تقييم جودة الأحماض النووية المستخرج من عينات الشرائح الشمعية المصبوغة كيمو- مناعيا وتطبيقاتها لدراسة البيولوجيا الجزيئية للسرطان.

حنين بنت زكي جاوي

مستخلص

تعتبر التقنية التقليدية التي يتم فيها تثبيت الأنسجة بالفورمالين وتضمينها بشمع البارافين FFPE هي الطريقة المثلى للحفاظ على شكل الخلايا والأنسجة، بينما يعتبر حفظ الأنسجة بالتجميد هو المعيار الذهبي للحفاظ على الجزيئات الحيوية. فبمجرد صبغ أنسجة ال FFPE، تتم أرشفة الشرائح بشكل روتيني جنبا إلى جنب مع كتل البارافين المثبت بالفورمالين لفترة طويلة في البنوك الحيوية والمستشفيات وما يعنيه هذا من سوء تقدير لقيمتها ومجالات إستخدامها. إن عملية إعادة استخدام العينات البيولوجية المثبتة والمصبوغة لاستخراج الحمض النووي والحمض النووي الريبي ليس ممارسة شائعة في جميع أنحاء العالم. وبالتالي فقد قدمت هذه الدراسة دليلاً إضافياً على جدوى إزالة غطاء الشرائح في أقل من ٢٤ ساعة باستخدام إما البنزين في درجة حرارة ٣٧ أو الأسيتون في درجة حرارة ٣٧. بعد إزالة الغطاء وقطف النسيج المصبوغ كيمومناعياً، تم استخراج كمية ونوعية مرضيتين من الحمض النووي والحمض النووي الريبي الكلي بنجاح وتم استخدامها بنجاح لإجراء بعض التحاليل الجزيئية المتقدمة للسرطان. إذ تم استخدام الحمض النووي لتقييم مستوى الميثيلية في منبه الجين *HIC1* الذي يعرف بشدة تعرضه للتغيرات الميثيلية في مرضى سرطان القولون والمستقيم. كما تم تقييم التشوهات للجينات الورمية KRAS و*CTNNB1* اللذان عادة ما يحتويان على طفرات في سرطان القولون والمستقيم باستخدام الحمض النووي نفسه. ايضاً تم استخراج الحمض الريبي واستخدامه في دراسة التعابير الجينية لـ*RPLPO* و*miR-124a* لأنهما يعرفان بمقاومتهما للسرطان في مرضى سرطان القولون والمستقيم. ويتكون سير العمل الذي صممته مجموعتنا تباعا من إزالة غطاء الشريحة بغمر الشرائح في الأسيتون، البنزين أو التيتروهيدروفوران مع درجات حرارة مختلفة (درجة حرارة الغرفة مقابل ٣٧ درجة مئوية). بعد إزالة الغطاء تم إستخراج بنجاح كمية وجودة مرضية من الحمض النووي والحمض النووي الريبي واستخدامها بفاعلية لتنفيذ بعض التحاليل الجزيئية لسرطان القولون والمستقيم. وعليه فقد اقترحت هذه الدراسة الرائدة منهجية واعدة لإعادة تدوير وإعادة استخدام كل من الحمض النووي (DNA) والحمض النووي الريبي (RNA) المستخرج من الشرائح FFPE بتركيز وجودة مناسبتين كدلائل أولية للتطبيقات الجزيئية المتقدمة ويمثل هذا النهج إذا تم تطبيقه على نطاق واسع إضافة نوعية في أساليب البنك الحيوي في جميع أنحاء العالم، سوف يمكن من تزويد علماء الطب الحيوي بكنوز غير مسبوقة من العينات والذي يساعد على تسريع الاكتشافات الطبية الحيوية، وهذه لإفادة المرضى ومقدمي الرعاية الصحية على حد سواء.

المشرفين على الرسالة:

د. سالينا يحيى صديق - د. مراد طاهر عصيدي.

لجنة المناقشة:

أ.د. صباح محمود حسن - د. منى محمد الشريف.

Quality Assessment and Utilization of Nucleic Acids Extracted From Immunostained Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) Slides in Molecular Cancer Biology.

Haneen Zaki Jawi

Abstract

The conventional Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) technique is the gold standard for preserving histomorphology, while cryopreservation of tissue is the gold standard for biomolecules' preservation. Once the FFPE tissues stained, the slides are routinely archived along with FFPE blocks for long in biobanks/hospitals and there for underastimated and underused. However, the use of already fixed and stained FFPE biospecimens to extract DNA and/or RNA is not a common practice worldwide. This study provided additional piece of evidence about the feasibility of cover slip removal in less than 24 hours using either Benzene 37 C^o or Acetone 37 C^o. Following cover slip removal and crude dissection of the immunostained IHC, satisfactory quantity and quality of both DNA and total RNA were extracted and successfully used to perform some downstream molecular analysis. In fact, DNA was used to report higher methylation profiles of HIC1 gene in colorectal carcinoma (CRC) patients. Mutational profiles of selected proto-oncogenes *KRAS* and *CTNNB1* as common mutated candidates in CRC were also studied using this reused DNA. Total RNA with successfeul quality was used for gene expression analysis of *RPLPO* and *miR-124a* as a tumor suppressors in CRC. A workflow designed by our group was developed for cover-slip removal by immersion in Acetone, Benzene, Tetrahydrofuran (THF) at different temperatures. Following cover-slip removal and crude dissection of the immunostained IHC, satisfactory quantity and quality of both DNA and total RNA were successfully extracted and successfully used to perform some downstream molecular analysis.This pioneering study suggested a promising approach to recycle and reuse both DNA and RNA from already immunostained slides with suitable concentration and integrity as starting biomolecules/templates for further downstream molecular applications. Such approach if applied at large scale will revolutionize the biobanking approaches worldwide, feed the biomedical scientists with unprecedented treasures of fully annotated biospecimens, speed up the biomedical discoveries, and therefore benefit both patients and healthcare providers.

Supervised By:

Dr. Salina Yahya Saddick – Dr. Mourad Taher Assidi

Examiners:

Prof. Sabah Mahmoud Hassan – Dr. Mona Mohammad AL-Sharif