Original Article
นิพนธ์ต้นฉบับ

Factors affecting FFPE tissues
ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนสภาพสารพันธุกรรมในเนื้อเยื่อที่ดองน้ำยาฟอร์มาลิน

Somkamol Dolbandalchok M.D.*, Parwana Numnoi M.Sc.*, Amolrada Yindeechai B.Sc.*, Nitikorn Poriswanish, M.D., Ph.D.*

**Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.*

สมกมล ดลบันดาลโชค พ.บ.†, ภาวนา นุ่มน้อย วท.ม.†, อมลรดา ยินดีชัย วท.บ.†, นิติกร โปริสวาณิชย์ พ.บ., ปร.ด.†

†ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10700, ประเทศไทย

Abstract:

Objective: To study a degree of DNA damage from different types of FFPE tissue in different fixing durations and conditions.

Materials and Methods: Autopsy tissue from four organs, i.e. brain, muscle, liver and spleen, were fixed in 10% neutral formalin in two different fixing conditions for 1, 3, 5, 10, 14, 21 and 28 days. One fixing condition is to immerse tissue in the same formalin throughout each due period while the other condition is to change formalin daily; pH of both conditions were recorded daily. The reference DNA was extracted from fresh tissues (Day0) by a frozen section and tissues from Day1 were not separated into two fixation groups yet while the other fixing periods were divided as mentioned. Fixed tissues were processed to embedding and were subsequently DNA-extracted. DNA concentration of each tissue sample was quantified by Nanodrop™ spectrophotometer and analyzed a degree of fragmentation via Bioanalyzer 2100 electropheresis..

Results: The overall number of tissue samples are 56 comprising of four in each group, Day0, 1 and two sets of Day 3, 5, 10, 14, 21 and 28 differentiated by fixing conditions as described. Each of the group, i.e. the same day and fixing condition, revealed uniform DNA condition along four different organs. The pH remained approximately 6.8 for fresh formalin in the first 24 hours and abruptly dropped to 6 and stayed still throughout the fixing periods. DNA degradation was found remarkable increasing in the fixing condition with retain the same formalin while the other showed much less degree.

Conclusion: Formalin itself plays a part in DNA deterioration, however, the increase of acidity owing to oxidization of formaldehyde to formic acid seems be to a major co-contribution; thus, a daily changing of formalin might effectively reduce the effect of acidity resulting in less DNA degradation. Degree of DNA damage should be observed via the sensitive electrophoresis to estimate the amount of remaining high molecular-weight molecules allowing an achievement of a downstream analysis.

Keywords: formalin-fixed tissue, DNA fragmentation, DNA degradation, FFPE

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาระดับความเสียหายของ DNA จากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ในระยะเวลาที่ดองน้ำยา formalin ที่แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการเปลี่ยนน้ำยาใหม่อย่างสม่ำเสมอเพื่อติดตามผลจากการเปลี่ยนสภาพความเป็นกรดด่างของน้ำยา formalin

วัสดุและวิธีการศึกษา: เก็บเนื้อเยื่อจากศพที่ตายตามธรรมชาติซึ่งถูกส่งมาผ่าตรวจทางนิติเวชศาสตร์จำนวน 1 ราย ที่มีระยะเวลาภายหลังตายไม่เกิน 8 ชั่วโมง ได้แก่สมอง กล้ามเนื้อ ตับ และม้าม แล้วดองน้ำยา formalin เป็นกลุ่มๆ ตามระยะเวลา 1, 3, 5, 10, 14, 21 และ 28 วัน โดยวันแรกเก็บเนื้อเยื่อสกัด DNA ไว้เป็นข้อมูลอ้างอิง และกลุ่มที่ดองไว้เกินกว่าวันที่ 1 จะถูกแบ่งออกเป็นสองพวก คือ พวกที่ดองในน้ำยาเดิมกับพวกที่ถูกเปลี่ยนถ่ายน้ำยาทุกๆ วัน แล้ววัดค่า pH ทุกวันจากทุกกลุ่ม หลังจากครบกำหนดแต่ละกลุ่ม ก็นำเนื้อมาสกัด DNA แล้ววัดปริมาณด้วย NanodropTM spectrophotometer และวิเคราะห์สภาพการสลายของ DNA ด้วย Bioanalyzer 2100 electropheresis

ผลการศึกษา: จากตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมด 56 ตัวอย่าง พบว่า แต่ละกลุ่มมีสภาพ DNA ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อวัดค่า pH พบว่า กลุ่มที่ไม่เปลี่ยนน้ำยาฟอร์มาลิน พบค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วภายหลัง 24 ชั่วโมงแรกและค่อยๆ คงที่ที่ pH = 6 ส่วนกลุ่มที่ 2 ที่เปลี่ยนน้ำยา formalin ทุกวัน มีค่า pH 8 ค่อนข้างคงที่และใกล้เคียงกับค่าตั้งต้น คือ pH ประมาณ 6.8 และทำให้สภาพ DNA ในกลุ่มแรกมีลักษณะสลายมากกว่ากลุ่มหลังอย่างชัดเจน

สรุป: ความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นของน้ำยา formalin มีผลต่อการทำลาย DNA อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น การเปลี่ยนน้ำยาฟอร์มาลินทุกวันจะช่วยลดผลดังกล่าวได้ นอกจากนี้ ควรวิเคราะห์สภาพ DNA ด้วยวิธี electrophoresis ที่ไว เพื่อใช้ประเมินสภาพและวางแผนการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปได้ดียิ่งขึ้นคำ

สำคัญ: เนื้อเยื่อดองน้ำยาฟอร์มาลิน, การทำลายสารพันธุกรรม, กระบวนการรักษาเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสารพันธุกรรม

บทนำ

การระบุเอกลักษณ์บุคคลจากสารคัดหลั่งหรือเนื้อเยื่อศพ ในปัจจุบันจะใช้วิธีตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม DNA ที่เป็น short-tandem repeat (STR) ทั้งจาก autosome (autosomal STRs) หรือ sex chromosome (X or Y STRs) หรือในบางกรณี อาจตรวจจาก mitochondrial DNA (mtDNA) ในตำแหน่ง hypervariable region 1 และ 2 (HV 1 & 2) อย่างไรก็ตาม ทั้ง STRs และ mtDNA ต่างก็มีความยาวประมาณ 100 - 400 bp(1) ในกรณีที่สภาพ DNA มีลักษณะขาดออกเป็นท่อนๆ ที่สั้นกว่าความยาวดังกล่าวภายใน ตำแหน่ง locus ของ STRs หรือ HV 1 หรือ 2 เอง ก็จะยิ่งทำให้การตรวจพิสูจน์เป็นไปไม่ได้

การฉีกขาดของสาย DNA เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น สารเคมี อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดดหรือรังสีจุลชีพ หรือแม้แต่จาก enzyme จากร่างกายของศพนั้นเองที่กำลังเน่า(1) ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ DNA ที่เสียหายจะมีโอกาสทำให้การตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมทางนิติเวชศาสตร์เกิดข้อจำกัด เช่น เกิดความไม่สมบูรณ์ของจำนวนตำแหน่งที่ตรวจ (incomplete หรือ partial profile) ด้วยเหตุฉะนี้ การเก็บสิ่งส่งตรวจที่มีสภาพที่ดีที่สุดและการรักษาสภาพของสิ่งส่งตรวจให้อยู่ในสภาพที่ดีที่สุด จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากก่อนการตรวจวิเคราะห์

อย่างไรก็ตามในหลายๆสถานการณ์ ก็อาจจะมีความจำเป็นที่ต้องตรวจวิเคราะห์ DNA จากเนื้อเยื่อที่ถูกเก็บรักษาในสภาที่ไม่ได้มีความมุ่งหมายจะเอาไว้ใช้ DNA แต่แรก เช่น กรณีที่ต้องการตรวจยืนยันเอกลักษณ์บุคคลในภายหลัง จากเนื้อเยื่อที่ถูกดอง formalin เท่าที่เหลืออยู่ หรือการตรวจวิเคราะห์ตังอย่างหายากในพิพิธภัณฑ์(2) เป็นต้น

ปัจจุบันการตรวจทางพยาธิวิทยา ยังคงใช้วิธีการดองอวัยวะหรือชิ้นเนื้อในน้ำยา formalin (10% normal buffered formalin) โดยมีจุดประสงค์ทั้งเพื่อรักษาสภาพและปรับสภาพชิ้นเนื้อให้แข็งเพียงพอสำหรับการตัดเพื่อทำสไลด์ การที่นิยมใช้น้ำยา formalin ก็เพราะมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพชิ้นเนื้อมากที่สุด อีกทั้งง่ายในการเตรียมและยังมีต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ดี วิธีนี้ส่งผลกระทบอย่างมากต่อการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม เนื่องจาก formaldehyde และ formic acid ที่เกิดจากการสลายของ formaldehyde ในน้ำยา formalin(3) เชื่อกันว่าทำให้สาย DNA ฉีกขาดมากจนเหลือความยาวเฉลี่ย < 200 bp(4)

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าชิ้นเนื้อที่แช่ในน้ำยา formalin ยังคงตรวจ STRs ได้อยู่จนถึง 12 สัปดาห์ แต่ผลการตรวจจะเป็น partial STR profile(5) อย่างไรก็ตาม การตรวจศพทางนิติเวชศาสตร์ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องเก็บอวัยวะทั้งชิ้นดองน้ำยา formalin สำหรับใช้ตรวจทางกายวิภาคในภายหลัง เพื่อให้ทราบลักษณะพยาธิสภาพอย่างละเอียด ซึ่งใช้ระยะเวลาโดยเฉลี่ยสำหรับการแช่ชิ้นเนื้อทั้งอวัยวะประมาณ 1 – 2 สัปดาห์ และในบางครั้งอาจจำเป็นต้องเก็บรักษาชิ้นเนื้อไว้เป็นวัตถุพยานนานมากกว่า 1 เดือน กรณีดังกล่าวทำให้เกิดปัญหาในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ ยังเป็นประเด็นที่พบในศพถูกฉีดน้ำยา formalin อีกด้วย

มีหลักฐานและความเชื่อที่ว่าน้ำยา formalin ทำลาย DNA โดยตรง(6-13) แต่การศึกษาต่างๆ ยังมีความไม่สอดคล้องกันทั้งในเรื่องระยะเวลาการดองและสภาพชิ้นส่วน DNA ที่ฉีกขาด ดังนั้น มีความเป็นไปได้ว่าอาจจะมีปัจจัยอื่นที่มีส่วนร่วมทำให้เกิดข้อแตกต่างกันเช่นนี้ สมมติฐานอย่างหนึ่งที่มีความเป็นไปได้คือ ระยะเวลาที่นานขึ้น จะทำให้ความเข้มข้นของน้ำยา formalin ลดลง จากการที่น้ำในเนื้อเยื่อแพร่ซึมออกมา ดังนั้น อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการดองลดลงและ ทำให้มีโอกาสเกิดการเน่าสลายจาก enzyme ภายในเซลล์เองที่เรียกว่า autolysis ซึ่งทำลาย DNA ได้ อีกประการหนึ่ง เชื่อกันว่า การสลายกลายเป็นกรดของ formaldehyde เองก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้ DNA สลายด้วย ฉะนั้น หากเปลี่ยนน้ำยา formalin อย่างสม่ำเสมอ น่าจะมีส่วนช่วยชะลอการสลายของ DNA ได้

นอกจากนี้ การศึกษาวิจัยนี้ยังต้องการวิเคราะห์สภาพ DNA ที่ฉีกขาดจากการดองน้ำยา formalin ตามระยะเวลา (duration) และชนิดของชิ้นเนื้อ (type of tissues) ที่แตกต่างกันด้วย

วัสดุและวิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากศพที่ถูกส่งมาตรวจชันสูตรที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ด้วยเกณฑ์ดังต่อไปนี้

1. ได้รับความยินยอมจากทายาทศพ
2. ระยะเวลาภายหลังตายไม่เกินกว่า 8 ชั่วโมง
3. ไม่ได้รับการบาดเจ็บ
4. ต้องได้รับการตัดชำแหละและตัดเก็บชิ้นเนื้อจากสมอง กล้ามเนื้อ ตับ และม้าม เพื่อใช้ในการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาตามขั้นตอนปรกติ และมีลักษณะคุณภาพและปริมาณชิ้นเนื้อที่เพียงพอสำหรับการเก็บตัวอย่าง

วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บเนื้อเยื่อจำนวน 56 ชิ้นจากอวัยวะ 4 ชนิด คือ สมอง กล้ามเนื้อ iliopsoas muscle ตับ และม้ามของศพเพียงศพเดียวเพื่อควบคุมให้มีปัจจัยสภาพ DNA ใกล้เคียงกันมากที่สุดที่โดยชิ้นเนื้อแต่ละชิ้น จะถูกตัดออกให้มีขนาดกว้าง 2 ซม. ยาว 2 ซม. หนา 1 ซม. จำนวนอวัยวะละ 14 ชิ้น

นำชิ้นเนื้ออวัยวะ อวัยวะละ 1 ชิ้น เก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C โดยไม่ดองน้ำยา formalin เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง (Day0) ซึ่งชิ้นเนื้อจะถูกตัดออกด้วยวิธี frozen section และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกันกับชิ้นเนื้ออื่นๆ

นำชิ้นเนื้ออวัยวะที่เหลือดองน้ำยา formalin แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์เมื่อครบตามระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง, 3 วัน, 5 วัน, 10 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน ตามขั้นตอนการสกัดของชุดสกัด วัดปริมาณสารพันธุกรรม และทำ electrophoresis ทั้งนี้ ชิ้นเนื้อที่ต้องการดองในระยะเวลาที่เกินกว่า 1 วัน จะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มหนึ่งดองด้วยน้ำยา formalin โดยไม่เปลี่ยนน้ำยาตั้งแต่แรก แต่อีกกลุ่มหนึ่งกำหนดให้เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 24 ชม. โดยทั้งสองกลุ่มจะถูกวัดค่า pH ของน้ำยาทุกๆ 24 ชม.

การตรวจวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาตามที่ต้องการศึกษาจะนำชิ้นเนื้อออกจากน้ำยาดอง แล้วนำชิ้นเนื้อมาผ่านกระบวนการทำ paraffin block แล้วตัดเป็นแผ่นบางๆ ประมาณ 2 µm หลังจากนั้นนำมาสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยา Gentra® Puregene® (Qiagen) และวัดความเข้มข้นของปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher)

นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี microchip electrophoresis ด้วยเครื่อง Bioanalyzer 2100 (Agilent)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกบันทึกลงในรูปแบบตารางการเก็บข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel และนำข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ในโปรแกรม SPSS for Window Version 24 เพื่อวิเคราะห์ข้อมูล ปริมาณสารพันธุกรรมในชิ้นเนื้อแต่ละชนิด ในแต่ละช่วงเวลา และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ดองที่เปลี่ยนและไม่เปลี่ยนน้ำยาฟอร์มาลิน

ผลการศึกษา

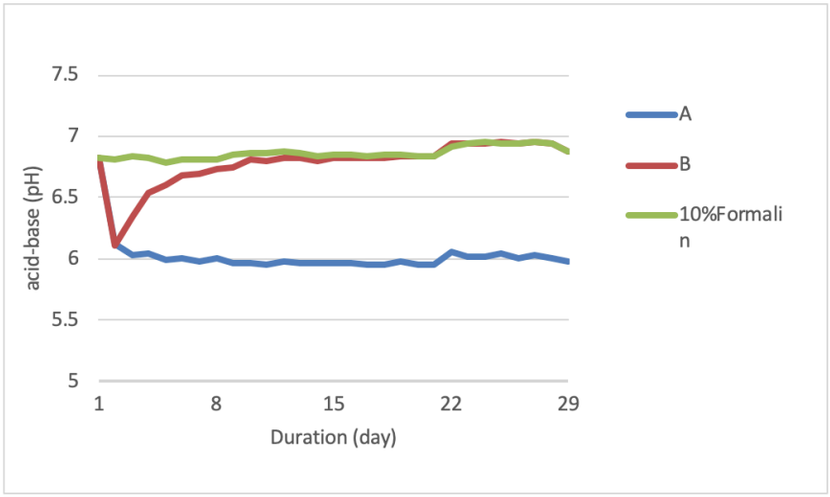
ผลข้อมูลทั่วไป

จากการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อได้จากศพเพศชายวัยกลางคนที่ไม่มีประวัติโรคประจำตัวหรือการเจ็บป่วยใดใดมาก่อน ได้รับการตรวจศพด้วยเหตุไม่ปรากฏสาเหตุการตาย โดยมีระยะเวลาภายหลังตายประมาณ 4 ชั่วโมง และไม่พบบาดแผลหรือการบาดเจ็บใดใดตามร่างกาย ได้ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะ 4 ชนิด ได้แก่ สมอง กล้ามเนื้อแผ่นหลัง ตับและม้าม ตามจำนวนที่ต้องการ

เมื่อนำเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิด สกัดสารพันธุกรรมและตรวจวิเคราะห์ (Day0) พบว่าสารพันธุกรรมมีลักษณะสมบูรณ์จากเนื้อเยื่อทุกชนิดที่

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยา formalin

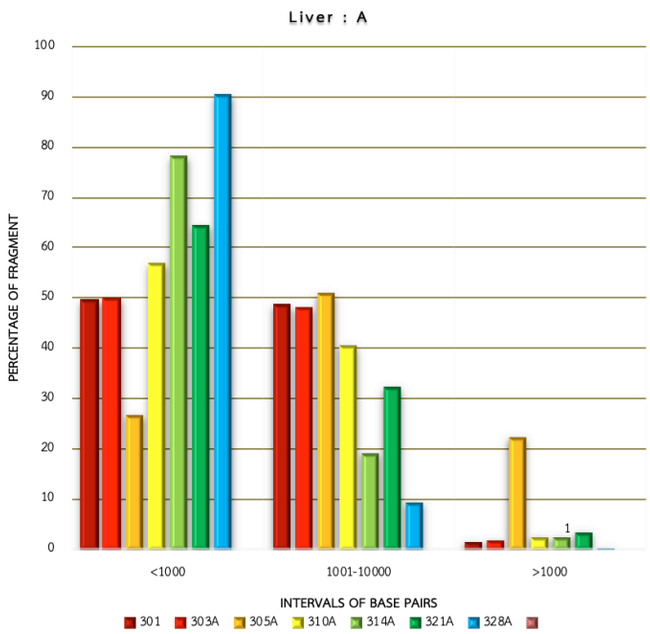
เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาที่ใช้ในการดองเนื้อเยื่อ พบว่าเฉพาะวันแรกค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยา formalin ลดลงอย่างรวดเร็วจาก 6.8 เป็น 6.1 ทั้งกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนน้ำยาฟอร์มาลินและกลุ่มที่ได้รับการเปลี่ยนน้ำยา แต่ในวันต่อๆมากลุ่มที่ได้รับการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน กลับสามารถคงระดับ pH ไว้ได้ใกล้เคียงกับระดับตั้งต้น (ประมาณ pH 6.8) คือ ประมาณ 6.6 – 6.8 ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนน้ำยาเลย จะมีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วในวันแรกและคงที่ที่ประมาณ 6 จนถึงวันสุดท้ายที่ทำการวิจัย คือ วันที่ 28 (Day28) ดังที่แสดงในภาพที่ 1



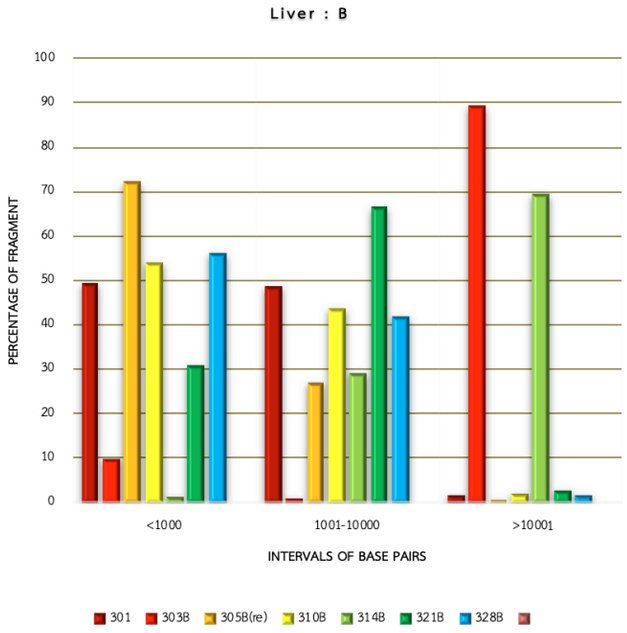
ภาพที่ 1 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำยาฟอร์มาลินดองเนื้อเยื่อตามวันที่ดอง โดยกลุ่ม A คือกลุ่มที่เปลี่ยนน้ำยาทุกวัน ส่วนกลุ่ม B ไม่ได้เปลี่ยนน้ำยา เส้นสีเขียวแสดงค่า pH ตั้งต้นของน้ำยาที่เตรียมใหม่ที่ใช้เปลี่ยนในแต่ละวัน

ผลการเปรียบเทียบปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนสภาพของสารพันธุกรรมในเนื้อเยื่อที่ดองน้ำยาฟอร์มาลิน

เมื่อนำเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิดที่ดองเป็นระยะเวลา 1, 3, 5, 10, 14, 21 และ 28 วัน (Day1, 3, 5, 10, 14, 21, 28) มาสกัดสารพันธุกรรม พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับการฉีกขาดของสารพันธุกรรมจากเนื้อเยื่อแต่ละชนิดที่ดองในระยะเวลาเดียวกันซึ่งใช้การเปลี่ยนถ่ายน้ำยา formalin แบบเดียวกันเมื่อแบ่งกลุ่มของการฉีกขาดของสายพันธุกรรมออกเป็น 3 กลุ่ม คือ พวกที่ 1 พบการฉีกขาดรุนแรง (มีขนาด <1000 bp) พวกที่ 2 พบการฉีกขาดปานกลาง (มีขนาด 1001 ถึง <10000 bp) และพวกที่ 3 อาจการฉีกขาดเล็กน้อยของสายสารพันธุกรรมเป็นท่อนยาว (มีขนาด >10001 bp) พบว่า กลุ่มที่ได้รับการเปลี่ยนน้ำยา formalin ทุกวันมีการฉีกขาดของสารพันธุกรรมอย่างรุนแรงน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเปลี่ยนน้ำยา โดยพบระดับการฉีกขาดรุนแรงอย่างชัดเจนที่ตั้งแต่วันที่ 10 (Day10)ขึ้นไป และมีจำนวนสารพันธุกรรมที่ฉีกขาดรุนแรงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ดอง ดังที่แสดงในภาพที่ 2 และ 3



ภาพที่ 2 กราฟแท่งแสดงช่วงปริมาณ DNA ตามขนาดที่มีการฉีกขาดจากเนื้อเยื่อตับในกลุ่มที่ไม่ได้รับการเปลี่ยนน้ำยาฟอร์มาลิน โดยแบ่งระยะเวลาที่ดองด้วยสีที่แตกต่างกัน เรียงลำดับจาก Day1 ถึง 28 จากซ้ายมาขวาในแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 3 กราฟแท่งแสดงช่วงปริมาณ DNA ตามขนาดที่มีการฉีกขาดของสายสารพันธุกรรมของจากเนื้อเยื่อตับในกลุ่มที่ได้รับการเปลี่ยนน้ำยาฟอร์มาลิน โดยแบ่งระยะเวลาที่ดองด้วยสีที่แตกต่างกัน เรียงลำดับจาก Day1 ถึง 28 จากซ้ายมาขวาในแต่ละกลุ่ม

อภิปรายผลการศึกษา

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการฉีกขาดของDNAและยังไม่พบข้อมูลรูปแบบการฉีกขาดของDNA อีกด้วย ว่ามีสัดส่วนการฉีกขาดอย่างไรบ้างงานวิจัยนี้จึงได้วิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวจากเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารพันธุกรรมในรูปแบบการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อทำสไลด์เพื่อล้างพาราฟินในเนื้อเยื่อ โดยคำนวณปริมาณสารพันธุกรรมตามช่วงความยาวของคู่เบสมาเปรียบเทียบกันในแต่ละปริมาณสารพันธุกรรมที่ตรวจวัดได้ทั้งหมด จากสมมติฐานที่ว่า การสลายของ formaldehyde ในน้ำยา formalin เป็นกรด(3) น่าจะส่งผลต่อการสลายของ DNA นอกเหนือจากผลของ formalin เพียงอย่างเดียว จากการศึกษาก็พบว่าเป็นเช่นนั้น แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาของการดองที่ยาวขึ้นก็ยังมีผลทำให้เกิดการสลายเพิ่มมากขึ้นแม้ว่าจะเปลี่ยนน้ำยาให้สดใหม่ทุกวันก็ตาม ก็เป็นการแสดงอย่าชัดเจนว่าตัว formalin เอง ยังมีผลต่อการสลายของ DNA อยู่ดี แต่เมื่อได้พิจารณาถึงระดับของการสลายแล้ว พบว่า formalin ไม่ได้ทำลาย DNA อย่างรุนแรงจนหมด หากยังคงปริมาณ high-molecular-weight DNA ไว้ไม่น้อย โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการเปลี่ยนน้ำยาทุกวัน ซึ่งเชื่อว่ายังสามารถนำไปวิเคราะห์ทางนิติเวชศาสตร์ได้อยู่

งานวิจัยนี้นอกจากจะช่วยแสดงภาพของการสลาย DNA จากการดองน้ำยา formalin มากขึ้นแล้ว ยังช่วยกำหนดแนวทางการดองน้ำยา formalin หากต้องการจะตรวจวิเคราะห์ DNA โดยสมควรเปลี่ยนน้ำยาทุกๆวันเพื่อคงระดับ pH ให้เป็นกลาง

สรุป

ระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยา formalinและระยะเวลาที่ดองเนื้อเยื่อในน้ำยามีผลต่อการฉีกขาดของ DNA การเปลี่ยนน้ำยาเรื่อยๆ ช่วยลดผลดังกล่าวได้

จริยธรรมการวิจัยและแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เลขที่การรับรอง 918/2561(EC) ผ่านการรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพของโครงการวิจัยจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เลขที่รับรอง SI 2019-003 และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนพัฒนาการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รหัสโครงการ (IO) R016231027

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยและห้องปฏิบัติการบริการเวชพันธุศาสตร์ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่อนุญาตให้ใช้เครื่องมือวิเคราะห์ Bioanalyzer 2100

เอกสารอ้างอิง

1. Butler, J. M. 2009. Fundamentals of forensic DNA typing. 1st ed. Academic Press. MA. USA.

2. Hykin, S. M., Bi, K., McQuire, J. A. 2015. Fixing formalin: A method to recover genomic-scale DNA sequence data from formalin-fixed museum specimens using high-throughput sequencing. PLos One. 10(10): e0141579.

3. Thavarajah, R. et al. 2012. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. J Oral Maxillofac Pathol. 16(3): 400 - 405.

4. Reid, K. M. et al. 2017. A review of the optimisation of the use of formalin fixed paraffin embedded tissue for molecular analysis in a forensic post-mortem setting. Forensic Sci Int. 280: 181-187.

5. Alqaydi, M. & Roy, R. 2016. Quantitative and qualitative study of STR DNA from ethanol and formalin fixed tissues. Forensic Sci Int. 262: 18 - 29.

6. Guyard, A. et al. 2017. DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. Virchows Arch. 471: 491 - 500.

7. Lagheden, C. et al. 2016. Validation of a standardized extraction method for formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. J Clin Virol. 80: 36 - 39.

8. Mansour, A. et al. 2014. A novel xylene-free deparaffinization method for the extraction of proteins from human derived formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) archival tissue blocks. MethodsX. 1: 90 - 95.

9. Nagahashi, M. et al. 2017. Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. J Surg Res. 220: 125 - 132.

10. Okello, J. B. et al. 2010. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. Anal Biochem. 400: 110 - 117.

11. Patel, P. G. et al. 2017. Reliability and performance of commercial RNA and DNA extraction kits for FFPE tissue cores. PLoS One. 12: e0179732.

12. Sam, S. S. et al. 2012. Automation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathol Res Pract. 208: 705 - 707.

13. Weiss, A. T. et al. 2011. Efficient and cost-effective extraction of genomic DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Vet Pathol. 48: 834 - 838.