

# Kontrola kvalitete RNA i mikroRNA izoliranih iz uzoraka tkiva fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin i egzosoma pacijenata s kolorektalnim karcinomom

---

Mikačević, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:842733>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Antonija Mikačević**

**Kontrola kvalitete RNA i mikroRNA izoliranih iz  
uzoraka tkiva fiksiranih formalinom i  
uklopljenih u parafin i egzosoma pacijenata s  
kolorektalnim karcinomom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Andree Huline Tomašković.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Andrei Hulini Tomašković na stručnom vodstvu, prenesenom znanju, strpljenju te brzim i konciznim odgovorima tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala Mariji Fabijanec, mag. med. biochem., na pruženoj podršci i odgovorima na sva stručna i nestručna pitanja.*

*Hvala mojoj obitelji.*

*Najviše hvala mojoj mami na neiscrpoj i bezuvjetnoj ljubavi, povjerenju, razumijevanju, pomoći i trudu u svakom trenutku.*

*Posebno hvala Zdenku na motivaciji, podršci, strpljenju i ljubavi.*

*Hvala što ste vjerovali u mene, čak i onda kad ja nisam. Bez vas sve ovo ne bi bilo moguće.*

Rad je financiran sredstvima projekta IP-2019-04-4624 Hrvatske zaklade za znanost.



**HRZZ**  
Hrvatska zaklada  
za znanost

**CRC**

**MolProfil**

*Posvećujem svojoj baki koja je usprkos dugoj i hrabroj borbi preminula od karcinoma  
debelog crijeva u 66. godini života.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. EGZOSOMI</b> .....	1
1.1.1. OPĆENITO O EGZOSOMIMA .....	1
1.1.2. BIOGENEZA EGZOSOMA .....	2
1.1.3. GRAĐA I SADRŽAJ EGZOSOMA .....	3
1.1.4. ULOGA EGZOSOMA .....	3
1.1.5. EGZOSOMI KAO NOSAČI LIJEKOVA .....	4
<b>1.2. MIKRO RNA (miRNA)</b> .....	5
1.2.1. O miRNA .....	5
1.2.2. BIOGENEZA miRNA .....	5
1.2.3. ULOGA miRNA .....	7
<b>1.3. ULOGA U PATOFIZIOLOGIJI KARCINOMA</b> .....	7
1.3.1. EGZOSOMI U KONTEKSTU KOLOREKTALNOG KARCINOMA .....	7
1.3.2. MiRNA U KONTEKSTU KOLOREKTALNOG KARCINOMA .....	9
<b>1.4. TKIVA FIKSIRANA FORMALINOM I UKLOPLJENA U PARAFIN (FFPE, engl. <i>FORMALIN-FIXED PARAFFIN-EMBEDDED</i>)</b> .....	9
1.4.1. O FFPE TKIVIMA .....	9
1.4.2. DOBIVANJE FFPE TKIVA .....	10
1.4.3. PREDNOSTI FFPE TKIVA .....	11
1.4.4. NEDOSTACI FFPE TKIVA .....	12
1.4.5. IZOLACIJA RNA I miRNA IZ FFPE UZORAKA TKIVA .....	13
<b>1.5. KONCENTRACIJA I KVALITETA IZOLIRANIH MOLEKULA RNA</b> .....	14
1.5.1. PARAMETRI KVALITETE .....	14
1.5.2. DENOVIK DS-11 .....	17
1.5.3. AGILENT 2100 BIOANALYZER .....	17
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	21

<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	22
<b>3.1. UZORKOVANJE</b> .....	22
3.1.1. UZORCI FFPE TKIVA .....	22
3.1.2. UZORKOVANJE KRVI I PRIPREMA PLAZME ZA IZOLACIJU EGZOSOMA .....	22
<b>3.2. IZOLACIJA</b> .....	23
3.2.1. POSTUPAK IZOLACIJE RNA .....	23
3.2.2. IZOLACIJA RNA IZ UZORAKA FFPE TKIVA .....	23
3.2.3. IZOLACIJA miRNA IZ UZORAKA FFPE TKIVA.....	26
3.2.4. IZOLACIJA EGZOSOMA IZ PLAZME .....	29
3.2.5. IZOLACIJA miRNA IZ EGZOSOMA.....	30
<b>3.3. ANALIZA</b> .....	32
3.3.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RNA.....	32
3.3.2. ANALIZA MOLEKULA RNA IZOLIRANIH IZ UZORAKA FFPE TKIVA .....	32
3.3.3. ANALIZA MOLEKULA miRNA IZOLIRANIH IZ UZORAKA FFPE TKIVA I EGZOSOMA .....	36
<b>3.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA</b> .....	39
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	40
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	48
<b>6. POPIS KRATICA</b> .....	49
<b>7. LITERATURA</b> .....	54
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	63
<b>8.1. SAŽETAK</b> .....	63
<b>8.2. SUMMARY</b> .....	64

# 1. UVOD

## 1.1. EGZOSOMI

### 1.1.1. OPĆENITO O EGZOSOMIMA

Egzosomi su membranom omeđene izvanstanične vezikule promjera 30-150 nm, zbog čega se nazivaju i nanovezikulama (Dimik i sur., 2023). Sferičnog su oblika, no druge oblike poprimaju u slučaju raspadanja tijekom obrade uzorka, točnije sušenja (Raposo i sur., 2013). Prisutni su i u eukariota i u prokariota, a oslobađaju se iz različitih vrsta stanica i tkiva, uključujući i maligne (Dimik i sur., 2023; Shao i sur., 2015). Otpuštaju ih trombociti, leukociti i vaskularne endotelne stanice (Wei i sur., 2021). U velikim se količinama nalaze u tumorima i biološkim tekućinama poput krvi, ascitesa, limfe, urina, žuči, mlijeka i likvora (Zhu i sur., 2020; Thery i sur., 2002). U usporedbi s tek nekoliko cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC, engl. *circulating tumor cell*) u 1 mL krvi, egzosomi se u uzorcima bioloških tekućina nalaze u broju od otprilike  $10^9$ /mL (Dan i sur., 2022). U velikoj su količini prisutni i kod tumora koji u krv otpuštaju nemjerljivu količinu CTC-a (Verbanac i sur., 2021).

Prvi opis egzosoma datira iz 1983. godine kada su dvije, međusobno neovisne skupine znanstvenika, Harding i sur., te Johnstone i Pan, opisale intraluminalne vezikule koje se otpuštaju iz sazrijevajućih retikulocita sisavaca u izvanstanični prostor, a pritom se tim vezikulama s površine stanice uklanjaju transferinski receptori. Prvi put pojam „egzosom“ spominje se 1981. godine, a pripisuje se Tramsu i suradnicima koji su egzosomima smatrali sve izvanstanične vezikule koje nastaju odvajanjem od stanične površine, a koje imaju fiziološku ulogu. Godine 1987. Johnstone i suradnici počinju koristiti pojam „egzosom“, pod i danas uvriježenom definicijom, za vezikule koje se otpuštaju striktno nakon fuzije multivezikularnog tijela s plazmatskom membranom. Brojna istraživanja koja su uslijedila otkrivala su i potvrđivala ulogu egzosoma u biološkim procesima. Johnstone i suradnici 1989. godine otkrivaju enzimsku aktivnost egzosoma iz retikulocita, a Iida i suradnici 1991. godine opisuju potencijal membranskog stvaranja vezikula kao mehanizma sprječavanja lize stanice. Raposo i suradnici 1996. godine opisuju da izvanstanične vezikule koje potječu iz imunskih stanica imaju sposobnost prezentirati antigen, što otvara novo područje istraživanja usmjerena na izvanstanične vezikule kao antitumorska cjepiva i lijekove. Kasnije egzosomi postaju predmet proučavanja kao biomarkeri i kao oblik primjene lijeka (Couch i sur., 2021).

### 1.1.2. BIOGENEZA EGZOSOMA

Biogeneza egzosoma obuhvaća četiri procesa: pupanje, invaginaciju, stvaranje multivezikularnog tijela i sekreciju (Deng i sur., 2023). Uvijanjem plazmatske membrane u smjeru unutrašnjosti stanice nastaju rani endosomi (Han i sur., 2022). Sekundarnim invaginacijama ranog endosoma nastaju intraluminalne vezikule (ILVs, engl. *intraluminal vesicles*) unutar kojih su uklopljene različite biomolekule (Deng i sur., 2023; Han i sur., 2022). Takva struktura naziva se kasni endosom ili multivezikularno tijelo (MVB, engl. *multivesicular body*). MVB-ovi nadalje ulaze u interakcije s drugim staničnim dijelovima, što obuhvaća izmjenu vezikula s trans-Golgijevom mrežom i izravni kontakt s endoplazmatskim retikulumom, mitohondrijima i fagosomima. Navedene interakcije utječu na nastajanje MVB-a i sastav ILV-a unutar njih. Sazreli MVB-ovi zatim imaju dva moguća ishoda: fuzija s lizosomima koja dovodi do njihove razgradnje ili fuzija s plazmatskom membranom kojom se u izvanstanični prostor oslobađaju ILV-ovi, odnosno egzosomi (Han i sur., 2022).

Formiranje MVB-ova odvija se putevima ovisnim ili neovisnim o endosomalnim sortirajućim kompleksima zaduženima za transport (ESCRT, engl. *endosomal sorting complex required for transport*).

ESCRT se sastoji od tridesetak proteina koji su organizirani u četiri kompleksa (ESCRT-0, -I, -II i -III) i pridružene proteine (ALIX ili PDCD6IP, VTA1, ATPaza VPS4). Uloga kompleksa ESCRT-0 je prepoznavanje i izdvajanje ubikvitarnih transmembranskih proteina u endosomalnu membranu, dok su kompleksi ESCRT-I i ESCRT-II zaduženi za oblikovanje membrane u mjehurićast oblik vezikule (Han i sur., 2022). Kidanje membrane i odvajanje vezikule omogućuje ESCRT-III kompleks koji se zatim uklanja s membrane MVB-a koristeći energiju VPS4 sortirajućeg proteina (Dimik i sur., 2023; Han i sur., 2022).

ESCRT-neovisni putevi omogućuju formiranje MVB-ova u slučajevima kad su proteini ESCRT-kompleksa i njihova funkcija inaktivirani. Pritom je za raspodjelu proteina potreban tetraspanin klaster diferencijacije (CD, engl. *cluster of differentiation*) 3 koji se nakuplja u ILV-ovima. Neutralna sfingomijelinaza (nSMase, engl. *neutral sphingomyelinase*) i fosfolipaza D2, dva enzima metabolizma lipida, omogućuju stvaranje ILV-a (Colombo i sur. 2014). Enzim nSMase katalizira hidrolizu sfingomijelina u ceramid koji se nakuplja u strukture nalik lipidnim otočićima, a oni se zatim povezuju s membranom i potiču proces pupanja membrane te nastanak ILV-ova (Dimik i sur., 2023; Colombo i sur., 2014).

Fosfolipaza D2, koja katalizira reakciju hidrolize fosfatidilkolina u fosfatidnu kiselinu, također stvara lipide u membrani MVB-a, što omogućuje uvijanje membrane prema



unutrašnjosti te stvaranje ILV-a (Colombo i sur., 2014). U procese raspodjele i ubacivanje sadržaja u egzosome te nastanak egzosoma uključeni su i tetraspanini.

### 1.1.3. GRAĐA I SADRŽAJ EGZOSOMA

Biološke molekule koje se fiziološki pakiraju u egzosome i koje će se osloboditi u drugu, udaljenu stanicu, ovise o mikrookolišu ishodišne stanice i podražajima poput hipoksije i stresa (Wei i sur., 2021). Strukturu egzosoma čine brojne lipidne komponente, kao što su fosfaditilserin, fosfatidna kiselina, kolesterol, sfingomijelin, prostaglandini, leukotrieni, arahidonska kiselina i druge masne kiseline, koji omogućuju stabilnost i rigidnost egzosoma. Dvoslojna fosfolipidna membrana egzosoma građena je od lipida poput ceramida i kolesterola čija je uloga raspodjela, sekrecija i signaliziranje između ishodišne stanice i egzosoma. U membranu su uklopljeni i tetraspanini CD9, CD63, CD81 i CD82 čije su funkcije ulazak i fuzija sa ciljnom stanicom (Zhang i sur., 2019). Oni su ujedno i površinski markeri za detekciju egzosoma. Drugi površinski markeri jesu brojni Rab proteini, primjerice Rab27A/B, odgovorni za membranski transport i fuziju (Dimik i sur., 2023; Zhang i sur., 2019). U egzosomima se mogu pronaći i proteini toplinskog šoka (Hsp, engl. *heat shock proteins*) Hsp 60, Hsp70 i Hsp90 (Wei i sur., 2021). Hsp70 i Hsp90 sudjeluju u imunološkom odgovoru tijekom vezanja i predstavljanja antigena. Hsp70 je također površinski marker za detekciju egzosoma (Zhang i sur., 2019).

Unutar egzosoma može se pronaći DNA, mikro RNA (miRNA, engl. *micro RNA*), glasnička RNA (mRNA, engl. *messenger RNA*), ribosomska RNA (rRNA, engl. *ribosomal RNA*), transportna RNA (tRNA, engl. *transfer RNA*), mala nuklearna RNA (snRNA, engl. *small nuclear RNA*), mala nukleolarna RNA (snoRNA, engl. *small nucleolar RNA*), piwi-interaktivna RNA (piRNA, engl. *piwi-interacting RNA*) i nekodirajuća RNA (ncRNA, engl. *non-coding RNA*) (Dimik i sur., 2023; Zhang i sur., 2019).

### 1.1.4. ULOGA EGZOSOMA

Egzosomi, kao i druge izvanstanične vezikule, štite sadržaj koji prenose od enzimske razgradnje i degradacije te omogućuju pogled u ishodišnu stanicu čiji stanični materijal prenose (Dimik i sur., 2023; Mulcahy i sur., 2014). Egzosomi omogućuju komunikaciju između stanica interakcijom egzosomskih membranskih proteina i proteina ciljne stanice ili

internalizacijom čitavog sadržaja ciljne stanice (Akers i sur., 2013). Postoje dokazi koji upućuju na uključenost egzosoma i u fiziološkim i u patofiziološkim procesima, primjerice u komunikaciji između stanica, staničnom signaliziranju, obnovi tkiva, imunološkom odgovoru, razvoju karcinoma i metastaziranju (Verbanac i sur., 2021). Egzosomi sudjeluju i u modulaciji tumorskog mikrookoliša (Shao i sur., 2015). Pretpostavlja se da miRNA zajedno s dugom nekodirajućom RNA (lncRNA, engl. *long non-coding RNA*) i cirkularnom RNA (circRNA, engl. *circular RNA*) utječe na prijenos staničnih signala što rezultira promjenom ili održavanjem stanja lokaliziranog staničnog mikrookoliša. Brojne egzosomima prenošene miRNA, poput miRNA-214, miRNA-29a, miRNA-1, miRNA-126 i miRNA-320, sudjeluju u angiogenezi, hematopoezi, egzocitozi i nastanku tumora (Zhang i sur., 2019). Egzosomi i druge izvanstanične vezikule imaju sposobnost indukcije specifičnih fenotipskih promjena stanice primatelja uslijed promjene transkriptoma i signalnih puteva (Mulcahy i sur., 2014).

#### **1.1.5. EGZOSOMI KAO NOSAČI LIJEKOVA**

Mehanizmi kojima egzosomi ulaze u stanicu primatelja je fuzija s plazmatskom membranom te fagocitoza ili endocitoza. Egzosomi lako prolaze fiziološke barijere, uključujući i krvno-moždanu. Točan mehanizam egzosomskog prolaska krvno-moždane barijere još uvijek nije potvrđen, no neka su istraživanja pokazala da je riječ o receptorom-posredovanoj endocitozi (Deng i sur., 2023). Svojstvo slabe imunogeničnosti, slabe toksičnosti i biokompatibilnosti čini ih potencijalnim terapijskim vektorima za prijenos mRNA (Deng i sur., 2023; Kar i sur., 2023). Štoviše, upravo amfipatska građa egzosoma omogućuje transport kako hidrofилnih, tako i lipofilnih lijekova (Deng i sur., 2023). Primjena egzosoma-nosača lijekova u kliničkim istraživanjima je parenteralna, oralna, intratumorska, intranazalna i intraperitonealna.

Uspješnost puta primjene terapijskih egzosoma povezana je s vrstom karcinoma i njegovim molekularnim karakteristikama (Kar i sur., 2023). Poteškoće u primjeni egzosoma kao nosača su nespecifično djelovanje i zadržavanje slabe imunogeničnosti nakon modifikacije (Deng i sur., 2023). U kontekstu ciljane terapije kolorektalnog karcinoma (CRC, engl. *colorectal cancer*), klinička su istraživanja bila usmjerena na ispitivanje KRAS (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*) siRNA čiji je ciljni ligand iRGD peptid. Time se cilja onkogen KRAS. Istraživanja su bila usmjerena i na ispitivanje uspješnosti 5-fluorouracil anti-miRNA-21 koja poništava kemorezistenciju i povećava uspješnost antitumorske terapije (Kar i sur., 2023).

## 1.2. MIKRO RNA (miRNA)

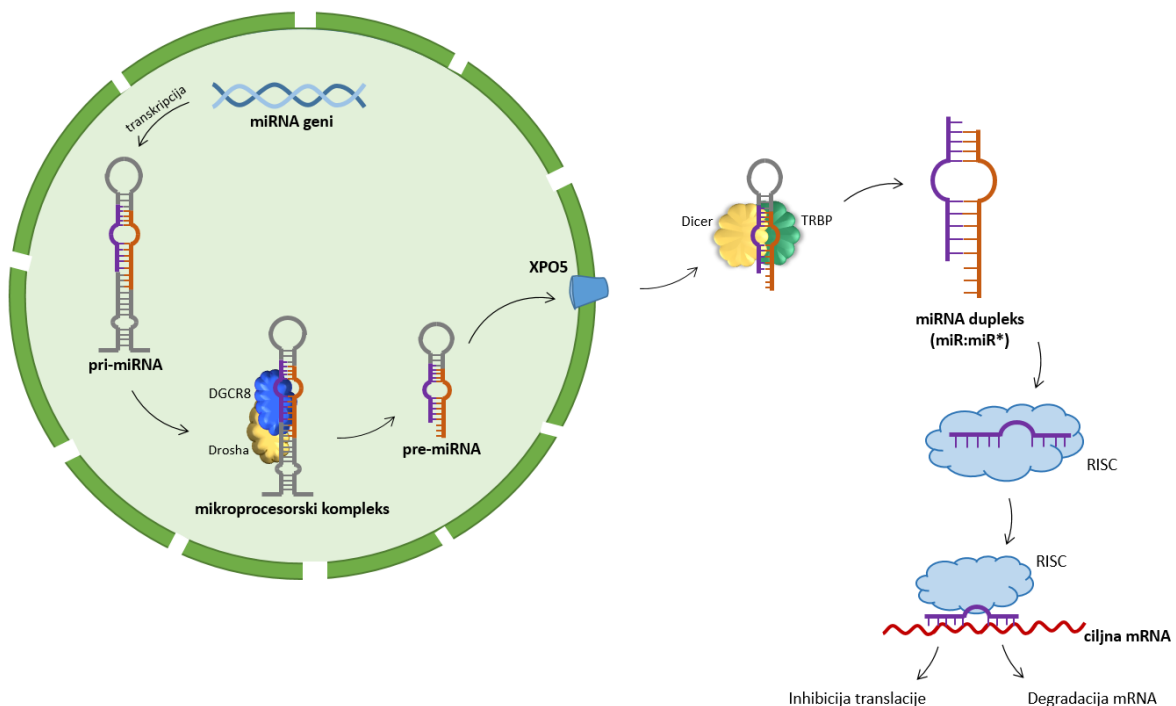
### 1.2.1. O miRNA

MiRNA je mala molekula RNA veličine 20-24 nukleotida (nt, engl. *nucleotide*) koja pripada skupini nekodirajućih RNA (ncRNA, engl. *non-coding RNA*), što znači da se molekule miRNA ne prevode u proteine (Karabulut i sur., 2024; Mohammed, 2023). Molekule miRNA kodiraju geni koji čine 1-4 % ljudskog genoma (Lotfi i sur., 2024). Prvo spominjanje miRNA pripisuje se Ambrosu i suradnicima koji su 1993. godine istražujući biološki model *C.elegans* uočili da gen *lin-4* ne kodira za protein, već uzrokuje sintezu malih RNA duljina 22 i 61 nt. Duža molekula RNA (61 nt) je prekursor kraće (22 nt) koja je *antisense* komplementarna 3'-netranslatiranoj regiji (3'UTR, engl. *three prime untranslated region*) područjima drugog gena, gena *lin-14*. Funkcija miRNA je regulacija genske ekspresije koju ostvaruju kontroliranjem stabilnosti ili aktivnosti ciljnih mRNA (Medley i sur., 2021). Imaju ključne uloge u brojnim procesima poput stanične proliferacije, apoptoze, diferencijacije i organogeneze (Tétreault i De Guire, 2013). Utvrđena je povezanost miRNA s patogenezom brojnih bolesti, uključujući karcinome, autoimune bolesti, pretilost, bubrežne bolesti, metaboličke poremećaje i virusne infekcije (Zhang i sur., 2019). Cirkulirajuće miRNA vrlo su stabilne i otporne na degradaciju zahvaljujući tome što se vežu na specifične proteine ili se nalaze unutar vezikula, primjerice egzosoma (Huang i sur., 2021). Potencijalni je klinički značaj miRNA, ponajviše u malignih oboljenja, kao dijagnostičkih biomarkera, za analizu molekularne pozadine bolesti i procjenu progresije bolesti (Zhang i sur., 2019).

### 1.2.2. BIOGENEZA miRNA

Transkripcijom miRNA gena u jezgri uz pomoć RNA polimeraze II nastaju primarne miRNA (pri-miRNA, engl. *primary miRNA*) (Mohammed, 2023). Pri-miRNA duge su nekoliko kilobaza, a sadrže jednu ili više struktura ukosnice (Lee i Shin, 2018; Li i sur., 2009). Kidanje pri-miRNA odvija se u jezgri pomoću mikroprocesorskog kompleksa kojeg čine enzim Drosha (RNaza III) i DGCR8 (protein koji veže diRNA), ali i drugi, pomoćni proteini poput DDX5, DDX17, EWSR1, Fus i heterogenih ribonukleoproteinskih kompleksnih proteina (Wu i sur., 2020). Mikroprocesorski kompleks prepoznaje strukturu ukosnice (Lee i Shin, 2018). Enzim Drosha uzrokuje kidanje 3' i 5' lanca pri-miRNA (Lee i Shin, 2018). Kidanjem pri-

miRNA nastaje prekursorska miRNA (pre-miRNA, engl. *precursor miRNA*) duga oko 80 baza, strukture dvolančane ukosnice. Pre-miRNA izlazi u citoplazmu pomoću proteina eksportina 5 (XPO5, engl. *exportin-5*) (Kim, 2017). Sljedeće kidanje odvija se pomoću enzima Dicer (RNaza III), a tomu pomaže i RNA-vezujući kofaktor TRBP (engl. *transactivation response element RNA-binding protein*) koji nije neophodan za ovaj proces, ali povećava afinitet Dicer enzima prema RNA te pojačava točnost kidanja (Fareh i sur., 2016). Dicer kida strukturu petlje i nastaje miRNA dupleks (miR:miR\*) kojeg čine dvije niti miRNA međusobno djelomično povezane sparenim bazama. Zatim se miRNA dupleks veže na argonaut protein (AGO, engl. *argonaute*) uz utrošak adenozin trifosfata (ATP, engl. *adenosine triphosphate*) (Medley i sur., 2021). Razdvajanjem dviju niti iz miRNA dupleksa, vodeće niti (miR) i niti „putnika“ (miR\*), oslobađa se zrela, slobodna molekula miRNA (prethodno imenovana kao vodeća nit) (Mohammed, 2023; Li i sur., 2009). Nit „putnik“ se odvaja s AGO, ne ostvaruje svoju funkciju i razgrađuje se. Izuzetak su miRNA-34b čiji su lanci miRNA-34b-5p i miRNA-34b-3p izmjereni u jednakim koncentracijama čime je utvrđeno da nijedan lanac u duplesku nije razdvojen i degradiran, već oba sazrijevaju, vežu se na AGO i ostvaruju svoju regulacijsku funkciju (Medley i sur., 2021). Alternativna biogeneza molekula miRNA koje se stoga specifično nazivaju „mirtroni“ temelji se na izravnom nastajanju pre-miRNA kidanjem, čime je izbjegnut mikroprocesorski kompleks (Medley i sur., 2021).



Slika 1. Biogeneza miRNA.

### **1.2.3. ULOGA miRNA**

Funkcija miRNA je regulacija brojnih procesa u organizmu i aktivnosti određenih gena (Mohammed, 2023). Prvenstveno je glavni regulator genske ekspresije (Jiang i sur., 2018). Molekule miRNA vezanjem na AGO postaju dio RNA-induciranog utišavajućeg kompleksa (RISC, engl. *RNA-induced silencing complex*). Time nastaje miRNA-inducirani utišavajući kompleks (miRISC, engl. *miRNA-induced silencing complex*) koji omogućuje zaustavljanje translacije ili potpunu degradaciju ciljne mRNA, što čini tako da se veže na komplementarna vezna mjesta unutar 3'UTR ciljnih mRNA (Lee i Shin, 2018; Jiang i sur., 2018; Li i sur., 2009). Specifičnost i usmjerenost djelovanja miRNA proizlazi iz komplementarnosti miRNA i ciljne mRNA. Štoviše, obje niti miRNA koje se nalaze u miRNA duplesu imaju potencijal postanka zreloom miRNA koja komplementarno odgovara nekoj mRNA, no samo će jedna od te dvije niti biti vezana na AGO u miRISC-u, dok će druga biti degradirana (Medley i sur., 2021).

Poremećena ekspresija miRNA posljedično dovodi do nenormalne genske ekspresije koja uzrokuje brojne patofiziološke procese. Poremećena ekspresija miRNA tako može uzrokovati nastanak karcinoma, bolesti jetre, bolesti kostiju, multiplog mijeloma, kardiovaskularnih bolesti, metaboličkog sindroma, dijabetesa i reumatoidnog artritisa. Ovisno o metama na koje djeluju, miRNA mogu djelovati kao tumor-supresori, ali i kao onkogeni (Mohammed, 2023). Procjenjuje se da miRNA reguliraju 30 % ljudskih gena, odnosno da jedna molekula miRNA regulira i veže se na dvjestotinjak ciljnih mRNA (Li i sur., 2009).

## **1.3. ULOGA U PATOFIZIOLOGIJI KARCINOMA**

### **1.3.1. EGZOSOMI U KONTEKSTU KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

Potencijal egzosoma kao izvora cirkulirajućih biomarkera proizlazi iz činjenice da oni prenose proteine, lipide i nukleinske kiseline iz ishodišnih, roditeljskih stanica.

Stanice raka različitim načinima utječu na biogenezu egzosoma te mijenjaju njihov sastav i ulogu s ciljem oslobađanja tumor-promovirajućih egzosoma (Han i sur., 2022). Egzosomi donose transkripcijske faktore, onkogene te kratke i duge nekodirajuće regulatorne RNA molekule (Wei i sur., 2021). U egzosomima pacijenata oboljelih od CRC Liu i suradnici su 2016. godine utvrdili su prisutnost CRNDE-h (engl. *colorectal neoplasia differentially*

*expressed – h*), lncRNA koja u odraslih osoba fiziološki nije prisutna ili je prisutna u vrlo niskoj koncentraciji, što ga čini potencijalnim biomarkerom. Mutirani KRAS gen uzrokuje pojačanu sekreciju egzosoma koji sadrže receptore epidermalnog faktora rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*), kinaze Src obitelji i integrine. EGFR je receptorska tirozin kinaza koja se aktivira vezanjem liganda, nakon čega slijedi dimerizacija i pokretanje unutarstaničnih signalnih puteva (uključujući i RAS/MAPK (engl. *rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase*) signalni put) koji rezultiraju staničnom proliferacijom, angiogenezom i adhezijom, što je nužno za opstanak tumorskih stanica (Janani i sur., 2022). Src kinaze imaju ključnu ulogu u patogenezi CRC. Njihova pojačana aktivnost i ekspresija potiče staničnu proliferaciju stanica raka, metastaziranje na udaljene organe, rezistenciju na kemoterapiju i stvaranje matičnih stanica raka (CSC, engl. *cancer stem cell*). Pojačana ekspresija Src kinaza ujedno je i loš prognostički pokazatelj (Jin i sur., 2020).

Integrini su transmembranski heterodimeri koji djeluju kao dvosmjerni posrednici u prijenosu signala. Sudjeluju u regulaciji adhezije, migracije, proliferacije, preživljavanja i diferencijacije stanice. Iako mehanizmi još nisu rasvijetljeni, integrinima se pripisuje ključna uloga u metastaziranju (Beaulieu, 2019). Kar i sur., (2023) navode biomarkere CRC-a vezane uz egzosome, kao što su CD147 koji se nalazi u plazmi, a ekspresija mu je povišena kod pacijenata oboljelih od CRC-a te miRNA-203 čija je povišena ekspresija povezana je s metastaziranjem u *in vivo* modelima kao mogući prognostički biomarker. Prednost egzosoma naspram drugih biomarkera malignih bolesti su njihove značajne količine u biološkim materijalima, duža stabilnost i raznolikost molekula koje sadrže, a koje se detaljno mogu analizirati (Shao i sur., 2015). Unatoč velikom potencijalu za buduće primjene i visoko specifičnim molekulama koje donose, egzosomi kao biomarkeri imaju brojne nedostatke. Egzosomi kao biomarkeri zahtijevaju minimalnu kontaminaciju uzorka, očuvanost integriteta membrane vezikule, visok prinos, reproducibilnost, mogućnost izolacije iz svih bioloških tekućina, simultanu izolaciju iz većeg broja uzoraka, jednostavnost opreme i, potencijalno, automatizaciju postupka. Zasad dostupne izolacijske metode su vremenski i tehnički zahtjevne, malog prinosa i nestandardizirane. Problem je i kontaminacija sastavnica bioloških tekućina (Yakubovich i sur., 2022). Izolacijske metode egzosoma su ultracentrifugiranje (zlatni standard), ultrafiltracija, precipitacija pomoću polimera, imunoafinitetna kromatografija i dr. Poteškoće u izolacijskom postupku su taloženje lipoproteina iste gustoće kao i egzosomi, oštećenje integriteta egzosoma, smanjeni prinos zbog nespecifičnog vezanja egzosoma na membranu tijekom ultrafiltracije ili zbog slabog

prepoznavanja egzosoma antitijelima te kontaminacija molekulama istog promjera (Mosquera-Heredia i sur., 2021).

### **1.3.2. MiRNA U KONTEKSTU KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

Važnost miRNA u karcinogenezi opisuje činjenica da je više od 50 % genomskih područja ili fragilnih područja povezanih s karcinomom sačinjeno od gena koji kodiraju miRNA (Karabulut i sur., 2024). Utjecaj miRNA na patogenezu CRC-a započinje abnormalnom ekspresijom miRNA, a ona regulira ekspresiju brojnih proteina koji sudjeluju u patofiziološkim procesima CRC-a, poput staničnog ciklusa, angiogeneze, apoptoze, epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT, engl. *epithelial mesenchymal transition*), autofagije, proliferacije i metastaziranja. Regulira i matične stanice raka (Wu i sur., 2020). MiRNA regulira signalne puteve: Wnt/ $\beta$ -katenin, MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR (Mohammed, 2023). MiRNA posttranskripcijski reguliraju više molekula, a ističu se proteini APC, KRAS, p53 i DCC. Onkogen RAS kontrolira tumor-supresorska miRNA koja se naziva *let-7*. MiRNA125b utječe na tumor-supresorski protein p53, veže se na njegovu 3'UTR regiju, suprimira ekspresiju proteina i inhibira apoptozu. Važnu ulogu u CRC ima i miRNA30a koja kontrolira ekspresiju CD73, staničnu proliferaciju, invaziju, metastaziranje i apoptozu (Karabulut i sur., 2024). Metastatski rast inhibiran je pomoću miRNA-215-5p čije mete zasad nisu poznate. Metastatski potencijal reguliraju miRNA kroz fokalnu adheziju, interakcije između izvanstaničnog matriksa i receptora na staničnoj površini, Wnt signalni put te pluripotentnost matičnih stanica (Lotfi i sur., 2024). Deregulacija miRNA molekula rezultira i rezistencijom na lijekove (Wu i sur., 2020).

## **1.4. TKIVA FIKSIRANA FORMALINOM I UKLOPLJENA U PARAFIN (FFPE, engl. *FORMALIN-FIXED PARAFFIN-EMBEDDED*)**

### **1.4.1. O FFPE TKIVIMA**

FFPE tkiva omogućuju očuvanje stanične morfologije uzoraka tkiva. Od 1991. godine koriste se u dijagnostičkoj patologiji za imunohistokemijsku analizu (Kokkat i sur., 2013). Danas su zlatni standard u očuvanju humanih tkiva za dijagnostičke svrhe (Mathieson i sur., 2020).

Pohranjuju se na sobnoj temperaturi bez vremenskog ograničenja i omogućuju analizu tkiva bilo kada nakon uzorkovanja (Rossouw i sur., 2021). Iz uzoraka FFPE tkiva mogu se izolirati proteini, DNA i RNA (Kokkat i sur., 2013). Najčešće se koriste za molekularna testiranja, primjerice za detekciju KRAS i EGFR mutacija kod CRC-a (Gao i sur., 2020).

#### **1.4.2. DOBIVANJE FFPE TKIVA**

Uzorak za pripremu FFPE tkiva dobiva se biopsijom ili se iz resektiranog tkiva izuzima uzorak tijekom patohistološke analize. Uzorkovano tkivo se prvo uranja i inkubira u formalinu (Rossouw i sur., 2021). Formalin je vodena otopina formaldehida volumnog udjela 40 % (masenog udjela 37 %) i metanola (6-13 %) ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Zahvaljujući maloj veličini molekule, formaldehid iz formalina lako i brzo prodire u tkiva te ih fiksira. Fiksacija je proces kojim se pomoću formaldehida, rjeđe glutaraldehida, stvaraju stabilne veze unutar i između proteina, čime se dovode u stanje vrlo sličnom onom u živom tkivu, ali izostaje precipitacija proteina (McMillan i sur., 2018). Fiksacija formalinom uzrokuje minimalno izobličenje i skupljanje tkiva, čime stvara iznimno dobre preduvjete za uspješno histopatološko bojanje (Rossouw i sur., 2021).

Nakon inkubacije tkiva u formalinu, slijedi dehidracijski korak u kojemu se formalin zamjenjuje s etanolom koji uklanja svu vodu iz tkiva (Rossouw i sur., 2021). Slijedi inkubacija tkiva s ksilenom koji uklanja zaostali etanol u tkivu, a zatim se ksilen zamjenjuje rastopljenim parafinom koji ulazi u sve pore uzorka tkiva. Uzorak se uklapa parafinom i stvrdnjuje, rezultirajući blokom parafina unutar kojeg se nalazi tkivo (Rossouw i sur., 2021). Materijali za uklapanje, parafin i plastika, omogućuju nastajanje vrlo tankih rezova uz očuvanje strukture stanica unutar tkiva (McMillan i sur., 2018).

Nakon što se blokovi FFPE tkiva pomoću mikrotoma izrežu na tanke rezove debljine 4-10 µm, rezovi se spuštaju u toplu vodenu kupelj i plutaju na površini vode čime se smanjuje zbijenost reza. Ukoliko slijedi histološka analiza pod mikroskopom, dobiveni se rezovi premještaju na predmetna stakalca i uklanja se višak vode. Takvi rezovi smješteni na predmetnom stakalcu dodatno se suše na grijaćoj podlozi nekoliko sati. Slijedi proces uklanjanja parafina i rehidriranja tkiva. Taj postupak obuhvaća kupelj s parafinskim (voštanim) otapalom, niz kupelji koje sadrže smanjujuće koncentracije alkohola i naposljetku vodenu kupelj (McMillan i sur., 2018). Zatim slijedi bojanje, primjerice, hematoksilinom i eozinom, a nakon toga ispiranje (Rossouw i sur., 2021; McMillan i sur., 2018). Upravo se



histološka dijagnostika karcinoma temelji na uočavanju promjena dijelova tkiva i povezivanje uočenih promjena s određenim stupnjem razvoja bolesti. Pritom je dijagnostički postupak olakšan korištenjem imunohistokemijskih metoda koje omogućuju uočavanje promjena u određenim proteinima (Rossouw i sur., 2021).

Za ekstrakciju proteina iz uzoraka FFPE tkiva i potpuno otapanje tkiva potreban je jak deterdžent poput natrijevog dodecil sulfata (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*) (Rossouw i sur., 2021).

### **1.4.3. PREDNOSTI FFPE TKIVA**

Prednosti FFPE tkiva u odnosu na svježa tkiva je minimalni rizik od infektivnih agensa, očuvanje gradivnih tkivnih komponenti i stanične morfologije te imunoreaktivnosti antigena (Rossouw i sur., 2021; Turashvili i sur., 2012). FFPE tkiva sprječavaju pojavu autoproteolize i truljenja tkiva. Svojstva FFPE tkiva omogućuju dugotrajnu pohranu velikog broja uzoraka tkiva, čime su, uz svu dostupnu medicinsku dokumentaciju pacijenta, omogućena retrospektivna translacijska istraživanja novijim metodama te analize novih ili potencijalnih biomarkera (Rossouw i sur., 2021; Kokkat i sur., 2013).

Brojna proteomska istraživanja, poput onog kojeg su 2013. godine proveli Craven i suradnici, pri čemu nisu uočili značajnu razliku u identifikaciji proteina FFPE uzoraka bubrežnog zdravog i tumorskog tkiva pohranjenih u trajanju do 10 godina, pokazuju zanemarivu promjenu proteina u duže pohranjenim FFPE uzorcima tkiva. Kokkat i suradnici su 2013. godine ispitali stabilnost, odnosno kvalitetu i kvantitetu genomske DNA, ukupne RNA i ukupnih proteina FFPE uzoraka tkiva malignih tumora pluća, štitnjače i žlijezda slinovnica te utvrdili da ne postoji značajna razlika u makromolekulama uspoređujući blokove FFPE uzoraka tkiva starih manje od godinu dana i onih pohranjenih čak 12 godina.

No, neka istraživanja pokazala su i suprotno, primjerice značajno smanjenu količinu proteina i broja proteina određenih tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS, engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*). Također, dokazano je da pravi uzrok smanjenju kvalitete uzorka nije duljina trajanja pohrane parafinskih blokova FFPE tkiva, već predanalitički čimbenici, točnije uzorkovanje i rukovanje uzorkom, produljeno vrijeme fiksacije (> 24 h) i uvjeti pohrane (Rossouw i sur., 2021).

Izolirane nukleinske kiseline iz uzorka FFPE tkiva omogućuju gensko profiliranje, odnosno testiranje na ciljne gene i biomarkere koji se vežu uz određene bolesti, čime je omogućeno

postavljanje prognoze te odabir terapije sukladno molekularnim karakteristikama bolesti. Pritom je naglasak stavljen na maligne bolesti, čija se inicijacija i progresija detaljnije mogu proučavati (Belder i sur., 2016).

#### 1.4.4. NEDOSTACI FFPE TKIVA

Iako su FFPE tkiva danas u širokoj uporabi, postoje dokazi o svježim smrznutim (FF, engl. *fresh frozen*) tkivima kao pogodnijim uzorcima za dijagnostički postupak (Mathieson i sur., 2020). Iako su rijetko korištena u kliničkoj praksi zbog kompleksnog protokola koji obuhvaća smrzavanje izuzetog tkiva u tekućem dušiku 30-60 minuta nakon odstranjivanja, FF tkiva sadrže očuvaniju DNA. Za razliku od FF tkiva, analiza FFPE tkiva u kontekstu genskog sekvenciranja, odnosno sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. *next-generation sequencing*) često obuhvaća poteškoće koje mogu dovesti do pogrešnog tumačenja DNA slijeda, a posljedica je hidrolitičke deaminacije citozinskih (C) baza, fragmentacije DNA i kemijskog umrežavanja uslijed fiksacije formalinom (Mathieson i sur., 2020). Hidrolitičkom deaminacijom citozina i 5'-metilcitozina (5mC, engl. *5-methylcytosine*) nastaju uracil i tiamin. Nakon što ih prepoznaju DNA polimeraze, nastaju artefakti u slijedu, primjerice C:G > T:A, C:G > A:T, C:G > G:C, A:T > G:C, ili nastaju mjesta bez ijedne baze, što narušava intrinzičnu strukturu dvostrukog heliksa DNA s puknućem kao mogućim ishodom (Cazzato i sur., 2021). Rješenje za formirane artefakte je enzim uracil DNA glikozilaza (UDG, engl. *uracil DNA glycosylase*) koja uklanja uracilne baze prije umnožavanja. UDG nije učinkovit u uklanjanju timina koji nastaje deaminacijom 5mC (Guo i sur., 2022).

Nedostatak FFPE tkiva je i proces kemijskog umrežavanja (engl. *cross-linking*). Kemijsko umrežavanje uzrokovano formalinom odnosi se na međusobno povezivanje unutarstaničnih makromolekula. Pritom nastaju umrežene strukture DNA-DNA, DNA-protein i DNA-RNA koje usporavaju funkciju DNA polimeraza tijekom umnažanja knjižnice, što rezultira značajno smanjenim brojem i smanjenom raznolikošću kalupa DNA iz uzorka FFPE tkiva koji se umnažaju tijekom PCR reakcije (Guo i sur., 2022). Formalin utječe i na strukturu dvostrukog heliksa DNA, posljedično smanjujući kvalitetu DNA ekstrahirane iz FFPE uzoraka tkiva (Cazzato i sur., 2021). Uočena je i smanjena kvaliteta RNA ekstrahirane iz FFPE uzoraka tkiva. Osim što formalin uzrokuje umrežavanje između proteina i nukleinskih kiselina, dolazi i do degradacije nukleinskih kiselina (Belder i sur., 2016). Unatoč

spomenutim prednostima, FF tkiva se povezuju s većom učestalosti dijagnostičke pogreške, prvenstveno specifičnosti, u odnosu na FFPE tkiva (Mathieson i sur., 2020).

Problem artefakata u slijedu može se ukloniti korištenjem DNA polimeraza koje prepoznaju uracil u lancu kalupa te zaustavljaju elongaciju tog lanca, što je omogućilo zadržavanje FFPE tkiva kao zlatnog standarda (Mathieson i sur., 2020).

Iako je dokazano kvantitativno i kvalitativno oštećenje DNA molekula (umrežavanje, degradacija i fragmentacija) ekstrahiranih iz uzoraka FFPE tkiva uslijed postupka fiksiranja, molekularna detekcija KRAS i EGFR mutacija je točna (Gao i sur., 2020).

#### **1.4.5. IZOLACIJA RNA I miRNA IZ FFPE UZORAKA TKIVA**

Prvi je korak u izolaciji nukleinskih kiselina iz uzorka FFPE tkiva deparafinizacija. Različiti protokoli deparafinizacije utječu na ukupnu količinu i čistoću izolirane RNA. Zasigurno je cilj izolirati što veću količinu što čišće RNA, no na samom se početku nameće problem degradacije RNA u FFPE tkivu (Belder i sur., 2016). Iako su razvijene novije, uspješnije metode izolacije RNA, ukupna količina izolirane RNA je i dalje prilično mala, a molekule RNA su često djelomično ili značajno degradirane (Roberts i sur., 2009). Za umnažanje tj. reverznu transkripciju degradiranih molekula RNA koriste se oligo-deoksitimidinske (dT, engl. *deoxythymidine*) početnice, ali i nasumične početnice, s ciljem očuvanja što više transkripata i smanjenjem umnažanja mRNA (Roberts i sur., 2009).

Peiró-Chova i suradnici analizirali su ukupnu RNA izoliranu iz odmrznutih FF i uzoraka FFPE tkiva i dokazali visoku degradiranost u oba uzorka. No, uzroci degradacije su različiti i razlika je uočena na elektroforetskim profilima: RNA izolirana iz FFPE tkiva pokazuje akumulirane RNA fragmente manje od 200 nt, a RNA izolirana iz odmrznutih FF tkiva akumulirane RNA fragmente do 1000 nt. U FF tkiva temperatura pohrane (-80 °C) narušava integritet staničnih struktura i onemogućuje unutarstanični metabolizam. Prilikom odmrzavanja navedenih uzoraka ponovno se aktiviraju tkivne RNaze (unutarstanične i vanstanične) koje potiču visok stupanj degradacije RNA (Peiró-Chova i sur., 2013). U uzorcima FFPE tkiva se uslijed fiksacije i uklapanja odvija dimerizacija adenina, enzimska degradacija i kovalentna modifikacija RNA uz umrežavanje s proteinima, što otežava ekstrakciju RNA (Peiró-Chova i sur., 2013; Masuda N. et al., 1999). Smanjenje kvalitete nukleinskih kiselina u uzorcima FFPE tkiva uzrokovano je i oksidacijom nukleinskih kiselina na izloženoj površini parafinskih rezova (Turashvili i sur., 2012). Za poboljšavanje ekstrakcije

RNA iz FFPE tkiva dodaje se enzim proteinaza K koja razgrađuje veze između RNA i proteina. Manje fragmente RNA, do 200 nt, lakše je ekstrahirati jer će proteinaza K zasigurno razgraditi veze između tih fragmenata i proteina, dok veći fragmenti RNA (veći do 200 nt) najčešće ostaju vezani za proteine i nakon dodavanja proteinaze K.

Ukupna RNA izolirana iz uzorka FFPE tkiva puno je manja u odnosu na ukupnu RNA izoliranu iz istog uzorka odmrznutog FF tkiva zbog toga što se iz FFPE tkiva izolira samo ona RNA koja nije vezana na proteine (mali RNA fragmenti), dok je u FF tkivima RNA slobodna (Peiró-Chova i sur., 2013).

Uočen je velik broj male RNA (sRNA, engl. *small RNA*) u odmrznutim i FFPE uzorcima tkiva u odnosu na smrznute, FF uzorke tkiva, što je posljedica degradacije RNA molekula, čime nastaju manji fragmenti RNA kao posljedica oštećenja. Metode određivanja ukupnog broja sRNA time bilježe veći broj sRNA od stvarnog jer, definirajući njihovu veličinu brojem nt, ne razlikuju vrste RNA te pritom ubrajaju degradacijom nastale fragmente RNA iste veličine (Peiró-Chova i sur., 2013).

Za razliku od DNA i drugih, dužih RNA molekula, uočeno je da su sRNA, u koje ubrajamo i miRNA, otporne na kemijsku i enzimsku degradaciju tijekom procesa fiksiranja te tijekom vremena, ali i na značajne promjene pH i temperature tijekom procesa izvođenja kvantitativnog PCR-a (qPCR, engl. *quantitative PCR*) (Kakimoto i sur., 2016; Peiró-Chova i sur., 2013). Stoga se miRNA, zbog svoje male veličine i stabilnosti, uspješno mogu izolirati iz FFPE tkiva (Peiró-Chova i sur., 2013).

Unatoč brojnim poteškoćama pri izolaciji RNA iz uzoraka FFPE tkiva, neke molekule RNA ostaju potpuno očuvane, a to su RNA molekule iz mitohondrija. Objašnjenje za ovu pojavu su mitohondrijske membrane koje štite RNA od degradacije, kao i mitohondrijski RNA-vezujući protein (RBP, engl. *RNA binding protein*) (Lin i sur., 2024).

## **1.5. KONCENTRACIJA I KVALITETA IZOLIRANIH MOLEKULA RNA**

### **1.5.1. PARAMETRI KVALITETE**

Na kvalitetu molekula RNA u FFPE tkivima utječu veličina uzorka, vrijeme trajanja hladne ishemije, vrijeme fiksacije, vrijeme pohrane i temperatura pohrane. Za postupak izrade blokova FFPE tkiva uz očuvanje kvalitete RNA molekula utvrđeno je da su optimalni uvjeti ishemije tkiva maksimalno 48 sati ukoliko se tkivo pohranjuje na temperaturi od 4 °C,

odnosno maksimalno 30 minuta na temperaturi od 25 °C. Potvrđeno je da niža temperatura pohrane ( $\leq 4$  °C) usporava degradaciju nukleinskih kiselina u uzorku FFPE tkiva (Lin i sur., 2024).

Koncentracija izolirane RNA određuje se spektrofotometrijski na 260 nm i 280 nm (Peiró-Chova i sur., 2013).

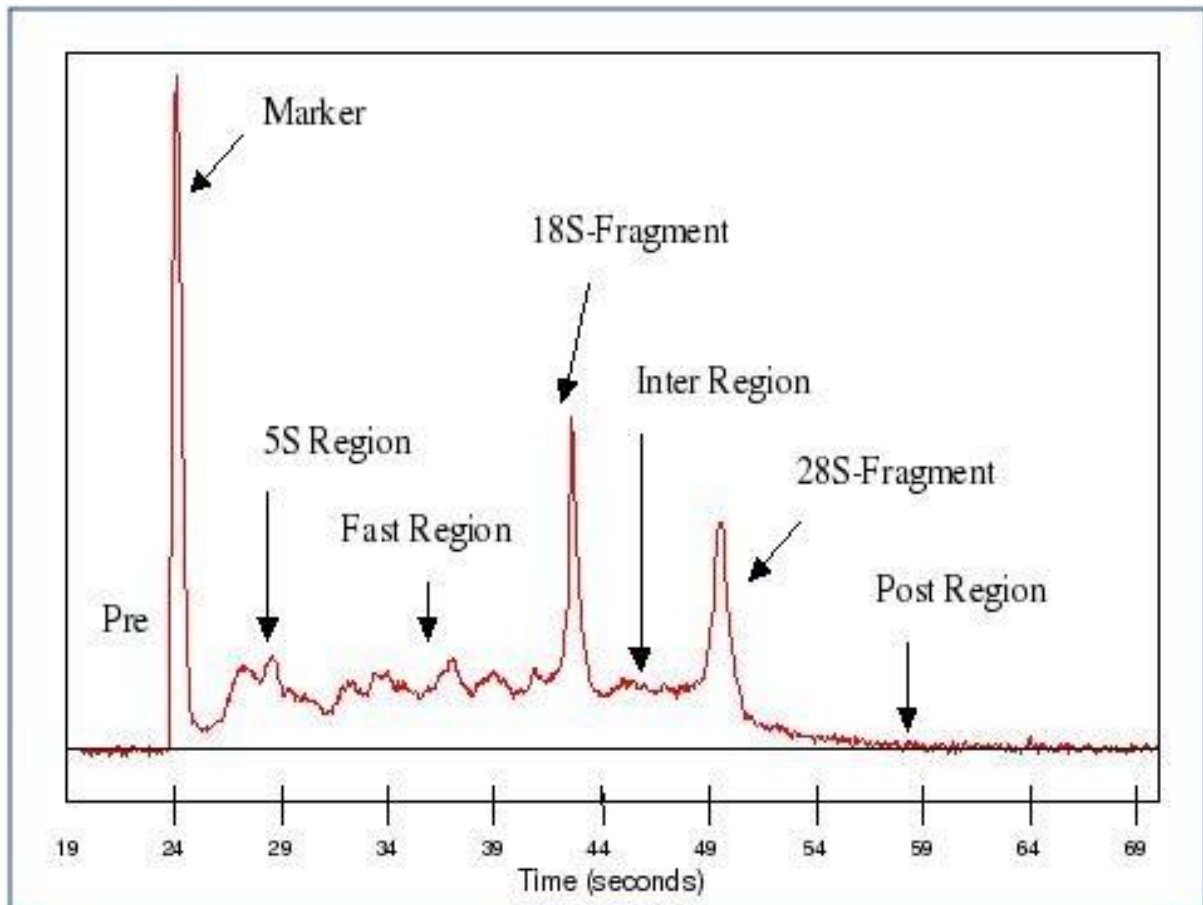
Optička gustoća (OD, engl. *optical density*) 260/280 je veličina kojom se opisuje kvaliteta izolirane RNA. Računa se kao omjer izmjerene apsorbancije na 260 nm i apsorbancije izmjerene na 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Idealnom vrijednošću smatra se 2,0. Snižene vrijednosti OD 260/280 upućuju da je uzorak kontaminiran fenolom ili proteinima (Li i sur., 2024).

Izmjerene koncentracije izolirane RNA ovise i o pH medija. U neutralnom pH vrijednost  $A_{260}$  jednaka 1 ekvivalentna je koncentraciji RNA od 44  $\mu\text{g/mL}$ . Spektrofotometrijski se određivati mogu uzorci RNA koji pokazuju apsorbanciju pri 260 nm ( $A_{260}$ ) veću od 0,15. Zbog navedenog ograničenja spektrofotometrijske metode, niske je koncentracije RNA prikladno određivati pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaja, kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze spregnutom s reverznom transkripcijom (RT-qPCR, engl. *reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction*) ili fluorometrijskim metodama.

Integritet izolirane RNA može se utvrditi elektroforezom na denaturiranom agaroznom gelu uz bojanje etidijevim bromidom ili novijom, preciznijom metodom elektroforeze i tehnologijom laboratorija na čipu (engl. *lab-on-chip*) (Li i sur., 2024). Ukoliko je potpuno očuvana RNA, vrpce i vršci rRNA su jasno vidljivi i oštri, a omjer 28S i 18S rRNA je približno 2:1.

Parametar kojim se utvrđuje kvaliteta izolirane RNA je broj integriteta RNA (RIN, engl. *RNA integrity number*). RIN je numerička veličina čiji je raspon od 1 do 10, a definirana je pomoću računalnog algoritma. Pritom vrijednost 1 označava potpuno degradaciju izolirane RNA, dok RIN vrijednost 10 označava potpunu očuvanost RNA (Li i sur., 2024). Izolirana RNA smatra se visoke kvalitete ukoliko RIN iznosi 8 ili više (Farrell Jr, 2023). Što je veća degradiranost RNA, to su na elferogramu manji vršci 28S i 18S rRNA, a pojavljuju se drugi, manji vršci koji predstavljaju kraće, elektroforetski manje pokretne fragmente RNA (Farrel Jr, 2017; Schroeder i sur., 2006). Na elferogramu je moguće uočiti marker područje, 5S područje u kojem se nalaze 5S rRNA, 5.8S rRNA i tRNA te *fast* područje koje se nalazi između 5S i 18S područja; područje 18S fragmenta i 28S fragmenta i inter-regija između njih, a naposljetku se nalazi post-područje. Algoritam kojim se određuje RIN uzima u obzir udio površine ispod krivulje u području 18S i 28S u odnosu na ukupnu površinu ispod krivulje, čime se procjenjuje odnos velikih i malih molekula. O degradaciji RNA dodatno govori 28S vrpca čiji

se vršak (engl. *peak*) brže smanjuje i nestaje nego 18S vrpca. Drugim riječima, samo smanjenje 28S vrška upućuje na prisutnu degradaciju. Degradacijom RNA nastaju fragmenti manje veličine, stoga se na elferogramu uzoraka čiji je određeni RIN vrijednosti između 3 i 6 pojavljuje tzv. *fast* područje. Kod izrazite degradacije marker područje ima veći vršak zbog velike količine vrlo malih fragmenata RNA (Schroeder i sur., 2006).



Slika 2. Prikaz elferograma i njegovih regija (preuzeto iz Schroeder i sur. (2006) uz Creative Commons licencu <https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>).

Drugi parametar koji opisuje kvalitetu RNA izolirane iz FFPE uzorka tkiva je vrijednost raspodjele (DV200, engl. *Distribution Value 200*) koji predstavlja postotak fragmenata RNA većih od 200 nt (Matsubara i sur., 2020). Poželjna je što veća vrijednost DV200 jer ona upućuje na bolju očuvanost molekula RNA. Vrijednost DV200 opisuje vjerojatnost uspješne izrade knjižnice iz izolirane i degradirane RNA (Lin i sur., 2024).

### 1.5.2. DENOVIK DS-11

Uređaj *Denovix DS-11* je mikrovolumni spektrofotometar koji omogućuje određivanje koncentracije nukleinskih kiselina (dDNA, jDNA, RNA), proteina i peptida iz tek 1  $\mu\text{L}$  uzorka metodom UV-VIS spektrofotometrije. Mjerni raspon je 0,6 – 30 000 ng/ $\mu\text{L}$  RNA, a prikazuje i omjere 260/230 i 260/280 koji upućuju na kontaminacije uzorka proteinima, nukleinskim kiselinama i organskim otapalima. U slučaju onečišćenja uzorka, odnosno nedovoljne čistoće uzorka, *DeNovix DS-11* prikazuje upozorenje. Prema uputama proizvođača, vrijednost omjera 260/230 prihvaća se ukoliko je unutar raspona 1,8-3,0, dok je raspon za omjer 260/280 1,65-2,5. Vrijednost omjera 260/280 za RNA je poželjno približna 2,0. Za svaku vrijednost jednog od omjera izvan dopuštenog raspona nužno je očistiti radne površine te promijeniti i ponovno izmjeriti slijepu probu (destiliranu vodu ili pripadajući puffer). Uzrok neprihvatljivo niske vrijednosti omjera 260/230 mogu biti i zaostali ekstrakcijski reagensi u uzorku, primjerice ugljikohidrati, kaotropne soli i fenol. Uzroci neprihvatljivo visoke vrijednosti omjera 260/280 također mogu biti zaostali ekstrakcijski reagensi, odnosno proteini i fenol koji potječu iz ekstrakcijskih reagensa. Kvantifikacijska metoda koja se izvodi na *DeNovix DS-11* spektrofotometru ne razlikuje pojedine vrste DNA ili RNA, stoga prethodno izvedeni izolacijski postupak nužno treba rezultirati izolatom jedne, željene nukleinske kiseline kako bi bilo osigurano što točnije kvantitativno određivanje nukleinskih kiselina.

### 1.5.3. AGILENT 2100 BIOANALYZER

*Agilent 2100 Bioanalyzer* je automatizirani uređaj za mikrokapilarnu elektroforezu. Ova metoda omogućuje razdvajanje, detekciju i kvantifikaciju RNA te utvrđivanje integriteta i kvalitete RNA izoliranih iz određenog uzorka tkiva. Princip metode je kombinacija mikrotekućinskih čipova, naponom inducirano razdvajanja u kapilarama ispunjenim gelom i detekcija pomoću laserom-inducirane fluorescencije (LIF, engl. *laser-induced fluorescence*) (Schroeder i sur., 2006). Fluorescencijska detekcija odvija se bilježenjem emisije pri valnoj duljini između 670 i 700 nm.

Elferogrami RNA dobiveni pomoću uređaja *Agilent 2100 Bioanalyzer* prikazuju razdvojene niskomolekularne (LMW, engl. *low molecular weight*) RNA od visokomolekularnih (HMW, engl. *high molecular weight*) RNA. Spomenute LMW RNA molekule su: 5.8S, 5S, tRNA,

miRNA, mala interferirajuća RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*) i snRNA, u jednolančanom i dvolančanom obliku. U toj frakciji nalaze se i preteče zrele miRNA (pri-miRNA, pre-miRNA) te zrela miRNA. HMW molekule su 18S i 28S rRNA (Masotti i sur., 2006). Detekcija se odvija zahvaljujući interkaliranoj boji unutar RNA molekula (Schroeder i sur., 2006). Analitički raspon ove metode je od 5 do 500 ng/μL. Za razliku od elektroforeze na agaroznom gelu na kojem su također jasno vidljive vrpce 18S i 28S rRNA, ali i blijede, razmazane vrpce LMW RNA, uređaj *Agilent 2100 Bioanalyzer* predstavlja učinkovit način kvantifikacije i procjene kvalitete RNA. Frakcija sRNA obuhvaća RNA manje od 200 parova baza, a očekivan je vršak na području između 100 i 175 parova baza. Uređaj *Agilent 2100 Bioanalyzer* u kombinaciji sa *Small RNA* i *RNA 6000 Nano* kompletom omogućuje analizu molekula miRNA u uzorcima ukupne RNA, točnije njihov integritet i čistoću sRNA te njihovu kvantifikaciju (Masotti i sur., 2006). Pritom se određuje RIN vrijednost, ukupna koncentracija RNA, koncentracija miRNA i omjer miRNA/sRNA, a zatim se računski određuje udio miRNA u uzorku RNA.

Pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaja određuju se također i DV200 vrijednosti na temelju kojih se izolirani uzorci RNA klasificiraju sukladno distribuciji veličine molekula. Uređaj obilježava analizirane uzorke različitim bojama i kategorizira ih sukladno rezultatima. Na navedeni se način mogu odabrati adekvatni uzorci za daljnju analizu sukladno veličini molekula, odnosno distribuciji veličine (Graf, 2017).





Slika 3. *Agilent 2100 Bioanalyzer*



Slika 4. *Agilent 2100 Bioanalyzer* – Prikaz postavljanja mikrotekućinskog čipa na uređaj.



Slika 5. Mikrotekućinski čip za analizu sRNA na *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaju pomoću *Agilent Small RNA* kompleta.

Mikrotekućinski čip za analizu sRNA u sklopu *Agilent Small RNA* kompleta sadržava ukupno 16 polja od kojih je 11 namijenjeno za uzorke (označeni brojevima 1-11). U tri jažice označene slovom G nanosi se smjesa gela i boje, u jažicu označenu sa „CS“ nanosi se RNA otopina za postizanje analitičkih uvjeta (CS, engl. *conditioning solution*), a u jažicu označenu simbolom ljestvi nanosi se marker veličine (engl. *ladder* – ljestve).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Egzosomi imaju velik potencijal kao cirkulirajući biomarkeri jer prenose različite biološke molekule (proteine, lipide, nukleinske kiseline) iz ishodišnih stanica. Egzosomi sadrže brojne nukleinske kiseline, ponajviše male RNA kojima pripada i miRNA koja može djelovati kao tumor-supresor, ali i kao onkogen. Funkcija miRNA je regulacija staničnih procesa i aktivnosti određenih gena.

FFPE tkiva mogu se koristiti kao izvor RNA u dijagnostici tumora, primjerice za gensko profiliranje, no RNA može biti degradirana uslijed postupka izrade FFPE tkiva koji obuhvaća fiksaciju formalinom koja dovodi do hidrolitičke deaminacije citozinskih baza, fragmentacije nukleinskih kiselina i kemijskog umrežavanja.

Bitno je odrediti kvalitetu i čistoću RNA izolirane iz tkiva i egzosoma kako bi se spriječile moguće interferencije onečišćenjima u izolatu koje mogu interferirati u molekularnim analizama ili dovesti do pogrešnog tumačenja rezultata analize.

U ovom radu određivale su se koncentracija, kvaliteta i čistoća RNA i miRNA izoliranih iz uzoraka FFPE tkiva i egzosoma 13 pacijenata s dijagnosticiranim kolorektalnim karcinomom. Koncentracija RNA i miRNA određena je na *DeNovix DS-11* spektrofotometru. Kvaliteta i čistoća RNA i miRNA određena je mikrokapilarnom elektroforezom na gelu korištenjem uređaja *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Rezultati su preliminarni, a koristit će se za procjenu svrhovitosti određivanja kvalitete RNA i miRNA korištenjem mikrokapilarne elektroforeze te za procjenu njihove prihvatljivosti za daljnje analize primjenom molekularnih tehnika, primjerice RT-qPCR-a, NGS-a i analize na mikropločici.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. UZORKOVANJE**

##### **3.1.1. UZORCI FFPE TKIVA**

Analizirani rezovi FFPE tkiva pripadaju pacijentima oboljelih od CRC-a koji su potpisali informativni pristanak za sudjelovanje u projektu *HRZZ IP-2019-04-4624*. Svim pacijentima je izvedena kolonoskopija kojom je potvrđena dijagnoza CRC-a. Tkiva su izuzeta iz resektiranog tumora u sklopu patohistološke analize.

##### **3.1.2. UZORKOVANJE KRV I PRIPREMA PLAZME ZA IZOLACIJU EGZOSOMA**

Puna krv uzorkovana je od pacijenata oboljelih od CRC-a koji su informirano pristali na sudjelovanje u projektu *HRZZ IP-2019-04-4624*. 10 mL krvi izvađeno je u *CellSave* epruvete (Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italy). Važno je što prije (unutar jednog sata od vađenja krvi) centrifugiranjem ukloniti stanice kako bi se spriječilo *in vitro* oslobađanje staničnog sadržaja. Hemolitični uzorci nisu prikladni za daljnju uporabu.

Dobiveni uzorci centrifugiraju se na 1 900 g (3 000 rpm) tijekom 10 minuta na temperaturi od 4 °C u centrifugi s njihajućim košarama (*LISA* rashladna centrifuga (AFI, Château-Gontier, France)). Plazma (žuti nadsloj), volumena 4-5 mL, prenese se u novu epruvetu s koničnim dnom od 15 mL uz oprez da se ne aspirira trombocitno-leukocitni međusloj (engl. *buffy coat*), s obzirom da leukociti i trombociti predstavljaju najčešći izvor kontaminacije prilikom rada s miRNA. Zatim se plazma centrifugira na 3 000 g tijekom 15 minuta na 4 °C što omogućuje uklanjanje preostalog staničnog debrisa, trombocitnih fragmenata i apoptotskih tjelešaca. Ključno je ukloniti sav stanični debris, i to što prije nakon uzorkovanja krvi, jer se RNA u većoj količini nalazi upravo unutar stanice, stoga svako zaostalo onečišćenje utječe na profil RNA u krvi i drugim slobodnim tjelesnim tekućinama. Nužno je drugo centrifugiranje provesti na srednjim brzinama (oko 3 000 g) jer se većim brzinama centrifugiranja (oko 16 000 g) uklanja neoštećeni kromatin liziranih stanica, ali i veće izvanstanične vezikule poput egzosoma koje sadrže izvanstanične nukleinske kiseline što u ovom protokolu nije poželjno. Pročišćena se plazma zatim prenese u novu epruvetu i alikvotira u epruvetice bez RNaza od 2 mL. Alikvoti namijenjeni za neposrednu izolaciju egzosoma (unutar 6 sati) su volumena 600

$\mu\text{L}$  te se pohranjuju na temperaturi  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a za dužu pohranu (na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pripremaju se alikvoti od  $700\text{ }\mu\text{L}$ .

Smrznuti alikvoti plazme se prije uporabe otapaju na ledu ili na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i vorteksiraju nakon otapanja, a zatim centrifuraju na  $3\ 000\text{ g}$  tijekom  $5-10$  minuta na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  čime se uklanjaju stanice, stanični debris, trombociti i fibrin. Ovim centrifugiranjem značajno je smanjena količina stanične i genomske DNA i RNA. Nadsloj se prenosi u novu epruvetu od  $2\text{ mL}$ .

## **3.2. IZOLACIJA**

### **3.2.1. POSTUPAK IZOLACIJE RNA**

Prije same izolacije RNA iz FFPE tkiva potrebno je provesti histološku kontrolu. Rezove FFPE tkiva debljine  $3\ \mu\text{m}$  potrebno je prvo obojati hematoksilinom i eozinom, a zatim analizirati pod mikroskopom kako bi se utvrdio udio tumorskih stanica. Sukladno tome odabiru se uzorci (uzorci s premalim udjelom tumorskih stanica ne koriste se za izolaciju RNA). Za samu izolaciju RNA koriste se deblji rezovi FFPE tkiva, oko  $20\ \mu\text{m}$ . Nakon deparafinizacije, RNA se izolira komercijalno dostupnim izolacijskim kompletom (Peiró-Chova i sur., 2013). Izolirana RNA stabilna je ukoliko se pohranjuje na temperaturi između  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  ili između  $-90$  i  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  u vodi bez RNaza.

### **3.2.2. IZOLACIJA RNA IZ UZORAKA FFPE TKIVA**

Molekule RNA dulje od  $70\text{ nt}$  iz uzoraka FFPE tkiva izdvajaju se pomoću *RNeasy FFPE* kompleta. Za postupak izolacije RNA potrebno je osigurati sljedeće:

- sterilni nastavci za pipete (bez RNaza)
- epruvetice od  $1,5$  i  $2\text{ mL}$
- mikrocentrifuga (s rotorom za epruvetice od  $2\text{ mL}$ )
- vorteks
- $100\%$ -tni etanol
- deparafinizirajuća otopina
- jednokratne rukavice
- termoblok
- ledomat

*RNeasy FFPE* komplet sadrži:

- *RNeasy MinElute Spin* kolone (svaka se nalazi u epruveticama za sakupljanje od 2 mL)
- epruvetice za sakupljanje od 1,5 i 2 mL
- pufer PKD - omogućuje digestiju, pospješuje djelovanje proteinaze K
- proteinaza K – razgrađuje proteine, prvenstveno DNaze i RNaze
- *DNaza Booster* pufer
- DNaza bez RNaza (liofilizat)
- pufer RBC – prilagođava uvjete vezanja na kolonu
- pufer RPE (koncentrat) - za ispiranje molekula RNA vezanih na membranu
- voda bez RNaza

Pufer RBC sadrži gvanidinske soli. DNazu bez RNaza i spin kolone pohraniti na temperaturi 2-8 °C, dok se ostatak kompleta može čuvati na sobnoj temperaturi (15-25 °C) barem 9 mjeseci. Proteinaza K pohranjena na sobnoj temperaturi stabilna je barem 12 mjeseci, dok se za dulju pohranu preporučuje temperatura 2-8 °C.

Uzorak tkiva koji se uklapa u parafin mora biti tanji od 5 mm. Neposredno nakon kirurškog odstranjenja tkiva uzorak se fiksira u 4-10 %-tnom neutralnom formalinu, a maksimalno vrijeme fiksacije je 24 sata. Prije uklapanja temeljito se ukloni voda iz uzorka, a samo uklapanje odvija se korištenjem parafina niske temperature taljenja.

Rezovi FFPE tkiva trebaju biti debljine do 20 µm. U slučaju korištenja do 4 reza svaki mora biti debljine do 10 µm i površine do 250 mm<sup>2</sup>, a ukoliko se upotrijebi više od 4 reza, ukupna debljina rezova mora biti manja od 40 µm.

Prije postupka izolacije potrebno je pripremiti otopine DNaze i pufera RPE.

DNaza se nalazi u liofiliziranom obliku, stoga je potrebno kroz gumeni pokrovni dio špricom injektirati 550 µL vode bez RNaza iz kompleta, a zatim lagano promiješati, bez vorteksiranja. Ukupni volumen se alikvotira i pohranjuje na -20 °C (pritom je stabilna do 9 mjeseci).

Odmrznuti alikvoti mogu se čuvati na 2-8 °C do 6 tjedana, no ne smiju se ponovno zamrzavati. Koncentratu RPE pufera se prije prve uporabe dodaje 4 volumena 96-100 %-tnog etanola, odnosno, dodaje se 44 mL 96-100 %-tnog etanola u bočicu s 11 mL koncentrata pufera RPE.

### *Postupak:*

Protokol, kao i svi koraci koji uključuju centrifugiranje, izvode se na sobnoj temperaturi. Dva reza tkiva debljine 5-20  $\mu\text{m}$  stave se u sterilne epruvetice od 1,5 mL. Iz svježih rezova FFPE tkiva uklanja se parafin dodavanjem 160  $\mu\text{L}$  deparafinizirajuće otopine, a zatim se vorteksira 10 sekundi i kratko centrifugira. Zatim slijedi inkubacija na 56 °C tijekom 3 minute, a nakon toga hlađenje na sobnu temperaturu. Ukoliko je prethodno dodano nedovoljno deparafinizirajuće otopine, ona će nakon hlađenja postati voštana ili čvrsta te je tada nužno ponoviti postupak od točke dodavanja 160  $\mu\text{L}$  deparafinizirajuće otopine zaključno s korakom hlađenja na sobnoj temperaturi. Deparafiniziranom uzorku dodaje se 150  $\mu\text{L}$  pufera PKD koji uzrokuje lizu. Slijedi centrifugiranje u trajanju od 1 minute na 11 000 g (10 000 rpm). U donju, čistu fazu dodaje se 10  $\mu\text{L}$  proteinaze K i lagano promiješa provlačenjem otopine kroz nastavak pipete. Pufer PKD za razgradnju proteinazom K i proteinaza K omogućuju oslobađanje molekula RNA iz rezova FFPE tkiva. Uzorak se inkubira na 56 °C 1 sat, a neposredno nakon toga na 80 °C 15 min, za što se koristi termoblok s laganim miješanjem ili je nužno uzorak vorteksirati svakih 3-5 minuta. Kratka inkubacija na visokoj temperaturi omogućuje smanjenje formalinskog vezanja nukleinskih kiselina, a posljedično je povećana kvaliteta i prinos izolirane RNA. Valja oprezno postupati s trajanjem inkubacije na 80 °C jer dulja inkubacija na navedenoj temperaturi može dovesti do veće fragmentacije RNA. Donja, neobojena faza prenese se u novu epruveticu od 2 mL, inkubira na ledu 3 minute, a zatim centrifugira 15 minuta na 20 000 g (13 500 rpm). Supernatant se prenese u novu epruveticu, uz oprez da se ne dodiruje talog u kojem se nalaze netopljivi dijelovi tkiva i DNA. Zatim se dodaje oko 16  $\mu\text{L}$  (1/10 ukupnog volumena) *DNaza booster* pufera i 10  $\mu\text{L}$  otopljenog i odmrznutog alikvota DNaze. Smjesa se lagano promiješa okretanjem epruvetice, bez vorteksiranja jer je DNaza I izuzetno podložna fizikalnoj denaturaciji, te se kratko centrifugira. Nakon inkubacije 15 minuta na sobnoj temperaturi dodaje se 320  $\mu\text{L}$  pufera RBC koji uzrokuje lizu isključivo eritrocita i smjesa se dobro promiješa. Zatim se dodaje 720  $\mu\text{L}$  100 %-tnog etanola te lagano promiješa (ne centrifugirati). Nakon dodavanja etanola moguće je prisustvo vidljivih precipitata, no oni ne utječu na protokol. 700  $\mu\text{L}$  uzorka prenosi se na *RNeasy MinElute* spin kolonu koja je stavljena na epruveticu za sakupljanje od 2 mL, poklopac se zatvori i centrifugira 30 sekundi na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm). Otopina koja ostane u epruvetici za sakupljanje se odbacuje, a epruvetice se nastavlja koristiti. Postupak od točke dodavanja 700  $\mu\text{L}$  uzorka na kolonu zaključno s bacanjem otopine u epruvetici za skupljanje ponavlja se sve dok cijeli volumen uzorka nije iskorišten. Zatim se

odaje 500  $\mu$ L pufera RPE na kolonu, zatvori se čep i centrifugira 30 sekundi na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm). Otopina koja ostane u epruveci za sakupljanje se odbacuje, epruvetica se koristi za sljedeći korak. Dodaje se 500  $\mu$ L pufera RPE na kolonu, zatvori se čep i centrifugira 2 minute na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm), a zatim baci otopina koja ostane nakon centrifugiranja zajedno s epruvecicom u kojoj se nalazi. Kolona se postavi u čistu epruvecicu od 2 mL koja se nalazi u kompletu, otvori čep kolone i centrifugira na maksimalnoj brzini 5 minuta. Ostatak iz epruvetice za sakupljanje se baca. Kolona se prenese u čistu epruvecicu od 1,5 mL iz kompleta te ispire dodavanjem 20  $\mu$ L vode bez RNaza i centrifugiranjem 1 minutu na maksimalnoj brzini tijekom kojeg je čep na koloni zatvoren. Pritom je mrtvi volumen kolone 2  $\mu$ L.

### 3.2.3. IZOLACIJA miRNA IZ UZORAKA FFPE TKIVA

Molekule RNA dulje od 18 nt iz uzoraka FFPE tkiva izdvajaju se pomoću *miRNeasy FFPE* kompleta. Za postupak izolacije miRNA potrebni su:

- sterilni nastavci za pipete (bez RNaza)
- epruvetice od 1,5 i 2 mL
- mikrocentrifuga (s rotorom za epruvetice od 2 mL)
- vorteks
- 100 %-tni etanol
- deparafinizirajuća otopina
- jednokratne rukavice
- termoblok
- ledomat

*miRNeasy FFPE* komplet sadrži:

- *RNeasy MinElute Spin* kolone (svaka se nalazi u epruvecicama za sakupljanje od 2 mL)
- epruvetice za sakupljanje od 1,5 i 2 mL
- pufer PKD - omogućuje digestiju, pospješuje djelovanje proteinaze K
- proteinaza K - razgrađuje proteine, prvenstveno DNaze i RNaze
- *DNaza Booster* pufer
- DNaza bez RNaza (liofilizat)



- pufer RBC - prilagođava uvjete vezanja na kolonu
- pufer RPE (koncentrat) - za ispiranje molekula RNA vezanih na membranu
- voda bez RNaza

Pufer RBC sadrži gvanidinske soli. DNaza bez RNaza i spin kolone se pohranjuju na 2-8 °C, dok se ostatak kompleta čuva na sobnoj temperaturi (15-25 °C) barem 9 mjeseci. Proteinaza K pohranjena na sobnoj temperaturi je stabilna barem 12 mjeseci, dok je za dulju pohranu preporučena temperatura 2-8 °C.

Uzorak tkiva koji se uklapa u parafin mora biti tanji od 5 mm. Neposredno nakon kirurškog odstranjenja tkiva uzorak se fiksira u 4-10 %-tnom neutralnom formalinu, a maksimalno vrijeme fiksacije je 24 sata. Prije uklapanja temeljito se ukloni voda iz uzorka, a samo uklapanje odvija se korištenjem parafina niske temperature taljenja.

Rezovi FFPE tkiva trebaju biti debljine do 20 µm. U slučaju korištenja do 4 reza svaki mora biti debljine do 10 µm i površine do 250 mm<sup>2</sup>, a ukoliko se upotrijebi više od 4 rezova, ukupna debljina rezova mora biti manja od 40 µm.

Prije postupka izolacije potrebno je pripremiti otopine DNaza i pufera RPE. DNaza se nalazi u liofiliziranom obliku, stoga je potrebno kroz gumeni pokrovni dio špricom injektirati 550 µL vode bez RNaze iz kompleta, a zatim se lagano promiješa, bez vorteksiranja. Ukupni volumen se alikvotira i pohranjuje na -20 °C (stabilna do 9 mjeseci). Odmrznuti alikvoti mogu se čuvati na 2-8 °C do 6 tjedana, no ne smiju se ponovno zamrzavati. Koncentratu RPE pufera se prije prve uporabe dodaje 4 volumena 96-100 %-tnog etanola, odnosno 44 mL 96-100 %-tnog etanola se dodaje u bočicu s 11 mL koncentrata pufera RPE, a zatim se promiješa.

#### *Postupak:*

Protokol, kao i svi koraci koji uključuju centrifugiranje, izvode se na sobnoj temperaturi. Dva reza tkiva debljine 5-20 µm stave se u sterilne epruvetice od 1,5 mL. Iz svježih se rezova FFPE tkiva uklanja parafin dodavanjem 160 µL deparafinizirajuće otopine, vorteksiranjem 10 sekundi i kratkim centrifugiranjem. Zatim slijedi inkubacija na 56 °C tijekom 3 minute, a nakon toga hlađenje na sobnu temperaturu. Ukoliko je prethodno dodano nedovoljno deparafinizirajuće otopine, ona će nakon hlađenja postati voštana ili čvrsta te je tada nužno ponoviti postupak od točke dodavanja 160 µL deparafinizirajuće otopine zaključno s korakom

hlađenja na sobnoj temperaturi. Deparafiniziranom uzorku dodaje se 150  $\mu\text{L}$  pufera PKD (namijenjenom za lizu) te se smjesa vorteksira. Slijedi centrifugiranje u trajanju od 1 minute na 11 000 g (10 000 rpm). U donju, čistu fazu dodaje se 10  $\mu\text{L}$  proteinaze K i lagano promiješa provlačenjem otopine kroz nastavak pipete. Pufer PKD i proteinaza K omogućuju oslobađanje molekula RNA iz rezova FFPE tkiva. Uzorak se inkubira na 56 °C 1 sat, a neposredno nakon toga na 80 °C 15 min, za što se koristi termoblok s laganim miješanjem ili je nužno uzorak vorteksirati svakih 3-5 minuta. Kratka inkubacija na visokoj temperaturi omogućuje smanjenje formalinskog vezanja nukleinskih kiselina, a posljedično je povećana kvaliteta i prinos izolirane RNA. Valja oprezno postupati s trajanjem inkubacije na 80 °C jer dulja inkubacija na navedenoj temperaturi može dovesti do veće fragmentacije RNA. Donja, neobojena faza prenese se u novu epruveticu od 2 mL, inkubira na ledu 3 minute, a zatim centrifugira 15 minuta na 20 000 g (13 500 rpm). Supernatant se prenese u novu epruveticu, uz oprez da se ne dodiruje talog u kojem se nalaze netopljivi dijelovi tkiva i DNA. Dodati oko 16  $\mu\text{L}$  (1/10 ukupnog volumena) *DNaza Booster* pufera i 10  $\mu\text{L}$  otopljenog i odmrznutog alikvota DNaze. Smjesa se lagano promiješa okretanjem epruvetice, bez vorteksiranja, jer je DNaza I izuzetno podložna fizikalnoj denaturaciji, te se kratko centrifugira. Nakon inkubacije 15 minuta na sobnoj temperaturi dodaje se 320  $\mu\text{L}$  pufera RBC i smjesa se dobro promiješa. Zatim se dodaje 1120  $\mu\text{L}$  100 %-tnog etanola i lagano promiješa (ne centrifugirati). Nakon dodavanja etanola moguće je prisustvo vidljivih precipitata, no oni ne utječu na protokol. 700  $\mu\text{L}$  uzorka prenese se na *RNeasy MinElute spin* kolonu koja je stavljena na epruveticu za sakupljanje od 2 mL, poklopac se zatvori i centrifugira 30 sekundi na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm). Otopina koja ostane u epruvetici za sakupljanje se odbacuje, a epruvetice se nastavlja koristiti. Postupak od točke dodavanja 700  $\mu\text{L}$  uzorka na kolonu zaključno s bacanjem otopine u epruvetici za sakupljanje ponavlja se sve dok cijeli volumen uzorka nije iskorišten. Zatim se dodaje 500  $\mu\text{L}$  pufera RPE na kolonu, zatvori se čep i centrifugira 30 sekundi na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm). Otopina koja ostane u epruvetici za sakupljanje se odbacuje, a epruvetice se koristi za sljedeći korak. Dodaje se 500  $\mu\text{L}$  pufera RPE na kolonu, lagano zatvori čep i centrifugira 2 minute na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm), a zatim baci otopina koja ostane nakon centrifugiranja zajedno s epruveticom u kojoj se nalazi. Kolona se postavi u čistu epruveticu od 2 mL koja se nalazi u kompletu, otvori čep kolone i centrifugira na maksimalnoj brzini 5 minuta. Ostatak iz epruvetice za sakupljanje se baca. Kolona se prenese u čistu epruveticu od 1,5 mL iz kompleta te ispire dodavanjem 20  $\mu\text{L}$  vode bez RNaza i centrifugiranjem 1 minutu na maksimalnoj brzini tijekom kojeg je čep na koloni zatvoren. Pritom je mrtvi volumen kolone 2  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.4. IZOLACIJA EGZOSOMA IZ PLAZME

Izolacija i pročišćavanje egzosoma i drugih izvanstaničnih vezikula iz seruma/plazme provodi se pomoću *miRCURY Exosome Serum/Plasma* kompleta (Qiagen, Hilden, Germany).

*miRCURY Exosome Serum/Plasma* komplet sadrži:

- pufer A za precipitaciju
- pufer za resuspenziju
- trombin (liofilizat)
- trombinski pufer

Svi reagensi iz kompleta čuvaju se na 2-8 °C zaštićeni od izlaganja svjetlu.

Liofilizirani trombin priprema se za uporabu otapanjem u 400 µL trombinskog pufera, inkubiranjem 1 minutu na sobnoj temperaturi, a zatim se promiješa, alikvotira i pohranjuje na -20 °C. Pritom se jednom odmrznuti alikvoti ne zamrzavaju ponovno. Nakon resuspenzije pripremljena otopina trombina je koncentracije 500 U/mL te stabilna najmanje 6 mjeseci na 2-8 °C.

Za postupak izolacije i pročišćavanja egzosoma iz seruma/plazme pomoću *miRCURY Exosome Serum/Plasma* kompleta potrebni su i:

- pipete i nastavci bez RNaza
- epruvete s koničnim dnom (15 mL)
- epruvete bez RNaza (2 mL)
- mikrocentrifuga za epruvete od 2 mL za centrifugiranje na 20 °C
- vorteks
- led
- hladnjak

Početnom volumenu plazme od 600 µL dodaje se 6 µL trombina, promiješa i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga centrifugira se 10 minuta na 20 °C na 10 000 g. 0,5 mL nadsloja prenese se u novu epruveticu od 2 mL, a zatim miješa 1 volumen uzorka s 0,4 volumena (200 µL) precipitacijskog pufera A. Vorteksira se 5 sekundi (precipitacijski pufer A se ne vorteksira jer će se zapjeniti), a zatim slijedi inkubacija 1 sat na 4 °C, a poželjno je i više sati (preko noći). Nakon toga centrifugira se 5 minuta na 20 °C na 500 g, a zatim se nadsloj

ukloni i baci. Egzosomi se nalaze u talogu na dnu epruvete. Ponovno se kratko centrifugira talog s ciljem uklanjanja preostalog nadsloja, a zatim se dodaje 270  $\mu\text{L}$  pufera za resuspenziju u talog egzosoma i vorteksira kako bi se egzosomi resuspendirali. Istovremena obrada uzoraka podrazumijeva mogućnost korištenja termalnog miksera za epruvetice od 2 mL (1 400 rpm tijekom 15 minuta na 20 °C) za navedeni korak. Konačni volumen izoliranih egzosoma je oko 300  $\mu\text{L}$ .

Izolirani egzosomi pohranjuju se do 6 sati na 2-8 °C, odnosno na -65 °C duži period.

Uzorci egzosoma dobiveni iz više alikvota plazme po 600  $\mu\text{L}$  se sjedine i alikvotiraju po 200  $\mu\text{L}$  za izolaciju RNA u epruvetice bez RNaza od 2 mL.

### 3.2.5. IZOLACIJA miRNA IZ EGZOSOMA

Za izolaciju miRNA iz egzosoma korišten je *miRNAeasy Serum/Plasma Advanced* komplet (Qiagen, Hilden, Germany) namijenjen za izolaciju slobodne ukupne RNA, uključujući i slobodne miRNA, iz malog volumena (200  $\mu\text{L}$ ) seruma i plazme. Izolirane molekule RNA velikog su prinosa.

*miRNeasy Serum/Plasma Advanced* komplet sadrži:

- *RNeasy UCP MinElute spin* kolone (svaka je pakirana uz epruveticu za sakupljanje od 2 mL)
- epruvetice za sakupljanje 1,5 i 2 mL
- RPL pufer - omogućuje lizu proteina, egzosoma i inaktivaciju RNaza
- RPP pufer - omogućuje precipitaciju proteina i drugih onečišćenja
- RWT pufer - omogućuje pročišćavanje RNA, uključujući i miRNA
- RPE pufer - omogućuje pročišćavanje RNA vezane na membranu
- voda bez RNaza

*RNeasy UCP MinElute spin* kolone se pohranjuju na temperaturi 2-8 °C, a ostatak kompleta se čuva na suhom i na sobnoj temperaturi (15-25 °C). Navedeni uvjeti pohrane osiguravaju stabilnost kompleta najmanje 9 mjeseci.

Za postupak izolacije miRNA iz egzosoma pomoću *miRNeasy Serum/Plasma Advanced* kompleta potrebni su i:

- 100 %-tni izopropanol
- 80 %-tni etanol
- sterilni nastavci za pipetu (bez RNaza)
- epruvetice za mikrocentrifugu (1,5 mL ili 2 mL)
- mikrocentrifuga s rotorom za epruvetice od 2 mL (centrifugiranje na sobnoj temperaturi)
- jednokratne rukavice

Prije postupka izolacije potrebno je pripremiti pufer RWT i pufer RPE koji se u kompletu nalaze kao koncentracije. Koncentratu RWT pufera se prije prve uporabe dodaje 2 volumena 96-100 %-tnog etanola, a koncentratu RPE pufera se dodaje 4 volumena 96-100 %-tnog etanola.

#### *Postupak:*

Protokol, kao i svi koraci koji uključuju centrifugiranje, izvodi se na sobnoj temperaturi. Također, puferi moraju biti sobne temperature. Protokol zahtijeva brzo izvođenje analitičkih koraka kako bi se spriječio negativan utjecaj RNaza. Koriste se uzorci svježe izoliranih egzosoma iz plazme ili otopljeni uzorci prethodno smrznutih alikvota egzosoma. 200 µL uzorka dodaje se u epruveticu za mikrocentrifugiranje od 2 mL, a zatim se dodaje 60 µL pufera RPL koji sadrži gvanidin tiocijanat i deterdžente koji potpomažu proces lize i denaturacije proteinskih kompleksa i RNaza. Time je omogućena stabilnost RNA i zaštita od degradacije. Epruveta se zatvori, vorteksira bar 5 sekundi, a zatim inkubira 3 minute na sobnoj temperaturi. Nakon toga se dodaje 20 µL pufera RPP koji se taloži s inhibitorima, točnije plazmatskim/serumskim proteinima koji su prisutni u visokim koncentracijama. Zatvori se epruvetice i vorteksira minimalno 20 sekundi kako bi se omogućilo potpuno miješanje za uspješno razdvajanje faza, a zatim slijedi inkubacija 3 minute na sobnoj temperaturi. Centrifugira se 3 minute na 12 000 g. Supernatant, koji je nužno bezbojan i bistar, volumena oko 230 µL i sadrži RNA, prenese se u novu epruveticu, dodaje se jedan volumen izopropanola koji omogućuje pogodne uvjete za vezanje RNA molekula veličine  $\geq$  18 nt, a zatim se vorteksira. Sav volumen uzorka prenese se na *RNeasy ECP MinElute* kolonu na čiju se silika membranu veže ukupna RNA. Zatvori se poklopac i centrifugira 15 sekundi

na 8 000 g. Prikupljena tekućina koja sadrži onečišćenja se baca, a na kolonu se dodaje 700 µL pufera RWT. Zatvori se poklopac i centrifugira 15 sekundi na 8 000 g. Prikupljena se tekućina baca, a epruvetica za sakupljanje se nastavlja koristiti. Na kolonu se dodaje 500 µL pufera RPE, zatvori se poklopac i centrifugira 15 sekundi na 8 000 g. Prikupljena se tekućina baca. Epruvetica za sakupljanje se nastavlja koristiti. Na kolonu se dodaje 500 µL 80 %-tnog etanola, zatvori se poklopac i centrifugira 2 minute na 8 000 g (10 000 rpm) čime se ispire membrana kolone. Prikupljena tekućina se odbacuje. Kolona se premješta u novu epruveticu za sakupljanje od 2 mL, otvori se poklopac kolone i centrifugira pri punoj brzini 5 minuta čime se postiže sušenje membrane. Ukoliko membrana nije potpuno suha, zaostali etanol interferira u daljnjim reakcijama, primjerice PCR-u. Epruvetica za sakupljanje, zajedno s pripadajućom tekućinom, se baca. Kolona se premješta u novu epruveticu za sakupljanje (1,5 mL) iz kompleta, dodaje se 20 µL vode bez RNaza točno na središte membrane i inkubira jednu minutu, a zatim se poklopac zatvori i centrifugira jednu minutu na maksimalnoj brzini. Time je RNA eluirana s membrane kolone. Mrtvi volumen kolone je 2 µL.

### **3.3. ANALIZA**

#### **3.3.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RNA**

Za određivanje koncentracije izolirane RNA iz FFPE uzoraka tkiva i egzosoma korišten je mikrovolumni spektrofotometar *DeNovix DS-11*. Koncentracija je određena mjerenjem apsorbanције uzorka pri valnoj duljini od 260 nm na kojoj RNA ima apsorpcijski maksimum. Sukladno dobivenim koncentracijama izolirane RNA, pripremljena su razrjeđenja uzoraka za analizu na *Agilent 2100 Bioanalyzeru*.

#### **3.3.2. ANALIZA MOLEKULA RNA IZOLIRANIH IZ UZORAKA FFPE TKIVA**

Za analizu molekula RNA izoliranih iz FFPE uzoraka tkiva korišten je *Agilent RNA 6000 Pico* komplet i *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaj.

*Agilent RNA 6000 Pico* komplet sadrži:

- *RNA Pico* mikrotekućinske čipove
- *Electrode Cleaner* - otopina za čišćenje elektroda

- šprica
- epruvetice bez DNaza/RNaza za smjesu gela i boje
- *RNA 6000 Pico Dye Concentrate* - koncentrat boje
- *RNA 6000 Pico Marker* - marker granica unutar kojih se nalaze RNA molekule i njihovi fragmenti
- *RNA 6000 Pico Conditioning Solution* - otopina za postizanje analitičkih uvjeta
- *RNA 6000 Pico Gel Matrix* - matriks za gel
- *RNA 6000 Pico Ladder* - marker veličine
- *Spin filters* - epruvetice s filterima za centrifugiranje.

Korišteni marker veličine *RNA Ladder* neotvoren se pohranjuje na -20 °C, a pripremljeni alikvoti se pohranjuju na -70 °C. Sve reagensi i smjese reagensa pohranjuju se na 4 °C kako bi se spriječilo propadanje reagensa. Boja i smjesa boje i gela se čuvaju zaštićene od svjetla zbog degradacije tijekom izloženosti svjetlosti.

Za postupak analize RNA iz FFPE uzoraka tkiva pomoću *Agilent RNA 6000 Pico* kompleta potrebni su i:

- stanica za nanošenje gela na čip (engl. *Chip Priming Station*)
- vorteks
- *RNaseZAP* otopina za dekontaminaciju elektroda
- voda bez RNaza
- pipete sa pripadajućim nastavcima bez RNaza
- epruvetice za mikrocentrifugiranje (0,5 mL i 1,5 mL)
- mikrocentrifuga (> 13 000 g)
- grijaći blok za pripremu markera veličine i uzoraka
- *2100 Expert* softver

### **Priprema uzoraka:**

Uzorci RNA pripremaju se u deioniziranoj vodi. Za analizu je poželjna ukupna RNA u koncentracijskom rasponu 200-5000 pg/μL. U slučaju veće koncentracije od navedenih raspona, uzorci se razrjeđuju vodom bez RNaza. Mjerni raspon metode je 50-5000 pg/μL. Osjetljivost metode je 50 pg/μL (u vodi).

### **Priprema stanice za nanošenje gela**

Plastični se poklopac uklanja s nove šprice i postavlja na postolje. Učvrsti se pripadajućim adapterom na samu stanicu za nanošenje gela. Osnovna ploča stanice za nanošenje gela učvršćuje se zatezanjem vijka pomoću odvijača. Visina klipa šprice podešava se otpuštanjem ručice s postolja stanice za nanošenje gela i namještanjem na najviši položaj.

### **Dodatne napomene**

Reagensi se pohranjuju u skladu s uputama navedenim na ambalaži. Prije uporabe reagensi se ostave 30 minuta na sobnoj temperaturi, a otopina markera veličine, boja i smjesa gela i boje se zaštite od izlaganja svjetlosti (svjetlost uzrokuje propadanje boje što rezultira smanjenjem intenziteta signala). Tijekom izvođenja protokola obvezno je nošenje jednokratnih rukavica i korištenje nastavaka za pipetiranje, epruvetica i vode bez RNaza. Uzorci se otapaju na ledu. Potrebno je izbjegavati moguće kontaminacije (prašina i sl.). Prilikom pipetiranja ključno je prisloniti vrh nastavka na dno jažice, nipošto na rubove te obratiti pozornost na gel koji je jako viskozozan. Preporučeno je uzorke RNA i RNA marker veličine prije uporabe izložiti temperaturi od 70 °C tijekom 2 minute čime se postiže denaturacija toplinom, a zatim ih pohraniti na ledu do uporabe. Preporučuje se ne interferirati s uređajem *Agilent 2100 Bioanalyzer* tijekom analize i nikada ne postavljati uređaj na vibrirajuću/pokretnu podlogu. Prije pripremanja smjese boje i gela koncentrat boje se vorteksira desetak sekundi. Za svaki novi komplet neophodno je koristiti novu špricu i novu otopinu za čišćenje elektrode. Čipovi na koje su nanoseni uzorci i potrebni reagensi moraju se iskoristiti unutar 5 minuta nakon pripreme zbog mogućeg isparavanja reagensa. S reagensima treba oprezno rukovati jer komplet *Agilent Small RNA* sadrži dimetil sulfoksid (DMSO, engl. *dimethyl sulfoxide*), potencijalni mutagen.

### **Priprema RNA markera veličine**

Otopina RNA markera veličine se centrifugira, a zatim prenese u epruveticu bez RNaza. Nakon toga se provede denaturacija toplinom (2 minute na 70 °C), a neposredno nakon toga slijedi hlađenje otopine na ledu. Dodaje se 90 µL vode bez RNaza i dobro promiješa. Alikvotira se u epruvetice bez RNaza od 0,5 mL i pohranjuje na -70 °C. Prije uporabe RNA marker veličine otapa se na ledu.

### **Priprema gela**

Pipetira se 550 µL RNA gel matriksa u epruvetice s filterima za centrifugiranje, a zatim se



centrifugira 10 minuta na 1500 g ( $\pm 20\%$ ) na sobnoj temperaturi. Alikvotira se 65  $\mu\text{L}$  filtriranog gela u epruvetice za mikrocentrifugiranje bez RNaza od 0,5 mL. Filtrirani se gel mora iskoristiti unutar 4 tjedna od pripreme, a pohranjuje se na 4 °C.

### **Priprema smjese gel-boje**

Svi se reagensi inkubiraju 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi postigli jednaku temperaturu. Koncentrat boje se vorteksira 10 sekundi, a zatim centrifugira. Dodaje se po 1  $\mu\text{L}$  boje u alikvot filtriranog gela od 65  $\mu\text{L}$ . Otopina se vorteksira do postizanja ujednačene smjese boje. Epruvetica se zatim centrifugira 10 minuta na sobnoj temperaturi na 13 000 g. Pripremljena se smjesa gel-boje treba iskoristiti unutar jednog dana.

### **Nanošenje smjese gel-boje**

Novi RNA čip postavlja se na stanicu za nanošenje gela, a zatim se dodaje 9  $\mu\text{L}$  smjese gel boje u jažicu označenu bijelim slovom G (zadnji stupac, treća jažica). Klip šprice postavlja se na točno 1 mL, a zatim se stanica za nanošenje gela na čip zatvara. Klip se pritisne onoliko koliko je potrebno da bi ga ručica postolja stanice držala. Pričeka se 60 sekundi, a zatim se ručica otpusti tako da se klip šprice sam pomiče prema sve manjem volumenu i dostigne oznaku od barem 0,3 mL. Nakon 5 sekundi ponovno se pritisne klip natrag do oznake 1 mL. Otvara se stanica za nanošenje gela na čip i dodaje se 9  $\mu\text{L}$  smjese gel-boje u jažice označene crnim slovom G (zadnji stupac, prva i druga jažica). Preostali volumen smjese gel-boje ne koristi se ponovno.

### **Nanošenje otopine za postizanje analitičkih uvjeta i markera veličine**

9  $\mu\text{L}$  otopine za postizanje analitičkih uvjeta za RNA dodaje se u jažicu označenu slovima CS (posljednji stupac, posljednja jažica), a zatim se 5  $\mu\text{L}$  RNA markera veličine dodaje u svih 11 jažica namijenjenih za nanošenje uzoraka te u jažicu označenu simbolom ljestvi (engl. *ladder* - ljestve; treći stupac, zadnja jažica).

### **Nanošenje razrjeđenog markera veličine i uzoraka**

Dodaje se 1  $\mu\text{L}$  već pripremljene otopine markera veličine u jažicu označenu simbolom ljestvi (treći stupac, zadnja jažica), a zatim se dodaje i po 1  $\mu\text{L}$  uzorka u jažice označene brojevima 1-11. Ako se analizira manje od 11 uzoraka, odnosno ako postoje jažice u koje nisu nanoseni uzorci, u te se jažice umjesto uzorka dodaje po 1  $\mu\text{L}$  RNA markera veličine. Čip se postavlja horizontalno u vorteks i miješa jednu minutu na 2400 rpm. Unutar 5 minuta nakon završetka

vorteksiranja, čip se premjesti na predviđeno mjesto za čip na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer* koji provodi analizu.

### **3.3.3. ANALIZA MOLEKULA miRNA IZOLIRANIH IZ UZORAKA FFPE TKIVA I EGZOSOMA**

Za analizu molekula miRNA izoliranih iz FFPE uzoraka tkiva i egzosoma korišten je *Agilent Small RNA* komplet i *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaj.

*Agilent Small RNA* komplet sadrži:

- *Small RNA* mikrotekućinske čipove
- *Electrode Cleaner* - otopina za čišćenje elektroda
- šprica
- epruvetice bez DNaza/RNaza za otopinu gel-boje
- *Small RNA Dye Concentrate* - koncentrat boje
- *Small RNA Marker* - marker granica unutar kojih se nalaze RNA molekule i njihovi fragmenti
- *Small RNA Conditioning Solution* - otopina za postizanje analitičkih uvjeta
- *Small RNA Gel Matrix* - matriks za gel
- *Small RNA Ladder* - marker veličine
- *Spin filters* - epruvetice s filterima za centrifugiranje

Korišteni marker veličine *Small RNA Ladder* neotvoren se pohranjuje na -20 °C, a pripremljeni alikvoti se pohranjuju na -70 °C. Svi reagensi i smjese reagensa pohranjuju se na 4 °C kako bi se spriječilo propadanje reagensa. Marker, boja i smjesa boje i gela čuvaju se zaštićeni od svjetla zbog degradacije tijekom izloženosti svjetlosti.

Za postupak analize miRNA iz egzosoma i FFPE uzoraka tkiva pomoću *Small RNA* kompleta potrebni su i:

- stanica za nanošenje gela na čip (engl. *Chip Priming Station*)
- vorteks
- *RNaseZAP* otopina za dekontaminaciju elektroda
- voda bez RNaza

- pipete sa pripadajućim nastavcima bez RNaza
- epruvetice za mikrocentrifugiranje (0,5 mL i 1,5 mL)
- mikrocentrifuga (> 13 000 g)
- grijaći blok za pripremu markera veličine i uzoraka
- *2100 Expert* softver

### **Priprema uzoraka:**

Uzorci RNA pripremaju se u deioniziranoj vodi. Za analizu je poželjna ukupna RNA u koncentracijskom rasponu od 1-100 ng/μL, odnosno pročišćeni uzorci sRNA (< 150 nt) u koncentracijskom rasponu 1-20 ng/μL. U slučaju veće koncentracije od navedenih raspona, uzorci se razrjeđuju vodom bez RNaza. Mjerni raspon metode je 50-2000 pg/μL, a analitički raspon 6-150 nt. Osjetljivost metode je 50 pg/μL.

### **Priprema stanice za nanošenje gela**

Nakon uklanjanja plastičnog poklopca, nova šprica se postavlja na postolje. Učvrsti se pripadajućim adapterom na samu stanicu za nanošenje gela.

Osnovna ploča stanice za nanošenje gela učvršćuje se zatezanjem vijka pomoću odvijača. Visina klipa šprice podešava se otpuštanjem ručice s postolja stanice za nanošenje gela i namještanjem na najniži položaj.

### **Dodatne napomene**

Reagensi se pohranjuju u skladu s uputama navedenim na ambalaži. Prije uporabe reagensi se ostave 30 minuta na sobnoj temperaturi, a otopina markera veličine, boja i smjesa gela i boje se zaštite od izlaganja svjetlosti (svjetlost uzrokuje propadanje boje što rezultira smanjenjem intenziteta signala). Tijekom izvođenja protokola obavezno je nošenje jednokratnih rukavica i korištenje nastavaka za pipetiranje, epruvetice i vode bez RNaza. Uzorci se otapaju na ledu. Potrebno je izbjegavati moguće kontaminacije (prašina i sl.). Prilikom pipetiranja ključno je prisloniti vrh nastavka na dno jažice, nipošto na rubove te obratiti pozornost na gel koji je jako viskoznan. Preporučeno je uzorke RNA i RNA marker veličine prije uporabe izložiti temperaturi od 70 °C tijekom 2 minute čime se postiže denaturacija toplinom, a zatim ih pohraniti na ledu do uporabe. Preporučuje se ne interferirati s uređajem *Agilent 2100 Bioanalyzer* tijekom analize i nikada ne postavljati uređaj na vibrirajuću/pokretnu podlogu. Prije pripremanja smjese boje i gela koncentrat boje se vorteksira desetak sekundi. Za svaki novi komplet neophodno je koristiti novu špricu i novu otopinu za čišćenje elektrode. Čipovi

na koje su nanesen uzorci i potrebni reagensi moraju se iskoristiti unutar 5 minuta nakon pripreme zbog mogućeg isparavanja reagensa. S reagensima treba oprezno rukovati jer komplet *Agilent Small RNA* sadrži dimetil sulfoksid (DMSO, engl. *dimethyl sulfoxide*), potencijalni mutagen.

### **Priprema RNA markera veličine**

Nakon centrifugiranja provodi se denaturacija toplinom (2 minute na 70 °C), a neposredno zatim hlađenje na ledu. RNA marker veličine se zatim razdijeli na alikvote od 0,5 mL i pohranjuje na temperaturi od -70 °C. Prije uporabe otapa se na ledu.

### **Priprema gela**

Ukupni volumen (oko 650 µL) gel matriksa se dodaje u epruvetice s filterima za centrifugiranje. Centrifugira se 15 minuta na 10 000 g ( $\pm 20\%$ ) na sobnoj temperaturi. Filtrirani gel je potrebno iskoristiti unutar 4 tjedna od pripreme. Pohranjuje se na 4 °C.

### **Priprema smjese gel-boje**

Svi se reagensi inkubiraju 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi postigli jednaku temperaturu. Koncentrat boje se vorteksira 10 sekundi, a zatim centrifugira. Dodaje se po 2 µL boje u mikroepipetice bez RNaza od 0,5 mL, a zatim se dodaje 40 µL filtriranog gela i miješa se pipetom ili okretanjem sve dok se ne postigne ujednačena smjesa boje. Vizualno se provjeri homogenost otopine. Epruvetica se centrifugira 10 minuta na 13 000 g na sobnoj temperaturi.

### **Nanošenje smjese gela i boje**

Novi sRNA čip se postavlja na stanicu za nanošenje gela, a zatim se dodaje 9 µL smjese gela i boje u jažicu označenu bijelim slovom G (zadnji stupac, treća jažica). Klip šprice postavlja se na točno 1 mL, a zatim se zatvori stanica za nanošenje gela na čip. Klip se pritisne onoliko koliko je potrebno da bi ga ručica postolja stanice držala. Nakon 60 sekundi otpusti se ručica tako da se klip šprice sam pomiče prema sve manjem volumenu i dostigne oznaku od barem 0,3 mL. Nakon 5 sekundi ponovno se pritisne klip natrag do oznake 1 mL. Otvara se stanica za nanošenje gela na čip i dodaje se 9 µL smjese gela i boje u jažice označene crnim slovom G (zadnji stupac, prva i druga jažica). Preostali volumen smjese gel-boje ne koristi se ponovno.

### **Nanošenje otopine za postizanje analitičkih uvjeta i markera veličine**

Dodaje se 9  $\mu\text{L}$  otopine za postizanje analitičkih uvjeta za RNA u jažicu označenu slovima CS (posljednji stupac, posljednja jažica), a zatim se dodaje i 5  $\mu\text{L}$  RNA markera veličine u svih 11 jažica u koje se kasnije nanose i uzorci te u jažicu označenu simbolom ljestvi (engl. *ladder* - ljestve; treći stupac, zadnja jažica).

### **Nanošenje markera veličine i uzoraka**

1  $\mu\text{L}$  već pripremljene otopine markera veličine dodaje se u jažicu označenu simbolom ljestvi (treći stupac, zadnja jažica). Volumen od 1  $\mu\text{L}$  uzorka dodaje se u jažice označene brojevima 1-11. Ukoliko se nanosi manje od 11 uzoraka, odnosno postoje jažice u koje nisu nanoseni uzorci, u te se jažice umjesto uzorka dodaje 1  $\mu\text{L}$  RNA markera veličine. Čip se postavlja horizontalno u vorteks i miješa jednu minutu na 2400 rpm. Unutar 5 minuta nakon završetka vorteksiranja, čip se premjesti na predviđeno mjesto na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer* koji provodi analizu.

## **3.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program *MedCalc Statistical Software*, v22.020 (*MedCalc Software Ltd*, Ostend, Belgium). Za ispitivanje normalnosti raspodjele podataka korišten je D'Agostino-Pearsonov test. Za utvrđivanje jednakosti medijana dvaju međusobno nezavisnih uzoraka iste populacije korišten je Mann-Whitneyev test nezavisnih uzoraka. Rezultat statističke analize  $P < 0,05$  smatra se statistički značajnim.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju korišteno je 13 uzoraka krvi i FFPE tkiva pacijenata s potvrđenom dijagnozom kolorektalnog karcinoma iz KBC Sestre milosrdnice. Koncentracije miRNA i RNA izmjerene su pomoću *DeNovix DS-11* mikrovolumnog spektrofotometra.

Deskriptivnom je statistikom izmjerenih koncentracija RNA izoliranih iz uzoraka FFPE tkiva dobivena aritmetička sredina koja iznosi 553,45 ng/μL, a standardna devijacija 330,65 ng/μL. Također je određen DV200, odnosno udio RNA molekula većih od 200 nt koji je prikazan u Tablici 1. iz čega možemo zaključiti da su 4 uzorka loše kvalitete (DV200 < 30 %) i njihova kvaliteta ne bi bila zadovoljavajuća za određene primjene, poput sekvenciranja.

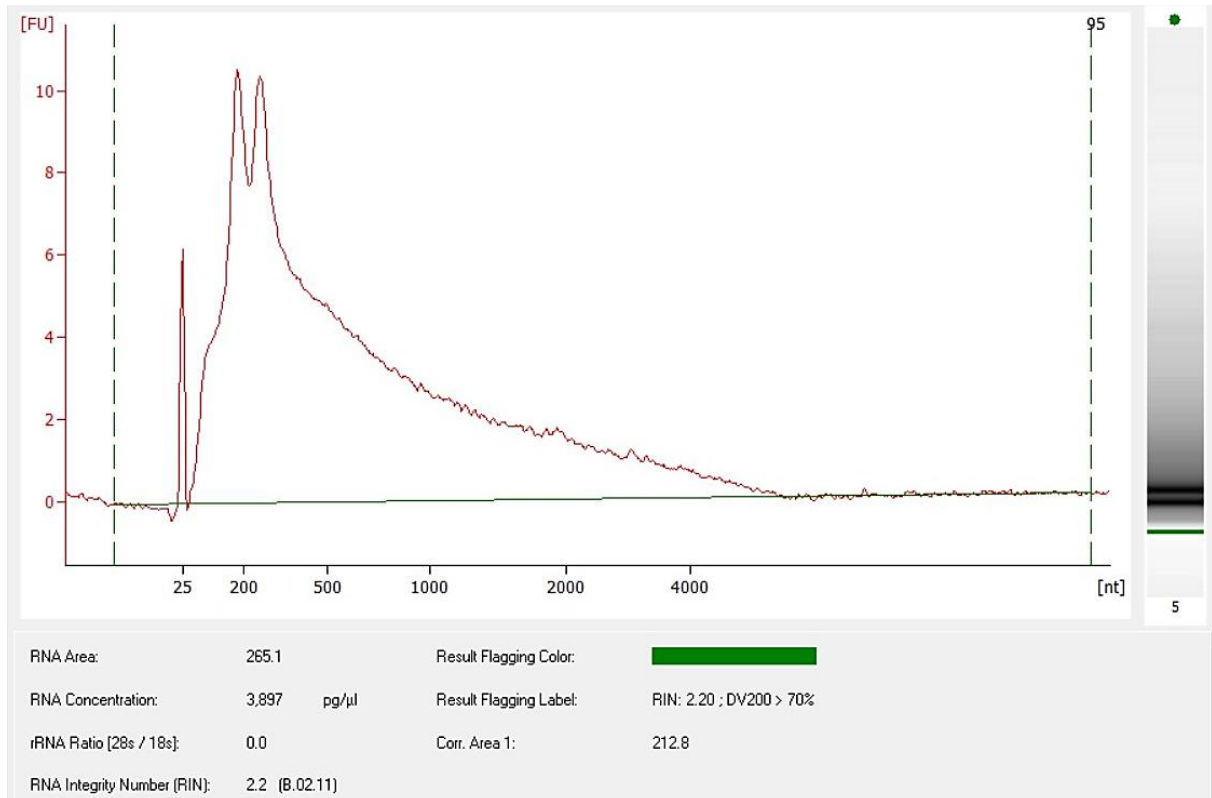
Tablica 1. Raspodjela uzoraka prema DV200 vrijednosti.

DV200	Broj uzoraka/13
> 70 %	4
50–70 %	3
30–50 %	2
< 30 %	4

Koncentracije miRNA izolirane iz egzosoma izmjerene su u rasponu od 3,78 do 38,64 ng/μL, a medijan iznosi 8,31 ng/μL ( $P < 0,0001$ ). Udio izolirane egzosomske miRNA nalazi se u rasponu od 5 do 80 %, a medijan iznosi 19 %.

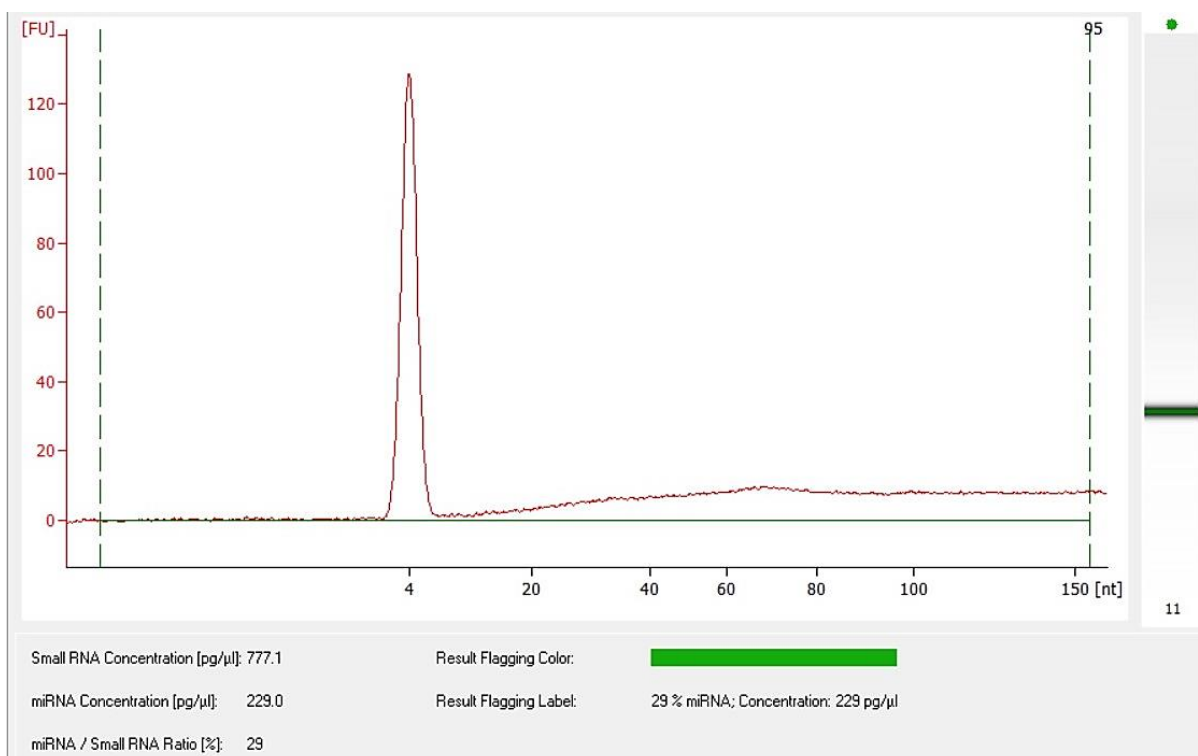
Za koncentracije miRNA izolirane iz uzoraka FFPE tkiva dobivena aritmetička sredina iznosi 833,33 ng/μL, a standardna devijacija 415,34 ng/μL. Za udio izolirane miRNA iz uzoraka FFPE tkiva dobivena aritmetička sredina iznosi 47,92 %, a standardna devijacija 19,32 %. Izmjerene RIN vrijednosti nalaze se u rasponu od 2,1 do 2,6, a medijan iznosi 2,4.

U nastavku su priloženi elferogrami izolirane RNA iz FFPE uzoraka tkiva, miRNA izolirane iz FFPE uzoraka tkiva i miRNA izolirane iz egzosoma. Sva tri elferograma odnose se na istog pacijenta. Područje sRNA na elferogramu obuhvaća dio do 200 nt, dok područje miRNA obuhvaća dio elferograma 10-40 nt.



Slika 6. Elferogram izolirane RNA iz uzorka FFPE tkiva, dobiven na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

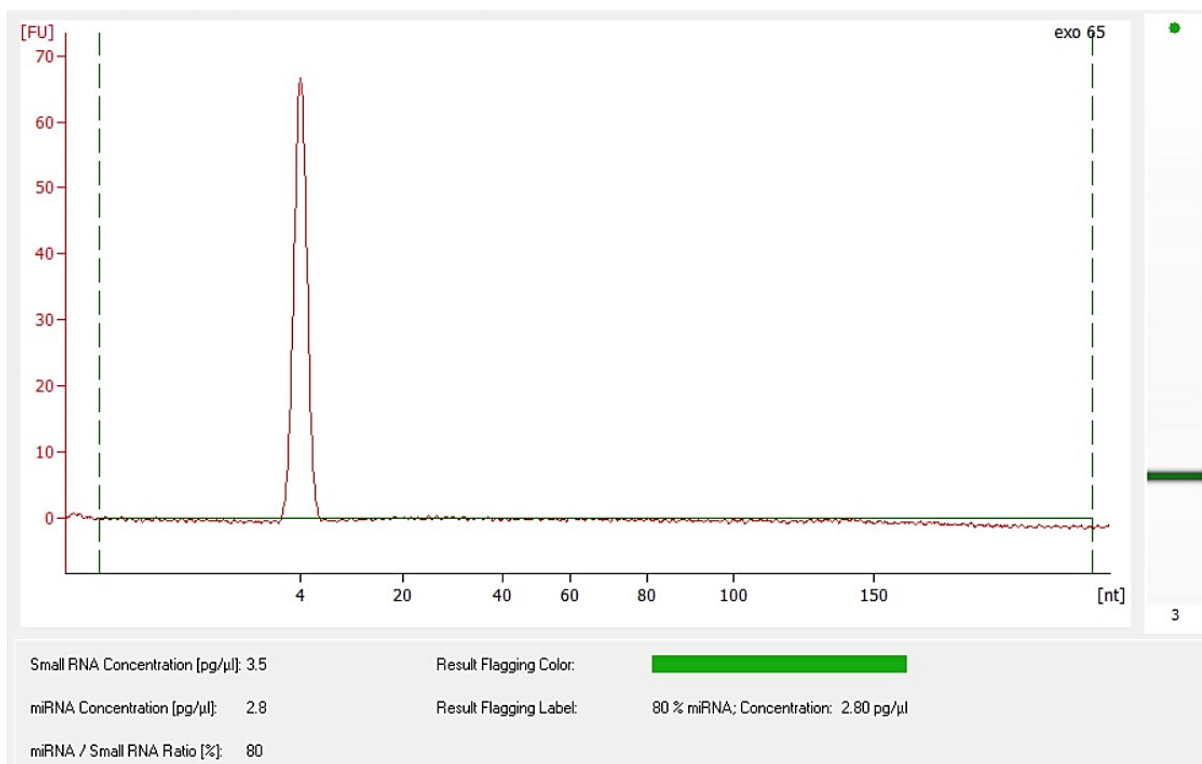
Rezultati analize RNA izolirane iz uzorka FFPE tkiva na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer* prikazani su kao elferogram na kojem su vidljivi vršci i kao gel-elektroforeza na kojoj se uočavaju vrpce. RIN za izoliranu RNA iznosi 2,20, što se tumači kao veća degradacija uzorka, no uzorak je ipak prihvatljiv za daljnju analizu. Vrijednost DV200 iznosi >70 % što znači da je više od 70 % molekula RNA dulje od 200 nt i moguće je stvaranje knjižnice. Vršak vidljiv na 25 nt je fragment RNA koji služi kao marker prema kojem se adekvatno postavlja ljestvica veličina. Vršak na području oko 200 nt je podijeljen na dva manja zbog prevelike koncentracije fragmenata približno jednake veličine kao posljedica degradacije. Omjer 28S rRNA i 18S rRNA nije izmjeren jer se vršci 28S rRNA i 18S rRNA ne uočavaju. U optimalnim uvjetima uočava se vršak 28S rRNA na području veličine oko 1900 nt i vršak 18S rRNA na području veličine oko 3800 nt. Tada je očekivani omjer rRNA je 2:1.



Slika 7. Elferogram izolirane miRNA iz uzorka FFPE tkiva, dobiven na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

Rezultati analize miRNA izolirane iz uzorka FFPE tkiva na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer* prikazani su kao elferogram na kojem su vidljivi vršci i kao gel-elektroforeza na kojoj se uočavaju vrpce. Vršak jasno vidljiv na 4 nt je fragment RNA koji služi kao marker prema kojem se adekvatno postavlja ljestvica veličina. Vršci izolirane miRNA su očekivani u području 10-40 nt. Iako se očekivani vršci izolirane miRNA ne ističu, prisutna je određena količina miRNA širokog raspona veličine čija je izmjerena koncentracija 229 pg/μL što se može tumačiti kao prisutnost različitih molekula sRNA ili degradacija RNA molekula. Udio miRNA u ukupnoj izoliranoj sRNA iznosi 29 %.

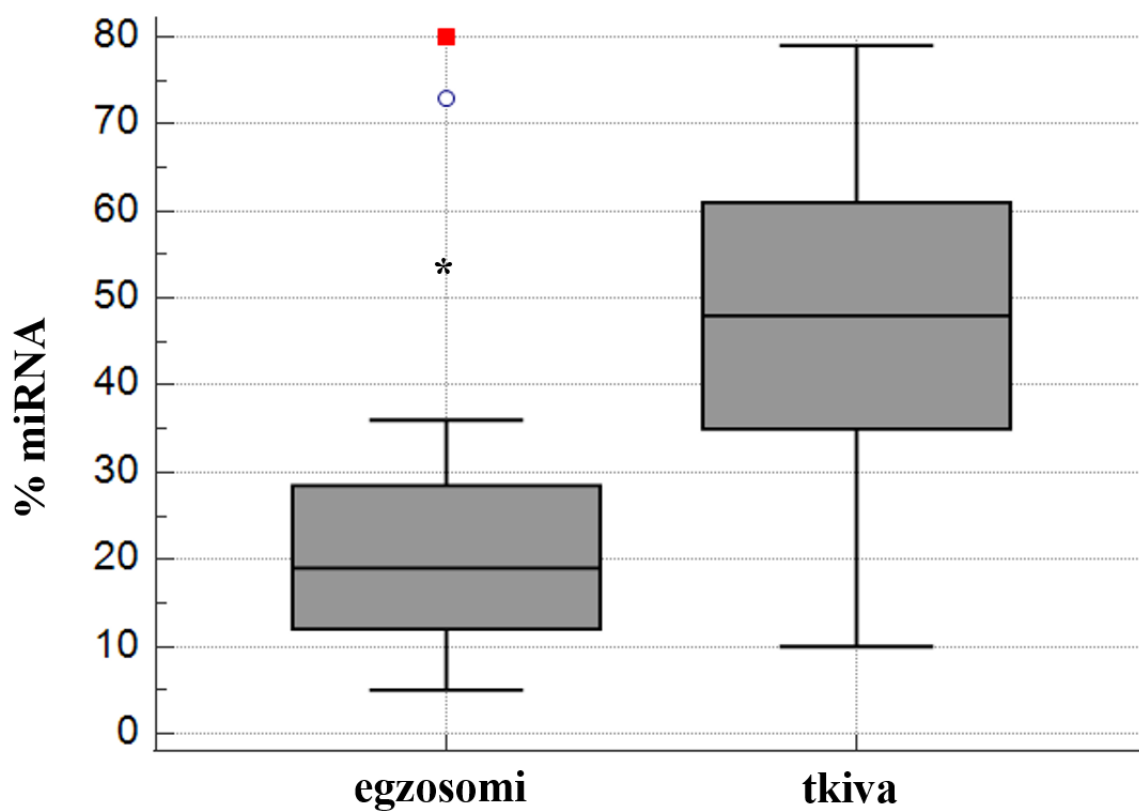




Slika 8. Elferogram izolirane miRNA iz egzosoma, dobiven na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

Rezultati analize miRNA izolirane iz egzosoma na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer* prikazani su kao elferogram na kojem su vidljivi vršci i kao gel-elektroforeza na kojoj se uočavaju vrpce. Vršak jasno vidljiv na 4 nt je fragment RNA koji služi kao marker prema kojem se adekvatno postavlja ljestvica veličina. Iako u uzorcima egzosoma nisu jasno vidljivi vršci miRNA koje očekujemo u području 10-40 nt, uređaj je detektirao određeni postotak miRNA u svim analiziranim uzorcima. Izmjerena koncentracija izolirane miRNA iz egzosoma iznosi 2.8 pg/μL, a udio miRNA u ukupnoj izoliranoj sRNA iz egzosoma iznosi 80 %.

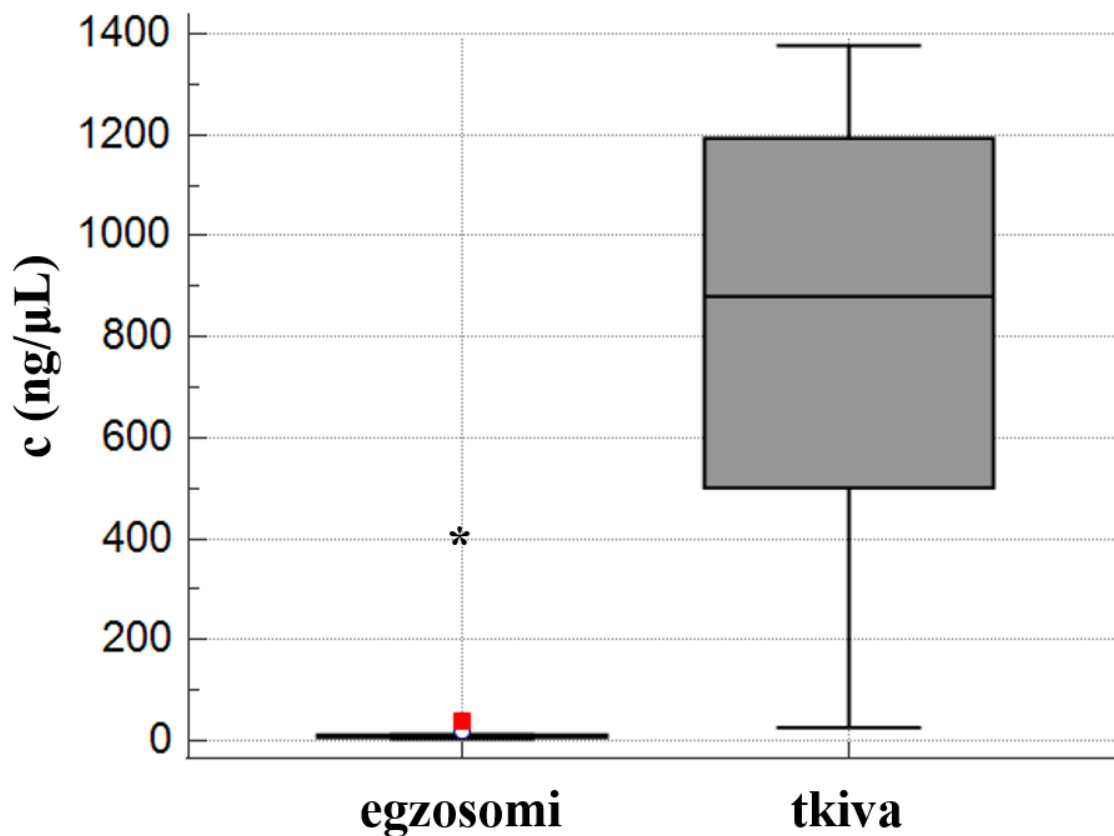
Mann-Whitneyevim testom uspoređeni su medijani dvaju međusobno nezavisnih uzoraka iste populacije (udio egzosomske miRNA i udio miRNA iz FFPE uzorka tkiva), čime se utvrđuje jesu li medijani tih dvaju uzoraka jednaki ili ne. U slučaju kad je P-vrijednost manja od 0,05 radi se o statistički značajnoj razlici. Dobivena P-vrijednost dvosmjernog testa iznosi 0,0138, što znači da se odbacuje nul-hipoteza prema kojoj su medijani ovih dvaju uzoraka jednaki, odnosno dokazana je statistički značajna razlika za udio miRNA iz egzosoma i udio miRNA iz FFPE uzorka tkiva.



Slika 9. Prikaz udjela miRNA izolirane iz egzosoma i miRNA izolirane iz FFPE uzorka tkiva.

\*označava statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ).

Mann-Whitneyevim testom uspoređeni su i medijani dvaju međusobno nezavisnih uzoraka iste populacije (koncentracija egzosomske miRNA i koncentracija miRNA iz FFPE uzorka tkiva). Dobivena P-vrijednost dvosmjernog testa je  $< 0,0001$  čime se odbacuje nul-hipoteza da su medijani ovih dvaju uzoraka jednaki, odnosno, dokazana je statistički značajna razlika između koncentracije miRNA izolirane iz egzosoma i koncentracije miRNA izolirane iz FFPE uzorka tkiva.



Slika 10. Prikaz koncentracije miRNA izolirane iz egzosoma i koncentracije miRNA izolirane iz FFPE uzorka tkiva. \*označava statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ).

Brojna istraživanja dokazala su uspješnost izolacije egzosoma i egzosomske RNA što je potvrđeno analizom na *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaju pomoću *RNA 6000 Pico* kompleta. Kim i suradnici su 2022. godine usporedili egzosomske RNA iz uzoraka plazme zdravih donora i preminulih osoba izoliranih pomoću tri komercijalna izolacijska kompleta i određivanjem na *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaju. Dobiveni elferogrami sadrže vrške u području sRNA (< 200 nt), no nema vršaka koji se odnose na rRNA. Najveći prinos ostvaren je *exoRNeasy* izolacijskim kompletom (Qiagen, Hilden, Njemačka).

Tang i suradnici su 2017. godine također uspoređivali različite izolacijske metode s ciljem izolacije egzosomske RNA iz seruma i iz stanične kulture, dok je kao metoda za određivanje prinosa egzosomske RNA korišten i *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaja uz *Agilent RNA 6000 Pico* komplet. Rezultati su pokazali da je najveći prinos postignut korištenjem *ExoQuick* i *exoRNeasy* izolacijskih kompleta, odnosno *exoRNeasy* izolacijskim kompletom kojim je dobivena najizraženija vrpca sRNA. Kod svih ispitivanih metoda vrpce rRNA nisu bile vidljive.

Manda i suradnici su 2018. godine istraživali egzosome kao potencijalni izvor EGFR-a kod EGFR-pozitivnih glioma i pritom su korištenjem *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaja utvrdili uspješnu izoliralaciju sRNA (RNA veličine < 200 nt) iz egzosoma pomoću *Total Exosome RNA and Protein* izolacijskog kompleta (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, SAD).

Korištenjem *ExoQuick* komercijalnog kompleta (System Biosciences, Palo Alto, Kalifornija, SAD), Veerman i suradnici su 2021. godine dobili najveći prinos RNA iz egzosoma ispitujući ukupnu izoliranu RNA iz izvanstaničnih vezikula pomoću 5 različitih metoda i mjerenjem na *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaju.

Izolacijski komercijalni kompleti korišteni za izradu ovog rada, uključujući i *miRNeasy Serum/Plasma Advanced* komplet kojim je izolirana miRNA iz egzosoma u plazmi, kao i spomenuti *exoRNeasy* i *ExoQuick* komplet, koriste metodu koja se temelji na korištenju spin kolona s afinitetnom membranom (engl. *membrane affinity spin column*). S obzirom na druga istraživanja kojima je uspješno izolirana sRNA istom metodom i dobiven je vršak u području sRNA, očekivana je uspješna izolacija sRNA.

Helwa i suradnici su komparativnom studijom 2017. godine utvrdili da sva tri ispitivana komercijalna kompleta (*miRCURY*, *ExoQuick*, *Total Exosome Isolation Reagent*) i diferencijalno ultracentrifugiranje uspješno izoliraju egzosomske RNA dobre kvalitete.

Analizom na *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaju dobiveni su elferogrami s jasno vidljivim vrškom u području 25-200 nt, bez vidljivih vršaka rRNA. Utvrdili su da između rezultata ispitivanih kompleta ne postoji statistički značajna razlika. S obzirom da nije utvrđena statistički značajna razlika između *ExoQuick* kompleta kojim se ostvaruje visok prinos egzosomskih RNA molekula i korištenog *miRCURY* kompleta, u izradi ovog rada je očekivana uspješna izolacija egzosomske RNA korištenim *miRCURY* kompletom.

D'Andrade i van den Berg su 2020. godine izolirali ukupnu RNA iz 10 godina pohranjenih FFPE i FF uzoraka zdravog i tumorskog plućnog tkiva pomoću *Qiagen miRNeasy* kompleta i *miRNeasy FFPE* kompleta koji je korišten u izradi ovog rada. Utvrđen je veći prinos RNA iz uzoraka FFPE tkiva (tumorskog i zdravog) nego FF tkiva (također tumorskog i zdravog). Kod obje vrste uzoraka određena je viša koncentracija RNA u tumorskom tkivu nego u zdravom tkivu. Dobiveni omjer 260/280 za FFPE uzorak tkiva iznosi 1,8 (za RNA je idealna vrijednost približna 2,0) a omjer 260/230 1,9 (za RNA je idealna vrijednost 2,0-2,2), što upućuje na malu kontaminaciju tijekom izolacijskog postupka. Dobivene RIN vrijednosti na *Agilent 2100 Bioanalyzer* uređaju iznose 2,3 za zdravo tkivo i 2,4 za tumorsko tkivo. Niske RIN vrijednosti su karakteristične za FFPE tkiva zbog degradacije uslijed fiksacijskog postupka. Dobiveni elferogrami sRNA iz uzoraka FF tkiva prikazuju jasne vrške sRNA, dok su na elferogramu uzorka FFPE tkiva vidljiva difuzna, široka područja, bez jasno istaknutih vršaka što se tumači kao degradacija uzorka. Drugim riječima, molekule sRNA vidljive kao vršci na elferogramu uzorka FF tkiva su u uzorku FFPE tkiva degradirane. Pritom nastaju fragmenti molekula RNA različitih veličina te se detektiraju molekule širokog raspona veličine, što je vidljivo i na slici 7.

## 5. ZAKLJUČCI

- Koncentracija RNA u uzorcima FFPE tkiva je očekivano viša u odnosu na egzosome.
- Koncentracija miRNA u uzorcima FFPE tkiva ( $833,33 \pm 415,34$  ng/ $\mu$ L) je očekivano viša u odnosu na egzosome (raspon od 3,78 do 38,64 ng/ $\mu$ L, a medijan iznosi 8,31 ng/ $\mu$ L).
- Udio miRNA je očekivano viši u uzorcima FFPE tkiva ( $47,92 \pm 19,32$  %) u odnosu na uzorke egzosoma (raspon od 5 do 80 %, a medijan iznosi 19 %).
- Kvaliteta uzoraka RNA izoliranih iz FFPE tkiva očekivano ima visok stupanj degradacije na što upućuju niske RIN vrijednosti (raspon od 2,1 do 2,6, a medijan iznosi 2,4).
- Jasni vršci miRNA nisu uočeni na dobivenim elferogramima. Mogući uzroci su niska koncentracija miRNA i prisutnost više vrsta malih RNA.

## 6. POPIS KRATICA

3'UTR	3'-netranslatirana regija (engl. <i>three prime untranslated region</i> )
5mC	5'-metilcitozin (engl. <i>5-methylcytosine</i> )
AGO	argonaut protein
APC	adenomatozna polipoza debelog crijeva (engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> )
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
CD	klaster diferencijacije (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
circRNA	cirkularna RNA (engl. <i>circular RNA</i> )
CRC	kolorektalni karcinom (engl. <i>colorectal carcinoma</i> )
CRNDE-h	engl. <i>colorectal neoplasia differentially expressed-h</i>
CS	otopina za postizanje analitičkih uvjeta (engl. <i>conditioning solution</i> )
CSC	matične stanice raka (engl. <i>cancer stem cells</i> )
CTC	cirkulirajuća tumorska stanica (engl. <i>circulating tumor cell</i> )
DDX17	engl. <i>Dead Box helicase 17</i>
DDX5	engl. <i>Dead Box protein 5</i>
DGCR8	engl. <i>DiGeorge critical region 8</i>

dIDNA	dvolančana DNA
dIRNA	dvolančana RNA
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DV200	vrijednost raspodjele (engl. <i>distribution value 200</i> )
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. <i>epithelial mesenchymal transition</i> )
ESCRT	endosomalni sortirajući kompleksi zaduženi za transport (engl. <i>endosomal sorting complex required for transport</i> )
FF	svježe smrznuta (engl. <i>fresh frozen</i> )
FFPE	tkiva fiksirana formalinom i uklopljena u parafin (engl. <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i> )
HMW	visokomolekularna (engl. <i>high molecular weight</i> )
Hsp	proteini toplinskog šoka (engl. <i>heat shock proteins</i> )
ILV	intraluminalna vezikula (engl. <i>intraluminal vesicle</i> )
jIDNA	jednolančana DNA
KRAS	engl. <i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
LC-MS/MS	tandemska spektrometrija masa udružena s tekućinskom kromatografijom (engl. <i>liquid chromatography – mass spectrometry</i> )
LIF	laserom inducirana fluorescencija (engl. <i>laser-induced fluorescence</i> )



LMW	niskomolekularno (engl. <i>low molecular weight</i> )
lncRNA	duga nekodirajuća RNA (engl. <i>long non-coding RNA</i> )
miRISC	miRNA-induciran utišavajući kompleks (engl. <i>miRNA-induced silencing complex</i> )
miRNA	mikro RNA (engl. <i>micro RNA</i> )
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
MVB	multivezikularno tijelo (engl. <i>multivesicular body</i> )
ncRNA	nekodirajuća RNA (engl. <i>non-coding RNA</i> )
NGS	sekvenciranje sljedeće generacije (engl. <i>next-generation sequencing</i> )
nSMase	neutralna sfingomijelinaza (engl. <i>neutral sphingomyelinase</i> )
nt	nukleotid
OD	optička gustoća (engl. <i>optical density</i> )
p53	tumorski protein p53
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
piRNA	piwi-interaktivna RNA (engl. <i>piwi-interacting RNA</i> )
pre-miRNA	prekursorska miRNA (engl. <i>precursor miRNA</i> )
pri-miRNA	primarna miRNA (engl. <i>primary miRNA</i> )

qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RAS/MAPK	engl. <i>rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase</i>
RBP	RNA vezujući protein (engl. <i>RNA-binding protein</i> )
RIN	broj integriteta RNA (engl. <i>RNA integrity number</i> )
RISC	RNA-inducirani utišavajući kompleks (engl. <i>RNA induced silencing complex</i> )
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
rRNA	ribosomska RNA (engl. <i>ribosomal RNA</i> )
RT-qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze spregnuta s reverznom transkripcijom (engl. <i>reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction</i> )
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
siRNA	mala interferirajuća RNA (engl. <i>small interfering RNA</i> )
snoRNA	mala nukleolarna RNA (engl. <i>small nucleolar RNA</i> )
snRNA	mala nuklearna RNA (engl. <i>small nuclear RNA</i> )
sRNA	mala RNA (engl. <i>small RNA</i> )
TRBP	engl. <i>transactivation response element RNA-binding protein</i>
tRNA	transportna RNA (engl. <i>transfer RNA</i> )

UDG uracil DNA glikozilaza (engl. *uracil DNA glycosylase*)

XPO5 eksportin 5 (engl. *exportin 5*)

## 7. LITERATURA

- Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*, 2013, 113, 1-11.
- Belder N, Coskun Ö, Doganay Erdogan B, Ilk O, Savas B, Ensari A, Özdağ H. From RNA isolation to microarray analysis: Comparison of methods in FFPE tissues. *Pathol Res Pract*, 2016, 212, 678-685.
- Cazzato G, Caporusso C, Arezzo F, Cimmino A, Colagrande A, Loizzi V, Cormio G, Lettini T, Maiorano E, Scarcella VS, Tarantino P, Marrone M, Stellacci A, Parente P, Romita P, De Marco A, Venerito V, Foti C, Ingravallo G, Rossi R, Resta L. Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Samples for Next Generation Sequencing: Problems and Solutions. *Genes (Basel)*, 2021, 12, 1472.
- Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30, 255-289.
- Couch Y, Buzàs EI, Di Vizio D, Gho YS, Harrison P, Hill AF, Lötval J, Raposo G, Stahl PD, Théry C, Witwer KW, Carter DRF. A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10, 12144.
- Craven RA, Cairns DA, Zougman A, Harnden P, Selby PJ, Banks RE. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded renal tissue samples by label-free MS: assessment of overall technical variability and the impact of block age. *Proteomics Clin Appl*, 2013, 7, 273–282.
- D’Andrade P, van den Berg A. (2020). *MicroRNA analysis of archival FFPE samples by microarray* (Application Note). Preuzeto s [www.agilent.com](http://www.agilent.com), pristupljeno 12. 9. 2024.

- Deng T, Hasan I, Roy S, Liu Y, Zhang B, Guo B. Advances in mRNA nanomedicines for malignant brain tumor therapy. *Smart Materials in Medicine*, 2023, 4, 257-265.
- Dimik M, Abeysinghe P, Logan J, Mitchell M. The exosome: a review of current therapeutic roles and capabilities in human reproduction. *Drug Deliv Transl Res*, 2023, 13, 473–502.
- Fareh M, Yeom KH, Haagsma AC, Chauhan S, Heo I, Joo C. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun*, 2016, 7, 13694.
- Farrel R Jr. Quality Control for RNA Preparations. U: RNA Methodologies (Fifth Edition) Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Farrel R Jr, urednik, York, Academic Press, 2017, str. 167-185.
- Farrell Jr RE. Quality control for RNA preparations. U: RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Farrell Jr RE, urednik, Pennsylvania, Academic Press, 2023, 183-200.
- Formaldehyde Solution (Code C62229), 2024., <https://www.cancer.gov/>, pristupljeno 19. 3. 2024.
- Gao XH, Li J, Gong HF, Yu GY, Liu P, Hao LQ, Liu LJ, Bai CG, Zhang W. Comparison of Fresh Frozen Tissue With Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for Mutation Analysis Using a Multi-Gene Panel in Patients With Colorectal Cancer. *Front Oncol*, 2020, 10, 310.
- Graf E. (2017). *Simplified DV<sub>200</sub> Evaluation with the Agilent 2100 Bioanalyzer System* (Technical Overview). Preuzeto s [www.agilent.com](http://www.agilent.com), pristupljeno 28. 2. 2024.
- Guo Q, Lakatos E, Bakir IA, Curtius K, Graham TA, Mustonen V. The mutational signatures of formalin fixation on the human genome. *Nat Commun*, 2022, 13, 4487.

- Han QF, Li WJ, Hu KS, Gao J, Zhai WL, Yang JH, Zhang SJ. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*, 2022, 21, 207.
- Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, 1983, 97, 329–339.
- Helwa I, Cai J, Drewry MD, Zimmerman A, Dinkins MB, Khaled ML, Seremwe M, Dismuke WM, Bieberich E, Stamer WD, Hamrick MW, Liu Y. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLoS One*, 2017, 12, 0170628.
- Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L, Wang L. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14, 319.
- Huang X, Zhu X, Yu Y, Zhu W, Jin L, Zhang X, Li S, Zou P, Xie C, Cui R. Dissecting miRNA signature in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Lett*, 2021, 501, 66-82.
- Iida K, Whitlow MB, Nussenzweig V. Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement. *Journal of Immunology*, 1991, 147, 2638–2642.
- Janani B, Vijayakumar M, Priya K, Kim JH, Prabakaran DS, Shahid M, Al-Ghamdi S, Alsaidan M, Othman Bahakim N, Hassan Abdelzaher M, Ramesh T. EGFR-Based Targeted Therapy for Colorectal Cancer-Promises and Challenges. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10, 499.
- Jiang LH, Zhang HD, Tang JH. MiR-30a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer. *J Oncol*. 2018, 2018, 5167829.

- Jin W. Regulation of Src Family Kinases during Colorectal Cancer Development and Its Clinical Implications. *Cancers (Basel)*, 2020, 12, 1339.
- Johnstone R, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: Transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*, 1989, 74, 1844–1851.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262, 9412–9420.
- Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Ochiai E, Osawa M. MicroRNA Stability in FFPE Tissue Samples: Dependence on GC Content. *PLoS One*, 2016, 11.
- Kar R, Dhar R, Mukherjee S, Nag S, Gorai S, Mukerjee N, Mukherjee D, Vatsa R, Chandrakanth Jadhav M, Ghosh A, Devi A, Krishnan A, Thorat ND. Exosome-Based Smart Drug Delivery Tool for Cancer Theranostics. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9, 577-594.
- Karabulut S, Şen S, Soyduñç HO, Doğan İ, Taştekin D, Karabulut M, Duman M, Turan M. Investigation of the potential of miRNA candidates as non-invasive biomarkers for the diagnosis and follow-up of colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, 2024, 254, 155094.
- Kim SW. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer. *Korean J Gastroenterol*, 2017, 25, 69, 206-211.
- Kim SY, Jang S, Lee S, Park JT, Lee SJ, Kim HS. Characterization of Exosomes and Exosomal RNAs Isolated from Post-Mortem Body Fluids for Molecular Forensic Diagnosis. *Diagnostics*, 2022, 12, 2153.

- Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank*, 2013, 11, 101-106.
- Lee D, Shin C. Emerging roles of DROSHA beyond primary microRNA processing. *RNA Biol*, 2018, 15, 186-193.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 2004, 23, 4051-4060.
- Li M, Marin-Muller C, Bharadwaj U, Chow KH, Yao Q, Chen C. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg*, 2009, 33(4), 667-684.
- Li S, Liu J, Zhao M, Su Y, Cong B, Wang Z. RNA quality score evaluation: A preliminary study of RNA integrity number (RIN) and RNA integrity and quality number (RNA IQ). *Forensic Sci Int*, 2024, 357, 111976.
- Li X, Corbett AL, Taatizadeh E, Tasnim N, Little JP, Garnis C, Daugaard M, Guns E, Hoorfar M, Li ITS. Challenges and opportunities in exosome research-Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL Bioeng*, 2019, 3, 011503.
- Lin Y, Dong ZH, Ye TY, Yang JM, Xie M, Luo JC, Gao J, Guo AY. Optimization of FFPE preparation and identification of gene attributes associated with RNA degradation. *NAR Genom Bioinform*, 2024, 6.
- Liu T, Zhang X, Gao S, Jing F, Yang Y, Du L, Zheng G, Li P, Li C, Wang C. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016, 7, 85551–85563.
- Lotfi E, Kholghi A, Golab F, Mohammadi A, Barati M. Circulating miRNAs and lncRNAs serve as biomarkers for early colorectal cancer diagnosis. *Pathol Res Pract*, 2024, 255, 155187.



- Manda SV, Kataria Y, Tatireddy BR, Ramakrishnan B, Ratnam BG, Lath R, Ranjan A, Ray A. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. *J Neurosurg*, 2018, 128, 1091-1101.
- Masotti A, Caputo V, Prudente S, Bottazzo GF. (2006). *Analysis of small RNAs with the Agilent 2100 bioanalyzer* (Application Note). Preuzeto s [www.agilent.com](http://www.agilent.com), pristupljeno 28. 2. 2024.
- Mathieson W, Thomas GA. Why Formalin-fixed, Paraffin-embedded Biospecimens Must Be Used in Genomic Medicine: An Evidence-based Review and Conclusion. *J Histochem Cytochem*, 2020, 68, 543-552.
- Matsubara T, Soh J, Morita M, Uwabo T, Tomida S, Fujiwara T, Kanazawa S, Toyooka S, Hirasawa A. DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing. *Biomed Res Int*, 2020, 2020, 9349132.
- McMillan DB, Harris RJ. Introduction. U: An Atlas of Comparative Vertebrate Histology. McMillan DB, Harris RJ, urednici, Academic Press, 2018, str. 9-29.
- Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY. microRNA strand selection: Unwinding the rules. *WIREs RNA*, 2021, 12, 1627.
- Mohammed OA. From strings to signals: Unraveling the impact of miRNAs on diagnosis, and progression of colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, 2023, 251, 154857.
- Mosquera-Heredia MI, Morales LC, Vidal OM, Barceló E, Silvera-Redondo C, Vélez JI, Garavito-Galofre P. Exosomes: Potential Disease Biomarkers and New Therapeutic Targets. *Biomedicines*, 2021, 9, 1061.

- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3.
- Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 1983, 33, 967-978.
- Peiró-Chova L, Peña-Chilet M, López-Guerrero JA, García-Giménez JL, Alonso-Yuste E, Burgues O, Lluch A, Ferrer-Lozano J, Ribas G. High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. *Virchows Arch*, 2013, 463, 765-774.
- Petrik J, Verbanac D, Fabijanec M, Hulina-Tomašković A, Čeri A, Somborac-Baćura A, Petlevski R, Grdić Rajković M, Rumora L, Krušlin B, Štefanović M, Ljubičić N, Baršić N, Hanžek A, Bočkor L, Čelap I, Demirović A, Barišić K. Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer: Detection Systems and Clinical Utility. *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 13582.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJB. Lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183, 1161–1172.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200, 373-383.
- Roberts L, Bowers J, Sensinger K, Lisowski A, Getts R, Anderson MG. Identification of methods for use of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in RNA expression profiling. *Genomics*, 2009, 94, 341-348.
- Rossouw SC, Bendou H, Blignaut RJ, Bell L, Rigby J, Christoffels A. Evaluation of Protein Purification Techniques and Effects of Storage Duration on LC-MS/MS Analysis of Archived FFPE Human CRC Tissues. *Pathol Oncol Res*, 2021, 27, 622855.

- Rupp GM, Locker J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques*, 1988, 6, 56–60.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 2006, 7, 3.
- Shao H, Chung J, Issadore D. Diagnostic technologies for circulating tumour cells and exosomes. *Biosci Rep*, 2015, 36.
- Tang YT, Huang YY, Zheng L, Qin SH, Xu XP, An TX, Xu Y, Wu YS, Hu XM, Ping BH, Wang Q. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med*, 2017, 40, 834-844.
- Tétreault N, De Guire V. miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin Biochem*, 2013, 46, 842-845.
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, 569–579.
- Turashvili G, Yang W, McKinney S, Kalloger S, Gale N, Ng Y, Chow K, Bell L, Lorette J, Carrier M, Luk M, Aparicio S, Huntsman D, Yip S. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol*, 2012, 92, 33-43.
- Veerman RE, Teeuwen L, Czarnewski P, Güclüler Akpınar G, Sandberg A, Cao X, Pernemalm M, Orre LM, Gabrielsson S, Eldh M. Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10, 12128.
- Verbanac D, Čeri A, Hlapčić I, Shakibaei M, Brockmueller A, Krušlin B, Ljubičić N, Baršić N, Detel D, Batičić L, Rumora L, Somborac-Baćura A, Štefanović M, Čelap I, Demirović A, Petlevski R, -Petrik J, Grdić Rajković M, Hulina-Tomašković A,

- Rako I, Saso L, Barišić K. Profiling Colorectal Cancer in the Landscape Personalized Testing—Advantages of Liquid Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 4327.
- Wei J, Hollabaugh C, Miller J, Geiger PC, Flynn BC. Molecular Cardioprotection and the Role of Exosomes: The Future Is Not Far Away. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2021, 35, 780-785.
- Wu KJ. The role of miRNA biogenesis and DDX17 in tumorigenesis and cancer stemness. *Biomed J*, 2020, 43, 107-114.
- Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol*, 2022, 16, 115-126.
- Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, Fang X, Zhang X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer*, 2022, 21, 56.
- Zhang N, Hu G, Myers TG, Williamson PR. Protocols for the Analysis of microRNA Expression, Biogenesis, and Function in Immune Cells. *Curr Protoc Immunol*, 2019, 126, 78.
- Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*, 2019, 9, 19.
- Zhu L, Sun HT, Wang S, Huang SL, Zheng Y, Wang CQ, Hu BY, Qin W, Zou TT, Fu Y, Shen XT, Zhu WW, Geng Y, Lu L, Jia HL, Qin LX, Dong QZ. Isolation and characterization of exosomes for cancer research. *J Hematol Oncol*, 2020, 13, 152.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. SAŽETAK

Egzosomi su membranom omeđene izvanstanične vezikule promjera 30-150 nm. Iz ishodišnih stanica prenose različite biomolekule (proteine, lipide, nukleinske kiseline), uključujući i miRNA čija je uloga regulacija staničnih procesa i aktivnosti gena. Zbog tih svojstava, egzosomi su predmet istraživanja kao potencijalni cirkulirajući biomarkeri za maligne bolesti i druga patološka stanja. Izvor molekula RNA u dijagnostici malignih bolesti su i tkiva fiksirana formalinom i uklopljena u parafin (FFPE, engl. *formalin-fixed paraffin embedded*). U postupku izrade FFPE tkiva može doći do degradacije molekula RNA uslijed fiksacije formalinom. Molekule RNA izolirane iz egzosoma i FFPE tkiva mogu sadržavati onečišćenja koja predstavljaju interferencije u molekularnim analizama, ali i pri tumačenju rezultata. Cilj ovog rada bio je odrediti kvalitetu RNA i miRNA pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* metodom mikrokapilarne elektroforeze i procijeniti prihvatljivost za daljnje molekularne analize. Određene su koncentracija, kvaliteta i čistoća RNA i miRNA izoliranih iz uzoraka FFPE tkiva i egzosoma 13 pacijenata s dijagnosticiranim CRC-om. Određivanjem DV200 utvrđeno je da su 4 uzorka loše kvalitete i nisu adekvatna za daljnje primjene. Na dobivenim elferogramima nisu uočeni jasni vršci miRNA, a mogući uzroci su prisutnost više vrsta malih RNA ili niska koncentracija miRNA u uzorku.

Više koncentracije RNA i miRNA izmjerene su u uzorcima FFPE tkiva nego u egzosomima. Izmjeren je veći udio miRNA u uzorcima FFPE tkiva nego u egzosomima.

Očekivana degradacija RNA molekula iz FFPE tkiva potvrđena je izmjerenim niskim RIN vrijednostima, no uzroci su prihvatljivi za daljnje molekularne analize.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su molekule RNA iz FFPE tkiva degradirane, ali dovoljnog prinosa za daljnje analize.

## 8.2. SUMMARY

Exosomes are membrane-bound extracellular vesicles with a diameter of 30-150 nm. Exosomes transport different biomolecules, such as proteins, lipids and nucleic acids, including miRNA, which regulates cellular processes and genes. Therefore, there is a lot of research of exosomes as potential circulating biomarkers for malignant diseases and other pathological conditions. Formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues are another source of RNA molecules in diagnostics of malignancies. Degradation of RNA molecules could occur during the preparation of FFPE tissue due to formalin fixation. RNA molecules isolated from FFPE tissues and exosomes can contain contaminants that interfere in results interpretation and following molecular analysis. The aim of this study was to determine quality of RNA and miRNA isolated from exosomes and FFPE tissues using microcapillary electrophoresis on *Agilent 2100 Bioanalyzer* and evaluate their acceptability for further analysis. The concentration, quality and purity of RNA and miRNA isolated from 13 FFPE tissue and exosome samples of CRC patients were measured. The DV200 value showed that 4 of 13 samples had low quality and were inadequate for further analysis. Distinct miRNA peaks weren't detected on elpherograms, which could be a result of different sRNA molecules present, or very low miRNA concentration in sample. Higher concentrations of RNA and miRNA were determined in FFPE samples than exosomes. The percentage of miRNA was also higher in FFPE samples than exosomes. Expected RNA degradation was confirmed by low RIN-values, but samples were adequate for further analysis. The results showed that RNA molecules isolated from FFPE samples were degraded, but their yield was sufficient for further molecular analysis.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### KONTROLA KVALITETE RNA I mikroRNA IZOLIRANIH IZ UZORAKA TKIVA FIKSIRANIH FORMALINOM I UKLOPLJENIH U PARAFIN I EGZOSOMA PACIJENATA S KOLOREKTALNIM KARCINOMOM

Antonija Mikačević

#### SAŽETAK

Egzosomi su membranom omeđene izvanstanične vezikule promjera 30-150 nm. Iz ishodišnih stanica prenose različite biomolekule (proteine, lipide, nukleinske kiseline), uključujući i miRNA čija je uloga regulacija staničnih procesa i aktivnosti gena. Zbog tih svojstava, egzosomi su predmet istraživanja kao potencijalni cirkulirajući biomarkeri za maligne bolesti i druga patološka stanja. Izvor molekula RNA u dijagnostici malignih bolesti su i tkiva fiksirana formalinom i uklopljena u parafin (FFPE, engl. *formalin-fixed paraffin embedded*). U postupku izrade FFPE tkiva može doći do degradacije molekula RNA uslijed fiksacije formalinom. Molekule RNA izolirane iz egzosoma i FFPE tkiva mogu sadržavati onečišćenja koja predstavljaju interferencije u molekularnim analizama, ali i pri tumačenju rezultata. Cilj ovog rada bio je odrediti kvalitetu RNA i miRNA pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* metodom mikrokapilarne elektroforeze i procijeniti prihvatljivost za daljnje molekularne analize. Određene su koncentracija, kvaliteta i čistoća RNA i miRNA izoliranih iz uzoraka FFPE tkiva i egzosoma 13 pacijenata s dijagnosticiranim CRC-om. Određivanjem DV200 utvrđeno je da su 4 uzorka loše kvalitete i nisu adekvatna za daljnje primjene. Na dobivenim elferogramima nisu uočeni jasni vršci miRNA, a mogući uzroci su prisutnost više vrsta malih RNA ili niska koncentracija miRNA u uzorku. Više koncentracije RNA i miRNA izmjerene su u uzorcima FFPE tkiva nego u egzosomima. Izmjeren je veći udio miRNA u uzorcima FFPE tkiva nego u egzosomima. Očekivana degradacija RNA molekula iz FFPE tkiva potvrđena je izmjerenim niskim RIN vrijednostima, no uzroci su prihvatljivi za daljnje molekularne analize. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su molekule RNA iz FFPE tkiva degradirane, ali dovoljnog prinosa za daljnje analize.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 64 stranice, 10 grafička prikaza, 1 tablicu i 73 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: RNA, miRNA, egzosomi, FFPE tkiva, mikrokapilarna elektroforeza

Mentor: **Dr. sc. Andrea Hulina Tomašković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Andrea Hulina Tomašković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### QUALITY CONTROL OF RNA AND miRNA ISOLATED FROM FORMALIN-FIXED PARAFFIN EMBEDDED TISSUE AND EXOSOME SAMPLE OF PATIENTS WITH COLORECTAL CARCINOMA

Antonija Mikačević

#### SUMMARY

Exosomes are membrane-bound extracellular vesicles with a diameter of 30-150 nm. Exosomes transport different biomolecules, such as proteins, lipids and nucleic acids, including miRNA, which regulates cellular processes and genes. Therefore, there is a lot of research of exosomes as potential circulating biomarkers for malignant diseases and other pathological conditions. Formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues are another source of RNA molecules in diagnostics of malignancies. Degradation of RNA molecules could occur during the preparation of FFPE tissue due to formalin fixation. RNA molecules isolated from FFPE tissues and exosomes can contain contaminants that interfere in results interpretation and following molecular analysis. The aim of this study was to determine quality of RNA and miRNA isolated from exosomes and FFPE tissues using microcapillary electrophoresis on *Agilent 2100 Bioanalyzer* and evaluate their acceptability for further analysis. The concentration, quality and purity of RNA and miRNA isolated from 13 FFPE tissue and exosome samples of CRC patients were measured. The DV200 value showed that 4 of 13 samples had low quality and were inadequate for further analysis. Distinct miRNA peaks weren't detected on elpherograms, which could be a result of different sRNA molecules present, or very low miRNA concentration in sample. Higher concentrations of RNA and miRNA were determined in FFPE samples than exosomes. The percentage of miRNA was also higher in FFPE samples than exosomes. Expected RNA degradation was confirmed by low RIN-values, but samples were adequate for further analysis. The results showed that RNA molecules isolated from FFPE samples were degraded, but their yield was sufficient for further molecular analysis.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 64 pages, 10 figures, 1 table and 73 references. Original is in Croatian language.

Keywords: RNA, miRNA, exosome, FFPE tissue, microcapillary electrophoresis

Mentor: **Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2024