

Комина А.В., Палкина Н.В., Аксененко М.Б., Рукша Т.Г.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОЧИПИРОВАНИЯ МИКРОРНК В ОБРАЗЦАХ МЕЛАНОМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ФИКСАЦИИ МАТЕРИАЛА

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, г. Красноярск, Российская Федерация

Меланома кожи является злокачественным новообразованием, характеризующимся быстрой прогрессией, высокой инвазивностью и как следствие низкими показателями выживаемости. В этой связи сохраняется актуальность совершенствования способов ранней диагностики данной опухоли. В настоящее время все большее распространение получают молекулярно-генетические методы исследования опухолей, одним из которых является микрочипирование (микроэррей), позволяющее анализировать изменения экспрессии сразу нескольких тысяч генов в клетке. Однако этот метод предъявляет высокие требования к качеству образцов и проведению исследования. В настоящее время для сохранения опухолевых тканей в практической медицине стандартно используется фиксация гистологических образцов формалином с последующим заключением в парафин, что обеспечивает сохранность образцов и возможность проведения в дальнейшем исследований на основе использования архивного материала. Вместе с тем известно, что данный способ фиксации может приводить к нарушениям в структуре и доступности нуклеиновых кислот для дальнейшего анализа. В данном исследовании проведена попытка оценить влияние фиксации гистологических образцов меланомы кожи на результат микрочипирования с целью оценки уровней экспрессии микроРНК. В этой связи проведен сравнительный анализ микроРНК на основе микрочипирования образцов меланомы кожи, фиксированных формалином и специфическим стабилизатором, содержащим ингибиторы РНКаз. Показано, что фиксация формалином по сравнению с фиксацией аммонийными солями, ингибирующими РНКазы, влечет за собой изменение уровня 454 микроРНК, при этом среди них оказываются микроРНК, которые играют важную роль в развитии меланомы. Таким образом, для молекулярных исследований биоптатов кожи на основе микроэррея требуется более тщательная стандартизация способов фиксации материалов или использование специфических стабилизаторов. Возможность использования метода фиксации на основе формалина для экспрессионного анализа микроРНК в тканях подлежит дальнейшему изучению.

Ключевые слова: меланома; микроРНК; микрочипирование; формалин.

Для цитирования: Комина А.В., Палкина Н.В., Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Сравнительный анализ микрочипирования микроРНК в образцах меланомы в зависимости от способа фиксации материала. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2016; 19(4): 200-205. DOI: 10.18821/1560-9588-2016-19-4-200-205

**Komina A.V., Palkina N.V., Aksenenko M.B., Ruksha T.G.**

### MICROARRAY COMPARATIVE ANALYSIS OF MELANOMA MICRORNA DEPENDING ON THE TISSUE FIXATION METHOD

Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, 660022, Krasnoyarsk, Russia

Cutaneous melanoma is the most aggressive form of skin cancer characterized by rapid progression, invasiveness and low survival rates. This explains the importance of optimization of early detection of this tumor. At the present time molecular and genetic methods of cancer investigation are broadly used. One of such methods is microarray that allows to analyze the expression of thousands genes in the single cell. However, this method makes high demands on the quality of samples and research procedure. Today the most common approach for tumor tissue preservation is formalin fixation followed paraffin embedding. This procedure is broadly used in clinical medicine but may affect the structure and availability of nucleic acids of the study sample. The present investigation was done to evaluate the effect of melanoma tissue fixation on the result of microRNA expression analysis by microarray. In this regard, we made comparative study of microRNA expression in melanoma samples fixed in formaldehyde and RNase inhibitor reagent based on ammonium sulfate solution. It has been shown that fixation by formalin as compared to ammonium salts based RNase inhibiting fixator alters the level of 454 microRNAs. Some miRNAs among them are playing an important role in the melanoma progression. Thus, molecular studies of skin tissues by microarray requires more thorough standardization of sample fixation methods or using of special RNA stabilizing solutions. The application of the formalin fixation method to preserve tissue for miRNA expression analysis requires further study.

Key words: melanoma; microRNA; microarray; formaldehyde.

**For citation:** Komina A.V., Palkina N.V., Aksenenko M.B., Ruksha T.G. Microarray comparative analysis of melanoma microRNA depending on the tissue fixation method. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Boleznei)*. 2016; 19(4): 200-205. (in Russian). DOI: 10.18821/1560-9588-2016-19-4-200-205

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The study was supported by Grant of the Russian Scientific Foundation (project № 14-15-00074).

Received 11 May 2016

Accepted 21 June 2016

Меланома кожи – агрессивное злокачественное новообразование с самым высоким показателем смертности среди дерматологических онкологических заболеваний [1]. В связи с трудностью терапии диссеминированных форм опухоли, важным является обеспечение максимально ранней диагностики опухоли, что зачастую включает дифференциальную диагностику с доброкачественными меланокитарными новообразованиями кожи.

В настоящее время в клинической и экспериментальной онкологии все большее внимание уделяется молекулярно-генетическому анализу опухолей с идентификацией молекулярных мишеней для дальнейшей разработки методов дифференциальной диагностики, прогноза и терапии. Так, выявление мутации V600E в гене *B-RAF* позволяет у больных меланомой проводить терапию ингибитором тирозинкиназ вемурафенибом [2], а наличие мутации L576P в гене *KIT* – тирозинкиназными ингибиторами иматиниб и дазатиниб [3]. Еще одним методом молекулярного исследования опухоли является микрочипирование (микроэррей), позволяющее одновременно оценить состояние клетки по характеру экспрессии множества белков или нуклеиновых кислот. Благодаря использованию данного метода стало возможным определять одновременно целый комплекс изменений, происходящих в клетке при патологии и, в частности, при развитии онкологического процесса [4]. Микрочипирование используют для оценки уровня различных видов РНК, комплементарной ДНК, белков, а также для оценки генетического статуса организма сразу по нескольким генам [5].

МикроРНК – короткие белок-некодирующие РНК длиной 18–23 нуклеотидов, принимающие непосредственное участие в регуляции экспрессии генов [6]. Экспрессионные профили микроРНК в клетке являются тканеспецифичными, а также подвергаются изменениям при развитии патологических процессов. По этой причине анализ профилей микроРНК рассматривается как перспективный метод дифференциальной диагностики онкологических заболеваний, в том числе меланомы кожи.

Поскольку молекулярно-генетические методы исследования относятся к разряду точных методов, требующих тщательного контроля качества, является важным правильное сохранение биопсийного материала, позволяющее впоследствии получить валидные результаты. Для сохранения РНК в образцах тканей на сегодняшний день существует ряд растворов для стабилизации РНК на основе четвертичных солей аммония, позволяющих ингибировать РНКазы. Однако в случае злокачественных новообразований многие десятилетия наиболее распро-

страненным во всем мире методом сохранения гистологического материала является фиксация тканей формалином с последующим заключением в парафин (formalin fixation paraffin embedding – FFPE). Этот метод положительно зарекомендовал себя способ сохранения клеточных структур и белков в неизменном виде в течение многих лет, FFPE-биоптаты успешно применяют во всем мире для проведения клинико-морфологических и иммуногистохимических исследований [7]. Однако исследование нуклеиновых кислот в таких образцах может представлять серьезные затруднения. Одной из причин является возникновение химических модификаций в ДНК и РНК под действием формальдегида, что делает эти молекулы труднодоступными для исследования [8]. Вместе с тем распространенность и сравнительная «долговечность» FFPE-образцов делает их очень удобным материалом для исследований, в связи с чем остается актуальным поиск эффективного выделения нуклеиновых кислот из данного материала для дальнейших работ молекулярно-биологического профиля [9–10].

МикроРНК в отличие от матричной РНК считаются более стабильными молекулами в клетке, которые не подвергаются быстрой деградации [11]. Однако стабильность микроРНК при воздействии таких внешних факторов, как формальдегид, остается недостаточно изученной, и ее сохранение в фиксированных тканях требует дальнейшего уточнения.

Целью данного исследования являлся сравнительный анализ экспрессии микроРНК в образцах меланомы в зависимости от способа фиксации материала.

## Материал и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол №59/2014 от 02.12.14).

Биопсийный материал меланомы ( $n = 3$ ) был получен в результате оперативного иссечения в Красноярском краевом клиническом онкологическом диспансере им. А.И. Крыжановского. Образцы ткани, полученные от пациентов, были разделены на две части, одна из которых фиксировалась в стабилизирующем РНК растворе RNAlater Solution (кат. №AM7020, “Ambion”, США) и сохранялась при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , а вторая была подвергнута фиксации 10% раствором формальдегида и заключена в парафин по стандартной методике.

С целью подтверждения гистологического диагноза меланомы кожи и оценки клинико-морфологических характеристик проводили окраску препаратов гематоксилином и эозином с последующей микроскопией. Данные о пациентах, включенных в исследование, представлены в **табл. 1**.

Для выделения тотальной РНК стабилизированные в RNAlater образцы были подвергнуты предварительной гомогенизации. Образцы, фиксированные формалином и заключенные в парафин (FFPE), подвергали диссекции на срезы толщиной 15 мкм при помощи микротомы. Полученные срезы депарафинизировали ксилолом с последующей двукратной отмывкой 96% этанолом. По окончании пробоподготовки полученные ткани заливали раствором для лизиса клеток Digestion buffer из набора для выделения нуклеиновых кислот RecoverAll Nucleic Acid Isolation kit (“Ambion”, США) и выделяли РНК с применением этого набора по протоколу производителя.

Концентрация выделенных микроРНК определялась на приборе Qubit 2.0 с использованием комплекта реагентов для определения концентрации микроРНК microRNA (“Assay”). Для постановки реакции микрочипирования использовали растворы очищенной РНК концентрации 21,2–33,2 нг/мкл.

Микрочипирование осуществляли с помощью системы GeneAtlas Microarray System (“Affymetrix”, США). Предва-

### Для корреспонденции:

Рукша Татьяна Геннадьевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. E-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru.

### For correspondence:

Ruksha Tatyana G., MD, PhD, DSc., Head of Department of pathophysiology, KGMU n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenyetsky, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation. E-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru.

### Information about authors:

Komina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2269-0298>;  
Palkina N.V., <http://orcid.org/0000-0002-6801-3452>;  
Aksenenko M.B., <http://orcid.org/0000-0001-7660-700X>;  
Ruksha T.G., <http://orcid.org/0000-0001-8142-4283>.

Таблица 1

## Клинико-морфологические характеристики больных меланомой кожи, включенных в исследование

Больной	Пол	Возраст, годы	Уровень инвазии (по Clark)	Толщина опухоли (Breslow), мм	Локализация	Диагноз
Больная №1	Ж.	81	IV–V	До 5	Правое плечо	Меланома кожи
Больной №2	М.	73	III	2	Правое плечо	Меланома кожи
Больной №3	М.	62	III–IV	3	Спина	Меланома кожи

рительно 8 мкл раствора очищенной РНК подвергали полиаденилированию и биотинилированию с использованием комплекта реагентов FlashTag HSR Biotin Labeling Kit (ref. 901913; “Affymetrix”, США). Меченные биотином молекулы гибридизовали в течение 20 ч при температуре 48 °С на микрочипах в наборе Affymetrix miRNA 4.1 ArrayStrip (“Affymetrix”, США). По окончании гибридизации чипы отмывались и окрашивались в автоматическом режиме в промывочном модуле (Fluidic Station) системы при помощи растворов из комплекта GeneChip GeneAtlas Hybridization and Stain Module (ref. 902135) (“Affymetrix”, США). На последнем этапе осуществлялась детекция интенсивности флуоресцентного сигнала в ячейках микрочипа в модуле визуализации (Imaging Station) системы GeneAtlas. На протяжении эксперимента в работу вводили контроль качества: spike control oligos, контроль гибридизации. Контроль качества (QC) оценивали с помощью программного обеспечения автоматически на этапе детекции путем анализа флуоресцентного сигнала из ячеек микрочипа, содержащих контрольные молекулы.

Для подтверждения результатов микрочипирования проводили постановку ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для определения уровня экспрессии трех видов микроРНК: miR-21 (MIMAT0000076), miR-146a (MIMAT0000449) и

miR-218 (MIMAT0000275) с использованием комплекта реагентов miRNA TaqMan Assays (кат. №4427975, “Applied Biosystems”, США). На первом этапе осуществляли постановку реакции обратной транскрипции с использованием специфических праймеров для обратной транскрипции (5X) из данного комплекта, а также реагентов набора Реверта (ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии», Россия). В 8,4 мкл реакционной смеси содержалось 1,6 мкл буфера для обратной транскрипции (5X ОТ-буфер), 1,6 мкл смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (5X dNTP mix), 0,4 мкл смеси праймеров для обратной транскрипции (5X), 4 мкл раствора очищенной РНК, 0,2 мкл фермента ревертазы (1 е.а.) и 0,6 мкл РНК-элюента. Для протекания реакции обратной транскрипции смеси инкубировались при температуре 37 °С в течение 30 мин. По окончании полученные кДНК использовали для постановки реакции ПЦР-РВ. Для этого смешивали 8 мкл 2,5X реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии ROX (кат. № M-431, «Синтол», Россия), 0,6 мкл смеси праймеров для ПЦР (20X) из комплекта miRNA TaqMan Assays, 1,33 мкл кДНК и 10,07 мкл воды без нуклеаз. Реакцию проводили на приборе StepOne™ Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, Сингапур) при следующем температурных режимах: 50 °С – 2 мин, 95 °С – 10 мин, затем

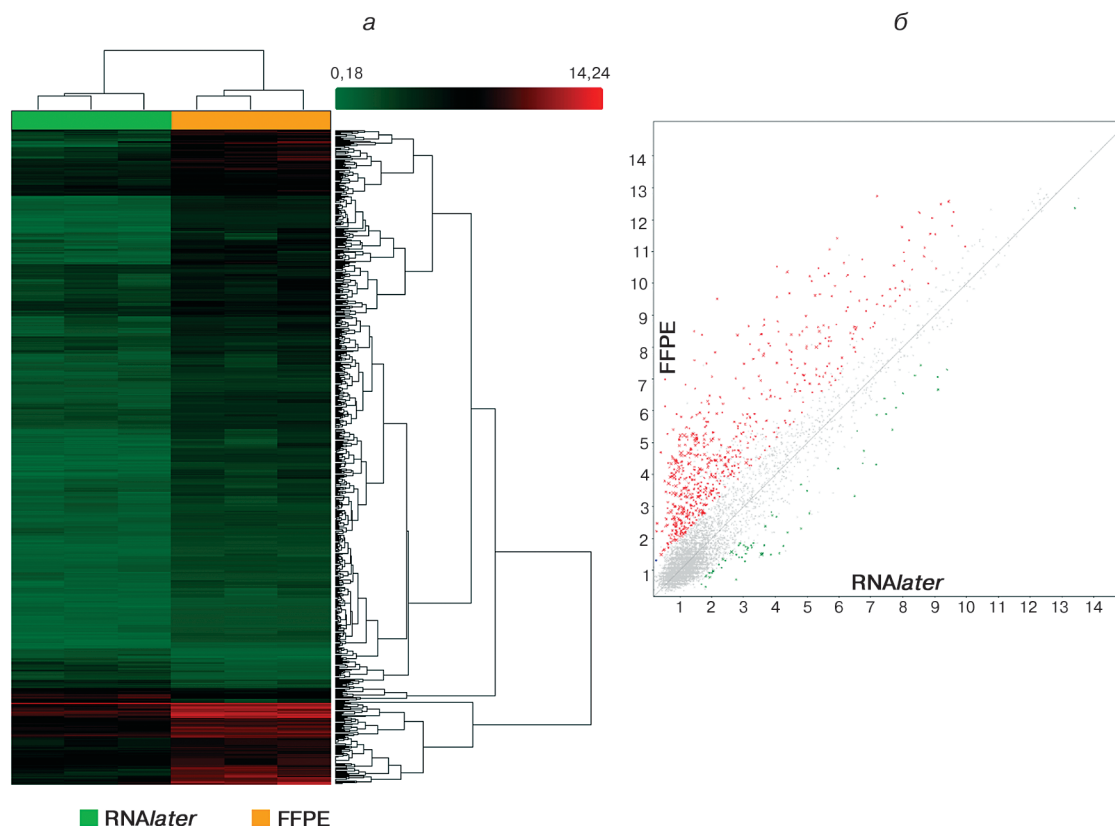


Рис. 1. Результаты микрочипирования образцов меланомы, фиксированных в формалине/заключенных в парафин (FFPE) и стабилизированных раствором RNAlater.

*a* – иерархическая кластерограмма микроРНК с уровнями экспрессии, различающимися в 2 раза и более ( $p < 0,05$ ). Цвет кластера от зеленого до красного отражает относительный уровень экспрессии микроРНК в соответствии с цветовым ключом. Наблюдается четкое разделение на группы в зависимости от фиксатора; *б* – диаграмма разброса уровней экспрессии микроРНК в образцах FFPE и стабилизированных RNAlater. Красными точками обозначены уровни микроРНК, значимо повышенные в FFPE-ткани по сравнению с фиксированной RNAlater, зелеными точками отмечены уровни микроРНК, уровень которых в FFPE-образцах ниже уровня в образце, фиксированном в RNAlater. Серые точки – уровни микроРНК, не имеющие статистически значимых различий при двух способах фиксации материала.

40 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 1 мин с детекцией по каналу FAM. Нормирование данных осуществляли по двум эндогенным контролям – U6snRNA и RNU6B (кат. №4427975, “Applied Biosystems”, США). Полученные значения пороговых циклов флюоресценции использовали для расчета относительных уровней экспрессии RQ по формуле  $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ , где  $\Delta Ct$  – разность значений пороговых циклов флюоресценции образца и эндогенного контроля ( $\Delta Ct = Ct_{\text{образца}} - Ct_{\text{контроля}}$ ).

Для статистической обработки данных микрочипирования использовали программное обеспечение Transcriptome Analysis Console 3.0 (“Affymetrix”, США), с помощью непараметрический метод анализа ANOVA.

Статистическую обработку данных ПЦР-ПВ проводили с помощью программы Statistica 6.0 (“StatSoft”, Россия) с использованием непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Во всех экспериментах статистически значимыми считали различия в уровнях микроРНК при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

Фиксация гистологических образцов формалином создана в первую очередь для сохранения клеточных структур и возможности их последующего морфологического и гистохимического исследования, и не преследует цели сохранения нуклеиновых кислот. В то же время стабилизирующие РНК растворы производятся с конкретной целью консервации РНК в тканях, предупреждения ее деградации и сохранения доступности для научных целей. Результаты исследований стабилизатора РНК на основе солей аммония, а также результаты сторонних исследований РНК в фиксированных таким образом тканях [12–13] позволили предположить высокую степень сохранения микроРНК в этом растворе. По этой причине данный способ фиксации РНК был рассмотрен как контрольный.

По результатам микрочипирования в тканях, фиксированных формалином, по сравнению с теми же образцами, стабилизированными RNAlater, было выявлено статистически значимое изменение уровня 732 малых некодирующих РНК, из них 454 относились к классу микроРНК. При этом 51 микроРНК имела пониженный уровень в FFPE-тканях, тогда как другие 403 микроРНК были обнаружены в повышенных количествах. При иерархической кластеризации результатов (рис. 1) наблюдалось четкое разделение образцов, фиксированных формалином и стабилизированных в RNAlater, при этом порядок распределения пациентов при кластеризации оказался идентичным.

Примечательно, что среди микроРНК, имеющих максимальное изменение в FFPE-образцах по сравнению с RNAlater-стабилизированными, были выявлены такие микроРНК, как miR-21-5p (повышение в FFPE в 162,15 раза), для которой описана роль онкогена в развитии различных видов рака, включая меланому [14–15], miR-146a (повышение в 40,96 раза), принимающая участие в инициации и прогрессии меланомы через активацию Notch-сигнального пути [16], miR-200c (повышение в 5,4 раза), которая рассматривается как ингибитор прогрессии меланомы и регулятор, повышающий чувствительность опухоли к терапии [17], miR-155 (повышение в 2,5 раза), описанная как опухолевый супрессор [18].

В то же время для других видов микроРНК, которые согласно исследованиям играют важную роль в меланогенезе, значимых изменений уровня не выявлено, что может характеризовать данные микроРНК как устойчивые к воздействию формальдегида. К таким микроРНК относится miR-218 (регуляция пролиферации, миграции и инвазии) [19], miR-137 (ингибитор пролиферации) [20], miR-214 (регуляция клеточной адгезии и метастазирования) [21], miR-211 (опухолевая супрессия, регуляция инвазии) [22].

Таблица 2

**Уровни микроРНК, имеющие максимально повышенный и максимально сниженный уровень экспрессии в тканях, фиксированных формалином (FFPE), в сравнении с тканями, стабилизированными раствором RNAlater**

МикроРНК	Кратность различий уровней экспрессии в FFPE-образце в сравнении с фиксированным RNAlater*	<i>p</i> (ANOVA)
hsa-miR-21-5p	162,17	0,000534
hsa-miR-18a-5p	132,24	0,002502
hsa-miR-20b-5p	102,45	0,038588
hsa-miR-20a-5p	88,4	0,01031
hsa-miR-19b-3p	86,43	0,002182
hsa-miR-10a-5p	69,24	0,001914
hsa-miR-126-3p	63,71	0,000181
hsa-miR-130a-3p	52,56	0,000166
hsa-miR-196a-5p	49,76	0,025952
hsa-miR-151b	49,64	0,003166
hsa-miR-6746-5p	-4,84	0,005206
hsa-miR-3682-3p	-4,88	0,006157
hsa-miR-6875-3p	-5,2	0,018077
hsa-miR-6831-5p	-5,24	0,014434
hsa-miR-4298	-5,42	0,001665
hsa-miR-6838-5p	-5,64	0,006032
hsa-miR-6746	-5,7	0,00664
hsa-miR-3065-5p	-6,07	0,045085
hsa-miR-296-3p	-7,27	0,004051
hsa-miR-3911	-8,97	0,015538

Примечание. \* – положительное значение – повышенный, а отрицательное – пониженный уровень микроРНК в FFPE-образцах в сравнении со стабилизированными RNAlater.

В табл. 2 представлены 10 микроРНК с максимально повышенным и 10 с максимально сниженным уровнем экспрессии.

Для подтверждения данных микрочипирования посредством ПЦР-ПВ были выбраны три вида микроРНК: miR-21-5p, miR-146a, miR-218, для которых ранее описаны изменения экспрессии при меланоме, а также есть указания на роль в канцерогенезе. Результаты микрочипирования подтвердились только для miR-218, показав отсутствие значимых различий уровня экспрессии независимо от способа фиксации ткани. Для микроРНК miR-21-5p и miR-146a в отличие от данных микрочипирования статистически значимых различий в уровнях экспрессии в зависимости от фиксации в FFPE или RNAlater также не выявлено (рис. 2).

## Обсуждение

Искажение профилей РНК в тканях, фиксированных формалином в сравнении со свежими и замороженными образцами описано в ряде работ [8, 23, 24]. При этом в отношении низкомолекулярных РНК исследователи отмечали, что уровень одних молекул в образцах, фиксированных формалином, снижается, что может предполагать их разрушение, однако уровень других значимо возрастает [23]. В целом полученные нами данные согласуются с исследованиями других авторов, указывающих, что ряд

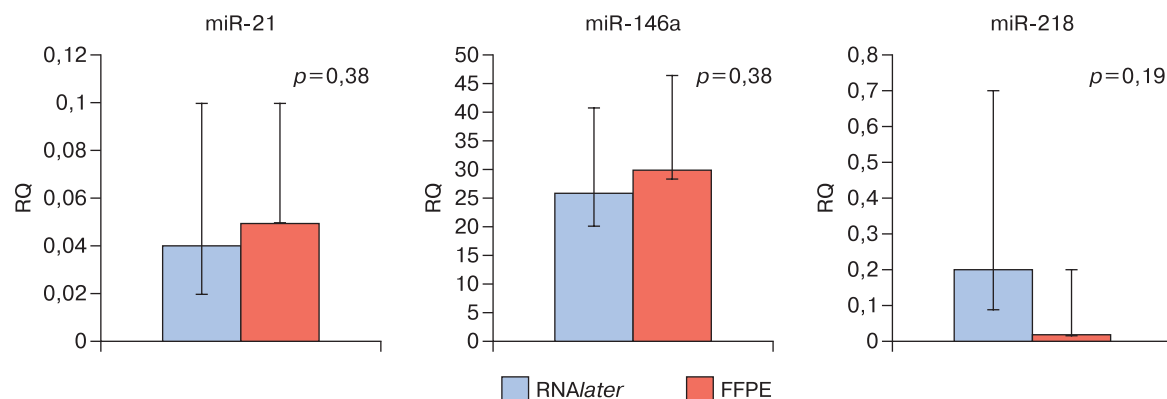


Рис. 2. Подтверждение уровней микроРНК методом ПЦР-РВ. Относительные уровни экспрессии микроРНК (RQ) нормированы по контрольным микроРНК U6snRNA и RNU6B. Данные представлены в виде медианных значений, верхнего и нижнего квартилей. *a* – miR-21 по результатам микрочипирования имела повышенный уровень в FFPE-тканях в сравнении с тканями, стабилизированными в RNAlater, в 162,17 раза. Однако при анализе методом ПЦР-РВ значимых различий в уровнях при этих методах фиксации выявлено не было; *б* – miR-146a по результатам микрочипирования имела уровень в 40,96 раза выше в FFPE-тканях в сравнении с фиксированными RNAlater. Результаты ПЦР-РВ показали отсутствие значимых различий при использовании этих методов фиксации; *в* – miR-218 не имела значимых различий уровней в тканях, фиксированных формалином и стабилизированных RNAlater по результатам микрочипирования, и эти данные подтвердились методом ПЦР-РВ.

микроРНК может подвергаться деградации при фиксации ткани в формальдегиде.

В попытке объяснить эти изменения мы обратились к описанию методов фиксации и исследованиям изменений, происходящих в молекулах РНК в процессе фиксации.

Согласно предположению J. Li и соавт. [25], одной из возможных причин таких изменений могут служить условия хранения образцов FFPE, поскольку парафиновые блоки с биоптатами сохраняются в архивах при комнатной температуре в условиях отсутствия защиты от РНКаз. В этом случае в процессе фиксации, а также при постфиксационных манипуляциях открытый доступ к ткани для РНКаз может повлечь расщепление ряда молекул.

Другой немаловажной причиной устойчивости микроРНК к деградации и модификациям под воздействием формалина называют соединение с белком RISC, обеспечивающим ее химическую стабильность и защиту от РНКаз [25]. Однако в исследовании O. Flores и соавт. [26] показана различная степень ассоциации микроРНК в клетке с белковым комплексом RISC. S. Bail и соавт. [27], наглядно продемонстрировав различную стабильность микроРНК в клетках, предположили, что помимо образования комплексов важную роль в стабильности молекул может играть последовательность нуклеотидов в их составе, а также возможное различие видов нуклеаз, отвечающих за расщепление той или иной молекулы. Следует отметить, что в проведенном нами исследовании также наблюдалось изменение уровня микроРНК, названных этими авторами нестабильными: miR-224, miR-382, miR-423, miR-187. Однако уровень этих микроРНК в FFPE-тканях оказался выше по сравнению с данными образцов, стабилизированных RNAlater. И еще большее повышение – до 5,73 раза в сравнении с образцами RNAlater – отмечалось для микроРНК miR-378, отмеченной S. Bail и соавт. [27] как стабильная. Невозможно не отметить факт наличия большого количества микроРНК, показавших более высокий уровень в тканях, фиксированных формалином, что также отмечается во многих научных исследованиях по изучению изменений профилей микроРНК в клетках после фиксации их формалином при последующей оценке методом микрочипирования. С одной стороны, в этом случае можно предположить, что фиксация ткани формалином происходит хоть и достаточно быстро, но не мгновенно, вызывая в клетке кратковременное состояние стресса. В этом случае в процессе воздействия

формалина в клетке могут произойти изменения, вызванные повреждающим фактором и проявляющиеся в нарушении синтеза микроРНК, которые, возможно, участвуют в процессах защиты клетки от химических повреждений. С другой стороны, отсутствие корреляции между данными, полученными на микрочипах и методом ПЦР-РВ для одних и тех же образцов, указывает на возможную зависимость результатов от выбранного метода исследования. ПЦР-РВ является методом более исследованным, оптимизированным, и потому рассматривается как более точный и надежный способ определения уровня нуклеиновых кислот в клетке. Для нее существует множество работ по оптимизации и исследований по подбору эндогенных контролей, по которым нормируются полученные данные. Существует ряд исследований, в том числе и для микроРНК, которые предполагают использование различных эндогенных контролей для различных типов тканей [28, 29]. При этом показано, что используемые в качестве контролей молекулы являются более или менее стабильными на разных этапах жизни или при различных состояниях организма. Однако нам не удалось найти исследований о сохранении устойчивости эндогенного контроля к химическим модификациям при использовании формальдегидного фиксатора. Вероятно, поэтому остается открытой проблема воздействия формальдегида на эндогенный контроль, в том числе в зависимости от типа ткани. Полученные нами данные для меланомы лишь частично согласуются с результатами сравнительного исследования замороженных и FFPE-тканей меланоцитарных невусов, полученных M. Glud и соавт. [23]. Поэтому возможно предположить, что при сравнении профилей микроРНК в различных тканях методом микрочипирования будут отмечаться искажения профиля, связанные не только с патологическими процессами, но и с модификацией молекул в процессе фиксации тканей. При этом именно исследования действия формалина на нуклеиновые кислоты указывают на значительные изменения РНК в процессе фиксации – деградация, снижение ее доступности в связи с формированием перекрестных связей с белками или иными химическими модификациями под действием формальдегида [30]. Следовательно, стоит предположить, что анализ данных микрочипирования FFPE-образцов требует осторожности в интерпретации и дальнейшего изучения. Аналогичными проблемами можно характеризовать применение FFPE-образцов для генетического анализа на

основе секвенирования. Таким образом, использование биоптатов кожи, фиксированных в формалине и залитых в парафин, для задач молекулярной диагностики на данном этапе может приводить к искажению результатов экспрессионного анализа.

**Финансирование.** Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 14-15-00074).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология опухолей кожи. *Практическая онкология*. 2012; 13(2): 61–8.

Остальные источники литературы см. в References

## REFERENCES

- Imyanitov E.N. Epidemiology and biology of skin tumors. *Practical oncology. Russian Journal (Prakticheskaya onkologiya)*. 2012; 13(2): 61–8. (in Russian)
- Ascierto P.A., Kirkwood J.M., Grob J.J., Simeone E., Grimaldi A.M., Maio M., et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 85. doi:10.1186/1479-5876-10-85.
- Woodman S.E., Trent J.C., Stemke-Hale K., Lazar A.J., Pricl S., Pavan G.M., et al. Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8(8): 2079–85.
- Fadiel A., Naftolin F. Microarray applications and challenges: a vast array of possibilities. *Int. Arch. Biosci.* 2003; 2003: 1111–21.
- Snijders A.M., Meijer G.A., Brakenhoff R.H., van den Brule A.J., van Diest P.J. Microarray techniques in pathology: tool or toy? *Mol. Pathol.* 2000; 53(6): 289–94.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431(7006): 350–5.
- Berg D., Malinowsky K., Reischauer B., Wolff C., Becker K.F. Use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for diagnosis and therapy in routine clinical settings. *Methods Mol. Biol.* 2011; 785: 109–22. doi: 10.1007/978-1-61779-286-1-8.
- Evers D.L., Fowler C.B., Cunningham B.R., Mason J.T., O’Leary T.J. The effect of formaldehyde fixation on RNA. *J. Mol. Diagn.* 2011; 13(3): 282–8.
- Sengüven B., Baris E., Oygur T., Berktaş M. Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *Int. J. Med. Sci.* 2014; 11(5): 494–9.
- Masuda N., Ohnishi T., Kawamoto Sh., Monden M. and Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucl. Acids Res.* 1999; 27(22): 4436–43.
- Ji L., Chen X. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Res.* 2012; 22(4): 624–36. doi: 10.1038/cr.2012.36.
- Matsuda Y., Fujii T., Suzuki T., Yamahatsu K., Kawahara K., Teduka K., et al. Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. *J. Histochem. Cytochem.* 2011; 59(1): 68–75.
- Van Eijsden R.G., Stassen C., Daenen L., Van Mulders S.E., Bapat P.M., Siewers V., et al. A universal fixation method based on quaternary ammonium salts (RNAlater) for omics-technologies: *Saccharomyces cerevisiae* as a case study. *Biotechnol. Lett.* 2013; 35(6): 891–900.
- Sand M., Skrygan M., Sand D., Georgas D., Gambichler T., Hahn S.A., et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi. *Cell Tissue Res.* 2013; 351(1): 85–98. doi: 10.1007/s00441-012-1514-5.
- Melnik B.C. MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? *J. Transl. Med.* 2015; 13: 202. doi: 10.1186/s12967-015-0570-5.
- Forloni M., Dogra S.K., Dong Y., Conte D. Jr., Ou J., Zhu L.J., et al. miR-146a promotes the initiation and progression of melanoma by activating Notch signaling. *Elife*. 2014; 3: e01460.
- Liu S., Tetzlaff M.T., Cui R., Xu X. miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1. *Am. J. Pathol.* 2012; 181(5): 1823–35.
- Kozubek J., Altaf F., Dadras S.S. MicroRNA biomarkers in melanoma. In: Murphy M.J., ed. *Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Melanoma*. New York: Springer; 2012: 113–26.
- Wei Y., Du Y., Chen X., Li P., Wang Y., Zang W., et al. Expression patterns of microRNA-218 and its potential functions by targeting CIP2A and BMI1 genes in melanoma. *Tumour Biol.* 2014; 35(8): 8007–15.
- Bennett P.E., Bemis L., Norris D.A., Shellman Y.G. miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma. *Physiol. Genomics*. 2013; 45(22): 1049–59.
- Penna E., Orso F., Cimino D., Tenaglia E., Lembo A., Quaglini E., et al. MicroRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J.* 2011; 30(10): 1990–2007. doi: 10.1038/emboj.2011.102.
- Mazar J., Qi F., Lee B., Marchica J., Govindarajan S., Shelley J., et al. MicroRNA 211 functions as a metabolic switch in human melanoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 2016; 36(7): 1090–108. doi: 10.1128/MCB.00762-15.
- Glud M., Klausen M., Gniadecki R., Rossing M., Hastrup N., Nielsen F.C., et al. MicroRNA expression in melanocytic nevi: the usefulness of formalin-fixed, paraffin-embedded material for miRNA microarray profiling. *J. Invest. Dermatol.* 2009; 129(5): 1219–24.
- Kashofer K., Viertler Ch., Pichler M., Zatloukal K. Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis. *PLoS ONE*. 2013; 8(7): e70714.
- Li J., Smyth P., Flavin R., Cahill S., Denning K., Aherne S., et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol.* 2007; 7: 36.
- Flores O., Kennedy E.M., Skalsky R.L., Cullen B.R. Differential RISC association of endogenous human microRNAs predicts their inhibitory potential. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(7): 1–11.
- Bail S., Swerdel M., Liu H., Jiao X., Goff L.A., Hart R.P., et al. Differential regulation of microRNA stability. *RNA*. 2010; 16(5): 1032–9. doi: 10.1261/rna.1851510.
- Davoren P.A., McNeill R.E., Lowery A.J., Kerin M.J., Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol. Biol.* 2008; 9: 76. doi: 10.1186/1471-2199-9-76.
- Carlsson J., Helenius G., Karlsson M., Lubovac Z., Andrén O., Olsson B., et al. Validation of suitable endogenous control genes for expression studies of miRNA in prostate cancer tissues. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010; 202(2): 71–5.
- 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(6): 1961–71.

Поступила 11.05.16

Принята к печати 21.06.16