

Comparative Efficacy of Various Formalin Fixatives for Molecular Diagnosis in Pathological Tissues

Woohyun Jee^{1,2,*}, Moonhwan Bae^{1,**}, Hyejin Yoon^{3,*}, Inyoung Kang^{2,*},
Myoungjoo Koo^{2,*}, Jaewang Lee^{2,4,***} and Jin Hyun Jun^{2,3,4,†,****}

¹Department of Pathology, Samsung Medical Center, Seoul 06351, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Graduate School, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

³Department of Senior Healthcare, Graduate School, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

⁴Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

Pathological tissue fixation using formalin has been widely used for histological samples in many hospitals and institutions. In general, formalin fixatives were either manufactured in laboratories or purchased commercially because of the risks and environmental concerns of handling organic compounds. In this study, the efficacy of three kinds of commercially purchased and one laboratory-made formalin fixative was compared in the PCR-based molecular diagnosis using the extracted DNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. The quality of extracted DNA from FFPE tonsil tissues with four kinds of formalin solutions was evaluated, and PCR for beta-globin gene and microsatellite instabilities (MSI) tests for pentaplex panel markers were performed using the extracted DNA. There was no difference in PCR and MSI tests as molecular diagnoses regardless of the types of formalin used in this study. However, the total amount and average length of double-stranded DNA extracted from FFPE tonsil tissue showed significant differences according to the type of formalin fixative. Optimized formalin fixatives and methods for DNA extraction might be sophisticated to extract good quality DNA from the small size of specific tissue samples. Further studies are needed to select the most effective formalin fixative for histology and molecular pathology using human FFPE tissues.

Key Words: Formalin, Formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues, Histology, Molecular diagnosis, DNA extraction, Polymerase chain reaction (PCR), microsatellite instabilities (MSI) tests

서 론

조직학적 관찰은 생물체를 구성하고 있는 여러 조직을 대상으로 하는 기본적인 연구 방법으로 정확한 조직과 세포의 형태학적 확인을 위해서 조직의 변성을 막는 과정인 고정(fixation)은 조직학적 연구의 기본적인 순서라

할 수 있다. 고정액의 특성에 따라 고정된 조직에서 특이 분자물질의 소실, 조직처리과정 중 조직의 팽창이나 수축, 조직학적 혹은 면역조직학적 염색 정도 차이(variation of quality), 생화학적 반응 과정의 정확성, 세포소기관 구조의 보존 정도 등에서 차이가 나타날 수 있다(Kiernan, 2000; Qin et al., 2021). 포르말린 고정 및 파라핀 포매는 조직 보존에 가장 널리 사용되는 일반적인 조직학적 방법이며

Received: October 27, 2022 / Revised: December 22, 2022 / Accepted: December 23, 2022

* Graduate student, ** Researcher, *** Professor.

† Corresponding author: Jin Hyun Jun. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, B106, Jicheon B/D, 553 Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam-si 13135, Korea.

Tel: +82-31-740-7210, Fax: +82-31-740-7351, e-mail: junjh55@eulji.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Bass et al., 2014). 포르말린을 이용한 조직 고정은 조직 변성을 억제하고 세포 구조를 보존하는 효과가 우수하다 (Peter et al., 2014). 세포 구조를 유지하기 위해 화학적인 조직의 고정 과정을 통해 세포나 조직을 있는 그대로 보존하고 모든 효소 과정이나 대사 과정을 중지시켜 고정 후 변화(post-fixation change)를 최소화하여야 한다. 조직의 고정 과정은 신뢰성 있는 조직학적 시료 준비 과정의 가장 중요한 부분 중의 하나로 연구와 진단에서 정확한 결과를 제공하는 데 중요한 요인이다. 불완전한 고정(under-fixation)은 조직의 형태적 보존이 이루어지지 않아 해당 조직의 정확한 확인이 불가능해질 수 있고, 과고정(over-fixation)은 특정 조직 분자의 소실 또는 비특이적 배경 신호의 노이즈(noise) 등을 유발할 수 있다(Lee, 2011; Zeng et al., 2013). 이상적인 고정은 조직이나 세포의 구조, 형태나 위치를 있는 그대로 유지하고 세포 내외의 특정 분자들의 손실을 방지할 수 있는 방법이어야 하며, 조직의 항원성(antigenicity)을 있는 그대로 유지하거나 항원의 변성을 최소화하며 조직 내 물질의 확산이나 재배열을 방지하는 것이다(Spector and Goldman, 2005; Qin et al., 2021).

근래에 조직학적 시료인 포르말린으로 고정된(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 조직에서의 DNA 추출과 이를 이용한 다양한 분자병리 검사는 진단뿐만 아니라 더 나아가 차세대 염기서열분석(next generation sequencing, NGS) 검사와 같이 정밀 의료 및 표적 치료를 위한 진단에도 활용되고 있다(Norouzi et al., 2021; McDonough et al., 2019; Fujii et al., 2022). 따라서, 조직학적 병리 시료는 단순한 진단의 목적에서 치료 및 예후, 예측, 표적 치료까지 그 영역 및 활용도를 높이고 있다. 분자 병리의 효용성을 높이기 위해서는 FFPE 조직에서 고품질의 DNA 추출이 선행되어야 하기 때문에 이에 대한 연구 또한 다양하게 진행되고 있다(Kocjan et al., 2016; Panchal et al., 2020). 포르말린 고정액을 이용한 조직 고정 과정에서의 DNA 손상의 일반적인 형태는, 저장 기간의 장기화와 조직 고정에 사용되는 포르말린의 낮은 pH로의 산성화와 연관된 것으로 알려져 있다(Ludyga et al., 2012; Groelz et al., 2018; Bauer et al., 2021).

인체에 유해한 물질인 포름알데히드는 10%의 수용액인 포르말린으로 희석되어 병리 조직 고정용으로 많이 사용되고 있으며, 몇몇 병원 및 기관에서는 직접 제조하여 사용하고 있다. 그러나 유기화합물 취급에 따른 위험성과 환경문제로 제조되어 시판되는 포르말린이 널리 사용 중이며 각각의 포르말린의 효용성을 파악하여 기관마다

다 적합한 포르말린을 선택하여 사용하는 것이 중요하게 생각되고 있다. 따라서 구입하여 사용할 수 있는 여러 회사의 포르말린 고정액들과 기관 병리과에서 자체 제조한 포르말린 고정액 등의 조직학적 검사와 분자진단 검사에서의 효용성에 대한 비교 평가 연구가 필요한 상황이다.

본 연구는 시판되는 제품들과 실험실에서 자체 제조한 포르말린 고정액 등의 생화학적 특성을 비교하고 조직학적 관찰 및 분자 진단에서의 그 효용성을 평가하는 것을 목적으로 진행하였다. 대상 포르말린들의 pH를 측정하고 고정한 FFPE 조직 절편에서 DNA를 추출하여 농도와 질(quality)을 비교하고, 추출한 DNA를 이용하여 beta-globin 유전자에 대한 중합효소연쇄반응(PCR)과 다양한 암(cancer)의 진단에 사용되는 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI) 검사를 실시하여 그 결과를 확인하였다.

재료 및 방법

연구 대상 및 재료

본 연구에 사용한 포르말린은 삼성서울병원 병리과에서 직접 제조한 포르말린과 3종류의 시판되고 있는 것들을 사용하였으며, 각각의 조직을 실온에서 12~18시간 고정하였다. 직접 제조한 포르말린 고정액(laboratory-made formalin, LmF)은 formaldehyde solution, 35% 원액 포르말린[(주)삼전화학]과 일반 증류수를 1:9 (10%)로 희석한 포르말린이었으며, 시판 포르말린 고정액은 (주)미락스의 10% neutral buffered formalin (Mirax neutral buffered formalin, MiN), 엠디포스의 포름알데히드(MD Force formaldehyde, MdF), (주)한국씨에프씨케미칼의 포르말린(Korea CFC chemical formalin, KoF) 등을 사용하였다.

본 연구는 삼성서울병원 연구심의위원회의 승인(승인 번호: SMC 2019-07-135-002)을 받아 시행하였으며, 분자진단 검사를 위해 림프 여포 증식을 동반한 만성 편도선염(chronic tonsillitis with lymphoid follicular hyperplasia) 환자에서 채취한 3개의 편도(tonsil) 조직을 사용하였다.

다양한 포르말린 고정액들의 pH 측정

각각의 포르말린(LmF, MiN, MdF, KoF)에 대한 pH 측정은 Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland) 사의 Seven compact S210 장비를 이용하여 10회 반복하여 측정하였다. 그 방법은 아래와 같다.

전극을 calibration 버퍼/표준용액에 넣은 뒤 CAL을 누

르면 Cal 1이 나타나며 신호가 안정된 뒤 또는 READ를 누른 뒤 미리 선택된 END Point 모드에 따라 미터의 측정을 완료한다. 종료 후 calibration을 확인한 후 센서를 측정 샘플에 넣은 뒤 READ를 눌러 측정을 시작하고 END Point 타입이 깜박거리며 측정이 진행되며 샘플의 측정값이 표시된다. 이후 선택된 안정기준에 따라 측정이 안정되며 안정 아이콘이 표시된 후 최종 측정값을 확인하였다.

조직의 고정 및 절편 제작

생검된 편도(tonsil) 조직을 고정하기 전에 1×1 cm 크기로 자른 후 각각의 포르말린 고정액(LmF, MiN, MdF, KoF)으로 12~18시간 동안 충분히 고정하였다. 블록을 제작하는 과정에서 조직 사이의 파라핀 침투는 Leica Biosystems (Wetzlar, Germany)의 Peloris Quick Tips 장비를 사용하여 하룻밤 동안 진행하였으며 파라핀이 침투된 각 조직들은 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)의 조직 포매 장치인 Histostar 장비를 사용하여 일정한 모양의 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)의 Finesse ME+ 박절기를 이용하여 3~4 μm의 두께로 박절 후 Muto Pure Chemicals (Tokyo, Japan)사의 유리 슬라이드에 파라핀 절편을 부착하였다.

조직학적 관찰을 위한 hematoxylin & eosin 염색

Hematoxylin & eosin (H&E) 염색은 조직학 시료에서 일반적으로 사용하는 염색법으로 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)의 두 염료를 이용하여 세포의 핵과 세포질을 구분하여 관찰할 수 있다.

조직 절편기를 이용하여 4 μm 두께로 파라핀 조직 절편을 제작하였으며, 이를 Roche Diagnostics (USA)의 Ventana HE 600 염색기를 사용하여 H&E 염색을 진행하였다. 건조부터 봉입, 염색까지의 전체 과정이 Ventana HE600 장비에서 자동으로 한 번에 이루어지기 때문에 염색 과정에서 슬라이드 이동 시간을 감소시키고 기존의 H&E 염색은 'Dip & Dunk' 방식으로 여러 조직 샘플을 염색하기 때문에 교차 오염을 최소화하였다. 알코올과 자일렌(xylene)을 사용하지 않고 대체물질을 이용하는 최신 염색 장비를 이용하여 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

포르말린 고정 후 파라핀 포매된 편도 조직에서 DNA 추출 및 분석

포르말린으로 고정된 조직에서의 DNA 추출은 삼성

서울병원 병리과에서 사용하고 있는 Qiagen DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 각각의 고정액에 따른 파라핀 블록을 5 μm 두께로 4~8장의 절편을 제작하고 신전기에서 건조 후 각각의 샘플 튜브에 넣었다. 탈파라핀 후 proteinase K 20 μL, ATL buffer 180 μL를 넣고, 56°C 항온 수조에서 12~15시간 처리하고, 90°C 가열 블럭에서 1시간 동안 고온 처리하였다.

상기와 같이 처리된 샘플 튜브를 단시간 원심분리 한 후 AL buffer 200 μL 넣고, 볼텍싱(vortexing)과 단시간 원심분리를 반복한 후 100% Et-OH 200 μL를 넣었다. 그 후 8,000 rpm으로 1분 원심분리 후 밑에 가라앉은 침전물은 제외하고 상층액만 컬럼(column)에 옮긴다. 수세를 위하여 컬럼(column)에 AW1 buffer 500 μL를 넣어주어 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, 2차로 AW2 buffer 500 μL를 넣어 14,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 컬럼(column)에 부착된 DNA를 분리하기 위해 수세된 컬럼(column)을 깨끗한 1.5 mL 미니원심분리 튜브에 옮기고, AE buffer 200 μL를 넣어 1분간 방치한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다.

이후 추출된 FFPE 조직의 DNA는 DU-730 spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)와 Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) 장비를 사용하여 DNA의 농도(concentration), 순도(purity) 및 총량(total amount)을 측정하였다.

추출한 DNA를 사용한 중합효소연쇄반응(PCR)과 증폭 산물 확인

추출한 genomic DNA의 상태를 확인하기 위해 아래와 같은 프라이머 쌍(forward primer 5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3', reverse primer 5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCA-3')를 이용하여 beta-globin 유전자에 대한 중합효소연쇄반응(PCR)을 진행하였으며, 예상되는 PCR product의 크기는 216 base pairs 였다.

중합효소연쇄반응(PCR)은 Maxime PCR premix (i-star Taq; iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Korea)를 사용하였으며, DW 17 μL, forward primer 1 μL, reverse primer 1 μL, genomic DNA 1 μL로 20 μL을 맞춰서 Bio-Rad C1000 PCR 장비(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 40 cycles PCR을 진행하였다. PCR 산물의 크기는 QIAxcel Advanced System (Qiagen) 장비를 사용하여 그 결과를 확인하였다.

추출한 DNA에 대한 현미부수체 불안정성 검사(microsatellite instability test, MSI test)

각각의 포르말린을 사용하여 고정된 편도(tonsil) 조직의 파라핀 블록에서 추출한 DNA를 사용하여 PCR 방법을 기반의 현미부수체 불안정성(MSI) 검사를 시행하고 그 결과값을 비교하였다. 추출한 DNA 시료 들에서 pentaplex panel인 NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26에 대한 현미부수체 불안정성(MSI) 검사를 해당 탐침자(probe)를 이용하여 진행하였다(Suraweera et al., 2002; Goel et al., 2010).

각각의 PCR 튜브에 분리된 DNA를 넣고, 각 표지자 별로 형광이 표시된 primer를 넣어주었다. Hot Starter Taq Master Mix (QIAGEN)을 넣어준 후 잘 섞어주었다. 시료는 GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 장착한 후 95°C에서 15분간 반응한 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30회전을 반응하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응하였다. 반응이 끝난 시료에 GeneScan-500 ROX size Standard (Applied Biosystems) 1 µL와 Hi-Di formamide (Applied Biosystems) 10 µL를 넣어 잘 혼합한 후 95°C에서 5분간 반응시켰다. 탐침자(probe)와 혼합된 시료를 96 well plate에 옮긴 후 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)에 장착하여 조각 분석(fragment analysis)을 실시하였다. 분석이 끝난 결과물은 GeneScan software (Applied Biosystems)을 이용하여 결과를 확인하였다.

확인된 결과의 평가는 5개의 표지자(marker) 중 2개 이상의 표지자(marker)에서 변이가 관찰될 경우에 MSI-High, 하나의 표지자(marker)에서만 변이가 있을 경우에는 MSI-Low, 모든 표지자(marker)에서 변이가 관찰되지 않는 경우에 microsatellite stable (MSS)로 분류하였다(Sood et al., 2001; Kim and Park, 2006; Bilbao-Sieyro et al., 2014).

통계 분석

통계처리는 SPSS Version 27 (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였다. 명목 변수에 대해서는 Chi-square test, 연속 변수에 대해서는 Student *t*-test 또는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였다. 통계 처리에서 *P* 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Table 1. Mean of pH in various formalin fixatives

Name of fixatives	pH (mean ± SD)
Laboratory-made formalin (LmF)	6.84 ± 0.06
Mirax Co. 10% neutral buffered formalin (MiN)	6.81 ± 0.01
MD force formaldehyde (MdF)	6.83 ± 0.07
Korea CFC chemical Co. formalin (KoF)	6.87 ± 0.06

The pH of each formalin was measured 10 times
There was no significant difference in one-way ANOVA

결 과

다양한 포르말린 고정액들의 pH 측정 결과

각각의 포르말린의 pH를 10회 반복 측정하였으며, 그 결과는 Table 1와 같았다. 측정 결과 pH 평균값 ± 표준편차는 KoF에서 6.873 ± 0.055로 가장 높았으며, MiN에서 6.814 ± 0.016으로 가장 낮게 나타났으나, 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)에서 통계적인 유의성은 없었다.

포르말린 고정액에 따른 H&E 염색성 차이 분석

각각의 고정액을 사용하여 편도 조직을 hematoxylin & eosin 염색을 시행 후 광학현미경으로 염색성을 확인한 결과 핵은 염기성 염료인 hematoxylin으로 인하여 짙은 청색으로 염색되었으며, 세포질은 산성 염료인 eosin에 의해서 적색으로 염색되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 고정액에 따른 조직 간의 염색성에서 유의한 차이점을 발견할 수 없었다(Fig. 1).

포르말린 고정액 종류에 따른 조직 검체 유래 DNA의 농도 및 상태

본 연구에서 사용한 4가지 포르말린으로 고정된 편도(tonsil) 조직 절편에서 추출한 DNA의 상태에 대한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 각각의 시료에서 추출된 핵산의 농도는 KoF에서 가장 높았고, LmF, MiN, MdF 순으로 확인되었지만 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 추출한 DNA의 순도를 나타내는 A260/280 ratio 값은 모두 1.94~1.99로 유사한 결과를 보였다.

각각의 포르말린 고정액을 사용한 시료에서 추출된 double-stranded DNA (dsDNA)의 양은 KoF에서 가장 높았고, MiN, LmF, MdF 순으로 확인되었으며, KoF를 사용한 경우에 MdF에 비해 통계적으로 유의하게 많은 dsDNA가 추출되었다(*P*<0.05). 또한, 추출된 dsDNA의 평균 길이를

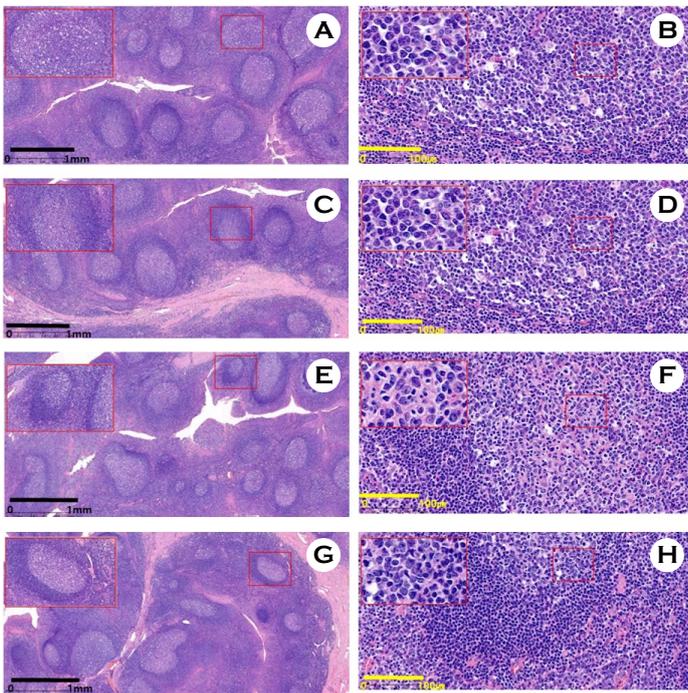


Fig. 1. Paraffin sections of human tonsil tissues were stained with a standard hematoxylin and eosin. Microscopic image of a moderate hyperplasia of a lymphatic follicle. The structure of the tonsil stroma and pathological region was well maintained. There was no difference in cytoplasmic and nuclear morphologies among different formalin fixatives. A and B was used laboratory-made formalin (LmF), C and D was used Mirax Co. 10% neutral buffered formalin (MiN), E and F was used MD force formaldehyde (MdF), G and H was used Korea CFC chemical Co. formalin (KoF), respectively. Magnification of A, C, E and G were $\times 50$, and B, D, F and H $\times 300$, respectively. Black and yellow scale bars respectively indicate 1 mm and 100 μm .

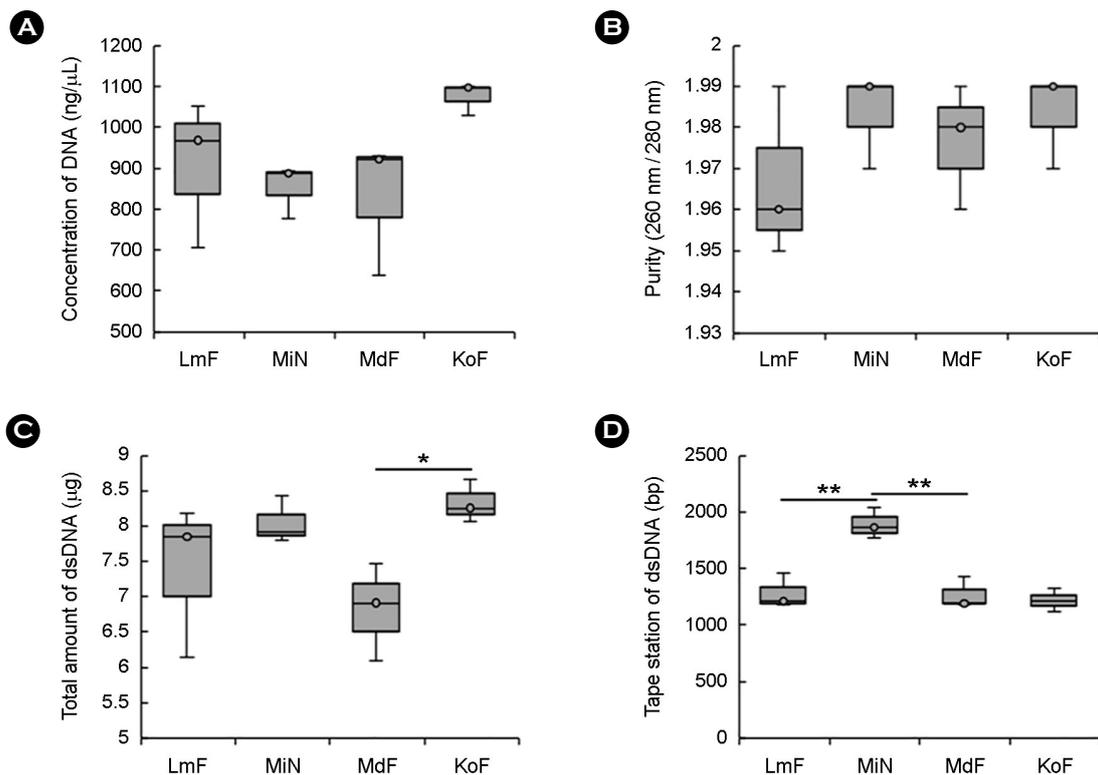


Fig. 2. Differences of DNA quality from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tonsil tissues. The concentrations (A) and purity (B) of DNA from FFPE tonsil tissues were similar by various formalin fixatives. The total amount of double-stranded DNA (C) was significantly higher in KoF compared to MdF ($*P < 0.05$). The tape station of double-stranded DNA (D) was significantly higher in MiN compared to LmF and MdF, respectively ($**P < 0.01$). LmF, laboratory-made formalin; MiN, Mirax Co. 10% neutral buffered formalin; MdF, Md force formaldehyde; KoF, Korea CFC chemical Co. formalin.

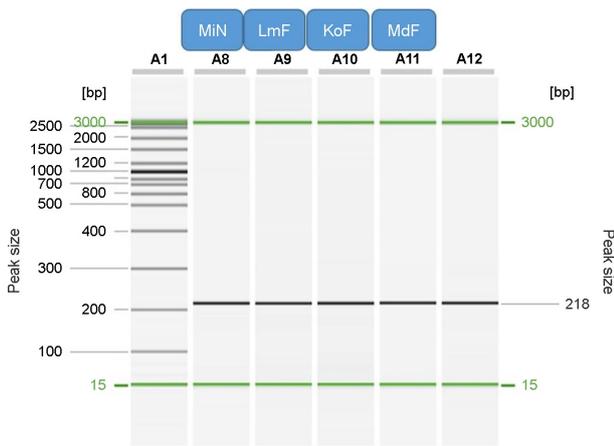


Fig. 3. PCR products of beta-globin gene by the QIAxcel Advanced System (Qiagen). Expected size of PCR products were 216 bp, which were found all lanes of samples. Lower bands of 15 bp and higher bands of 3 Kbp were primer dimer and genomic DNAs, respectively. Lane A1, size markers; A8, MiN (Mirax Co. 10% neutral buffered formalin); A9, LmF (laboratory-made formalin); A10, KoF (Korea CFC chemical Co. formalin); A11, MdF (MD force formaldehyde); A12, positive control.

의미하는 tape station은 MiN에서 가장 길었으며, LmF를 사용한 경우에 비해 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ($P<0.01$).

추출한 DNA에서 beta-globin 유전자에 대한 PCR 결과

다양한 포르말린으로 고정된 편도(tonsil) 조직 절편에서 추출한 DNA를 이용하여 실제적인 병리분자 진단에서 주로 사용하는 PCR 검사를 진행하였다. Beta-globin 유전자에 대한 PCR 결과물의 gene scan 이미지에서 예상했던 216 bp 크기의 위치에서 PCR product band를 확인할 수 있었으며, 4가지 포르말린 조직에 따른 PCR 결과물들과 positive control 시료의 증폭 산물 band 위치가 동일하였다(Fig. 3).

추출한 DNA에 대한 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI) 검사 결과

각각의 포르말린 고정액을 사용하여 고정된 편도 조직의 절편에서 추출한 DNA를 이용하여 현미부수체 불안정성(MSI) 검사를 진행하였다. 현미부수체 불안정성(MSI)을 확인하기 위해 PCR 방법으로 증폭한 5개의 pentaplex panel markers (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26) 검사 결과는 Fig. 4에서와 같이 양성 시료와 각각의 추출된 DNA 시료에서 유사한 결과를 나타냈다.

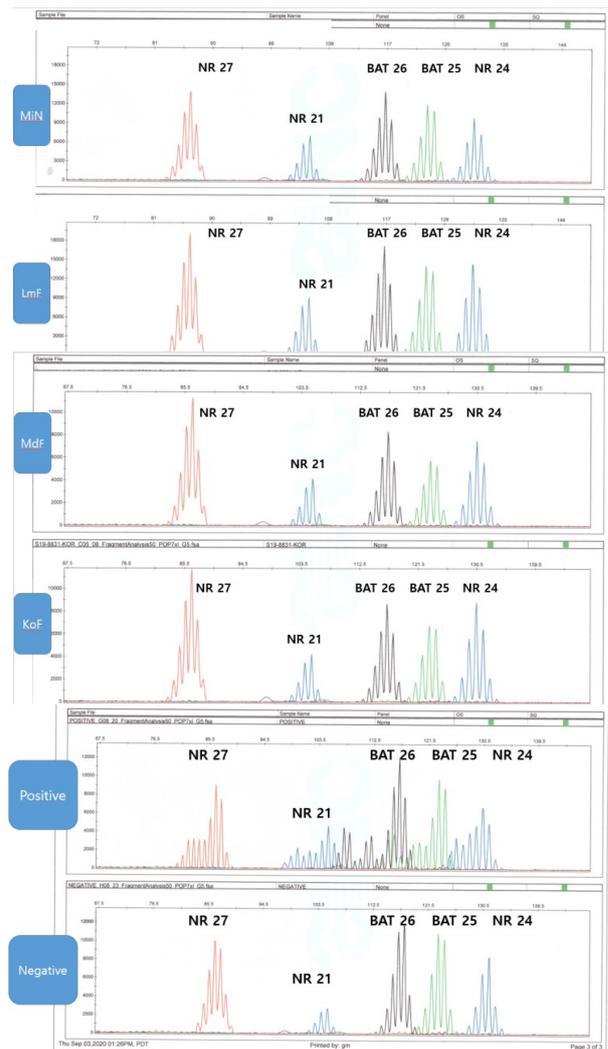


Fig. 4. Gene scan results of microsatellite instability (MSI) tests for pentaplex panel markers. Similar peak height was obtained in isolated DNAs by FFPE with various formalin fixatives. All samples showed similar with positive sample, however different with negative sample in NR 21 marker. MiN, Mirax Co. 10% neutral buffered formalin; MdF, Md force formaldehyde; LmF, laboratory-made formalin; KoF, Korea CFC chemical Co. formalin; positive control; negative control.

고 찰

병리조직검사 과정의 첫 번째 단계인 고정 과정에 사용할 수 있는 여러 고정액들이 있지만, 그 중 포르말린이 가장 널리 사용되고 있으며 외과 병리, 면역, 분자 검사 등에 두루 사용되는 가장 보편적인 고정액이다(Han, 2017). 이러한 포르말린 중 일반적으로 사용되는 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin) 고정액은 조직의 형태 유

지와 효율적인 교잡 반응에 가장 적합하다고 알려져 있으며, 고정 후 제작된 파라핀 블록은 핵산과 단백질을 안정화된 상태로 장기간 보존하기 적합하다고 알려져 있다 (Bramwell et al., 1988; Turashvili et al., 2012).

포르말린의 주성분인 포르말데하이드는 조직 단백질과 메틸렌 다리(methylene bridge)를 형성하며 글루타르알데히드가 조직과 형성하는 교차결합보다는 다소 약한 결합을 보인다. 이유는 포르말데하이드는 아주 작은 분자로 조직 내 교차결합을 형성하는 부분과 교차결합을 형성하지 않는 부분이 존재하며 교차결합을 형성하더라도 다소 가역성(reversible)을 띄어 고정 후 세척과정 등으로 탈고정(unfixed) 될 수 있다. 이와 같이 포르말린은 다소 약한 고정효과를 가지므로 조직학적 그리고 면역세포화학적 연구에 널리 이용되고 있으며, 특히, 핵산(nucleic acid)의 고정에 효과적이라고 알려져 있다(Spector and Goldman, 2005; Sengüven et al., 2014).

근래에 그 적용 범위가 확대되고 있는 병리학적 분자진단(molecular diagnostics)은 인류의 건강, 식품, 환경 등의 분야에서 매우 중요한 분야이며 DNA와 RNA 같은 핵산들(nucleic acids)은 다양한 분자 진단의 주요 표적이 되어 왔다.

포르말린 고정 파라핀 포매 조직(FFPE) 시료는 중개 임상 연구와 분자 체외 진단 등에서 유용한 검체로 사용하고 있으며, 분자 진단 및 임상 연구에 가장 널리 사용되는 시료이다. 포르말린 고정 후 제작된 파라핀 블록을 이용한 분자병리검사는 본 연구에서 진행한 PCR 및 현미부수체 불안정성(MSI) 검사 뿐만 아니라 최근에는 진단 결과, 치료, 예후까지 예측이 가능한 동반 진단 및 차세대 염기서열분석(NGS)까지 다양한 검사법으로 발전되고 있다(Lee, 2019; Newton et al., 2020; Norouzi et al., 2021; DiGuardo et al., 2021; Fujii et al., 2022).

검사실에서 적절한 비율로 직접 제조하는 포르말린은 그 경제성이나 병리 결과의 유용성은 있을 수 있으나, 유독한 물질에 대한 과도한 노출로 인해 검사자의 인체에 미치는 영향이 큰 만큼 제조되어 시판되는 포르말린 사용이 적극적으로 권장되고 있다. 이러한 시대적 흐름에 맞추어 검사실에서 직접 제조하여 사용하는 포르말린(LmF)을 비롯해서 현재 시판되는 3개 회사의 포르말린(MiN, MdF, KoF)으로 병리학적인 분자 검사에서의 효용성 확인을 위한 연구를 진행하였다.

결과를 종합해 보면, 직접 제조하는 포르말린을 비롯해서 3종류의 시판되는 포르말린에서 병리조직학적 염색성

은 큰 차이가 없었으며, 병리분자검사서 중요한 포르말린으로 고정된 조직에서 추출한 DNA의 농도와 순도도 유사하게 확인되었다. 그러나 dsDNA 총량과 dsDNA의 평균 길이를 나타내는 tape station 결과의 일부에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 실험실에서 직접 제조한 포르말린에 비해 시판되는 포르말린들을 사용하였을 때 분자 진단을 위해 추출하는 DNA의 상태에서 커다란 차이가 없음을 확인하였다. 그리고 실제적인 분자진단 검사를 대변하는 특정 유전자에 대한 PCR과 현미부수체 불안정성(MSI) 검사에서 각각의 포르말린들로 고정한 시료의 파라핀 블록 절편에서 추출한 DNA를 사용한 경우 유사한 결과를 보였다.

결론적으로 다양한 포르말린 고정액을 사용한 각각의 시료들에 대한 조직학적인 H&E 관찰에서 일반 염색 정도의 차이는 없었으며, 분자 진단에서의 PCR과 현미부수체 불안정성(MSI) 검사에서도 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 고정액에 따라 편도(tonsil) 조직에서 추출된 DNA의 총량과 길이에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다. 일반적인 인체 장기 시료에서 포르말린 고정액의 종류에 따른 조직학적 검사와 분자병리검사에서의 유의한 차이는 확인할 수 없었지만, 소량의 시료를 이용한 정교한 분자진단 검사에서는 최상의 DNA를 추출할 수 있는 최적화된 포르말린 고정액과 추출 방법에 대한 연구들이 요구된다. 이러한 결과들을 뒷받침하기 위해 FFPE에서 추출한 DNA를 이용하여 real-time PCR과 같은 정량적인 검사도 필요할 것으로 생각된다. 향후 다양한 FFPE 조직 시료들을 이용한 추가적인 분자진단 연구를 통해 조직학적 검사와 분자병리진단 검사에 가장 효과적인 포르말린 고정액을 선택하고 고정 방법을 개선할 필요성이 있다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was financially supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education (NRF-2020R1F-1A1071918).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Bass BP, Engel KB, Greytak R, Moore HM. A review of pre-analytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue: How well do you know your FFPE specimen. *Arch Pathol Lab Med.* 2014. 138: 1520-1530.
- Bauer S, Pauli J, Pelisek J. Optimized high quality DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded human atherosclerotic lesions. *J Vis Exp.* 2021. 12: (168).
- Bilbao-Sieyro C, Ramírez R, Rodríguez-González G, et al. Microsatellite instability and ploidy status define three categories with distinctive prognostic impact in endometrioid endometrial cancer. *Oncotarget.* 2014. 5: 6206-6217.
- Bramwell NH, Burns BF. The effects of fixative type and fixation time on the quality of extractable DNA for hybridization studies on lymphoid tissue. *Exp Hematol.* 1988. 16: 730-732.
- DiGuardo MA, Davila JI, Jackson RA, et al. RNA-seq reveals differences in expressed tumor mutation burden in colorectal and endometrial cancers with and without defective DNA-mismatch repair. *J Mol Diagn.* 2021. 23: 555-564.
- Fujii T, Takeda M, Uchiyama T, et al. Identification of fusion transcripts in sarcoma from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues: A next-generation sequencing approach. *Pathol Int.* 2022. 72: 444-456.
- Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One.* 2010. 5: e9393.
- Groelz D, Viertler C, Pabst D, Dettmann N, Zatlouk K. Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. *PLoS One.* 2018. 13: e0203608.
- Han JH. The pathological diagnosis and interpretation of pathological results: Emphasis on immunohistochemical staining. *Korean J Med.* 2017. 9: 36-40.
- Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy Today.* 2000. 1: 8-12.
- Kim SS, Park IS. Microsatellite instability analysis on epithelial ovarian tumor. *J Gynecol Oncol.* 2006. 17: 302-309.
- Kocjan BJ, Hošnjak L, Poljak M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens. *J Clin Virol.* 2016. 2: 76 Suppl 1: S88-S97.
- Lee DH. Next-generation diagnostics with CRISPR, Sherlock Holmes, *News Inform Chem Engineers.* 2019. 37: 440-447.
- Lee KY. Morphological study of the mouse inner ear. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* 2011. 54: 445-453.
- Ludyga N, Grunwald B, Azimzadeh O, Englert S, Hofler H, Tapio S, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch.* 2012. 460: 131-140.
- McDonough SJ, Bhagwate A, Sun Z, Wang C, Zschunke M, Gorman JA, et al. Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. *PLoS One.* 2019. 14: e0211400.
- Norouzi M, Shafiei M, Abdollahi Z, Miar P, Galehdari H, Emami MH, et al. WRN germline mutation is the likely inherited etiology of various cancer types in one Iranian family. *Front Oncol.* 2021. 11: 648649.
- Newton Y, Sedgewick AJ, Cisneros L, et al. Large scale, robust, and accurate whole transcriptome profiling from clinical formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Sci Rep.* 2020. 10: 17597.
- Panchal NK, Bhale A, Chowdary R, Verma VK, Beevi SS. PCR Amplifiable DNA from breast disease FFPE section for mutational analysis. *J Biomol Tech.* 2020. 31: 1-6.
- Peter B, Juliane W, Martin LB, Markus K, Bettina M, Vanessa D, et al. Impact of routinely employed procedures for tissue processing on the proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue Special issue: Focus on animal models for translation proteomics. 2014. 8: 796-804.
- Qin Y, Jiang W, Li A, et al. The combination of paraformaldehyde and glutaraldehyde is a potential fixative for mitochondria. *Biomolecules.* 2021. 11: 711.
- 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: 494-499.
- Sood AK, Holmes R, Hendrix MJC, Buller RE. Application of the national cancer institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001. 61: 4371-4374.
- Spector DL, Goldman RD. Basic methods in microscopy. *Protocols and concepts from cells: A laboratory manual.* 2005. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Karen L, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology.* 2002. 123: 1804-1811.

Turashvili G, Yang W, McKinney S, et al. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol.* 2012. 92: 33-43.

Zeng F, Yang W, Huang J, Chen Y, Chen Y. Determination of the lowest concentrations of aldehyde fixatives for completely fixing various cellular structures by real-time imaging and quantification. *Histochem Cell Biol.* 2013. 139: 735-749.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.4.298>

Cite this article as: Jee W, Bae M, Yoon H, Kang I, Koo M, Lee J, Jun JH. Comparative Efficacy of Various Formalin Fixatives for Molecular Diagnosis in Pathological Tissues. *Biomedical Science Letters.* 2022. 28: 298-306.