

Karışan patoloji laboratuvar örneklerinin DNA analizi ile kimliklendirilmesi

The identification of mixed pathology laboratory samples by DNA analysis

Ayşim TUĞ, Cüneyt ELMA

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş biyopsi örnekleri DNA analizi için önemli kaynaklardır. İki olguda, total tiroidektomi ameliyatında çıkarılan iki doku parçası rutin uygulamaya uygun olarak patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Ancak patoloji raporunda aynı hastaya ait üç parçanın sonucu verilmiştir. Laboratuvarın incelemesinde iki örneğe nodüler guatr; 3. parçaya ise papiller karsinom tanısı konulmuştur. Uygulanacak tedavi şekillerinin farklılığı nedeniyle söz konusu parçaların aynı hastaya ait olup olmadığının belirlenmesi için doku örnekleri ile hasta arasındaki genetik uyumun araştırılması istenmiştir.

Her bir olay için formaldehit içinde üç adet ve parafine gömülü üç adet olmak üzere toplam altı adet doku parçası ile iki hasta Adli Tıp Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilmiştir. Hastalardan alınan kan örneklerinden ve doku örneklerinden elde edilen DNA profilleri karşılaştırıldığında incelenen 16 gen bölgesi açısından tam bir uyum olduğundan örneklerin hastalara ait olduğu belirlenmiştir. Analizler üç gün içinde tamamlanmış ve sonuç raporları ilgili kliniklere gönderilmiştir.

Anahtar sözcükler: DNA analizi, patoloji, formalin, parafin, adli bilimler

ABSTRACT

Formalin-fixed, and paraffin embedded biopsy samples can be useful sources for DNA analysis. In two cases, two tissue specimens taken from patients during total thyroidectomy operations were sent to pathology laboratory in accordance with the routine application. However, from pathology laboratory, results of the three samples belonging to the same patient were reported. Nodular goitre in two, and papillary carcinoma in one sample were diagnosed. Due to the difference of therapies to be applied, genetic matching between tissue samples sent and the patient had been claimed for the determination of whether all the samples do belong to the same patient or not.

For each case totally six tissue samples, fixed in formalin (n=3) and embedded in paraffin (n=3) were sent to the DNA laboratory of the department of forensic sciences. When DNA profiles of blood samples and tissue specimens taken from patients were compared, all samples matched perfectly with respect to 16 analyzed genetic loci, and thus it was concluded that the specimens were unmistakably belonged to the respective biopsied patients. Analyses were completed within three days and the results were sent to the related clinics.

Key words: DNA analysis, pathology, formalin, paraffin, forensic sciences

GİRİŞ

İnsan kaynaklı biyolojik materyaller, klinik patolojik örnek arşivlerinde, kan, doku ve organ bankalarında ve DNA bankalarında prepat ve parafin bloklar hazırlanarak, fikse edi-

lerek, dondurularak veya DNA'sı izole edilerek saklanmaktadır. Patoloji laboratuvarlarında genellikle tercih edilen yöntem doku örneklerinin formalin içerisinde veya parafine gömülü olarak saklanmasıdır (1).

Formalin, gaz formundaki formaldehitin metanol ve suda çözünmesiyle oluşan bir çözeltilidir. Patoloji ve histolojide mantar, bakteri, parazit üremesini engelleyerek biyolojik dokuları bozulmadan saklayabilmek için ve yüksek doku

Bu çalışma tek olgu ile III. Balkan Adli Tıp Kongresi'nde (02-05.06.2005, Romanya) poster olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi: Ayşim Tuğ, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Adli Tıp Anabilim Dalı, 06100, Dikimevi, Ankara

penetrasyon gücüne sahip olduğundan fiksasyon amaçlı kullanılır. Parafin mumu da hücresel reaksiyona girmedeği için biyolojik materyallerin saklanması yaygın olarak tercih edilen bir petrol yan ürünüdür. Patoloji laboratuvarlarında formalinle fikse edilerek ya da parafine gömülmüş olarak saklanan örnekler doku yapıları ve proteinleri korunduğu için DNA analizleri için de uygun kaynaklardır (2,3).

DNA teknolojisi, klinik moleküler patolojide kalıtsal hastalıkların moleküler düzeyde tanımlanmasında, patogenezin araştırılmasında ve tedavide etkin olarak kullanılmaktadır (4).

Bu analizler moleküler teknolojideki gelişmelerin en etkin yansıdığı alanlardan biri olan adli bilimlerde de soybağı tayininde, suç olaylarının aydınlatılmasında ve bireysel veya toplu ölüm olaylarında kimlik tespitinde rutin yöntem olarak kabul görmüştür. Biyolojik bir örneğin ait olduğu kişinin tespiti amacıyla yapılan incelemelerde, örneğin durumuna ve analiz hangi amaçla yapıldığına bağlı olarak yapılacak analizin türü değişebilmektedir. Örneğin uygun olması durumunda hücre nükleusunda kromozomlarda lokalize nükleer DNA'nın analizi genellikle tercih edilen yöntemdir. Nükleer DNA'nın protein sentezi yapılmayan bölümlerinde kısa ardışık tekrarlar (Short Tandem Repeats-STR) olarak tanımlanan yüksek polimorfik özelliğe sahip gen bölgeleri bulunmaktadır. Günümüzde kullanılan en gelişmiş STR analizinde 15 gen bölgesi (D8S, D21S, D7S, CSF, D3S, THO1, D13S, D16S, D2S, D19S, VWA, TPOX, D18S, Amelogenin, D5S, FGA) ve cinsiyeti gösteren amelogenin lokusu ile birlikte toplam 16 gen bölgesi incelenmektedir. Bu 16 gen bölgesi karşılaştırıldığında, iki kişinin aynı DNA'ya sahip olması olasılığı mümkün değildir. Bu durumun tek istisnası, kişinin tek yumurta ikizinin olmasıdır (5,6).

Patoloji laboratuvarlarında saklanan örnekler, kimliklendirme amacıyla yapılan analizlerde karşılaştırma örneği olarak kullanılabilen önemli bir kaynaktır. Bunun yanı sıra cerrahi girişimde alınan doku parçalarının başka has-

taya ait örneklerle karıştığı kuşkusunun olduğu durumlarda da, DNA analizleri en doğru sonuç için başvurulması gerekli bir yöntemdir. Bununla birlikte biyolojik örnekler formalin veya parafin içinde olduğundan analizler için uygun miktar ve kalitede DNA elde etmek için diğer örneklerden farklı özel yöntemler uygulanması gerekmektedir (7).

Patoloji laboratuvarı örneklerinde genel olarak şu aşamalar ortaktır.

1. Parafinden arındırma (Deparafinizasyon)
2. Parçalama (Digestion)
3. Saflaştırma (Purifikasyon) (8)

Bu tür örneklerden yapılan DNA analizinde sonuç alınmasını doğrudan etkileyen aşama temizleme aşamasıdır. Parafinin alkol veya ksilen ile uzaklaştırılması 1985 yılından beri kullanılan bir yöntem olmakla birlikte son dönemlerde mikrodalga fırında kısa süreli ısıtma veya thermal cyler cihazında (PCR) 90°C ısıda eritme gibi yöntemler de kullanılmaktadır (9). Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın temel amaç mümkün olan en yüksek oranda örneği formalin veya parafinden temizlemektir. Bu maddelerden arındırılmış dokudan DNA izole edildikten sonra çoğaltma ve genetik analizör yardımıyla gen bölgelerinin tiplendirilmesi yapılır.

OLGULAR

Olgular farklı tarihlerde (2003 ve 2006) incelenmiş olmakla birlikte benzerlik göstermektedir. Her iki olguda da hastalar nodüler guatr ön tanısıyla ameliyat edilmiş ve hastalara total tiroidektomi uygulanmıştır. İlk olgunun operasyonunda tiroid sağ ve sol lobu iki ayrı parça olarak çıkartılmış ve frozen kesit incelemesi için ameliyathanedeki patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Frozen kesit incelemesi benign olarak rapor edilmiştir. Parçalar daha sonra parafin kesit ve kati patoloji raporu için farklı bir binada bulunan patoloji laboratuvarına personel tarafından götürülmüştür. Takibe alınan bu materyalden sonra yine tiroide ait başka bir materyal, bu kez hasta yakını tarafından, aynı hastaya ait ol-

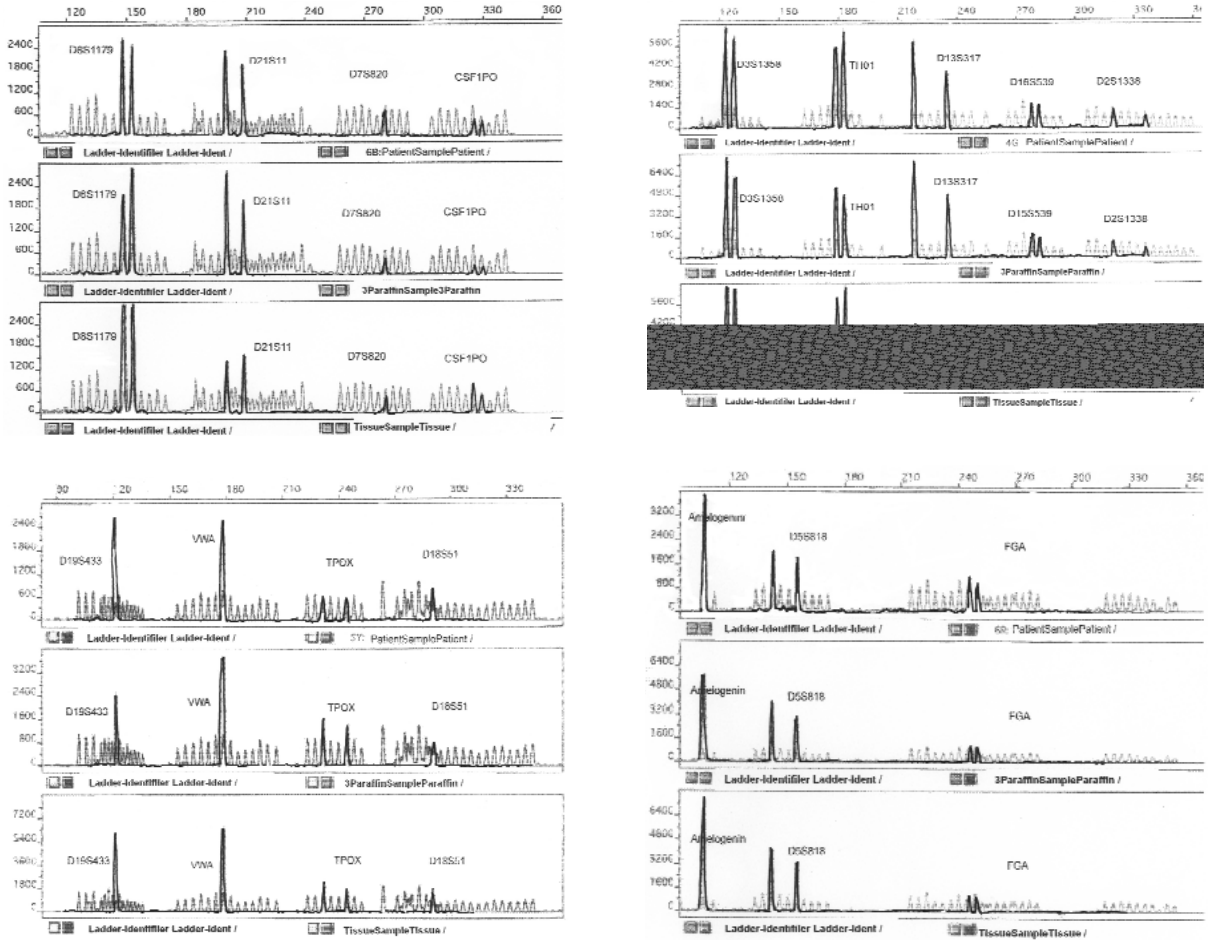
duğu belirtilerek patoloji laboratuvarına iletilmiştir. Patolojik inceleme sonucunda ilk iki örneğe nodüler guatr; üçüncü örneğe ise papiller karsinom tanısı konulmuştur. Bu karışık durumun açıklanması için ameliyatı yapan cerrah ile patoloğun görüşmesi sonucu, her iki lobu frozen kesit ile incelenen ve ilk olarak gönderilen iki parça tiroid dokusu dışında hastaya ait bir başka operasyon materyalinin bulunmadığı düşünülmüştür. Bununla birlikte gönderilen üçüncü parçanın da tiroid materyali olması, papiller karsinom bulundurması ve papiller karsinom tanısına bağlı olarak ameliyat sonrası uygulanacak tedavi protokollerinin farklılığı nedeniyle, bu üç parçanın aynı hastaya ait olup olmadığının kesin olarak belirlenmesi gereği doğmuş ve ameliyatı

yapan cerrah tarafından DNA analizi istemi ile başvuru yapılmıştır. İkinci olguda ayrıntılara ulaşılamamış, bununla birlikte DNA analizi ile durumun açıklığa kavuşup kavuşmayacağı konusunda DNA Laboratuvarımızdan bilgi isteyen patolog ile yapılan görüşmede diğer olgu ile benzer olduğu görülmüştür.

Her iki olguda, doku örnekleri ile hasta arasındaki genetik uyumun araştırılmasına karar verilmiş ve kan örneklerini vermek üzere hastalar ve doku parçaları Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli DNA Analizleri Laboratuvarına gönderilmişlerdir.

Kullanılan yöntem:

Laboratuvara gelen iki hastanın 5 cc venöz



Şekil 1. Birinci hastanın kan örneğinden elde edilen genetik profil (üst) ile parafine gömülü örnek (orta) ve aynı kişiye ait olup olmadığı şüphe yaratan üçüncü örnek arasında (alt) 16 STR bölgesinde tam bir uyum olduğunu gösteren sonuçlar.

kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır. Formaldehit içinde üç adet ve parafine gömülü üç adet olmak üzere toplam altışar adet doku parçası da patoloji laboratuvarından gönderilmiştir.

Formalin içindeki doku örnekleri ilki 2 saat, ikincisi 10 dakika olmak üzere iki kez serum fizyolojikle hafif çalkalamayla yıkanmıştır. Parafine gömülü doku örneklerinden alınan parçalar üzerindeki parafin steril bistüri yardımı ile dokuya zarar vermeden kazındıktan sonra, kuvvetli bir çözücü olan ksilen ile 45 dakika süreyle yıkanmış daha sonra alkol ile ikinci yıkama yapılarak ksilen uzaklaştırılmış, son olarak distile su ile bir kez daha yıkama yapılmıştır. Formaldehit ve parafinden arındırılan yaklaşık 2mm² büyüklüğündeki parçalar lizis buffer (%10 Sodium Dodecyl Sulfate, 1M NaCl, 10 mg/ml proteinaz K, Tris EDTA) içerisinde bir gece bekletilerek dokunun çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra standart protokole uygun olarak fenol kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır (8). Amelogenin, D8S, D21S, D7S, CSF, D3S, THO1, D13S, D16S, D2S, D19S, VWA, TPOX, D18S, D5S ve FGA gen bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Son olarak ABI Prism™ 310 genetik analizatöründe Gene Scan programı kullanılarak örnekler bu gen bölgeleri açısından tiplendirilmişlerdir (10,11). İki hastadan alınan kan örneklerinden Chelex yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış, izole edilen DNA'nın çoğaltılması amacıyla uygulanan PCR (Polymerase Chain Reaction) aşamasından sonra temeli elektroforez sistemine dayanan genetik analiz cihazı ile genetik tiplendirme yapılmıştır. Son olarak doku örneklerine ve hastalara ait DNA profilleri genetik uyum açısından karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

Her iki hastanın parafin ve formaldehit içindeki tiroid dokusu örneklerinden elde edilen DNA profili ile tarafımızdan alınan kan örneklerinden elde edilen profilin, incelenen 16 gen bölgesinin tümünde uyumlu olduğu belirlenmiştir. Birinci hastaya ait sonuçlar şekil 1'de görülmektedir. Çalışmaların her ikisi de üçer gün gi-

bi kısa sürede tamamlanarak sonuç raporları hazırlanmıştır.

TARTIŞMA

Patoloji laboratuvarına gönderilen örneklerin türü, ait olduğu hasta, tarih ve benzeri bilgiler çalışmanın çeşitli aşamalarında kontrol edilmektedir. Bununla birlikte hastalarda örneklerin karışmış olabileceği korkusu yaygındır. Özellikle kanser gibi tanı konulduğunda bu durumu ilk anda kabul etmekte zorlanan hastalar örneklerin karışmış olabileceği olasılığını düşünebilirler (11). Bunun yanı sıra sunulan olgularda görüldüğü gibi örneklerle ilgili karışıklıklar da olabilir. Tanıya bağlı olarak tedavinin şekli de değişeceğinden karışıklık olduğuna dair en ufak bir şüphe dahi olsa bu durumun açığa kavuşturulması gerekir. Kayıt kontrolü ile sorun giderilemiyorsa DNA analizi yüksek güvenilirlik oranı ile sorunun çözümünü sağlayacak bir yöntemdir.

Patoloji laboratuvarında dokunun fiksasyon süresi ve tipinin DNA elde edilmesini etkileyen faktörler olduğunu gösteren çalışmalar vardır (7,8,12). Patoloji laboratuvarlarına gönderilen formalin içindeki ve parafine gömülmüş örneklerle yapılan çalışmalarda sonucu etkileyen en önemli aşama bu maddeleri dokudan uzaklaştırma aşamasıdır. Bu amaçla farklı pH, mikrodalga gibi farklı ısı kaynakları ve farklı sıcaklık dereceleri ile yapılan deneysel çalışmalar, alkali ortam ve yüksek ısının elde edilen DNA'nın miktarını ve kalitesini arttırdığını göstermektedir. Bununla birlikte yüksek ısı ile ilgili henüz yerleşmiş standart bir protokol yoktur (13). Çalışmamızda kısa sürede sonucun verilmesi gerektiğinden biyolojik örnekten formalin ve parafinin uzaklaştırılmasında örneğin zarar görmesi olasılığı düşünülerek yüksek ısı yöntemi yerine yıkama yöntemi tercih edilmiştir (14). Örneğin alındığı tarihin, bir başka tanımla örneğin yaşının da DNA izolasyonu ve çoğaltılma aşamalarında etkili bir faktör olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Beş yıllık örneklerde DNA el-

de etme oranı %65,5 iken, bu oran 5-10 yıllıklarda %54,5; 10 yıldan daha eski örneklerde %51,4 olmaktadır (8). Olgularımızda örnekler en fazla 30 günlük olduğundan DNA eldesi ile ilgili süreyle bağlantılı bir sorun olmaması doğaldır.

Tanı, tedavi veya adli amaçlı yapılan DNA analizlerinin sonuçları kişilerin yaşamlarında önemli değişiklikler yaratmaktadır. Nitekim iki olguda da, hastalar kan örneklerini vermek için geldiklerinde, analiz sonucunda kanser olup olmadıklarını öğreneceklerinden yoğun stres altında olduklarını ifade etmişlerdir. Aynı şekilde sonuçlar, patoloji uzmanları ve ameliyatı gerçekleştiren, tedaviyi programlayacak olan cerrahi uzmanları için de önem taşımaktadır. Yüksek güvenilirliği ve kısa sürede sonuç alınması nedeniyle DNA analizleri patoloji laboratuvarlarında örneklerin karışması şüphesinde önemli bir çözüm kaynağı olarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Hansson MG, Jonsson L, Langedren U. Storing and using biobanks for research. In Hansson MG (eds) The Use of Human Biobanks-Report I-Ethical, Social, Economical and Legal Aspects, Uppsala Universitet. 2004. p.1-8.
2. Yılmaz D. Formaldehit intoksikasyonu. Toksikoloji Dergisi 2004;2:17-19.
3. Öner Ü: Laboratuvar da dokuların takibi ve işlemleri. Demiray U (ed) Patoloji. Eskişehir Anadolu Üniversitesi Yayınları. No:495; 1991, s.12-15.
4. Akar N. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş, 2. Basım., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ANTİP AŞ, Ankara,1999. s.1-7.
5. James SH, Nordby JJ. Forensic Science-An Introduction to Scientific and Investigative Techniques, CRC Press, Boca Raton, 2003. pp.226-227 and 592.
6. Carey L, Mitnik L. Trends in forensic DNA analysis. Electrophoresis 2005;23:1386-1397.
7. Ota M, Shimada K, Asamura H, Katsuyama Y. Highly sensitive HLA-DNA typing from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. Am J Forensic Med Pathol 2006;27:347-351.
8. Coombs NJ, Gough AJ, Primrose NJ. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin fixed tissue. Nucleic Acid Research 1999;27:16.
9. Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. Bio-Techniques 1995;18:768-773.
10. Ladd C, Bourke MT, Scherzinger CA, Pagliaro EM, Gaensslen RRE, Lee HC. A PCR based strategy for ABO genotype determination. J Forensic Sci 1996;41:134-137.
11. Perkin Elmer Corporation, Applied Biosystems.ABI Prism 310 Genetic Analyzer User's Manual. Foster City CA,1994, p. 3-13.
12. de Lamballerie X, Chapel F, Vignoli C, Zandotti C. Improved current methods for amplification of DNA from routinely processed liver tissue by PCR. J Clin Pathol 1994;47:466-467.
13. Shia SR, Cotea R, Wub L, L Cheng, Datar R, Shia Y, et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. J Histochem Cytochem 2002;50:1005-1011.
14. Klintschar M, Neuhuber F. Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. J Forensic Sci 2000;45:669-673.