

Efektywność zastosowania techniki mikromacierzy tkankowych do oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w gruczolakoraku endometrioidalnym *endometrium* – doniesienie wstępne

Effectiveness of tissue microarray technique for the assessment of estrogen and progesterone receptors expression in endometrioid endometrial cancer – preliminary report

Gottwald Leszek^{1,2}, Sęk Piotr³, Kubiak Robert⁴, Pasz-Walczak Grażyna⁴, Piekarski Janusz³, Szwalcki Jarosław^{5,6}, Suzin Jacek⁷, Tyliński Wiesław⁷, Hendzel Katarzyna⁵, Jeziorski Arkadiusz³

¹ Oddział Medycyny Paliatywnej, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi, Polska

² Poradnia Brachyterapii, Regionalny Ośrodek Onkologiczny, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi, Polska

³ Klinika Chirurgii Onkologicznej, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

⁴ Zakład Patomorfologii, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

⁵ Pracownia Histopatologiczna, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Pirogowa w Łodzi, Polska

⁶ Pracownia Histopatologiczna, Olympus Consilio Sp. z O.O. w Łodzi, Polska

⁷ Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej, I Katedra Położnictwa i Ginekologii Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

Streszczenie

Cel pracy: określenie efektywności biopsji bloku-dawcy igłą 2 mm w technice mikromacierzy tkankowych (TMA) oraz ocena przydatności techniki TMA do oceny ekspresji receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR) w gruczolakoraku endometrioidalnym *endometrium* (GEE).

Materiał i metody: Do badań wykorzystano bloki parafinowe z tkankami GEE od 60 chorych. Z każdego bloku-dawcy pobrano igłą 2 mm i przeniesiono do bloku-biorcy po dwie próbki tkankowe tworząc TMA. Określono efektywność biopsji bloku-dawcy, oceniając obecność tkanek GEE w preparatach z TMA. Zbadano ekspresję ER i PR w tkance GEE. Wyniki opracowano statystycznie.

Adres do korespondencji:

Leszek Gottwald
Oddział Medycyny Paliatywnej, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi
ul. Ciołkowskiego 2, 93-509 Łódź, Polska
tel: +48 42 689 54 81; fax: +48 42 689 54 82
e-mail: lgottwald@wp.pl

Otrzymano: 12.01.2012
Zaakceptowano do druku: 20.04.2012

Gottwald L, et al.

Wyniki: W preparatach z TMA obecność GEE stwierdzono w 56 przypadkach (93,33%), w tym w 49 przypadkach (81,67%) nowotwór był obecny w obydwu biopciatach. W 4 przypadkach (6,67%) w TMA nie stwierdzono tkanek GEE. Trafność biopsji bloku-dawcy (2 biopsje w każdym przypadku) wynosiła 87,50% (105/120). We wszystkich przypadkach z obecnością GEE objętość tkanek nowotworu w TMA umożliwiła ocenę obecności ER i PR. Jednocześnie ekspresję ER i PR stwierdzono w 29 przypadkach (51,78%), w 3 przypadkach (5,36%) występowała tylko ekspresja ER, w 8 przypadkach (14,29%) stwierdzono tylko ekspresję PR, a w 16 przypadkach (28,57%) brak było ekspresji ER i PR.

Wnioski: Dwa fragmenty tkankowe o średnicy 2mm pobrane z bloku-dawcy i umieszczone w bloku-biorcy TMA w 93,3% przypadków zawierały wystarczająco dużo materiału do oceny morfologii GEE oraz do oceny ekspresji ER i PR w tkance guza. Zastosowanie techniki TMA stanowi znaczne ułatwienie w prowadzeniu badań immunohistochemicznych nad biologią GEE.

Słowa kluczowe: **rak endometrium endometrioidalny / receptor estrogenowy / receptor progesteronowy / mikromacierze tkankowe / analiza mikromacierzy /**

Abstract

Objectives: To assess the effectiveness of the donor-block biopsies with a 2 mm-size needle in endometrioid endometrial cancer (EEC) in the tissue microarray (TMA) technique and the application of the TMA for estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) expression in EEC.

Material and methods: The study examined EEC tissues from 60 patients. Tissue cores, 2 mm in size, in duplicate, were taken from the formalin-fixed and paraffin-embedded tissue donor blocks and constructed into the TMA recipient block. The presence of EEC tissue in the TMAs was analyzed, and the ER and PR expressions were examined.

Results: EEC tissue in TMAs was confirmed in 56 cases (93.33%). In 49 of them (81.67%), both cores presented with cancer tissues. In 4 cases (6.67%) EEC tissue was absent. All cases with EEC present on the TMA slides were appropriate for the ER and PR analysis. In 29 EEC cases (51.98%) both ER and PR were expressed. In 3 cases (5.36%) only ER was expressed, in 8 cases (14.29%) only PR was expressed, and in 16 cases (28.57%) ER and PR were assessed as negative.

Conclusions: Two 2 mm-sized tissue cores from donor-block biopsies constructed into the TMA recipient block were sufficient to diagnose EEC and enabled the assessment of ER and PR expression in 93.3% of the cases. The use of the described TMA technique makes the immunohistochemical study of EEC easier and more time-efficient.

Key words: **cancer endometrial endometrioid / estrogen receptor / progesterone receptor / tissue microarrays / microarray analysis /**

Wstęp

Metoda mikromacierzy tkankowych (TMA – ang. *Tissue Microarray*) stanowi nowe narzędzie w histopatologii. Jej istotą jest zgromadzenie w pojedynczym bloku parafinowym tkanek z wielu nowotworów, które następnie są oceniane jako pojedynczy preparat mikroskopowy [1-4]. W swej obecnej formie została ona opisana po raz pierwszy przez Kononenko i wsp. w 1998 roku, jednak wciąż jest udoskonalana [5].

Bardzo istotnym elementem w konstruowaniu TMA jest wyselekcjonowanie i zgromadzenie odpowiednich bloków parafinowych zawierających badane tkanki (tzw. blok-dawca, ang. *donor block*). Z bloków tych wykonywane są preparaty barwione hematoksyliną i eozyną, które następnie poddawane są ocenie histopatologicznej w celu znalezienia i zaznaczenia na preparacie miejsc najbardziej reprezentatywnych dla danego rozpoznania. Podczas wytwarzania TMA, walcowate fragmenty tkankowe o średnicy od 0,6mm do kilku mm pobierane są z bloków-dawców i umieszczane w odpowiednich co do średnicy otworach w blokach-biorcach (ang. *recipient block*) [5]. Uważa się, że dwa do czterech fragmentów tkankowych pobrane z bloku-dawcy są wystarczające do oceny morfologii guza [6,7]. Pojedynczy blok-biorca może natomiast zawierać tkanki od kilkudziesięciu do nawet kilkuset nowotworów. Po zatopieniu w parafinie, poprzeczne

cięcie takiego bloczka pozwala uzyskać nawet do 200 skrawków o grubości 4µm zawierających tkanki zawsze z tych samych lokalizacji badanych guzów [1, 3]. Uzyskany metodą TMA pojedynczy skrawek umieszczony na szkiełku podstawowym jest barwiony i oceniany jako jeden preparat mikroskopowy.

Chociaż TMA nie wykorzystuje się obecnie w celu ustalenia rozpoznania choroby, to jednak są one coraz częściej stosowane do prowadzenia badań naukowych nad biologią nowotworów [2, 8], w tym także nowotworów ginekologicznych [6, 9-13]. Główne założenia techniki TMA pozostają niezmiennione, jednak nadal wprowadzane są modyfikacje w metodyce prowadzenia badań nad różnymi nowotworami [14-16].

W pracy postanowiliśmy zbadać możliwości zastosowania techniki TMA do badań nad gruczolakorakiem *endometrium* – najczęściej rozpoznawanym u kobiet w Polsce nowotworem złośliwym narządów płciowych [17, 18].

Cel pracy

Celem pracy było określenie efektywności biopsji bloku-dawcy igłą 2mm w technice TMA oraz ocena przydatności tej techniki w badaniu ekspresji receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR) w gruczolakoraku endometrioidalnym *endometrium* (GEE).

Efektywność zastosowania techniki mikromacierzy tkankowych do oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych...

Materiał i metody

Materiał badawczy

Do badań wykorzystano bloki parafinowe z tkankami GEE od 60 kolejnych chorych z macicy usuniętej podczas laparotomii w Wojewódzkim Specjalistycznym Szpitalu im. M. Madurowicza (obecnie im. M. Pirogowa) w Łodzi w latach 2001-2004.

Leczenie uzupełniające oraz kontrolę chorych po zakończonym leczeniu onkologicznym prowadzono w Regionalnym Ośrodku Onkologicznym w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. M. Kopernika w Łodzi. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/82/11/KE z dnia 17.05.2011 r.

Konstrukcja mikromacierzy tkankowych (TMA)

Na podstawie oceny histopatologicznej preparatów zabarwionych hematoksyliną-eozią (H+E), wyselekcjonowano bloki tkankowe zawierające reprezentatywne tkanki nowotworu. Z każdego bloku-dawcy, urządzeniem Tissue-Tek Quick-Ray Tissue Microarray System (Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA 90501 USA), igłą o średnicy 2mm, pobrano po dwie próbki tkankowe z miejsc wskazanych przez histopatologa na preparacie H+E.

Pobrane próbki tkankowe umieszczono w gotowych blokach parafinowych (Tissue-Tek Quick-Ray Recipient Block, Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA 90501 USA), tworząc TMA zawierającą bioptaty z 20 bloków-dawców z tkankami GEE. Z każdej TMA, po uprzednim zatopieniu w formalinie, skrojono za pomocą mikrotomu po 3 skrawki grubości 4µm.

Skrawki te następnie umieszczono na szkiełkach Super-Frost (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Pierwszy skrawek wybarwiono hematoksyliną i eozią (H+E). Określono efektywność biopsji bloku-dawcy igłą 2 mm, oceniając obecność tkanek GEE w preparacie TMA. Technikę wykonania TMA zobrazowano na rycinach 1-3.

Wykonanie i interpretacja odczynów immunohistochemicznych ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w tkankach GEE

Zbadano ekspresję ER i PR w tkankach GEE w preparatach z TMA. Użyto komercyjnych przeciwciał monoklonalnych (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) rozcieńczonych 1:150.

Dla oceny wyników posłużono się ośmiostopniową skalą (*ang. total score*) wg Allreda i wsp. [19]. Wyróżniono sześć stopni określających odsetek komórek nowotworu wykazujących dodatni odczyn jądrowy - A (0 = brak; 1 = <1%; 2 = <10%; 3 = 10-33%; 4 = 33-66%; 5 = >66%) oraz cztery stopnie określające intensywność odczynu - B (0 = brak; 1 = słaby odczyn; 2 = średni odczyn; 3 = silny odczyn).

Wyniki opisywano jako sumę A + B. Gdy wynik wynosił 0 pkt. - stwierdzano brak ekspresji, jeżeli było to 2 – 4 pkt. ekspresję oceniano jako słabą, w przypadkach gdy było to 5 – 8 pkt. stwierdzano silną ekspresję ER lub PR.

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu CSS Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK., USA). W celu porównania danych nieparametrycznych wykorzystano test χ^2 i test dokładny Fishera. Poziom istotności przyjęto jako $p < 0,05$.

Wyniki

Metodą TMA obecność tkanek GEE potwierdzono w 56 przypadkach (93,33%), a w 4 przypadkach (6,67%) nie uzyskano skrawków tkankowych pozwalających na rozpoznanie nowotworu ($p < 0,001$). W 49 przypadkach (81,67%) nowotwór rozpoznawano w obydwu fragmentach tkankowych z TMA, a w 7 przypadkach (11,66%) tylko w jednym fragmencie tkankowym ($p < 0,001$). Trafność biopsji bloku-dawcy (2 biopsje w każdym przypadku) wynosiła 87,50% (105/120).

We wszystkich 56 przypadkach, z obecnością GEE w preparacie z TMA objętość tkanek nowotworu w preparacie umożliwiła wykonanie i ocenę badań immunohistochemicznych. Brak ekspresji, słabą ekspresję i silną ekspresję ER stwierdzono odpowiednio w 24 (42,86%), 9 (16,07%) i 23 przypadkach (41,07%) GEE. Brak ekspresji, słabą ekspresję i silną ekspresję PR stwierdzono w 19 (33,93%), 8 (14,29%) i 29 (51,78%). Jednocześnie ekspresję ER i PR stwierdzono w 29 przypadkach (51,78%), w 3 przypadkach (5,36%) występowała tylko ekspresja ER, w 8 przypadkach (14,29%) stwierdzono tylko ekspresję PR, a w 16 przypadkach (28,57%) brak było ekspresji ER i PR.

Sposób wykonywania TMA zobrazowano na rycinach 1-3. Przykładowe obrazy mikroskopowe GEE w preparatach TMA przedstawiono na rycinie 4.

Dyskusja

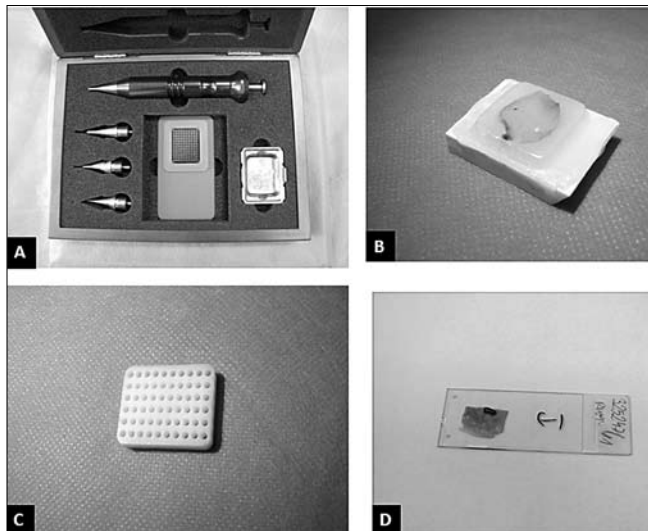
Stale unowocześniana technika TMA zyskuje w ostatnich latach coraz większe uznanie w prowadzeniu badań immunohistochemicznych w onkologii ginekologicznej [6, 10, 13, 20]. Także w chorobach ginekologicznych nie będących nowotworami, jak endometrioza, wskazuje się na korzyści wynikające z jej stosowania [21]. Najważniejsze zalety metody TMA to redukcja kosztów i czasu prowadzenia badań, możliwość analizy nawet kilkuset przypadków przy zużyciu zaledwie kilku mikrolitrów przeciwciała oraz fakt, że każde kolejne badanie jest prowadzone na precyzyjnie ustalonym i zawsze tym samym fragmencie guza [2-4, 7, 15, 20, 22, 23].

W badaniach immunohistochemicznych z wieloma przeciwciałami, ograniczenie pola oceny do 1-2mm zawsze tego samego fragmentu tkanki, czyni otrzymywane wyniki porównywalnymi i bardziej wiarygodnymi [13, 15].

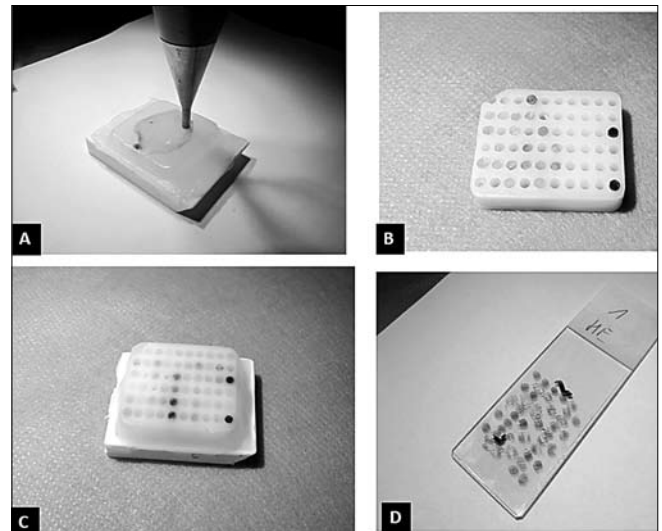
W naszym badaniu postanowiliśmy sprawdzić, czy dwumilimetrowe fragmenty tkankowe GEE z TMA stanowią materiał wystarczający do prowadzenia badań immunohistochemicznych. W tym celu zbadaliśmy ekspresję receptorów steroidowych ER i PR, których obecność jest zaliczana do czynników o istotnym znaczeniu klinicznym u chorych z GEE [13]. Spośród 60 GEE, obecność ER i PR stwierdziliśmy odpowiednio w 36 przypadkach (57,14%) i w 41 przypadkach (66,07%). Są to odsetki zbliżone do wyników badań innych autorów, gdzie ekspresję ER i PR w GEE obserwowano odpowiednio u 59-80% i 38-88% chorych [13, 24, 25].

Pomimo, że efektywność zastosowania metody TMA w ginekologii onkologicznej została już potwierdzona [9-13], niektóre elementy składowe metody pozostają nadal dyskusyjne [20, 26]. Liczne kontrowersje towarzyszą reprezentatywności 1-2mm fragmentów tkankowych nowotworów o zróżnicowanej budowie morfologicznej [7, 8]. Rozwiązaniem tej kwestii może być pobieranie większej liczby biopsji z bloku-dawcy, lub zwiększenie średnicy pobieranych fragmentów tkankowych [4, 8].

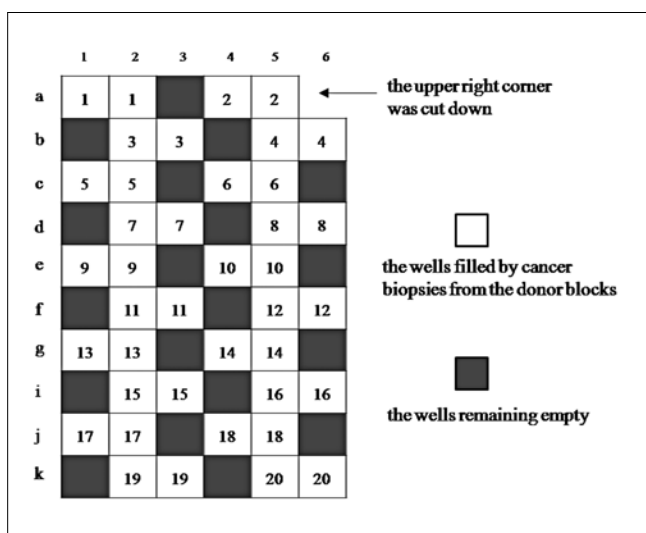
Gottwald L, et al.



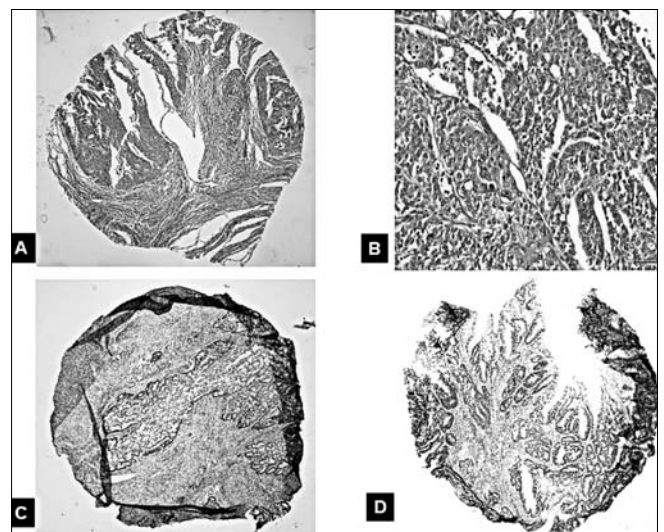
Rycina 1. Elementy używane do wytwarzania mikromacierzy tkankowych: A – zestaw Tissue-Tek Quick-Ray TMA System, B – parafinowy blok – dawca, C – parafinowy blok – biorca zawierający 60 otworów o średnicy 2 mm, D – preparat histologiczny z bloku – dawcy z zaznaczonym obszarem zajęтым przez nowotwór.



Rycina 2. Wytwarzanie mikromacierzy tkankowych: A – technika biopsji bloku – dawcy, B – blok – biorca częściowo wypełniony biopsjami z bloku – dawcy, C – gotowy parafinowy blok – biorca (TMA), D – preparat histologiczny z TMA (H+E).



Rycina 3. Schemat bloku – biorcy (TMA) obrazujący rozmieszczenie poszczególnych biopsji pobranych z bloku – dawcy.



Rycina 4. Dwumilimetrowe biopsaty z tkankami GEE w metodzie TMA: A+B – barwienie H+E, C – silna ekspresja ER, D – silna ekspresja PR.

W obu jednak przypadkach ceną za poprawę efektywności metody TMA jest większe uszkodzenie parafinowego bloku-dawcy. W sprzedaży komercyjnej znajdują się igły do wykonywania biopsji skrawków o średnicy 0,6-5 mm [4, 20, 21, 23, 27].

W prezentowanym badaniu stosowaliśmy igłę 2 mm pobierając każdorazowo po dwie biopsje bloku-dawcy, stwierdzając w preparacie z TMA tkanki GEE w 93,3% przypadków. We wszystkich tych przypadkach uzyskany obraz GEE w preparatach TMA pozwalał na ocenę odczynów immunohistochemicznych. Wykonana przez nas dotychczas liczba bloków TMA i oznaczeń immunohistochemicznych jest jednak zbyt mała i pozwala jedynie szacunkowo wnioskować o wysokiej efektywności przyjętej metodyki prowadzenia badań metodą TMA w GEE.

W piśmiennictwie szeroko dyskutowany jest problem utraty materiału tkankowego podczas wytwarzania TMA, szacowany przez różnych autorów na 3-30% [2, 8, 28, 29]. Jako jedną z przyczyn podaje się jakość parafinowego bloku-dawcy [2]. Uważa się, że jeżeli proces utrwalania trwał zbyt długo, lub blok jest zbyt wysuszony, to istnieje znaczne ryzyko pęknięcia bloku i jego nieodwracalnego uszkodzenia [28].

Z kolei w przypadkach, gdy z bloku było już uprzednio pobierane wiele wycinków i grubość tkanki w bloku jest niewielka, to ilość materiału tkankowego może być niewystarczająca do uzyskania reprezentatywnego fragmentu tkankowego w TMA [28]. Szczególnie w tych przypadkach, gdy skrawki tkankowe są cienkie, ryzyko zbyt głębokiego lub zbyt płytkiego osadzenia

Efektywność zastosowania techniki mikromacierzy tkankowych do oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych...

bioptatu w bloku-biorcy jest wysokie. Gulmann i wsp. podkreślają, że w sytuacjach, gdy bioptyaty tkankowe osadzone są w bloku-biorcy na różnych głębokościach, reprezentatywność tkanek w kolejnych następujących po sobie skrawkach może być różna [4].

Uważamy, że kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na trafność wykonanej biopsji jest wielkość obszaru zajmowanego przez GEE w fragmencie tkankowym zawartym w bloku-dawcy.

Mankamenty dotyczące konstrukcji mikromacierzy tkankowych są zatem nadal istotne i wymagają dalszych starań w celu uzyskania jak największej efektywności metody, w połączeniu z minimalizacją uszkodzeń archiwalnego materiału histopatologicznego.

Według naszej oceny wprowadzenie w ostatnim czasie do sprzedaży wykorzystanych w prezentowanej pracy gotowych parafinowych bloków-biorców z otworami o średnicach 1-5 mm do umieszczania bioptatów, w miejsce trudnych do wykonania i nietrwałych bloków tworzonych przez samych badaczy potwierdza, że ten kierunek działań jest możliwy i powinien być kontynuowany.

Wnioski

1. Dwa fragmenty tkankowe o średnicy 2mm pobrane z bloku-dawcy i umieszczone w bloku-biorcy TMA w 93,3% przypadków zawierały wystarczająco dużo materiału do oceny morfologii GEE oraz do oceny ekspresji ER i PR w tkance guza.
2. Zastosowanie techniki TMA stanowi znaczne ułatwienie w prowadzeniu badań immunohistochemicznych nad biologią GEE.

Piśmiennictwo

1. Voduc D, Kenney C, Nielsen T. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2008, 18, 89-97.
2. Takikita M, Chung J, Hewitt S. Tissue microarrays enabling high-throughput molecular pathology. *Curr Opin Biotechnol.* 2007, 18, 318-325.
3. Chen W, Foran D. Advances in cancer tissue microarray technology: towards improved understanding and diagnostics. *Anal Chim Acta.* 2006, 564, 74-81.
4. Gulmann C, O'Grady A. Tissue microarrays: an overview. *Curr Diagn Pathol.* 2003, 9, 149-154.
5. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, [et al.]. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998, 4, 844-847.
6. Kim J, Lim S, Park K, [et al.]. Cyclooxygenase-2 and c-erbB-2 expression in uterine cervical neoplasm assessed using tissue microarrays. *Gynecol Oncol.* 2005, 97, 337-341.
7. Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z. Tissue microarray technology in breast cancer HER2 diagnostics. *Pathol Res Pract.* 2007, 203, 169-177.
8. Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotech.* 2008, 19, 19-25.
9. Cimbaluk D, Rotmensch J, Scudiere J, [et al.]. Uterine carcinosarcoma: immunohistochemical studies on tissue microarrays with focus on potential therapeutic targets. *Gynecol Oncol.* 2007, 105, 138-144.
10. Fowler J, Ramirez M, Cohn D, [et al.]. Correlation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and aromatase expression in human endometrial cancer: tissue microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 192, 1262-1273.
11. Huang G, Arend R, Li M, [et al.]. Tissue microarray analysis of hormonal signaling pathways in uterine carcinosarcoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2009, 200, 457.e1-5.
12. Mhawech-Fauceglia P, Herrmann F, Andrews C, [et al.]. 14-3-3 σ expression and prognostic value in patients with epithelial ovarian carcinoma: a high throughput tissue microarray analysis. *EJSO.* 2009, 35, 763-767.
13. Jongen V, Briët J, de Jong R, [et al.]. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor-A and -B in a large cohort of patients with endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2009, 112, 537-542.
14. Mirlacher M, Simon R. Recipient block in TMA technique. *Methods Mol Biol.* 2010, 664, 37-44.
15. Tzankov A, Went P, Zimpfer A, Dimhofer S. Tissue microarray technology: principles, pitfalls and perspectives-lessons learned from hematological malignancies. *Exp Gerontol.* 2005, 40, 737-744.
16. Tennstedt P, Köster P, Brüchmann A, [et al.]. The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol.* 2012, 40, 261-268.
17. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut w Warszawie. Krajowa baza danych nowotworowych. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku. <http://www.onkologia.org.pl>.
18. Gottwald L, Chalubińska J, Moszyńska-Zielińska M, [i wsp.]. Gruczolakorak endometrium typu endometrioidalnego – analiza wartości prognostycznej wybranych parametrów klinicznych i histopatologicznych. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 743-748.
19. Allred D, Harvey J, Bernardo M, Clark B. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998, 11, 155-168.
20. Shergill I, Shergill N, Araya M, Patel H. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin.* 2004, 20, 707-712.
21. Karnat A, Younes P, Sayeeduddin M, [et al.]. Protein expression profiling of endometriosis: validation of 2-tissue microarrays. *Fertil Steril.* 2004, 82, 1681-1683.
22. Lugli A, Forster Y, Haas P, [et al.]. Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissues samples. *Hum Pathol.* 2003, 34, 994-1000.
23. Goldman T, Drömann D, Marzouki M, [et al.]. Tissue microarrays from HOPE-fixed specimens allow for enhanced high throughput molecular analyses in paraffin-embedded material. *Pathol Res Pract.* 2005, 201, 599-602.
24. Markova I, Duskova M, Lubusky M, [et al.]. Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2010, 20, 576-582.
25. Srijaipracharoen S, Tangjitgamol S, Tanvanich S, [et al.]. Expression of ER, PR, and Her-2/neu in endometrial cancer: a clinicopathological study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010, 11, 215-220.
26. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays for early target evaluation. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2004, 1, 41-48.
27. Chang E, Lee A, Lee E, [et al.]. HER2/neu oncogene amplification by chromogenic in situ hybridization in 130 breast cancers using tissue microarray and clinical follow-up studies. *J Korean Med Sci.* 2004, 19, 390-396.
28. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest.* 2001, 81, 1331-1338.
29. Mucci N, Akdas G, Manely S, Rubin M. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heteroenous protein expression. *Hum Pathol.* 2000, 31, 406-414.