

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

ТЕХНОЛОГИЯ ТКАНЕВОЙ МАТРИЦЫ
В КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Методические рекомендации



Ташкент – 2019 г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

«СОГЛАСОВАНО»

Начальник управления развития
науки

Д.м.н. профессор

Н.Л. ХАБИЛОВ

« 05 » 03. 2019 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник Главного управления науки
и образования

Д.м.н. профессор

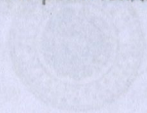
У.С.ИСМАИЛОВ

« 05.03. 2019 г.



ТЕХНОЛОГИЯ ТКАНЕВОЙ МАТРИЦЫ В КЛИНИКО-
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Методические рекомендации



Ташкент – 2019 г.

Основное учреждение разработчик:

Ташкентская медицинская академия, Университетская клиника Инха

Составители:

Сук Джин Чве (S.J.Choi) профессор кафедры "Патологии" Университетской клиники Инха, д.м.н. профессор
Атаханова Н.Э. заведующая кафедрой онкологии ТМА, д.м.н. профессор
Имамов А.А. доцент кафедры "Факультетской и госпитальной хирургии №1" ТМА, к.м.н.
Каххаров А.Ж. ассистент кафедры онкологии ТМА

Рецензенты:

Гафур-Охунов М.А. Заведующий кафедрой онкологии с курсом УЗИ ТашИУВ, д.м.н., профессор
Джураев М.Д. Директор Самаркандского областного филиала РСНПМЦОиР, д.м.н., профессор

Методические рекомендации рассмотрены и утверждены на заседании Ученого Совета ТМА от 1 июня 2018 года

Протокол № 11

Ученый секретарь ТМА  Исмаилова Г.А.



Методические рекомендации предназначены для врачей-онкологов, патологоанатомов, гистологов, а также исследователей в области фундаментальных и прикладных исследований.

Введение

Рак молочной железы является самым распространенным злокачественным новообразованием среди женщин по всему миру. По данным ежегодно в мире выявляется около 1,38 миллионов новых случаев рака молочной железы, при этом наблюдается неуклонный рост заболеваемости и смертности от данного вида заболевания [1].

До 2000 года в мире, практически всем без исключения пациентам раком молочной железы было рекомендовано проведение химиотерапии, что в свою очередь приводило к перелечиванию, большим экономическим тратам и ненужным побочным эффектам и как следствие к снижению качества жизни пациенток [2]. В ходе изучения природы рака молочной железы было выявлено что он является гетерогенным заболеванием, включающим в себя злокачественные опухоли молочной железы с различным клиническим течением, чувствительностью к проводимой терапии и прогнозом [3]. С развитием геномики и генетики рака, стало возможным более глубокое понимание биологической его природы. С выявлением новых биологических маркеров, классификация и подход к лечению больных начинает носить более дифференцированный характер. Кроме того раннее выявление рака молочной железы, с минимальными размерами опухоли и экстрамаммарным распространением, постепенно снижают прогностическую и клиническую значимость TNM классификации, и требуют поиска новых подходов к классификации рака, с переходом из органного и тканевого уровня на клеточный и молекулярно-генетический уровень. Стратификация риска у пациентов в зависимости от наличия и отсутствия новых прогностически значимых биологических, геномных и генетических факторов позволит улучшить результаты лечения и качество жизни пациентов, избежать чрезмерного применения специальной терапии, а также разработать новые препараты.

Наиболее часто используемые маркеры при раке молочной железы- рецепторы к эстрогену и прогестерону, HER2 neu рецепторы, а также индекс пролиферации опухоли, согласно которым рак молочной железы поделен на 4 большие подгруппы: люминальный (гормонпозитивный) тип (А и В), HER2 neu позитивный и трижды

негативный [4,5]. Однако существуют множество других рецепторов, определение которых позволяет более точно определить тактику лечения и прогноз. К примеру наличие FOXP3 положительных опухоль инфильтрирующих лимфоцитов у больных с эстроген положительным раком гортани о плохом прогнозе заболевания, тогда как при HER2 псу позитивном о хорошем прогностическом исходе.

В современной медицинской науке наблюдается тенденция перехода научных исследований от органного и тканевого уровня к молекулярно-генетическому. Основной проблемой в проведении экспериментальных и клинических исследований является их дороговизна. Самостоятельные и молодые исследователи сталкиваются с нехваткой финансирования, что является препятствием к проведению оригинальных научных исследований в области медицины.

В онкологии с целью углубленного изучения и персонализированного подхода к диагностике и лечению онкологических больных используются такие методики как: иммуногистохимическое исследование, реакция гибридизации ДНК, геномные, генетические исследования. Основным материалом изучения является опухолевая ткань, как свежая, так и в виде парафиновых блоков.

Технология тканевой матрицы

С целью обработки большого объема гистологического материала в развитых странах используется технология тканевой матрицы (tissue microarray), заключающаяся в сборе биопсического материала (материала из гистологических блоков) множества больных на одном гистологическом блоке [6]. Данная методика позволяет с высокой точностью, а также малыми финансовыми и временными затратами одновременно произвести анализ большого объема данных. Гистологический материал в виде микроблоков можно подвергнуть исследованию с помощью различных методик, таких как ИГХ, реакции *in situ* гибридизации и др. Тканевая матрица позволяет осуществлять научные исследования с целью изучения новых биомаркеров, а также осуществлять прогностическое моделирование исходов болезни.

Различают несколько видов тканевых матриц, по целям исследования:

1. Тканевые матрицы для определения диагностической ценности новых биологических маркеров.
2. Тканевые матрицы для определения прогностически значимых рецепторов. При конструкции данного типа матрицы необходима информация об исходе болезни пациентов, материал которых содержится в матрице.
3. Тканевые матрицы для определения специфических маркеров ответа на терапию. Данные виды матриц содержат гистологический материал больных получивших химио-, гормоно- или биологическую терапию. С использованием методики тканевой матрицы Lam J.S. и соавторами была выявлена связь между экспрессией протеина теплового шока (HSP 27) и лекарственной резистентностью рака предстательной железы.
4. Использование тканевых матриц при неонкологических заболеваниях (нейродегенеративных заболеваниях, дерматологических и других заболеваниях).
5. Применение тканевых матриц при клинических исследованиях.
6. Контроль качества иммуногистохимии
7. Тканевые матрицы с использованием нефиксированной замороженной ткани. При фиксации, дегидратации и заливки ДНК, РНК и белки могут быть подвержены разрушению, в связи с чем результаты *in situ* гибридизации (ISH, FISH исследования) могут быть субоптимальными. Использование нефиксированной замороженной ткани позволяет сохранить ДНК, РНК и белки, что позволяет использовать ее при молекулярных исследованиях.
8. Тканевые матрицы с использованием клеточных линий.
9. Хранение гистологических материалов, возможность использования в мультицентровых исследованиях, а также использование их в образовательных целях.
10. Позволяет уменьшить количество исследуемых срезов.
11. Анализ гистологического материала может быть подвержен автоматическому анализу.

Виды исследований, которым может быть подвержена тканевая матрица:

1. иммуногистохимическое исследование
2. окраска гематоксилином эозином, реакция *in situ* гибридизации
3. *In situ* ПЦР
4. анализ экспрессии ДНК, РНК
5. TUNEL исследование, для изучения апоптоза (определяет дефрагментацию ДНК)

Идея одновременного гистологического исследования ткани нескольких пациентов принадлежит Baltifora, который проводил заливку нескольких биоптатов в одном гистологическом блоке. Данная техника получила название *sausage roll*. Прототип современной тканевой матрицы был предложен Koponen и соавторами из Национального Института Здоровья, США.

На сегодняшний день существует ряд методик включающих в себя автоматический, полуавтоматический, а также ручной метод изготовления микроблоков. Однако все вышеуказанные методики требуют дорогостоящего оборудования, что ограничивает использование тканевой матрицы в центрах с низким финансированием. Стоимость автоматизированной установки по изготовлению тканевой матрицы Beecher instruments, San Prairie, Wisconsin, США составляет от 12 до 42 тысяч долларов США. Стоимость готового ручного набора составляет 1200 долларов США. В тканевую матрицу размерами 25x35x5 мм можно поместить от 50 до 400 и более гистологий. С целью забора гистологического материала из донорских блоков используются панч иглы диаметром 0.6, 1.0, 1.5, 2.0 мм. Скорость забора и имплантации биопсического материала автоматическими машинами для изготовления тканевых матриц составляет 120-180 столбиков ткани в час, ручного метода от 30 до 70 столбиков в час.

В связи с дороговизной данного оборудования рядом исследователей предпринялись попытки к самостоятельному изготовлению тканевой матрицы.

Предложенная S. Choi et al. методика позволяет самостоятельно с минимальными затратами изготовить тканевую матрицу высокого качества и разрешения [7,8,9].

Методика самостоятельного изготовления тканевой матрицы

Процесс изготовления тканевой матрицы включает в себя:

1. планирование исследования
2. изготовление блока реципиента
3. подготовка донорских блоков (гистологических блоков пациентов включенных в исследование)
4. создание карты тканевой матрицы
5. забор и вживление интересующих областей гистологических блоков (материал подвергнутый забору должен содержать в себе опухолевую ткань) в блок реципиент.
6. подготовка блока к окраске.

Для изготовления блока реципиента необходимо использовать агар агар растворенный в дистиллированной воде (0.5-5%) с последующей заливкой в форму для парафиновых блоков с последующим медленным охлаждением. Наиболее оптимальной концентрацией агарозного геля является 2% с толщиной 2 мм. После чего полученный гель помещается в стандартную платмассовую тканевую кассету. В дальнейшем гель при помощи автоматического тканевого процессора или вручную необходимо подвергнуть процедуре фиксации 10% формалином, дегидратации спиртом различной крепости (30%,50%,70%,80%,95%,100%), очистки ксилолом и пропиткой парафином.

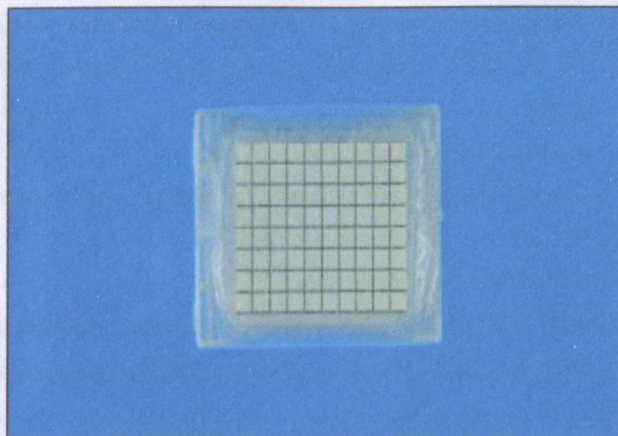


Рис.1. Размеченный парафиновый блок

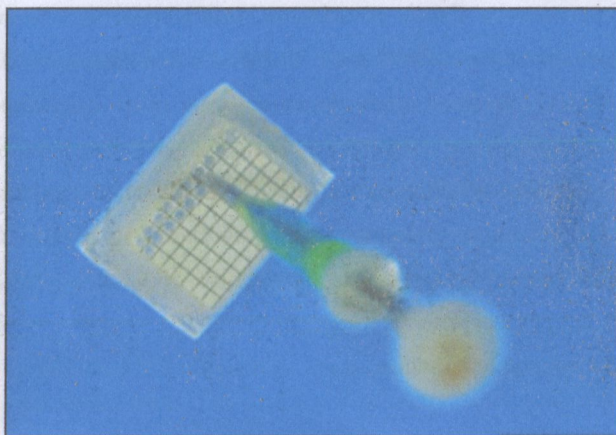


Рис.2. Процесс изготовления ячеек.

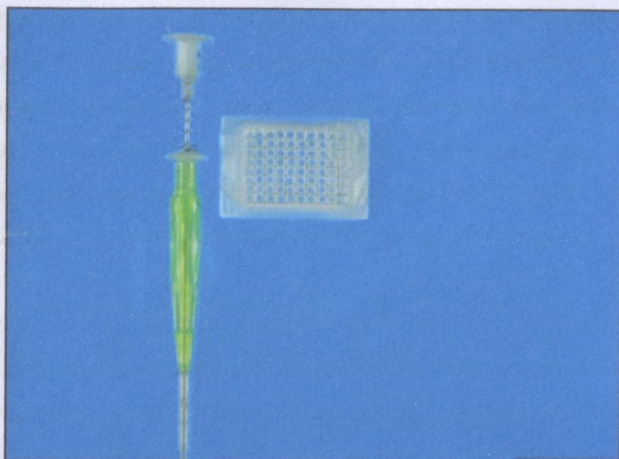


Рис. 3. Готовая тканевая матрица и биопсическая ручка.

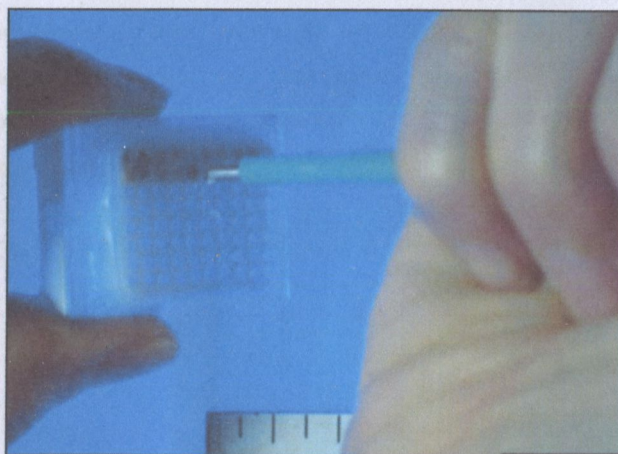


Рис.4. Процесс имплантации гистологического материала в тканевую матрицу.

После подготовки агарозно-парафинового блока его поверхность необходимо обработать микротомом. С целью разметки будущих отверстий на поверхность блока наклеивается сетчатая бумага (рис 1). Самодельной биопсической ручкой с диаметром 2 мм для забора гистологического материала производятся отверстия тканевой матрицы. Также отверстия возможно сделать при помощи аппарата для сверления. С помощью изготовленной из модифицированной иглы 11 G для

костномозговой биопсии и металлического чернильного катриджа шариковой ручки с внутренним диаметром 2мм, биопсической ручки делаются отверстия в блоке реципиенте (рис 2,3). Тканевая матрица может содержать различное количество отверстий в зависимости от целей и объема планируемого исследования. В последующем с помощью той же ручки производится забор гистологического материала из донорского блока с последующей имплантацией в блок реципиент (рис 4).

С целью построения карты тканевой матрицы можно использовать программу Microsoft Excel (рис.6). Количество и расположение ячеек в таблице Excel должно соответствовать количеству и расположению ячеек в тканевой матрице. В 2-х или 4-х углах тканевой матрицы с целью ее пространственной ориентации необходимо вживление ткани из других органов. При имплантации ткани в блок-реципиент необходимо параллельно вводить номер используемого гистологического блока в ячейку таблицы. Пустые ячейки необходимо отмечать другим цветом.

Место имплантации определяется согласно заранее подготовленной карте.

85-86/2016 в сердце	14339-42 2012	8331- 34 2012	1305- 08 2012	23732- 35 2011	13795- 08 2012	8229- 42 2011	8522 1879-82 2011	841-46 2011	56/201 48/201	3 3
1167-71 2012	12373-77 2012	12651- 56 2012	17495- 98 2012	14395- 2012	14267- 70 2012	20648- 51 2011	8281- 84 2012	15935- 38 2011	841-46 56/201	153- 253- 54/201
1167-71 2012	14702-05 2011	10729- 32 2012	17785- 88 2012	14623- 30 2012	23819- 23 2011	5927- 30 2012	15935- 38 2012	20206- 09 2011	153- 253- 56/201	3 3 54/201
14323-26 2012	14726-29 2011	10729- 32 2012	1891- 94 2011	16201- 08 2012	1807- 10 2012	5927- 30 2012	26824- 27 2011	20206- 09 2011	269- 253- 72/201	54/201 3 3
11069-72 2011	8293-96 2012	12339- 42 2011	1745- 48 2012	14744- 57 2011	1783- 47 2011	3347- 86 2012	15362- 65 2012	3169-72 72/201	269- 253- 72/201	3 3 54/201
14255-58 2012	20658-61 2011	1381- 38 2011	8030- 23 2012	14794- 2123-26 97 2011	1783- 86 2011	3347- 86 2012	15362- 65 2011	1337-40 2011	269- 1121- 72/201	24/201 3 3
1355-58 2011	20658-61 2011	1381- 84 2011	15047- 52 2012	17293- 06 2012	3081- 54 2012	20672- 75 2011	1337-40 2011	345- 1121- 48/201	24/201 3 3	
11128-32 2012	11069-72 2012	15406- 07 2011	703-08 2012	123-126 8239-43 2011	3081- 84 2012	20672- 75 2011	165- 48/201	345- 1121- 68/2013	81- 82/2016 в результате 3	
83-84/2016 почечью	14838-41 2011	533-36 04 2012	13795- 08 2012	2427- 98 2011	1879- 28 2011	82/201 865-68 1 2011	165- 48/201	345- 1121- 68/2013	81- 82/2016 в результате 3	

После окончания имплантации гистологического материала в блок реципиент, тканевую матрицу необходимо подвергнуть термическому воздействию в термостате с целью слияния донорского материала с блоком реципиентом, что позволяет предотвратить утерю или смещение донорского гистологического материала при последующей работе с ним (рис.6,7).



Рис. 6. Подготовка тканевой матрицы к термическому воздействию.

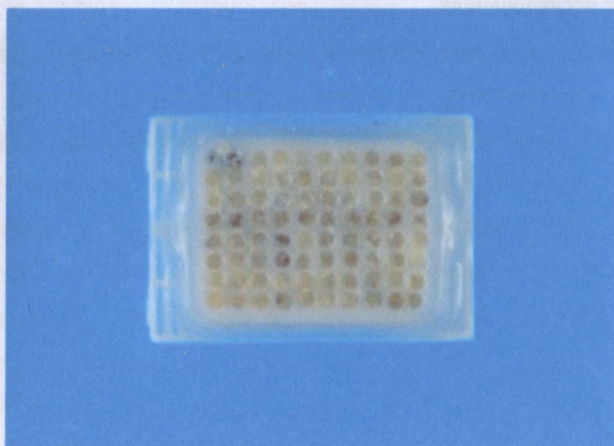


Рис.7. Готовая тканевая матрица с имплантированным гистологическим материалом.

В дальнейшем производится заморозка готовой тканевой матрицы с последующем проведением срезов с помощью микротомы.

Микротомные срезы с целью окраски гематоксилин эозином и иммуногистохимическими реагентами составляют 4 микрона.

К недостатку методики тканевой матрицы может быть отнесена возможность утери единичных столбиков ткани во время изготовления срезов и последующей ее окраски. В связи с чем при неуверенности исследователя в качестве имплантируемого материала из гистологических блоков доноров возможно дублирование материала в другой ячейке от того же донора. Однако данный возможный недостаток никоим образом не умоляет использование метода, так как при анализе большого массива материала единичные потери столбиков ткани не влияют на статистическую достоверность полученных результатов.

Заключение

Использованная методика позволяет самостоятельно и без дополнительных затрат изготовить тканевую матрицу высокого качества и высокого разрешения с целью последующего использования ее в иммуногистологическом и молекулярно-генетических исследованиях.

Технология тканевой матрицы позволяет значительно сократить время проведения исследования, а также финансовые затраты, связанные с использованием дорогостоящих методов исследования, при этом качество и результаты проводимого исследования ничуть не снижаются, что позволяет использовать данную методику в повседневной научной деятельности в области морфологии, патологии и онкологии.

Список использованной литературы:

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2015.
2. Curigliano G., Criscitiello C., Esposito A. et al. Over-using chemotherapy in adjuvant setting *The Breast* 31 (2017) 303-308.
3. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009;360(8):790-800.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747e52.
5. Wegelt B., Baehner F.L., Reis-Filho J.S., 2010c. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostification and prediction: a retrospective of the last decade. *J. Pathol.*220, 263-280.
6. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001; 195: 72-9
7. Kyu Ho Kim, Suk Jin Choi, Yeon Il Choi et al. In-house Manual Construction of High-Density and High-Quality Tissue Microarrays by Using Homemade Recipient Agarose-Paraffin Blocks. *The Korean Journal of Pathology* 2013; 47: 238-244
8. Chang Hwan Choi, Kyu Ho Kim, Ju Young Song et al. Construction of High-Density Tissue Microarrays at Low Cost by Using Self-Made Manual Microarray Kits and Recipient Paraffin Blocks. *The Korean Journal of Pathology* 2012; 46: 562-568.
9. Чве С.Д., Атаханова Н.Э., Каххаров А.Ж. Технология тканевой матрицы в клинико-морфологических и молекулярно-генетических исследования рака молочной железы. *Вестник ТМА* 2018, №2, стр.46-48



MUHARRIRIYAT VA NASHRIYOT BO'LIMI

Объем – 3.2 уч. изд. л. Тираж –100 . Формат 60x84. 1/16.

Гарнитура «Times New Roman»

Заказ № 0222 -2019. Отпечатано РИО ТМА

100109. Ул. Фароби 2, тел: (998 71)214-90-64, e-mail: rio-tma@mail.ru

