

Применение автоматизированных систем для создания тканевых микроматриц в онкоморфологических исследованиях

И.А. Парфенова, С.А. Ерышова

Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Тканевые микроматрицы — один из перспективных методов для высокопроизводительного анализа архивированных образцов тканей. Лаборатории, использующие традиционный ручной метод изготовления тканевых микроматриц (ТМА), сталкиваются с необходимостью повышения эффективности и стандартизации, что особенно важно для онкоморфологических исследований и диагностики. Достичь этого можно за счёт автоматизации процесса.

Настоящий обзор посвящён рассмотрению возможностей и преимуществ автоматизированных систем для создания ТМА по сравнению с ручным методом, с акцентом на их применение в анализе саркомы Юинга и других недифференцированных круглоклеточных сарком. В проанализированных работах автоматизированные системы использовали для извлечения и позиционирования тканевых цилиндров в парафиновые блоки-реципиенты, а на полученных срезах ТМА проводили гистологические и иммуногистохимические исследования. Кроме того, оценивали качество срезов тканевых микроматриц. В упомянутых работах автоматизированные системы показали высокую точность позиционирования тканевых цилиндров, что значительно ускорило процесс создания ТМА и улучшило качество готовых срезов.

Таким образом, внедрение автоматизированных систем для конструирования ТМА имеет значительные преимущества по сравнению с ручным методом, поскольку обеспечивает стандартизацию и повышает производительность лабораторных исследований. Автоматизированные системы позволяют эффективно анализировать большие серии образцов, что особенно важно для валидации диагностических и прогностических биомаркеров. Опубликованные работы подчеркивают необходимость дальнейшего развития и более широкого внедрения автоматизированных систем в онкоморфологические исследования для повышения их эффективности и воспроизводимости.

Ключевые слова: тканевые микроматрицы; автоматизация, онкоморфология.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Парфенова И.А., Ерышова С.А. Применение автоматизированных систем для создания тканевых микроматриц в онкоморфологических исследованиях // Морфология. 2025. Т. 163, № 4. С. **XX–XX**. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.634185> EDN **CJENQT**

© Эко-Вектор, 2025

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International

Рукопись получена: 10.07.2024

Рукопись одобрена: 11.10.2024

Опубликована online: 14.05.2025

Application of automated systems to produce tissue microarrays for oncomorphological studies

Inna A. Parfenova, Sofia A. Eryshova

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

ABSTRACT

Tissue microarrays are one of the promising methods for high-throughput analysis of archived tissue samples. Laboratories using the traditional manual method of tissue microarray (TMA) fabrication still need to improve the efficiency and standardize the process, which is particularly important for oncomorphological research and diagnostics. This can be achieved by automating the process.

This review discusses the capabilities and advantages of automated systems for TMA creation over manual methods, with a focus on their application in the analysis of Ewing's sarcoma and other undifferentiated round cell sarcomas. In the papers reviewed, automated systems were used to extract and position tissue cylinders into recipient paraffin blocks, and the obtained TMA sections were used for histological and immunohistochemical examination. In addition, the quality of tissue microarray sections was evaluated. In these studies the automated systems demonstrated high accuracy of tissue cylinder positioning, which significantly accelerated the TMA preparation process and improved the quality of the obtained sections.

The introduction of automated systems for tissue TMA construction has significant advantages over the manual method by providing standardization and increasing productivity in laboratory research. Automated systems allow efficient analysis of large sample series, which is particularly important for validation of diagnostic and prognostic biomarkers. Published works highlight the need for further development and wider implementation of automated systems in oncomorphological studies to improve their efficiency and reproducibility.

Keywords: tissue microarrays; automation.

TO CITE THIS ARTICLE:

Parfenova IA, Eryshova SA. Application of automated systems to produce tissue microarrays for oncomorphological studies. *Morphology*. 2025;163(4):XX-XX.

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.634185> EDN CJEHQT

© Eco-Vector, 2025.

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

Received: 10.07. 2024

Accepted: 11.10.2024

Published online: 14.05.2025

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность применения автоматизированных систем, позволяющих создавать тканевые микроматрицы (ТМА) для онкоморфологических исследований, обусловлена необходимостью повышения точности и эффективности анализа большого количества тканевых образцов. С помощью ТМА можно исследовать десятки и сотни образцов на одном предметном стекле, что существенно ускоряет диагностику и исследовательские процессы в онкологии [1]. Метод ТМА, предложенный Н. Battifora в 1986 году, широко используется для валидации диагностических и прогностических биомаркеров, контроля качества иммуногистохимических (ИГХ) исследований и других научных целей [2, 3].

Трудности при традиционном ручном изготовлении ТМА в основном связаны с трудоёмкостью процесса, требующего высокой квалификации персонала, и значительными временными затратами [4]. Автоматизация процесса создания ТМА позволяет преодолеть эти трудности, обеспечивая высокую точность и значительную экономию времени, а также минимизацию риска перекрестной контаминации [5, 6]. Однако, несмотря на очевидные преимущества автоматизированных систем, их использование в клинической практике в Российской Федерации ограничено отсутствием регистрационных удостоверений [7].

Ранее опубликованные результаты исследований подтверждают эффективность автоматизированных систем для конструирования ТМА. Например, такие системы успешно использовались для анализа биомаркеров в опухолях различных типов [3], обеспечивая высокую точность результатов. Подтверждённая исследованиями экономия ресурсов и времени при использовании автоматизированных систем делает их привлекательными для лабораторий с большим потоком образцов и значительным объёмом работы [5].

Таким образом, внедрение автоматизированных систем для создания ТМА в практику онкоморфологических исследований является значительным шагом вперёд, способствующим повышению эффективности и стандартизации исследований. Тем не менее, для полноценной интеграции данных систем в клиническую практику необходимо решить вопросы, связанные с регистрацией и стандартизацией использования такого оборудования в Российской Федерации [7]. Настоящий обзор посвящён рассмотрению возможностей и преимуществ автоматизированных систем для создания тканевых микроматриц по сравнению с ручным методом, с акцентом на их применение в анализе саркомы Юинга и других недифференцированных круглоклеточных сарком.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕВЫХ МИКРОМАТРИЦ

Автоматизированные системы для конструирования ТМА представляют собой высокотехнологичные приборы, обеспечивающие точное и быстрое изготовление микроматриц из десятков и сотен образцов тканей [4]. Основные модули, входящие в состав таких систем: блок для автоматического извлечения тканевых цилиндров из донорских парафиновых блоков и переноса их в блоки-реципиенты (рис. 1); высокоточный микроманипулятор для позиционирования тканевых цилиндров; система контроля глубины погружения тканевых цилиндров (лазерный датчик или механический зонд); специализированное программное обеспечение для создания виртуальной схемы ТМА [8].

Процесс автоматического изготовления ТМА начинается с загрузки виртуальной схемы расположения тканевых цилиндров в блоке-реципиенте. Современные программы для дизайна ТМА позволяют задавать различные параметры: диаметр тканевых цилиндров, расстояние между ними, их количество и расположение, а также индивидуально аннотировать каждый образец [4]. На основе виртуальной схемы прибор автоматически формирует в блоке-реципиенте отверстия заданного диаметра для размещения каждого из образцов (рис. 2).

Далее оператор последовательно устанавливает на прибор донорские парафиновые блоки и с помощью микроманипулятора позиционирует панч-иглу над областью интереса, выбранной в каждом образце на основе контрольного среза, окрашенного гематоксилином и эозином (рис. 2) [9]. Прибор автоматически извлекает тканевой цилиндр заданного диаметра (обычно от 0,6 до 2 мм) из донорского блока и переносит его в соответствующее отверстие блока-реципиента. Система контроля глубины погружения обеспечивает точное позиционирование каждого тканевого цилиндра на одном уровне, что особенно важно для получения качественных срезов [10].

После завершения сбора тканевых цилиндров блок-реципиент переплавляется для их фиксации, а затем охлаждается. Полученный ТМА-блок нарезается на серийные срезы толщиной 4–5 мкм, которые можно использовать для гистологических и ИГХ исследований, а также для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [11]. Примеры микропрепаратов, изготовленных при помощи данной технологии изображены на рис. 3.

Важным аспектом при создании ТМА является высота тканевых цилиндров. Чтобы сохранить оригинальный диагностический материал, для создания ТМА часто используют дополнительные парафиновые блоки того же случая. Это стандартная практика, позволяющая проводить исследования без ущерба для первичной диагностики.

В нашей лаборатории автоматизированная система для конструирования ТМА используется как для научных, так и для клинично-диагностических целей¹. В частности, нами была создана ТМА из 106 случаев саркомы Юинга [12] и других недифференцированных круглоклеточных сарком (саркома с альтерациями гена *BCOR* и *CIC*-перестроенная саркома). Для каждого случая из образцов были отобраны по 2 репрезентативных цилиндра опухолевой ткани диаметром 1 мм и перенесены в парафиновые блоки-реципиенты. Полученные ТМА-срезы окрашивали гематоксилином и эозином для оценки морфологических признаков. Для разработки алгоритма дифференциальной диагностики было проведено ИГХ исследование на автоматическом иммунофлуоресцентном устройстве Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Швейцария) с использованием антител к различным маркерам, применяемым для анализа фенотипа саркомы Юинга и других недифференцированных круглоклеточных сарком: CD99 (Cell Marque, США), NKX2.2 (BioSB, США), *BCOR* (Cell Marque, США), SATB2 (Santa cruz, США), TLE1 (Cell Marque, США), WT1 (Cell Marque, США), ETV4 (Invitrogen, США), десмину (Cell Marque, США), миогенину (Cell Marque, США), MyoD1 (Cell Marque, США) и панцитокератину (Ventana, США). Поскольку исследование выполнено ретроспективно, набор иммуногистохимических маркеров выбран с учётом того, что в исследование были включены образцы наиболее часто встречающихся вариантов круглоклеточных сарком. Качество ТМА-срезов и результаты окрашивания оценивали независимо два врача-патологоанатома.

Применение автоматизированной системы для конструирования ТМА в нашем исследовании позволило эффективно проанализировать большую выборку (106 случаев) саркомы Юинга и других недифференцированных круглоклеточных сарком, а также обнаружить новые сочетания диагностических маркеров. Результаты ИГХ исследования показали различия в экспрессии маркеров между саркомой Юинга, саркомой с альтерациями гена *BCOR* и *CIC*-перестроенной саркомой. Характерную для саркомы Юинга коэкспрессию CD99 и NKX2.2 наблюдали в 94% случаев, при этом такое сочетание не было выявлено в других типах опухолей. Саркома с альтерациями гена *BCOR* отличалась коэкспрессией *BCOR*, TLE1 и SATB2 в 80% случаев. Для *CIC*-перестроенной саркомы была характерна коэкспрессия ETV4 и WT1, хотя она детектировалась только в 25% случаев. На основании полученных результатов был составлен алгоритм дифференциальной диагностики опухолей, как внутри группы, так и с другими круглоклеточными опухолями [12].

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ

Внедрение автоматизированных систем для конструирования ТМА открывает новые возможности для стандартизации и ускорения онкоморфологических исследований. По сравнению с ручным методом, автоматизированное изготовление ТМА имеет ряд преимуществ [6]:

- более высокая точность отбора тканевых цилиндров за счёт использования высокоточной механики и систем контроля глубины [3];
- значительная экономия времени квалифицированного персонала, особенно при работе с большим количеством образцов [5];
- благодаря минимизации ручных манипуляций снижается риск перекрёстной контаминации между образцами и повреждения тканей [7];
- возможность гибкого дизайна ТМА и выбора различных параметров тканевых цилиндров и их расположения с помощью специализированного программного обеспечения [4];
- индивидуальная маркировка и аннотация тканевых цилиндров для последующего сопоставления морфологической картины, результатов ИГХ исследования и FISH [13].

¹ На момент подготовки данной публикации приборы для автоматизированного создания тканевых микроматриц не имеют регистрационного удостоверения на территории Российской Федерации.

Следует отметить, что ТМА служат своего рода универсальным контролем. Хотя не все образцы могут давать положительную реакции с антителами к маркерам, характерным для конкретного диагностического случая, ценность ТМА заключается в возможности одновременного анализа большого числа образцов, что особенно важно для крупномасштабных исследований.

Использование автоматизированных систем требует учёта дополнительных затрат времени на программирование и обслуживание оборудования. Тем не менее, наш опыт показывает, что при правильной организации процесса и регулярном использовании автоматизированные системы позволяют значительно оптимизировать работу, особенно при обработке большого количества образцов.

Несмотря на очевидные преимущества использования автоматизированных систем для конструирования ТМА, для получения корректных результатов важно соблюдать ряд методологических требований: проводить картирование, используя ткани, отличающиеся по строению от исследуемой [3]; соблюдать репрезентативность отбора тканевых цилиндров с учётом гетерогенности опухолей [2]; исследовать достаточное количество тканевых цилиндров из каждого случая (не менее 2–3) [14]; проводить стандартизацию протоколов окрашивания и интерпретации результатов [5, 15].

Опыт нашей лаборатории показывает, что внедрение автоматизированных систем для конструирования ТМА существенно оптимизирует процесс одновременного получения высококачественных срезов большого количества образцов для всех основных видов морфологических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тканевые микроматрицы — это инструмент современной онкоморфологии, позволяющий эффективно исследовать большие архивные серии образцов для валидации диагностических и прогностических биомаркеров как в исследовательских целях, так и для контроля качества иммуногистохимических исследований.

Автоматизация процесса конструирования ТМА с помощью специализированных систем обеспечивает стандартизацию преаналитического этапа и повышает производительность лаборатории по сравнению с ручными методами.

Дальнейшее развитие и более широкое применение автоматизированных систем для конструирования ТМА будет способствовать повышению эффективности онкоморфологических исследований и ускорению трансляции научных достижений в клиническую практику.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. И.А. Парфенова — концепция и дизайн работы, написание и редактирование текста статьи; С.А. Ерышова — концепция и дизайн работы, поиск и анализ первоисточников, написание текста статьи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Авторы выражают благодарность врачу-патологоанатому патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва» МЗ РФ Сидорову Илье Владимировичу и заведующему патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва» МЗ РФ Коновалову Дмитрию Михайловичу за предоставление клинического материала и ценные консультации в ходе проведения исследования пациентов с недифференцированными круглоклеточными саркомами. Благодаря их экспертным знаниям и поддержке удалось успешно выполнить данную работу.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении работы.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. All authors have approved the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are properly investigated and resolved. I.A. Parfenova — concept and design of the work,

writing and editing the text of the article; S.A. Eryshova — concept and design of the work, data search and processing, writing the text of the article.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to Ilya Vladimirovich Sidorov, pathologist of the Department of Pathology of the Dmitry Rogachev National Research Center, and Dmitry Mikhailovich Konovalov, head of the Department of Pathology of the Dmitry Rogachev National Research Center, for providing clinical material and valuable advice in the study of patients with undifferentiated round cell sarcoma. Their expertise and support have been invaluable for the successful completion of this work.

Funding source. This article was not supported by any external sources of funding.

Disclosure of interests. The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemistry antibody testing. *Lab Invest.* 1986;55(2):244–248.
2. 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. doi: 10.1038/nm0798-844
3. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):1966–1975.
4. Kononen J, Hostetter G, Sauter G, Kallioniemi OP. Construction of tissue microarrays. In: Bowtell D, Sambrook J, editors. *DNA microarrays: a molecular cloning manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. P:603–645.
5. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, et al. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J.* 2001;7(1):24–31.
6. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest.* 2001;81(10):1331–1338. doi: 10.1038/labinvest.3780347
7. Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. 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. doi: 10.1097/00129039-200203000-00001
8. Jensen TA, Hammond ME. The tissue microarray - a technical guide for histologists. *Journal of Histotechnology.* 2001;24(4):283–287. doi: 10.1179/his.2001.24.4.283
9. De Marzo AM, Fedor HH, Gage WR, Rubin MA. Inadequate formalin fixation decreases reliability of p27 immunohistochemical staining: probing optimal fixation time using high-density tissue microarrays. *Hum Pathol.* 2002;33(7):756–760. doi: 10.1053/hupa.2002.126187
10. Andersen CL, Hostetter G, Grigoryan A, et al. Improved procedure for fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cytometry.* 2001;45(2):83–86. doi: 10.1002/1097-0320(20011001)45:2<83::aid-cyto1149>3.0.co;2-p
11. Chin SF, Daigo Y, Huang HE, et al. A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridisation on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples. *Mol Pathol.* 2003;56(5):275–279. doi: 10.1136/mp.56.5.275
12. Sidorov IV, Fedorova AS, Sharlai AS, Konovalov DM. Clinical and morphological characteristics of Ewing's sarcoma and the algorithm for diagnosing undifferentiated round cell sarcomas. *Archive of Pathology.* 2023;85(5):13–21. EDN: [GPKBOX](#) doi: 10.17116/patol20238505113
13. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1245–1251. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64075-8
14. Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(3):312–319. doi: 10.1097/00000478-200203000-00004
15. Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2002;15(12):1374–1380. doi: 10.1097/01.MP.0000039571.02827.CE

ОБ АВТОРАХ

AUTHORS INFO

Автор, ответственный за переписку:	
*Парфенова Инна Андреевна; адрес: Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1; ORCID: 0009-0002-0667-9352; e-mail: pathmorf@mail.ru	*Inna A. Parfenova; address: 1 Samory Mashela st, 117997, Moscow, Russia; ORCID: 0009-0002-0667-9352; e-mail: pathmorf@mail.ru
Соавторы:	
Ерышова София Александровна; ORCID: 0009-0008-8862-2619; e-mail: sofya.eryshova@dgoi.ru	Sofia A. Eryshova; ORCID: 0009-0008-8862-2619; e-mail: sofya.eryshova@dgoi.ru

РИСУНКИ

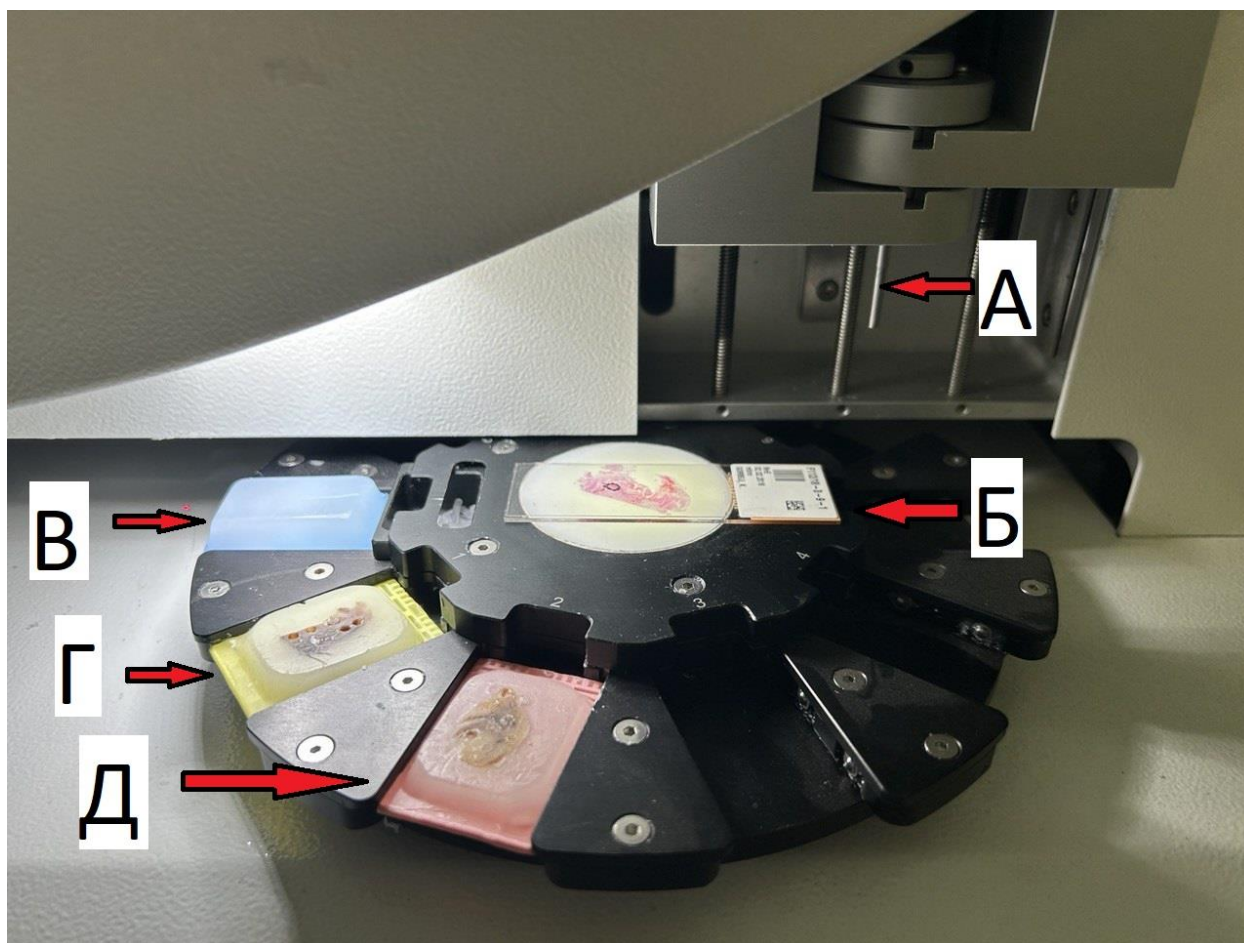


Рис. 1. Устройство для автоматического позиционирования панч-иглы: А — панч-игла; Б — гистологический препарат с отмеченной областью интереса, препарат окрашен гематоксилином и эозином и находится в центре ротатора для позиционирования; В — блок-реципиент; Г — блок-донор №1; Д — блок-донор №2.

Fig. 1. Device for automatic positioning of the punch needle: A — punch needle; B — histological preparation with a marked area of interest, the section is stained with hematoxylin and eosin and placed in the center of the rotator for positioning; C — block recipient block; D — block donor N 1; D — block donor N 2.

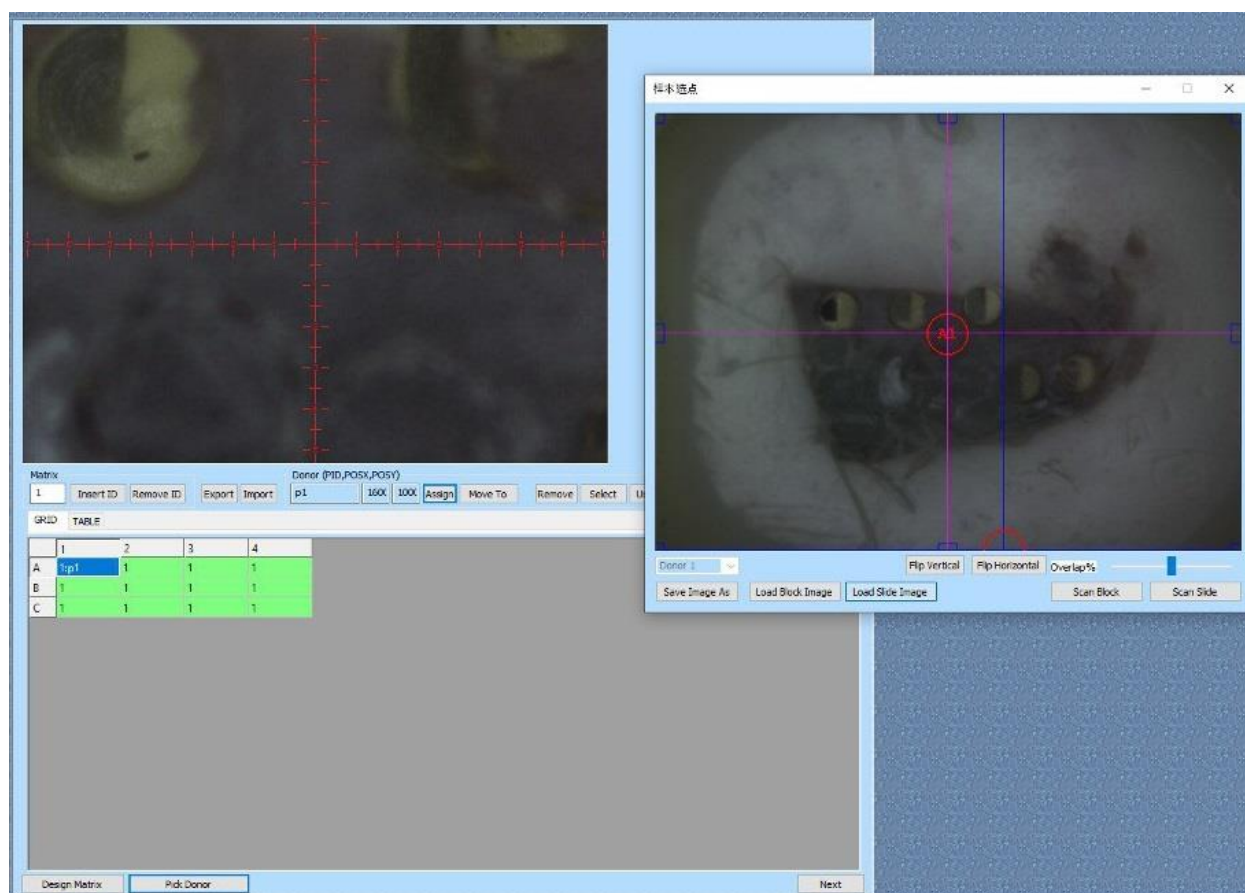


Рис. 2. Процесс позиционирования панч-иглы с помощью программного обеспечения.

Fig. 2. Punch needle positioning with software.

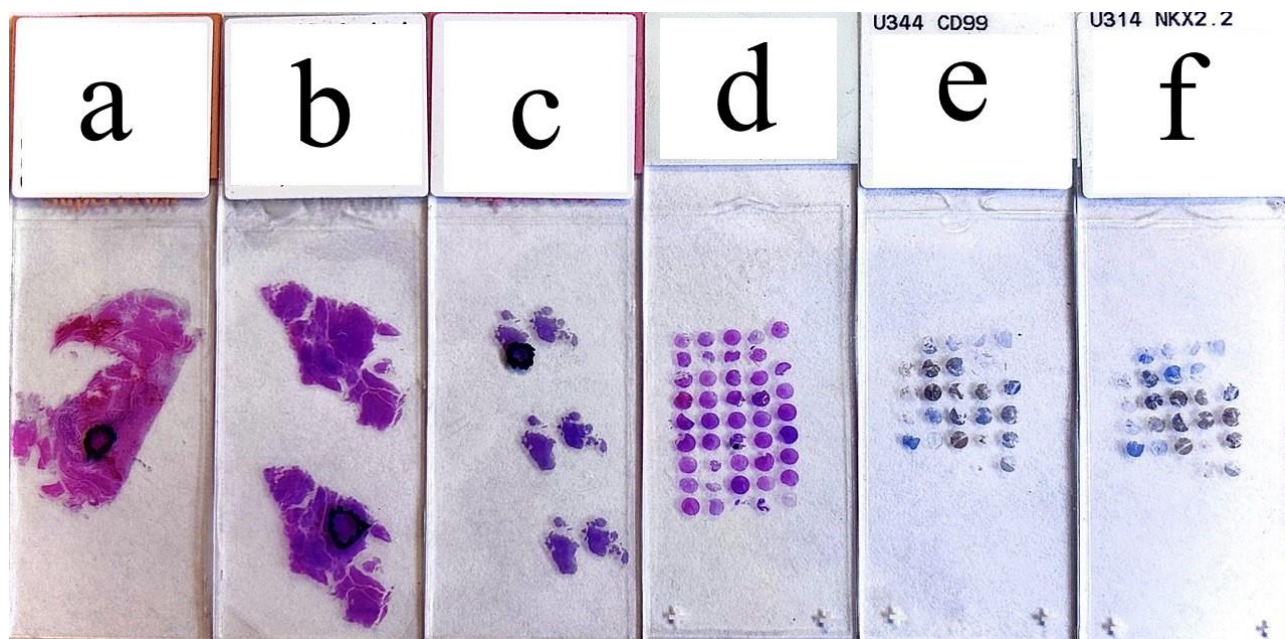


Рис 3. Общий вид микропрепаратов: *a–c* — микропрепараты с отмеченными зонами интереса, окрашивание гематоксилином и эозином; *d* — микропрепарат с тканевой микроматрицей, окрашивание гематоксилином и эозином; *e, f* — микропрепараты, окрашенные иммуногистохимическим методом на CD99 и на транскрипционный фактор NKX2.2 соответственно.

Fig. 3. General view of microscopic slides: *a–c* — slides with marked areas of interest, stained with hematoxylin and eosin; *d* — slide with tissue microarray, stained with hematoxylin and eosin; *e, f* — slides with immunohistochemical staining for CD99 and for the transcription factor NKX2.2, respectively.

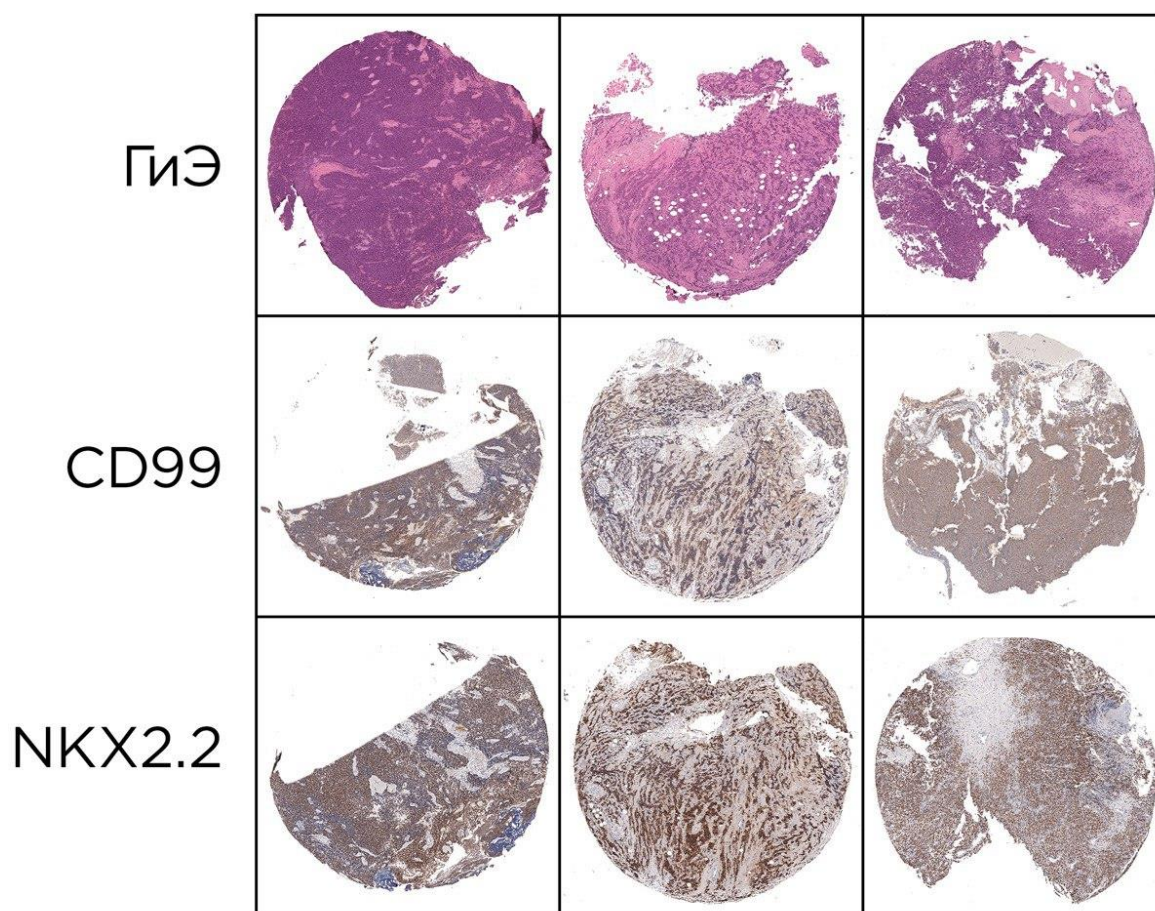


Рис. 4. Результаты исследования пациентов с саркомой Юинга: ГиЭ — препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, x40; CD99 — препараты, окрашенные иммуногистохимическим методом на CD99, x40; NKX2.2 — препараты, окрашенные иммуногистохимическим методом на транскрипционный фактор NKX2.2, x40. Показаны только препараты с положительной реакцией с антителами к маркерам CD99 и NKX2.2, x40.

Fig. 4. Results from patients with Ewing sarcoma: ГиЭ — slides stained with hematoxylin and eosin, x40; CD99 — slides immunohistochemically stained for CD99, x40; NKX2.2 — slides immunohistochemically stained for NKX2.2, x40. Only samples with positive staining for CD99 and NKX2.2 are shown, x40.