



## Patolojide Doku Mikroarray Teknolojisi: Zaman ve Bütçe Avantajları

Hasan Tarık Atmaca, Oğuz Kul, Sıla Canpolat, Tuğçe Anteplioğlu

*Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye*

### ÖZET

Doku mikroarray (DMA) teknolojisi ilk olarak 1998 yılında ortaya konulan ve aynı anda çok fazla sayıda doku örneğinin histolojik, immunohistokimyasal veya in situ hibridizasyon (FISH) testleriyle incelenmesine imkân veren yeni bir tekniktir. Sunulan bu çalışmada; yüksek örnek sayısına sahip iki ayrı bilimsel araştırma projesinde kullandığımız DMA teknolojisi tanımlanmaktadır. Birinci çalışmada 108 parafin bloktan oluşan örnek sayısı 10 DMA alıcı bloğuna, ikinci çalışmada ise 700 parafin bloktan oluşan örnek sayısı 30 DMA alıcı bloğuna yerleştirilmiş ve immunohistokimyasal test ve analizleri yapılmıştır. Birinci çalışmada; 1 TUNEL ve 8 ayrı hücre belirteci için immunoperoksidaz teknik (IPT), ikinci çalışmada ise; 1 belirteç için IPT ve 1 hematoksilen eozin boyaması yapıldı. Test prosedürleri, çalışmanın tamamlanması için gereken toplam zaman ve her bir kesit için kullanılan kit ve sarf malzemelerin maliyeti hesaplandı. Özellikle çalışmalarda kullanılan örnek sayısı ve alınan kesit sayısı düşünüldüğünde, primer antikor ve immunohistokimyasal test solüsyonları açısından belirgin derecede ekonomik kazanç sağlandı. Her iki çalışma için ayrılan sürenin, doku mikroarray metodu ile belirgin derecede düştüğü ortaya çıktı. Sonuç olarak, doku mikroarray yönteminin yüksek örnek ve test sayısına sahip çalışmalarda, hem işgücü ve hem de ekonomik perspektif açısından çok kullanışlı bir yöntem olduğu gösterildi.

*Anahtar kelimeler: DMA, Doku mikroarray, Immunohistokimya, Maliyet hesabı, Patoloji*

## Tissue Microarray Technology In Pathology: Time And Cost Advantages

### ABSTRACT

The tissue microarray (TMA) was first described by Kononen in 1998, and represents a high-throughput technology for the assessment of histology-based laboratory tests, including immunohistochemistry and fluorescent in-situ hybridization (FISH). In this study, we described TMA methodology that we established in two different scientific research projects.

In the first study the number of samples were 108 paraffin blocks and these blocks were designed and embedded to 10 recipient TMA blocks, in the second study; the number of samples were 700 paraffin blocks and they were designed and embedded to 30 recipient TMA blocks. Then immunohistochemical tests and analyses were performed. In the first study, 1 TUNEL staining and immunoperoxidase test (IPT) for 8 immunological markers, in the second study IPT for 1 immunological marker and 1 histopathological analysis were done and total time for completion the study and cost of the kits and consumables used for each section was calculated. Significantly economic gain was achieved from primary antibody and immunohistochemistry test solution, considering the number of samples and sections that used in studies. The allocated time for study is minimized by tissue microarray method. Tissue microarray method was shown as a very useful method both labor force and economical perspective in interdisciplinary studies collaborating with pathology laboratories.

*Keywords: Cost calculation, Immunohistochemistry, Pathology, Tissue microarray, TMA*

**Correspondence to:** Hasan Tarık Atmaca, Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye. ht\_atmaca@yahoo.com

## Giriş

Doku mikroarray (DMA) teknolojisi ilk olarak 1998 yılında tanımlanmış ve dünyada birçok araştırmacı tarafından benimsenen ve yüksek örnek sayısına sahip histoloji-patoloji çalışmalarında kullanılan yeni bir teknik olarak yerini almıştır (Kononen ve ark., 1998). Doku mikroarray tekniği; formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda; ilgi duyulan lezyonlu bölgelerden alınan örneklerin alıcı bir parafin bloğa aktarılması ve çok sayıda dokunun tek bir kesitte temsil edilmesi olarak tanımlanır (Kallioniemi ve ark., 2001). Bu sayede, 20-150 arası farklı örneği içeren alıcı blok kesitlerinin değerlendirilmesi ile aynı laboratuvar koşullarında, hızlı, ekonomik ve eş zamanlı patolojik incelemeler yapılabilmektedir (Brown ve Huntsman, 2007). Doku mikroarray tekniği, özellikle rutin histopatolojik inceleme sonrasında, doku kesitlerinde DNA, mRNA veya proteinlerin in-situ hibridizasyon ve immunohistokimyasal testlerle işaretlenmesine ihtiyaç duyulduğunda tercih edilmektedir (Kallioniemi ve ark., 2001; Voduc ve ark., 2008; Brown ve Huntsman, 2007). Bunun nedeni, doku kesitlerinde uygulanan moleküler patoloji ve immunopatoloji tekniklerinin test başına olan maliyetlerinin ve laboratuvar işgücü gereksinimlerinin yüksek olmasıdır. Örneğin; immunoperoksidaz testlerde; ister manuel, ister otomatik immun boyama cihazı kullansın, bir patoloji uzmanı tarafından bir günde test edilebilecek örnek sayısı en fazla 40-50 ile sınırlıdır. Bu sayı, DMA tekniği kullanıldığında hemen hemen aynı miktarda sarf malzemesi harcanarak günde 5.000 örneğe kadar çıkarılabilmektedir.

Bu çalışma, Türkiye’de patoloji alanında DMA teknolojisi uygulanarak laboratuvarında sağladığı test süresi ve maliyet avantajlarının değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bu raporda, öncelikle DMA teknolojisinin temel prensipleri, kullanılan donanımlar, teknikler, avantaj ve dezavantajlarından bahsedilerek, yüksek sayıda örnek ve immunopatolojik belirteç sayısına sahip iki ayrı proje kapsamında gerçekleştirilen DMA uygulamalarının, konvansiyonel patoloji çalışmalarına göre sağladığı avantajların gösterilmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

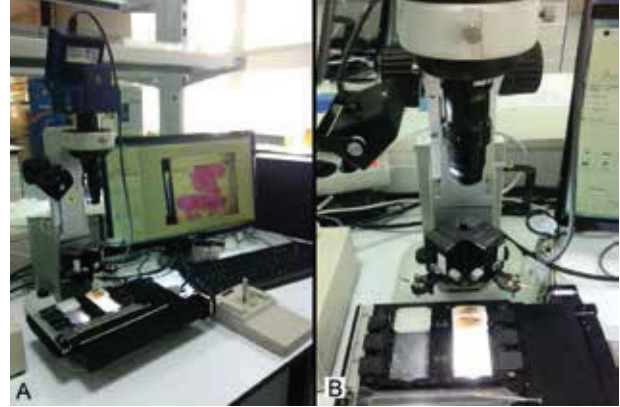
### Genel Doku Mikroarray Prosedürü

Doku mikroarray kullanımında manuel, yarı otomatik ve tam otomatik sistemlerden yararlanılmaktadır. Temel olarak parafin bloklara gömülmüş olan dokulardan farklı çaptaki iğneler (0,6mm, 1mm, 2mm, 3 mm) (Packeisen ve ark., 2003; İlyas ve ark., 2013) ile alınan örneklerin önceden yada DMA yapım aşamasında üzerinde isteğe bağlı olarak dizayn edilen çukurların oluşturulduğu alıcı bloklara dizilmesi ile şekillenmektedir. Alınan örnekler, verici parafin bloktan alınan ve tüm dokuyu içeren histolojik kesitlerin hematoksilin-eozin ile boyanması, mikroskopta incelenmesi ve DMA da kullanılacak ilgili bölgenin işaretlenmesi ile belirlenmektedir (Singh ve Sau. 2010).

### Çalışmalar

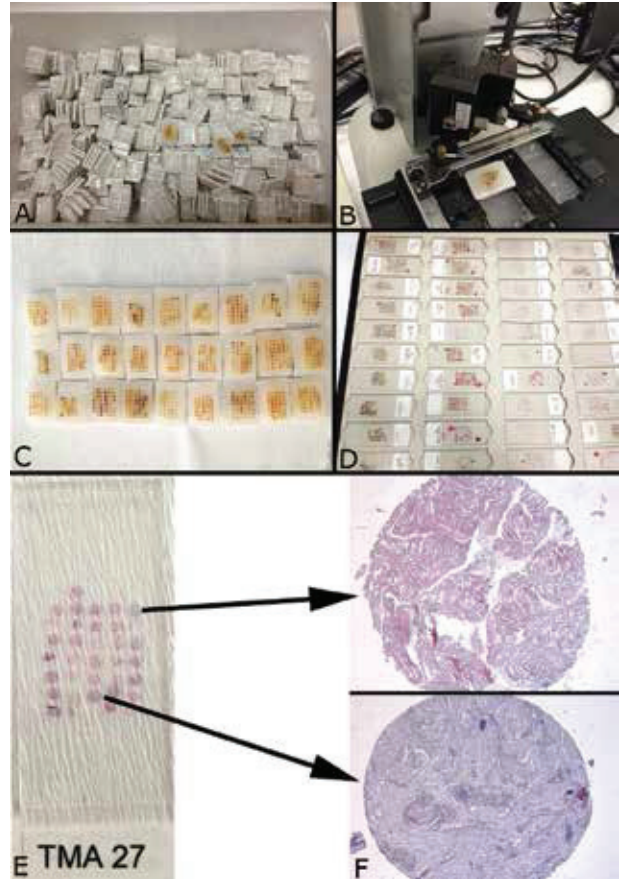
Çalışmalarda, doku mikroarray yapılması planlanan dokular, rutin patoloji takip işlemlerinden geçirilip parafine gömüldü. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları (KÜBTAL)’nda bulunan yarı otomatik Doku mikroarray cihazı (Galileo TMA CK2500, İtalya) (Şekil 1A) ile parafine gömülen dokuların istenilen bölgelerinden 2 mm çapında örnekler alındı (Şekil 1B). Rutin patoloji takip işlemlerinden geçirilip parafine gömülen bloklardan (Şekil 2A) daha önce 2 mm çapında açılmış 30-35 çukurdan oluşan yeni parafin bloklara aktarıldı (Şekil 2B ve 2C). Çukurlara aktarılan

dokuları içeren yeni parafin bloktan 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı (Şekil 2D). Alınan kesitler hematoksilin ve eozin veya immunohistokimyasal boyamalar ile boyandı (Şekil 2E ve 2F). Yapılan maliyet hesaplamaları 2013 yılı KÜBTAL hizmet bedelleri esas alınarak yapılmıştır (<http://kubtal.kku.edu.tr>)



Şekil 1. A. Doku mikroarray cihazının genel görünümü. B. Örneklerin verici bloktan alıcı bloğa aktarılması.

Figure 1. A. Appearance of tissue microarrayer. B. Transferring of samples from the donor block to the recipient block.



Şekil 2. Doku mikro array aşamaları. A. Rutin parafin doku blokları B. Parafin doku bloklarından TMA için örnek alınması C. Alınan örneklerin önceden kuyucuklar açılmış parafin bloklara yerleştirilmiş hali D. Yeni parafin bloklardan alınmış kesitlerin boyanmış hali E. Slayt üzerinde dokuların makroskobik görüntüsü F. Herbir kuyucuktaki dokuların mikroskobik görüntüsü

Figure 2. Tissue microarray stages. A. Routine paraffin tissue blocks B. Sampling for TMA from paraffin tissue blocks C. Tissue samples in to the holes on paraffin blocks D. Stained slides from new paraffin blocks E. Macroscopic view of the tissue on the slide F. Microscopic images of the tissue in each holes.

**Tablo 1.** Birinci DMA çalışmasına ait blok, kesit ve test sayılarına ait karşılaştırmalı bilgiler. KP:Klasik Patoloji, DMA: Doku mikro array, IPT: İmmunoperoksidaz

**Table 1.** Comparative data on the blocks, sections and tests of first TMA studies.

KP: Classic Pathology DMA: Tissue microarray, IPT: Immunoperoxidase

Blok sayısı	Kesit Sayısı	IPT 8 belirteç	TUNEL	Histomorfometri	TOPLAM
KP/DMA	KP/DMA	KP/DMA	KP/DMA	KP/DMA	
108/10	972/90	864/80	108/10	972/90	
Süre					
KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)
3/4	4/1	25/3	5/1	15/4	52/13
Maliyet					
KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)
1080/3024	4860/450	34560/3200	10080/1000	4860/200	55440/7874

İlk çalışmada, testis torsiyonu ile oluşturulan doku hasarında, farklı tedavi yöntemlerinin koruyucu etkisinin araştırılması planlandı ve toplamda 54 rat kullanıldı. Her bir ratın sağ ve sol testisleri ayrı blokları ve toplamda 108 blok elde edildi. Hazırlanan her bir bloktan 2 mm çapında 3'er örnek alınarak 10 alıcı bloğa aktarıldı ve bu bloklardan alınan kesitlere TUNEL testi ve 8 farklı belirteçle (TNFR1, Endotelin, Kaspaz 3, Kaspaz 8,

odağı' olarak belirlenen bölümünün, alıcı bir parafin blok üzerine aktarılması yer alır. Bu sayede alıcı bir blok üzerine 1mm çapında 100'den fazla test numunesi aktarılabilmektedir. Bu sayede, ileride yapılacak histokimyasal boyamalar, immunohistokimya ve in-situ hibridizasyon gibi rutin ve araştırma temelli laboratuvar testlerinin gerçekleştirilmesinde; testlerin bir örnekliği, zaman ve test maliyeti avantajları sağlanabilmektedir. Doku

**Tablo 2.** İkinci DMA çalışmasına ait blok, kesit ve test sayılarına ait karşılaştırmalı bilgiler. KP:Klasik Patoloji, DMA: Doku mikro array, IPT: İmmunoperoksidaz HP: Histopatoloji.

**Table 2.** Comparative data on the blocks, sections and tests of second TMA studies.

KP: Classic Pathology DMA: Tissue microarray, IPT: Immunoperoxidase HP: Histopathology.

Blok sayısı	Kesit Sayısı	IPT 1 belirteç	HP	Histomorfometri	TOPLAM
KP/DMA	KP/DMA	KP/DMA	KP/DMA	KP/DMA	
700/30	1400/60	700/30	700/10	700/90	
Süre					
KP/DMA(işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)	KP/DMA (işgünü)
3/6	25/1	18/1	5/1	12/2	63/11
Maliyet					
KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)	KP/DMA (TL)
7000/10600	7000/300	28000/1200	3500/1000	3500/450	48500/13550

eNOS, VEGF, TNF-alfa, Sitokrom-c) immunoperoksidaz testleri yapıldı ve tedaviler ile gruplar arası doku hasarı karşılaştırıldı.

İkinci çalışmada ise mezbahadan toplanan 100 koyuna ait dört farklı kas grubu ve beyinden alınan 3 ayrı bölge parafine bloklanarak toplam 700 parafin blok elde edildi. Toplamda her bir hayvana ait olan 7 farklı parafine gömülü dokulardan rastgele 3'er örnek alınarak 30 alıcı bloğa aktarıldı ve sonrasında histopatolojik inceleme ve immunoperoksidaz testler bu bloklardan alınan kesitlerde yapıldı.

### Bulgular ve Tartışma

Doku mikroarray teknolojinin temelinde; histopatolojik inceleme yapılan bir doku örneğinin parafin bloğundan 'ilgi

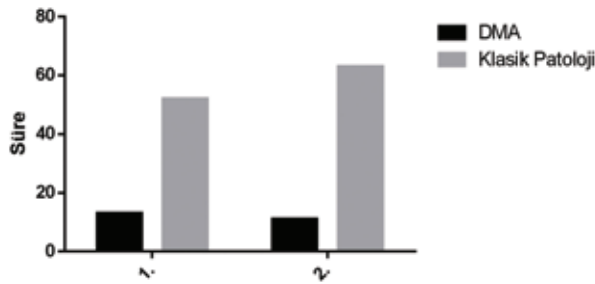
mikroarray teknolojisi, ayrı ayrı her bir doku örneği üzerinde geleneksel olarak yapılan immunohistokimyasal, FISH ve mRNA ISH testlerinin prosedüründe oldukça büyük bir avantaj sağlamıştır (Shebl ve ark., 2011). Bu avantajlardan birisi, DMA teknolojinin sağladığı ekonomik tasarruftur. Her ne kadar, DMA yapılan testlerin ve uygulanan geleneksel prosedürlerin fiyatını düşürse de, DMA teknolojinin kullanımını sağlayan donanımlar pahalıdır. Bu nedenle, DMA teknolojinin patoloji ve histoloji laboratuvarlarında kullanımı henüz istenilen düzeyde gerçekleşmemiş ve sınırlı sayıda laboratuvarlarda kullanıma geçmiştir (Singh ve Sau, 2010). Bu yüzden araştırmacıların birçoğu, daha ucuza mal olan DMA donanımları yapmak için çalışmaktadır (Pires ve ark., 2006, Singh ve Sau,

2010).

Bu çalışmada kullanılan DMA donanımı (Galileo TMA CK2500, İtalya) yarı otomatik bir cihaz olup, kullanıcının dokuların verici dokudan alınıp, alıcı bloğa yerleştirilmesine kadarki aşamaları takip ederek, alıcı bloktaki oyuklara konulan doku örneklerinin hatasız olarak yerleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Yapılan her iki çalışmada elde edilen histopatolojik ve immunohistokimyasal boyamalar için, kesitler ne kadar düzgün alındıysa boyanmalar da o kadar artefaksız oldu. Bazı çukurlardaki dokuların verici bloktan alınırken kırılması veya alıcı bloğa yerleştirildikten sonra çukura tam oturmaması gibi nedenlerle düştüğü görüldü. Bu dokular DMA yapıldıktan sonra alınan yedek kesitlerde tekrar boyanarak değerlendirildi. Birinci çalışmada kullanılan parafin blok sayısı, yapılan testler ve analiz süreleri Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

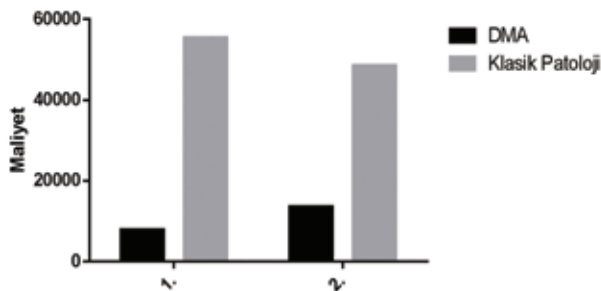
Birinci çalışma süresi, rutin patoloji, histopatolojik muayene ve immunohistokimya ile 52 işgünü alacaktı. Doku mikroarray ile yapıldığında bu işgününün 13 güne düştüğü, arada 39 günlük bir işgücü kazancı olduğu gösterilmiştir (Şekil 3). Maliyet ise işgücüne paralel olarak düşüş göstermiştir (Şekil 4).

İkinci çalışmada da benzer kazançlar elde edilmiştir (Şekil 3 ve 4). En önemli kazançlardan birisi ise immunohistokimyasal testlerde kullanılan antikor ve IPT kitlerinden elde edilen tasarruftur.



Şekil 3. Klasik patoloji ve DMA ile yapılan incelemelerde süre karşılaştırması. 1. Birinci çalışma, 2. İkinci çalışma.

Figure 3. Comparison of time on classic pathology and TMA. 1. First study, 2. Second study.



Şekil 4. Klasik patoloji ve DMA ile yapılan incelemelerinde maliyet karşılaştırması. 1. Birinci çalışma, 2. İkinci çalışma.

Figure 4. Comparison of cost on classic pathology and TMA. 1. First study, 2. Second study.

Birinci çalışmada IPT, klasik patoloji ile yapılan IPT'nin yaklaşık % 14.2'una karşılık gelen bir maliyet ile tamamlanmıştır. İkinci çalışmada da yaklaşık % 27.9'una karşılık gelmiştir. Her iki çalışmada da maliyetin büyük bölümünü oluşturan IPT kit sarfları büyük düşüş gösterdi ve ekonomik olarak avantaj sağlandı. Maliyet hesabının yanı sıra özellikle uzman personel

sayısının az olduğu patoloji laboratuvarlarında, rutin patolojik muayene iş süresinin doku mikroarray yöntemi ile oldukça kısaldığı gösterilmiştir. kesit başına kullanılan, başta primer antikor olmak üzere tüm immunperoksidaz test solusyonlarında, çalışmada kullanılan örnek sayısına göre değişmekle birlikte, önemli oranda tasarruf sağlanmıştır. Çalışmaya ayrılan süre doku mikroarray metodu ile en aza indirilmiştir.

## Sonuç

Sonuç olarak; hem ekonomi hem de işgücü göz önüne alındığında doku mikroarray metodunun, patoloji laboratuvarlarında disiplinler arası çalışmalarda çok kullanışlı bir yöntem olduğu yapılan uygulamalar ile gösterilmiştir.

## Kaynaklar

- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*;4:844–847.
- Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. (2008). Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol. Apr*;18(2):89-97. doi: 10.1016/j.semradi.2007.10.006.
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet. Apr*;10(7):657-62.
- Brown LB, Huntsman D, (2007) Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions. *J Mol Hist*;38:151-157.
- Singh A, Sau AK. (2010). Tissue Microarray: A powerful and rapidly evolving tool for high-throughput analysis of clinical specimens. *International Journal of Case Reports and Images*, 1:1-6
- Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları, <http://kubtal.kku.edu.tr>
- Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. (2003). Demystified...Tissue microarray technology *J Clin Pathol: Mol Pathol*;56:198–204
- Shebl AM, Zalata KR, Amin MM, El-Hawary AK. (2011). An inexpensive method of small paraffin tissue microarrays using mechanical pencil tips. *Diagnostic Pathology*, 6:117.
- Pires AR, Andreiuolo FD, Rabello de Souza S. (2006). TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagnostic Pathology*,1:14
- Ilyas M, Grabsch H, Ellis I O, Womack C, Brown R, Berney D, Fennell D, Salto-Tellez M, Jenkins M, Landberg G, Byers R, Treanor D, Harrison D, Green A R, Ball G, Hamilton P. (2013). Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. *Histopathology* 62, 827–839