

Received: 2006.12.15  
Accepted: 2007.02.27  
Published: 2007.03.16

## Trudności w wykorzystaniu tkanek z archiwalnych blozków parafinowych w badaniach ekspresji RNA

### Difficulties in using archival paraffin-embedded tissues for RNA expression analysis

**Agnieszka Korga, Katarzyna Wilkołaska, Elżbieta Korobowicz**

Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej w Lublinie

#### Streszczenie

Wycinki tkankowe utrwalone w formalinie i zatopione w bloczkach parafinowych są wykorzystywane do rutynowej diagnostyki histopatologicznej, coraz częściej jednak stanowią materiał do badań molekularnych genomu oraz ekspresji genów z użyciem technik biologii molekularnej, takich jak PCR i RT-PCR. Poważnym ograniczeniem jest jednak wysoki stopień fragmentacji i chemicznych modyfikacji kwasów nukleinowych izolowanych z utrwalonych tkanek.

W pracy dokonano przeglądu danych dotyczących możliwości wykorzystania wycinków tkankowych z rutynowo wykonywanych blozków parafinowych do badań histologicznych, jako źródło matrycowego RNA. Trudności w uzyskaniu dobrej jakości RNA są związane przede wszystkim z wpływem formaliny na kwasy nukleinowe, a także innych czynników fizykochemicznych, jakie oddziałują na materiał tkankowy w czasie zabezpieczania i utrwalania. Niezbędna jest optymalizacja warunków izolacji RNA oraz reakcji RT-PCR. Zwrócono uwagę na coraz większą potrzebę wprowadzenia alternatywnych technik utrwalania materiału tkankowego, zapewniających lepsze zabezpieczenie zarówno makromolekuł, jak i morfologii tkankowej, a tym samym umożliwiających uzupełnienie diagnostyki histologicznej badaniami na poziomie molekularnym.

**Słowa kluczowe:**

**tkanki w bloczkach parafinowych • formalina • utrwalacze tkankowe • mRNA • RT-PCR**

#### Summary

Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections are used for routine histopathological diagnostics, but they have increasingly become material for molecular studies of genome and gene expression using molecular biological techniques such as PCR and RT-PCR. A major limitation is the significant degree of degradation and chemical modification of the nucleic acids recovered from fixed tissues. The purpose of this review is to provide an overview of studies on the possibility of using routinely prepared paraffin-embedded tissue sections as a source of messenger RNA. Difficulties in recovering high-quality RNA are mainly connected with the influence of formalin on nucleic acids and the effects of other physical and chemical agents on tissue during preservation and fixation. It is necessary to optimize RNA isolation and polymerase chain reaction conditions. Special attention is paid to the rising need to introduce alternative techniques for the fixation of tissue sections that provide for better preservation of both macromolecules and tissue morphology and for conducting histological diagnostics with molecular studies.

**Key words:**

**paraffin-embedded tissues • formalin • tissue fixatives • mRNA • RT-PCR**

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/10246.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10246.pdf)**Word count:** 2000**Tables:** –**Figures:** –**References:** 27**Adres autorki:** mgr Agnieszka Korga, Akademia Medyczna w Lublinie, Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin; e-mail: a.korga@interia.pl**Wykaz skrótów:** **A** – adenina; **C** – cytozyna; **cDNA** – komplementarny DNA; **dT** – deoksytymidyna; **G** – guanina; **HOPE** – technika utrwalania tkanek wykorzystująca efekt protekcyjny rozpuszczalnika organicznego; **ISH** – hybrydyzacja *in situ*; **mRNA** – matrycowy RNA; **PCR** – łańcuchowa reakcja polimeryzacji; **RT-PCR** – łańcuchowa reakcja polimeryzacji poprzedzona odwrotną transkrypcją; **T** – tymina; **TE** – bufor Tris-EDTA.

## 1. WSTĘP

Szybki rozwój technik biologii molekularnej oraz coraz szersze ich zastosowanie jest obserwowane w laboratoriach naukowych na całym świecie, ale również coraz większe znaczenie ma w diagnostyce rutynowej, zwłaszcza w diagnozowaniu nowotworów. Takie techniki jak RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) czy mikromacierze, są wykorzystywane do tworzenia profili ekspresji genów w określonych jednostkach chorobowych, co może mieć istotne znaczenie w określaniu nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych. Bogatym źródłem materiału biologicznego do badania ekspresji genów na poziomie mRNA są archiwa zakładów patomorfologii, w których przez lata są przechowywane wycinki tkankowe zatopione w bloczki parafinowe. Główną zaletą takiego materiału jest możliwość uzyskania podstawowych danych klinicznych pacjentów, od których został pobrany, pełne rozpoznanie histopatologiczne oraz ewentualne dodatkowe informacje, takie jak np. odpowiedź na leczenie. Zasadniczym problemem jest jednak izolacja z tego specyficznego materiału RNA o jakości wystarczającej do przeprowadzenia reakcji RT-PCR.

W 1991 r. po raz pierwszy udało się amplifikacja RNA uzyskanego z tkanek zatopionych w parafinie [26]. Mimo licznych modyfikacji metod izolacji możliwe jest uzyskanie jedynie krótkich fragmentów RNA, jednak dzięki rozwojowi technik amplifikacji udało się przybliżyć czułość reakcji do tych wykorzystujących jako matryce RNA z tkanek świeżych lub mrożonych [13,22].

## 2. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA JAKOŚĆ MATERIAŁU TKANKOWEGO WYKORZYSTYWANEGO DO BADAŃ

Materiał do badań molekularnych mogą stanowić fragmenty tkanek usuniętych chirurgicznie, materiał biopsyjny, krew pełna lub surowica, a także tkanki pobrane w czasie autopsji.

Bez względu na rodzaj materiału istotne jest jego odpowiednie zabezpieczenie, zależne od późniejszego przeznaczenia. Najczęściej wykorzystuje się materiał świeży, który może służyć do wyprowadzenia hodowli komórkowych lub bezpośredniej izolacji DNA, RNA lub białek. Wycinki mrożone, będące podstawą szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej mogą, podobnie jak tkanki świeże, po homogenizacji służyć do izolacji kwasów nukleinowych lub białek. Jednak w prak-

tyce zdecydowana większość pobieranego materiału tkankowego jest utrwalana i zatapiana w parafinie. Skrawki parafinowe są wykorzystywane w diagnostyce histopatologicznej oraz do badań immunohistochemicznych. W postaci bloczków parafinowych tkanki są również archiwizowane.

## 3. WPŁYW FORMALINY NA PIERWOTNĄ STRUKTURĘ RNA

Najbardziej rozpowszechnionym i stosowanym już od ponad 100 lat odczynnikiem utrwalającym jest formalina (40% roztwór formaldehydu w wodzie stosowany w rozcieńczeniu 1:9). Formalina doskonale zachowuje morfologię tkanek oraz większość epitopów wykrywanych w reakcjach immunohistochemicznych czy immunofluorescencyjnych, wpływa jednak niekorzystnie na strukturę kwasów nukleinowych. Podczas utrwalania może także dochodzić do zmian autolitycznych głębiej położonych tkanek, spowodowanych powolnością dyfuzji formaliny szczególnie w przypadku dużych wycinków [27]. W następstwie częściowej degradacji RNA oraz obecności wiązań krzyżowych z białkami i innych chemicznych modyfikacji RNA, reakcja izolacji przy wykorzystaniu tradycyjnych protokołów lub zestawów komercyjnych jest mało wydajna, a samo RNA niskiej jakości [16].

Podobnie jak w wypadku DNA, formaldehyd reaguje z zasadami azotowymi w cząsteczce RNA tworząc N-metylol (N-CH<sub>2</sub>OH). Następnie dochodzi do ataku elektrofilowego N-metylolu na grupę aminową, skutkiem czego jest utworzenie mostka metylenowego między dwiema grupami aminowymi. Jak wykazały badania wszystkie zasady azotowe reagują z formaldehydem, ale najbardziej reaktywna jest adenina. Po 16-godzinnej inkubacji w roztworze formaliny w temperaturze 4°C prawie 40% cząsteczek adeniny w syntetycznym RNA zawiera addycyjny monometyl. Wskazuje to na możliwość istotnych zmian w ogonie poliadenylowym utrwalonego mRNA [17].

Addycja metylolu w komórkowym RNA także zakłóca odwrotną transkrypcję i syntezę cDNA. Działanie to można częściowo znieść podgrzewając próbki RNA w buforze TE (Tris-EDTA). Ta tylko częściowa odwracalność jest przypisywana formowaniu mostków metylenowych między zasadami RNA i grupami aminowymi białek cytoplazmatycznych. Innym wyjaśnieniem pozostawiania grup aminowych w postaci niereaktywnej może być formowanie struktur drugorzędowych w jednoniciowym RNA [17].



Praca Hamatani i wsp. wykazała, że chemiczne modyfikacje RNA pochodzącego z tkanek utrwalanych w niezbuforowanej formalinie i przechowywanych przez wiele lat mogą zostać zniszczone poprzez ogrzewanie próbek w buforze cytrynianowym o pH 3–6,5 [10].

#### 4. WARUNKI UTRWALANIA W FORMALINIE

##### a) Temperatura

Rutynowe utrwalanie tkanek w temperaturze pokojowej ma niekorzystny wpływ na strukturę kwasów nukleinowych i może spowodować utratę nawet do 30% ich cząsteczek [5,6]. Wskazano, że utrwalanie w formalinie w temperaturze +4°C zapewnia lepszą ochronę DNA i RNA, a ponadto nie wpływa znacząco na morfologię tkanek [18,24].

##### b) pH

Wykazano, że utrwalanie tkanek w formalinie o obniżonym pH zmniejsza wydajność izolacji kwasów nukleinowych [11]. Stąd konieczność stosowania formaliny zbuforowanej w odpowiednio dużej objętości w stosunku do pobranego wycinka. W tkankach utrwalanych w formalinie o pH 3,0 stwierdzono zwiększoną liczbę mutacji artefaktowych. Sugeruje się, że obniżone pH sprzyja depurynacji, czyli usuwaniu pojedynczych zasad azotowych z łańcucha węglowo-fosforanowego jednej z nici DNA, a w konsekwencji tworzeniu się nieprawidłowych par nukleotydów [7].

Badania ekspresji niektórych genów na poziomie RNA w wycinkach z ludzkiego gruczołu piersiowego wykazały, że utrwalanie tkanki w formalinie o wysokim pH znacząco wzmacnia sygnał hybrydyzacji *in situ* (ISH), zarówno w przypadku mRNA występującego w komórce w dużej, jak i w małej liczbie kopii [2].

##### c) Czas „przed utrwaleniem” tkanek

Czas, jaki upływa od chwili pobrania wycinka do umieszczenia go w płynie utrwalającym jest niezwykle istotny dla zachowania struktury kwasów nukleinowych. Wykazano, że zmiany biochemiczne zachodzą w tkankach w ciągu 10 minut od ustania krążenia [11,14]. Z tego powodu wycinki powinny być jak najszybciej utrwalane, zwłaszcza w przypadku narządów o wysokim poziomie RNaz i proteaz, np. trzustki, pęcherzyka żółciowego czy skóry. Wszelkie czynności *ex vivo*, takie jak fragmentacja czy orientacja wycinka, powinny być przeprowadzone szybko i sprawnie, aby zapobiec utracie enzymów, zniszczeniu mitochondriów oraz transkrypcji białek apoptotycznych spowodowanej postępującym niedotlenieniem [23].

W tkankach pobranych podczas autopsji rozpad RNA i białek jest bardzo gwałtowny, dlatego czas, jaki upłynął od śmierci organizmu do pobrania wycinka ma istotny wpływ na wynik badań molekularnych [23].

#### 5. WARUNKI REAKCJI RT-PCR

##### a) Izolacja RNA

Warunkiem przeprowadzenia reakcji RT-PCR jest uzyskanie z tkanek zatopionych w parafinie RNA odpowiedniej

jakości. Obecnie jest dostępnych wiele gotowych zestawów do izolacji RNA, chociaż stosuje się również klasyczne protokoły oparte na działaniu proteinazy K oraz tiocyjanianu guanidyny. Przy izolacji RNA z materiału z bloczków parafinowych, metoda wykorzystująca czynnik chaotropowy – tiocyjanian guanidyny, ustępuje metodom z zastosowaniem proteinazy K. [16, 22]. Dzięki enzymatycznemu trawieniu utrwalonej tkanki udaje się uzyskać do 10 razy więcej całkowitego RNA [17].

Istnieją również procedury łączące oba te czynniki. Godfrey i wsp. [9] opisali trzydniową inkubację z proteinazą K w buforze zawierającym tiocyjanian guanidyny, a następnie ekstrakcję fenolowo-chloroformową z dodatkowym etapem oczyszczania.

Wykazano, że niekorzystny wpływ na jakość RNA, a w konsekwencji rezultat reakcji RT-PCR mogą mieć inhibitory RNaz dodawane na etapie enzymatycznego trawienia tkanki. Mimo to, iż RNazy to enzymy bardzo stabilne, wysoce reaktywne i niewymagające do działania kofaktorów, w czasie utrwalania w formalinie są inaktywowane. Ponadto użycie proteinazy K zapewnia ich całkowite zniszczenie [12,16].

##### b) Dobór primerów

Wyniki reakcji RT-PCR wykorzystującej jako matrycę RNA izolowany z materiału z bloczków parafinowych są często niesatysfakcjonujące. Stąd wynika konieczność optymalizacji warunków reakcji. Niezwykle ważna jest właściwa konstrukcja primerów, które powinny obejmować jak najkrótszy amplicon. Degradacja i kowalencyjna modyfikacja matrycowego RNA powodują, że trudno jest uzyskać produkty reakcji o długości większej niż 300 par zasad. Modyfikacja ogona poliadenylowego cząsteczki mRNA utrudnia przyłączanie standardowo używanych primerów oligo-dT i prawidłową syntezę cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Ponieważ częściowo zdegradowane cząsteczki RNA mogą nie zawierać jednocześnie ogona poliadenylowego i docelowej sekwencji amplifikacji, synteza cDNA z wykorzystaniem losowych heksametrów („random-priming”) może być bardziej skuteczna niż użycie oligomerów dT [16,17].

Ważny jest także taki dobór primerów, który zapewni eliminację wyników fałszywie dodatnich pod postacią produktów powstałych na bazie DNA genomowego a nie cDNA jako matrycy. Amplicony w reakcji RT-PCR mogą obejmować intron – wtedy produkt genomowego DNA będzie większy niż produkt właściwy. Natomiast niepożądany produkt nie powstanie, jeśli primery obejmą połączenia ekson-ekson [20].

##### c) Real-time pcr

Standardowa reakcja RT-PCR jest szczególnie użyteczna w przypadku identyfikacji RNA wirusowego lub produktów ekspresji genów fuzyjnych związanych z translokacjami chromosomowymi, czy też genów zmutowanych [22]. Ponieważ korelacja między stężeniem końcowego produktu, a początkową liczbą cząstek matrycowych jest w tej reakcji ograniczona, standardową techniką wykorzystywaną do ilościowej oceny ekspresji badanych genów stała

się reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Monitorowanie zmian w stężeniu produktu następuje poprzez pomiar fluorescencji proporcjonalnej do ilości produktu w mieszaninie. Dodatkową zaletą tej techniki w odniesieniu do specyficznego materiału, jakim jest RNA z tkanek utrwalonych jest wysoka czułość, niewielka ilość wymaganego RNA oraz wykorzystanie bardzo krótkich amplikonów o długości ok. 50-150 par zasad [16, 22].

Materiał tkankowy pochodzący z archiwalnych bloczków parafinowych jest wysoce niejednorodny, tzn. niemożliwe jest określenie czasu, jaki upłynął zanim tkanka została utrwalona, a także czas samego utrwalaania. W związku z tym stopień degradacji RNA w poszczególnych tkankach jest trudny do określenia i porównania. Dlatego też zaleca się podawanie względnych ilości powstającego produktu, w odniesieniu do genu referencyjnego (tzw. „house-keeping gene”), w przeciwieństwie do ilości bezwzględnych, obliczonych na podstawie krzywej standardowej [15,16].

W przypadku badania ekspresji genów w tkankach nowotworowych jest niezwykle istotna ostrożność w doborze genu referencyjnego, ponieważ istnieją doniesienia dotyczące zmienionej ekspresji tych genów w komórkach niektórych rodzajów nowotworów [1].

## 6. ALTERNATYWNE TECHNIKI UTRWALANIA

W związku z gwałtownym rozwojem technik biologii molekularnej, zaistniała potrzeba zastąpienia w rutynowych badaniach histopatologicznych formaliny takimi związkami utrwalającymi, które zachowywałyby nie tylko morfologię tkanek, ale również strukturę kwasów nukleinowych. Umożliwiłoby to wykorzystanie tego samego materiału tkankowego do całego panelu badań, w tym określenia ekspresji poszczególnych genów na poziomie mRNA, diagnozowania mutacji, a także zakażeń wirusowych [23].

### a) Alkohole

Alkohole, zaliczane do grupy utrwalaczy koagulacyjnych bywają stosowane zamiennie z utrwalaczami działającymi na drodze tworzenia wiązań krzyżowych („cross-linking”), do których należy formalina. Etanol 95% jest stosowany do utrwalaania rozmazów w badaniach cytologicznych. Wykazano, że etanol 70% wystarczająco zachowuje morfologię tkanek i komórek, a także strukturę DNA oraz białek. Słabiej jednak zabezpiecza RNA. O fragmentacji świadczy brak prążka 28 i 18 S w rozdziale elektroforetycznym [8].

Ponadto warunki utrwalaania w alkoholu (+4°C przez 16–24 godz.) stanowią pewną niedogodność w rutynowej diagnostyce histologicznej [25].

### b) Płyn Carnoya

Alkohol etylowy wchodzi również w skład niektórych złożonych płynów utrwalających. Jednym z nich jest płyn Carnoya (alkohol absolutny, chloroform, lodowaty kwas octowy w stosunku 60:30:10%). Utrwalacz ten dobrze zachowuje morfologię tkanek oraz epitopy wykrywane za pomocą reakcji immunohistochemicznych [3]. Zapewnia także lepszą ochronę kwasów nukleinowych w utrwala-

nych tkankach. W porównaniu z formaliną płyn Carnoya powoduje niewielką degradację wysokocząsteczkowego RNA, co pozwala na uzyskanie odcinków o długości około 700–800 par zasad w reakcji RT-PCR.

### c) Metakarn

Metakarn jest mieszaniną utrwalającą zawierającą alkohol metylowy (metanol, chloroform, lodowaty kwas octowy w stosunku 60:30:10%). Jest dobrym utrwalaczem stosowanym do wydajnej izolacji RNA, o jakości porównywalnej do uzyskiwanej z tkanek mrożonych. Dzięki zahamowaniu aktywności RNaz w reakcji RT-PCR można uzyskać amplikony o długości 300–700 par zasad. Jest on również zalecanym płynem utrwalającym do badań immunohistochemicznych.

Ograniczeniem w stosowaniu metakarnu jest konieczność sporządzania mieszaniny bezpośrednio przed użyciem [21].

### d) Technika HOPE (hepes-glutamic acid buffer-mediated organic solvent protection effect)

W technice tej stosuje się dwuetapowe utrwalaanie. Wycinki są początkowo umieszczane w roztworze protekcyjnym zawierającym mieszaninę aminokwasów o pH 5,8–6,4, a następnie odwadnianie w acetonie w temperaturze 0–4°C i zatapiające w parafinie [19].

Morfologia tkanek utrwalanych metodą HOPE jest porównywalna z uzyskaną z zastosowaniem formaliny. Doskonale zachowane są epitopy, a także kwasy nukleinowe (nawet po 5 latach) [19].

Przeszkodą we wprowadzeniu HOPE do badań rutynowych jest długi okres inkubacji w obniżonej temperaturze. Ponadto, podobnie jak w przypadku innych alternatywnych związków utrwalających większe są koszty procedury w porównaniu ze standardową procedurą z użyciem formaliny. Dlatego wykorzystywane są one głównie do badań naukowych.

### e) Ultradźwięki

Jedną z najnowszych metod jest wykorzystanie ultradźwięków jako uzupełnienia standardowej procedury utrwalaania tkanek w formalinie. Wykazano, że ultradźwięki skracają czas utrwalaania do około 1 godziny, bez szkody dla morfologii tkanek i stabilności makromolekuł, w tym kwasów nukleinowych. Mniej zmienione są również determinanty antygenowe, co zapewnia większą czułość reakcji immunohistochemicznych [4].

Technika ta pozwala także na śledzenie zmian fizycznych zachodzących w tkankach w czasie procesu utrwalaania. Umożliwia to kontrolę jakości wykonywanych rutynowo bloczków poprzez monitorowanie poziomu utrwalaania tkanki [4].

## 7. PODSUMOWANIE

Prowadzone w ostatnich latach badania dowiodły, że wycinki utrwalaane i przeprowadzane rutynowo do bloczków



parafinowych mogą stanowić źródło RNA o jakości wystarczającej do przeprowadzenia badań ekspresji genów. Jest to materiał coraz powszechniej wykorzystywany w badaniach naukowych, jednak istnieją przeszkody w wykorzystaniu go do wzbogacenia rutynowej diagnostyki histopatologicznej o badania na poziomie molekularnym. Stąd też

istnieje pilna konieczność ujednoczenia procedur przeprowadzania tkanek do bloczków parafinowych, zwłaszcza na etapie utrwalania, zarówno w przypadku użycia formaliny jak i utrwalaczy alternatywnych. Niezbędna jest również optymalizacja warunków reakcji PCR, która zapewni, że otrzymane wyniki będą miały wartość diagnostyczną.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Abrahamsen H.N., Steiniche T., Nexø E., Hamilton-Dutoit S.J., Sorensen B.S.: Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.*, 2003; 5: 34–41
- [2] Basyuk E., Bertrand E., Journot L.: Alkaline fixation drastically improves the signal of *in situ* hybridization. *Nucleic Acids Res.*, 2000; 28: E46
- [3] Benchekroun M., DeGraw J., Gao J., Sun L., von Boguslawsky K., Leminen A., Andersson L.C., Heiskala M.: Impact of fixative on recovery of mRNA from paraffin-embedded tissue. *Diagn. Mol. Pathol.* 2004; 13: 116–125
- [4] Chu W.S., Liang Q., Tang Y., King R., Wong K., Gong M., Wei M., Liu J., Feng S.H., Lo S.C., Andriko J.A., Orr M.: Ultrasound-accelerated tissue fixation/processing achieves superior morphology and macromolecule integrity with storage stability. *J. Histochem. Cytochem.*, 2006; 54: 503–513
- [5] Cross S.S., Start R.D.: Estimating mitotic activity in tumours. *Histopathology*, 1996; 29: 485–488
- [6] Cross S.S., Start R.D., Smith J.H.: Does delay in fixation affect the number of mitotic figures in processed tissue? *J. Clin. Pathol.*, 1990; 43: 597–599
- [7] Douglas M.P., Rogers S.O.: DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat. Res.*, 1998; 401: 77–88
- [8] Gillespie J.W., Best C.J., Bichsel V.E., Cole K.A., Greenhut S.F., Hewitt S.M., Ahrm M., Gathright Y.B., Merino M.J., Strausberg R.L., Epstein J.I., Hamilton S.R., Gannot G., Baibakova G.V., Calvert V.S., Flaig M.J., Chuaqui R.F., Herring J.C., Pfeifer J., Petricoin E.F., Linehan W.M., Duray P.H., Bova G.S., Emmert-Buck M.R.: Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am. J. Pathol.*, 2002; 160: 449–457
- [9] Godfrey T.E., Kim S.H., Chavira M., Ruff D.W., Warren R.S., Gray J.W., Jensen R.H.: Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.*, 2000; 2: 84–91
- [10] Hamatani K., Eguchi H., Takahashi K., Koyama K., Mukai M., Ito R., Taga M., Yasui W., Nakachi K.: Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J. Histochem. Cytochem.*, 2006; 54: 773–780
- [11] Kingsbury A.E., Foster O.J., Nisbet A.P., Cairns N., Bray L., Eve D.J., Lees A.J., Marsden C.D.: Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1995; 28: 311–318
- [12] Körbler T., Gršković M., Dominis M., Antica M.: A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues. *Exp. Mol. Pathol.*, 2003; 74: 336–340
- [13] Kunz F., Shalaby T., Lang D., von Büren A., Hainfellner J.A., Slavic I., Tabatabai G., Grotzer M.A.: Quantitative mRNA expression analysis of neurotrophin-receptor TrkC and oncogene c-MYC from formalin-fixed, paraffin-embedded primitive neuroectodermal tumor samples. *Neuropathology*, 2006; 26: 393–399
- [14] Labat-Moleur F., Guillermet C., Lorimier P., Robert C., Lantuejoul S., Brambilla E., Negoescu A.: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.*, 1998; 46: 327–334
- [15] Lehmann U., Kreipe H.: Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, 2001; 25: 409–418
- [16] Lewis F., Maughan N.J., Smith V., Hillan K., Quirke P.: Unlocking the archive – gene expression in paraffin-embedded tissue. *J. Pathol.*, 2001; 195: 66–71
- [17] Masuda N., Ohnishi T., Kawamoto S., Monden M., Okubo K.: Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.*, 1999; 27: 4436–4443
- [18] Noguchi M., Furuya S., Takeuchi T., Hirohashi S.: Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol. Int.*, 1997; 47: 685–691
- [19] Olert J., Wiedorn K.H., Goldmann T., Kuhl H., Mehraein Y., Scherthan H., Niketghad F., Vollmer E., Müller A.M., Müller-Navia J.: HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol. Res. Pract.*, 2001; 197: 823–826
- [20] Sandhu K.S., Acharya K.K.: ExPrimer: to design primers from exon-exon junctions. *Bioinformatics*, 2005; 21: 2091–2092
- [21] Shibutani M., Uneyama C., Miyazaki K., Toyoda K., Hirose M.: Methacarn fixation: a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab. Invest.*, 2000; 80: 199–208
- [22] Specht K., Richter T., Müller U., Walch A., Werner M., Höfler H.: Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am. J. Pathol.*, 2001; 158: 419–429
- [23] Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S.: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 1961–1971
- [24] Tokuda Y., Nakamura T., Satonaka K., Maeda S., Doi K., Baba S., Sugiyama T.: Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J. Clin. Pathol.*, 1990; 43: 748–751
- [25] Vincek V., Nassiri M., Block N., Welsh C.F., Nadji M., Morales A.R.: Methodology for preservation of high molecular-weight RNA in paraffin-embedded tissue: application for laser-capture microdissection. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2005; 3: 127–133
- [26] Von Weizsäcker F., Labeit S., Koch H.K., Oehlert W., Gerok W., Blum H.E.: A simple and rapid method for the detection of RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR amplification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991; 174: 176–180
- [27] Werner M., Chott A., Fabiano A., Battifora H.: Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1016–1019