокачественных опухолей больных раком эндометрия, подвергшихся хирургическому лечению в марте 2004 г. в отделении онкогинекологии Санкт-Петербургского городского клинического онкологического диспансера. С помощью компьютерной базы данных установлено, что таких пациентов в матрице 16; 16 опухолей эндометрия полноценно представлены в 2 повторах на всех 3 микропрепаратах.

Следует отметить, что составление табличной клинической характеристики больных с использованием компьютерной базы данных занимает несколько минут (табл. 1).

Гистологическое строение, степень дифференцировки опухолей и распределение по стадиям заболевания представлены в табл. 2.

Как представлено в таблицах, хирургическому лечению подверглись, как и положено, в основном больные начальными стадиями рака тела матки. Интраоперационное выявление у одной больной метастатически измененных парааортальных лимфоузлов изменило стадию заболевания. В одном случае диагностирован первично-множественный рак – сочетание рака тела матки с раком яичников. По гистологическому строению основная масса опухолей явля-

Таблица 1

Клиническая характеристика больных

Показатель		п
Больные раком эндометрия		16
из них больные первично-множественным раком		1
Средний возраст	59,±9,9 лет	
Объем хирургического лечения	Гистераднексэктомия	11
	Гистераднексэктомия с тазовой лимфодиссекцией	5
	Оментэктомия	3

Таблица 2

Характеристика злокачественных опухолей эндометрия

Показатель		п
Гистологическое строение	Эндометриоидная аденокарцинома	14
	Серозно-папиллярный рак	1
	Гипернефроидный рак	1
Степень дифференцировки	G1	4
	G2	6
	G3	6
Стадия заболевания	I	3
	II	12
	III	–
	IV	1

лась эндометридной аденокарциномой эндометрия средней и низкой степени дифференцировки.

Экспрессия рецепторов к эстрогенам и прогестерону оценивалась по наиболее распространенной полуколичественной методике HistoScore, предложенной K.S. McCarty с соавторами в 1985 г., путем визуальной оценки результатов исследования врачом-морфологом, специалистом по гистохимическим исследованиям. Как уже было отмечено, особенностью метода тканевой матрицы является строгая выборочность материала; таким образом, преобладающей тканью во всех микрообразцах был злокачественный эпителий. Экспрессия рецепторов к половым гормонам в миометрии и стромальных элементах не оценивалась. Отрицательными контролями служили микрообразцы некротизированной ткани.

Полученные данные, сгруппированные по уровням дифференцировки опухоли, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Гормонорецепторный статус злокачественных опухолей эндометрия (n=16)

Степень дифференцировки	Номер образца	ER-H-Score*	PR-H-Score**
G1	J05	100	200
	J11	90	170
	K11	90	110
	K17	60	50
G2	J17	10	0
	K03	70	120
	K05	100	120
	K07	90	90
	K09	80	40
	K19	20	20
G3	J07	0	0
	J09	20	100
	J13	25	20
	J15	105	120
	J19	0	0
	K01	110	0

*Экспрессия рецепторов к эстрогенам, **экспрессия рецепторов к прогестерону.

Проведенный эксперимент показал, что метод тканевой матрицы позволяет без затруднений провести рутинные иммуногистохимические исследования. Время, потраченное на подготовку материала, окраску микропрепаратов, оценку результатов исследования, прогрессивно сократилось. Наличие электронной базы данных позволило в кратчайший срок свести полученные данные в табличную форму, персонализировать и клинически охарактеризовать

исследованные образцы, подготовить материал к статистической обработке.

Полученный цифровой материал идеально подходит для проведения сравнительных статистических вычислений: разница погрешностей при технической подготовке материала, окрашивании микропрепаратов, субъективизм оценки результатов сводятся к нулю, так как имеет одну и ту же величину для всех микрообразцов матрицы.

Наличие в матрице материала 140 пациентов позволяет выполнить подобные исследования с необходимой клинической выборкой и интересующим маркером, провести ретроспективный статистический анализ, оценить вклад тех или иных переменных в пятилетнюю выживаемость, безрецидивный интервал и т. д.

Безусловно, работа с тканевой матрицей имеет ряд неоспоримых преимуществ. Тем не менее оценка множества образцов матрицы, особенно при проведении скрининговых поисковых исследований, требует определенных усилий. Возможность создания базы цифровых видеоизображений микрообразцов матрицы стимулирует специалистов к компьютерной унификации обработки цифровых фотографий тканей. Без сомнения, компьютерные технологии в настоящий момент не могут в полной мере заменить глаза и интеллект опытного специалиста. Среди коммерчески доступных компьютерных программ нет ни одной, которая могла бы, к примеру, самостоятельно провести определение гормонорецепторного статуса злокачественной опухоли по McCarty. Это связано с отсутствием у компьютера интеллектуальной возможности дифференцирования всего многообразия морфологии опухолевой клетки, обусловленного индивидуальным строением опухоли, причудливостью плоскостных клеточных форм при микротомии, патологическим строением ядерного аппарата, возможным наличием артефактов в препарате и т. п.

Нами предпринята попытка анализа цифровых видеоизображений микрообразцов с помощью компьютерной программы «Видеотест-Морфология 5.0» фирмы «Видеотест». Эта программа позволяет автоматически производить поиск, выделение и математическую обработку видеообъектов с цифрового изображения. Такие параметры, как размер, форма, цвет, интенсивность окраски искомым объектов, задаются исследователем и сохраняются на протяжении всего исследования единичными для всех микрообразцов, практически полностью исключая относительную погрешность при считывании информации в изучаемой группе тканевых фрагментов.

Как следует из вышеизложенного, повторение классических методов иммуногистохимического анализа с помощью компьютера невозможно. Нами были подобраны стандартные условия обработки

видеоизображений, при которых компьютер определял площадь всех интенсивно окрашенных ядер и отношение площади окрашенных ядер к реальной площади всего исследуемого микрообразца на фотোগрафии.

Корреляционной зависимости между результатами экспрессии рецепторов к половым гормонам, полученными двумя методами, выявлено не было, что и следовало ожидать. Метод McCarty, в сущности, основан на вычислении взвешенной средней арифметической; этот метод прост, имеет свои преимущества и недостатки: в частности, он позволяет определить меру сравнения, но не учитывает изменчивость. Компьютерная оценка позволяет выделить безусловно негативные и условно позитивные на наличие рецепторов к гормонам опухоли (этап скрининга), а также менее позитивные и более позитивные опухоли (этап первичного ранжирования). Условность данной компьютерной обработки видеоматериала очевидна. Тем не менее на основании полученного опыта начата кооперационная работа с разработчиками компьютерных программ по оптимизации прикладных возможностей компьютерной техники в области тканевого морфоанализа.

С момента появления первых тканевых матриц применение этого метода постоянно расширяется в силу ряда преимуществ.

Тканевые матрицы значительно превосходят традиционные методы исследования, поскольку дают возможность быстро идентифицировать и охарактеризовывать искомые объекты или молекулы-мишени в сотнях или даже тысячах образцов тканей.

Как было отмечено выше, создание тканевой матрицы исключает необходимость работы с множеством отдельных блоков и предметных стекол.

Создание парафиновой тканевой матрицы из 20 исследуемых образцов, включающей в себя также положительные и отрицательные контроли для каждого из 2 антител, при определенном навыке может занять 1–1,5 ч рабочего времени. В данном случае экономия материальных средств, рабочего времени и сил очевидна. Эта экономия становится фантастической, если количество образцов в исследуемой группе составит несколько сотен, а количество искомым маркеров – нескольких десятков.

Компактное расположение образцов тканей в матрице значительно упрощает их окраску в рутинных методиках и со специфическими для различных молекул антителами. Расположение на одном микропрепарате множества типов опухолей, а также нормальных тканей в одном ряду с ними дает возможность проводить анализ и сравнение одного и того же искомого показателя в различных тканях при абсолютно равных условиях. Одним из важнейших преимуществ матриц является абсолютно идентич-

ные условия окраски всех исследуемых образцов, а также положительных и отрицательных контролей. Это позволяет исключить относительные погрешности, возникающие при окрашивании разных микропрепаратов.

Матричные срезы могут быть окрашены диагностикумами широкого спектра и оценены с помощью различных методов. В зависимости от вида материала и методики создания матрицы, они могут быть использованы для окраски гематоксилин-эозинном и по другим стандартным морфологическим методикам, иммуногистохимических исследований, гибридизации *in situ*, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), ПЦР *in situ*, анализа экспрессии РНК и ДНК, TUNEL-оценки апоптоза.

Создание тканевых матриц позволяет быстро и эффективно проводить иммуногистохимический анализ тысяч тканевых образцов с использованием большого количества различных антител для каждого образца. Это техническое развитие сделало необходимым создание специальных методик с высокой пропускной способностью для анализа и архивирования больших объемов полученных данных. Были разработаны электронные устройства видеозахвата изображений тканевых образцов матрицы, компьютерные системы для анализа и хранения данных, полученных при иммуногистохимических исследованиях матриц. Данные могут подвергаться иерархическому кластерному анализу или другим видам статистического анализа. Иерархический кластерный анализ является мощным методом, оценивающим связанность в группе опухолей, он основан на их иммуногистохимическом окрашивании с использованием различных наборов антител. Другие виды анализа, такие, как создание кривых выживаемости, регрессивных моделей Кокса, оценка внутри- и межвидовых различий опухолей, также могут быть выполнены с помощью разработанного программного обеспечения. Информация достаточно оперативно может быть извлечена из архива для определения иммунного профиля отдельно взятого требуемого тканевого образца с формированием прямых связей между кластерными данными и архивными электронными изображениями [9].

Выраженная экономия рабочего времени, расходных материалов, резкое снижение потребления дорогостоящих диагностикумов и в конечном итоге – высокая скорость и адекватность получаемых данных делают метод тканевых матриц научно и экономически целесообразным.

Литература

1. Batiffora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing // *Lab. Invest.* 1986. Vol. 55. P. 244–248.

2. Batiffora H., Mehta P. The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block // *Lab. Invest.* 1990. Vol. 63. P. 722–724.
3. Budwit-Novotny D.A., McCarty K.S., Cox E.B. et al. Immunohistochemical analyses of estrogen Receptor in Endometrial Adenocarcinoma Using a Monoclonal Antibody // *Cancer Res.* 1986. Vol. 46. P. 5419–5425.
4. Camp R.L., Charette L.A., Rimm D.L. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma // *Lab. Invest.* 2000. Vol. 80. P. 1943–1949.
5. Fons G., Hasibuan S.M., van der Velden J., ten Kate F.J.W. Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium // *J. Clin. Pathol.* 2007. Vol. 60. P. 500–503.
6. Hoos A., Urist M.J., Stojadinovic A. et al. Validation of tissue microarray for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors // *Am. J. Pathol.* 2001. Vol. 158. P. 1251–1254.
7. Kallioniemi O., Wagner U., Kononen J., Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer // *Hum. Mol. Genet.* 2001. № 10. P. 657–662.
8. Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens // *Nat. Med.* 1998. № 4. P. 844–847.
9. Liu C.L., Prapong W., Natkunam Y. et al. Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays // *Am. J. Pathol.* 2002. Vol. 161. № 5. P. 1557–1565.
10. McCarty K.S., Jr., Sbazzo E., Flowers J.L. et al. Use of monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors // *Cancer Res.* 1986. Vol. 46 (Suppl.). P. 4244s–4248s.
11. Montgomery K., Zhsao M., van de Rijn M., Natkunam Y. A novel method for making “tissue” microarrays from small number of suspension cells // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2005. № 13. P. 80–84.
12. Packeisen J., Korsching E., Herbst H. et al. Demystified ... tissue microarray technology // *Mol. Pathol.* 2003. Vol. 56. P. 198–204.
13. Rimm D.L., Camp R.L., Charette L.A. et al. Amplification of tissue by construction of tissue microarray // *Exp. Mol. Pathol.* 2001. Vol. 70. P. 255–264.
14. Sauter G., Mirlacher M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology // *J. Clin. Pathol.* 2002. Vol. 55. P. 575–576.
15. Schoenberg Fezjo M., Slamon D.J. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA and proteins // *Am. J. Pathol.* 2001. Vol. 150. P. 1645–1650.
16. Wan W.H., Fortina M.B., Furmansky P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously // *J. Immunol. Methods.* 1987. Vol. 103. P. 121–129.
17. Wang L., Deavers M.T., Malpica A. et al. Tissue array: a simple and cost-effective method for high-throughput studies // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2003. № 11. P. 174–176.