

А.Г. Кудайбергенова, Е.А. Туркевич, А.С. Артемьева

Определение рецепторного и HER2 статуса рака молочной железы с применением технологии тканевых матриц. Валидизация метода

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Изучена возможность использования техники изготовления тканевых матриц (ТМА) в качестве альтернативы исследованию полных гистологических срезов при раке молочной железы. В исследование включены данные 229 пациентов с раком молочной железы стадии T1-2N0M0, леченых в период 2000-2009 г. После сканирования полных срезов опухоли с использованием 2 мм «шагов» прибора ТМА-master конструировались ТМА-блоки. Результаты иммуногистохимического исследования HER2 ТМА-срезов были сравнены с результатами исследования полного среза. Общее распределение HER2 статуса для полных срезов оказалось таким: негативный (0+1) 82,6%, неопределенный (2+) 6,07%, позитивный (3+) 8,41%, для ТМА-срезов: негативный (0+1) 82,6%, неопределенный (2+) 7,04%, позитивный (3+) – 10,33%. При сравнении индивидуальных случаев обнаружено умеренное совпадение при негативном (0) и позитивном (3+) статусе HER2 (около 70%) и низкая частота совпадений в категории HER2 (1+2+) – только 50% и 25%, соответственно. Подобные расхождения предположительно связаны с использованием в этот период времени различных первичных антител и тест-систем, использованных на ТМА-блоках. Тем не менее, для рака молочной железы использование ТМА может быть разумной альтернативой исследованию полноразмерного среза.

Ключевые слова: рак молочной железы, тканевые матрицы

Технология тканевых матриц (ТМА - tissue microarray) впервые была предложена J. Kononen et al. [8] в 1998 г. Она представляет собой высокопроизводительный способ оценки тестов, основанных на анализе гистологического материала, включая оценку иммуногистохимических маркеров и FISH. Принцип этой технологии заключается в том, что из стандартного, фиксированного в формалине и заключенного в парафин гистологического блока (блок - донор) с помощью специальных приспособлений (ручной метод) или приборов (автоматический метод) извлекают небольшие порции гистологического материала и вставляют в специально подготовленную

тканевую матрицу (реципиентный блок). Таким образом, в противоположность традиционному способу оценки гистологических и ИГХ препаратов, требующему анализа сотен препаратов и блоков, создается возможность для одновременного гистологического, иммуногистохимического или FISH анализа более сотни образцов в одном блоке - реципиенте и десятков различных тестов с одного блока ТМА [1,7-9,11].

В дополнение к сокращению затрат на расходные материалы и реагенты преимущество технологии тканевых матриц в том, что весь анализ проходит одновременно и в одинаковых условиях. Тем не менее, использование этого способа вызывает определенные споры в профессиональном сообществе, так как в тканевых матрицах исследуется ничтожно малый объем опухоли, около 0,3% от объема материала, который исследуется при обычном способе [4], что вместе с внутриопухолевой гетерогенностью может исказить результаты исследований.

Для валидизации метода тканевых матриц и попытки внедрения этой технологии в исследовательские проекты и ежедневную практику мы провели сравнительный анализ традиционных ИГХ исследований на так называемых полных срезах и ТМА блоках.

Материалы и методы

Материалом исследования стал архивный материал 1118 пациенток стадии T1-2N0M0, проходивших хирургическое лечение по поводу рака молочной железы в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в 2000-2012 гг. Архивный материал был пересмотрен, реклассифицирован по гистологическому типу и степени злокачественности. Для производства ТМА были выбраны блоки, содержавшие первичную опухоль; в случае наличия двух опухолевых узлов, в исследование включались оба узла. Таргетные блоки перезаливались, подвергались микротомии, затем стандартному окрашиванию гематоксилином и эозином (ГЭ). Готовые окрашенные ГЭ препараты сканировали с помощью сканера гистологических препаратов Rapporamic Flash III. На цифровой копии гистологического препарата маркером с помощью программы-просмотрщика Rapporamic Viewer отмечались зоны интереса (рис. 1). С каждого препарата для производства ТМА матрицы было выбрано не менее 2 зон диаметром 2 мм. После позиционирования и наложения скана гистологического препарата на изображение корреспондирующего блока программа автоматически определяла на блоке интересные зоны (рис. 2), а прибор для приготовления матриц (ТМА

GrandMaster), автоматически забирал гистологический материал (диаметр «шага» 2мм) в матрицу; одновременно осуществлялась фиксация всех манипуляций с блоком в специальную таблицу (рис. 3). Подготовленные таким образом тканевые матрицы в течение 30 минут прогревались в термостате при 58°C, чтобы добиться расплавления парафина донорского блока и плотного склеивания стенок донорского блока со стенками блока-реципиента. Готовые TMA блоки подвергали микротомии (рис. 4) и ИГХ окрашиванию по стандартной методике.

Методика ИГХ окрашивания

Срезы толщиной 2-3мкм после просушивания в термостате в течение 18 ч при температуре 37°C помещали в автостейнер VENTANA ULTRA и проводили окрашивание рецепторов эстрогенов, прогестерона и HER2 согласно протоколу, приведенному в табл. 1.

После ИГХ окрашивания препараты с TMA матриц повторно подвергали сканированию. Распознавание объектов и привязка номеров гистологических блоков к изображениям TMA осуществлялась с помощью программы TMA module

Таблица 1.
Протокол иммуногистохимического исследования

Антитело, клон	Восстановление антигенной активности	Инкубация с первичными антителами	Инкубация с системой визуализации	Усиление и визуализация.
ER, 6F11	pH 9,0	30 мин	30 мин, EnVision Real	
PgR, 16	pH 9,0	30 мин	30 мин, EnVision Real	
HER-2 PATHWAY® rmAb 4B5 (Ventana)	SS2, Ventana Ultra	42 мин	8 мин, Ultra View,	

Таблица 2.
Сравнение результатов HER2 статуса в полном гистологическом срезе (классическая методика) с результатами исследования HER2 статуса в TMA

Статус HER2	Полный срез	TMA
Негативный (0, 1+)	85,5%	82,6%
Неопределенный 2+	6,07%	7,04%
Позитивный 3+	8,41%	10,33%

Таблица 3.
Сравнение индивидуальных градаций HER2 статуса в полном гистологическом срезе (классическая методика) с результатами исследования HER2 статуса в TMA

TMA-споты	Полный гистологический срез			
Градации HER2 статуса	0	1+	2+	3+
Her2 0	70,66667	22,66667	6,66667	0
Her2 1+	46,15385	50	0	
Her2 2+	40	33,33333	25	6,66667
Her2 3+	4,545455	18,18182	4,545455	72,72727

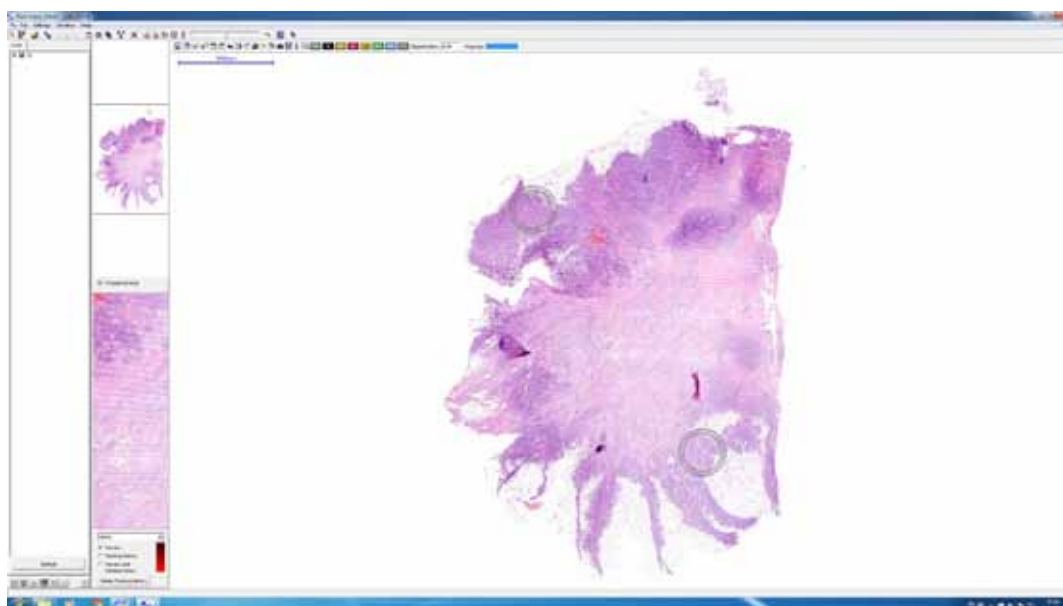


Рис. 1. Разметка зон интереса в программе-просмотрщике Panasonic Viewer

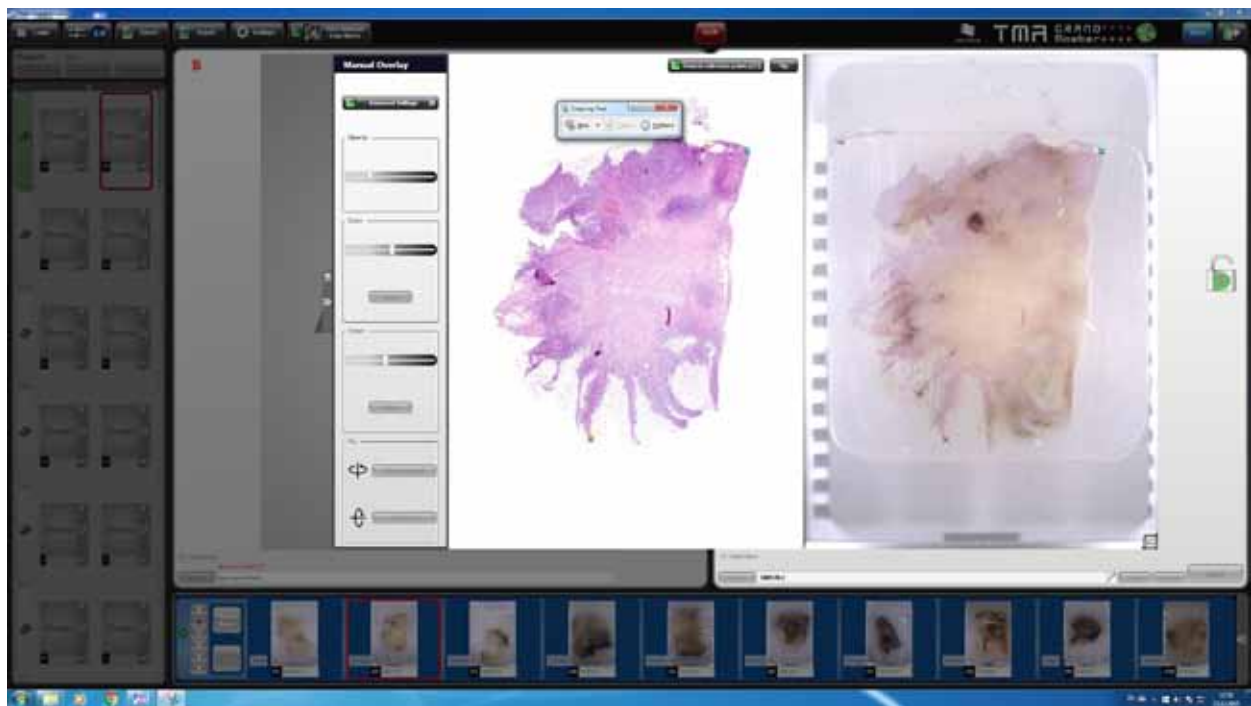


Рис. 2. Сопоставление изображений блока и отсканированного препарата

	A	B	C	D	E	F	
1	253406tme	X1	X2	X3	X4	X5	
2	Y1	exp	253406	253406	253442	253442	
3	Y2	253414	253414	253443	253443	253504	
4	Y3	253504	253445	253445	253543	253543	
5	Y4	253614	253614	253652	253652	253713	
6	Y5	253713	253839	253839	253947	253947	
7	Y6	253994	253994	254061	254061	254062	
8	Y7	254062	254067	254067	254131	254131	
9	Y8	254193	254193		254197	254197	
10							
11							

Рис. 3. Схема расположения гистологического материала в готовой ТМА матрице

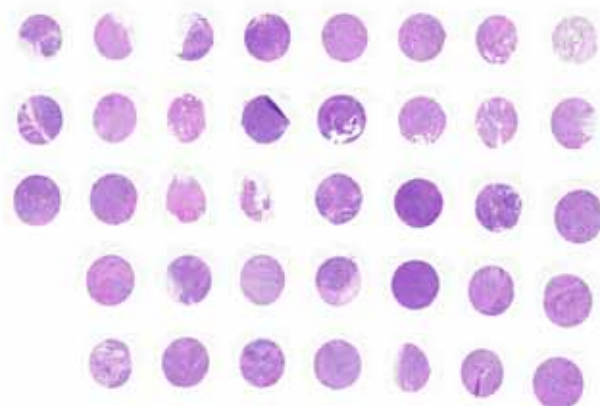


Рис. 4. Внешний вид готового ТМА препарата РЭ, ув. 5

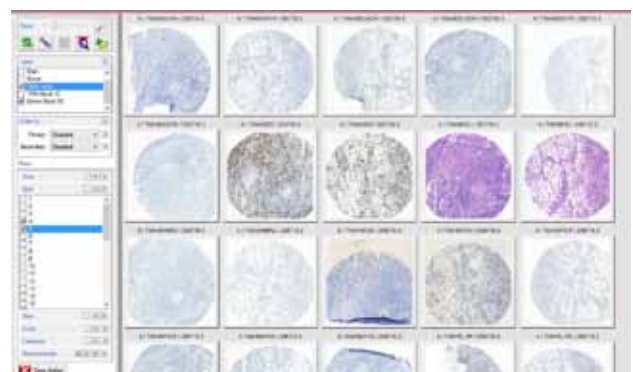


Рис. 5. Работа в программе ТМА модуль: расположение и привязка номеров блоков к изображениям

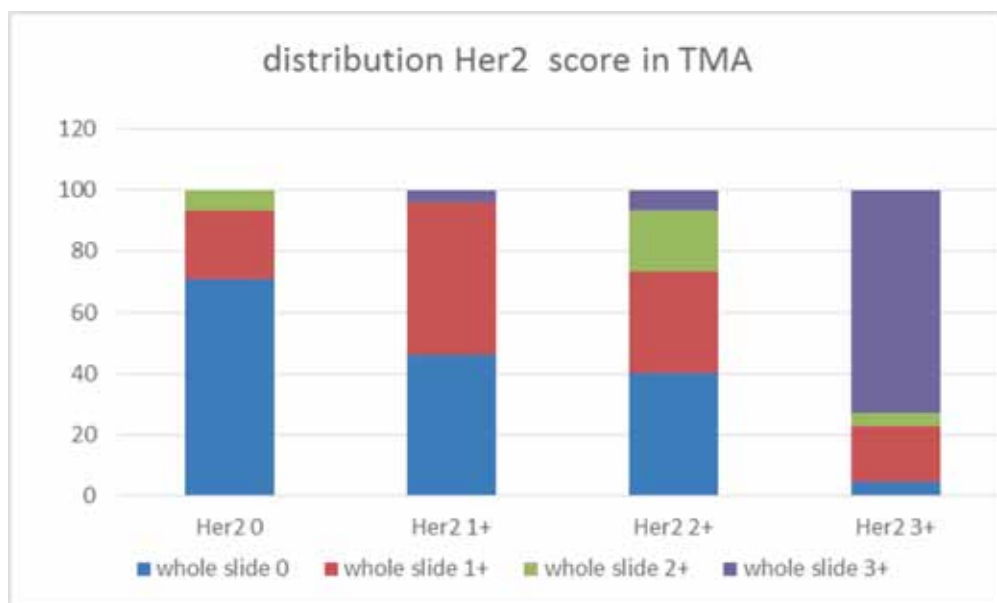


Рис. 6. Результаты сравнительного анализа окрашивания HER2 в полном срезе и TMA

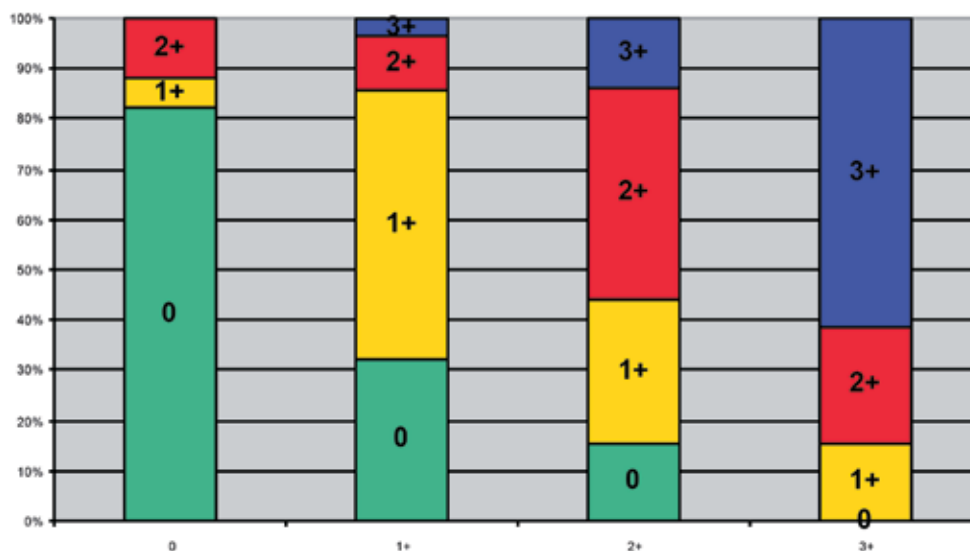


Рис. 7 Результаты сравнительного анализа окрашивания HER2 в централизованной лаборатории и сторонних лабораториях Северо-Западного региона

(рис. 5). Оценка рецепторного статуса и статуса HER2 осуществлялась согласно рекомендациям ASCO - CAP 2013 [6] (кратко: 0, 1+ - полное отсутствие мембранного окрашивания, частичное, слабое, едва заметное окрашивание менее 10% опухолевых клеток, 2+ слабое или умеренное полное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток, 3+ выраженное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток).

Результаты и обсуждение

При анализе результатов ИГХ окрашивания и сопоставлении с результатами предшествующих исследований, оказалось, что в 229 случаях имелось предварительное ИГХ окрашивание с одним (HER2) или тремя (ER, PgR, HER2) маркерами. При этом из 229 случаев, в которых

имелись результаты ИГХ исследования как с полного гистологического среза (т.е. классического исследования, которое в настоящее время считается золотым стандартом), так и с тканевой матрицы диаметром 2 мм, рецепторный статус совпал в 228 случаях. Расхождение было зафиксировано только в одном случае, причем, при исследовании полного гистологического среза был диагностирован негативный рецепторный статус, а при исследовании в TMA - положительный.

Распределение HER2 в полном срезе и TMA-спотах представлено в табл. 2. Негативный HER2 статус был обнаружен в 85,5% случаях при исследовании полного среза и в 82,6% случаях при исследовании материала TMA. При сравнении

индивидуальных показателей статуса HER2 имеется следующее совпадение оценок: для HER2 0 баллов (ТМА и полный срез) - 70,66%, для позитивного статуса (HER2 3+) - 72,72%.

Что касается промежуточных градаций при оценке статуса HER2 (категории HER2 1+ и HER2 2+), т.е. здесь процент расхождений варьирует от 6% (HER2 3+ в полном срезе и 2+ в ТМА) до 40% (HER2 0 в полном срезе и 2+ в ТМА). Полностью данные по распределению индивидуальных показателей статуса HER2 представлены в табл. 3 и на рис. 6.

Напомним, что уже больше столетия фиксированные в формалине и залитые в парафин ткани используются для гистологической диагностики, этот метод стал стандартом гистологического исследования [13]. Исследование гистологического материала в соотношении 1 см³ на один срез считается минимальным репрезентативным количеством, необходимым для диагностики. Между тем, 1 см³ опухоли, представленный в гистологическом срезе, составляет около 0,05% объема опухоли. Использование технологии тканевых матриц еще больше уменьшает объем материала, представленного для анализа (до 0,3% от минимального репрезентативного количества, т.е. до 0,0015% от минимального диагностического количества). Поэтому среди профессионального сообщества возникает настороженность или даже неприятие внедрения этой методики и рекомендаций к ее использованию. Однако, экономическая эффективность, быстрота анализа, воспроизводимость данных, получаемых при использовании методики ТМА, позволяют сослаться на то, что уже ни одно сколько-нибудь значимое исследование не проводится без использования тканевых матриц [3,10]. Наиболее известными считаются исследования D. Voduc et al. [14], который на основании ИГХ исследования 6500 карцином молочной железы с помощью методики тканевых матриц сформировал понятие «суррогатной панели маркеров» для определения молекулярного подтипа рака молочной железы.

Расхождение при оценке рецепторного статуса только в одном случае из 229 является ожидаемым и не противоречит данным литературы. В исследованиях R.L. Camp et al. [4] было показано, что забор 1 образца размером 0,6 мм в диаметре коррелирует с рецепторным статусом в 95% случаях, а увеличение количества забранных из донорского блока образцов с тем же диаметром увеличивает вероятность совпадений до 99,9%. В нашем случае проводился забор материала донорского блока из двух различных участков опухоли, предварительно совмещая изображения гистологического препарата и блока. В готовую тканевую матрицу по-

падали только гистологически подтвержденные репрезентативные образцы опухоли диаметром 2 мм. Скорее, мы ожидали и могли бы объяснить отсутствие рецепторов в объекте ТМА малым объемом забранного материала и опухолевой гетерогенностью, которая препятствовала полноценному исследованию рецепторного статуса. В нашем исследовании как раз, наоборот, в полном гистологическом препарате отсутствовала реакция с рецепторами эстрогенов и прогестерона, в то время как в малом материале рецепторный статус был позитивным.

Такое положение можно объяснить ошибочной первичной диагностикой, когда (в 2000-2009 гг.) в лаборатории использовались невалидизированные протоколы и тест-системы, в то время как для исследования ТМА были использованы современные системы автоматического иммуногистохимического окрашивания и валидизированные FDA тесты и протоколы, причем, лаборатория участвует в системе внешнего контроля качества NORDIQ.

Определение статуса HER2 до сих пор является важной и сложной задачей. Большое число ложноположительных и ложноотрицательных заключений по маркеру, корректное определение которого приводит к назначению таргетного препарата, привели к тому, что были созданы специальные закрытые тест-системы (Pathway, Ventava; Herceptest, DAKO; ORCLE, LEICA) и разработаны ориентированные на закрытые системы протоколы окрашивания. Определение корректности окрашивания и интерпретации результатов тестирования HER2 является одной из приоритетных задач международных систем контроля качества ИГХ окрашивания, таких как NORDIQ и UKNEQAS [15]. В многочисленных работах было показано, что использование закрытых систем тестирования и одобренных FDA протоколов является оптимальным методом определения статуса HER2 [5,12]. Вместе с тем, сравнительные показатели раундов тестирования в системе внешнего контроля NORDIQ показывают, что использование так называемых «домашних» систем при определении статуса HER2 приемлемо, если лаборатория регулярно проходит проверку в системе внешнего контроля и постоянно проводит работу по калибровке протоколов.

В нашем исследовании результаты определения HER2 статуса совпали в крайних категориях: это категория 0 – полное отсутствие окрашивания, совпадение отмечено в 70% случаев и категория 3+ (также более 70% совпадений). Промежуточные градации имели большой разброс данных. Эти данные совпадают с результатами референсного анализа статуса HER2 у пациенток с раком молочной железы. В рамках

программы референса данные из различных лабораторий перепроверялись в одной лаборатории с помощью валидизированных протоколов окрашивания (валидация проводилась с помощью системы внешнего контроля качества NOR-DIQC). Результаты окрашивания в централизованной лаборатории и сторонних лабораториях также имели высокие проценты совпадений по крайним значениям, а промежуточные результаты часто оказывались несовпадающими (рис. 7), что и требовало дополнительной перепроверки таких случаев в рамках референсных центров.

Таким образом, технология тканевых матриц, предложенная для единообразного, стандартного окрашивания ИГХ или FISH большого количества гистологического материала, может быть использована в клинической практике. Достижимая при этом существенная экономия реагентов при минимальных временных затратах позволяет рекомендовать эту технологию для больших скрининговых или потоковых исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albanghali M, Green A, Rakha E. et al. Construction of tissue microarrays from core needle biopsies - a systematic literature review. *Histopathology*. 2015 Aug 12 (epub ahead of print)
2. Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J. et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: Analysis by complementary DNA and tissue microarrays // *J Natl Cancer Inst*. – 1999. – Vol. 91. – P. 1758–1764.
3. Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers // *J Clin Oncol*. – 2008. – Vol. 34. – P. 5630–5637.
4. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma // *Lab Invest*. – 2000. – Vol. 12. – P. 1943–1949.
5. Gasljevic G, Lamovec J, Contreras JA. et al. HER2 in gastric cancer: an immunohistochemical study on tissue microarrays and the corresponding whole-tissue sections with a supplemental fish study // *Pathol Oncol Res*. – 2013. – Vol. 19. – P. 855–865.
6. Fitzgibbons P. L., Dillon D, Alsabeh R. et al. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Breast http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/breast_biomarker_template.pdf
7. Franco R, Caraglia M, Facchini G et al. The role of tissue microarray in the era of target-based agents // *Expert Rev Anticancer Ther*. – 2011. – Vol. 6. – P. 859–869.
8. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A. et al. Tissue microarrays for highthroughput molecular profiling of tumor specimens // *Nat Med*. – 1998. – Vol. 4. – P. 844–847.
9. Moch H, Schraml P, Bubendorf L High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma // *Am J Pathol*. – 1999. – Vol. 154. – P. 981–986.
10. Mucci NR, Akdas G, Manely S. et al. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: Evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression // *Hum Pathol*. – 2000. – Vol. 31. – P. 406–414.
11. Perrone EE, Theoharis C, Mucci NR et al. Tissue microarray assessment of prostate cancer tumor proliferation in African- American and white men // *J Natl Cancer Inst*. – 2000. – Vol. 92. – P. 937–939.
12. Pinder S E, Brown J P, Gillett Ch. et al. The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example // *J Clin Pathol*. – 2013. – Vol. 66 (3) – P. 169–177.
13. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types // *Clin Cancer Res*. – 1999. – Vol. 5. – P. 1966–1975.
14. Voduc D, Kenney K, Nielsen T. Tissue Microarrays in Clinical Oncology // *Seminars in radiation oncology*. – 2008. – P. 89–97.
15. Vyberg M, Nielsen S, Rge R Immunohistochemical expression of HER2 in breast cancer: socioeconomic impact of inaccurate tests // *BMC Health Serv Res*. – 2015. – Vol. 15. – P. 352.

Поступила в редакцию 12.01.2016 г.

A.G.Kudaibergenova, E.A.Turkevich, A.S.Artemieva

Determination of receptor and HER2 status of breast cancer using tissue matrix technology. Validation of the method

N.N.Petrov Research Institute of Oncology
St. Petersburg

We studied ability of TMA technique as alternative to analysis of whole sections (WS) for breast carcinomas. The study included 229 patients with breast carcinoma T1-2 N0 M0 treated within 2000-2009 years. After whole slide scanning were constructed TMA blocks using 2mm punches and TMA master device (3DHitech, Budapest). TMA results of immunohistochemistry of HER2 were compared retrospectively with the results of WS. General distribution of HER2 status for WS was: negative (0+1) 85,5%, unequal (2+) 6,07%, positive (3+) – 8.41%, for TMA cores negative (0+1) 82,6%, unequal (2+) 7,04%, positive (3+) – 10,33%. When we compared each cases for HER2 there was moderate agreement with negative (score 0) and positive(score 3+) case around 70% and poor agreement in HER2 (1+2+ category) – only 50% 25% including both false negative and false positive estimations. We thought such kind disagreement in individual group was due to using different primary antibodies (all not FDA-approved) in previous years compared with PATHWAY® rmAb 4B5 (Ventana) antibody which was used for TMA slides. For breast cancer TMAs could be reasonable alternative to WS. Especially for Her2 testing, should be used only FDA approved systems and this technique allow reduce time, reagent and finally cost of such type of analysis.

Key words: breast cancer, tissue matrix