

# Optimizacija lize mononuklearnih stanica periferne krvi

---

Vrbanić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:532864>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Matea Vrbanić**

**OPTIMIZACIJE LIZE**  
**MONONUKLEARNIH STANICA**  
**PERIFERNE KRVI**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Matea Vrbanić**

**OPTIMIZACIJE LIZE**  
**MONONUKLEARNIH STANICA**  
**PERIFERNE KRVI**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek

Mentor rada: doc. dr. sc. Željko Debeljak

Rad ima 29 stranica, 1 tablicu i 12 slika.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Mononuklearne stanice .....	1
1.1.1. Limfociti .....	1
1.1.2. Monociti.....	2
1.2. Tumorski biljezi.....	2
1.3. Stanična liza.....	5
2. CILJ.....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	10
3.1. Ustroj .....	10
3.2. Materijali.....	10
3.3 Metode .....	11
3.3.1. Određivanje kompletne krvne slike .....	11
3.3.2. Određivanje serumskih parametara.....	11
3.3.3. Izolacija mononuklearnih stanica .....	12
3.3.4. Liza mononuklearnih stanica.....	13
3.4. Statističke metode .....	14
4. REZULTATI.....	15
4.1. Biokemijski parametri iz liziranih mononuklearnih stanica .....	15
4.2. Normalizirani biokemijski parametri.....	17
4.3. ANOVA .....	20
5. RASPRAVA.....	21
6. ZAKLJUČAK .....	23
7. SAŽETAK .....	24
8. SUMMARY .....	25
9. LITERATURA .....	26
10. ŽIVOTOPIS .....	29

## Popis kratica

NK stanice – prirodno ubilačke stanice (engl. *Natural killer cells*)

NSE – neuron specifična enolaza

LDH – laktat dehidrogenaza

Fe – željezo

Fe<sup>2+</sup> - željezov (II) ion

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (eng. *Reactive oxygen species*)

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 9H<sub>2</sub>O - željezov (III) oksid nonahidrat

SCLC – karcinom pluća malih stanica (eng. *Small cell lung carcinoma*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

RNK – ribonuklearinska kiselina

F/T – pothlađivanje i zagrijavanje (engl. *freezing and thawing*)

OH<sup>-</sup> – hidroksilni ion

NaOH – natrijev hidroksid

SDS – natrijev dodecil sulfat

K<sub>3</sub>-EDTA – trikalij – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid*)

Okr/min – okretaji po minuti

NAD<sup>+</sup> – nikotinamid adenin dinukleotid, oksidirani oblik

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid, reducirani oblik

PBS – fosfatom puferirana otopina soli (engl. *phosphate buffered saline*)

NaCl – natrijev klorid

KCl – kalijev klorid

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – kalijev dihidrogenfosfat

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – dinatrijev hidrogenfosfat

ANOVA – analiza varijance (engl. *Analysis of mean using variance*)

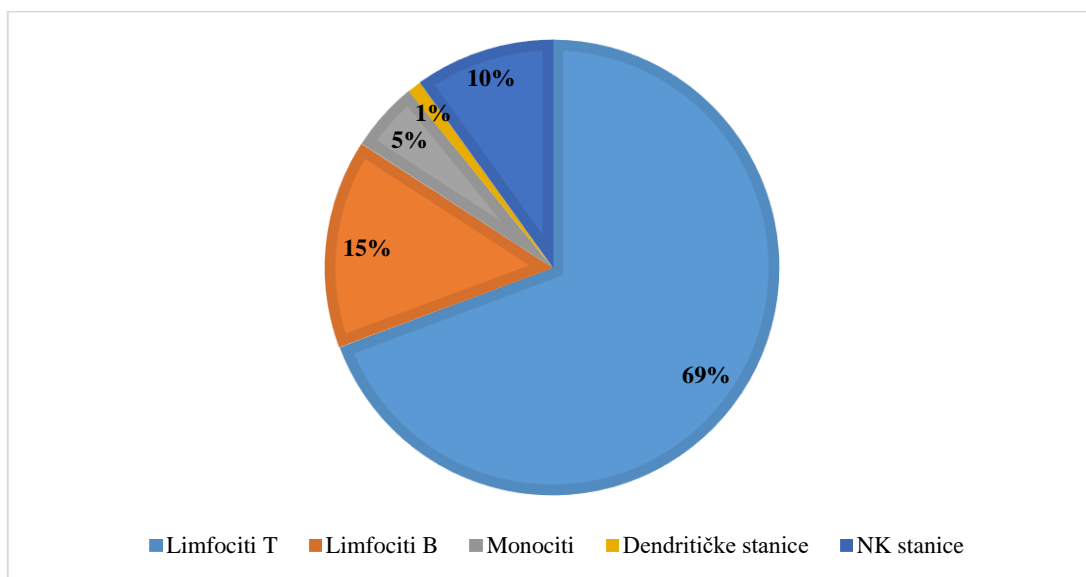
PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

## 1. UVOD

### 1.1 Mononuklearne stanice

Leukociti su bijele krvne stanice, pokretne jedinice imunološkog sustava u tijelu. Krvlju se prenose u područja zahvaćena upalom, čime je osigurana brza i snažna obrana organizma od djelovanja stranih tvari. Zadaće imunoreakcije koju pokreće imunostni sustav jesu obrana od infekcije, obrana od tumora te održavanje antigenske i genske homeostaze (1).

Odrasla osoba ima oko  $7 \times 10^9$  (2) leukocita u krvi, a vrste su leukocita polimorfonuklearni (granulocitni) neutrofili, eozinofili i bazofili te mononukleari (agranulociti). Mononuklearima pripada nekoliko klasa imunoloških stanica, uključujući T limfocite, B limfocite, monocite, dendritičke stanice i prirodno ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*, NK stanice) (1, 2, 3). Udio pojedinih vrsta mononuklearnih stanica u njihovom ukupnom broju grafički je prikazan na Slici 1.



Slika 1. Udio vrsta mononuklearnih stanica u njihovom ukupnom broju. (Grafički prikaz izradila autorica prema podacima iz članka autora Sen P. i sur. (3)).

#### 1.1.1. Limfociti

Limfociti su osnovni nositelji svih vrsta imunosti, a razlikujemo dvije linije limfocita: limfocite T, koji sudjeluju u staničnoj imunosti, i limfocite B, koji sudjeluju u humoralnoj imunosti (2). Vrste su limfocita T: pomagačke T stanice, citotoksične T stanice ili NK stanice i supresijske T stanice. Pomagačke T stanice najbrojnije su te čine  $\frac{3}{4}$  ukupnog broja limfocita (1). Djeluju kao glavni regulatori gotovo svih imunoloških funkcija stvarajući različite proteinske medijatore, potiču rast i proliferaciju citotoksičnih i supresijskih T stanica te



aktiviraju makrofage u cijelom organizmu. NK stanice izravno napadaju i uništavaju mikroorganizme, stanice raka, stanice presađenog organa ili druge vrste organizmu stranih stanica, a ako je potrebno, i stanice vlastitog organizma (4). Receptorske im bjelančevine omogućuju da se čvrsto vežu sa specifičnim antigenima napadnute stanice, a nakon vezivanja izlučuju bjelančevine koje stvaraju pore kroz koje će otpustiti citotoksične tvari. Supresijske stanice mogu potisnuti funkciju citotoksičnih i pomagačkih T stanica i tako reguliraju intenzitet imunološke reakcije (1, 3, 4).

Specifična je značajka limfocita B sudjelovanje u humoralnoj imunosti izlučivanjem protutijela. Protutijela nastaju nakon što makrofagi u limfatičnome tkivu fagocitiraju antigen i predoče ga limfocitima B, ali i pomagačkim limfocitima T koji zajedno s makrofagima nastavljaju aktivaciju limfocita B. Aktivirani limfociti B specifični za antigen povećavaju volumen i poprime izgled limfoblasta od kojih se neki diferenciraju u plazma-stanice. U plazma-stanicama se povećavaju količina citoplazme i proliferacijska sposobnost u hrapavom endoplazmatskom retikulu. Zrele plazma-stanice proizvode oko 2000 molekula gamaglobulinskih protutijela u sekundi koja se limfom izlučuju u krvotok. Proces se nastavlja dok plazma-stanice ne propadnu (1).

### **1.1.2. Monociti**

Monociti su mononuklearne stanice koje uklanjaju bakterije, viruse i druge štetne agense. Krvni su monociti nezrele stanice koje u cirkulaciji imaju malu moć suprotstavljanja antigenu, ali nakon što uđu u tkiva, stvaraju velik broj lizosoma zbog kojih povećavaju volumen. Takve imunološki reaktivne stanice nazivamo makrofagima. Kroz tkivo se kreću ameboidnim gibanjem uzrokovanim kemotaksijom zbog bakterijskih toksina, degenerativnih proizvoda upaljenog tkiva i kompleksa komplementa (1).

## **1.2. Tumorski biljezi**

Rak je zajednički pojam za sve zloćudne tumore. Diljem svijeta najčešći je javnozdravstveni problem, a prema podacima Hrvatskog zdravstvenog ljetopisa, drugi je najčešći uzrok smrtnosti (24,68 %) u Republici Hrvatskoj, odmah poslije bolesti kardiovaskularnog sustava (50,26 %) (5, 6). Za liječenje zloćudnih bolesti od presudnog je značenja njihovo što ranije otkrivanje, ali još uvijek ne postoji dijagnostička pretraga koja bi jasno i dovoljno rano nedvosmisleno pokazala boluje li neka osoba od zloćudne bolesti (6).

U laboratorijskoj dijagnostici za praćenje i otkrivanje zloćudnih tumora koriste se tumorski biljezi, tumorski markeri ili biomarkeri. To su spojevi koje najčešće sintetiziraju

tumorske stanice, a njihova prisutnost ili povećanje koncentracije u serumu upućuju na prisutnost zloćudnog tumora. Najčešće su niskoosjetljivi i nespecifični, imaju nisku pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost, nisu specifični za pojedini organ ni za pojedinu malignu bolest, a sintetiziraju ih i zdrave tjelesne stanice (5). Kriteriji koje određeni tumorski biljeg mora zadovoljiti kako bi se koristio u kliničkoj praksi jesu 95 %-tna specifičnost, najmanje 50 %-tna osjetljivost, optimalna pozitivna i negativna prediktivna vrijednost i korelacija s tumorskom masom (6).

Najučestalija je klinička primjena tumorskih biljega praćenje uspješnosti terapije i povratka bolesti kod zloćudnih stanja (6). Za potrebe ove studije koristit će se tri biomarkera: feritin, neuron specifična enolaza (NSE) i laktat dehidrogenaza (LDH).

Feritin je skladišni protein čija je uloga pohrana unutarstaničnog željeza (Fe). Molarna je masa feritina 450 kDa, a feritinski kompleks tvore 24 proteinske podjedinice koje formiraju sferično simetričnu proteinsku ljusku. Feritinski kompleks stvara osam hidrofilnih kanala koji služe kao ulazna mjesta za dvovalentno željezo ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Centar za feroksidazu katalizira oksidaciju  $\text{Fe}^{2+}$  koje se posljedično taloži u feritinskoj šupljini kao mineralizirani željezov (III) oksid nonahidrat ( $\text{Fe}_2\text{O}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ ) s tragovima fosfora i dušika. Ova antioksidacijska aktivnost troši  $\text{Fe}^{2+}$  i perokside te time sprječava stvaranje toksičnih reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, eng. *Reactive oxygen species*) u Fentonovoj reakciji koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju, lom DNK-a i druge forme staničnog oštećenja (7). Zahvaljujući unutrašnjem praznom prostoru, feritin može pohraniti do 4500 atoma Fe u sigurnom, topljivom i biodostupnom obliku (8). Izvor serumskog feritina još je uvijek nejasan, no smatra se da serumski feritin primarno nastaje iz makrofaga. Feritin iz makrofaga povezanih s tumorom važan je u mikrookolišu tumora i u biologiji raka jer sudjeluje u promociji rasta tumora osiguravanjem Fe tumorskim stanicama zajedno s Fe oslobođenim iz eritrocita i mrtvih tumorskih stanica. Visoka ekspresija feritina u makrofazima povezanim s tumorom štiti stanice raka od proizvodnje ROS-a uzrokovanih Fe, čime se povećava njihova otpornost na kemoterapiju (7). Manjak feritina upućuje na anemiju uzrokovanu nedostatkom željeza ili neposrednu flebotomiju. Nasuprot tome, viša razina serumskog feritina prisutna je kod pacijenata s Hodgkinovim limfomom, hepatocelularnim karcinomom, neuroblastomom, glioblastomom, rakom dojke, karcinomom pločastih stanica glave i vrata, rakom gušterače, karcinomom bubrežnih stanica, melanomom, rakom pluća ne-malih stanica (SCLC) te tijekom kronične i akutne upale u drugim bolestima. Povišenje feritina često je povezano s

progresivnom bolesti i kratkim preživljenjem (7, 8). Referentne su vrijednosti za muškarce od 30 do 400  $\mu\text{g/L}$ , a za žene 13 do 150  $\mu\text{g/L}$  (9).

Enolaza ili fosfopiruvat-hidrataza glikolitički je enzim (10). Katalizira reakciju dehidratacije 2-fosfo-D-glicerata u fosfoenolpiruvat u ciklusu glikolize i obrnutu reakciju, hidrataciju fosfoenolpiruvata u 2-fosfo-D-glicerat u ciklusu glukoneogeneze (11). Postoji pet izoenzima enolaze koji su građeni od kombinacije triju podjedinica –  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . NSE, također poznat kao i  $\gamma$ -enolaza, jest neuro- i neuroendokrino specifični izoenzim enolaze, građen od triju  $\gamma$  podjedinica (10). Molekularna masa NSE-a iznosi oko 87 kDa, a građen je od dvaju gotovo identičnih polipeptidnih lanaca (dimer enzima enolaze) (6). Sintetiziran je u centralnim i perifernim neuronima te neuroendokrinim stanicama, ali se može naći i u plazma-stanicama, eritrocitima i trombocitima (12). Koncentracije NSE-a do 16,3  $\mu\text{g/L}$  smatraju se referentnima (5). Povišena se koncentracija NSE-a može detektirati pri patološkim promjenama u tumorima neuralnog i neuroendokrinog podrijetla, kao što su neuroblastom, feokromocitom, medularni karcinom štitnjače, melanom, endokrini tumor gušterače, SCLC itd. (5, 10). Određivanje NSE-a značajno je pri diferencijalnoj dijagnozi između SCLC-a i ostalih histoloških tipova te vrste raka i praćenju stanja oboljelih od karcinoma pluća (5). NSE je povećan kod 70 – 80 % bolesnika sa SCLC-om te samo kod 17 % bolesnika s karcinomom pluća druge histološke građe. Iako je povećana razina NSE-a dijagnostički važna kod zloćudnih oboljenja pluća, NSE nema odgovarajuću specifičnost i osjetljivost da bi se koristio u probiru opće populacije (6, 13).

LDH je glikolitički enzim koji se nalazi u većini tkiva i organa (14). To je ubikvitarni enzim koji je prisutan u većim koncentracijama u jetri, bubregu, miokardu, skeletnim mišićima, gušterači, plućima, limfnim čvorovima, trombocitima, leukocitima i eritrocitima (15). Aktivni je oblik LDH-a homo- ili heterotetramer sastavljen od dvaju tipova podjedinica s molekularnom masom približno 35 000 Da (14). Pet različitih izoenzima molekule LDH kombinacija su dviju podjedinica – LDH-H i LDH-M; LDH-1 (četiri H monomera), LDH-2 (H3M1), LDH-3 (H2M2), LDH-4 (H3M1), LDH-5 (M4) (5). Svaka podjedinica određuje metaboličke karakteristike proteina: M podjedinica nalazi se u tkivima u kojima se događa anaerobni metabolizam (skeletni mišići), a H podjedinica uglavnom u tkivima s aerobnim metaboličkim procesima, kao što je srčano mišićje (5, 14). Referentni interval za odrasle, neovisno o spolu, iznosi od 103 do 241 U/L (5). LDH je klinički koristan kao indikator progresije tumora u uznapredovalom stadiju bolesti, unatoč nespecifičnosti i lažno pozitivnim vrijednostima (5). Obilježje je većine stanica raka poremećaj metabolizma, što dovodi do puta

aerobne glikolize s proizvodnjom laktata, uz veću apsorpciju glukoze kao glavnog izvora energije. Utvrđeno je da laktat potiče interakcije između stanica raka i stromalnih stanica utječući na motilitet stanica, podržavajući angiogenezu i metastaze, a glavni je izvor energije za proliferaciju stanica (15, 16). Povišena razina aktivnosti LDH-a prisutna je kod bolesnika s melanomom, karcinomom bubrega, Hodgkinovim limfomom, ne-Hodgkinovim limfomom, multiplim mijelomom, SCLC-om, nazofaringealnim karcinomom, rakom debelog crijeva itd. (5).

### 1.3. Stanična liza

Liza stanice ili raspad stanice laboratorijski je postupak čija je svrha izolacija unutarstaničnih komponenti perforacijom stanične membrane. Stanična je membrana semipermeabilni fosfolipidni dvosloj koji stvara barijeru između unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora (17). Pucanjem stanične membrane oslobađa se intracelularni sadržaj koji nazivamo izoliranim materijalom ili staničnim lizatom. U staničnom lizatu nalaze se biološke molekule kao što su plazmidi, proteini, stanični organeli, deoksiribonukleinska kiselina (DNK), ribonukleinska kiselina (RNK) itd. (17, 18).

Primjene su staničnog lizata za laboratorijsku analizu višestruke. Izolirani materijal važno je analitičko ishodište za molekularnu dijagnostiku patogena, enzimske imunopretrage, proces purifikacije proteina, dijagnostiku karcinoma, skrining lijekova, čitanje transkripta mRNK-a, analizu građe proteina, lipida i nukleinskih kiselina (18). Isto tako, stanični lizat ima ključnu ulogu u kontekstu bioinženjerstva i biomedicine za proizvodnju hormona, cjepiva i monoklonskih protutijela iz biofarmaceutskih proizvoda kao što su gljive, bakterije ili sisavci (17, 19).

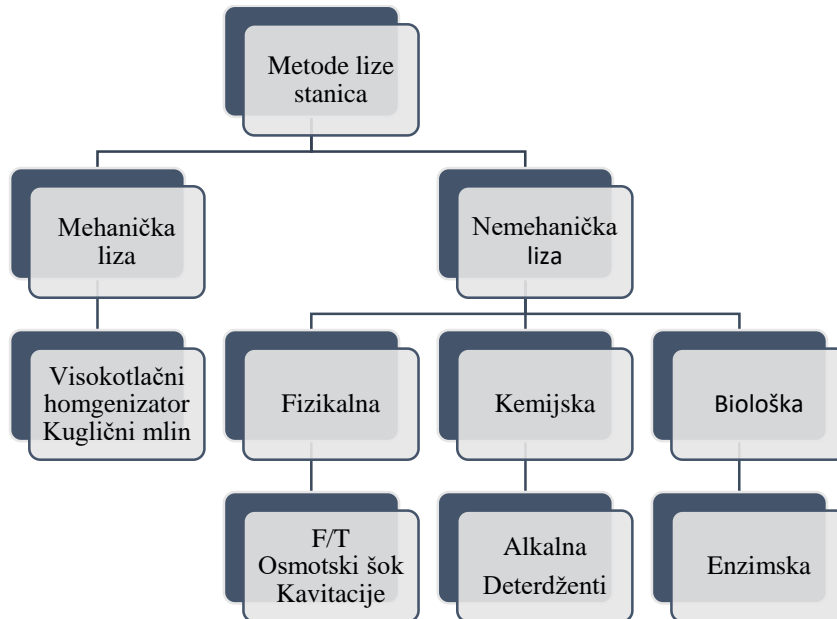
Tijekom procesa lize stanica uništavanjem stanične membrane nestaju uvjeti koji su sprječavali inaktivaciju, denaturaciju i degradaciju intracelularnih proteina, stoga se liza u dijagnostičke svrhe provodi u puferskoj otopini kako ne bi došlo do odstupanja od fiziološke pH-vrijednosti stanične solucije. Većina poteškoća nastaje zbog nekontroliranog pucanja stanica koje rezultira nekontroliranim oslobađanjem cjelokupnog unutarstaničnog sadržaja (17). Kako je liza stanica osjetljiv proces, važno je odabrati prikladnu metodu kako bi rezultati analize zahtijevanih biokemijskih parametara iz lizata bili što točniji i vjerniji stvarnom stanju (20).

Čimbenici koji su važni pri odabiru metode lize jesu:

- vrsta stanice (eukariotska stanica, prokariotska stanica, virusi)

- koraci u pročišćavanju
- ciljne molekule za analizu i
- kvaliteta konačnih proizvoda (18, 21)

Postoje razne metode za staničnu lizu, a klasificirane su u mehaničke i nemehaničke metode, što je detaljnije prikazano na Slici 2 (17, 19, 20).



Slika 2: Podjela metoda stanične lize. (Shemu izradila autorica prema slici iz članka autora Zhou Y. i sur. (21)).

### 1.3.1. Mehanička liza

Mehanička liza podrazumijeva dezintegraciju stanične membrane djelovanjem vanjskih sila, ponajprije smicajnih (18, 21). Mehaničke se metode često primjenjuju u laboratorijskoj praksi zbog visoke učinkovitosti lize, a pripadaju im metode liziranja s visokotlačnim homogenizatorom, tekućim dušikom i kugličim mlinom (19, 21). Neke od njih objašnjene su u daljnjem tekstu.

Liziranje stanica visokotlačnim homogenizatorom najčešće se koristi za lizu mikroorganizama s razvijenom staničnom stijenkom (19, 21). U ovoj metodi stanična se suspenzija u instrumentu potiskuje kroz otvor ventila djelovanjem visokog tlaka. Do lize stanice dolazi zbog velike smicajne sile pri kompresiji koja nastaje tijekom ulaska stanice u ventil i ekspanziji nakon izlaženja. Ovisno o tipu stanica, potreban je tlak od 15 do 150 MPa, a cijeli postupak traje između 15 sekundi i 2 minute (21). Postoje i ultrazvučni homogenizatori koji stanice liziraju ultrazvučnim valovima, tj. sonifikacijom. Optimalni se

intenzitet ultrazvuka može postaviti pojedinačno za svaku tvar i medij, stoga je sonifikacija vrlo učinkovita i pouzdana metoda za lizu stanica. Kako se tijekom ultrazvučne sonifikacije temperatura povećava, na uređaju je omogućeno praćenje temperature integriranim temperaturnim senzorom ili sonifikacijom u pulsnom modu (16).

Kavitacija je vrsta sonokemijske reakcije u kojoj se liza stanica događa u aktivnim kavitacijskim područjima u blizini izvora ultrazvuka (20). Kavitacija podrazumijeva formaciju, rast i brzi kolaps mjehurića u tekućini koji nastaje promjenom lokalnog tlaka. Tijekom raspada mjehurića oslobađa se velika količina mehaničke energije u obliku vala koja dezintegrira staničnu membranu, suspenzija se intenzivno zagrijava ( $\sim 5000$  K), a tlak se povećava ( $\sim 1000$  atm) (21, 22). Ova je metoda vrlo nestabilna jer i male promjene temperature ili plina u tekućem mediju mogu generirati kemijske i fizikalne reakcije promjenom kavitacije (20). Kako bi se prevladali problemi povezani s ultrazvučnom kavitacijom, koristi se hidrodinamička kavitacija. Hidrodinamička kavitacija nastaje pumpanjem suspenzije stanica kroz suženi kanal, što dovodi do povećanja brzine, a postiže se visokotlačnim homogenizatorom (21). Hidrodinamičke sile koje se stvaraju u homogenizatoru liziraju staničnu membranu, a broj liziranih stanica i koncentracija oslobođenih enzima proporcionalni su jačini hidrodinamičkih sila u homogenizatoru (20).

U kugličnom mlinu stanice se razbijaju sudaranjem kuglica izrađenih od stakla, čelika ili keramike i medija u kojemu se nalaze stanice pri velikoj brzini. Na ovaj postupak utječu brojni parametri, poput promjera i gustoće kuglice, koncentracije stanica te brzine miješanja uzorka. Manje se kuglice, u rasponu od 0,25 do 0,5 mm, preporučuju za lizu stanica zbog svoje efikasnosti. Iako je djelotvornost kugličnog mlina vrlo visoka, potpunim raspadom stanica stvaraju se krhotine koje otežavaju pročišćavanje uzorka i daljnju analizu. Tijekom sudara kuglica i stanica povisuje se temperatura koja može razgraditi proteine i nukleinske kiseline (21).

### **1.3.2. Nemehanička liza**

Nemehanička liza može se razvrstati u tri glavne skupine – fizikalnu, kemijsku i biološku – od kojih se svaka dijeli na temelju specifičnih tehnika koje se koriste za dezintegraciju stanične membrane (19, Slika 2.).

Fizikalna liza stanice nekontaktna je metoda raspada stanice koja koristi vanjsko djelovanje poput topline, tlaka i energije za rupturu stanica. Toplinska liza, kavitacija i osmotski šok pripadaju ovoj skupini (18).

Toplinska liza može se provesti ponavljanim ciklusima pothlađivanja i zagrijavanja (engl. *freezing and thawing*, F/T). Pothlađivanje stanične suspenzije uzrokuje stvaranje kristalića leda koji zbog svojih fizikalnih svojstava potiče raspad stanice (21). Kristalizacija vode u ekstracelularnoj tekućini uzrokuje smanjenje volumena tekućine, što dovodi do narušavanja osmolarnosti. Intracelularna tekućina izlazi iz stanice zbog hipertoničnosti izvanstanične otopine, a samim time uništava organele i oblik stanice. Zbog različite gustoće vode i leda prilikom zagrijavanja uzorka stanične membrane stanica lako pucaju i uslijed toga dolazi do lize stanice (23, 24). Iako ova tehnika uzrokuje oštećenja staničnih komponenti osjetljivih na temperaturu, odabrani biokemijski parametri koji se koriste za evaluaciju lize u ovom istraživanju ne mijenjaju značajno svoje karakteristike (19, 21).

Osmotski šok nastaje ako se koncentracija iona soli izvan stanice naglo promijeni tako da nastane razlika u koncentraciji izvanstaničnih i unutarstaničnih ionskih vrijednosti. Stanična membrana zbog osmoze postaje propusna za vodu, povećava volumen i puca. Osmotski je šok pogodan za lizu stanica sisavaca zbog krhke membranske strukture (21).

Tehnike kemijske lize mogu se klasificirati u alkalnu lizu i lizu stanica deterdžentima (18). U alkalnoj su lizi hidroksilni ioni ( $\text{OH}^-$ ) glavna komponenta koja se koristi za dezintegraciju stanične membrane. Puffer za lizu sastoji se od natrijevog hidroksida (NaOH) i natrijevog dodecil sulfata (SDS).  $\text{OH}^-$  ion reagira s esterima masnih kiselina i glicerolom iz fosfolipida te čini staničnu membranu propusnom, a SDS solubilizira proteine i membranu. Raspon pH od 11,5 do 12,5 poželjan je za lizu stanica. Sredstva za lizu deterdženata, koja se nazivaju i površinski aktivna sredstva, mogu poremetiti hidrofobno-hidrofilne interakcije između parova lipid-lipid, lipid-protein i protein-protein. Deterdženti se najčešće koriste za liziranje stanica sisavaca. Od triju skupina deterdženata – kationskih, anionskih i neionskih – preferiraju se neionski deterdženti jer uzrokuju minimalna oštećenja proteina i enzima (19, 21).

Najznačajnija karakteristika enzimske lize jest njezina specifičnost. Za lizu bakterijskih stanica koriste se lizozimi koji reagiraju s peptidoglikanskim slojem i razbijaju glikozidnu vezu pri temperaturi 35 °C i pH-vrijednosti 6 – 7. Za gram-negativne bakterije lizozim se koristi u kombinaciji s deterdžentima za razbijanje stanične stijenke, a potom i membrane. Hitinaza se može koristiti za lizu kvasaca, a pektinaze se koriste za lizu biljnih stanica. Proteinaza K koristi se za izoliranje genomske DNK (18, 21).

## **2. CILJ**

Cilj je ovog istraživanja procjena moguće dijagnostičke primjene unutarstaničnih biljega – LDH-a, NSE-a i feritina – iz staničnog lizata za postupak optimizacije lize perifernih mononukleara. Uvjeti pri kojima se dobije najveći maseni udio biokemijskih parametara po gramu proteina u lizatu smatrat će se optimalnim uvjetima za lizu mononuklearnih stanica periferne krvi.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ustroj

Ova je studija dio šireg projekta optimizacije validacije kandidata za tumorske biljege nemikrocelularnog karcinoma pluća. Prethodno su je odobrili Klinički bolnički centar Osijek (Broj: 25-1:13152-5/2011), Klinički bolnički centar Zagreb (Klasa: 8.1-16/ 158-1, Broj: 02/21 AG) i Opća bolnica Našice (Broj: 01-664/2-2014.). Istraživanje pod nazivom „Validacija kandidata za tumorske biljege nemikrocelularnog karcinoma pluća” u svrhu izrade doktorske disertacije provela je mr. sci. Sandra Dundović, spec. med. biochem. (mentor: doc. dr. sc. Željko Debeljak). Za segment studije koji se nalazi u završnom radu ishodeno je dodatno odobrenje od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/18-08/07, Broj: 2158-61-07-18-117).

Istraživanje je podijeljeno u dva dijela: optimizaciju izolacije mononuklearnih stanica periferne krvi, koju je neophodno provesti prije lize stanica, i na optimizaciju lize stanica kojom se ovaj rad i bavi. Za optimizaciju lize perifernih mononukleara postavljena su četiri uvjeta varijacijom broja ciklusa i temperature pothlađivanja i zagrijavanja kako bi se ispitali različiti uvjeti pripreme lizata mononuklearnih stanica (Slika 4.).

#### 3.2. Materijali

U studiju je uključeno 40 zdravih ispitanika obaju spolova od dvadeset do šezdeset godina s područja Osječko-baranjske županije. Jedini je kriterij za ulazak u studiju odsutnost bolesti koje uzrokuju pomak vrijednosti parametara diferencijalne krvne slike izvan referentnih vrijednosti. Formirane su četiri skupine ispitanika čiji su se uzorci koristili za ispitivanje pojedinih uvjeta lize perifernih mononuklearnih stanica.

Krv potrebna za izolaciju mononuklearnih leukocita uzorkovana je iz vena antekubitalnog područja u redovnoj ambulanti Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek. Svakom je ispitaniku uzorkovano približno 8 mL venske krvi u tri epruvete. Epruveta s 5,4 mg K3-EDTA (trikalij – etilendiamintetraoacetna kiselina, engl. *tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid*) antikoagulansa korištena je za određivanje kompletne krvne slike u svrhu evaluacije uspješnosti izolacije perifernih mononukleara. Iz venske krvi u epruveti bez antikoagulansa analizirani su serumski parametri

za procjenu uspješnosti lize stanica. U komercijalnim epruvetama (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, SAD) mononuklearne su stanice separirane iz pune krvi u nekoliko koraka, a tome doprinose poliesterski gel i gradijent gustoće tekućine ispod poliesterskog gela koji se nalaze u epruveti. Tekućina sadrži 1 mL 0,1 molarne otopine natrijeva citrata i 2 mL Ficoll otopine (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, SAD). Ficoll je razgranati polimer saharoze i epiklorhidrina, molekularne mase 400 000 Da. Zbog velikog broja hidroksilnih skupina izuzetno je topljiv u vodi (25).

### **3.3 Metode**

Kako bi iskorištenje staničnog lizata iz kojeg je moguće analizirati unutarstanične biljege bilo što kvalitetnije, potrebno je optimizirati postupak lize mononuklearnih stanica. Optimizacija je provedena u nekoliko koraka na uzorcima venske krvi četrdesetero ispitanika. Individualni uzorci krvi raspoređeni su u tri epruvete iz kojih su zasebno izolirani periferni mononukleari i provedene evaluacije uspješnosti izolacije i lize perifernih mononukleara.

#### **3.3.1. Određivanje kompletne krvne slike**

U svrhu procjene zdravstvenog stanja ispitanika i efikasnosti izolacije mononuklearnih stanica određujemo kompletnu krvnu sliku na hematološkom brojaču Sysmex XN 1000, Kobe, Japan.

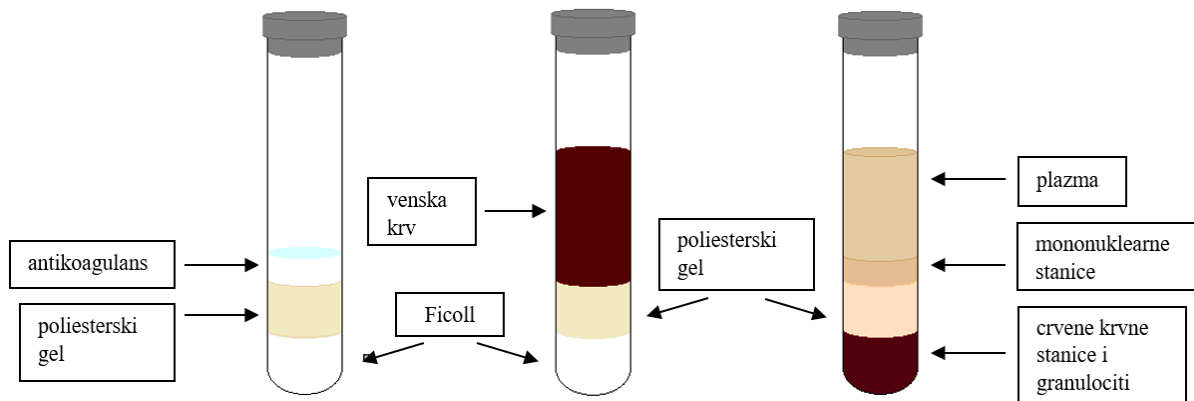
#### **3.3.2. Određivanje serumskih parametara**

Serumske parametre potrebno je odrediti neposredno prije postupka lize stanica radi potrebnih analitičkih čimbenika za prikaz iskorištenja liziranih stanica u poslije analitičkoj fazi obrade podataka koji će pokazati optimalne rezultate istraživanja. Uzorak venske krvi iz kojeg određujemo serumske parametre potrebno je centrifugirati 10 minuta na 3500 okretaja po minuti (okr/min) pri temperaturi 25 °C. Nakon centrifugiranja serum se raspodijeli u dva alikvota. Iz jednog alikvota određuju se ukupni proteini, feritin i LDH na mjernom instrumentu Beckman Coulter AU680 (Brea, Kalifornija, SAD). LDH se određuje enzimskom spektrofotometrijskom metodom. Enzimska reakcija LDH-a katalizira prijelaz laktata i oksidiranog oblika nikotinamid adenin dinukleotida (NAD<sup>+</sup>) u piruvat i reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). NADH apsorbira svjetlost valne duljine 340 nm, što se detektira spektrometrom (26).

Ukupni proteini određuju se tzv. biuret metodom pomoću bakrovih iona koji u alkalnoj sredini reagiraju s peptidima koji imaju najmanje dvije peptidne veze, pri čemu se razvija karakteristična ljubičasta boja otopine pa se apsorbancija mjeri pri 540/660 nm i direktno je proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku (27). Feritin se određuje imunoturbidimetrijskom metodom. Iz drugog alikvota određuje se NSE na analitičkom uređaju Cobas c6000 (Basel, Švicarska). Metoda je detekcije elektrokemiluminiscentna.

### 3.3.3. Izolacija mononuklearnih stanica

Za separaciju mononukleara u komercijalnim epruvetama potrebno je minimalno 8 mL pune krvi. U epruveti se ispod poliesterskog gela u suspenziji nalaze ficoll i antikoagulans, a iznad gela se nalazi uzorak krvi. Centrifugiranje je potrebno provesti unutar dva sata od uzorkovanja krvi. Nakon centrifugiranja mononuklearne stanice nalaze se iznad poliesterskog gela i ispod sloja plazme, a granulociti, trombociti i eritrociti utjecajem centrifugalne sile prolaze ispod poliesterskog gela (Slika 3.). U sljedećem je koraku potrebno ukloniti gornju polovicu volumena tekućine. Preostali dio plazme, u kojemu se nalaze mononuklearne stanice, pažljivo se pipetira kako se uzorak ne bi kontaminirao gelom ili kako ne bi došlo do povlačenja drugih krvnih stanica. Pipetiranu tekućinu potrebno je premjestiti u epruvetu s konusnim dnom za daljnji postupak centrifugiranja i ispiranja stanica.



Slika 3. Prikaz sadržaja izolacijske epruvete s lijeva na desno: prije uzorkovanja krvi, nakon uzorkovanja krvi te nakon centrifugiranja uzorka. (Shemu izradila autorica prema slici iz članka autora Puleo A. i sur. (28)).

### 3.3.4. Liza mononuklearnih stanica

Nakon postupka izolacije stanice je potrebno resuspendirati u 10 mL fosfatom puferirane otopine soli (PBS, engl. *phosphate buffered saline*). Za pripremu PBS-a potrebno je 8,0063 g natrijeva klorida (NaCl), 0,2013 g kalijeva klorida (KCl), 0,2449 g kalijevog dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1,7799 g dinatrijevog hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) i 1 L destilirane vode. Lagano promiješana solucija centrifugira se 20 min na 1300 okr/min. Supernatant se pažljivo ukloni, a precipitat u kojemu se nalaze stanice ponovno se resuspendira u 1 mL PBS-a. Nakon što su stanice resuspendirane, jedan je dio uzorka (200  $\mu\text{L}$ ) potrebno odvojiti za brojanje izoliranih stanica na hematološkom brojaču, a ostatak uzorka koristi se pri daljnjem postupku lize stanica. Kao varijacija uvjeta za optimizaciju lize mononuklearnih stanica koristit će se broj ciklusa i temperature zagrijavanja i pothlađivanja. Prva se skupina uzoraka u jednom ciklusu zaledi na temperaturi  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom dva sata i nakon toga se epruvete s uzorcima prenose u vodenu kupelj temperature  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  te se zagrijavaju sat vremena. Druga je skupina uzoraka podvrgnuta istim uvjetima ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$  pothlađivanje,  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  zagrijavanje), ali će broj ciklusa u ovom slučaju biti dva, što znači da će se uzorci još jednom zamrznuti i odmrznuti. Sljedeća se skupina uzoraka pothlađuje na temperaturi  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom dva sata te se nakon toga premješta u vodenu kupelj ( $+37\text{ }^\circ\text{C}$ ), gdje se zagrijava sat vremena u jednom ciklusu. Za posljednju skupinu uzoraka temperature zagrijavanja i pothlađivanja bit će identične prethodnoj skupini ( $-70\text{ }^\circ\text{C}$  pothlađivanje,  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  zagrijavanje), ali će broj ciklusa biti dva.



Slika 4. Uvjeti lize mononuklearnih stanica periferne krvi.

Nakon zagrijavanja u vodenoj kupelji stanice su lizirane i lizat je spreman za daljnju obradu. Lizat se alikvotira u dva dijela: 300  $\mu\text{L}$  za analizu LDH-a, ukupnih proteina i feritina te 300  $\mu\text{L}$  za analizu NSE-a. Dobivene koncentracije biokemijskih parametara bit će izražene kao maseni udio po gramu proteina u lizatu, a isto tako i serumski proteini. Uvjeti pri kojima se dobije najveći maseni udio biokemijskih parametara po gramu proteina u lizatu smatrat će se optimalnim uvjetima za postupak lize mononuklearnih stanica periferne krvi. Zbog biološke varijabilnosti u koncentracijama biomarkera dobiveni rezultati iz lizata stavit će se u omjer s pripadajućim koncentracijama iz seruma. Omjer LDH-a prikazan je sljedećom jednadžbom:  $\{[\text{LDH lizat (U/L) po gramu proteina LDH serum (U/L) po gramu proteina}] = \text{LDH lizat/LDH serum}\}$ , a analogno tome obrađeni su rezultati za feritin, NSE i ukupne proteine. Omjeri biokemijskih parametara iz lizata i seruma predstavljaju normalizirane rezultate ili iskorištenost stanica.

### 3.4. Statističke metode

Primijenjene su jednostavne metode deskriptivne statistike. Numeričke vrijednosti koncentracije i aktivnosti LDH-a, NSE-a, feritina te ukupnih proteina u lizatu opisane su aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom i analizom varijance (ANOVA, engl. *Analysis of mean using variance*). Izračuni su provedeni primjenom računalnih programa Microsoft Office Excel 2007 (Redmond, WA, SAD) i STATISTICA (inačica 7.0. StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD).

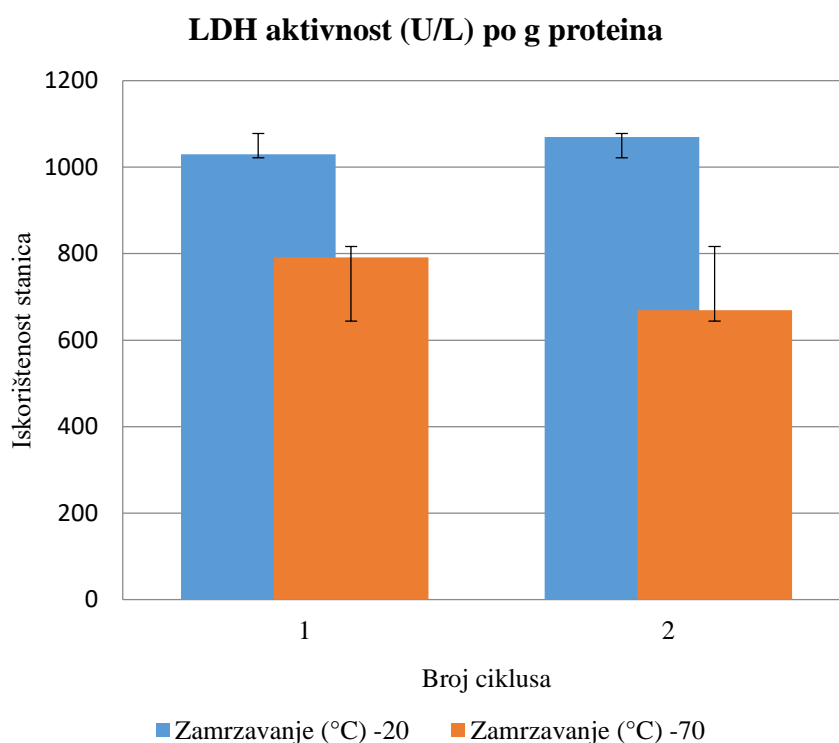
#### 4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 40 ispitanika obaju spolova. Uzorkovana im je venska krv iz koje su izolirane i lizirane periferne mononuklearne stanice.

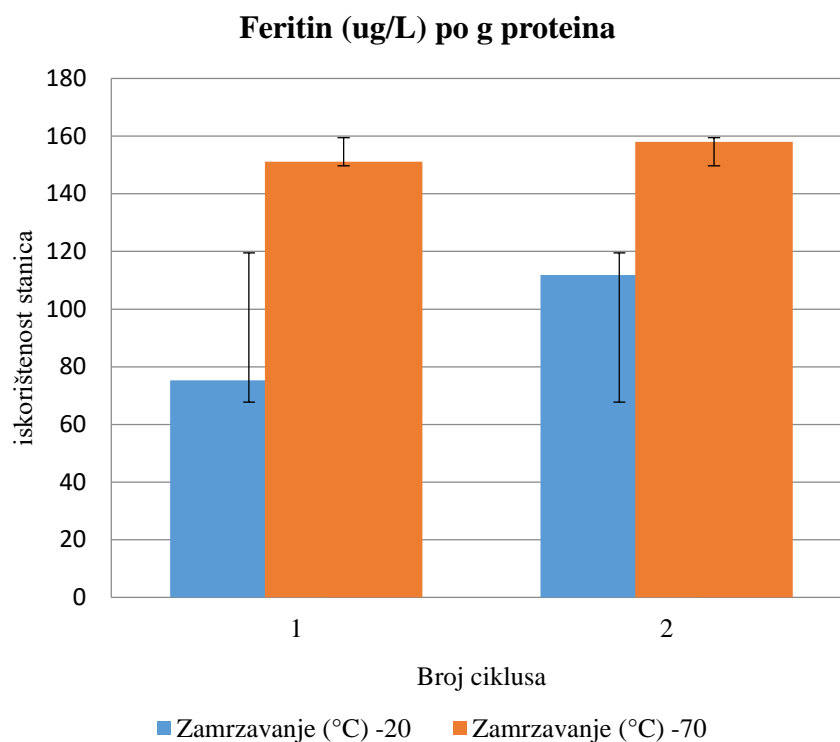
##### 4.1. Biokemijski parametri iz liziranih mononuklearnih stanica

Na Slikama 5. – 9. grafički su prikazane aritmetičke sredine i standardne devijacije biokemijskih parametara iz liziranih stanica. Pojedini grafički prikazi pokazuju aktivnosti analita po gramu proteina i koncentracije analita po gramu proteina povezanih s četirima ispitivanim kriterijima. Uvjeti su postavljeni varijacijom broja ciklusa lize stanica i temperature F/T ciklusa (Slika 4.).

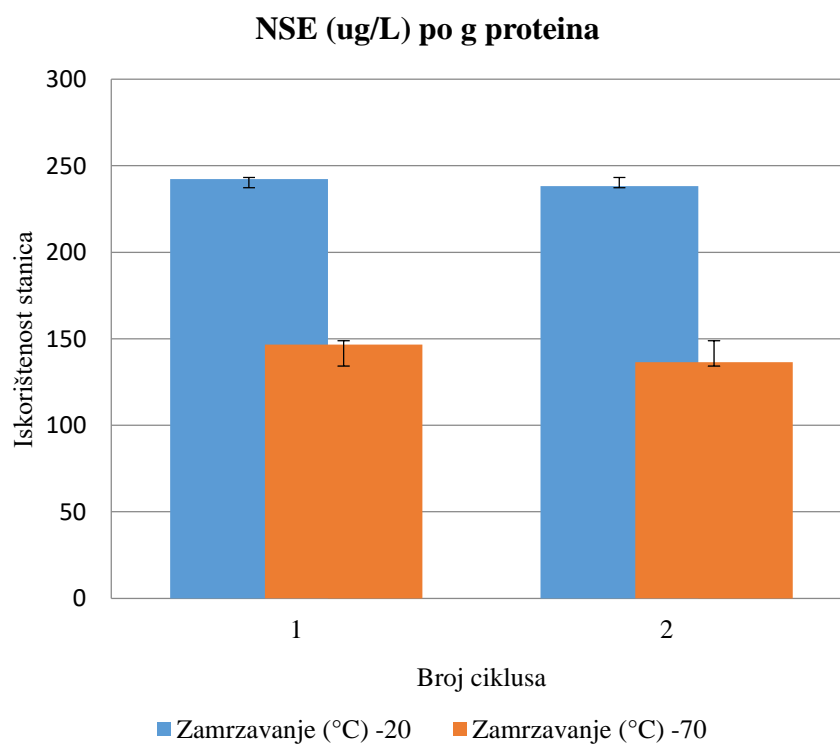
Najveća koncentracija LDH-a i proteina u lizatu izmjerena je nakon lize stanica u dvama F/T ciklusima na temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a značajna je koncentracija NSE-a u lizatu dobivena pri jednakoj temperaturi u jednom F/T ciklusu. Za feritin iz lizata optimalno je zamrzavanje na temperaturi  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  u dvama F/T ciklusima.



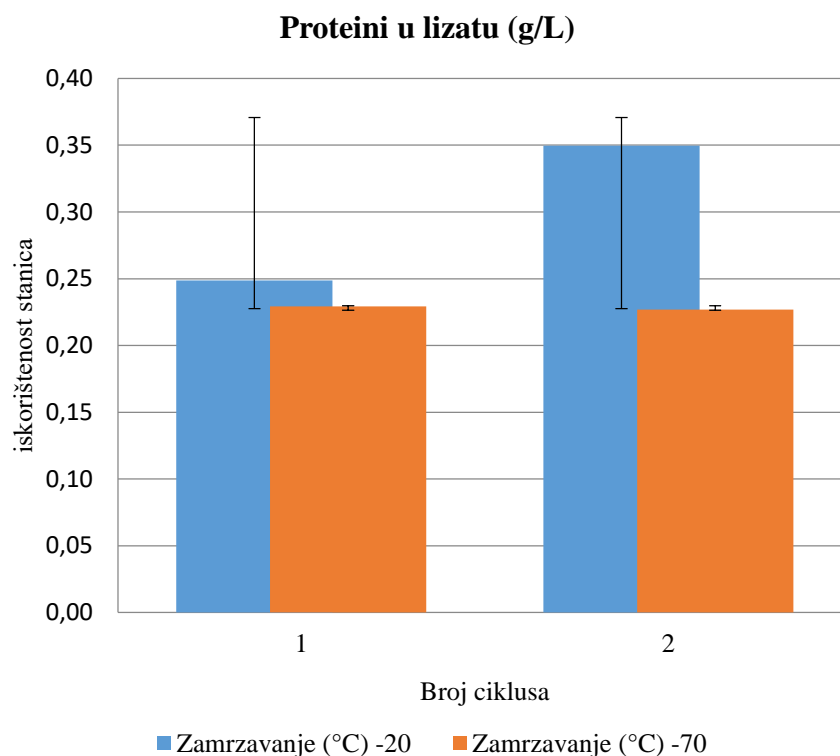
Slika 5. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) LDH-a (U/L) po gramu proteina u lizatu.



Slika 6. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) feritina ( $\mu\text{g/L}$ ) po gramu proteina u lizatu.



Slika 7. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) NSE-a ( $\mu\text{g/L}$ ) po gramu proteina u lizatu.

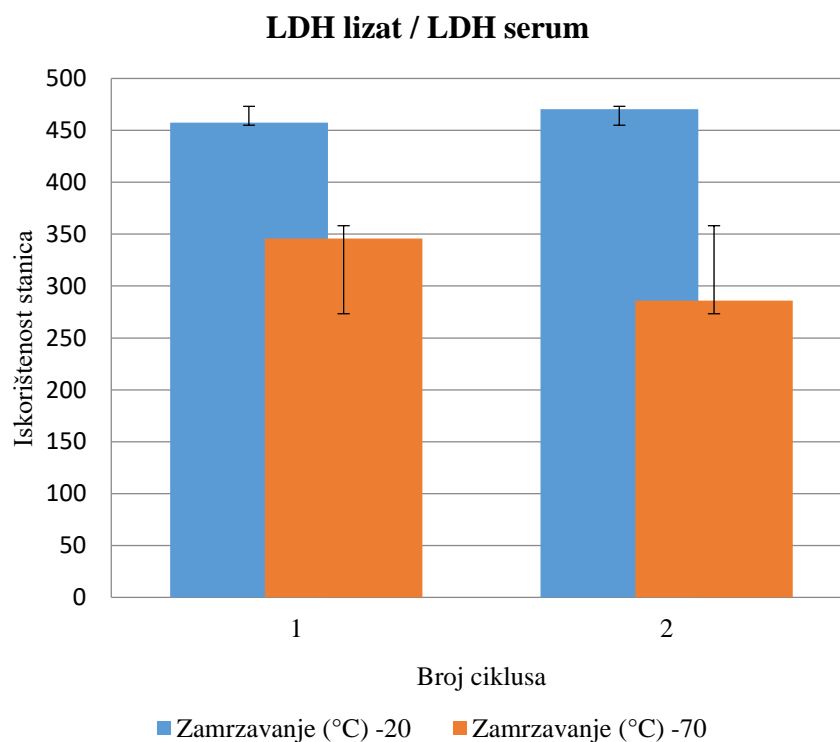


Slika 8. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) proteina (g/L) u lizatu.

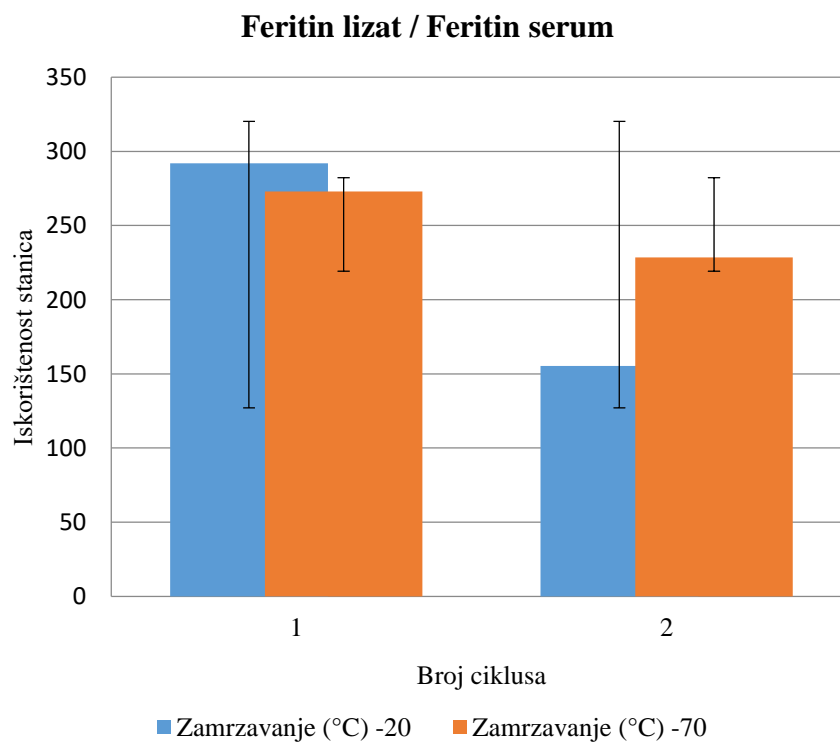
#### 4.2. Normalizirani biokemijski parametri

Aritmetičke sredine i standardne devijacije omjera analiziranih segmenata iz lizata sa segmentima iz seruma nalaze se na Slikama 9. – 12. Normalizirani rezultati mijenjaju optimalne vrijednosti iz samog lizata pa su svi analizirani parametri najbolje iskorišteni pri temperaturi -20 °C neovisno o broju F/T ciklusa. Unutarstanični LDH i proteini najveće vrijednosti postižu kroz dva F/T ciklusa, a NSE i feritin kroz jedan F/T ciklus.

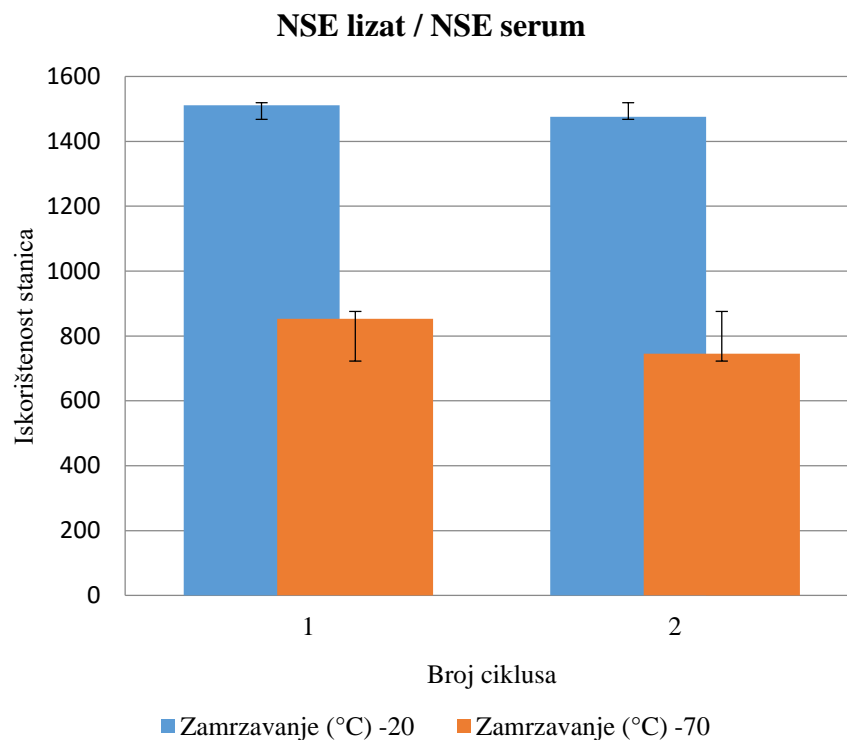




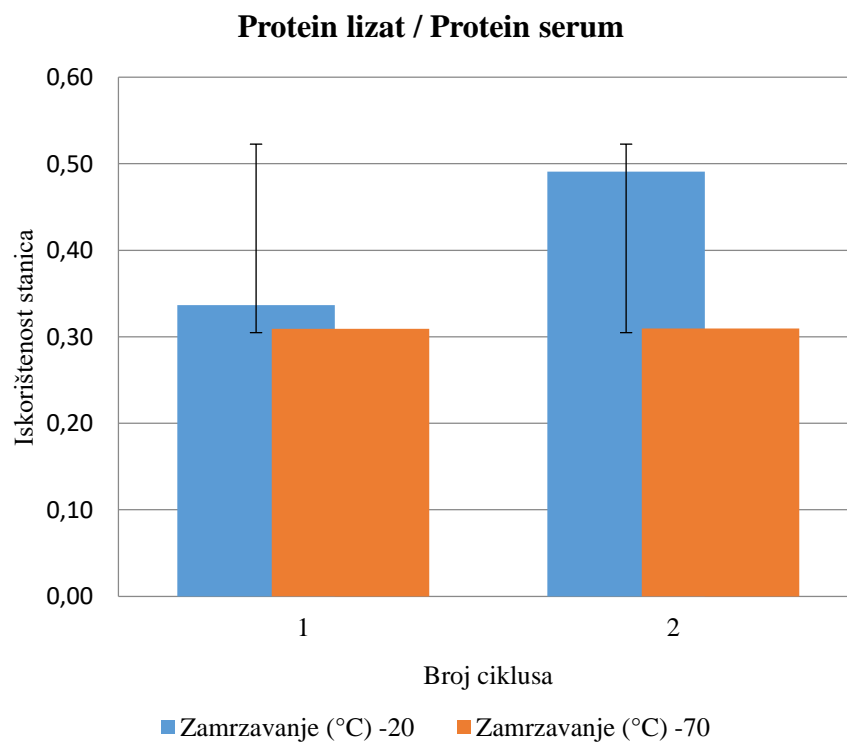
Slika 9. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) LDH-a (lizat/serum).



Slika 10. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) feritina (lizat/serum).



Slika 11. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) NSE-a (lizat/serum).



Slika 12. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) proteina (lizat/serum).

### 4.3. ANOVA

U Tablici 1. prikazani su rezultati primjene ANOVA-e. Iz tablice je uočljivo da su neke vrijednosti manje od 0,05, što znači da su statistički značajne (29). Za LDH, NSE i ukupne proteine iz lizata te njihove normalizirane vrijednosti statistički je značajna temperatura zamrzavanja. Temperatura zamrzavanja za feritin statistički je značajna samo za vrijednosti iz lizata, dok normalizirani rezultati feritina primjenom ANOVA-e postaju irelevantni. Broj ciklusa ni za jedan od primijenjenih parametara za optimizaciju metode lize nije relevantan.

Tablica 1. Vrijednosti statističke značajnosti biokemijskih parametara.

<b>Biokemijski parametri (p*)</b>	<b>Odsječak</b>	<b>Temperatura zamrzavanja (°C)</b>	<b>Broj ciklusa</b>
<b>LDH (lizat)</b>	>0,001	0,001	0,654
<b>LDH (lizat/serum)</b>	>0,001	0,001	0,581
<b>Feritin (lizat)</b>	>0,001	0,005	0,292
<b>Feritin (lizat/serum)</b>	>0,001	0,615	0,098
<b>NSE (lizat)</b>	>0,001	0,001	0,795
<b>NSE (lizat/serum)</b>	>0,001	>0,001	0,650
<b>Protein (g/L)</b>	>0,001	0,001	0,795
<b>Protein %</b>	>0,001	>0,001	0,650

\* p – statistička značajnost

## 5. RASPRAVA

Mononuklearne stanice neizostavni su dio imunosnog sustava. Kao glavni regulatori svih imunoloških funkcija, prenose se krvlju u područja zahvaćena upalom, čime je osigurana brza i snažna obrana organizma (1, 3). Kako su mononuklearne stanice važan faktor u obrani organizma u zloćudnim i upalnim stanjima, njihov se unutarstanični sastav mijenja ovisno u potrebama reakcije u kojoj sudjeluju. Ako su određene biomolekule koje izlučuju mononukleari prisutne u većoj koncentraciji u zloćudnim i upalnim procesima, možemo ih smatrati kandidatima za tumorske markere, odnosno biomarkere. Svrha je ovog istraživanja optimizirati postupak lize mononuklearnih stanica. Koncentracije i aktivnosti unutarstaničnih biomarkera iz lizata s pripadajućim serumskim parametrima staviti će se u omjer radi normalizacije dobivenih rezultata na temelju kojih će se odrediti optimalni uvjeti lize mononuklearnih stanica. U istraživanju su korišteni biomarkeri NSE, LDH i feritin.

Prema našim spoznajama, ovakva istraživanja u literaturi nisu poznata. Stanični je lizat potencijalno dobar uzorak za laboratorijsku dijagnostiku patogena, enzimske imunopretrage, proces purifikacije proteina, dijagnostiku karcinoma, analizu građe bioloških molekula te proizvodnju hormona, cjepiva i monoklonskih protutijela u kontekstu biomedicine (17, 18, 19). Zbog širokog spektra pretraga i tehnika kojima se može izvesti stanična liza postala je perspektivan izvor dijagnostičkih biomarkera. Vrijednosti postupaka koji se temelje na staničnoj lizi na globalnom tržištu procjenjuju se na oko 2,35 milijardi dolara u 2016. godini, a očekuje se da će do 2021. dostići 3,84 milijarde dolara (18).

Za optimizaciju postupka lize mononuklearnih stanica postavljena su četiri uvjeta varijacijom broja ciklusa i temperature pothlađivanja i zagrijavanja kako bi se ispitali različiti uvjeti pripreme lizata. Zadane temperature zamrzavanja jesu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a nakon svakog zamrzavanja uzorka slijedi zagrijavanje u vodenoj kupelji na temperaturi  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Svakom temperaturnom uvjetu pridružen je broj ciklusa pothlađivanja i zagrijavanja koji varira između 1 i 2. Uzimajući u obzir rezultate prikazane aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, uvjeti pri kojima je dobiven najveći maseni udio biokemijskih parametara po gramu proteina u lizatu za LDH i ukupne proteine u lizatu jesu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u dvama ciklusima (F:  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , T:  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dva ciklusa). Za feritin su najbolje vrijednosti pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  u dvama ciklusima (F:  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , T:  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dva ciklusa), a za NSE je najpogodnija temperatura lize  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u jednom ciklusu (F:  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , T:  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; jedan ciklus). Kako bismo mogli zaključiti koji kriterij za lizu mononuklearnih stanica daje najbolje iskorištenje, zbog individualne biološke

varijabilnosti u koncentracijama biomarkera, dobiveni rezultati iz lizata stavljeni su u omjer s pripadajućim koncentracijama iz seruma. Iz normaliziranih vrijednosti biokemijskih parametara može se zaključiti da je optimalan kriterij lize stanica za LDH i proteine postignut pri temperaturi zamrzavanja  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u dvama ciklusima, a najveće iskorištenje feritina i NSE-a ostvareno je pri istoj temperaturi u jednom ciklusu.

Međutim, kako se aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ne mogu prikazati statistički značajni rezultati, podaci su dodatno obrađeni ANOVA-om. Optimalni kriteriji dobiveni analizom LDH-a, NSE-a i ukupnih proteina iz lizata, izračunom njihovih normaliziranih vrijednosti, pokazuju da je jedan temperaturni uvjet za lizu mononuklearnih stanica, pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , statistički značajan. Broj F/T ciklusa ne utječe na raspad stanica te ne doprinosi većoj iskorištenosti stanica s obzirom na koncentracije i aktivnosti analita iz staničnog lizata. Feritin je jedini parametar kojemu se mijenjaju uvjeti. U staničnom lizatu statistički je značajno veće iskorištenje feritina pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ali pri normalizaciji rezultata, svi uvjeti korišteni za varijaciju lize stanica za feritin postaju statistički beznačajni te se za izolaciju feritina mogu koristiti bilo koji temperaturni uvjet i broj ciklusa.

Kako je stanični lizat važno analitičko ishodište za širok spektar pretraga te ima perspektivu u području biomedicine i bioinženjerstva, važno je odabrati i istražiti optimalne metode lize stanica koje pogoduju analitičkim zahtjevima određenih biokemijskih parametra. U ovom istraživanju odabrana je metoda lize F/T ciklusima, a zaključeno je da je optimalna temperatura zamrzavanja za sve parametre  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  neovisno o broju F/T ciklusa. Kako bi se ova metoda zaključno potvrdila ili odbacila, moguće je daljnje istraživanje istih biokemijskih parametara u populaciji bolesnika. Zajednička je svim ispitivanim analitima (LDH, feritin, NSE) povezanost s agresivnim i brzorastućim oblikom karcinoma pluća, SCLC-om, koji zauzima 15 – 20 % svih karcinoma pluća, ali i drugim karcinomima pluća (4, 13) Optimizacija metode lize iz mononuklearnih stanica pacijenata oboljelih od karcinoma pluća stvorila bi preduvjet za unaprjeđenje dijagnostike ove grupe bolesti.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- optimalna temperatura zamrzavanja za postupak stanične lize pri kojem se postigne najveće iskorištenje biokemijskih parametara – ukupnih proteina, NSE-a i LDH-a – iz lizata jest -20 °C
- statistički značajno veće iskorištenje feritina iz lizata dobije se pri -70 °C, neovisno o broju F/T ciklusa, ali nakon normalizacije rezultata uvjeti varirani u istraživanju – temperatura i broj ciklusa – gube statističku značajnost
- broj F/T ciklusa statistički je irelevantan za svaki od korištenih parametara u istraživanju te se zbog uštede vremena preporučuje postupak lize stanice u jednom F/T ciklusu.

## 7. SAŽETAK

**Cilj:** Cilj je ovog istraživanja procjena moguće dijagnostičke primjene unutarstaničnih biljega – LDH-a, NSE-a i feritina – iz staničnog lizata za postupak optimizacije lize perifernih mononukleara.

**Nacrt studije:** Kliničko opservacijsko istraživanje

**Materijali i metode:** U studiju je uključeno 40 zdravih ispitanika obaju spolova. Svakom je ispitaniku uzorkovano približno 8 mL venske krvi u tri spremnika iz kojih su zasebno izolirani, a potom su lizirani periferni mononukleari te su provedene evaluacije uspješnosti izolacije i lize perifernih mononukleara.

**Rezultati:** Optimalni kriterij za postupak lize stanica za LDH i ukupne proteine u lizatu: F -20 °C, T: +37 °C, dva ciklusa; feritin: F: -70 °C, T: + 37 °C, dva ciklusa; NSE: F: 20 °C, T: + 37 °C; jedan ciklus. Normalizacijom rezultata optimalni se uvjeti mijenjaju za feritin: F: -20 °C, T: + 37 °C; jedan ciklus. Nakon obrade podataka ANOVA-om statistički je značajan samo temperaturni uvjet lize pri -20 °C, a za izolaciju feritina ni jedan kriterij nije pogodan.

**Zaključak:** Optimalna temperatura zamrzavanja pri kojoj se postigne najveće iskorištenje biokemijskih parametara – ukupnih proteina, NSE-a i LDH-a – iz lizata jest -20 °C, a za feritin iz lizata -70 °C. Broj F/T ciklusa statistički je irelevantan za svaki od korištenih parametara u istraživanju te se zbog uštede vremena preporučuje postupak lize stanice u jednom F/T ciklusu

**Ključne riječi:** feritin, laktat dehidrogenaza, lizat, mononuklearne stanice, neuron specifična enolaza, pothlađivanje i zagrijavanje

## 8. SUMMARY

### **Optimization of peripheral mononuclear blood cells lysis**

**Objective:** The aim of this study is to identify possible diagnostic applications of intracellular markers: LDH, NSE and ferritin from the cell lysate for peripheral blood mononuclear cells (PBMC) optimization procedure.

**Study design:** Clinical observational study

**Materials and Methods:** The study included 40 healthy subjects of both sex. Approximately 8 mL of venous blood was sampled to each subject in 3 vacutainers. Individual blood samples were divided into 3 tubes from which isolates were individually isolated and then lysed peripheral mononuclear and verified isolation and lysis of peripheral mononuclear isolates.

**Results:** Optimal lysis criteria, considering arithmetic mean and standard deviation, for lysate protein concentrations and activity, LDH and total lysate proteins: F:  $-20^{\circ}\text{C}$ , T:  $+37^{\circ}\text{C}$ , 2 cycles; ferritin: F:  $-70^{\circ}\text{C}$ , T:  $+37^{\circ}\text{C}$ , 2 cycles; NSE: F:  $20^{\circ}\text{C}$ , T:  $+37^{\circ}\text{C}$ ; 1 cycle. A protein ratio lysate to serum alters optimal lysis conditions for ferritin: F:  $-20^{\circ}\text{C}$ , T:  $+37^{\circ}\text{C}$ ; 1 cycle, whereas remaining parameters keep the same values. After processing data by ANOVA, only the lysis temperature condition is statistically significant. Freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  is suitable for LDH, NSE and total proteins, while no criteria are suitable for ferritin.

**Conclusion:** The optimal freezing point for cell lysis procedure, at which the greatest utilization of biochemical parameters is achieved: NSE, LDH and total lysate proteins is  $-20^{\circ}\text{C}$  and for lysate ferritin is  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ferritin value in lysate/serum ratio does not show significant temperature condition. The number of F/T cycles is statistically insignificant for each of the parameters used in the study.

**Keywords:** ferritin, freezing and thawing, lactate dehydrogenase, lysate, mononuclear cells, neuron specific enolase



**9. LITERATURA**

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Vukinović Škudar D, Marušić M. i sur. Imunologija. 7. izdanje. Zagreb. Medicinska naklada; 2010. str 1-17.
2. Guyton AC. Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti. 5. izdanje. Zagreb. Medicinska naklada; 1995. str. 241-253.
3. Sen P, Kemppainen E, Oreši M. Perspectives on system modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Front. Mol. Biosci.* 2018;4:96:1
4. Schuurman, Henk-Jan & Quesniaux, VFJ. Development and maturation of T and B cells. 1999;2-6.
5. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M. i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. izdanje. Zagreb. Medicinska naklada; 2018. str. 624-639.
6. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. 1. izdanje. Zagreb. Medicinska naklada; 2009. str. 517-533.
7. Alkhateeb AA, Connor JR. The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1836:2:245-254.
8. Thévenod F. Iron and Its Role in Cancer Defense: A Double-Edged Sword. *Met. Ions Life Sci.* 2018;18:438-454.
9. Poliklinika Breyer. Feritin. Dostupno na adresi: <http://breyer.hr/pretrage/sve-pretrage/fertin>. Datum pristupa: 3.9.2019.
10. Harmsna M, Schutte B, Ramaekers F. Serum markers in small lung cancer: Opportunities for improvement. *Biochim Biophys Acta.* 2013;23-41:87-203:209-251:620-652.
11. Georgantzi K, Sköldenberg GE, Stridsberg M, Kogner P, Jakobson Å. Eva Tiensuu i sur. Chromogranin A and neuron-specific enolase in neuroblastoma: Correlation to stage and prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol.* 2018;0(0):2,7-8.
12. Zhou M, Wang Z, Yao Y, Zhou H, Liu M, Sun J. Neuron-specific enolase and response to initial therapy are important prognostic factors in patients with small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol.* 2017; 19(7):1-2,3-4.
13. Buil-Bruna N, López-Picazo JM, Moreno-Jiménez M, Martín-Algarra S, Ribba BF, Trocóniz I. A Population Pharmacodynamic Model for Lactate Dehydrogenase and

- Neuron Specific Enolase to Predict Tumor Progression in Small Cell Lung Cancer Patients. *The AAPS Journal*.2014;16:3:610-617.
14. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R. Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer lett.* 2015;358:1-4.
  15. Serum markers in small lung cancer: Opportunities for improvement – harmsma 2013;23-41;87-203;209-251;620-652.
  16. Zhou L, Xie Z, Shao Z, Chen W, Xie H, Cui X. Modeling the relationship between baseline lactate dehydrogenase and prognosis in patients with extensive-disease small cell lung cancer: a retrospective cohort study. *J Thorac Dis.* 2018;10(2):1043-1049.
  17. Hielscher Ultrasound Technology. Sonication Lysis: Cell Disruption & Extraction. Dostupno na adresi: <https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>. Datum pristupa: 14.7.2019.
  18. Thatcher SA. DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clin Chem.* 2015;61:1; 1-8.
  19. Balasundaram B, Harrison S, Bracewell DG. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends Biotechnol.* 2009;27:8:477-483.
  20. Üstün-Aytekin Ö, Arısoy S, Aytekin AÖ, Yıldız E. Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *Lactis. Ultrason Sonochem.* 2016;29:164-170.
  21. Islam MS, Aryasomayajula A, Selvaganapath PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines.* 2017;8:83:1-22.
  22. Hielscher Ultrasound Technology. Sonochemical Reaction and Synthesis. Dostupno na adresi: [https://www.hielscher.com/sonochem\\_01.htm](https://www.hielscher.com/sonochem_01.htm) Datum pristupa: 24.08.2019.
  23. Zhu Z, Qiao L, Zhao Y, Zhang S. Optimal freezing and thawing for the survival of peripheral nerves in severed rabbit limbs. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(11):7801–7805.
  24. Yuan Q, Telling G, Bartelt-Hunt S, Bartz J. Dehydration of prions on environmentally relevant surfaces protects them from inactivation by freezing and thawing. *J Virol.* 2018;28:92(8):220-236.
  25. Merck KGaA. FICOLL 400\*. Dostupno na adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/ficoll-400.html> Datum pristupa: 4.9.2019.

## LITERATURA

26. Beckman Coulter. Technical Documents. Lactate dehidrogenase. Dostupno na adresi:  
[https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/BAOSR6x27/%/EN\\_LACTATE](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/BAOSR6x27/%/EN_LACTATE) Datum pristupa: 27.6.2019.
27. Beckman Coulter. Technical documents. Total protein. Dostupno na adresi:  
[https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/BAOSR6x32A/01/EN\\_TOT](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/BAOSR6x32A/01/EN_TOT) Datum pristupa: 27.6.2019.
28. Bio-protocol. Isolation of PBMCs Using Vacutainer Cellular Preparation Tubes.  
Dostupno na adresi: <https://bio-protocol.org/e2103> Datum pristupa: 27.6.2019.
29. Greenland S, Senn SJ, Rothman KJ, Carlin JB, Poole C, Goodman SN, i sur.  
Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to  
misinterpretations. *Eur J Epidemiol.* 2016;31(4):341.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:**

Matea Vrbanić

**Datum i mjesto rođenja:**

22. 10. 1996., Našice

**Obrazovanje:**

2003. – 2011. Osnovna škola Ivane Brlić Mažuranić, Koška

2011. – 2015. Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

2015. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

.