

## ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ З БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ, ФІКСОВАНИХ У ПАРАФІНІ

### FEATURES OF DNA OBTAINING FROM FIXED AND PARAFFIN-EMBEDDED BIOLOGICAL OBJECTS

Мещанінова Г.П., судовий експерт сектору молекулярно-генетичних досліджень  
відділу біологічних досліджень та обліку  
Харківський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр  
Міністерства внутрішніх справ України

Дослідження нуклеїнових кислот, отриманих із зафіксованих формаліном і занурених у парафінові блоки тканин, методом аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції стало часто використовуватися в судовій експертизі. Водночас відсутні загально визнані рекомендації щодо особливостей вибору методів вилучення нуклеїнових кислот. У зв'язку із цим, метою роботи є проведення порівняльної характеристики наявних методів виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти із зафіксованих формаліном і занурених у парафінові блоки тканин.

Загальні етапи процедур екстрагування нуклеїнової кислоти із зафіксованих формаліном і занурених у парафінові блоки тканин пов'язані з депарафінізацією та протеолітичним розщепленням протеїназою К. Водночас у різних методиках вказані різні концентрації та час/температура інкубації.

Більшість комерційних методів і внутрішніх методик різних лабораторій рекомендують проводити протеолітичну стадію при температурі 55–60 °С, проте час значно відрізняється в різних методиках – від години до 12–48 год.

Екстракція нуклеїнової кислоти із зафіксованих формаліном і занурених у парафінові блоки тканин є технічно вимогливою та лабораторно інтенсивною процедурою, тому автоматизація може значно підвищити ефективність процесу. Натепер комерціалізовано кілька напівавтоматів. Проте єдиною повністю автоматизованою системою вилучення дезоксирибонуклеїнової та рибонуклеїнової кислот є інструмент Siemens, який виділяє загальні нуклеїнові кислоти із зафіксованих формаліном і занурених у парафінові блоки тканин за допомогою пластин заліза оксиду, що покриті наночастиною кремнезему з модифікованою молекулярною системою VERSANT kPCR.

Важливим завданням для дослідження дезоксирибонуклеїнової кислоти є не тільки її виділення, але й подальше визначення вмісту нуклеїнових кислот в екстракті методом полімеразної ланцюгової реакції. На якість проведення полімеразної ланцюгової реакції впливає велика кількість факторів, зокрема наявність інгібіторів, деградованих матриць дезоксирибонуклеїнової кислоти, а також низький/високий вміст матриць. У цих випадках моніторинг гальмування може здійснюватися за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі або кількісному застосуванні з використанням внутрішнього позитивного контролю. Повторне тестування гальмування дозволяє оптимізувати комбінації фасилітаторів полімеразної ланцюгової реакції та розведення зразків таким чином, щоб кількість вилученої дезоксирибонуклеїнової кислоти та/або кількісна точність були максимальними в наступних циклах полімеразної ланцюгової реакції.

Роботи в напрямку стандартизації кількісних методів визначення нуклеїнових кислот продовжуються. Це важливо, оскільки контроль і забезпечення якості є запорукою будь-якого аналізу, а молекулярні аналізи вимагають складніших і жорсткіших заходів для забезпечення надійних результатів.

**Ключові слова:** нуклеїнові кислоти, дезоксирибонуклеїнова кислота, зафіксовані формаліном та занурені в парафінові блоки тканини, полімеразна ланцюгова реакція, екстракція, кількісне визначення, стандартизація.

Nucleic acid studies, derived from formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks (FFPE), have been widely used in forensic examination using the polymerase chain reaction assay. At the same time there are no generally recognized recommendations on the peculiarities of the choice of nucleic acids extraction method. In this regard, the purpose of the work is to perform a comparative characterization of the existing deoxyribonucleic acid (DNA) extraction methods from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks.

The general steps of nucleic acid extraction procedures from FFPE were related to dewaxing and proteolytic cleavage by proteinase K. Different incubation times and temperatures were indicated in different methods.

Most commercial methods and internal techniques from different laboratories recommend a proteolytic step at a temperature of 55–60 °C, but the time varies greatly from one hour to 12–48 hours.

Nucleic acid extraction from FFPE is a technically demanding and laboratory-intensive procedure, so automation can greatly increase the efficiency of the process. Currently, several semi-automatic machines are commercialized. However, the only fully automated system for DNA and RNA extraction is the Siemens tool, which isolates total nucleic acids from FFPE tissues by using iron oxide plates coated with a silica nanoclay with a modified VERSANT kPCR molecular system.

An important task for DNA research is not only its isolation but also the subsequent determination of the nucleic acid content in the extract by the polymerase chain reaction (PCR) method. The quality of PCR is influenced by a number of factors, including the presence of inhibitors, degraded DNA matrices, and low/high content of the matrices. In these cases, the braking can be monitored by real-time PCR or quantified using internal positive control. Re-testing the inhibition allows optimization of PCR facilitators and dilution of the samples combinations so that the amount of DNA extracted and/or quantitative accuracy is maximized in subsequent PCR cycles.

Work towards standardizing quantitative methods for nucleic acid determination is continuing. This is important because quality control and quality assurance is the key to any analysis, and molecular analyzes require more sophisticated and rigorous measures to ensure reliable results.

**Key words:** nucleic acids, deoxyribonucleic acid, formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks, polymerase chain reaction, extraction, quantification, standardization.

Підвищення ефективності розслідування злочинів проти життя та здоров'я громадян є перманентним завданням правоохоронної діяльності. Важливе значення в розслідуванні злочинів, об'єктивізації доказування в кримінальних справах мають об'єкти біологічного походження, які є предметом дослідження судово-медичної експертизи. Для цього використовуються різні методи: серологічний, цитологічний, гістологічний, біохімічний, хіміко-токсикологічний, фізико-технічний тощо.

Проте натепер найточнішими методами, що є альтернативою медико-криміналістичним і серологічним методам дослідження, є молекулярно-генетичні. Для проведення такої експертизи як біологічні об'єкти застосовують зуби, кісткову й м'язову тканини, волосся, плідний матеріал тощо. У випадках поховання трупа й відсутності вищеперерахованих біологічних об'єктів єдиним біологічним матеріалом є парафінові блоки, оскільки вони зберігаються в архіві гістологічного відділення до 3 років [1, с. 40].

Однак під час дослідження нуклеїнових кислот, отриманих із зафіксованих формаліном і занурених в парафінові блоки тканин (далі – ЗФЗП), методом аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції (далі – ПЛР) виникає низка труднощів, зумовлених тим, що виділені із ЗФЗП нуклеїнові кислоти є деградованими. Водночас із метою стандартизації досліджень відсутні стандарти для контролю якості. Незважаючи на те, що зростає кількість публікацій про методи проведення молекулярних аналізів нуклеїнових кислот, отриманих із ЗФЗП [21, с. 416], та особливостей їх виконання, не існує загально визнаних рекомендацій щодо особливостей вибору методів вилучення нуклеїнових кислот [16, с. 812]. Це й зумовлює актуальність дослідження.

У зв'язку із цим, метою роботи є проведення порівняльної характеристики наявних методів виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (далі – ДНК) із зафіксованих формаліном і занурених в парафінові блоки тканин.

Формалін є золотим стандартним фіксатором для гістопатологічної діагностики, оскільки він чудово зберігає морфологію структури тканини, створюючи зшивання між білками [11, с. 375]. Хоча зшивання білок-білок є найчастішою реакцією, відбувається також значне міжмолекулярне зшивання білків із нуклеїновими кислотами. Формальдегід реагує з основами нуклеїнових кислот з утворенням N-гідроксиметильної (метилової) групи (-CH<sub>2</sub>OH) з подальшою повільною електрофільною атакою цієї N-метилової групи на амінокислотні основи з утворенням метиленових містків між двома аміногрупами [3, с. 762]. Ця реакція дозволяє тверднути тканинам для подальшого мікроскопічного й імуногістохімічного аналізу, але метиленові мостики між білками й нуклеїновими кислотами як додавання CH<sub>2</sub>OH до основ нуклеїнових кислот є критичними для вилучення неушкоджених нуклеїнових кислот із ЗФЗП [13, с. 28].

Робочий процес вилучення нуклеїнової кислоти із ЗФЗП полягає в такому. Загальні етапи процедур екстрагування пов'язані з депарафінізацією та протеолітичним розщепленням протеїназою К. Найпоширеніша методика видалення парафіну заснована на його солюбілізації в ксилолі чи інших органічних розчинниках, таких, як лимонен і гексан [14, с. 280], а потім промиванні етанолом [14, с. 281].

Відомо, що за здатністю розчиняти парафін у разі порівняння ксилолу, гексану й лимонену переважає ароматичний ксилол, який розчиняє парафін краще, ніж інші розчинники [19, с. 20]. Існують також альтернативні методи, такі, як його видалення або пряме плавлення за допомогою мікрохвильових печей [21, с. 416], мінеральної олії та інкубації при температурі 90 °С [20, с. 495] або використання специфічних екстракційних реагентів, таких, як Q-розчин (TrimGen's Wax Free™ Набір для підготовки рибонуклеїнової кислоти з парафінових зразків, TrimGen, MA, США) [2, с. 151]. Більшість авторів сходяться на думці, що етап депарафінізації не надає конкретного ефекту в разі використання таких процедур [9, с. 9], можливо, через його видалення під час фаз екстрагування. Однак невелика кількість вчених продемонструвала, що відновлення нуклеїнових кислот із ЗФЗП тісно пов'язане з процесом депарафінізації [6, с. 585].

Екстракція нуклеїнових кислот із тканин ЗФЗП вимагає спеціальних методик, які ґрунтуються на вичерпному протеолітичному видаленні зшивання білка, що зшитий із нуклеїновими кислотами. Це дозволить проекстрагувати нуклеїнові кислоти в повному об'ємі.

У більшості випадків протеоліз досягається протеїназою К. Водночас в різних методиках вказані різні концентрації та час/температура інкубації. Проте саме час і температура інкубації суттєво впливають на процедуру вилучення, оскільки вони безпосередньо пов'язані з введенням теплової енергії для видалення зшивок.

Низка вчених наполегливо підтверджують, що кількість фрагментів ядерної ДНК значно збільшується внаслідок збільшення часу гідролізу [5, с. 693]. Щодо введення теплової енергії, температура інкубації також впливає на видалення поперечних зв'язків. Однак, коли температура вище 65 °С, може відбутися деградація ДНК [4, с. 19]. Відомо, що вихід ДНК, які ампліфіковані ПЛР, збільшується з часом інкубації з протеїназою К у результаті того, що під час введення теплової енергії в систему зшивання формальдегід-білок є оборотним [19, с. 495]. Під час виділення ДНК із ЗФЗП відбувається її деградація. Проте ступінь деградації не така критична, як для рибонуклеїнової кислоти (далі – РНК) із того ж джерела.

Для екстрагування ДНК із ЗФЗП може використовуватися декілька методів, таких, як засолювання, вилучення фенолом/хлороформом і фільтрація на основі кремнезему [19, с. 18]. Більшість комерційних методів і внутрішніх методик різних лабораторій містять протеолітичну стадію, що, як правило, проводиться при температурі 55–60 °С, проте час значно відрізняється в різних методиках – від години до 12–48 год.

Протеоліз є досить мінливим процесом, оскільки можуть бути використані різні буфери й різні концентрації протеїнази К. Зазвичай буфери для гідролізу складаються з трис(гідроксиметил)амінометан-хлоридної кислоти, етилендіамінтетраоцтової кислоти, натрію хлориду, детергенту й протеїнази К. Згідно з думкою вчених С. Viertler, D. Groelz, S. Gündisch [22, с. 460], також у склад буферу може входити й натрію гідроксид.

Так, у багаточисловому дослідженні з одних і тих же тканин ЗФЗП екстрагували ДНК, використовуючи різні методи, з кінцевою концентрацією протеїнази К в межах від 0,2 до 3,3 мкг/мл при температурі від 37 до 56 °С без особливої різниці в тривалості ампліфікованості ДНК [13, с. 30].

Хоча гідроліз протеїназою К не достатній для видалення речовин, що інгібують ПЛР, вона відіграє важливу роль у гідролізі довгих фрагментів секвенування ДНК (> 200 основ), можливо, шляхом доступності ДНК для ампліфікації. Ймовірно, це відбувається шляхом розриву зв'язків кислот із протеїном [10, с. 112].

Застосування діагностики під час молекулярної патології в основному базується на використанні комерційних наборів, оскільки вони можуть підвищити відтворюваність, зменшивши також мінливість препаратів реагентів [9, с. 9]. У такому контексті використання комерційного набору є якоюсь мірою гармонізацією під час підготовки зразків, а не вдосконаленням або стандартизацією процедур вилучення ДНК. Немає доказів того, що комерційні набори підвищують кількість та/або якість вилученої ДНК. Останні звіти показали, що використання внутрішніх методів, заснованих на екстракції фенолом/хлороформом, може забезпечити екстрагування більшої кількості ДНК, але не обов'язково вищу ампліфікованість [12, с. 48].

З боку ампліфікованості ПЛР різні методи екстракції ДНК досить схожі між собою. Якщо довжина амплікона обмежена приблизно 200 bp, ефективність різних методів вилучення ДНК буде досить схожою [15, с. 262]. Відомо, що рівень деградації ДНК у ЗФЗП залежить також від інших факторів, таких, як склад тканини, умови префіксації, а також час фіксації та період зберігання [15, с. 264].

У лабораторній практиці широко використовуються такі комерційні засоби: QIAmp® DNA FFPE (Qiagen, Valnecia, Каліфорнія, США), AmbionRecoverAll® (Ambion, TX, США), Wax Free® TrimGenDNA, NucliSense-EasyMAG® (Biomerieux, NC, США) або GentraDNA (Qiagen, Каліфорнія, США). Вибір конкретних продуктів також залежить від напрямку подальшого дослідження отриманого екстракту з ДНК. Нещодавно опубліковані повідомлення про можливість спільної екстракції ДНК і РНК [20, с. 497], а також про інноваційний і швидкий

метод отримання ДНК із ЗФЗП методом на основі готування під тиском [12, с. 50].

Враховуючи всі вищезазначені дані, серед вчених немає загальної думки щодо переваги одного набору або одного конкретного методу, оскільки більшість із них працює добре. Тканини ЗФЗП неоднорідні за обробкою та типом тканини, і навіть невелике коригування в інструкціях до комплексу може показати відмінності в продуктивності [8, с. 106].

Екстракція нуклеїнової кислоти із ЗФЗП є технічно вимогливою та лабораторно інтенсивною процедурою. Підготовка зразків вручну вимагає багато практичного часу, і на неї впливають особливості роботи оператора, що може спричинити менш відтворювані й надійні результати [23, с. 6385]. Оскільки кількість молекулярних аналізів збільшується в зразках ЗФЗП під час проведення молекулярно-генетичних досліджень, автоматизація може стати складним завданням для підвищення ефективності й стандартизації.

Існують різні рівні автоматизації молекулярних досліджень: від методів вилучення, що потребують значної кількості ручних маніпуляцій, до майже повністю автоматизованих методологій. Найважливішими процедурами в процесі автоматизації є мікродисекція, видалення парафіну зі зразків і стандартизація умов лізису, які враховують різні умови, що виникали під час фіксації та в процесі зшивання, а також коливання розміру зразка тканини та його неоднорідний морфологічний склад [18, с. 322]. Після лізису протягом ночі оператори зазвичай можуть проводити візуальний огляд для встановлення необхідності подальшої інкубації зі свіжою протеїназою К. Цю процедуру за участю оператора досить важко перевести в автоматизований режим.

Натепер комерціалізовано кілька напівавтоматів. Дослідники оцінювали два автоматизовані екстрактори й порівнювали їхню продуктивність із ручним екстрагуванням, використовуючи різні мішені нуклеїнової кислоти, отримані з різних типів зразків, які зазвичай зустрічаються в педіатричній лабораторії мікробіології. Потім вони порівнювали як вартість, так і продуктивність аналізованих напівавтоматів [17, с. 706]. Встановлено, що значних відмінностей не знайдено.

Інші автори випробували напівавтоматичне отримання нуклеїнових кислот зі зразків ЗФЗП [11, с. E376] і продемонстрували, що для такого типу тканини можна застосовувати роботизовані процедури. Водночас у деяких випадках кількість нуклеїнової кислоти під час проведення ручного вилучення нуклеїнових кислот була вище, ніж у напівавтоматизованій процедурі. Однак результати були порівняні за якістю ДНК [23, с. 6384].

Єдиною повністю автоматизованою системою вилучення ДНК і РНК є інструмент Siemens (Siemens Enterprise Communications GmbH&Co, KG, Мюнхен, Німеччина), який виділяє загальні нуклеїнові кислоти з тканин ЗФЗП за допомогою пластин заліза оксиду, які покриті шаром кремнезему з модифікованою молекулярною системою VERSANT kPCR. Цей автомат також оснащений модулем нагрівача/шейкера й носіями зразків. Вищезазначена конфігурація дозволяє здійснювати повну автоматизацію, включаючи видалення парафіну, оскільки він плавиться під час вилучення [23, с. 6383].

Після першого звіту про цю автоматизовану систему для вилучення нуклеїнових кислот були проведені інші дослідження з метою вивчення можливості екстрагування обох нуклеїнових кислот з однієї ділянки або тканинних ядер у поєднанні із соматичним мутаційним аналізом KRAS і BRAF, і найскладнішим виявилось рутинне тестування мутації KRAS без попередньої мікродисекції [7, с. 14]. Вчені визначають, що кількість опублікованих даних щодо автоматизації вилучення в тканині ЗФЗП досить мало. Однак, можливість використання напів- або

повністю автоматизованих процедур у молекулярному аналізі тканини ЗФЗП є важливим кроком для молекулярних лабораторій, що проводять велику кількість досліджень.

Як відомо, кількість та якість є незалежними параметрами під час вилучення нуклеїнових кислот із ЗФЗП [3, с. 766]. Щодо екстрактів ДНК, то це очевидно для сирих екстрактів, які не піддаються очищенню ні екстракцією фенолу, ні фільтруванням кремнеземом. У цих випадках кількість ДНК завищена й наявність інгібіторів ПЛР може впливати на якість проведення ПЛР [18, с. 322]. У таких випадках вимірювання спектрофотометра точне лише для співвідношення A260:A280, що є показником чистоти екстрактів. Однак навіть після етапів очищення екстракти ДНК можуть містити інгібітори ПЛР, які також можна було б ідентифікувати як невеликі фрагменти копрофільованих нуклеїнових кислот [19, с. 19]. Якщо ПЛР не вдається провести, специфічне виявлення інгібіторів може бути корисним.

Інгібування особливо проблематично з деградованими матрицями ДНК або в разі наявності низької кількості матриць, неможливості розведення екстракту [21, с. 418]. В таких випадках моніторинг гальмування може здійснюватися за допомогою ПЛР у реальному часі або кількісного застосування з використанням внутрішнього позитивного контролю. Повторне тестування гальмування дозволяє оптимізувати комбінації фасилітаторів ПЛР і розведення зразків таким чином, щоб кількість вилученої ДНК та/або кількісна точність були максимальними в наступних циклах ПЛР [13, с. 30].

Як правило, розподіл за розміром ДНК, отриманої із ЗФЗП, є адекватним предиктором для успішності більшості тестів. Проте деякі вчені повідомляють про відсутність збіжності під час порівняння результатів дослідження геномних гібридизаційних структур. Водночас під час дослідження максимальної довжини кислот отримано подібні результати.

Під час проведення аналізу на встановлення клональних властивостей у результаті фіксації та обробки тканин ДНК фрагментується, тому клональні мішені не можуть бути ефективно ампліфіковані через можливість отримання потенційно хибнонегативних результатів. Це зумовлює те, що тестування на клональність не рекомендується у випадках із сильно фрагментованою ДНК (ампліфікація лише 100-nt продукту контрольного гена ПЛР BIOMED-2) [6, с. 590]. Аналогічні висновки можна зробити для більшості аналізів на основі ПЛР. Тому використання можливої комплементарної ПЛР для визначення максимальної довжини продукту ампліфікації може бути кроком до стандартизації аналізів.

Таким чином, натепер застосування молекулярних тестів на ДНК-екстрактах із ЗФЗП стало досить частим, по-перше, тому, що ДНК краще зберігається у ЗФЗП, а по-друге, тому, що більшість тестів якісні, а не кількісні. У найближчі кілька років застосування автоматизованих систем вилучення нуклеїнових кислот може стати досить популярним інструментом у судовій молекулярно-генетичній експертизі. Це може стати реальною лише за умови отримання точної стандартизації на всіх етапах обробки тканин. Контроль і забезпечення якості є запорукою будь-якої експертизи, а молекулярні аналізи вимагають складніших і жорсткіших заходів для забезпечення надійних результатів. Ці вимоги потребують економічних та організаційних зусиль, що сильно залежать від надання фінансової підтримки з боку держави. Незважаючи на всі труднощі, вважаємо, що можливість використання складніших молекулярних тестів під час проведення молекулярно-генетичних досліджень дозволить спростити роботу працівників правоохоронних органів у разі проведення оперативно-слідчих дій.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Федин И.В., Чикун В.И., Горбунов Н.С. Проблема идентификации человека. *Вестник судебной медицины*. 2017. Т. 6. № 4. С. 40–43.
2. Alvarez-Aldana A., Martinez J.W., Sepulveda-Arias J.C. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. *Pathol. Res. Pract.* 2015. Vol. 211. P. 150–155.
3. de Abreu F.B., Peterson J.D., Amos C.I. Effective quality management practices in routine clinical next-sequencing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016. Vol. 54. P. 761–771.
4. Einaga N., Yoshida A., Noda H. Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. *PLoS One*. 2017. Vol. 12. P. 18–23.
5. Flury B.B., Weisser M., Prince S.S. Performances of two different panfungal PCRs to detect mould DNA in formalin fixed paraffin-embedded tissue: What are the limiting factors? *BMC Infect. Dis.* 2014. Vol. 14. P. 692–698.
6. Funabashi K.S., Barcelos D., Visoná I. DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: the effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Pathol. Res. Pract.* 2012. Vol. 208 (10). P. 584–591.
7. Haile S., Pandoh P., McDonald H. Automated high throughput nucleic acid purification from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples for next generation sequence analysis. *PLoS One*. 2017. Vol. 12. P. 12–22.
8. Hamblin A., Wordsworth S., Fermont J.M. Clinical applicability and cost of a 46-gene panel for genomic analysis of solid tumours: Retrospective validation and prospective audit in the UK National Health Service. *PLoS Med.* 2017. Vol. 14. P. 102–111.
9. Janecka A., Adamczyk A., Gasinska A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin fixed paraffin-embedded tissues. *Anal. Biochem.* 2015. Vol. 476. P. 8–10.
10. Kapp J.R., Diss T., Spicer J. Variation in pre-PCR processing of FFPE samples leads to discrepancies in BRAF and EGFR mutation detection: A diagnostic RING trial. *J. Clin. Pathol.* 2015. Vol. 68. P. 111–118.
11. Kikuchi A., Sawamura T., Daimaru O. Improved protocol for extraction of genomic DNA from formalin fixed paraffin-embedded tissue samples without the use of xylene. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016. Vol. 54. P. E375–E377.
12. Kocjan B.J., Hosnjak L., Poljak M. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* 2015. Vol. 24. P. 47–53.
13. Mathieson W., Marcon N., Antunes L. A critical evaluation of the PAX gene tissue fixation system: Morphology, immunohistochemistry, molecular biology, and proteomics. *Am. J. Clin. Pathol.* 2016. Vol. 146. P. 25–40.
14. Milcheva R., Janega P., Celec P., Russev R., Babál P. Alcohol based fixatives provide excellent tissue morphology, protein immunoreactivity and RNA integrity in paraffin embedded tissue specimens. *Acta Histochem.* 2012. Vol. 115(3). P. 279–289.
15. Nietner T., Jarutat T., Mertens A. Systematic comparison of tissue fixation with alternative fixatives to conventional tissue fixation with buffered formalin in a xenograft-based model. *Virchows. Arch.* 2012. Vol. 461 (3). P. 259–269.
16. Oktay M.H., Hui P. Molecular pathology as the driving force for personalized oncology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2012. Vol. 12 (8). P. 811–813.
17. Sam S.S., Lebel K.A., Bissailon C.L., Tafe L.J., Tsongalis G.J., Lefferts J.A. Automation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol. Res. Pract.* 2012. Vol. 208 (12). P. 705–707.
18. Sanchez I., Remm M., Frasilho S. How severely is DNA quantification hampered by RNA co-extraction? *Biopreserv. Biobank.* 2015. Vol. 13. P. 320–324.
19. Seiler C., Sharpe A., Barrett J.C. Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: A trade off between quantity and quality? *BMC Clin. Pathol.* 2016. Vol. 16. P. 17–22.
20. Senguven B., Baris E., Oygur T. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin embedded archival tissues. *Int. J. Med. Sci.* 2014. Vol. 11. P. 494–499.
21. Serizawa M., Yokota T., Hosokawa A. The efficacy of uracil DNA glycosylase pretreatment in amplicon-based massively parallel sequencing with DNA extracted from archived formalin-fixed paraffin-embedded esophageal cancer tissues. *Cancer Genet.* 2015. Vol. 208. P. 415–427.
22. Viertler C., Groelz D., Gündisch S. A new technology for stabilization of biomolecules in tissues for combined histological and molecular analyses. *J. Mol. Diagn.* 2012. Vol. 14 (5). P. 458–466.
23. Wallinger C., Staudacher K., Sint D. Evaluation of an automated protocol for efficient and reliable DNA extraction of dietary samples. *Ecol. Evol.* 2017. Vol. 7. P. 6382–6389.