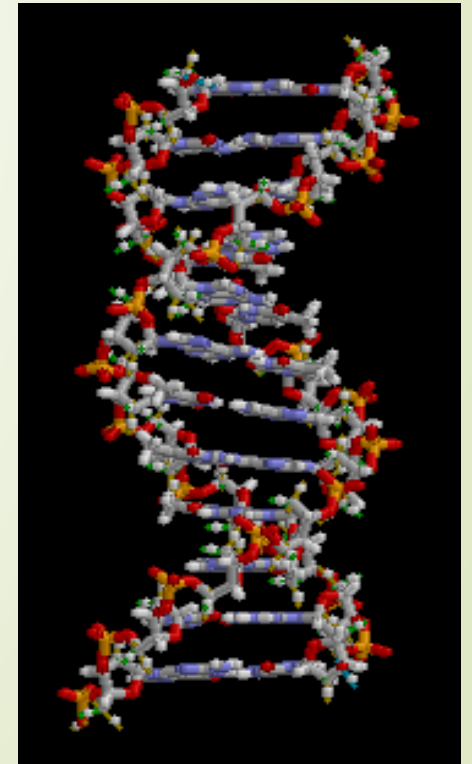


ЗНАЧЕЊЕТО НА ЦИРКУЛИРАЧКИТЕ НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ ВО ЛАБОРАТОРИСКАТА ДИЈАГНОСТИКА

Проф. д-р Невенка Величкова
Факултет за медицински науки
Универзитет “Гоце Делчев” – Штип
Р. Северна Македонија



Нуклеински киселини

Биолошките молекули/протеините и нуклеинските киселини (ДНК и РНК) претставуваат потенцијално прогностички биомаркери

Лесно се екстрахираат од различни биолошки материјали

постапката е брза и неинвазивна

РНК-и како биомаркери се посебно значајни бидејќи овозможуваат увид во динамиката на клеточниот циклус

специфичните РНК како што се микроРНК (miRNA) и циркулирачката РНК се постабилни во различни телесни течности



кратки некодирачки молекули на RNK кои имаат важна регулаторна улога во транслацијата на mRNK

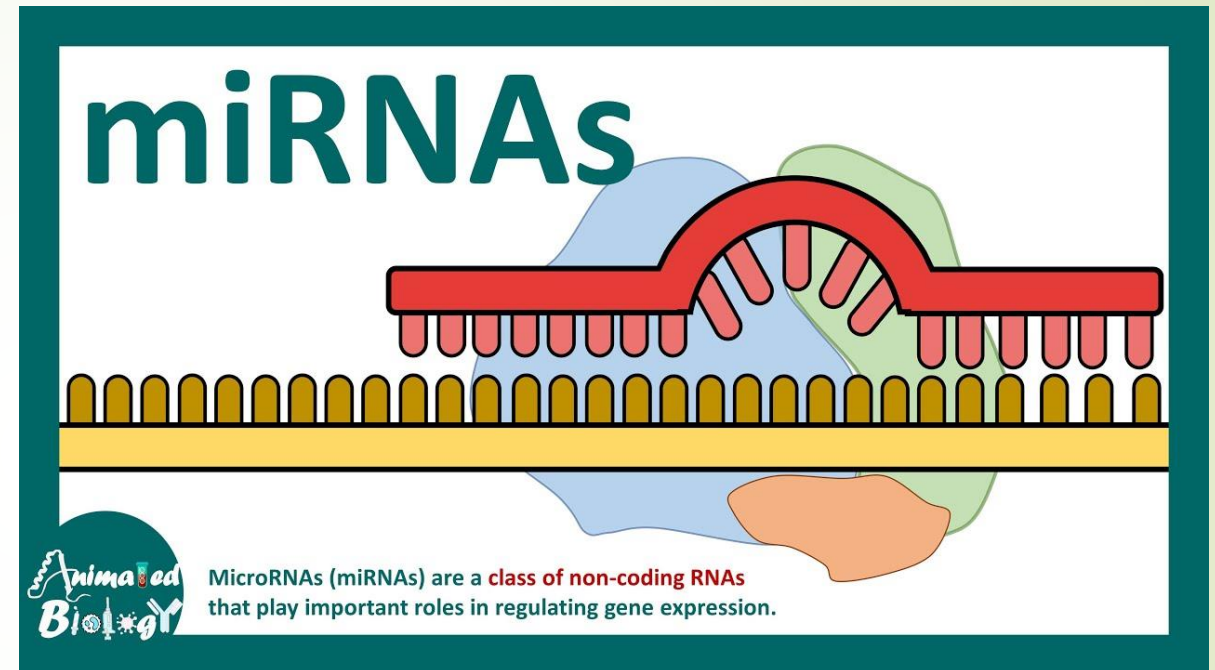
Повеќе од 1000 различни молекули на miRNA се откриени кај луѓето

истите се вклучени во голем број клеточни процеси

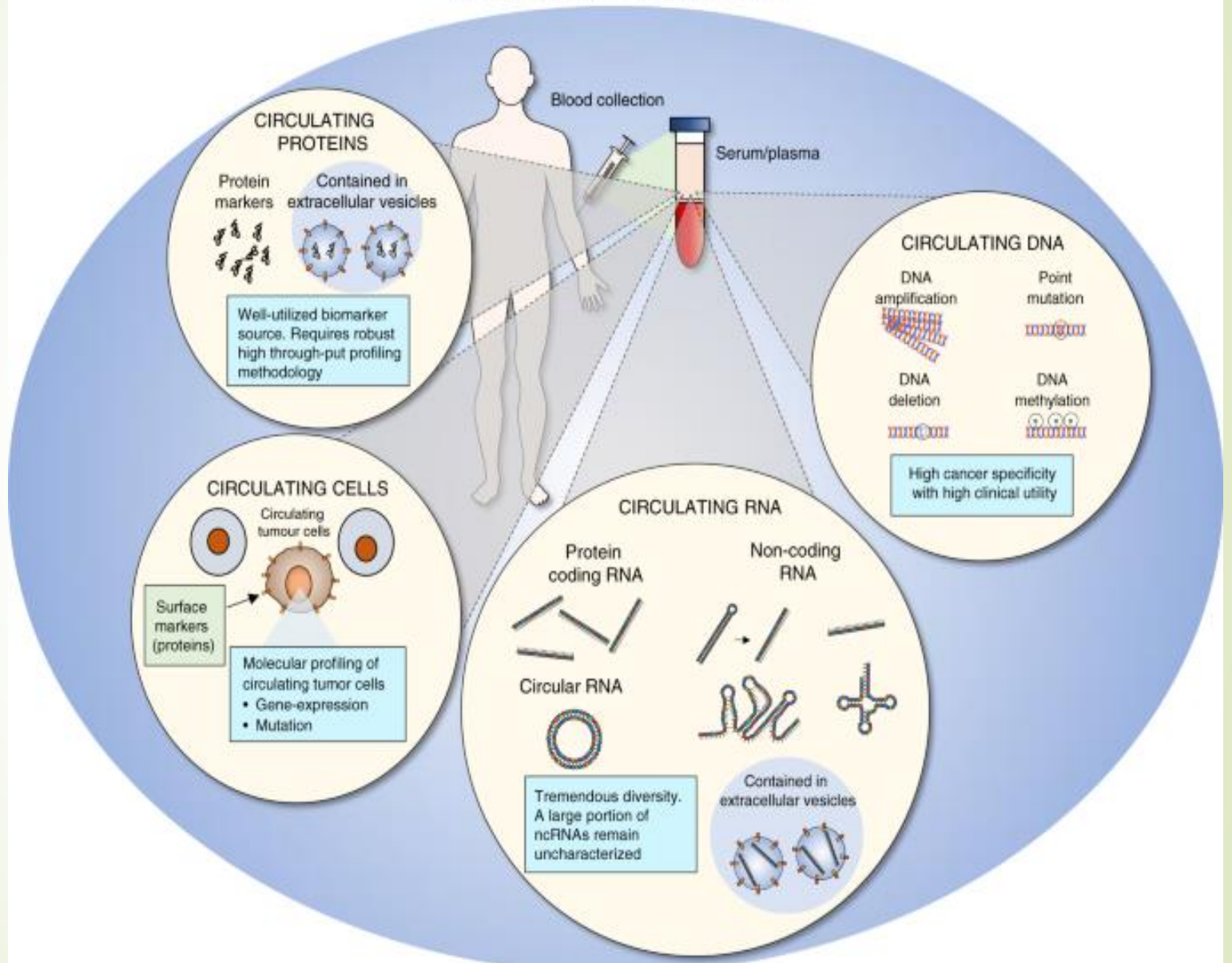
Различни молекули на miRNA се специфични за физиологијата на поединечни ткива

дијагностички маркер за промената клеточна диференцијација и пролиферација

терапијата базирана на miRNA е атрактивна алтернатива за лекување на одредени метаболички болести



MOLECULAR BIOMARKER TYPES



неинвазивните биомаркери има посебно значење во молекуларната лабораториска дијагностика

да се детектира присуството на miRNA како циркулирачки биомаркери во телесните течности како што е урина или пунка, крв и нејзините деривати како што се плазма или серум

Нивото на видот на miRNA што се пренесува преку крв може да се промени како одговор на патолошки процес

Биогенеза на miRNA

мали RNK молекули кои се откриени во раните 1990-ти

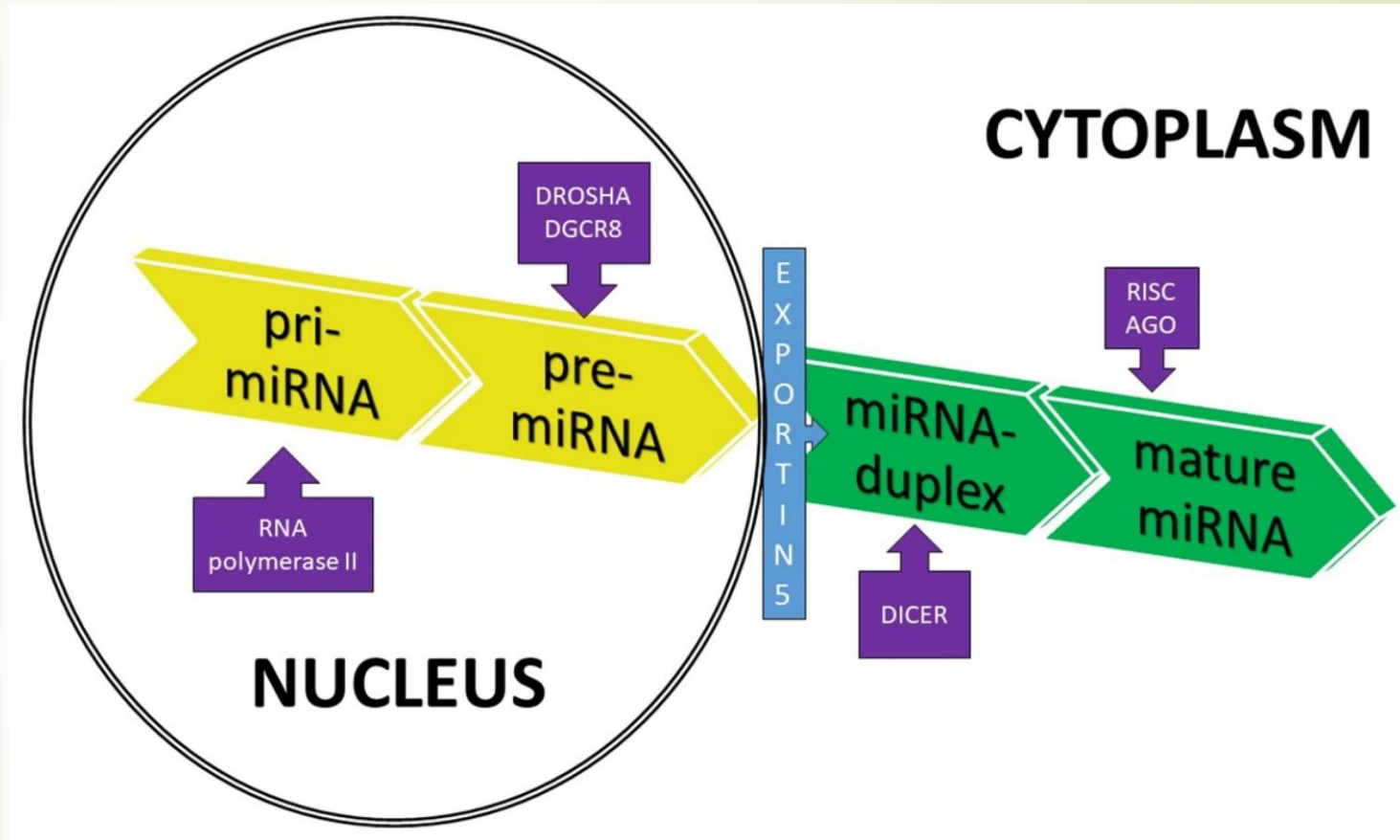
ја регулираат генската експресија главно на пост-транскрипциско ниво

По нивната транскрипција, комплексот за обработка на miRNA кој се состои од **RNase Drosha** и **кофакторот DGCR8** кој ги **расцепува** таканаречените pri-miRNAs

Пред miRNA или pri-miRNA брзо се извезува од јадрото во цитоплазмата, а потоа **се расцепува од ензимот Dicer** за да произведе кратка дуплекс молекула на зрела miRNA

зрелите miRNAs се вчитуваат во комплексот индуциран од RNK (RISC) каде што се врзани со член на семејството на RNK-врзувачките протеини Argonaute (AGO)

Комплексот RISC потоа може да се поврзе со mRNA кои носат секвенци кои се комплементарни на соодветната miRNA, што може или да доведе до деградација или до инхибиција на транслацијата на mRNA

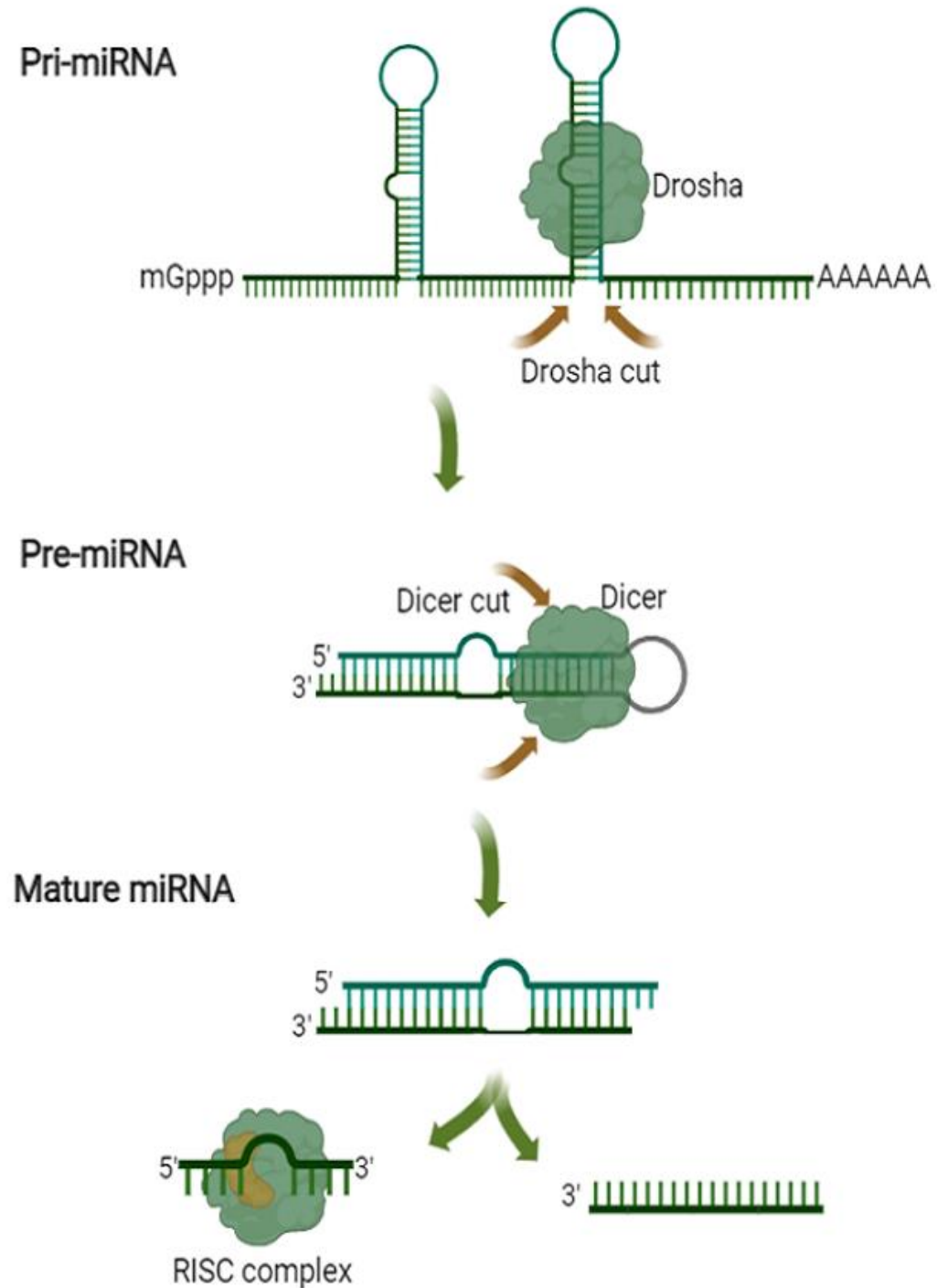


Биогенеза на miRNA

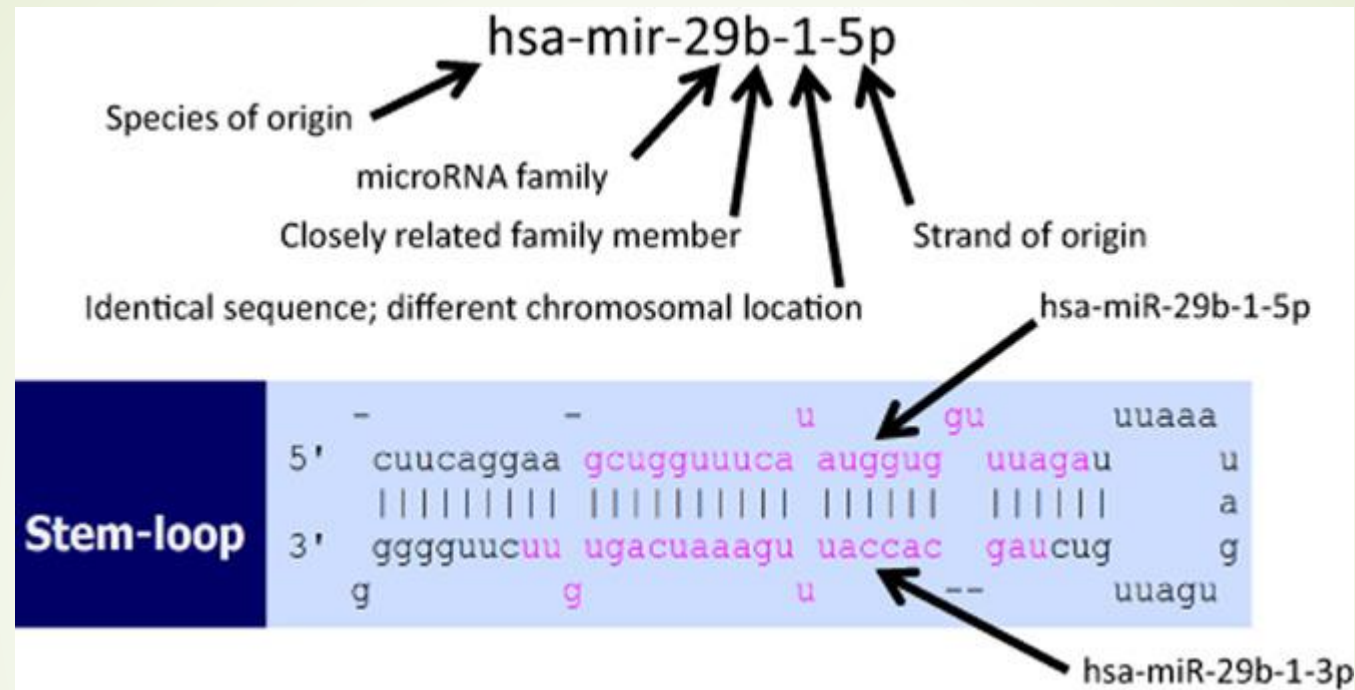
Во цитоплазмата, на pre-miRNA делува друга ендонуклеаза Дицер, која го расцепува пределот на јамката, додавајќи кратка комплементарна низа од нуклеотидна секвенца и создава miRNA дуплекс

Во примарната miRNA се процесираат две ендорибонуклеази, Дроша и Дицер (RNase III)

Протеинскиот комплекс кој ја формираат Дроша и кофакторот DGCR8 делува на pre-miRNA додека се уште е во јадрото и ја расцепува врзаната структурата, при што се формира pre-miRNA долга 70-80 нуклеотиди



Номенклатура на miRNA



Суфиксите mir и miR се користат за претходници и зрели miRNA молекули

За означување се користи префикс од 3 или 4 букви. miRNA која припаѓа на специфичен вид, на пр. префикс HSA (eng. HSA од *Homo sapiens*) укажува дека се работи за човечка miRNA

Идентичните miRNA кои потекнуваат од истиот генски locus го имаат истиот нумерички суфикс, а се разликуваат по дополнителната буква што се додава, на пр. miRNA-10a и miRNA-10b2

miRBase
the archive for
and annotations

By tissue expression

Select organism and tissue


Homo sapiens


Tissue:

- Tissue:
- melanoblast
- melanocyte
- melanoma cell
- mucosal melanoma cell
- uveal melanoma cell
- uterine cervix
- nasopharyngeal carcinoma cell line
- tonsil
- germinal center
- B-lymphocyte
- plasma cell
- HEK-293T cell
- HeLa cell
- cervical carcinoma cell
- frontal lobe
- cerebellum
- heart
- kidney
- testis


By identifier or keyword


By tissue expression


Browse


Downloads

Материјал и методи

кога полната крв се користи како примерок за анализа /присуството на стандардниот антикоагулант во овој тип на примерок - (EDTA) - **нивоата на miRNA во примерокот се менуваат со текот на времето**, (како што транскрипцијата и деградацијата на miRNA во белите крвни зрнца и тромбоцитите продолжува)



епруветите за собирање крв да содржат стабилизирачки реагенси кои директно ги лизираат крвните клетки и со тоа веднаш го запираат изразувањето на miRNA по земањето на крвта (треба да се користат за изолирање на miRNA од полна крв)

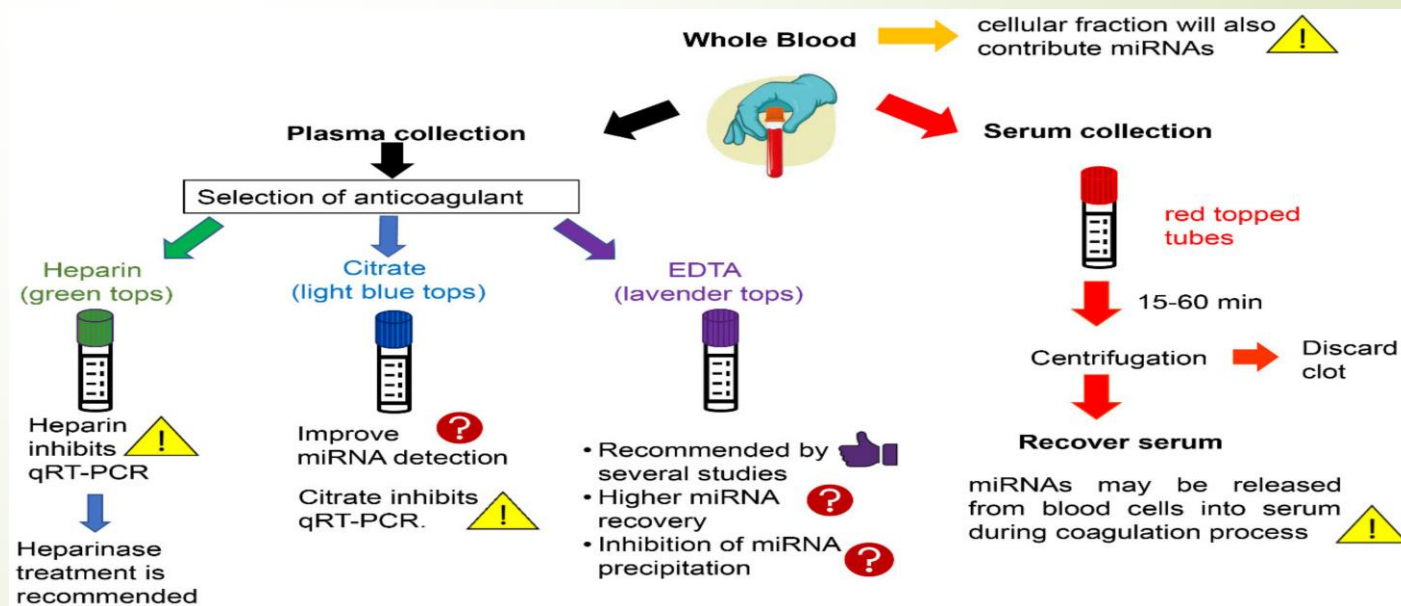
За анализа на нивоата на изразување на miRNA во примероците од плазмата, EDTA, хепарин или цитрат може да се користат како антикоагулант

поеѓу серумот и плазмата постои разлика помеѓу концентрацијата и составот на miRNA, што се должи на ослободувањето на miRNA од тромбоцитите во епруветата од примерок за време на коагулацијата

резултатот на miRNA е секогаш специфичен за даден тип на примерок.

бидејќи и цитратот и хепаринот се сметаат дека ги инхибираат полимеразните верижни реакции (PCR), EDTA е антикоагулант на избор кога плазмата се користи за анализа на miRNA со квантитативна реверзна транскрипција PCR (RT- qPCR)

miRNA од плазмата и серумот се разликуваат и во дистрибуцијата во типовите на примероци



- повеќето последователни методи за откривање бараат miRNA да се прочистат со методи кои се специјализирани за оваа цел
- miRNAs обично се прочистуваат со помош на процедура за екстракција во цврста фаза на силика колони или моноистра, или филтри од стаклени влакна
- дијагностички тест заснован на специфичен резултат на miRNA е секогаш поврзан со типот на примерокот и методот на прочистување што се користел за неговиот развој и валидација

Собирање на примерок
(крвни серум, урина, плунка
млеко, перитонеална и
цереброспинална течност,
туморски ткива - биопсија)

Екстракција на миРНА со
гванидиниум тиоцијанат-
фенол-хлороформ

Детекција на миРНА со qRT-
PCR, In situ хибридизација,
NGS, метод на Вестерн блот,
RNA-Seq

Собирање на податоците и
статистичка анализа

Најчести методи во лабораториската дијагностика

Квантитативната полимеразна верижна реакција во реално време (qRT-PCR)

висококвалитетен примерок
особено поради ниската
концентрација на miRNA во
плазмата

нивоата во плазмата се ни
100 пати помали од концен
во клетките и ткив

примерок со висока ч
се отстранети компо
што се протеините
јаглехидр

Покрај компонент
хемолизата мож
причина за вари

In situ хибридизацијата

вклучува откривање на miRNA со
означување на комплементарни miRNA
проби

се заснова на комплементарно врзување
на нуклеотидна сонда за одредена целна
секвенца на DNK или RNK

Главната предност кај оваа метода е
можноста следење на дистрибуцијата на
miRNA, што е значајно кај малигните
тумори со интратуморна хетерогеност што
укажува на појава на субпопулација на
туморски клетки

Секвенционирањето на новите генерации НГС (NGS, од Eng. Next Generation Sequencing)

за секвенционирање на RNK секвенционирањето на miRNA кои посебни карактеристики

Недостатоците вклучуваат висок
за рутинска употреба и потреба
дигитална инфраструктура за анализа
интерпретација на добиените податоци

може да ги квантифицира познати
секвенци на miRNA додека во исто време
може да идентификува и квантифицира
претходно непознати секвенци

озможува мултиплексирана
експресивна анализа на miRNA од
различни примероци во еден
експеримент

неговиот висок динамички опсег, кој овозможува прецизно квантифицирање и на високо изразените и на ниските изобилни miRNA во исто време во истиот експеримент

мерење на прилично мали miRNA панели од поголем број примероци

недостатоци:
претставува доста поскапа метода,
особено кога се споредува со RT-qPCR.

одзема многу време и сè уште не е целосно автоматизиран, со што се врзуваат ресурсите во лабораторијата

Вестерн Блот метод (од. *eng* *Western Blot*)

може да се користат нерадиоактивни или радиоактивни сонди како изотопи ^{32}P

овозможува анализа на нивото на изразување на поединечни miRNA во примерок

главна предност е што овозможува истовремено откривање на зрели miRNA и неговите прекурсори

примерокот од RNK се дигестира со рестриktivна ендонуклеаза, одделен со агарозен гел електрофореза, денатуриран и префрлен во најлонска мембрана или нитроцелулозен филм според нејзината позиција во гелот и фиксиран со реакција со изотоп или друг маркер сонда

По миењето на слободната сонда, miRNA може да се детектираат со ауторадиографија или други соодветни техники

Недостатоци- претставувањето на полу-квантитативна метода, ниско пропусна

одзема време и лесна деградација на RNK

ниска чувствителност, со што ниската молекуларна тежина на RNK не може да биде детектирана

Дискусија и резултати

MIRNA	Тип на заболување
miRNA – 10a	Зголемен кај МДС, АМЛ
miRNA – 146a	Намален кај МДС
miRNA – 150	Намален кај МДС
miRNA – 7a	Намален кај МДС
miRNA – 34a	Намален кај МДС
miRNA – 17-5p	Намален кај МДС
miRNA – 20a	Намален кај МДС
miRNA – 22	Зголемен кај МДС, АМЛ
miRNA – 382	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 134	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 376a	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 223	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 299-5p	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 323	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 7b	Намален кај АМЛ
miRNA – 7c	Намален кај АМЛ
miRNA – 126	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 224	Намален кај АМЛ
miRNA – 368	Намален кај АМЛ
miRNA – 382	Намален кај АМЛ
miRNA – 17-92	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 196b	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 29	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 204	Намален кај АМЛ
miRNA – 128a	Намален кај АМЛ
miRNA – 155	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 181a, miRNA – 181b	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 1	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 133	Зголемен кај АМЛ
miRNA – 124a	Намален кај АМЛ
miRNA – 223	Намален кај АМЛ
miRNA – 193a	Намален кај АМЛ
miRNA – 203	Намален кај АМЛ
miRNA – 138	Намален кај АМЛ
miRNA – 222	Зголемен кај МДС



Pandolfi, 2014, miRNA во дијагностиката кај миелодиспластични синдром (МДС)



неопходно е да се минимизираат сите фактори кои пречат користејќи пристап на екстракција

развиени се и применети различни методи на екстракција за мерење на miRNA во клетките, плазмата, серумот и ткивата
комерцијалните комплекти за екстракција на miRNA се во голема мера поделени на реагенсни комплекти базирани на хлороформ-фенол и комплекти за екстракција базирани на колони
специфичноста и чувствителноста на qRT-PCR

резултатите може да се разликуваат според типот и концентрацијата на прајмерот

Во праксата qRT-PCR методата е најмногу користена метода



**Proceed with
Caution**

минимални или и неинвазивни
процедура

овозможува тестирање или
лабораториска анализа во
услови каде што е тешко или
дури и невозможно да се
добијат примероци од ткиво за
анализа на miRNA

стандардни типови примероци
што се користат во сите
клинички лаборатории, за нив е
предвидена истата постапка
или логистика за транспорт на
примероци и подготовката на
примерокот

извонредна стабилност на
miRNA

Заклучок

Happy
MEDICAL LABORATORY
PROFESSIONALS Week



THANK YOU
TRULY APPRECIATE ALL YOU DO!



INSTANT
DOWNLOAD



8x10
Printable Sign