

Вязовская Н.С.¹, Русинова Г.Г.¹, Азизова Т.В.¹, Ревина В.С.¹, Казачков Е.Л.², Сычугов Г.В.²

Оценка возможности использования днк архивных тканей, хранившихся в виде фиксированных в формалине и залитых в парафиновые блоки, в молекулярно-генетических исследованиях

1 – ФГУП Южно-Уральский Институт Биофизики, г. Озерск; 2 – ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Челябинск

Vyazovskaya N.S., Rusinova G.G., Azizova T.V., Revina V.S., Kazachkov E.L., Sychugov G.V.

Evaluating the feasibility of dna from archival tissues stored as FFPE samples for molecular and genetic studies

Резюме

Проведена оценка возможности использования ДНК, выделенной из тканей, архивных фиксированных в формалине и залитых в парафиновые блоки (ФФПБ), в зависимости от срока хранения тканей и метода исследования. Для генотипирования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии ДНК, выделенная из ФФПБ разных сроков хранения, пригодна в 100%. Для исследований методом ПЦР-ПДРФ ДНК пригодна в 100% при хранении ФФПБ менее 10 лет, и в 67,7% – при хранении ФФПБ более 10 лет. Возможность успешного использования ФФПБ определяется только сохранностью ДНК. **Ключевые слова:** молекулярно-генетический анализ, ФФПБ, ДНК архивных тканей

Summary

This study assessed the potential for use of DNA extracted from FFPE tissues in relation to the shelf life of paraffin blocks containing fixed tissues and analysis techniques. DNA extracted from fixed tissues embedded in paraffin blocks with various shelf lives was 100% suitable for genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. DNA was shown to be 100% suitable for PCR-RFLP analyses if extracted from paraffin blocks stored less than 10 years and 67.7% suitable for FFPE tissue shelf life more than 10 years. Potential for use of FFPE tissues depends only on the DNA quality.

Key words: molecular and genetic analysis, FFPE, DNA of archival tissues

Введение

В банках биоматериала персонала, подвергшегося профессиональному облучению, или населения, проживающего на радиационно-загрязненных территориях, имеется большой массив образцов тканей, фиксированных формалином и залитых в парафиновые блоки (ФФПБ) [1,2]. Исследование этого биологического материала важно для получения недостающих знаний о влиянии ионизирующего излучения на здоровье человека, и, прежде всего, на риск возникновения злокачественных новообразований.

Показано, что в России на предприятиях с вредными условиями труда повышен риск возникновения профессиональных раков, причем доля рака легкого среди них составляет 70% [3]. Так, в эпидемиологических исследованиях когорты работников ПО «Маяк», подвергшихся профессиональному пролонгированному внешнему γ -излучению и внутреннему α -излучению от инкорпорированного ^{239}Pu , показано повышение риска рака легкого [4-6]. Для выявления риска и механизмов

развития рака легкого при исследовании биологического материала, сохраненного в виде ФФПБ, наиболее перспективными являются молекулярно-генетические методы анализа [7]. Успешность таких исследований зависит от количества и качества выделенной геномной ДНК [8-10]. Известно, что качество ДНК, выделенной из ткани ФФПБ, определяется рядом факторов, и, в первую очередь, длительностью периода после смерти пациента до подготовки ФФПБ. Этот период может составлять 1–3 суток, что приводит к аутолизу ткани образца, и, как следствие, к деструкции и фрагментации ДНК [11]. Деградация ДНК приводит к снижению ее количественного выхода и ухудшению качества генетического материала.

Несмотря на то, что в литературе описано множество методик выделения ДНК из ФФПБ и ее частичного восстановления [12,13], важно показать, какие современные молекулярно-генетические методы применимы для исследования биологического материала, сохраненного в виде ФФПБ.

Таблица 1. Результаты подбора условий по оптимизации выделения ДНК из архивной ткани легкого

Номер группы*	Количество срезов на образец	Объем ПК, мкг/мл	Инкубация с ПК, час	M ± m**, A260/280	M ± m**, количество ДНК, нг/мкл на срез	p [^]	M ± m**, количество ДНК, нг/мкл раствора	p [^]
1	3	100	4	1,91 ± 0,01	23,66 ± 4,61	-	70,98 ± 13,80	-
2	3	100	16	1,99 ± 0,01	31,42 ± 0,97	0,240	94,28 ± 2,93	0,239
3	3	200	4	1,99 ± 0,01	48,91 ± 0,13	0,031	146,73 ± 0,39	0,031
4	3	200	16	1,89 ± 0,02	31,82 ± 0,50	0,219	95,45 ± 1,48	0,219
5	5	100	4	1,88 ± 0,01	51,91 ± 1,97	0,029	259,48 ± 9,80	0,007
6	5	100	16	1,99 ± 0,01	26,00 ± 0,62	0,664	129,98 ± 3,10	0,052
7	5	200	4	1,96 ± 0,02	31,88 ± 1,66	0,234	159,38 ± 5,88	0,027
8	5	200	16	1,97 ± 0,01	29,60 ± 6,22	0,522	148,00 ± 33,11	0,164

Примечание. * – каждая группа представлена тремя образцами; все образцы 8ми групп получены из одного ФФПБ; ПК – протеиназа К; жирным шрифтом выделена группа с оптимальными условиями выделения ДНК; ** – среднее арифметическое ± стандартная ошибка; p[^] – уровень значимости по сравнению с группой 1

Известно, что для выявления риска рака легкого является важным определение полиморфных вариантов генов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК).

В нашей предыдущей работе [14] была описана методика выделения ДНК из ФФПБ и частичное улучшение ее качества. Целью настоящего исследования являлась оценка возможности проведения генотипирования (на основе генов I и II фазы биотрансформации ксенобиотиков, а также гена-супрессора p53) с использованием ДНК, выделенной из образцов ткани ФФПБ. В работе использовали разные методы генотипирования.

Материалы и методы

Исследование было проведено на биологических образцах ткани легкого, полученной при аутопсии, и хранящейся в Радиобиологическом репозитории тканей человека (РРТЧ) Южно-Уральского Института биофизики [1]. После проведения аутопсии ткань фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 1 суток, осуществляли проводку и заливали фрагмент ткани жидким парафином. Заливку материала в парафин и изготовление парафиновых блоков проводили по стандартной методике [15].

Было отобрано 22 ФФПБ с фрагментами ткани легкого, подготовленных в период с 1981 по 2007 год. Для выделения ДНК из ткани легкого свежеприготовленные срезы толщиной 10 мкм в стерильных условиях помещали в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку, содержащую 1 мл кислоты.

Выделение ДНК проводили согласно технической инструкции производителя по использованию набора QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, USA). Для оптимизации выделения ДНК осуществляли подбор условий [14] – варьировали такими параметрами, как количество фермента протеиназы К, время инкубации с протеиназой К и количество срезов (табл. 1).

Количество выделенной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра «Spectronic Genesys 5» (Spectronic Inc., USA); целостность ДНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 2%-ом агарозном геле [14]. Длину фрагментов выделенной ДНК оценивали с помощью маркера pUC19/MspI (НПО «СибЭнзим», Россия). Для улучшения качественных и количественных характеристик деградированной ДНК, проводили ее удлинение, а также полногеномную амплификацию, используя набор REPLY-g FFPE Kit (QIAGEN, USA).

В образцах ДНК, выделенной из ткани легкого ФФПБ, определены полиморфные варианты генов I фазы биотрансформации ксенобиотиков – CYP1A1*2A (rs4646903), CYP1A1*2C (rs1048943), CYP2E1 (rs6413432), II фазы биотрансформации ксенобиотиков – mEPOX (rs1051740 и rs2234922), гена-супрессора опухоли p53 (rs1042522), а также делеционные варианты генов CSTM1, GSTT1. Генотипирование проводили с использованием метода ПЦР–ПДРФ анализа [13,16], а также масс-спектрометрической детекции продуктов реакции минисеквенирования на приборе Microflex (Bruker Daltonics, Germany).

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ «Statistica 6.0». Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия Стьюдента (при p ≤ 0,05). При сравнении долей использовали ф-преобразование [17].

Результаты и обсуждение

Было установлено, что самым оптимальным комплексом условий для выделения ДНК из ткани легкого ФФПБ, позволившим получить максимальный выход ДНК (51,91 нг на 1 срез; 259,48 нг/мкл) являлось использование 5 срезов ткани легкого ФФПБ при минимальном количестве фермента протеиназы К (100 мкг/мл) и минимальном времени инкубации с протеиназой К – 4 часа (таблица 1, группа 5).

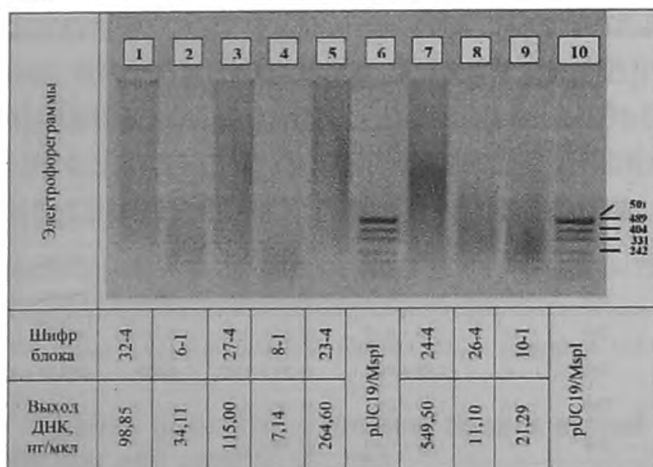


Рис. 1. Примеры электрофореграмм ДНК в 2,0 % агарозном геле (инвертированное изображение).

Проведено выделение ДНК из ткани легкого ФФПБ с использованием подобранных оптимальных условий.

Спектрофотометрический анализ выделенной ДНК показал, что значения оптической плотности A260/280 проб находились в пределах 1,8–2,0, что свидетельствовало о получении высокоочищенных препаратов [13,18]. Средний количественный выход ДНК составлял 112,53 нг/мкл и варьировал от 7,14 нг/мкл до 549,5 нг/мкл.

При оценке целостности ДНК методом гелеэлектрофореза показаны различия в количестве и качестве ДНК, выделенной из разных блоков. На электрофореграмме ДНК (рис. 1) яркие, четкие полосы разгона (дорожки 1, 3, 5 и 7) указывали на большой выход ДНК (от 98,85 до 549,50 нг/мкл). Полосы разгона с низкой интенсивностью свечения (дорожки 2, 4, 8 и 9) свидетельствовали о малом количестве ДНК. Оценка длины фрагментов выделенной ДНК с помощью маркера pUC19/MspI показала, что на дорожках 1, 3, 5 и 7 находились фрагменты с длиной более 500 п.н., в то время как на дорожках 2, 4, 8 и 9 ДНК была сильно деградированной, и ее основная доля была представлена фрагментами малой длины (менее 500 п.н.).

В результате оценки качества 22-х проб ДНК методом электрофореза и спектрофотометрии было установлено, что 18 проб ДНК были нормального качества (длина фрагментов более 500 п.н.), а 4 пробы ДНК имели низкое качество (длина фрагментов менее 500 п.н.).

Значительная степень фрагментации, а также малое количество ДНК делают затруднительным использование ДНК низкого качества для молекулярно-генетических исследований [9,19]. Применение набора REPLY-g FFPE Kit (QIAGEN, USA) для образцов ДНК низкого качества позволило осуществить пропорциональную наработку всех участков генома и частично восстановить поврежденную структуру ДНК. Однако качество ДНК было улучшено только в 50% образцов. По-видимому, это связано с тем, что длина фрагментов в исходных пробах тех образцов, которые не поддались восстановлению, была менее 500 п.н., что и явилось основной причиной невозможности улучшения качества ДНК в этих пробах.

При проведении молекулярно-генетических исследований с использованием выделенной из тканей ФФПБ ДНК стояла задача идентификации индивидуальных аллелей генов (генотипирование) с целью выявления полиморфных вариантов. Было проанализировано 10 генов I и II фазы биотрансформации ксенобиотиков, а также гены репарации ДНК.

Как указано выше, у части проб ДНК, выделенной из ткани при ауто-псии, отмечена высокая степень фрагментации, что не позволило наработать длинный ампликон для анализа. В связи с этим праймеры были подобраны с учетом получения коротких ампликонов.

При работе с нативной ДНК для проведения ПЦР в качестве матрицы обычно используют 100 нг/мкл ДНК [17]. В настоящем исследовании при работе с ДНК, выделенной из ткани, сохраняемой в виде ФФПБ, ее концентрацию увеличивали до 200 нг/мкл, чем достигали повышение вероятности присутствия в амплификационной смеси подходящих по длине фрагментов ДНК. Кроме того, для синтеза специфического фрагмента при проведении амплификации ДНК использовали Hot Start Taq ДНК полимеразу, которая является наиболее специфичной и высокочувствительной по сравнению с другими стандартными ДНК-полимеразам.

Идентификация генотипов методом масс-спектрометрии, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью детекции, была успешно проведена по всему изучаемому спектру генов во всех пробах ДНК.

Генотипирование образцов методом ПЦР с использованием ПДРФ-анализа было проведено только в 18 пробах ДНК, где ранее было установлено нормальное качество и количество исходной ДНК.

В 4 пробах ДНК низкого качества, где анализ ПДРФ не был успешным, было проведено частичное восстановление ДНК путем случайного лигирования коротких фрагментов исходной ДНК. В восстановленных пробах было успешно проведено генотипирование методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, но применение анализа ПДРФ снова не привело к положительным результатам.

Таблица 2. Зависимость качества ДНК случаев, взятых для исследования, от срока хранения ФФПБ

№	Срок хранения ФФПБ, лет	Общее количество случаев	Случаи с ДНК нормального качества (%)	M ± m, Значения %	Уровень значимости p*
1	<10	10	10 (100,0)	100,0±0,0	–
2	10 – 14	9	6 (66,7)	66, 7±5,6	0,032
3	15 – 31	3	2 (66,7)	66,7±19,2	0,043

Примечание. * – уровень значимости при сравнении с первой группой

Анализ качества ДНК, выделенной из ФФПБ в зависимости от срока хранения этих ФФПБ, показал, что из ФФПБ со сроком хранения менее 10 лет, ДНК нормального качества выделена в 100% случаев (табл. 2). При хранении блоков более 10 лет, ДНК нормального качества выделена в 66,7% со статистически значимым различием по отношению к первой группе (табл. 2).

Заключение

Использование двух методов генотипирования показало преимущество MALDI-TOF масс-спектрометрии, где результат получен в 100% проб; тогда как метод ПЦР-ПДРФ результативен был только в 82 % проб. Вероятно, как в исходной ДНК низкого качества из-за ее первоначальной высокой степени фрагментации, так и в частично восстановленной ДНК этих же образцов, отсутствовал сайт узнавания специфической рестриктазы, что и определило невозможность проведения ПДРФ-анализа.

Несмотря на то, что в частично восстановленной ДНК удалось провести генотипирование с применением масс-спектрометрии, использование восстановленной ДНК для идентификации генотипов не желательно с учетом того, что последовательность «сшитых» фрагментов может отличаться от их последовательности в исходной ДНК.

Заслуживает обсуждения качество ДНК, полученной из ФФПБ. Как показано в исследовании, не все пробы ДНК были нормального качества. Очевидно, качество проб ДНК зависит, прежде всего, от условий и продолжительности хранения биоматериала на предыдущих этапах до приготовления ФФПБ.

Следует отметить, что в последние годы произошел качественный сдвиг в сохранении тел умерших, обеспечивающий замедление аутолиза: появились холодильные камеры с оптимальной поддерживающей температурой; более жесткие нормы при лабораторной подготовке ФФПБ [15,20]. Так, строго регламентированы временные условия обработки тканей формалином в процессе приготовления ФФПБ, используемых для предотвращения распада клеток, как вещества, химически видоизменя-

ющего ДНК. Действительно, как показано в настоящем исследовании, во всех случаях, где срок хранения тканей в виде ФФПБ был менее 10 лет, ДНК выделена только нормального качества (табл. 2). Пробы ДНК, полученные из ФФПБ со сроком хранения >10 лет, были нормального качества только в 66,7%. (табл. 2). Предпринятые меры, оказавшие положительный качественный сдвиг в сохранении тел умерших, дают возможность получения ДНК из ткани ФФПБ, пригодной для молекулярно-генетических исследований в течение неограниченного времени сохранения блоков, при условии их правильного хранения. Так, в работах [9,21] показана возможность использования ФФПБ, сохраненных в течение пяти десятилетий, в молекулярно-генетических исследованиях, а также показано отсутствие влияния продолжительности хранения ФФПБ на качество белка в исследованиях по поиску биомаркеров.

Таким образом, как показано в настоящем исследовании, возможность успешного использования ФФПБ в описанных молекулярно-генетических методах анализа определяется сохранностью ДНК.

Если это условие выполняется, срок использования ФФПБ для применяемых молекулярно-генетических исследований может быть не ограничен, что подтверждается и литературными данными. ■

Вязовская Н.С.1, м.н.с. клинического отдела ЮУРИБФ; Рушинова Г.Г.1, к.б.н., ведущий научный сотрудник клинического отдела ЮУРИБФ; Азизова Т.В.1, к.м.н., зав. клиническим отделом ЮУРИБФ; Ревина В.С.1, научный сотрудник ЮУРИБФ; Казачков Е.Л.2, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии и судебной медицины ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России; Сычугов Г.В.2, к.м.н., ассистент кафедры патологической анатомии и судебной медицины ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Автор, ответственный за переписку: Казачков Евгений Леонидович, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64. e-mail: doctorkel@narod.ru Тел. 8(351)232-01-45. моб. +7-912-3233974.

Литература:

- 1 Кириллова Е.Н., Романов С.А., Лоффредо К.А. Радиобиологический репозиторий тканей человека: успехи и перспективы в решении проблем радиационной безопасности и здоровья персонала и населения. Радиационная биология. Радиэкология 2014; 54 (6): 565-581.
- 2 Рушинова Г.Г., Глазкова И.В., Гурьянов М.Ю., Азизова Т.В. Банк ДНК работников ПО «Маяк» и их семей.

- Медицина экстремальных ситуаций* 2010; 31: 93-100.
- 3 Соленова Л.Г. Профессиональный рак в России и роль онколога в его выявлении. *Онкология. Журнал им П. А. Герцена* 2012; 1: 83–86.
 - 4 Gilbert E.S., Sokolnikov M.E., Preston D.L. et al. Lung Cancer Risks from Plutonium: An Updated Analysis of Data from the Mayak Worker Cohort. *Rad. Res.* 2013; 179: 332–342.
 - 5 Sokolnikov M.E., Gilbert E.S., Preston D.L. et al. Lung, liver and bone cancer mortality in Mayak workers. *Int. J. Cancer* 2008; 123(4): 905–911.
 - 6 Tokarskaya Z.B., Scott B.R., Zhumtova G.V. et al. Interaction of radiation and smoking in lung cancer induction among workers at the Mayak nuclear enterprise. *Health Phys.* 2008; 83(6): 833–846.
 - 7 Lyon C.M., Klinge D.M., Liechty K.C. et al. Radiation induced lung adenocarcinoma is associated with increased frequency of genes inactivated by promoter hypermethylation. *Rad Res.* 2007; 168: 409–414.
 - 8 Belinsky S.A., Klinge D.M., Liechty K.C. et al. Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1063–1067.
 - 9 Hosein A.N., Song S., McCart R. et al. Evaluating the repair of DNA derived from formalin-fixed paraffin-embedded tissues prior to genomic profiling by SNP-CGH analysis. *Technical Methods and Pathology* 2013; 93(6): 701–710.
 - 10 Krijgsman O., Israeli D., Haan J. C. et al. CGH arrays compared for DNA isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2012; 51: 344–352.
 - 11 El-Harouny M.A., El-Dakroory S.A., Attalla S.M. et al. The relationship between postmortem interval and DNA degradation in different tissues of drowned rats. *The Internet Journal of Forensic Science* 2009; 4(1): 475-481.
 - 12 Ильянитов Е.Н., Григорьев М.Ю., Городинская В.М и др. Способ восстановления ДНК, изолированной из архивных патоморфологических образцов тканей. Патент на изобретение №:2219243. 2003.
 - 13 Херрингтон С., Макги Дж., ред. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М: Мир; 1999: 558.
 - 14 Вязовская Н.С., Русинова Г.Г., Азизова Т.В. и др. Возможность выделения ДНК из архивных тканей, полученных при аутопсии для молекулярно-генетических исследований. *Архив патологии.* 2014; 2: 46-47.
 - 15 Пальцев М.А., Франк Г.А., Мальков П.Г. Стандартные технологические процедуры при морфологическом исследовании биопсийного и операционного материала. *Архив патологии (приложение)* 2011: 112.
 - 16 Далгов В.В., Меньшиков В.В., ред. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. Т.1; М: 2012: 923.
 - 17 Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М: Медицина, 1975.
 - 18 Мануантис Т. Молекулярное клонирование. М: Мир, 1984.
 - 19 Salawu A., Ul-Hassan A., Hammond D. et al. High Quality Genomic Copy Number Data from Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Leiomyosarcoma: Optimisation of Universal Linkage System Labelling. *PLoS ONE* 2012. doi:10.1371/journal.pone.0050415; 7(11).
 - 20 Ясуи В., Ито Х., Тахара Е. Анализ ДНК в архивных образцах и его применение для изучения патогенеза опухолей. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. М: Мир; 1999: 517–531.
 - 21 Craven R.A., Cairns D.A., Zougman A. et al. Proteomic analysis of formalin- fixed paraffin-embedded renal tissue samples by label-free MS: Assessment of overall technical variability and the impact of block age. *Proteomics Clin Appl.* 2012.