

Зависимость количества выделенной ДНК от сроков хранения архивных парафиновых блоков

Научный руководитель – Данилова Наталья Владимировна

Синкина В.Д.¹, Колина А.Д.², Вартапатрикова Н.А.³

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия, *E-mail: sinkina.2005@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра физиологии и общей патологии, Москва, Россия, *E-mail: arina.zaharkina@mail.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия, *E-mail: vartpatrikova@yandex.ru*

Ткани, фиксированные в формалине и залитые в парафин (formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE) являются ценным биологическим материалом, поскольку обеспечивают возможность ретроспективного изучения патологических процессов [1]. Однако, на сохранность макромолекул, выделяемых из парафиновых блоков, влияет множество факторов, включая концентрацию, рН и температуру фиксирующего раствора, время фиксации, температуру и длительность хранения FFPE-блоков [2]. В рамках данной работы изучалось влияние периода хранения архивных FFPE-блоков на количество выделенной ДНК, оцениваемой методом ПЦР.

В работе использовались 62 парафиновых блока из архива патологоанатомического отделения МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, хранящиеся от 0 до 5 лет (группа 1), от 5 до 8 лет (группа 2), от 8 до 10 лет (группа 3). В исследование отобраны FFPE-блоки с площадью среза не менее 0,5 см². Образцы ткани фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов с последующей однотипной гистологической проводкой и заливкой в парафин в одной лаборатории, что минимизировало вариабельность на начальных этапах. С каждого FFPE-блока изготавливали по 2 среза толщиной 10 мкм. ДНК из парафиновых блоков выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с помощью набора для выделения ДНК (ООО «БиоЛинк», Россия). Количественный анализ выделенной ДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора Real-time-PCR-HER2/neu (ООО «БиоЛинк», Россия). Количество ДНК оценивали по величине Ct, соответствующей количеству циклов ПЦР, при которых кривая флуоресценции пересекает заданный уровень фона. Значения Ct образцов сравнивали со значениями Ct разведений ДНК стандартов с известными концентрациями.

В 1 группе образцов со сроком хранения 0-5 лет медиана концентрации выделенной ДНК составила 10.00 нг/мкл [2.70-10.00], во 2 группе (5-8 лет) составила 0.20 нг/мкл [0.20-0.40], в 3 группе (8-10 лет) – 0.20 нг/мкл [0.20-0.20]. Выявлено значимое снижение количества ДНК в образцах при сроке хранения более 5 лет ($P=0,019631$ при сравнении групп 1 и 2; $P=0,000003$ при сравнении групп 1 и 3). При сравнении значений в группах 2 и 3 значимых различий не выявлено ($P>0,05$). Таким образом, при продолжительном хранении образцов (более 5 лет) концентрация ДНК в парафиновых блоках значимо снижается, что нужно принимать во внимание при ретроспективном анализе архивного материала.

Источники и литература

- 1) Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein // Biopreservation and Biobanking. 2013. Vol. 11, № 2, P.101-106.

- 2) 2. Nechifor-Boilă A, Banescu C, Zahan AE, Moldovan V, Szasz E, Borda A. DNA Isolation from Achieved Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues in a Series of 212 Thyroid Carcinoma Cases: The Influence of Preanalytical Factors on DNA Quantity and Purity // Journal of Investigative Medicine. 2020. Vol. 68, № 3, P. 792-798.