



## Општи подаци и протокол истраживања

**Назив Пројекта :** УТИЦАЈ ФОРМАЛИНА И ПАРАФИНСКОГ БЛОКА НА СТЕПЕН ФРАГМЕНТАЦИЈЕ МОЛЕКУЛА ДНК У ТКИВИМА ЈЕТРЕ, СРЦА И МОЗГА ИЗУЗЕТИХ ПРИЛИКОМ ИЗВОЂЕЊА СУДСКОМЕДИЦИНСКИХ ОБДУКЦИЈА

**Кључне речи :** ДНК, формалин, парафински блок, судскомедицинска обдукција, PCR.

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

У току судскомедицинске обдукције, као стандардна процедура, изузимају се исечци различитих ткива који се чувају у раствору формалина, од којих се праве парафински блокови.

Савремене студије су показале да је могуће изоловати геномску ДНК и урадити генетска испитивања на узорцима различитих туморских ткива, која су чувана замрзнута или складиштена у виду парафинских блокова више година (1,2). Притом је утврђено да је у различитим врстама туморских ткива молекула ДНК различитог квалитета. Тумачење резултата који су добијени у току ових истраживања треба посматрати уз чињеницу да је у питању туморски измењено ткиво, које је по свим карактеристикама различито од здравог, тј. нетуморског ткива.

До сада су објављена два рада која су спроведена на нетуморском ткиву, добијеном у току обдукција, али се резултати тих истраживања односе на кратак временски период (од 270 дана до 5 година) чувања ткива у парафину (3,4).

Такође, не постоји сагласност научника ни око избора методе депарафинизације и изоловања молекула ДНК из парафинских узорака (5-8).

Информација о томе колико је дуго интегритет молекула ДНК очуван у парафинским блоковима здравог ткива и у ком ткиву је степен фрагментације најмањи, као и информације о избору најадекватније методе за изоловање ДНК, допринеле би постављању стандарда за прављење архиве у којој би се парафински узорци чували на најадекватнији начин, онолико година колико је ДНК очувана и корисна за спровођења одговарајућих генетских анализа.

### Циљ истраживања:

Због изузетног значаја које исечци ткива, као носиоци молекула ДНК, могу имати као материјално доказно средство у судским процесима, циљеви нашег истраживања су да на узорцима ткива из парафинских блокова и из раствора формалина, старим до 22 године извршимо:



1. испитивање утицаја формалина на деградацију молекула ДНК;
2. испитивање утицаја врсте ткива (срце, јетра, мозак) и дужине чувања ткива у парафинским исечцима на очуваност (степен фрагментације) молекула ДНК;
3. оптимизацију услова и начина изоловања молекула ДНК из узорака.

### Актуелност истраживања

Анализа геномске дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) има широку примену у форензичкој генетици с обзиром да су молекули ДНК јединствени и непоновљиви. Геномска ДНК се може изоловати из било ког материјала у коме постоје ћелије са једром, па биолошки материјал који се користи за анализу ДНК може бити било које ткиво или ћелија (крв и мрље од крви, корен длаке, семена течност, пљувачка, спутум, цереброспинална течност, урин, амнионска течност, ткиво узето биопсијом и др.). Најбољи резултати се добијају анализом живих ткива и крви, али и материјал са обдукције може бити употребљив све док, због одмаклих трулежних промена, не дође до потпуног уништења једарног материјала. Примена форензичке ДНК анализе постала је суверена метода у утврђивању идентитета особа, разјашњењу случајева криминалних радњи, утврђивању очинства, идентификацији жртава катастрофа и др. Идентификацију је могуће извршити било на основу упоређивања ДНК профила неидентификоване особе са ДНК профилем сродника, или се упоређивање врши са ДНК профилем који постоји у одговарајућој архиви узорака (9).

Молекули ДНК су у биолошким материјалима често деградовани због утицаја различитих фактора средине, материјали су оскудни или садрже неке инхибиторне супстанце које могу отежати изолацију молекула ДНК из узорка. Последица тога је добијање мале количине ДНК из узорка. Откриће ланчане реакције полимеразе (Polymerase Chain Reaction - PCR), која се заснива на процесу репликације ДНК у строго контролисаним условима, при чему долази до експоненцијалног повећања броја молекула ДНК у реакционој смеси, омогућило је процват у судскомедицинској пракси, захваљујући чињеници да је за успешну анализу довољно обезбедити минималне количине ДНК из биолошког материјала (9).

Досадашња истраживања показују да је могуће извршити изолацију геномске ДНК и урадити генетска испитивања на узорцима различитих туморских ткива, која су чувана замрзнута или складиштена у виду парафинских блокова и до неколико десетина година, при чему је у различитим врстама туморских ткива молекула ДНК различитог квалитета (1,2). Gulisa Turashvili и сарадници поредили су ефекат изолације из замрзнутог ткива материце, танког црева и јетре и ткива које је било у формалину различит временски период до 7 дана (10), а Fetter и сарадници су слично истраживање спровели на можданом ткиву, базирајући се на анализе генских мутација (11). Из парафинских блокова тумора дојке након периода од три месеца успешно су изоловани молекули ДНК помоћу неколико различитих метода (12); из парафинских блокова ректалних карцинома старих од 8 до 16 година (13); из парафинских блокова ларингеалног карцинома након периода од 25 година (14). Истраживања која су спроведена на здравом тј., нетуморском ткиву, које је изузето у току обдукција, су јако оскудна, јер се резултати тих истраживања односе на кратак временски период чувања ткива у парафину, и на само поједина ткива.

Информација о томе колико је дуго интегритет молекула ДНК очуван у парафинским блоковима здравог ткива и у ком ткиву је степен фрагментације најмањи, као и информације о избору



најадекватније методе за изоловање ДНК, допринеле би постављању стандарда за прављење архиве у којој би се парафински узорци чували на најадекватнији начин, онолико година колико је ДНК очувана и корисна за спровођења одговарајућих генетских анализа.

### **Предмет и опис истраживања: задаци, методологија, очекивани резултати**

Студија ће бити организована као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. За анализу ћемо користити исечке ткива јетре, мозга и срца који су изузети у току судскомедицинске обдукције и чувани у формалину, као и парафинске блокове истих ткива. Материјал се налази у архиви Службе за судску медицину и токсикологију КЦ Крагујевац, а за његово коришћење је добијена дозвола Етичког одбора КЦ Крагујевац (01-2798 од 15.03.2013. год.).

ДНК ће бити изолована из узорака који ће бити сврстани у старосне групе на по 6 месеци, све док не покажемо у ком моменту почиње фрагментација ДНК и у ком степену. Након тога ћемо ДНК изоловати из узорака који се међусобно разликују у дужини инкубације по годину дана, како би били сигурни да је после одређене временске тачке ДНК заиста деградована у великом степену.

**Контролна група:** Као контролни узорци биће коришћени узорци геномске ДНК изловане из културе нормалних хуманих ћелија, као и ДНК излована из узорака јетре, мозга и срца одмах након обдукције.

### ***Прављење микроскопских препарата и хистолошки опис ткива***

Парафински блокови се након хлађења секу на резове дебљине од 4 до 8 микрона, монтирају на предметна стакла у воденом купатилу, суше, а након тога се приступа депарафинизацији и бојењу ткивних резова са Мауеровим хематоксилином и алкохолним еозином, и испирају у раствору алкохола растућих концентрација (према протоколу РТ.35.01). Микроскопски препарати ће бити анализирани на микроскопу (Nikon SE), и описани морфолошки.

### ***Депарафинизација парафинских блокова***

За депарафинизацију ћемо користити слајсеве дебљине 10  $\mu\text{m}$  по узорку које ћемо најпре опрати у ксилену и рехидратисати у етанолу опадајућих концентрација.

### ***Изоловање молекула ДНК***

За изолацију молекула ДНК користићемо две различите методе:

#### **1. Екстракција уз помоћ фенол-хлороформ-изоамилалкохола**

Екстракција уз помоћ фенол-хлороформ-изоамилалкохола представља "златни стандард" у изолацији молекула ДНК. Узорци ће бити инкубирани у присуству дигестионог пуфера и протеиназе К. Након тога ћемо додати фенол-хлороформ-изоамилалкохол и центрифугирати на 10000 rpm. Супернатант преносимо у нову епрувету, и екстракцију поновљамо 2 пута. Центрифугирањем ће ДНК бити сталожена, а добро осушен талог ћемо растворити у ТЕ пуферу.

#### **2. Екстракција комерцијалним комплетом**



Ова екстракција представља употребу комерцијалног комплета за изоловање молекула ДНК. Комплетан поступак ће бити спроведен према процедури произвођача (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit).

### ***Спектрофотометрија***

Концентрација ДНК у узорцима, као и квалитет изоловане ДНК, биће одређен мерењем апсорбанце на 260 nm ( $A_{260}$  апсорбанца нуклеинских киселина) и на 280 nm ( $A_{280}$  апсорбанца протеина). Однос између  $A_{260}/A_{280}$  ћемо користити за одређивање односа нуклеинских киселина и протеина, тј за одређивање чистоће узорака.

### ***Ланчана реакција полимеразе (polymerase chain reaction - PCR)***

За извођење PCR реакције користићемо прајмере за 3 гена различите дужине:

1. GPDH величине од 150 bp,
2. ВЕТА АКТИН величине од 262 bp и
3. RPL 4 величине од 600 bp.

За PCR амплификацију, користићемо одговарајући пуфер и прајмере. После оптимизирања услова за извођење PCR реакције и одређивања одговарајућег броја циклуса (између 40 и 50), у свим узорцима ће бити амплификовани поменути гени.

Ампликони ће бити анализирани на 2 % агарозном гелу. Након електрофорезе гелови ће бити визуелизовани, анализирани и фотографисани.

### ***Снага студије и статистичка обрада података***

Величина експерименталне групе израчуната је на основу података из претходних радова (8) који су се бавили сличном тематиком: праг значајности ( $\alpha$ )=0,05; снага студије ( $1-\beta$ )=0,80 (80%); број група=2 при чему је  $N_1=N_2$ . На основу израчунавања, најмањи број узорака који је потребан по години је 6, што је укупно за период од 22 године 132 узорка, односно 396 узорака три различита ткива. Израчунатом величином узорка добија се актуелна снага студије од 0,831476 (83,14%).

Прикупљени подаци ће бити унети у компјутерску базу података, а за обраду података ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS for Windows. Дескриптивна статистика ће бити генерисана за све варијабле у студији. Значајност разлика по групама биће евидентирана параметријским (Анова) или непараметријским (Wilcoxon-Mann-Whitney test) у случају неправилне дистрибуције података. Подаци ће се сматрати статистички значајним уколико је  $p < 0,05$ . За одређивање тачног временског тренутка када је молекула ДНК неупотребљив за испитивање користиће се пробит анализа. Дефинитиван избор статистичких метода зависиће од природе добијених података у току студије.

### ***Очекивани резултати***

Очекује се да у узорцима ткива чуваним у формалину и узорцима складиштеним у парафинским блоковима одредимо:



- који је максималан временски период формалинске фиксације, да би се могао добити задовољавајући узорак за изолацију молекула ДНК;
- која је метода изоловања молекула ДНК најпогодина;
- у којој врсти испитиваног ткива је молекул ДНК најочуванији;
- до колико година је могуће изоловати молекул ДНК из узорака ткива из парафинских блокова.

### **Значај истраживања**

Пошто је искористивост молекула ДНК из узорака ткива фиксираног у формалину временски ограничена, и јако кратка, за форензичку праксу је важно пронаћи адекватан начин за чување узорака ткива након обдукције, који ће омогућити изолацију нефрагментисаног молекула ДНК и након дугог низа година. Ако из узорака ткива из парафинских блокова старих до 22 године изолујемо молекул ДНК, и покажемо у којој врсти ткива је ДНК најмање фрагментисан, управо овај метод може бити одређен за стандардну процедуру приликом сваке обдукције. Одабир најподеснијег ткива, стандардизовање начина за прављење парафинских блокова и њихово адекватно чување, имало би за резултат стварање архиве са узорцима ткива који би били доступни за форензичке анализе (идентификација особе које је пре смрти извршила злочин, утврђивање очинства или родбинских веза након смрти особе и др.). Оптимизирање процеса депарафинизације и изолације молекула ДНК, такође би били од великог значаја за добијање ДНК високог квалитета из парафинских узорака.

### **Временски оквир**

Истраживање ће се спровести у периоду од две године.

### **Литература**

1. Soya S. S., Label K.A., et al. Automation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology- Research and Practice* 208,(2012) 705-707.
2. Gilbert MTP, Haselkorn T., et al. The isolation of nucleic acid from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *Plos ONE* June 2007, 2(6):e537.
3. Funabashi K. S., Barcelos D., et al. DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: The effect of formalin fixation and paraffin embedding *Pathology-Research and Practice* 208, 2012; 584-591.
4. Ferryelo A., El-Assar M., et al., Transcriptional profiling and genotyping of degraded nucleic acid from autopsy tissue samples after prolonged formalin fixation times, *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4(1):156-161.
5. Farrygia A, Keyser C, Lydes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int.* 2010 Jan 30;194(1-3):e25-8.



6. Huyjsmans CJ, Damen J, et al. Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications. *BMC Res Notes*. 2010 Sep 14;3:239.
7. Elisa Cartyran, David J. Tester, et al. An evaluation of different DNA extraction protocols and the feasibility of mutational analysis from archival paraffin-embedded heart tissue. *Anatomic Pathology* 2008; 129:391-397
8. Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp*. 2011 Mar 26;(49).
9. Дуњић Д., *Експертизна медицина*, Београд 2008.
10. Tyrashvili G., Yang W., et al. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: Defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Experimental and Molecular Pathology* 92 (2012) 33-43.
11. Isidre Ferrer, Judith Armstrong et al., Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: A brainnet europe study, *Brain Pathology* 2007, 17(3), 297-303.
12. Pratiksha Dedhia, Shivraj Tarale et al., Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin –fixed paraffin-embedded tissues, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 8, 2007; 55-59.
13. Coyra R, Prolla JC, Meyrer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol*. 2005 Aug;58(8):894-5.
14. Gillio-Tos A., De Marko L., Fiano F., et al. Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology* (June 2007), 39 (3), pp. 345-348.