

Kvaliteta molekule RNA izolirane iz uzoraka tkiva karcinoma mokraćnog mjehura uklopljenih u parafinske blokove

Županić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:658973>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Katarina Županić

**KVALITETA MOLEKULE RNA IZOLIRANE IZ
UZORAKA TKIVA KARCINOMA MOKRAĆNOG
MJEHURA UKLOPLJENIH U PARAFINSKE BLOKOVE**

Završni rad

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Katarina Županić

**KVALITETA MOLEKULE RNA IZOLIRANE IZ
UZORAKA TKIVA KARCINOMA MOKRAĆNOG
MJEHURA UKLOPLJENIH U PARAFINSKE BLOKOVE**

**QUALITY OF RNA MOLECULE ISOLATED FROM
BLADDER CARCINOMA SAMPLES EMBEDDED IN
PARAFFIN BLOCKS**

Završni rad / Bachelor's Thesis

Mentor :
izv.prof.dr.sc.Vedrana Čikeš Čulić

Split, 2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Mokraćni mjehur	1
1.1.1. Građa mokraćnog mjehura	1
1.1.2. Karcinomi mokraćnog mjehura	1
1.1.3. Tipovi karcinoma	2
1.1.4. Simptomi i dijagnostika	3
1.1.5. Uzorci karcinoma	4
1.2. FFPE uzorci	4
2. CILJ RADA	6
2.1. Hipoteza istraživanja kvalitete RNA molekule	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Ispitanici i metode	7
3.2. Postupak izolacije RNA iz parafinskih blokova	7
3.3. Spektrofotometrijski test – NanoDrop	9
3.3.1. Omjeri apsorbancija	10
3.3.2. Kontaminacije	11
3.3.3. Promjene u spektralnom profilu	12
3.3.4. Ostale kontaminacije	12
4. REZULTATI	16
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČCI	28
7. LITERATURA	29
8. SAŽETAK	31
9. SUMMARY	32
10. ŽIVOTOPIS	33

Zahvala

Najiskrenije zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Vedrani Čikeš Čulić, koja mi je otvorila vrata svog laboratorija te svojim savjetima, iskustvom i potporom omogućila izradu ovoga završnog rada.

1. UVOD

1.1. Mokraćni mjehur

Mokraćni mjehur je šuplji organ u donjem dijelu abdomena. Oblika je malenog balona i ima mišićnu stjenku koja mu dopušta proširenje ovisno o količini urina koju skladišti. U bubrezima se filtrira i pročišćava krv. Oni uklanjaju štetne produkte i proizvode mokraću (urin). Urin zatim mokraćovodima dolazi u mjehur, a iz mjehura izlazi preko mokraćne cijevi (uretre) (1).

1.1.1. Građa mokraćnog mjehura

Presjek stijenke mokraćnog mjehura pokazuje histološku građu od četiri sloja. Unutrašnji sloj je epitelni pokrov u obliku prijelaznog epitela ili urotela ispod kojeg se nalazi submukozna (lamina muskularis) koju čini sloj rahlog vezivno-mišićnog tkiva.

Najdeblji dio stijenke mokraćnog mjehura je lamina muskularis proprija, tj. mišićni sloj mjehura kojeg s vanjske strane prekriva serozni sloj (adventicija). Ovakva podjela se koristi za stupnjevanje bolesti oboljelih od tumora mokraćnog mjehura i to u dijagnostičke, terapijske i prognostičke svrhe (2) (3).

1.1.2. Karcinomi mokraćnog mjehura

Karcinom mokraćnog mjehura je deveti najčešći oblik maligniteta i trinaesti najčešći uzrok smrti od raka širom svijeta (4).

Klinički je karakteriziran progresijom, ponavljanjem, metastazama i rezistencijom na lijekove. Zbog životnog zahtjeva za praćenjem recidiva tumora, tipični trošak liječenja karcinoma mokraćnog mjehura od dijagnoze do smrtnosti je najviši među svim vrstama raka. Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura je 3-4 puta veća kod muškaraca nego kod žena. Životni stil i okolišni čimbenici, kao dim cigareta i

industrijske kemikalije, mogu biti odgovorni za rodnu razliku u stupnju i smrtnosti kod tumora mokraćnog mjehura (5).

1.1.3. Tipovi karcinoma

Tri su vrste karcinoma mokraćnog mjehura koji započinju u stanicama u podlozi mjehura. Nazivaju se po vrstama stanica koje postaju maligne.

Karcinom prijelaznog epitela je karcinom koji počinje u stanicama u najdubljim slojevima tkiva mokraćnog mjehura. Te se stanice mogu rastezati kada je mjehur pun i sužavati kada je ispražnjen. Većina karcinoma započinje u stanicama prijelaznog epitela.

Karcinom stanica prijelaznog epitela može biti niskog ili visokog stupnja. Karcinom prijelaznog epitela niskog stupnja se često vraća nakon liječenja, ali rijetko se širi u mišićni sloj mjehura ili na druge dijelove tijela. Karcinom prijelaznog epitela visokog stupnja se često vraća nakon liječenja i često se širi u mišićni sloj mjehura, na druge dijelove tijela i u limfne čvorove. Skoro sve smrti uzrokovane karcinomom mokraćnog mjehura potiču od karcinoma visokog stupnja bolesti.

Karcinom pločastih stanica je karcinom koji počinje u pločastim stanicama, koje su tanke, ravne stanice koje mogu nastati u mjehuru nakon dugotranje infekcije ili iritacije.

Adenokarcinom je karcinom koji počinje u žljezdanim stanicama koje se nalaze u podlozi mjehura. Ovo je vrlo rijedak oblik karcinoma mokraćnog mjehura.

Karcinom koji je u podlozi mjehura naziva se površinski karcinom mokraćnog mjehura. Karcinom koji se je proširio kroz podlogu mjehura i napao mišićnu stijenku mjehura ili se proširio na obližnje organe i limfne čvorove naziva se invazivni karcinom mokraćnog mjehura (1).

1.1.4. Simptomi i dijagnostika

U 90% pacijenata karcinom mokraćnog mjehura se očituje bezbolnom hematurijom, mikroskopskom ili makroskopskom. Javlja se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili kao simptom urinarne infekcije. Znakovi lokalnog širenja tumora su hidronefroza, opstipacija, limfedem te palpabilna masa u maloj zdjelici. Urotelni karcinom najčešće metastazira u trbušne limfne čvorove, jetru, pluća i u kosti (6).

Testovi koji ispituju urin i mokraćni mjehur koriste se u detekciji i dijagnozi karcinoma mokraćnog mjehura.

- Fizički pregled i anamneza: pacijent se pregledava tjelesno za opće znakove zdravlja, uključujući provjeru znakova bolesti, kao što su kvržice ili bilo što što izgleda neuobičajeno. Uzima se pacijentova povijest bolesti i dosadašnjih tretmana te se ispituju zdravstvene navike.
- Unutarnji pregled vagine i rektuma za kvržice.
- Analiza urina: ispituje se boja i sadržaj urina – šećeri, proteini, eritrociti, leukociti.
- Citologija urina: laboratorijski test prilikom kojeg se uzorak urina pregledava pod mikroskopom na abnormalne stanice.
- Cistoskopija: postupak gledanja unutar mokraćnog mjehura i uretre radi provjere abnormalnih područja. Cistoskop se umetne kroz uretru u mjehur. Cistoskop je tanki instrument, nalik cijevi, koji sadrži svjetlo i objektiv za promatranje. Mokraćni mjehur se napuni tekućinom, a liječnik preko kamere na cistoskopu promatra unutarnju stjenku mokraćnog mjehura na monitoru. Cistoskop može sadržavati i alat za uzimanje uzorka, koji se zatim pregledavaju pod mikroskopom na znakove karcinoma.
- Intravenozna pijelografija (IVP): serija rendgenskih slika bubrega, uretre i mokraćnog mjehura da bi se na njima mogli potražiti znakovi karcinoma. Kontrastna boja se ubrizgava u venu. Pomicanjem boje kroz organe uz pomoć x-zraka pregledavaju se organi za prisutnost karcinoma.
- Biopsija: postupak uzimanja uzorka tkiva ili stanica da bi ih patolog pregledao pod mikroskopom. Biopsija mokraćnog mjehura se obično radi tijekom cistoskopije. Ponekad je moguće i ukloniti cijeli tumor tijekom procedure (1).

1.1.5. Uzorci karcinoma

Uzorke karcinoma dobivene biopsijom proučavaju patolozi. Uzorci su značajni za dijagnostiku samog tumora, ali i za određivanje terapije i prognozu tijeka bolesti. Jedan od načina obrade uzorka je i njegovo uklapanje u parafinske blokove (7).

1.2. FFPE uzorci

Uzorci tkiva dobiveni biopsijom, fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafinske blokove već su desetljećima temelj za istraživanje i terapijske aplikacije. Tako pripremljeni i sačuvani uzorci značajni su u ispitivanjima i eksperimentalnim istraživanjima, razvoju lijekova te samoj dijagnostici i prognozi bolesti (7).

Patološke arhive sadrže velike količine FFPE uzoraka, sakupljenih prilikom rutinskih biopsija i obdukcija, i među njima vrijedne uzorke iz slučajeva rijetkih bolesti ili iznimne patogeneze. Za razliku od eksperimentalnih studija na životinjama, koje se zasnivaju na svježim smrznutim uzorcima, istraživanja koja se baziraju na ljudskim tkivima ovise o FFPE uzorcima (8).

Tkiva se prikupljaju od preminulih i živih donora. Onkolozi često uzimaju dva ili više uzorka istog pacijenta. Takvi uzorci im služe za usporedbu primarnog tumora s kasnijim metastatskim tumorom (7).

Proces započinje biopsijom. Nakon što je uzorak zaprimljen prvo se radi fiksacija u formalinu, da bi se sačuvale proteinske i vitalne strukture tkiva. Fiksiranje u 10%-tnom formalinu u trajanju od 18-24 h služi učvršćivanju samog tkiva, kao priprema za sljedeće korake. Tkivo se zatim mora dehidrirati i očistiti uz pomoć različitih koncentracija etanola. Sljedeći korak je uklapanje u parafinske blokove. Takva struktura omogućava lakše rezanje potrebnih dimenzija za daljnje ispitivanje. Parafinski blokovi mogu se čuvati godinama. Po potrebi, za istraživanja, rade se rezovi. Tanki rezovi na mikrotomu – 3-4 mikrometra, postavljeni na mikroskopska stakalca, spremni su za daljnja proučavanja i metode. Rezovi parafinskih blokova mogu se koristiti i za izolaciju DNA, RNA. Stoga FFPE uzorci predstavljaju ključan dio onkoloških istraživanja (7).

Studije biomarkera karcinoma često iziskuju izolaciju nukleinske kiseline iz ograničenih količina FFPE uzorka tkiva. Izazov je niska količina i kvaliteta izolirane nukleinske kiseline, što može uzrokovati probleme za korištenje iste u daljnim analizama (9).

FFPE uzorci tumorskih tkiva trebali bi imati minimalan sadržaj tumora od 60% (7).

2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja jest procijeniti kvalitetu RNA molekule izolirane iz uzoraka tkiva karcinoma mokraćnih mjehura uklopljenih u parafinske blokove. Pritom će se za izolaciju koristiti GenElute FFPE RNA Purification kit.

2.1. Hipoteza istraživanja kvalitete RNA molekule

Očekuje se da će uporaba ovog kita optimizirati količinu i kvalitetu izolirane molekule. Provjera će se vršiti spektrofotometrijskim testom na NanoDropu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i metode

Za ovo istraživanje korišteni su uzorci pacijenata koji su bili podvrgnuti transuretralnoj resekciji tumora mokraćnog mjehura (TURBT) u Općoj bolnici Šibenik. Nakon patološke obrade uzoraka, parafinski blokovi dani su na korištenje u svrhu ovog istraživanja.

3.2. Postupak izolacije RNA iz parafinskih blokova

Izolacija RNA izvršila se korištenjem Sigma's GenElute FFPE RNA Purification kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). On pruža brzu metodu izolacije i pročišćavanja RNA iz formalinom fiksiranih i u parafin uklopljenih uzoraka tkiva.

RNA-ze su stabilni i robusni enzimi koji degradiraju RNA. Prije samog početka rada ključno je osigurati okoliš slobodan od RNA-za. Radno mjesto mora biti udaljeno od mikrobiološke radne jedinice. Optimalno je raditi u digestoru. Radnu površinu treba očistiti s dekontaminacijskim otopinama bez RNA-za. Prilikom rukovanja s uzorcima, reagensima, pipetama, otopinama, obavezno treba nositi rukavice. Svi materijali za izolaciju trebaju biti pripremljeni isključivo za RNA. Sve mjere opreza su u svrhu sprječavanja kontaminacije, posebno u zadnjim koracima, posljednjem ispiranju i eluciji.

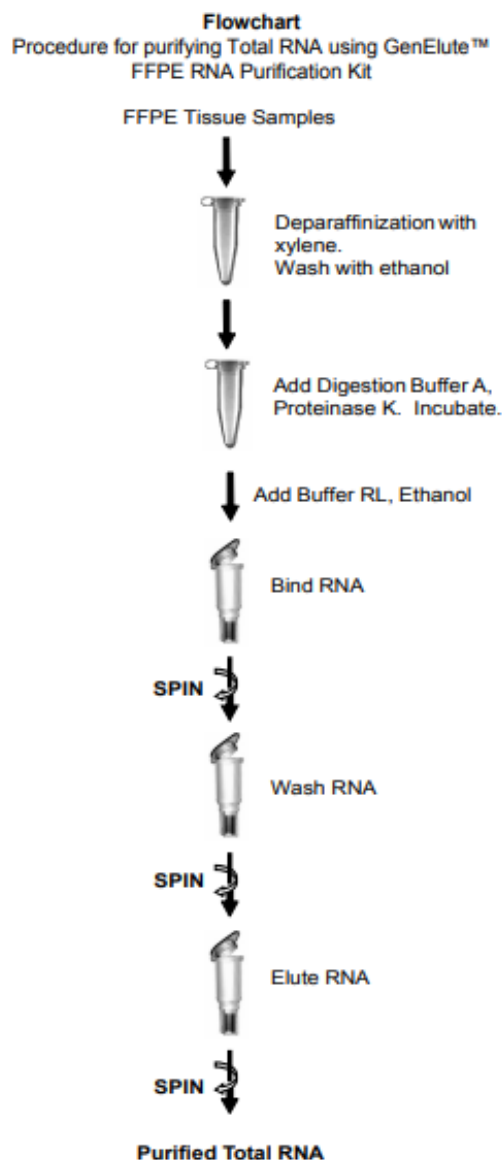
Pročišćavanje se temelji na spin kromatografiji koristeći smolu kao matriks za razdvajanje. RNA je optimalno pročišćena od ostalih staničnih komponenata bez upotrebe fenola ili kloroforma.

Iz parafinskih blokova sa uzorcima tkiva karcinoma mokraćnog mjehura na mikrotomu se odrežu 20 µm tanki rezovi. Ukloni se višak parafina.

- Prvi korak je deparafinizacija FFPE uzoraka kroz seriju ispiranja ksilenom i etanolom. Uzorku se doda ksilen, promiješa na vorteksu, slijedi inkubacija u termobloku na 50 stupnjeva pet minuta i zatim centrifugiranje. Ukloni se višak ksilena i doda se 96-100% etanol. Nakon vorteksiranja, slijedi centrifugiranje, a

zatim se uklanja i višak etanola. Postupak se ponovi još jednom te se uzorak u tubici suši na sobnoj temperaturi desetak minuta.

- Slijedi priprema lizata. Uzorku se dodaje Digestion Buffer A i Proteinaza K. Promiješa se na vortkesu i inkubira na 55 stupnjeva 15 minuta, nakon čega slijedi druga inkubacija na 80 stupnjeva 15 minuta. Dodaju se Buffer RL i etanol. Sve se miješa na vorteksu.
- Dobivena otopina – lizat, pipetira se na kolonu. Smola veže nukleinske kiseline na temelju ionske koncentracije, što znači da će se samo RNA vezati na kolonu, dok će drugi kontaminanti biti uklonjeni kroz kolonu ili se zadržati na vrhu. Lizat koji se pipetirao prolazi niz centrifugiranja dok cijeli volumen nije prošao kroz kolonu.
- U ovom trenutku ostatni tragovi DNA mogu se ukloniti dodatnim korakom uklanjanja DNA na koloni.
- DNA-za otopina se pripravi dodavanjem 4 μ L RNA-za free DNA-ze u 96 μ L Enzyme Incubation Buffer A (za svaki uzorak).
- Za uklanjanje DNA prvo se radi ispiranje s Wash Solution A, a zatim se dodaje pripremljena DNA-za otopina. Sadržaj koji je prošao kroz kolonu ovog puta se vraća na nju – to maksimizira aktivnost DNA-za otopine. Inkubira se na sobnoj temperaturi 15 minuta.
- Ispiranje kolone 3 puta s Wash Solution A uklanja sve nečistoće sa vezane RNA na koloni. Iza svakog ispiranja slijedi centrifugiranje, a sadržaj koji je prošao kroz kolonu se odbacuje.
- Kao posljedni korak izolacije RNA se eluira. Kolona se stavlja u novu 1.7 ml elucijsku tubicu. Dodaje se Elution Solution A i inkubira na sobnoj temperaturi 1 minutu. Nakon centrifugiranja, kada je cijeli volumen prošao kroz kolonu, ona se odbacuje i RNA je u tubici za eluiranje (10).



Slika 1. Postupak izolacije RNA (Preuzeto sa stranice <https://www.sigmaaldrich.com>)

3.3. Spektrofotometrijski test – NanoDrop

U molekularnoj biologiji kvantitativno određivanje nukleinskih kiselina obično se provodi kako bi se odredile prosječne koncentracije DNA ili RNA prisutne u smjesi, kao i njihove čistoće. Reakcije koje koriste nukleinske kiseline često zahtijevaju određene količine i čistoću za optimalnu učinkovitost. Do danas postoje dva glavna pristupa koji znanstvenici koriste za određivanje ili utvrđivanje koncentracije

nukleinskih kiselina u otopini. To su spektrofotometrijska kvantifikacija i označavanje fluorescencije u prisutnosti DNA boja.

Spektrofotometrijska analiza je jedan od najčešće korištenih postupaka za kvantificiranje nukleinskih kiselina. Spektrofotometar određuje prosječnu koncentraciju DNA ili RNA u smjesi, kao i njihovu čistoću. Spektrofotometrijska analiza se temelji na principu da nukleinske kiseline apsorbiraju ultraljubičasto svjetlo u određenom uzorku. U slučaju DNA i RNA uzorak je izložen UV svjetlu na valnoj duljini od 260 nanometara (nm), a fotodetektor mjeri svjetlo koje prolazi kroz uzorak. Nešto UV svjetla će proći kroz uzorak, a nešto će biti apsorbirano od DNA/RNA. Što uzorak apsorbira više svjetla, to znači da je veća koncentracija nukleinske kiseline u samom uzorku. Posljedica toga je da će manje svjetlosti pogoditi fotodetektor što će rezultirati višom optičkom gustoćom (11).

Neprekidno se razvijaju biomolekularna ispitivanja koja koriste sve manje količine materijala, često isključujući upotrebu konvencionalnih instrumenata s kivetama za kvantifikaciju nukleinskih kiselina. Konvencionalni instrumenti zamjenjuju se novijima, modernijima, koji mogu izvesti mikrovolumenska mjerenja (12).

NanoDrop mikrovolumenski sustav za zadržavanje uzorka (Thermo Scientific NanoDrop Products) funkcionira kombinirajući tehnologiju optičkih vlakana sa svojstima prirodne površinske napetosti da bi uhvatio i zadržao male količine uzorka bez upotrebe kiveta ili kapilara. Nadalje, sustav koristi kraće duljine puta, što dovodi do širokog raspona mjerenja koncentracije nukleinskih kiselina, što u osnovi eliminira potrebu za razrjeđenjima. Smanjenje volumena potrebnog za spektroskopsku analizu također olakšava uključanje dodatnih koraka kontrole kvalitete (12).

3.3.1. Omjeri apsorbancija

Čistoća uzoraka za ovo istraživanje mjerila se spektrofotometrijskom metodom na NanoDrop instrumentu (Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, Delaware). Iz jedne kapljice, u kratkom vremenu (desetak sekunda), dobiva se očitavanje parametara uzorka – koncentracija u ng/μl, apsorbancija pri 260 i 280nm te omjeri A260/A280 i A260/A230.

Nukleinske kiseline i proteini imaju maksimum apsorbancije na 260 i 280 nm. Povijesno gledano, omjer apsorbancije na ovim valnim duljinama korišten je kao mjera čistoće prilikom ekstrakcije nukleinskih kiselina i proteina. Omjer od 1.8 prihvaćen je za DNA, a 2.0 za RNA. Slično tome, apsorbancija na 230 nm koristi se kao mjera ostalih onečišćenja. Omjeri 260/230 za nukleinske kiseline su veći od omjera 260/280. Očekivane vrijednosti su u rasponu od 2.0-2.2. Zaostala kemijska onečišćenja od postupka izolacije nukleinske kiseline mogu rezultirati pogrešnom procjenom koncentracije nukleinske kiseline i/ili negativnim nizvodnim aplikacijama (13).

Apsorbancija na 230 nm je pokazatelj ostale kontaminacije. Zbog toga se često izračunava i omjer A_{260}/A_{230} . Vrijednosti su više nego kod omjera A_{260}/A_{280} . Očekivane vrijednosti su u rasponu od 2.0.-2.2 (13).

3.3.2. Kontaminacije

Nakon mjerenja svakog uzorka treba provjeriti sljedeće parametre: omjer A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280} . U oba slučaja mali omjeri mogu biti posljedica kontaminacije zagađivačem koji apsorbira svjetlo na 230 ili 280 nm.

Omjer 260/230 : Neki kontaminanti imaju karakterističan profil, npr. fenol, dok neki imaju slične karakteristike pri valnoj duljini od 230 nm ili manje. Abnormalne vrijednosti ukazuju na problem sa uzorkom ili sa postupkom izolacije.

Niski omjer A_{260}/A_{230} može biti rezultat ostatnog fenola, gvanidina ili glikogena korištenog za precipitaciju.

Visoki omjer A_{260}/A_{230} može se dogoditi zbog prljavog postolja za mjerenje ili neprimjerene otopine za kalibracijsko mjerenje. Kalibracijska otopina mora biti istog pH i slične ionske jakosti kao i otopina uzorka.

Omjer A_{260}/A_{280} : Abnormalan omjer ovih valnih duljina obično je indikacija da je uzorak kontaminiran proteinom, fenolom, ili da se dogodila greška prilikom mjerenja. Niski omjer A_{260}/A_{280} može biti uzrokovan ostatnim fenolom ili bilo kojim drugim reagensom korištenim tijekom izolacije.

Visoki omjer A_{260}/A_{280} nije indikacija greške (13).

3.3.3. Promjene u spektralnom profilu

Ispitivanje spektara uzoraka može biti korisno za identificiranje postojanja problema s čistoćom uzorka.

Valna duljina kanala u spektru uzorka bi trebala biti na 230 nm. Apsorbancija kontaminanata na niskoj valnoj duljini će obično pomicati valnu duljinu od kanala.

Valna duljina vrha u spektru uzorka bi trebala biti na 260 nm. Apsorbancija kontaminanta može pomaknuti valnu duljinu apsorpcije vrha. (Slika 1.) (13).

Shifts in Spectral Profile

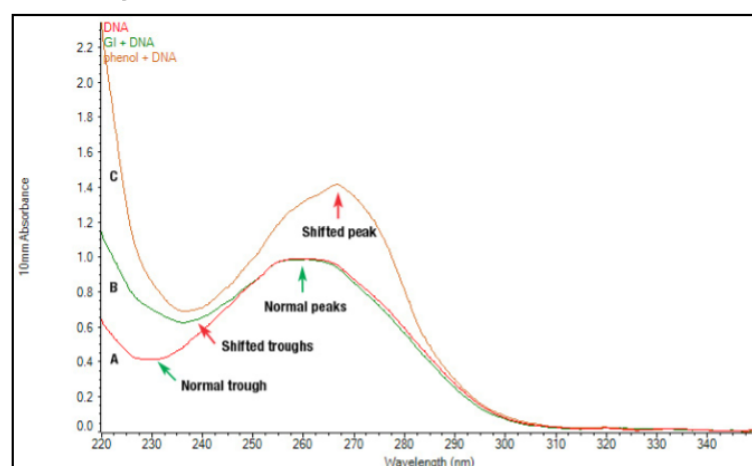


Figure 2: Spectra of purified DNA without contamination (A), and of the same DNA sample contaminated with guanidine (B) and phenol (C)

Slika 2. Promjene u spektralnom profilu (Preuzeto sa stranice <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/oww-files-public/d/d7/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>)

3.3.4. Ostale kontaminacije

Među problemima koji se mogu javiti u postupku izolacije RNA ističu se slab oporavak RNA, začepljena kolona, degradirana RNA te da se izolirana RNA ne ponaša

dobro u daljnim korištenjima. Za svaki od problema, poznat je mogući uzrok i ponuđeno rješenje (Prikazano u Tablici 1).

Tablica 1. Problemi i rješenja tijekom postupka izolacije RNA(Preuzeto sa stranice stranice <https://www.sigmaaldrich.com>)

Problem	Mogući uzrok	Rješenje i objašnjenje
Slab oporavak RNA	Nekompletna liza stanica ili tkiva	Treba koristiti odgovarajuću količinu Digestion Buffer A i Proteinaze K. Povećanje vremena inkubacije također pomaže.
	Začepljena kolona	Ne smiju se prekoračiti dozvoljene količine materijala
	Korištenje neke druge otopine za eluiranje	Preporuča se korištenje Elution Solution A koji dolazi u ovom kitu.
	Etanol ili Buffer RL nisu dodani lizatu	Pripaziti na točnost propisanih količina ovih reagensa prije no što se lizat veže na kolonu
	Etanol nije dodan u Wash Solution A	Treba dodati etanol u Wash Solution A prije upotrebe
	Nizak sadržaj RNA u korištenom tkivu ili stanicama	Različita tkiva i stanice imaju različit sadržaj RNA, tako će i dobivene vrijednosti RNA varirati između ovih izvora
Začepljena kolona	Nedovoljno otapanje stanica ili tkiva	Treba dodati propisanu količinu Digestion Buffer A
	Maksimalni broj stanica ili količina tkiva nadilazi specifikacije kita	Pregledati specifikacije da bi se utvrdilo da li količina početnog materijala upada u intervale
	Nije korišten odobreni lizat za korak vezivanja na kolonu	Treba osigurati dobro centrifugiranje uzorka i u narednim koracima koristiti samo dobro pročišćeni lizat

	Mala temperatura centrifuge	Osigurati da je centrifuga na sobnoj temperaturi tijekom izvođenja procesa. Temperature ispod 15 °C mogu uzrokovati stvaranje precipitata koji posljedično uzrokuju začepljenje kolone
Degradirana RNA	Stari FFPE uzorak	Kvaliteta pročišćene RNA može značajno opasti kod starih uzoraka
	Kontaminacija RNA-zama	Tijekom rada može doći do kontaminacije, zbog toga treba poštovati i pridržavati se pravila o radu s RNA molekulom
	Sporo izveden postupak	Da bi se očuvao integritet RNA postupak se mora izvoditi brzo.
	Neprikladno pohranjivanje pročišćene RNA	Kratkoročno, RNA se može čuvati na -20 °C nekoliko dana. Za dugotrajnu pohranu, preporuča se čuvanje na -70 °C
	Prolongirana inkubacija na 80 °C	Da bi se formalinske unakrsne veze preokrenule potrebna je inkubacija na 80 °C . Prelaženje zadanog vremenskog okvira od 15 minuta će povećati RNA fragmentaciju
RNA se ne ponaša dobro u daljnjim aplikacijama	RNA nije isprana 3 puta sa Wash Solution A	Tragovi soli iz koraka vezivanja mogu ostati u uzorku ako se kolona ne ispere 3 puta sa Wash Soution A. Sol može interferirati u daljnom primjeni RNA kroz neke druge analize
	Prijenos etanola	Prije eluiranja treba se osigurati da su se uklonili svi tragovi etanola tako da se provede suhi spin pod postupkom

		pranja kolone. Etanol interferira u daljnim analizama u kojima se koristi izolirana RNA
	Formalinske unakrsne veze se nisu kompletno preokrenule	Treba osigurati dovoljnu inkubaciju na 80°C i ne prijeći 15 minuta da ne bi povećali fragmentaciju RNA

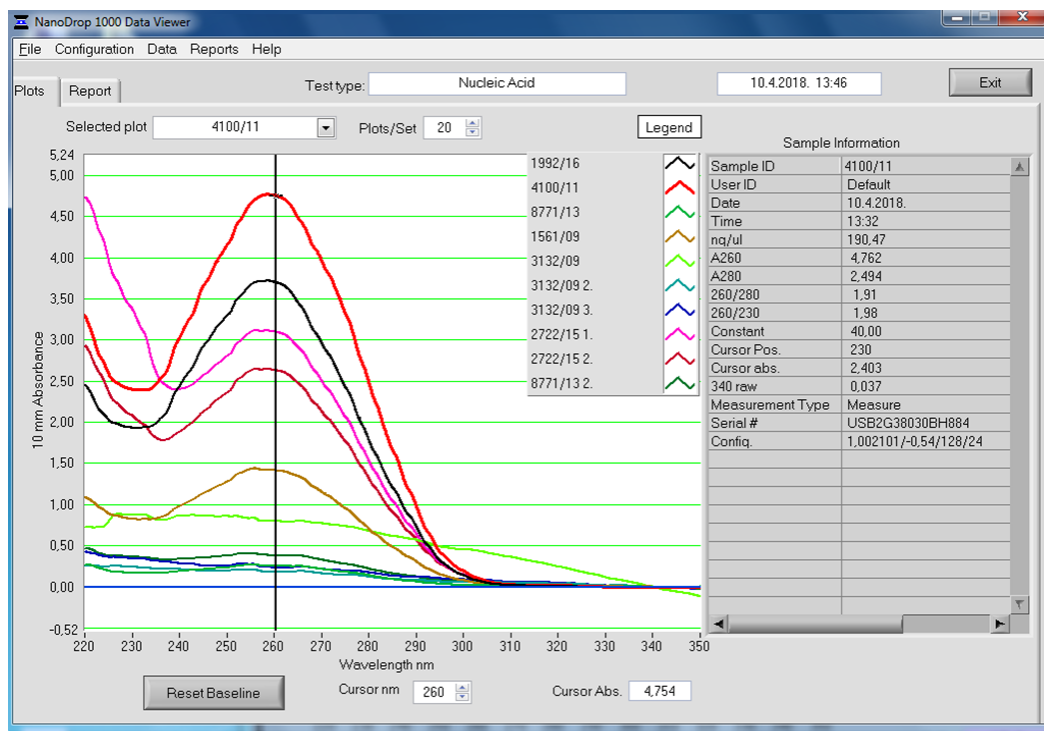
4. REZULTATI

Od ukupno 36 obrađenih uzoraka 22 su recidiva i 14 ne-recidiva. Koncentracija uzoraka varirala je od 2,3 pa sve do 1153,3 ng/μL. Omjer apsorbancija A260/280, koji nam ukazuje na čistoću izolirane RNA, kod većine uzoraka je zadovoljavao referentnu vrijednost uz minimalno prihvatljivo odstupanje. (1,81 – 2,06). Četiri uzorka* nisu zadovoljila kriterije. Preniske koncentracije RNA onemogućuju njihovo korištenje u daljnjim aplikacijama. Također, i omjeri apsorbancija tih uzoraka ne ulaze u referentni interval, što se vidi i na krivuljama tih uzoraka. (Tablica 2; Slika 2- Slika 13).

Tablica 2. Rezultati istraživanja kvalitete izolirane RNA molekule

UZORAK	DATUM IZOLACIJE	KONCENTRACIJA RNA ng/μL	A260/A280
1992/16	10.04.2018.	148,2	2,06
2722/15		I 124,1; II 105,4	2,01; 1,99
Recidiv			
8771/13	10.04.2018.	I 10,2; II 15,3	1,81; 1,74
3132/09		I 31,9; II 7,3; III 9,4	1,18 *
Recidiv			
4100/11	10.04.2018.	190,5	1,91
1561/09		56,6	2,0
Recidiv			
2632/12	11.04.2018.	346,4	1,99
ne-recidiv			
1470/15	11.04.2018.	398,7	2,02
ne-recidiv			
2153/15		387,2	2,01
ne-recidiv			
1652/11	11.04.2018.	1153,3	2,01
ne-recidiv			
2585/13		320,0	2,01

ne-recidiv			
4199/15 ne-recidiv	11.04.2018.	216,2	2,03
1325/09 1686/10 Recidiv	12.04.2018.	281,1 2,3	1,97 4,34 *
4094/13 4525/15 Recidiv	12.04.2018.	473,3 23,1	1,99 1,87
2574/11 4113/15 Recidiv	12.04.2018.	25,9 397,5	1,94 2,00
4493/14 4709/15 Recidiv	25.04.2018.	13,2 45,9	1,65* 1,84
87/12 2262/13 Recidiv	25.04.2018.	32,9 28,9	1,98 1,86
2230/14 451/12 Recidiv	25.04.2018.	199,9 475,0	1,96 1,96
991/13 ne-recidiv	26.04.2018.	714,1	1,92
468/12 ne-recidiv	26.04.2018.	686,7	1,99
1929/11 ne-recidiv	26.04.2018.	511,4	1,95
1981/11 ne-recidiv	26.04.2018.	297,3	1,93
1070/15 ne-recidiv	26.04.2018.	536,4	2,00
3853/15	26.04.2018.	176,0	1,95



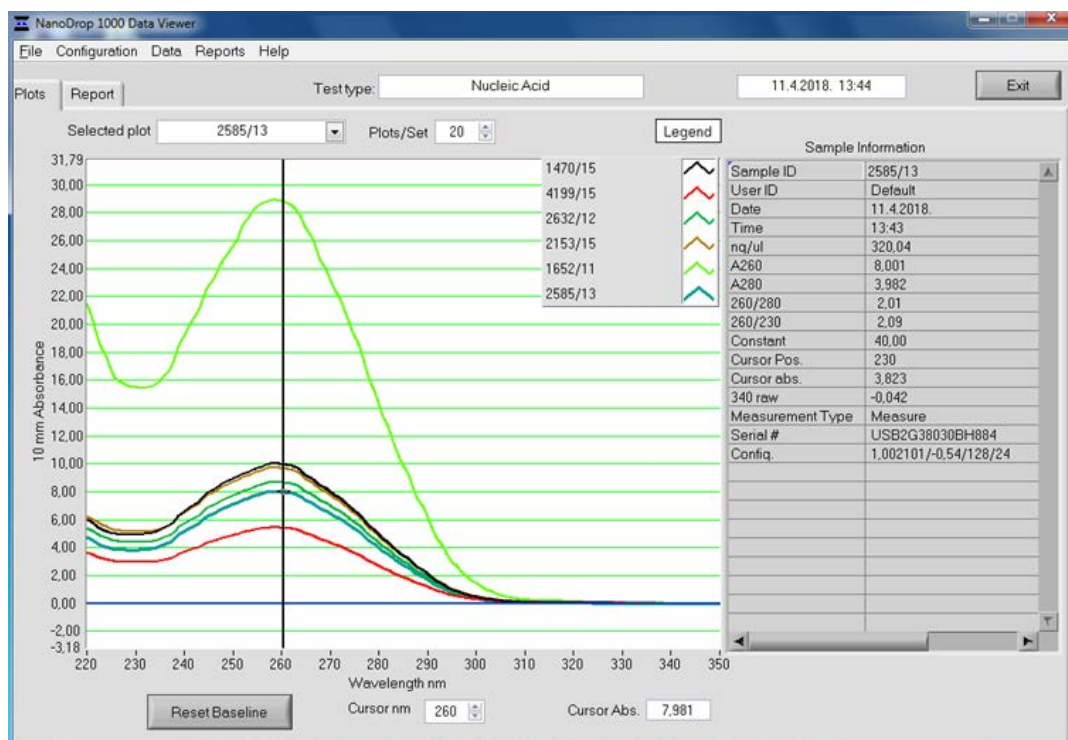
Slika 4. Krivulje rezultata 10.04.

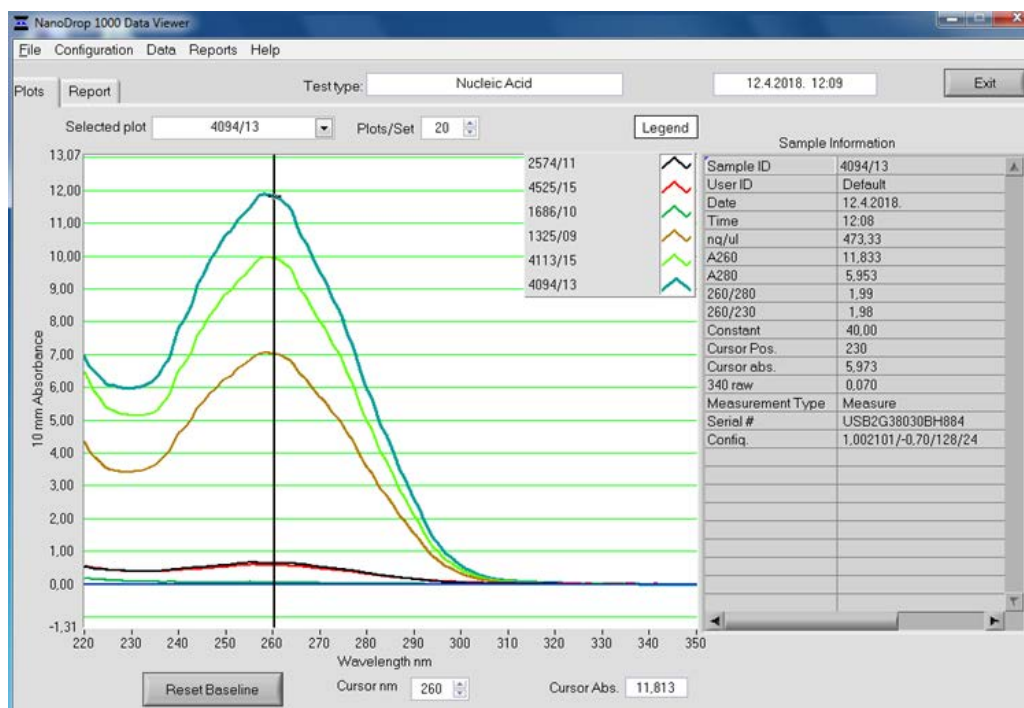
Plots Report Test type: Nucleic Acid 11.4.2018. 13:44 Exit

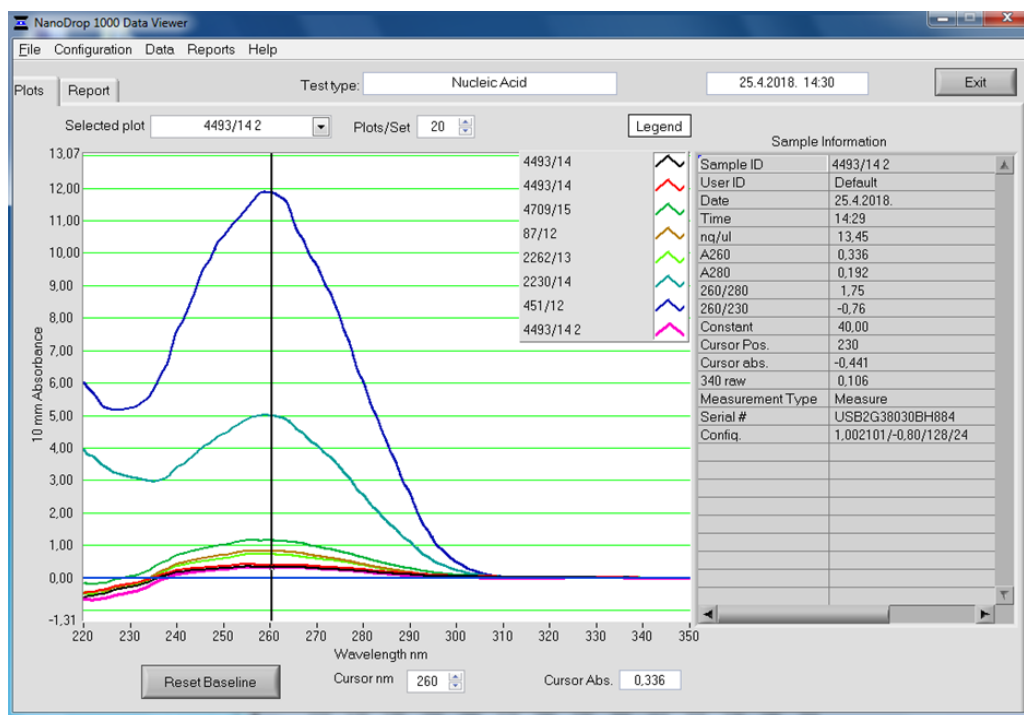
Report Name: Report Full Mode: Ignore

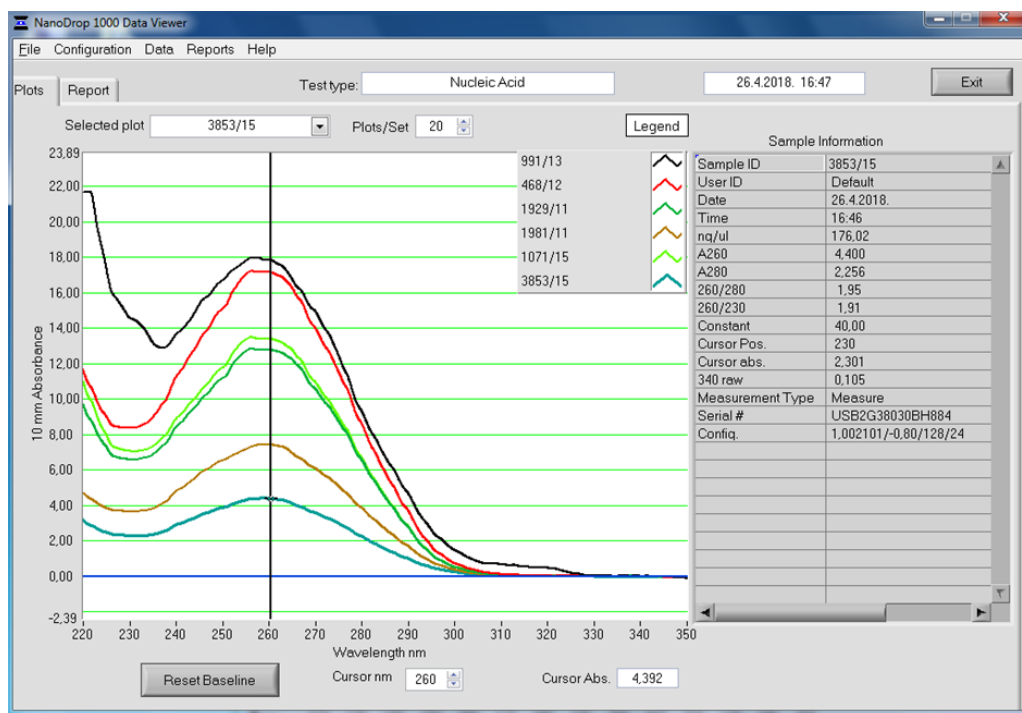
Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
1470/15	Default	11.4.2018.	13:38	398.73	9.968	4.933	2.02	2.03	40.00	230	4.906	0.189
4199/15	Default	11.4.2018.	13:39	216.17	5.404	2.666	2.03	1.84	40.00	230	2.941	0.289
2632/12	Default	11.4.2018.	13:40	346.44	8.661	4.341	1.99	1.98	40.00	230	4.365	0.117
2153/15	Default	11.4.2018.	13:41	387.15	9.679	4.820	2.01	1.89	40.00	230	5.121	0.241
1652/11	Default	11.4.2018.	13:42	1153.26	28.832	14.328	2.01	1.86	40.00	230	15.485	0.468
2585/13	Default	11.4.2018.	13:43	320.04	8.001	3.982	2.01	2.09	40.00	230	3.823	-0.042

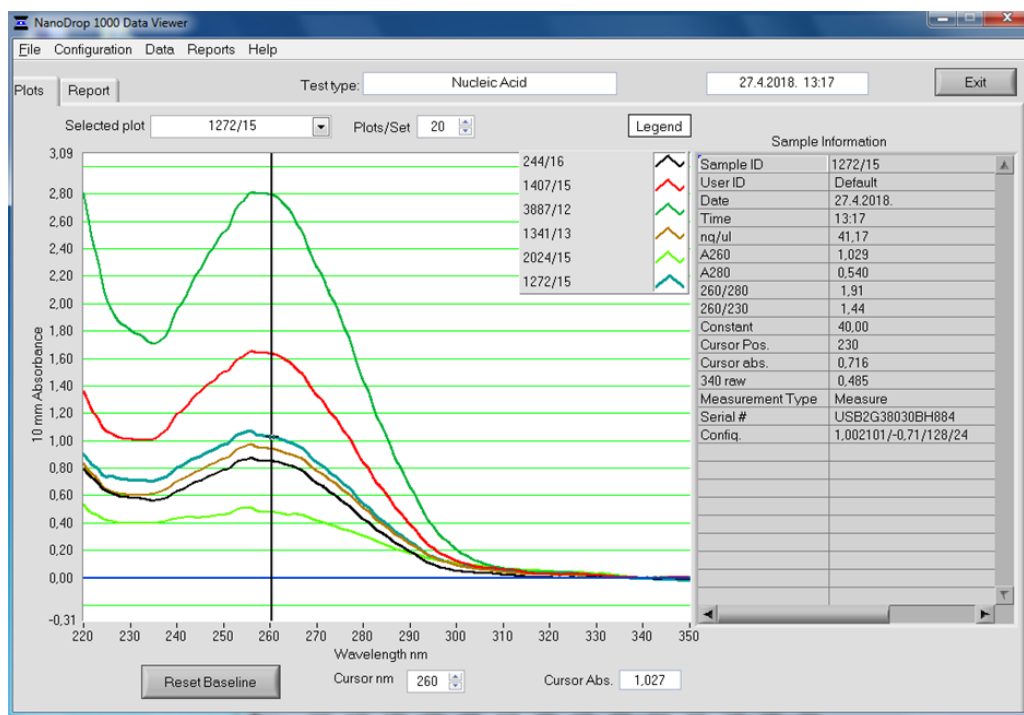
Slika 5. Rezultati izolacije 11.04.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]



Slika 14. Krivulje rezultata 27.04.

5. RASPRAVA

U ovom trenutku, bolnički bazirani patološki laboratoriji i biobanke najbolji su izvori biouzoraka povezanih s robusnim i relevantnim kliničkim i patološkim informacijama, što omogućuje retrospektivnu analizu genotipsko-fenotipske povezanosti. Sposobnost očuvanja morfološke i molekularne informacije unutar tih biouzoraka omogućuje upotrebu histopatoloških kriterija, kao što su patološki stupanj, stadij, i histološki podtipovi, kao bazu za daljnja istraživanja biomarkera (9).

Mogućnost korištenja arhiviranih FFPE uzoraka tkiva u otkrivanju biomarkera pridonijela je važnosti u otkrivanju potencijala ovog resursa. Međutim, arhivirana FFPE tkiva predstavljaju mnoge tehničke izazove u molekularnoj analizi. Fiksacija formalinom dovodi do umrežavanja nukleinskih kiselina s proteinima i drugim staničnim sastojcima, što otežava ekstrakciju tih analita (9).

Osim toga, promjene povezane s vremenom i pH mogu dovesti do oksidacije formalina u mravlju kiselinu, što uzrokuje pročišćavanje baze i lomljenje lanaca. Tako su nukleinske kiseline dobivene iz FFPE tkiva tipično fragmentirane, a njihova učinkovitost kao supstrata za enzimske analize, kao što je lančana reakcija polimeraze (PCR) i sekvenciranje, nepouzdana (9).

Nadalje, upotreba nukleinskih kiselina iz FFPE tkiva također se može ograničiti onečišćenjem s inhibitorima nizvodnih PCR aplikacija.

Uspostavljanje pouzdane i reproducibilne metode dobivanja dovoljnih količina visokokvalitetnih nukleinskih kiselina iz ograničenih količina FFPE tkiva ostaje glavni izazov u mnogim studijama biomarkera. Trenutno je dostupno nekoliko komercijalnih kompleta za ekstrakciju RNA i DNA iz FFPE tkiva. Dok proces kontrole kvalitete pojedinog proizvođača osigurava dosljednu izvedbu u danim eksperimentalnim uvjetima, svaki od ovih setova ima različite karakteristike u pogledu količine i čistoće RNA (9).

Većina kitova za izolaciju RNA iz FFPE tkiva uključuje korak digestije s proteinazom K tijekom lize tkiva, jer se to pokazalo neizbježno za dobivanje RNA iz FFPE tkiva. Općenito, zabilježeno je dugo vrijeme inkubacije za poboljšanje prinosa i kvalitete RNA. Vrh nakon uobičajene faze platoa RNA elektroferograma je indikacija na rezidualne, umrežene nukleinske kiseline.

U slučaju istraživanja provedenog u Decentralnom objektu Instituta za biomedicinsko istraživanje (Medical University of Vienna), korištenjem tkiva s biopsije, koje je optimalno fiksirano (samo 24 sata) produžetak vremena lize od 3 (prema prijedlozima proizvođača) na 10 sati, smanjio je količinu molekula velike molekularne težine, koje predstavljaju navodno umrežene nukleinske kiseline; međutim, nije imao učinaka (ni povoljnih ni štetnih) na parametre kvalitete RNA i funkcionalne primjenjivosti. Ipak, u slučaju tkiva FFPE kao početnog materijala, za koje protokoli fiksacije često nisu standardizirani, povećanje vremena liziranja tkiva moglo bi pozitivno utjecati na parametre performansi. Iako se nije u potpunosti isključilo da produljenje vremena lize može povećati fragmentaciju RNA, potonje nije izgledalo kao značajan čimbenik u njihovim eksperimentima kao što je naznačeno stabilnim parametrima kvalitete RNA u njihovim podacima (8).

Istraživanje provedeno u Kanadi, objavljeno 2017, testiralo je pouzdanost i izvedbu dostupnih komercijalnih setova za izolaciju RNA i DNA iz FFPE tkiva jezgre (9).

Uspoređivali su izvedbu 8 RNA i 8 DNA protokola izolacije (iz 14 komercijalnih kitova) koristeći 0.68 mm³ homogeniziranog tkiva. Za svaki komplet slijedili su se protokoli proizvođača. Općenito, postupak ekstrakcije uključivao je rehidraciju homogeniziranog tkiva, nakon koje slijedi digestija proteazom, vezanje na kruti supstrat, pranje i eluiranje, s varijacijama specifičnim za svaki set / protokol.

Za svaku ekstrakciju, prinosi DNA i RNA kvantificirani su na Qubit 3.0 Fluorometru (ThermoFisher Scientific), koristeći komplet za dsDNA HS (High Sensitivity) i RNA BR (BroadRange). Čistoća izoliranih nukleinskih kiselina procijenjena je omjerom apsorbancije A260/280 i A260/230 dobivenim pomoću NanoDrop spektrofotometra.

Spektrofotometrijskom procjenom, svi RNA kompleti za izolaciju dali su omjere A260/280 blizu 2,0, što je u skladu s "čistim" uzorcima. Nasuprot tome, osim RNeasy kompleta, svi RNA izolacijski setovi proizveli su omjere A260/230 koji su pokazali značajne nečistoće.

Dobiveni rezultati njihovog istraživanja daju potrebne mjerne podatke koji će voditi odabir protokola koji najbolje odgovara potrebama cjelokupnog dizajna studije s obzirom na količinu raspoloživog tkiva i očekivanih nizvodnih aplikacija. Sveukupno,

AllPrep protokol reproducibilno donosi velike količine odgovarajuće RNA i DNA iz istog izvora tkiva. Dok nečistoće nukleinskih kiselina izoliranih primjenom AllPrep kompleta utječu na metode bazirane na PCR-u pri visokoj koncentraciji, taj učinak je zanemariv kod razrjeđenja tipičnih za predložke u testovima temeljenim na PCR-u. Uzeto zajedno, AllPrep kit bio je njihov preferirani postupak pripreme nukleinskih kiselina za nizvodne epigenetske i genske ekspresijske studije (9).

GenElute FFPE RNA Purification Kit osigurava uvjete koji omogućuju djelomično preokretanje formalinskih modifikacija, što rezultira visokom kvalitetom i prinosom RNA.

Ukupna izolirana RNA je najviše kvalitete i cjelovitosti, a može se koristiti u svim osjetljivim nizvodnim aplikacijama.

Komplet je u stanju pročistiti sve veličine RNA, od velike mRNA i ribosomalne RNA do mikroRNA (miRNA) i male interferirajuće RNA (siRNA), ovisno o starosti FFPE tkiva, budući da će se stupanj fragmentacije RNA povećati tijekom vremena.

Nema fenol - kloroformne ekstrakcije. Ukupna RNA se izolira iz uzoraka tkiva FFPE bez uporabe štetnih kemikalija kao što su fenol ili kloroform.

RNA izolirana ovim kompletom može se primjenjivati u sljedećim aplikacijama:

- Bioanalizator
- Kvantitativni, real-time RT-PCR za veliku RNA i malu RNA uključujući miRNA
- Northern blotting
- Zaštita RNase
- Ispitivanja polja izražavanja
- Next generation sekvenciranje
- mikroRNA kloniranje
- miRNA testovi
- RNA-Seq
- Nanostring
- Fluidigm
- Kapljični / digitalni PCR (10).

6. ZAKLJUČCI

1. Sigma's GenElute FFPE RNA Purification komplet pruža mogućnost jednostavne izolacije RNA koristeći brzi format spin-kolone za izolaciju RNA.
2. Korištenje ovog kompleta za izolaciju reproducibilno donosi velike koncentracije izolirane RNA, koja se može koristiti u daljnim aplikacijama.
3. Dobiveni omjeri A260/A280 s minimalnim odstupanjima zadovoljavaju zahtjeve za čistoćom RNA molekule.
4. Sama metoda za izolaciju je pokazala dobre rezultate, ali ti rezultati ovise i o kvaliteti samog uzorka te njegovoj obradi prije izolacije.

7. LITERATURA

1. Anon. National Cancer Institute, Bladder Cancer Symptoms, Tests, Prognosis, and Stages (PDQ®)–Patient Version (Internet) (Citirano: 15.06.2018.) Dostupno na: <https://www.cancer.gov/types/bladder/patient/about-bladder-cancer-pdq>
2. Wein JA, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell-Walsh Urology. Saunders, 2007; (9)
3. Sobin LH, Wittekind C. UICC: TNM Classification of Malignant Tumors. Wiley, 2002; (6)
4. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon PA, Resnick JM, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology and Outcomes. Eur Urol. 2015; 69 (2): 300-331
5. Chen J, Cui Y, Li P, Liu L, Li C, Zu X. Expression of androgen receptor in bladder cancer. Molecular and clinical oncology. 2017; (7): 919-927.
6. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori mokraćnog sustava. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2013; 146-149.
7. Anon. BioChain, The Versatility and Necessity of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue (Internet) (Citirano:16.06.2018.) Dostupno na : <https://www.biochain.com/general/what-is-ffpe-tissue/>
8. Wimmer I, Troscher AR, Brunner F, Rubino SJ, Bien CG, Weiner HL, et al. Systematic evaluation of RNA quality, microarray data reliability and pathway analysis in fresh, fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. Nature: Scientific Reports, 2018; 8
9. Patel PG, Selvarajah S, Guerard K-P, Bartlett JMS, Laiponte J, Berman DM, et al. Reliability and performance of commercial RNA and DNA extraction kits for FFPE tissue cores. PLoS ONE, 2017; 12(6)
10. Sigma Aldrich, GenElute FFPE RNA Purification kit (Internet) (Citirano 16.06.2018) Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/rnb400?lang=en®ion=HR>
11. Anon. Nucleic acid quantitation, Wikipedia (Internet) (Citirano 17.06.2018.) Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleic_acid_quantitation

12. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. J.Vis.Exp, 2010; (45)
13. Brian Matlock. Thermo Fischer Scientific, Technical Bulletin: Assessment of Nucleic Acid Purity (Internet) (Citirano 18.06.2018.) Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/search/results?query=Assessment%20of%20nucleic%20acid%20purity&focusarea=Search%20All>

8. SAŽETAK

CILJ: FFPE uzorci su vrijedan izvor za istraživanje biomarkera karcinoma. Takve studije traže izolaciju nukleinske kiseline iz ograničenih količina uzoraka tkiva. Cilj ovog istraživanja jest procijeniti kvalitetu RNA molekule izolirane iz uzoraka tkiva karcinoma mokraćnog mjehura uklopljenih u parafinske blokove korištenjem GenElute FFPE RNA Purification kita (Sigma Aldrich).

METODE: Koristili su se uzorci pacijenata koji su bili podvrgnuti transuretalnoj resekciji tumora mokraćnog mjehura i čiji su uzorci nakon patološke obrade uklopljeni u parafinske blokove. RNA se izolirala pomoću prije spomenutog kompleta, pridržavajući se uputa proizvođača. Šest je koraka u postupku izolacije: 1. Deparafinizacija, 2. Priprema lizata, 3. Vezanje RNA na kolonu, 4. Dodatni korak uklanjanja DNA, 5. Ispiranje kolone te završni korak 6. Eluiranje RNA. Provjera koncentracije i čistoće RNA izvršila se spektrofotometrijskim testom na NanoDropu (Thermo Scientific NanoDrop Products)

REZULTATI: Obradeno je 36 uzoraka, od kojih 4 nisu prikladna za daljnje korištenje. Ostali uzorci zadovoljavaju kriterije koncentracije i čistoće RNA. Koncentracije iznad 30 ng/μL su uzete kao prihvatljive vrijednosti. Omjeri apsorbancija A260/A280 koji ukazuju na čistoću RNA u većine uzoraka su bili prihvatljivi uz minimalna odstupanja (1,81-2,06)

ZAKLJUČCI: Korištenje Sigma's GenElute FFPE RNA Purification kompleta potvrdilo je početnu hipotezu. Ovaj komplet pruža mogućnost brze i jednostavne izolacije te donosi velike prinose i čistoću izolirane RNA.

9. SUMMARY

AIM: FFPE samples are a valuable source for cancer biomarker research. Such studies require the isolation of nucleic acid from limited amounts of tissue samples. The aim of this study is to evaluate the quality of the RNA molecule isolated from bladder tumor tissue samples incorporated in paraffin blocks using the GenElute FFPE RNA Purification Kit (Sigma Aldrich).

METHODS: We used samples of patients who had undergone transurethral resection of the bladder tumor and whose samples were incorporated into paraffin blocks, after pathological treatment. RNA was isolated using the before mentioned kit, in accordance with the manufacturer's instructions. There are six steps in the isolation process: 1. Deparaffinisation, 2. Preparation of lysate, 3. RNA binding on the column, 4. Additional step of DNA removal, 5. Washing of the column, and final step 6. Elution of RNA. Concentration and purity of RNA were checked by spectrophotometric assay at NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop Products).

RESULTS: 36 samples were processed, of which 4 are not suitable for further use. Other samples meet the concentration and purity criteria of RNA. Concentrations above 30 ng/μL were taken as acceptable values. A260 / A280 absorbance ratios that indicate the purity of RNA were acceptable in most samples, with minimal deviations (1.81-2.06).

CONCLUSIONS: The use of Sigma's GenElute FFPE RNA Purification kit confirmed the initial hypothesis. This kit provides fast and easy isolation and high concentration and purity of isolated RNA.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Katarina Županić

Datum rođenja: 22.05.1995.

Adresa: Ulica 31. broj 17. 20270 Vela Luka

Državljanstvo: Republike Hrvatske

E-mail: kejt2205@gmail.com

Obrazovanje:

- 2015-2018. Sveučilište u Splitu, Odjel zdravstvenih studija, smjer: medicinsko laboratorijska dijagnostika (preddiplomski sveučilišni studijski program)
- 2009-2013. Gimnazija Vela Luka
- 2001-2009. Osnovna škola Vela Luka

Vještine: Aktivno se služim engleskim i pasivno talijanskim i njemačkim jezikom.