

Beata Hryciuk<sup>1\*</sup>, Bartosz Szymanowski<sup>2\*</sup>, Michał Bieńkowski<sup>3</sup>, Adrian Perdyan<sup>4</sup>,  
 Aleksandra Korwał<sup>3</sup>, Kamil Winnik<sup>5</sup>, Barbara Radecka<sup>6</sup>, Jolanta Żok<sup>7</sup>, Natalia Cichowska<sup>8</sup>,  
 Katarzyna Sosińska-Mielcarek<sup>8</sup>, Rafał Pęksa<sup>3</sup>, Renata Duchnowska<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Mazowieckie Centrum Chorób Płuc i Gruźlicy, Oddział III w Otwocku

<sup>2</sup>Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Patomorfologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>4</sup>Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny w Gdańsku

<sup>5</sup>Zakład Patomorfologii, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. J. Korczaka w Słupsku

<sup>6</sup>Instytut Medycyny, Uniwersytet Opolski

<sup>7</sup>Wojewódzkie Centrum Onkologii w Gdańsku

<sup>8</sup>Klinika Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

\*Na prawach współautorstwa

# Zgodność w ocenie ekspresji biomarkerów między rdzeniami mikromacierzy tkankowych z pierwotnych ognisk raka pęcherzyka żółciowego i raka jajnika

Consistency in biomarkers expression between matched tissue microarray cores from primary gallbladder and ovarian cancers

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Hryciuk B, Szymanowski B, Bieńkowski M et al. Consistency in biomarkers expression between matched tissue microarray cores from primary gallbladder and ovarian cancers. *Oncol Clin Pract* 2019; 15. DOI: 10.5603/OCP.2019.0011.

Należy cytować wersję pierwotną.

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med. Renata Duchnowska,

prof. nadzw. WIM

Wojskowy Instytut Medyczny CSK MON

ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa

e-mail: rduchnowska@wim.mil.pl

## STRESZCZENIE

**Wstęp.** Technika mikromacierzy tkankowych (TMA) znalazła szerokie zastosowanie szczególnie w badaniach immunohistochemicznych nad nowymi markerami rokowniczymi i predykcyjnymi. Głównym zarzutem stawianym przez przeciwników tej metody jest niewielka ilość badanego materiału i związane z tym ryzyko nieadekwatnej oceny ekspresji analizowanych biomarkerów, wynikające z potencjalnej heterogenności tkanek guza.

**Materiał i metody.** W niniejszej pracy oceniono zgodność ekspresji biomarkerów w dwóch niezależnych rdzeniach tkankowych o średnicy 1,5 mm uzyskanych techniką TMA od chorych na raka pęcherzka żółciowego (ER $\beta$ , cytoPgR, HER2, CTGF) i raka jajnika (PTEN, BCL2, PIK3CA, IGF1R). Porównanie ekspresji poszczególnych biomarkerów między rdzeniami przeprowadzono przy wykorzystaniu współczynnika korelacji (ICC), przyjmując kappa < 0,4 jako korelację słabą,  $\geq 0,4$  wystarczającą,  $\geq 0,6$  dobrą i  $\geq 0,75$  optymalną oraz testu Kendalla tau — pakiet ICC.

**Wyniki.** Ocenę ekspresji biomarkerów w guzie pierwotnym przeprowadzono u 60 chorych na raka pęcherzyka żółciowego i u 64 chorych na surowiczego raka jajnika o wysokim stopniu złośliwości (*high grade*). U chorych na raka pęcherzykowego dodatkowo oceniono ekspresję badanych markerów w nabłonku wolnym od utkania nowotworowego. W obu nowotworach stwierdzono dobry lub wystarczający stopień jednorodności w ekspresji analizowanych biomarkerów między rdzeniami tkankowymi. Współczynnik korelacji dla ekspresji poszczególnych markerów w raku pęcherzyka żółciowego i przylegającej tkance zdrowej wyniósł: 0,68 (95% CI: 0,53–0,79)/0,62 (95% CI: 0,39–0,78) dla ER $\beta$ , 0,44 (95% CI: 0,23–0,61)/0,77 (95% CI: 0,61–0,87) dla cytoPgR, 0,77 (95% CI: 0,65–0,85)/0,66 (95% CI: 0,44–0,80) dla HER2 i 0,68 (95% CI: 0,53–0,79)/0,62 (95% CI: 0,39–0,78) dla CTGF. U chorych na raka jajnika współczynnik korelacji w obrębie guza pierwotnego wyniósł 0,82 (95% CI: 0,71–0,89) dla PTEN, 0,84 (95% CI: 0,75–0,90) dla BCL2, 0,71 (95% CI: 0,56–0,81) dla PIK3CA i 0,77 (95% CI: 0,65–0,85) dla IGF1R.

**Wnioski.** Technika mikromacierzy tkankowych pozwala na wiarygodną ocenę ekspresji biomarkerów tkankowych w obrębie pierwotnego ogniska raka pęcherzyka żółciowego i raka jajnika.

**Słowa kluczowe:** mikromacierze tkankowe, biomarkery, rak pęcherzyka żółciowego, rak jajnika

## ABSTRACT

**Introduction.** Tissue microarray (TMA) technique has been widely used, especially in immunohistochemical assays of new prognostic and predictive markers. The main objections raised by its opponents are the small amount of sampled material and the associated risk of inadequate assessment of analysed expression, resulting from the potential heterogeneity of tumour tissue.

**Material and methods.** This study evaluated the compatibility of biomarker expression in two independent tissue cores, 1.5 mm in diameter, obtained by TMA technique from patients with gallbladder cancer (ER $\beta$ , cytoPgR, HER2, CTGF) and ovarian cancer (PTEN, BCL2, PIK3CA, IGF1R). Comparison of the expression of individual biomarkers between cores was performed using the intraclass correlation coefficient (ICC), assuming a kappa < 0.4 as weak,  $\geq$  0.4 as sufficient,  $\geq$  0.6 as good, and  $\geq$  0.75 as optimal correlation, and Kendall's tau test — ICC package.

**Results.** Evaluation of biomarker expression in the primary tumour was performed in 60 patients with gallbladder cancer and in 64 patients with high-grade serous ovarian cancer. Additionally, in patients with follicular cancer, the expression of the tested markers was assessed in the epithelium free from neoplastic malignancy. In both tumours, a good or sufficient level of homogeneity was observed in the expression of the analysed biomarkers between tissue cores. The correlation coefficient for the expression of individual markers in gallbladder cancer and adhering healthy tissue was: 0.68 (95% CI: 0.53–0.79)/0.62 (95% CI: 0.39–0.78) for ER $\beta$ , 0.44 (95% CI: 0.23–0.61)/0.77 (95% CI: 0.61–0.87) for cytoPgR, 0.77 (95% CI: 0.65–0.85)/0.66 (95% CI: 0.44–0.80) for HER2, and 0.68 (95% CI: 0.53–0.79)/0.62 (95% CI: 0.39–0.78) for CTGF. In patients with ovarian cancer, the correlation coefficient within the primary tumour was 0.82 (95% CI: 0.71–0.89) for PTEN, 0.84 (95% CI: 0.75–0.90) for BCL2, 0.71 (95% CI: 0.56–0.81) for PIK3CA, and 0.77 (95% CI: 0.65–0.85) for IGF1R.

**Conclusions.** Tissue microarray technique allows reliable assessment of the expression of tissue biomarkers within the primary tumour of gallbladder cancer and ovarian cancer.

**Key words:** tissue microarrays, biomarkers, gallbladder cancer, ovarian cancer

Copyright © 2019 Via Medica

ISSN 2450-1646

Oncol Prakt Klin Edu 2019; 5: 111–115

## Wstęp

Technikę mikromacierzy tkankowych (TMA, *tissue microarray*) po raz pierwszy opisano w latach 80. XX wieku [1]. W kolejnych latach zmodyfikowana metoda znalazła szerokie zastosowanie szczególnie w badaniach immunohistochemicznych nad nowymi markerami rokowniczymi i predykcyjnymi [2, 3]. Umożliwia ona umieszczenie na jednym szkiełku podstawnym materiału tkankowego od wielu dziesiątek, a nawet setek chorych. W pierwszym etapie patolog dokonuje pod mikroskopem oceny całego skrawka wybarwionego hematoksyliną i eozyną tak, aby wyznaczyć do dalszej analizy najbardziej reprezentatywny, pozbawiony ognisk martwicy obszar nowotworu. W drugim etapie, z parafinowego bloczka tkankowego (tzw. dawcy), zawierającego utrwalony w formalinie fragment guza, za pomocą specjalnej igły pobierany jest mały, cylindryczny rdzeń o średnicy 0,6–2 mm. Rdzeń ten następnie umieszczany jest we wcześniej przygotowanym otworze znajdującym się w innym parafinowym bloczku zwanym „biorcą”. Aby zwiększyć reprezentatywność badanego materiału i zmniejszyć ryzyko utraty tkanek w procesie wybarwiania, zwykle dla każdego przypadku pobierane są co najmniej dwa rdzenie. Oprócz tego tworzona jest mapa zawierająca informacje o położeniu danego ma-

teriału, co pozwala go szybko zidentyfikować w bloku. Po zakończeniu procesu gromadzenia materiału, za pomocą mikrotomu uzyskuje się skrawki do badań, zawierające zwykle na jednym szkiełku podstawnym 50–150 przypadków [4]. Głównym zarzutem stawianym przez przeciwników tej metody jest niewielka ilość badanego materiału i związane z tym ryzyko nieadekwatnej oceny ekspresji analizowanych biomarkerów, wynikające z potencjalnej heterogenności tkanek guza. Dane dotyczące wiarygodności TMA w raku pęcherzyka żółciowego i raku jajnika są skąpe. W niniejszej pracy oceniono zgodność w ekspresji biomarkerów między dwoma rdzeniami tkankowymi uzyskanymi techniką TMA w obu wymienionych nowotworach.

## Materiał i metody

Charakterystyka ocenianych biomarkerów (białek)

Przedmiotem pracy byli chorzy, u których w ramach dwóch retrospektywnych badań naukowych badano ekspresję panelu biomarkerów tkankowych. Białka do analizy immunohistochemicznej wybrano na podstawie dostępnego piśmiennictwa, z uwzględnieniem dostępności przeciwciał i technicznych możliwości wykonania oznaczeń na archiwalnym materiale utrwalonym w forma-

Tabela 1. Badane przeciwciała oraz metody oceny immunohistochemicznej

Przeciwciało	Producent nr katalogowy	Stężenie	Odzyskiwanie epitopów	Czas ekspozycji	Tkanka kontrolna	Metoda oceny
ER $\alpha$	DAKO; anti-human; królicze klon EP1	RU	HIER; DAKO PT-link, wysokie pH	20'	Rak piersi	Półilościowa
ER $\beta$	Abcam; anti-human; królicze klon EPR3778; ab133467	1:70	HIER; DAKO PT-link, wysokie pH	Inkubacja nocna	Rak piersi	Półilościowa
PgR	DAKO; anti-human; mysie klon 636	RU	HIER; DAKO PT-link, wysokie pH	20' + linker mouse 15'	Rak piersi	Półilościowa
HER2	Ventana; królicze klon 4B5	RU	Odzyskiwanie epitopu w maszynie	20'	Rak piersi	Półilościowa
CTGR	Santa Cruz, California; kozie sc-14939	1:100	HIER, DAKO PT-link, wysokie pH	60'	Mięśnie gładkie	Półilościowa
PTEN	DAKO; clone 6H2.1	1:50	HIER, DAKO PT-link, wysokie pH	30'	Łożysko	Półilościowa
BCL2	DAKO monoclonal mouse clone 124	RU	HIER, DAKO PT-link, wysokie pH	20'	Węzeł chłonny	Półilościowa
PIK3CA	Cell signaling Rabbit monoclonal	1:50	HIER, DAKO PT-link, niskie pH	60'	Rak piersi	Półilościowa
IGF1R	Roche Rabbit Monoclonal (G11)	RU	Odzyskiwanie epitopu w maszynie	30'	Łożysko	Półilościowa

linie i zatopionym w parafinie. W projekcie dotyczącym raka pęcherzyka żółciowego wykonano analizę ekspresji receptorów dla hormonów steroidowych: estrogenowego  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) i  $\beta$  (ER $\beta$ ), progesteronowego (PgR), ludzkiego, naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*) oraz czynnika wzrostu tkanki łącznej (CTGF, *connective tissue growth factor*). Z kolei w raku jajnika badano ekspresję ludzkiego białka kodowanego przez gen supresorowy *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10, białka należącego do rodziny *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), białka podjednostki katalitycznej  $\alpha$ 3-kinazy fosfatydilinozytolu (*PI3KCA*, *phosphatidyl inositol 3-kinase*) oraz receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*IGF1R*, *insulin-like growth factor-1*).

#### Przygotowanie mikromacierzy tkankowych

W badanej grupie wycinki wybarwione hematoksylina i eozyną poddano ponownej ocenie histopatologicznej, co pozwoliło na zweryfikowanie rozpoznania oraz wyznaczenie najbardziej reprezentatywnych fragmentów nowotworu i tkanek zdrowych. Wybrane preparaty wraz z odpowiadającymi im bloczkami parafinowymi posłużyły do wyznaczenia obszarów guza, z których przy użyciu igły o średnicy 1,5 mm pobrano wycinki do mikromacierzy tkankowych. Biopaty fragmentów guzów umieszczano we wcześniej przygotowanych, beztkankowych blokach parafinowych — „biorcach”.

Mikromacierze tkankowe wykonywano za pomocą aparatu Manual tissue arrayer I firmy Beecher Instruments (MTAI, K7 BioSystems). W obu grupach pobierano po dwa fragmenty (biopaty) z guzów pierwotnych, a w projekcie dotyczącym raka pęcherzyka żółciowego dodatkowo również wycinki z sąsiednich tkanek zdrowych. Barwienia immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach tkankowych mikromacierzy o grubości 4  $\mu$ m. Zestawienie przeciwciał zastosowanych w badaniu wraz z metodyką wykonania immunohistochemicznych barwień umieszczono w tabeli 1.

#### Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą środowiska statystycznego R w wersji 3.4.3 [5] na podstawie danych zawartych w specjalnie przygotowanej bazie danych. Porównanie ekspresji poszczególnych biomarkerów między „rdzeniami tkankowymi” przeprowadzono przy wykorzystaniu współczynnika korelacji (ICC, *intraclass correlation coefficient*), przyjmując kappa < 0,4 jako korelację słabą,  $\geq 0,4$  — wystarczającą,  $\geq 0,6$  — dobrą i  $\geq 0,75$  — optymalną oraz testu Kendalla tau — pakiet ICC [6].

#### Wyniki

W ramach projektu dotyczącego raka pęcherzyka żółciowego ocenę ekspresji biomarkerów wykonano

**Tabela 2. Analiza zgodności w ekspresji ER $\beta$ , cytoPgR, HER2, CTGF między rdzeniami tkankowymi w raku pęcherzyka żółciowego i przylegającej tkance zdrowej (przy wykorzystaniu ICC, przyjmując kappa: < 0,4 jako korelację słabą,  $\geq$  0,4 wystarczającą,  $\geq$  0,6 dobrą,  $\geq$  0,75 optymalną oraz testu Kendalla tau — pakiet ICC)**

<b>HER2</b>	
Ogółem	0,74 (95% CI: 0,64–0,82)
Rak pęcherzyka żółciowego	0,77 (95% CI: 0,65–0,85)
Tkanka zdrowa	0,66 (95% CI: 0,44–0,80)
<b>cytoPgR</b>	
Ogółem	0,80 (95% CI: 0,73–0,86)
Rak pęcherzyka żółciowego	0,44 (95% CI: 0,23–0,61)
Tkanka zdrowa	0,77 (95% CI: 0,61–0,87)
<b>CTGF</b>	
Ogółem	0,66 (95% CI: 0,55–0,76)
Rak pęcherzyka żółciowego	0,68 (95% CI: 0,53–0,79)
Tkanka zdrowa	0,62 (95% CI: 0,39–0,78)
<b>ER<math>\beta</math></b>	
Ogółem	0,66 (95% CI: 0,55–0,76)
Rak pęcherzyka żółciowego	0,68 (95% CI: 0,53–0,79)
Tkanka zdrowa	0,62 (95% CI: 0,39–0,78)

ICC (intraclass correlation coefficient) — współczynnik korelacji

**Tabela 3. Analiza zgodności w ekspresji PTEN, BCL2, PIK3CA, IGF1R między rdzeniami tkankowymi w raku jajnika (przy wykorzystaniu ICC, przyjmując kappa: < 0,4 jako korelację słabą,  $\geq$  0,4 wystarczającą,  $\geq$  0,6 dobrą,  $\geq$  0,75 optymalną oraz testu Kendalla tau — pakiet ICC)**

<b>PTEN</b>	
Ogółem	0,82 (95% CI: 0,71–0,89)
<b>BCL2</b>	
Ogółem	0,84 (95% CI: 0,75–0,90)
<b>PIK3CA</b>	
Ogółem	0,71 (95% CI: 0,56–0,81)
<b>IGF1R</b>	
Ogółem	0,77 (95% CI: 0,65–0,85)

ICC (intraclass correlation coefficient) — współczynnik korelacji

w materiale tkankowym pochodzącym z cholecystektomii przeprowadzonej u 60 chorych leczonych w latach 2004–2016 w 4 ośrodkach onkologicznych w Polsce: Wojskowym Instytucie Medycznym w Warszawie, Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Opolskim Centrum Onkologii im. prof. Tadeusza Koszarowskiego oraz Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. J. Korczaka w Słupsku. Z kolei w projekcie dotyczącym raka

jajnika analizę przeprowadzono w guzie pierwotnym, w materiale pooperacyjnym pochodzącym od 64 chorych z rozpoznaniem raka surowiczego o wysokiej złośliwości (*high grade*), leczonych operacyjnie w latach 2010–2016, w Wojskowym Instytucie Medycznym w Warszawie.

W obu nowotworach stwierdzono dobry lub wystarczający stopień jednorodności w ekspresji analizowanych biomarkerów między rdzeniami tkankowymi. Nie wykazano ekspresji ER $\alpha$  w raku pęcherzyka żółciowego i tkance zdrowej. Współczynnik korelacji dla ekspresji dla pozostałych biomarkerów w raku pęcherzyka żółciowego i przylegającej tkance zdrowej wyniósł: 0,68 (95% CI: 0,53–0,79)/0,62 (95% CI: 0,39–0,78) dla ER $\beta$ , 0,44 (95% CI: 0,23–0,61)/0,77 (95% CI: 0,61–0,87) dla cytoplazmatycznego PgR, 0,77 (95% CI: 0,65–0,85)/0,66 (95% CI: 0,44–0,80) dla HER2 i 0,68 (95% CI: 0,53–0,79)/0,62 (95% CI: 0,39–0,78) dla CTGF. U chorych na raka jajnika współczynnik korelacji w obrębie guza pierwotnego wyniósł 0,82 (95% CI: 0,71–0,89) dla PTEN, 0,84 (95% CI: 0,75–0,90) dla BCL2, 0,71 (95% CI: 0,56–0,81) dla PIK3CA i 0,77 (95% CI: 0,65–0,85) dla IGF1R (tab. 2 i 3).

## Dyskusja

Nowotwory z natury są heterogenne, co powoduje, że w obrębie pierwotnego guza lub jego dalszych ognisk mogą występować znaczne genotypowe różnice, wynikające z selekcji klonów komórkowych [7–9]. Dlatego też heterogenność nowotworów ma charakter przestrzenny i czasowy. Z kolei w diagnostyce i kwalifikacji do leczenia, zwłaszcza ukierunkowanego molekularnie, istnieje konieczność określenia wiarygodnych czynników prognostycznych i predykcyjnych — biomarkerów. Niewątpliwie heterogenność wewnątrzguzowa w chorobie nowotworowej może prowadzić do błędnych wniosków i utrudniać rozwój medycyny personalizowanej [7–9]. Z tego powodu tak istotna jest walidacja metod diagnostycznych stosowanych w badaniach naukowych. Technika mikromacierzy tkankowych, dzięki zgromadzeniu na jednym szkiełku materiału pochodzącego od różnych chorych, znacznie skraca czas barwienia i oceny, oszczędza materiał tkankowy i ilość zużywanych odczynników, umożliwia przeprowadzenie badań w jednolitych warunkach i przy takich samych rozcieńczeniach stosowanych przeciwciał. Z kolei ocena tak małych fragmentów tkankowych budzi wątpliwości odnośnie ich reprezentatywności w odniesieniu do całego guza. Wyniki dotychczasowych badań dotyczących tego zagadnienia, przeprowadzonych na różnych nowotworach wskazują na wysoką zgodność wyników ocenianych w mikromacierzach i w pełnych skrawkach guza [10–18]. W poszczególnych badaniach rozbieżność w liczbie rdzeni

potrzebnych do uzyskania akceptowalnej reprezentacji próbek mogła wynikać z niejednorodności ekspresji antygenów w nowotworach [14, 16, 17, 19]. W pracy dotyczącej raka piersi stwierdzono, że jeden lub dwa rdzenie TMA w każdym przypadku dają wyniki, które są w 95% podobne do uzyskanych przy użyciu skrawków guza [10]. Jednak w większości badań walidacyjnych wykazano, że analiza dwóch do trzech rdzeni o średnicy 0,6 mm daje wyższe współczynniki zgodności niż użycie jednego rdzenia [10, 14–16]. Dlatego też w niniejszej pracy stosowano po dwa rdzenie o średnicy 1,5 mm. Wykazano wysoką jednorodność w ekspresji analizowanych biomarkerów z udziałem TMA w nowotworach, które dotychczas nie były przedmiotem podobnej oceny. Wiarygodność i użyteczność tej metody w diagnostyce innych nowotworów wymaga przeprowadzenia podobnych badań.

## Wnioski

W badaniach immunohistochemicznych nad nowymi biomarkerami rokowniczymi i predykcyjnymi w raku pęcherzyka żółciowego i raku jajnika TMA jest wiarygodną metodą diagnostyczną.

## Piśmiennictwo

- Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986; 55(2): 244–248, indexed in Pubmed: [3525985](#).
- Hewitt SM. Tissue microarrays as a tool in the discovery and validation of predictive biomarkers. *Methods Mol Biol.* 2012; 823: 201–214, doi: [10.1007/978-1-60327-216-2\\_13](#), indexed in Pubmed: [22081347](#).
- 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, indexed in Pubmed: [9662379](#).
- Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol.* 2008; 26(34): 5630–5637, doi: [10.1200/JCO.2008.17.3567](#), indexed in Pubmed: [18936473](#).
- Team RC (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2015). <http://www.R-project.org>.
- Wolak ME, Fairbairn DJ, Paulsen YR. Guidelines for estimating repeatability. *Methods in Ecology and Evolution.* 2012; 3: 129–137.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012; 366(10): 883–892, doi: [10.1056/NEJMoa1113205](#), indexed in Pubmed: [22397650](#).
- Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet.* 2014; 46(3): 225–233, doi: [10.1038/ng.2891](#), indexed in Pubmed: [24487277](#).
- Seoane J, De Mattos-Arruda L. The challenge of intratumour heterogeneity in precision medicine. *J Intern Med.* 2014; 276(1): 41–51, doi: [10.1111/joim.12240](#), indexed in Pubmed: [24661605](#).
- Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2000; 80(12): 1943–1949, indexed in Pubmed: [11140706](#).
- Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, et al. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol.* 2003; 16(1): 79–84, doi: [10.1097/01.MP0000047307.96344.93](#), indexed in Pubmed: [12527717](#).
- Fonseca FP de Andrade BA, Rangel AL, et al. Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014; 117(1): 81–88, doi: [10.1016/j.oooo.2013.08.029](#), indexed in Pubmed: [24332331](#).
- Khouja MH, Baekelandt M, Sarab A, et al. Limitations of tissue microarrays compared with whole tissue sections in survival analysis. *Oncol Lett.* 2010; 1(5): 827–831, doi: [10.3892/ol\\_00000145](#), indexed in Pubmed: [22966388](#).
- Griffin MC, Robinson RA, Trask DK. Validation of tissue microarrays using p53 immunohistochemical studies of squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol.* 2003; 16(12): 1181–1188, doi: [10.1097/01.MP0000097284.40421.D6](#), indexed in Pubmed: [14681317](#).
- Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, et al. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Arch.* 2003; 443(2): 115–121, doi: [10.1007/s00428-003-0833-z](#), indexed in Pubmed: [12802583](#).
- Gomaa W, Ke Y, Fujii H, et al. Tissue microarray of head and neck squamous carcinoma: validation of the methodology for the study of cutaneous fatty acid-binding protein, vascular endothelial growth factor, involucrin and Ki-67. *Virchows Arch.* 2005; 447(4): 701–709, doi: [10.1007/s00428-005-0002-7](#), indexed in Pubmed: [16012850](#).
- Su Y, Shrubsole MJ, Ness RM, et al. Immunohistochemical expressions of Ki-67, cyclin D1, beta-catenin, cyclooxygenase-2, and epidermal growth factor receptor in human colorectal adenoma: a validation study of tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(9): 1719–1726, doi: [10.1158/1055-9965.EPI-05-0946](#), indexed in Pubmed: [16985035](#).
- Rosen DG, Huang X, Deavers MT, et al. Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. *Mod Pathol.* 2004; 17(7): 790–797, doi: [10.1038/modpathol.3800120](#), indexed in Pubmed: [15073602](#).
- Leversha MA, Fielding P, Watson S, et al. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. *J Pathol.* 2003; 200(5): 610–619, doi: [10.1002/path.1374](#), indexed in Pubmed: [12898597](#).