

Slobodna cirkulirajuća DNA u osteoartritisu

Ćosić, Klara

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:163:005480>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-20**



Repository / Repozitorij:

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



Klara Ćosić

Slobodna cirkulirajuća DNA u osteoartritisu

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Šupraha Goreta.

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sandri Šupraha Goreta na velikodušnom i nesebičnom pristupu radu, na svakom udijeljenom savjetu i nesebičnom dijeljenju znanja. Zahvaljujem što mi je svojim primjerom pokazala što znači istovremeno biti dobra i ostvarena osoba i znanstvenica.

Zahvaljujem svojim roditeljima, Pili i Slađani, na nesebičnoj žrtvi, ljubavi i podršci koju su mi pružali tijekom cijelog razdoblja studiranja. Hvala im što su me svojim primjerom i podrškom uvijek poticali na dobro te naučili kako su dobrota i poštenje prema svakoj osobi vrline koje treba živjeti i u privatnom, i u profesionalnom okruženju. Zahvaljujem i svojim sestrama, Mariji i Luciji, što su mi svojom podrškom, savjetima i sestrinskom ljubavi uljepšale ovo razdoblje.

Zahvaljujem svim prijateljima koje sam stekla tijekom studiranja, posebno posebnoj grupi prijatelja, tzv. „Službi za korisnike FBF-a“, s kojima sam provodila najviše vremena tijekom studiranja i koji su mi svojim šalama, vedrim duhom i međusobnim motiviranjem na uspjeh, uvelike olakšali i uljepšali studiranje.

I na kraju, zahvaljujem dragom Bogu što mi je dao znanje i razum da ih mogu koristiti kako bih vještinama stečenim na ovom fakultetu doprinijela zdravstvenoj skrbi i novim otkrićima na dobrobit svih ljudi. Hvala Mu što me doveo baš na ovaj fakultet i među ove prijatelje i tako obogatio moj život na poseban način.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Slobodna cirkulirajuća DNA.....	2
1.2. Osteoartritis i cfDNA.....	6
1.3. Predanalitika.....	9
1.4. Izolacija cfDNA.....	9
1.5. Detekcija i kvantifikacija cfDNA.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Ispitanici.....	14
3.1.2. Uzorkovanje.....	14
3.2. Materijali.....	14
3.2.1. Proizvođači korištenih materijala i kemikalija.....	14
3.2.2. Standardne kemikalije.....	15
3.2.3. Boje.....	15
3.2.4. Standardi.....	15
3.2.5. Gel za elektroforezu.....	16
3.3. Metode.....	16
3.3.1. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kit-om.....	16
3.3.2. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA QIAamp Mini Kit-om.....	17
3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije izolirane DNA pomoću Nanodrop spektrofotometra.....	18
3.3.4. Agarozna elektroforeza.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	29
6. LITERATURA.....	32
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	35

1. Uvod

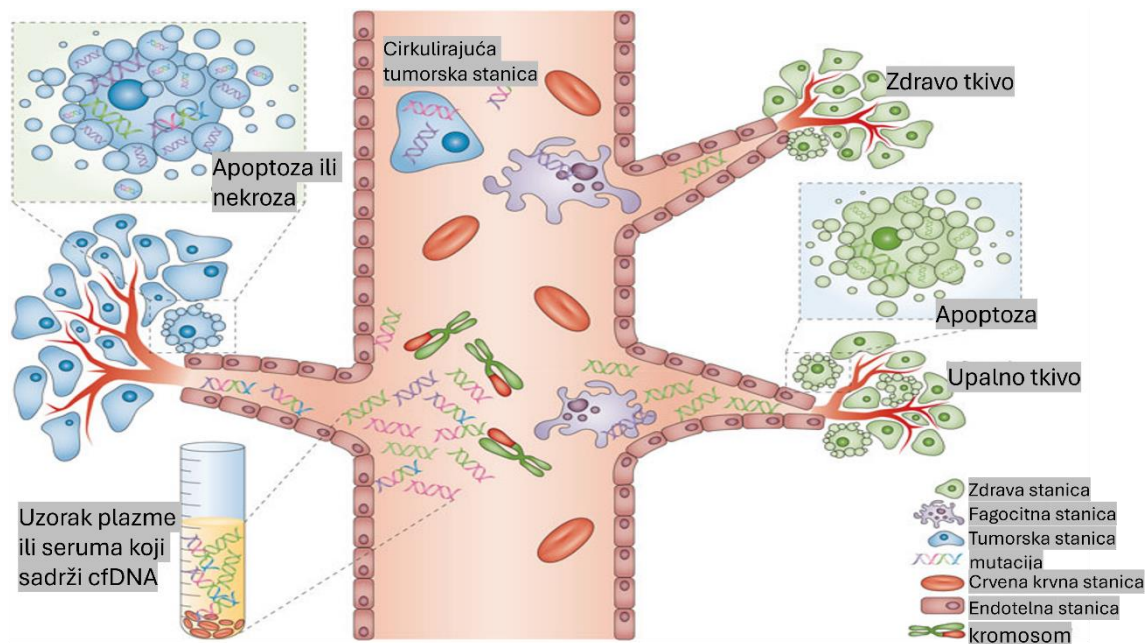
1.1. Slobodna cirkulirajuća DNA

Slobodna cirkulirajuća DNA (engl. *Circulating cell-free DNA*, *cfDNA*) podrazumijeva DNA molekulu koja nije smještena u stanici nego slobodno cirkulira u krvi i ostalim tjelesnim tekućinama (Budd, 2017).

Slobodna cirkulirajuća DNA otkrivena je 1948. godine, tj. njezina prisutnost tada je otkrivena u plazmi. Međutim, tek 1966. godine, kada je otkrivena njezina povišena koncentracija u plazmi osoba oboljelih od sistemskog eritemskog lupusa, njezino postojanje dobiva na značaju. Istraživanja koja su uslijedila, potvrdila su prisutnost cfDNA u plazmi pacijenata oboljelih i od drugih autoimunih bolesti, uključujući i reumatoidni artritis. Također, uočena je poveznica između porasta plazmatske koncentracije cfDNA i progresije bolesti što je pogodilo tome da bi cfDNA potencijalno mogla poslužiti kao biomarker autoimunih bolesti. Zadnjih pedesetak godina intenzivno se istražuje, ovisno o tehnološkim dostignućima određene dekade, kao biomarker kroničnih bolesti, a posebice ima veliki klinički potencijal za dijagnostiku i praćenje terapije u tumorima s obzirom da predstavlja mogući neinvazivni biomarker te je u znanstvenoj i stručnoj literaturi ta metoda nazvana tekućom biopsijom (Liu Sc, 2024). cfDNA, koja je prisutna u cirkulaciji, potječe od tumorskih stanica, ako su prisutne, stanica okolnog tkiva te od hematopoetskih stanica zbog čega je pronađena i u cirkulaciji zdravih osoba. (KLG, Spindler 2017)

DNA molekula primarno se nalazi u jezgri i mitohondrijima stanice. Otpuštanjem fragmenata DNA iz stanice ona dopijeva u cirkulaciju. Njezina prisutnost u cirkulaciji može biti posljedica apoptoze, nekroze i netoze stanica čiji će se mehanizmi detaljnije objasniti u slijedećem odjeljku (Duvvuri i Lodd, 2017).

Slobodna cirkulirajuća DNA je visokofragmentirana dvolančana DNA, veličine oko 150-200 pb što odgovara osnovnoj organizacijskoj jedinici DNA molekule u jezgri, nukleosomu, odnosno veličini fragmenata otpuštenih iz stanica nakon apoptoze pa cfDNA na elektroforezi pokazuje ljestvičastu distribuciju (Volik S, 2016.) Oslobađa se iz zdravog, inflamatornog ili bolesnog (kancerognog) tkiva iz stanica koje prolaze već navedene ključne fiziološke mehanizme, kroz apoptozu ili nekrozu. Ekstrahira se iz uzorka krvi i dosada su otkrivene i kvantificirane brojne genetske aberacije posebice u DNA oslobođenoj iz kancerogenog tkiva (Slika 1).



Slika 1. Otpuštanje cfDNA u krvotok te ekstrakcija cfDNA iz plazme ili seruma ispitanika. Genetske promjene nastale tumorom koji se mogu detektirati u krvi uključuju točkaste mutacije (uzastopne ljubičaste, crvene, zelene i plave DNA niti), kopiju fluktuacije broja (crveni dio kromosoma) i strukturne promjene (zeleni i crveni DNA lanci), preuzeto i prilagođeno prema Crowley, 2013.

Uočeno je nekoliko različitih tipova cfDNA poput tumorske, fetalne, mitohondrijske cfDNA. Smatra se da su to sve iste molekule, samo različitog podrijetla.

Apoptoza

Apoptoza, programirana stanična smrt, prirodni je čimbenik u održavanju normalne funkcije organizma te regulaciji homeostaze kojom se uklanjaju neželjene i oštećene stanice. Apoptoza je inducirana aktivacijom kaspaza koje mogu biti aktivirane ekstrinzičnim ili intrinzičnim putem. Aktivirane kaspaze pokreću proteolitičku kaskadu koja dovodi do morfoloških i biokemijskih promjena u apoptotičkoj stanici poput smanjenja volumena stanice, kidanja DNA na manje fragmente te lipidne redistribucije, npr. ekspresije fosfatidilserina, inače prisutnog u unutrašnjosti stanice, na staničnoj površini. Fagociti prepoznaju te signale te uklanjaju sav debri koji se otpušta iz stanice. Obilježje fragmentirane apoptotične DNA jest da je dvostruka zavojnica koja se kida na fragmente veličine 180-200 pb. cfDNA je, kao i apoptotička DNA, visoko fragmentirana dvostruka zavojnica, male molekularne mase, veličine 180-200 pb te se

na gel elektroforezi obje uočavaju na isti način što dodatno potvrđuje njezino podrijetlo (Duvvuri i Lodd, 2017).

Nekroza

U cirkulaciji nekih pacijenata, osim niskomolekularne cfDNA karakteristične za proces apoptoze, zabilježena je pojava i visokomolekularne DNA koja potječe iz procesa nekroze. Nekroza je neprogramirana stanična smrt do koje najčešće dolazi u slučaju mehaničke ili kemijske ozljede stanica uslijed čega je narušen integritet stanične membrane pri čemu dolazi do otpuštanja unutarstaničnog sadržaja. S obzirom na to da je riječ o neprogramiranom procesu, dolazi do nasumične razgradnje kromatina što omogućuje otpuštanje velikih fragmenata DNA u izvanstanični prostor. Nekrotsko otpuštanje DNA u cirkulaciju povezuje se sa stanjima velike upale poput traume, ozljede i sepse. Također, porast koncentracije visokofragmentirane nekrotske cfDNA u tim stanjima korelira s intenzitetom upale. Neka istraživanja pokazala su i da u nekim stanjima, primjerice sistemskom eritemskom lupusu, većina cfDNA koja je prisutna potječe upravo od nekroze. (Duvvuri i Lodd, 2017; Pisareva, 2022)

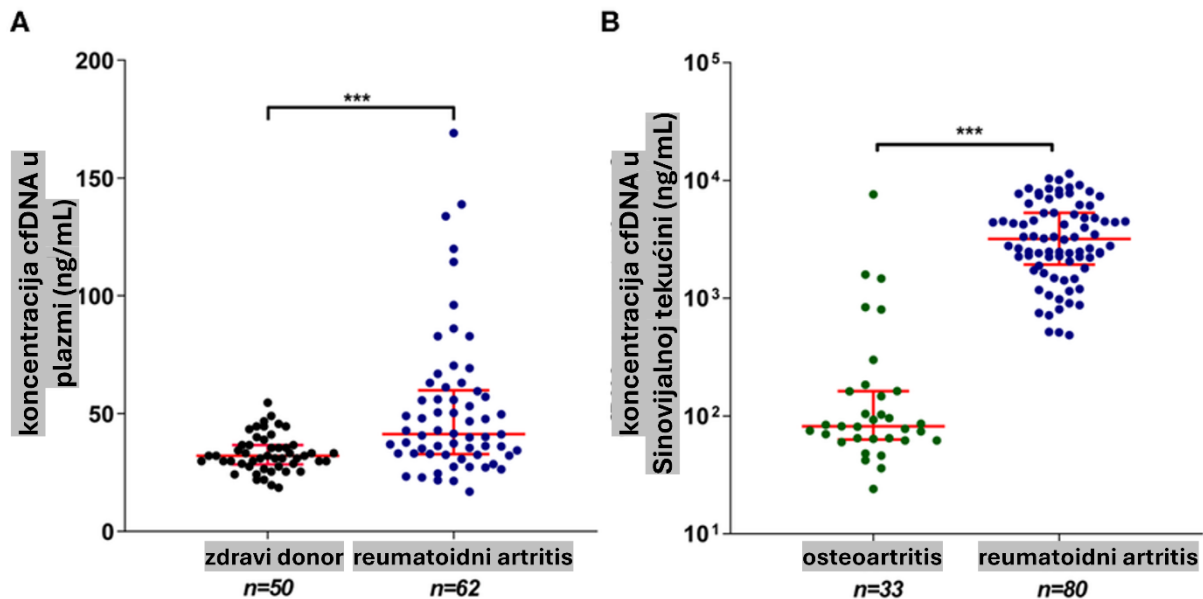
Netoza

Kao odgovor na mikrobnu infekciju ili koji drugi oblik upale, neutrofili mogu biti podvrgnuti procesu programirane stanične smrti, tzv. netoze. Tijekom tog procesa dolazi do otpuštanja umreženog kompleksa koji čine DNA okružena histonima te drugi citoplazmatski proteini. S obzirom na to da kromatinska vlakna iz kompleksa mogu vezati i obuhvatiti mikroorganizme, takvi kompleksi dobili su naziv NET (engl. *neutrophil extracellular trap*) (Pisareva, 2022, Henry, 2022).

Sumarno gledajući, cfDNA u cirkulaciju može dospjeti apoptozom ili nekrozom zdravih stanica, tumorskih stanica, iz živih tumorskih stanica te cirkulirajućih tumorskih stanica. Do apoptoze ili nekroze stanica te posljedičnog otpuštanja sadržaja stanice, uključujući i fragmentiranu DNA, dolazi i uslijed prisutne upale u organizmu kakva se javlja i u autoimunih bolesti. Najviše istraživanja o ulozi cfDNA u autoimunim bolestima provedeno je na uzorcima pacijenata oboljelih od sistemskog eritemskog lupusa te reumatoidnog artritisa. Osim autoimunog reumatoidnog artritisa, uočena je prisutnost cfDNA i u drugim oblicima artritisa, poput osteoartritisa.

Do sada je uočena povišena koncentracija cfDNA u sinovijalnoj tekućini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa, ali i osteoartritisa. Iako je u osteoartritisa koncentracija cfDNA niža

u odnosu na pacijente oboljele od reumatoidnog artritisa, ipak je znatno viša u odnosu na koncentraciju iste u sinovijalnoj tekućini zdravih osoba. Za razliku od sinovijalne tekućine, u plazmi osoba oboljelih od osteoartritisa detektirane su vrlo male količine cfDNA, Slika 2. (Dong, 2020).

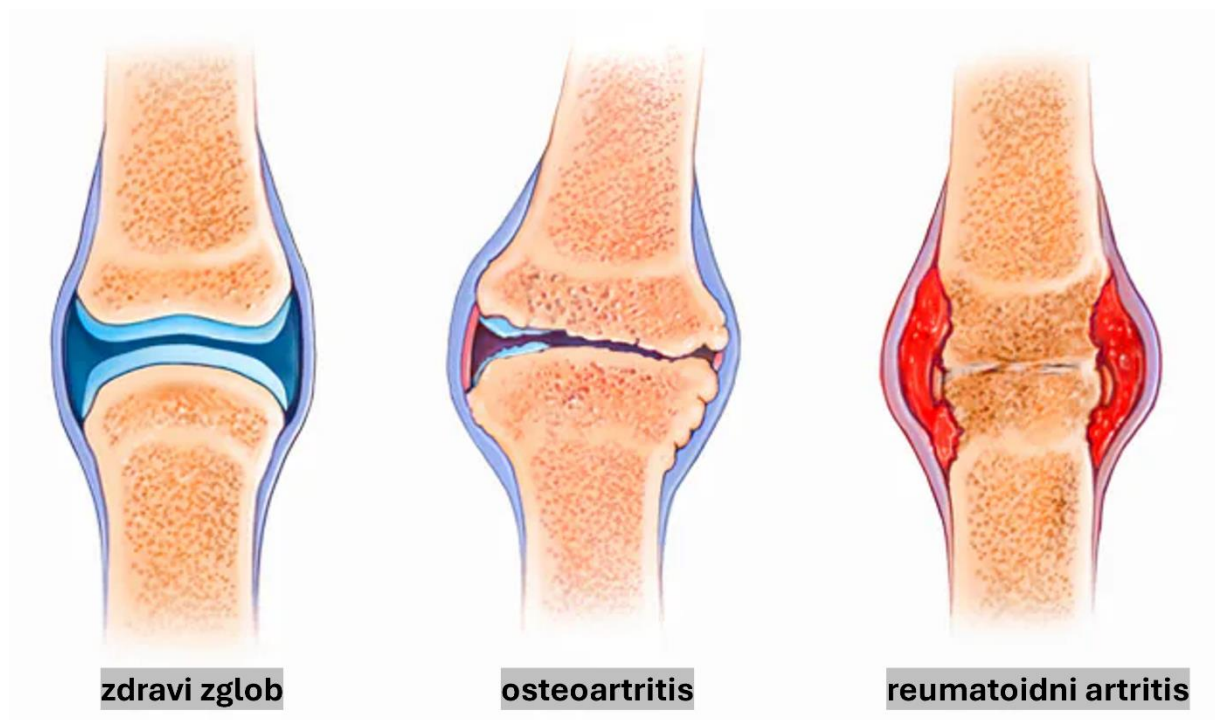


Slika 2. Povišena koncentracija cfDNA u sinovijalnoj tekućini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. A) koncentracija cfDNA u plazmi zdravog donora i u reumatoidnog artritisa. B) koncentracija cfDNA u sinovijalnoj tekućini u osteoartritisa i reumatoidnog artritisa, preuzeto i prilagođeno prema Dong, 2020.

Razlike između reumatoidnog artritisa i osteoartritisa

Reumatoidni artritis i osteoartritis dvije su upalne bolesti zglobova. Iako na prvi pogled djeluju slično, njihova je etiologija ipak različita. Reumatoidni je artritis sistemska autoimunosna bolest koju karakterizira upala sinovijalne membrane. Dolazi do stvaranja protutijela na komponente sinovijalne membrane pri čemu se povećava njezina propusnost i posljedično dolazi do pojačane upale, smanjene produkcije sinovijalne tekućine te, u konačnici, do degradacije zglobne hrskavice što uzrokuje bol. Osteoartritis također karakterizira degradacija zglobne hrskavice, ali bez stvaranja protutijela. Uzrok osteoartritisa najčešće je starija životna dob, genetika, a nakon toga mehanička ozljeda. Što se tiče simptoma, reumatoidni artritis najčešće

počinje s boli u manjim zglobovima (šaka, prsti, gležanj) dok osteoartritis najčešće zahvaća velike zglobove poput koljena, kuka i lumbalnog dijela kralježnice, Slika 3 (Ross, 1997).



Slika 3. Usporedba osteoartritisa i reumatoidnog artritisa, preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/arthritis/multimedia/osteoarthritis-vs-rheumatoid-arthritis/img-20008728>

1.2 Osteoartritis i cfDNA

Osteoartritis je najčešća bolest zglobova, najčešći oblik artritisa. To je degenerativna upalna bolest zglobova, a zahvaća najčešće veće zglobove, poput koljena, šake i kukova. Patološke značajke osteoartritisa obuhvaćaju promjene u brojnim dijelovima zgloba uključujući hrskavicu, kosti, sinovijalnu tekućinu, ligamente i okolne mišiće. Primarni simptomi koji se javljaju su kronična bol u zglobovima, ukočenost i nestabilnost (Felekkis, 2023).

Osteoartritis možemo podijeliti na primarni i sekundarni oblik. U nastanku osteoartritisa sudjeluje više čimbenika rizika, a to su uglavnom kombinacija životnih navika i aktivnosti, nasljeđe, hormonalni čimbenici, trauma te djelovanje određenih enzima i kemijskih spojeva.

Primarni oblik je onaj koji ne možemo povezati sa izvanjskim rizičnim čimbenikom, osim u rijetkim slučajevima kod kojih postoji obiteljski oblik (Heberdenovi i Bouchardovi čvorići na malim zglobovima prstiju šaka). S druge strane, sekundarni oblici nastaju zbog poznatih čimbenika djelovanja na zglob kao što su debljina, ponavljana pretjerana opterećenja zgloba,

prethodne traume, stanja nakon upale zgloba (poput uričnog artritisa ili infekcije), neuropatski poremećaji (dijabetes) i poremećaji krvotoka, (npr. vaskularna nekroza ili Pagetova bolest).

Pretilost (prekomjerna tjelesna težina) pojačava mehanički stres na zglobne hrskavice te dolazi do progresivnog pogoršanja stanja zglobne hrskavice, popraćeno upalom u sinovijalnoj šupljini. Održavanje zglobne hrskavice regulirano je aktivnošću hondrocita. Hondrociti su stanice koje proizvode elemente hrskavičnog matriksa poput proteoglikana i kolagena. U zdravoj hrskavici, hondrociti prilagođavaju svoju aktivnost sukladno zahtjevima organizma te se odvija pravilna izmjena anaboličkih i kataboličkih procesa kojima se obnavlja struktura hrskavice (Yunus, 2020).

Međutim, kod osteoartritisa dolazi do disbalansa u aktivnosti hondrocita što rezultira povećanom razgradnjom hrskavice. Zbog toga dolazi do povećanog trenja na dodirnom području dviju kostiju što dovodi do upale u sinovijalnom području i uzrokuje bol.

Hondrociti su specijalizirane stanice koje su odgovorne za održavanje hrskavice. Oni proizvode elemente izvanstaničnog matriksa poput kolagenskih vlakana i proteoglikana koji pružaju strukturnu potporu i omogućuju zglobu elastičnost i pravilnu raspodjelu težine.

Rizični faktori za razvoj osteoartritisa su detaljnije; dob (vremenom hrskavica propada, a simptomi se jave kad je bolest već u uznapredovaloj fazi), upala (brojni proupalni citokini poput IL-1, IL-6, TNF potiču proces razgradnje hrskavice, a neki od njih sprječavaju anaboličke reakcije koje potiču obnovu hrskavice), trauma zgloba (uslijed ozljede dolazi do povećane upale i opet proupalni čimbenici dodatno potiču progresiju bolesti), mehanički stres, genetika i pretilost.

Koji god uzrok oštećenja hrskavice bio, hondrociti pokušavaju popraviti to oštećenje. Proizvode manje proteoglikana, a počinju proizvoditi više kolagena, i to kolagena tipa I koji stvara drugačije interakcije s proteoglikanima u odnosu na kolagen tipa II koji stvara bolje interakcije s proteoglikanima. Zbog svega toga, smanjuje se elastičnost i u konačnici, dolazi do pucanja veza te potrošnje hrskavice. S druge strane, hondrociti tijekom godina ne mogu više obavljati svoju funkciju te podliježu procesu apoptoze. Tijekom tog procesa, u sinovijalnu tekućinu, a kasnije i u cirkulaciju, otpušta se stanični debri među kojim se može naći i slobodna cirkulirajuća DNA.

U suvremenoj medicini jedan od glavnih izazova je dijagnostika osteoartritisa kao degenerativne bolesti, koja predstavlja zanemaren segment u dijagnostici s obzirom na težinu i progresiju bolesti te potrebe za ranim otkrivanjem bolesti.

Danas su glavne dijagnostičke metode radiografske metode i tehnike snimanja zglobova. Međutim, njima je teško pratiti promjene koje se događaju u samoj unutrašnjosti zgloba. Također, obično su implementirane tek kada se već pojave simptomi bolesti, tj. kada je bolest već u uznapredovaloj fazi.

Smatra se da razvoj osteoartritisa kreće godinama prije pojave prvih simptoma. Kada bi postojali odgovarajući, neinvazivni biomarkeri, to bi doprinijelo ranijem otkriću bolesti, ranijem postavljanju dijagnoze te ranijem početku liječenja, a također bi se mogla pratiti uspješnost terapije (Budd, 2017).

Analiza izvanstaničnih tjelesnih tekućina poput sinovijalne tekućine, krvi, plazme, seruma i urina područje je interesa kako bi se identificirao potencijalni topljivi biomarker osteoartritisa. Na taj bi se način uvelike olakšala dijagnostika osteoartritisa i izostavila primjena invazivnih metoda (Felekkis, 2023).

Kao što je već poznato i navedeno, povišene koncentracije cfDNA pronađene su u brojnim upalnim stanjima poput pankreatitisa, infarkta miokarda, karcinoma, sistemskog eritemskog lupusa, reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Tijekom usporedbe rezultata, uočeno je da su koncentracije cfDNA, i u sinovijalnoj tekućini i u serumu, više u pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa u odnosu na pacijente oboljele od osteoartritisa. Sukladno tome, cfDNA mogla bi poslužiti i kao pomoć u detaljnijoj dijagnostici reumatoidnog artritisa i osteoartritisa tijekom dijagnosticiranja bolesti.

Biološka uloga cfDNA

Do sada je utvrđeno da cfDNA ima dvije značajne uloge u organizmu. To su sudjelovanje u radu imunskog sustava te utjecaj na zgrušavanje krvi.

Kao odgovor na bakterijsku infekciju u organizmu, neutrofili otpuštaju tzv. NET-ove. Upravo cfDNA sastavna je komponenta NET-a koja omogućuje vezanje i hvatanje mikrobnih patogena. S druge strane, tako, u NET-ove ugrađena, cfDNA prisutna u cirkulaciji, potiče proces zgrušavanja krvi. Zbog toga je u cirkulaciji prisutan i enzim deoksiribonukleaza I koja razgradnjom te cfDNA regulira proces zgrušavanja krvi. Osim ovih dviju uloga, smatra se da bi potencijalno mogla imati ulogu i u širenju tumora i starenju, ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se te pretpostavke potvrdile (Volik, 2016).

1.3. Predanalitika

Predanalitički postupci imaju vrlo važnu ulogu u cjelokupnom procesu analize cfDNA. Kako bi se metoda tekućinske biopsije mogla pouzdano primjenjivati u kliničke svrhe dijagnostike i praćenja uspješnosti terapije, potrebno je osigurati da su uzorci koji se koriste u analizi ispravni i pravilno pripremljeni. U istraživanjima je primijećeno da je ukupni prinos DNA veći kada su korišteni uzorci plazme u odnosu na serum. Također, predanalitička priprema uzorka može utjecati na kvantitativne rezultate u slučaju da tijekom pripreme uzorka dođe do gubitka određene količine DNA (KLG, Spindler, 2017; Ungerer, 2020).

1.4. Izolacija cfDNA

Prvi je korak u samoj analizi prikupljanje uzoraka. Uzorak krvi prikuplja se u EDTA epruvetu. EDTA djeluje kao antikoagulans. Nakon uzimanja uzorka krvi, procesom centrifugiranja izoliraju se plazma ili serum. Iz plazme ili seruma se potom izolira slobodna cirkulirajuća DNA. Izolacija se uglavnom provodi prema odgovarajućim standardiziranim protokolima i pomoću komercijalno dostupnih kitova. Najčešće korišteni komercijalno dostupni kompleti su QIAamp, Maxwell RSC cfDNA Plasma Kit i Norgen's Genomic DNA Isolation Kit (Sorber, 2017).

1.5. Detekcija i kvantifikacija cfDNA

Standardizacija i optimizacija metoda za detekciju i kvantifikaciju cfDNA od iznimne su važnosti kako bi se mogle pouzdano primjenjivati u kliničke svrhe. Pouzdana primjena u kliničke svrhe omogućila bi pravovremenu detekciju klinički značajnih promjena, kako na području dijagnostike, tako i tijekom praćenja uspješnosti terapije. Odnosi se na različite vrste bolesti, od karcinoma i autoimunih bolesti do drugih upalnih bolesti, među kojima je i osteoartritis. Metode koje imaju prednost pri odabiru su svakako one koje su najmanje invazivne, kod kojih se uzorkovanje što jednostavnije provodi te koje su cjenovno najpristupačnije. Također, poželjno je da metoda bude što više specifična i osjetljiva kako bi se različite vrste cfDNA mogle na vrijeme razlikovati, npr. tumorska cfDNA od drugih vrsta, te kako bi se mogla detektirati već i niska koncentracija cfDNA u svrhu rane dijagnostike određene bolesti (Volik, 2016).

Kvantitativna PCR metoda koristi se za mjerenje signala označenih proba tijekom amplifikacije ciljanih gena za odgovarajuće makromolekule. Metoda je jednostavna, reproducibilna i visoke osjetljivosti. Međutim, nedostatak je što je potreban veliki broj odvojenih testova kako bi se obuhvatio odgovarajući broj mutacija (KLG, Spindler, 2017).

Digitalni PCR (*ddPCR*, engl. *Digital droplet PCR*) podrazumijeva analizu DNA koja je podijeljena na pojedinačne izolirane DNA molekule koje su onda pojedinačno podvrgnute analizi. Ova metoda omogućuje detekciju višestrukih mutacija na istom uzorku te je visoke osjetljivosti.

Sekvenciranje sljedeće generacije, NGS (engl. *next generation sequencing*) metoda je koja omogućuje potragu za genetskim promjenama u cijelom genomu. Može biti dizajnirana tako da je usredotočena na otkrivanje genskih mutacija na specifičnom genu ili može biti usmjerena na širu gensku analizu. Ova je metoda nedavno primijenjena za molekularnu karakterizaciju tumorske cfDNA što je od velikog kliničkog značaja (Halemayr, 2023).

2. Obrazložnje teme

Slobodna cirkulirajuća DNA može potjecati iz različitih tkiva u organizmu te prema tome nositi svojstva karakteristična za pojedino tkivo. To je vrlo korisno kod patoloških stanja jer tada cfDNA, podrijetlom iz patološkog tkiva, signalizira prisutnost takvog stanja u organizmu.

S obzirom na to da se cfDNA može pronaći u različitim vrstama tjelesnih tekućina, pa tako i u krvi, određivanje njezine koncentracije u serumu ili plazmi moglo bi poslužiti kao neinvazivni biomarker različitih upalnih stanja, karcinoma, autoimunih bolesti te omogućiti praćenje uspješnosti terapije koja se provodi u svrhu liječenja istih.

Cilj ovoga rada jest: prikazati na koje je načine moguće izolirati slobodnu cirkulirajuću DNA, usporediti rezultate dviju metoda koje su korištene za izolaciju iste te kvantitativno odrediti dobivene koncentracije izolirane cfDNA.

3. Materijali i metode

3.1. Ispitanici

Uzorkovanje je provedeno na ispitanicima oboljelim od osteoartritisa nakon njihovog dobrovoljnog pristanka na sudjelovanje u istraživanju. U istraživanju je sudjelovalo 20 ispitanika, 15 žena i 5 muškaraca u dobi od 56-75 godina. Uzorci korišteni u ispitivanju prikupljeni su u Kliničkom bolničkom centru Ljubljana (Univerzitetni klinički center Ljubljana, Slovenija), uz odobrenje Etičkog povjerenstva Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i Kliničkog bolničkog centra Ljubljana. Uzorci su prikupljeni kao ostatni uzorci tijekom dijagnostičke obrade. Kao kontrolni uzorci tijekom mjerenja, korišteni su uzorci zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi koji su prikupljeni u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu. Za upotrebu tih kontrolnih uzoraka također je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva nadležne ustanove.

3.1.2. Uzorkovanje

Korišteni uzorci su prikupljeni serumu pacijenata.

Pacijentima je venepunkcijom uzet uzorak krvi koji je potom pohranjen u epruvetu bez antikoagulansa. Zbog toga što u epruveti nije prisutan antikoagulans, dolazi do spontanog taloženja, odnosno zgrušavanja krvi na dnu epruvete. Tako dobiveni talog sadrži krvne stanice, faktore zgrušavanja te fibrinogen, a iznad taloga prisutan je supernatant koji predstavlja serum. Dobiveni serum, korišten za daljnju analizu, sadrži odgovarajuće biološke makromolekule, među kojima i slobodnu cirkulirajuću DNA molekulu, ione te druge prisutne organske tvari.

Prikupljeni uzorci seruma, i prije, i nakon analize, pohranjeni su u hladnjaku na temperaturi od -20°C .

3.2. Materijali

3.2.1. Proizvođači korištenih materijala i kemikalija

Amersham Bioscience (Cardiff, Velika Britanija)

Fermentas (Vilnius, Litva)

Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD)

Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Norgen (Thorold, ON, Kanada)

Qiagen (Valencia, CA, SAD)

Roth (Karlsruhe, Njemačka)

Sigma (St. Louis, MO, SAD)

ThermoFischer Scientific (Waltham, MA, SAD)

3.2.2. Standardne kemikalije

Agaroz	Sigma
EDTA	Roth
Etanol (96%)	Kemika
Glacijalna octena kiselina	Sigma
Glicerol	Kemika
H ₃ BO ₃	Roth
HCl (36%)	Kemika
KCl	Kemika
NaOH	Sigma
Octena kiselina	Kemika
Proteinaza K	Invitrogen
Tris (tris[hidroksimetil]aminometan) – Trizma baze ®	Sigma
Triton X-100	Sigma
TAE pufer (50X) pH 8,3 (za 1000 mL) Tris	242 g
Octena kiselina	57,1 mL
EDTA (0,5mM)	10 mL
u destiliranoj vodi	

3.2.3. Boje

GelRed TM , Biotium

3.2.4. Standardi

Komercijalno probavljene smjese fragmenata DNA poznatih veličina (standard 1kb),

Thermo Fisher Scientific

3.2.5. Gel za elektroforezu

Za elektroforezu izolirane DNA iz uzoraka seruma i plazme korišten je pripremljen 1,5%-tni agarozni gel.

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit-om

Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit namijenjen je izolaciji slobodne cirkulirajuće DNA iz uzorka plazme ili seruma ispitanika na učinkovit i pouzdan način uz kratko vrijeme potrebno za analizu. Omogućuje se analiza uzoraka volumena između deset mikrolitara i deset mililitara. Sama metoda djeluje po principu kolonske kromatografije gdje se različite komponente uzorka mogu razdvojiti na temelju njihove različite adsorpcije na adsorbens. Na taj način moguće je, iz uzorka plazme ili seruma, odvojiti sve druge sastavnice kako bi se na kraju dobila pročišćena i izolirana slobodna cirkulirajuća DNA. Prednost ove metode jest što se njome može izolirati slobodna cirkulirajuća DNA iz uzoraka plazme ili seruma, bilo da se radi o svježim ili smrznutim uzorcima.

Postupak

Prije samog početka analize, pripremi se otopina za ispiranje A, dodatkom 42 mL 96 % etanola u dobivenu otopinu za ispiranje A. Također, dobivenu proteinazu K potrebno je vorteksirati prije upotrebe kako bi se homogenizirao njezin sadržaj te ne bi dolazilo do pogreške tijekom mjerenja. Nakon provedene pripreme, kreće postupak izolacije.

500 μ L uzorka seruma prebaci se u epruvetu od 2 mL. Sadržaju epruvete doda se 12 μ L Proteinaze K te se sve skupa homogenizira na miješalici tijekom deset sekundi, a nakon toga slijedi inkubacija na 55 °C tijekom deset minuta.

Nakon provedene inkubacije, dodaje se 1000 μ L Binding Buffera B te se cjelokupni sadržaj homogenizira na vortex miješalici deset sekundi.

800 μ L tako dobivenog sadržaja prebaci se u Mini Spin kolonu zajedno s epruvetom za sakupljanje. Zatim se sadržaj centrifugira dvije minute na 3300 x g (približno 6000 RPM). Dobiveni se filtrat odbaci, a kolona ponovno poveže s epruvetom za sakupljanje.

Taj postupak na Mini Spin koloni ponovi se za ostatak sadržaja koji je preostao.

Sljedeći korak podrazumijeva primjenu Wash Solution A na kolonu nakon čega slijedi centrifugiranje jednu minutu na 3300 x g (približno 6000 RPM). Ponovno se odbaci dobiveni filtrat te se ponovno Mini Spin kolona spoji s odgovarajućom epruvetom za sakupljanje. Taj se postupak ponovi još jednom kako bi se kolona ukupno isprala dva puta.

Nakon ispiranja, prazna kolona se centrifugira tijekom dvije minute na 13 000 x g (približno 14 000 RPM). Epruveta se za sakupljanje odbaci, a Mini Spin kolona premjesti se u novu epruvetu za ispiranje od 1,7 mL. Zatim se na kolonu dodaje 50 µL pufera za ispiranje B te se sve skupa ostavi na sobnoj temperaturi dvije minute. Zatim se centrifugira jednu minutu na 400 x g (približno 2 000 RPM), a nakon toga dodatne dvije minute na 5 800 x g (približno 8 000 RPM).

U svrhu maksimalnog iskorištenja, eluirani pufer prebaci se natrag na kolonu te ponovno ostavi dvije minute na sobnoj temperaturi. Zatim slijedi centrifugiranje jednu minutu na 400 x g (2 000 RPM), a nakon toga dodatno centrifugiranje na 5 800 x g (približno 8 000 RPM) tijekom dvije minute.

Tako dobiveni uzorak može se koristiti u daljnjoj analizi.

3.3.2. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA QIAamp® MinElute® ccfDNAMini Kit-om

QIAamp® MinElute® ccfDNAMini Kit namijenjen je brzom i jednostavnom izolaciji DNA molekule koja je onda pogodna za analizu primjenom različitih metoda. Također, omogućuje izolaciju DNA i iz svježih i iz prethodno smrznutih uzoraka krvi. Nakon provedenog protokola, ovom metodom dobije se izolirana i pročišćena DNA koja ne sadrži popratna onečišćenja poput makromolekula, iona i drugih organskih tvari. Tako dobivena DNA molekula uglavnom je fragmenata veličine 20-30 kb. DNA QIAamp® Mini Kit-om može se izolirati otprilike 6 µg DNA iz početnog uzorka 200 µL.

Ova metoda temelji se na specifičnom vezanju DNA na magnetske čestice dok druge sastavnice prolaze kroz membranu i ne zadržavaju se na njoj. One pak, koje ostanu, uklanjaju se puferima za ispiranje, a to su pufer ACB i ACW2. Izolirana DNA molekula na kraju se eluira primjenom ultra čiste destilirane vode.

Postupak

Otpipetira se 20 µL Proteinaze K u tubu od 15 mL. Zatim se doda 500 µL uzorka seruma te 150 µL vezujućeg pufera te 30 µL suspenzije magnetskih zrnaca se dobivena smjesa inkubira

na miješalici tijekom 10 minuta. Potrebno je dobro homogenizirati smjesu kako bi se osigurala učinkovita liza. S obzirom na to da prinos DNA dostiže svoj maksimum nakon lize na 56 °C tijekom deset minuta, nakon homogenizacije na miješalici, smjesa se inkubira u vodenoj kupelji upravo pri tim uvjetima. Zatim se kratko centrifugira kako bi se uklonile nakupljene kapljice s unutrašnje strane poklopca.

Sljedeći je korak dodatak ACB pufera te homogeniziranje na vortex miješalici. Zatim ponovno slijedi kratko centrifugiranje kako bi se uklonile nakupljene kapljice s unutrašnje strane poklopca.

Dobivena se smjesa pažljivo prenese na QIAamp Mini Spin kolonu koja je umetnuta u epruvetu za sakupljanje od 2 mL. Zatim se smjesa centrifugira na 6 000 x g (približno 8 000 RPM) tijekom jedne minute. Nakon centrifugiranja, odbaci se epruveta s eluiranim sadržajem te se Mini Spin kolona umetne u novu epruvetu za sakupljanje, također od 2 mL.

Zatim se u QIAamp Mini Spin kolonu dodaje 500 µL ACW2 pufera te se potom smjesa ponovno centrifugira na 6 000 x g (približno 8 000 RPM) tijekom jedne minute. Nakon centrifugiranja, ponovno se odbaci epruveta s eluiranim sadržajem te se QIAamp Mini Spin kolona premjesti u novu epruvetu za sakupljanje od 2 mL.

Zatim se na QIAamp Mini Spin kolonu dodaje 20-80 µL pufera ultra čiste destilirane vode te se centrifugira na 20 000 x g (približno 14 000 RPM) tijekom tri minute. Kako bi se spriječila mogućnost daljnje kontaminacije puferom ACW2, kolona se prenese u novu epruvetu za sakupljanje te se centrifugira jednu minutu na maksimalnoj brzini.

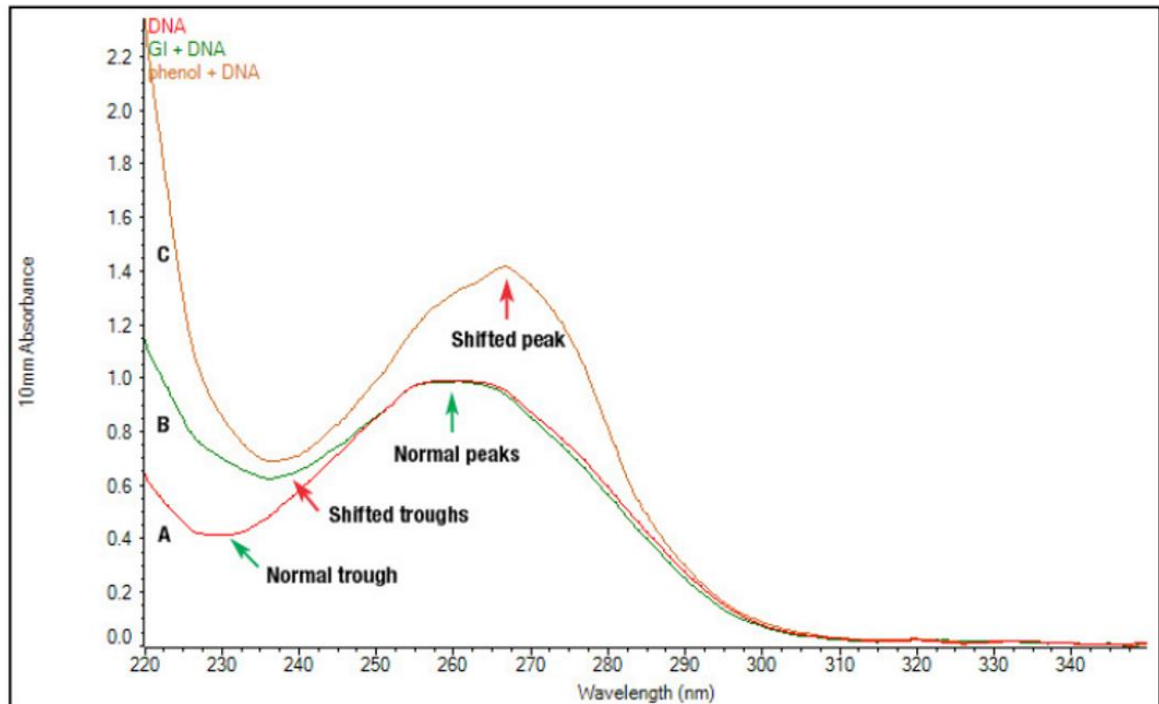
Nakon toga, kolona se premjesti u čistu, novu epruvetu od 1,5 mL za mikrocentrifugiranje te joj se dodaje destilirana voda. To se inkubira na sobnoj temperaturi (15-25 °C) nekoliko minuta te se potom centrifugira na 6 000 x g (približno 8 000 RPM) tijekom jedne minute. Inkubacija na sobnoj temperaturi prije samog centrifugiranja provodi se u svrhu poboljšanja prinosa DNA. Tako dobivena DNA spremna je za daljnju analizu.

3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije izolirane DNA pomoću Nanodrop spektrofotometra

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA temelji se na sposobnosti DNA molekule da apsorbira UV zračenje na odgovarajućim valnim duljinama što onda reproducira odgovarajući signal koji je vidljiv na uređaju. Dakle, uređaj mjeri apsorbanciju koja je proporcionalna koncentraciji DNA u uzorku. Što je veća apsorbancija, veća je i koncentracija

DNA u uzorku. To opisuje i Beer-Lambertov zakon, $A = \epsilon \times l \times c$, gdje A označava apsorbanciju, ϵ je molarni apsorpcijski koeficijent, l je duljina puta koju prođe zraka svjetlosti, a c predstavlja koncentraciju određene tvari u uzorku.

Dio DNA molekule koji je odgovoran za apsorpciju jesu purinske i pirimidinske baze, a kada govorimo o proteinima, aminokiseline fenilalanin, triptofan, tirozin i histidin najodgovornije su za apsorpciju zračenja. Nukleinske kiseline maksimum apsorpcije postižu na 260 nm, a proteini na 280 nm. Kako bi se utvrdila čistoća izolata, bilo da se radi o izolaciji nukleinskih kiselina ili izolaciji proteina, računa se omjer dobivenih apsorbancija na tim dvjema valnim duljinama. U slučaju nukleinskih kiselina, prihvatljivi omjer A_{260}/A_{280} je između 1,8-2,0. Ukoliko je navedeni omjer manji od tih vrijednosti, smatra se da su prisutna onečišćenja koja apsorbiraju pri 280 nm te se uzorak ne smatra dovoljno pročišćenim za daljnju analizu. Međutim, ukoliko u narednim analizama, rezultati ne odgovaraju očekivanome, treba imati na umu da, unatoč tome što je omjer A_{260}/A_{280} unutar referentnog intervala, može postojati neki drugi problem s uzorkom ili predanalitičkim postupcima tijekom analize. Također, često se izračunava i omjer apsorbancija A_{260}/A_{230} jer pri 230 nm brojna sekundarna onečišćenja imaju sposobnost apsorpcije zračenja pa je i to svojevrsni pokazatelj čistoće uzorka. Prihvatljivi je omjer izmjerenih apsorbancija na tim valnim duljinama od 2,0-2,2 (Slika 4).



Slika 4. A) spektar pročišćene DNA bez kontaminacije onečišćenjima, B) spektar DNA kontaminirane gvanidinom, C) spektar DNA kontaminirane fenolom, preuzeto i prilagođeno iz: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

Thermo Scientific Nanodrop 8000 spektrofotometar je koji je korišten za mjerenje koncentracije prethodno izolirane DNA. Ovaj uređaj omogućuje spektrofotometrijsku analizu uzorka pri vrlo malom volumenu. Također, moguće je mjeriti svaki uzorak pojedinačno ili čak do 8 uzoraka istovremeno. Na predviđeno mjesto u podnožju uređaja pažljivo se pipetiraju izolirane DNA tako da se spriječi gubitak uzorka uslijed mogućeg izlivanja tijekom pipetiranja. Zatim se zatvori dio gdje su smješteni uzorci te se na uređaju pokrene mjerenje apsorbancije iz koje se, prema Beer-Lambertovu zakonu, dobiju vrijednosti koncentracija izolirane DNA u uzorcima (ThermoFischer Scientific, 2017).

3.3.4. Agarozna elektroforeza

Načelo

Elektroforeza je metoda razdvajanja koja se temelji na gibanju nabijenih struktura u električnom polju. Nukleinske kiseline negativno su nabijene zbog nosećih fosfatnih skupina i, pod utjecajem električnog polja, gibaju se prema pozitivno nabijenoj elektrodi – anodi (Čepelak I, Čvorišćec D, 2009). Agarozna elektroforeza je tip elektroforetskog razdvajanja molekula na agarozu kao nosaču. Agaroz je polisaharid izoliran iz crvenih algi roda *Gelidium* i *Gracilaria*. Sastoji se od ponavljajućih agarobioza (L- i D- galaktoza). Prilikom izrade gela, agarozni polimeri povezuju se u mrežu nekovalentnim vezama stvarajući pore dovoljne veličine da fragmenti nukleinskih kiselina mogu njima prolaziti. Brzina gibanja fragmenata ovisi o njihovoj veličini, koncentraciji agaroze, konformaciji molekula, jakosti električnog polja, tipu agaroze, svojstvima korištenog pufera. Veličina pora određena je koncentracijom agaroze u gelu. Agarozni gel najpogodniji je za razdvajanje fragmenata veličine 100 bp do 25 kb (Lee et al, 2012).

Postupak

U ovom radu korišten je 1,5 % agarozni gel. U 30 mL 1x TBE pufera zagrijavanjem se otopi 0,45 g agaroze. Da bi se formirao gel, otopina se hladi do 56°C i izlije u elektroforetsku kadu gdje će se odvijati proces razdvajanja. Češljicom za formiranje jažica u gelu naprave se jažice u koje se stavljaju produkti izolacije dobiveni QIAGEN ccfDNAMini Kit-om i Norgen Biotek Mini Kit-om pomiješani s bojom bromfenol plavom. U posljednju jažicu stavlja se standard. Elektroforeza se radi u TBE puferu. Električno polje je jakosti 5-7 V/cm. Elektroforezu zaustavljamo kad uzorci prijeđu otprilike 2/3 duljine pute u gelu. Dobiveni rezultati vizualiziraju se na aparatu Imager (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Science).

4. Rezultati i rasprava

Određivanje koncentracije slobodne cirkulirajuće DNA u serumu provedeno je pomoću spektrofotometra Nanodrop 8000, Thermo Fischer Scientific. Izmjerena je apsorbancija cfDNA u uzorcima izoliranim dvjema različitim metodama. Dvadeset uzoraka DNA izolirano je Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit-om i QIAamp® ccfDNA Mini Kit-om. Apsorbancija je mjerena na 260 nm u svrhu određivanja koncentracije izolirane DNA. Također, provedeno je mjerenje apsorbancije i na 280 nm kako bi se iz izračunatog omjera A_{260}/A_{280} dobila mjera onečišćenja. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 1. i Tablici 2.

Tablica 1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA na aparatu Nanodrop 8000, Thermo Fischer Scientific. Koncentracija DNA određena je u 20 uzoraka seruma pacijenata oboljelih od osteoartritisa. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA provedena je Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit-om.

Oznaka uzorka u istraživanju	Koncentracija cfDNA (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}
S1	8,458	1,37
S2	8,080	1,34
S3	6,635	1,43
S4	5,307	1,51
S5	9,258	1,39
S6	8,451	1,42
S7	6,961	1,44
S8	7,057	1,39
S9	9,412	1,35
S10	8,210	1,44
S11	10,25	1,62

S12	5,405	1,70
S13	8,640	1,44
S14	11,340	1,36
S15	9,250	1,75
S16	5,870	1,65
S17	4,234	1,45
S18	8,540	1,47
S19	8,900	1,35
S20	7,809	1,37
Srednja vrijednost	7,903	1,46
Standardna devijacija	1,728	0,12

U skladu s dobivenim rezultatima, srednja vrijednost izmjerenih koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA u serumu, izolirane Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit-om iznosi 7,903 ng/ μ L. Uzorci S4, S12 i S17 sadrže nešto nižu koncentraciju DNA u odnosu na druge uzorke te zbog toga i vrijednost standardne devijacije iznosi 1,728. Do odstupanja ovih triju vrijednosti potencijalno dolazi uslijed pogreške u predanalitičkom procesu, oslabljene kvalitete uzoraka ili drugih čimbenika koji su mogli utjecati na to.

Što se tiče čistoće uzorka, izmjerena je i vrijednost apsorbancije na 280 nm kako bi se mogao dobiti odgovarajući omjer A_{260}/A_{280} . Uzorak se smatra dovoljno pročišćenim ukoliko navedeni omjer iznosi 1,8-2,0. Iz priloženih rezultata, vidljivo je da DNA, izolirana ovom metodom, gotovo niti u jednom uzorku ne zadovoljava traženi omjer. Jedino uzorci S12 i S15 približno odgovaraju tom zahtjevu jer im traženi omjer iznosi otprilike 1,7 što je blizu tražene najniže vrijednosti, ali ni to teoretski ne zadovoljava traženi kriterij čistoće te se može zaključiti da slobodna cirkulirajuća DNA koja je izolirana Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA

Purification Mini Kit-om nije dovoljno dobro pročišćena te sadrži visoki udio onečišćenja koja apsorbiraju zračenje pri 280 nm, a ponajviše je riječ o proteinima.

Tablica 2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA na aparatu Nanodrop 8000, Thermo Fischer Scientific. Koncentracija DNA određena je u 20 uzoraka seruma pacijenata oboljelih od osteoartritisa. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA provedena je QIAamp® ccfDNA Mini Kit-om.

Oznaka uzorka u istraživanju	Koncentracija DNA (ng/ μ L)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
S1	9,205	1,79
S2	9,800	1,60
S3	7,700	1,60
S4	6,250	1,80
S5	9,600	1,82
S6	8,760	1,79
S7	7,890	1,80
S8	7,560	1,56
S9	10,789	1,67
S10	9,830	1,54
S11	10,670	1,82
S12	6,780	1,80
S13	10,860	1,65
S14	11,900	1,50
S15	10,670	1,80

S16	6,780	1,70
S17	5,890	1,50
S18	9,780	1,55
S19	9,560	1,55
S20	9,280	1,45
Srednja vrijednost	8,978	1,67
Standardna devijacija	1,666	0,13

Prema dobivenim podacima, prikazanima u Tablici 2., srednja vrijednost koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA, izolirane QIAamp® Mini Kit-om, u uzorcima, iznosi 8,978 ng/μL. U većini uzoraka izmjerene su približno podjednake vrijednosti koncentracija cfDNA, osim u uzorku S17 gdje se uočava značajnije odstupanje što utječe i na vrijednost standardne devijacije koja iznosi 1,666. Uzrok tomu, kao i u prethodnoj metodi, može biti predanalitička pogreška, loša kvaliteta uzorka ili drugi, tomu slični čimbenici.

Što se tiče čistoće uzoraka DNA, također je mjerena apsorbancija na valnoj duljini od 280 nm te je izračunat omjer A_{260}/A_{280} čija je zadovoljavajuća vrijednost 1,8-2,0. U uzorcima DNA, koji su izolirani QIAamp® Mini Kit-om, gotovo polovica ispitanih uzoraka odgovara standardima čistoće jer im omjer A_{260}/A_{280} iznosi približno ili više od 1,8.

Dobiveni rezultati upućuju na to da uzorci DNA, koji su izolirani QIAamp® ccf DNA Mini Kit-om, pokazuju viši stupanj pročišćenosti u odnosu na uzorke izolirane Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit-om, što pokazuju vrijednosti omjera A_{260}/A_{280} .

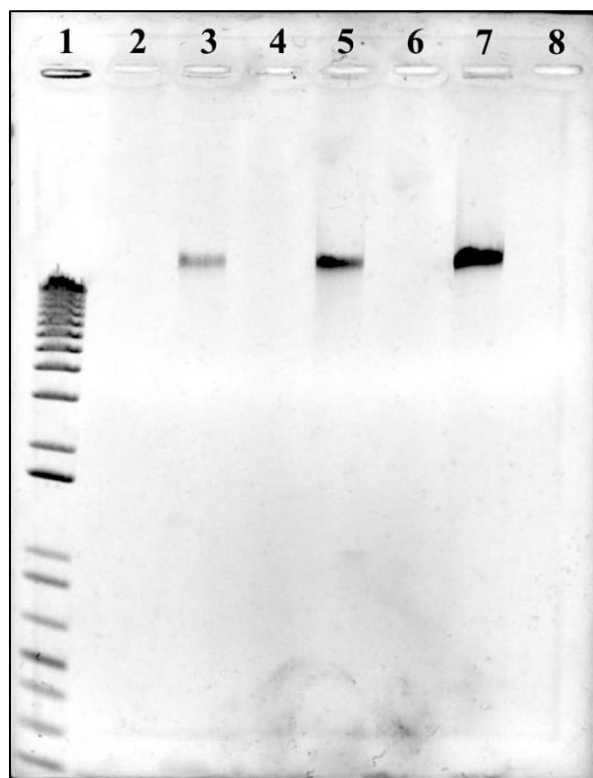
Uzimajući u obzir pročišćene uzorke, može se zaključiti da je ovim eksperimentom potvrđena prisutnost te izmjerena koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA u serumu osoba oboljelih od osteoartritisa. To upućuje na prisutnost upale u organizmu što odgovara i patofiziologiji bolesti. Međutim, iz izmjerenih koncentracija ne može se s pouzdanošću odrediti stadij bolesti. Nedostatak je i u tome što nije sigurno koje je točno podrijetlo određene DNA, potječe li ona

od zdravih stanica koje su, uslijed odgovarajućih fizioloških procesa, podlegle procesu apoptoze, ili je riječ o DNA koja se oslobodila uslijed upale uzrokovane osteoartritisom.

Što se tiče samog eksperimenta, dobiveni rezultati upućuju na to da je metoda izolacije DNA provedena uspješnije QIAamp® ccfDNA Mini Kit-om u odnosu na Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit. Također, može se zaključiti da predanalitički postupci utječu na kvalitetu čistoće uzorka jer uvjeti čuvanja, svježine uzorka i pripreme istoga, utječu na konačnu čistoću izolata.

Analizom provedene agarozne elektroforeze vidljiva je genomska DNA iz uzoraka seruma pacijentica s osteoartritisom ili fragmenti (približno 12000 i 7000 bp), Slika 5. Nameće se pretpostavka da genomska DNA može ometati izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA ili da koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA nije dovoljna da bi se izolirala odabranom metodom. Međutim, svakako bi spomenutu problematiku trebalo provjeriti i testirati na puno osjetljivijim kolonama za izolaciju koje omogućuju izolaciju specifično malenih fragmenata DNA. Prema dobivenom i prikazanom, kao što je već spomenuto, jedna od mogućnosti je da je granica detekcije u uzorcima ispod detektabilne razine pa zbog toga slobodna cirkulirajuća DNA nije vidljiva što se, s druge strane, može obrazložiti mogućom slabom i sporom progresijom bolesti. Predanalitika predstavlja veliki izazov koji se mora savladati i standardizirati kako bi krajnji rezultati bili reprezentativni i klinički primjenjivi. Uporabom osjetljivijih metoda, poput apsolutne kvantifikacije digitalnim PCR-om mogli bi sa pouzdanošću tvrditi o prisutnosti ili odsutnosti određenih ciljanih fragmenata cfDNA te točno kvantificirati cfDNA.

Potrebna je i specifičnija izolacija DNA na kolonama koje omogućuju izolaciju malih fragmenata DNA za koje se pretpostavlja da ovom metodom izolacije nisu vidljivi. Razlika u obrascu ponašanja DNA svakako je rezultat predanalitičkog postupanja s uzorcima kao i činjenice da su ovakva oboljenja vrlo kompleksni patofiziološki procesi koji se značajno razlikuju od čovjeka do čovjeka iako se radi o dijagnostici iste bolesti. Dodatna stavka na koju treba obratiti pozornost je odabir vrste uzorka za izolaciju kako bi doprinos izolirane DNA bio što veći i kako bi genomska DNA što manje ometala izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA.



Slika 5. Izolacija genomske i slobodne cirkulirajuće DNA prema protokolu QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; uzorci: 1 – standard 1 kbp, 2 – kontrolni uzorak zdrave osobe 3 – osteoartritis 01, 4 – osteoartritis 02, 5 – osteoartritis 03, 6 – osteoartritis 04, 7 – osteoartritis 05, 8 – osteoartritis 06., agarozna elektroforeza, 0,8% agarozna u TBE puferu

5. Zaključak

- Izolacija pročišćene slobodne cirkulirajuće DNA koja je provedena QIAamp® ccfDNA Mini Kit-om uspješnija je, osigurava veći prinos te veću pročišćenost DNA u odnosu na DNA koja je izolirana Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit-om.
- Odgovarajući predanalitički čimbenici utječu na konačnu kakvoću i prinos izolirane tvari. Potrebno je standardizirati postupke koji podrazumijevaju predanalitičku pripremu uzorka kako bi se osigurali istovjetni i pouzdani rezultati u svakom laboratoriju. Na taj bi se način omogućila vjerodostojna primjena u kliničke svrhe.
- Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se odredila odgovarajuća referentna vrijednost koja bi se mogla koristiti u laboratorijskim nalazima.
- Slobodna cirkulirajuća DNA može biti tumorskog, fetalnog, mitohondrijskog ili nekog drugog podrijetla, međutim, trenutni je problem njezina nespecifičnost, tj. nije specifična za svaku pojedinu bolest kod koje je njezina koncentracija u cirkulaciji povišena.
- Unatoč nekim nedostacima, cfDNA pokazuje veliki potencijal kliničke primjene. Mogla bi poslužiti kao neinvazivni biomarker u dijagnostici bolesti. Naime, većina biopsija provodi se, manje ili više, invazivnim metodama. Tekućinska biopsija koja podrazumijeva izolaciju i analizu cfDNA u uzorku uvelike bi olakšala proces dijagnostike, kako pacijentima, tako i zdravstvenom osoblju. Također, s obzirom na to da se većina simptoma određene bolesti, pa tako i osteoartritisa, manifestira kada je bolest u uznapredovaloj fazi, povišena koncentracija cfDNA u cirkulaciji, mogla bi biti pokazatelj prisutne upale u organizmu te omogućiti raniju dijagnostiku bolesti.
- Praćenje uspješnosti terapije još je jedno područje gdje cfDNA pronalazi svoju primjenu. Koncentracija cfDNA u cirkulaciji brzo povisi i, isto tako brzo, snizi svoju vrijednost što je dobro za trenutno praćenje uspješnosti terapije. U usporedbi s trenutnim tumorskim biomarkerima, to pokazuje napredak jer njihova koncentracija u krvi sporo raste i sporo opada te zbog toga ne može poslužiti kao odgovarajući marker za praćenje uspješnosti terapije.
- cfDNA, kako u drugim bolestima, tako i u osteoartritisu ima značajnu ulogu. S obzirom na to da se simptomi osteoartritisa javljaju tek kada je zglobna hrskavica jako oštećena, ta bolest se vrlo rijetko dijagnosticira u ranoj fazi što uvelike utječe na terapiju i stupanj oporavka oboljelih osoba. Tako bi određivanje koncentracije cfDNA u ovih pacijenata omogućilo pravovremenu dijagnostiku, a isto tako omogućuje

praćenje odgovora na terapiju kako bi se, ukoliko terapija nije dovoljno učinkovita, na vrijeme promijenio terapijski režim, u svrhu poboljšanja kvalitete života i produljega istoga u oboljelih osoba.

6. Literatura

Budd, E., Nalesso, G., Mobasheri, A. Extracellular genomic biomarkers of osteoarthritis, *Expert Review of Molecular Diagnostic*, 2018, 18(1), 55-74.

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013, 10(8), 472-84.

Čepelak I, Čvorišćec D. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 622-637.

Dong C, Liu Y, Sun C, Liang H, Dai L, Shen J, Wei S, Guo S, Leong KW, Chen Y, Wei L, Liu L. Identification of Specific Joint-Inflammatogenic Cell-Free DNA Molecules From Synovial Fluids of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2020, 11, 662.

Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2019, 10, 502.

Hallermayr A, Keßler T, Fujera M, Liesfeld B, Bernstein S, von Ameln S, Schanze D, Steinke-Lange V, Pickl JMA, Neuhann TM, Holinski-Feder E. Impact of cfDNA Reference Materials on Clinical Performance of Liquid Biopsy NGS Assays. *Cancers (Basel)*. 2023, 15(20), 5024.

Henry BM, de Oliveira MHS, Cheruiyot I, Benoit J, Rose J, Favaloro EJ, Lippi G, Benoit S, Ponde Shakked N. Cell-Free DNA, Neutrophil extracellular traps (NETs), and Endothelial Injury in Coronavirus Disease 2019- (COVID-19-) Associated Acute Kidney Injury. *Mediators Inflamm*. 2022, 9339411.

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012, 62, 3923.

Liu SC. Circulating tumor DNA in liquid biopsy: Current diagnostic limitation. *World J Gastroenterol.* 2024, 30(15), 2175-2178.

Pisareva E, Mihalovičová L, Pastor B, Kudriavtsev A, Mirandola A, Mazard T, Badiou S, Maus U, Ostermann L, Weinmann-Menke J, Neuberger EWI, Simon P, Thierry AR. Neutrophil extracellular traps have auto-catabolic activity and produce mononucleosome-associated circulating DNA. *Genome Med.* 2022, 14(1), 135.

QIAGEN. QIAamp DNA Mini and Blood Handbook, 2024, 2, 8-33.

Ross C. A comparison of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: diagnosis and treatment. *Nurse Pract.* 1997, 22(9), 20-41.

Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, Pauwels P. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *J Mol Diagn.* 2017, 19(1), 162-168.

Spindler, K.-L. G. Methodological, biological and clinical aspects of circulating free DNA in metastatic colorectal cancer, *Acta Oncologica*, 2017, 56(1), 7-16.

Thermo Fischer Scientific. Nanodrop 8000 Spectrophotometer, V2.2 User Manual, 2017, 2, 9-101.

Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2020, 57(7), 484-507.

Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res.* 2016, 14(10), 898-908.

7. Sažetak/Summary

7. Sažetak

Osteoartritis (OA), kronična i degenerativna bolest zglobova, najčešći je oblik artritisa. Često se zanemaruje ozbiljnost ove raširene i kronične bolesti. Razvoj lijeka za modificiranje OA otežan je nedostatkom topivih biomarkera za rano otkrivanje OA. Cilj istraživanja OA biomarkera je identificirati rani OA prije pojave radiografskih znakova i razvoja boli. Slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA) mogla bi poslužiti kao neinvazivni biomarker OA. Uspoređene su dvije različite metode izolacije cfDNA i cilj je bio potvrditi koju je od njih bolje koristiti u budućoj genomskoj analizi s obzirom na bolji prinos ili čistoću. Istraživanje izvanstaničnog genomskog materijala također može otkriti više o temeljnoj patofiziologiji OA, stoga postoji potreba za definiranjem biomarkera za otkrivanje i praćenje napredovanja OA bolesti. Minimalno invazivne metode tekuće biopsije kao što su uzorkovanje sinovijalne tekućine i krvi za uzimanje genomskog materijala mogu biti osjetljivije od radiografije u otkrivanju, dijagnozi i praćenju OA u budućnosti.

7. Summary

Osteoarthritis (OA), a chronic, debilitating and degenerative disease of the joints, is the most common form of arthritis. The seriousness of this prevalent and chronic disease is often overlooked. Disease modifying OA drug development is hindered by the lack of soluble biomarkers to detect OA early. The objective of OA biomarker research is to identify early OA prior to the appearance of radiographic signs and the development of pain.

So, the aim of work was extracellular genomic material that could serve as biomarkers of OA, cell-free DNA (cfDNA). Two different cfDNA isolation methods were compared and the aim was to confirm which one is better to use in future genomic analysis considering better yield or purity.

There is an unmet need for soluble biomarkers for detecting and then monitoring OA disease progression. Extracellular genomic material research may also reveal more about the underlying pathophysiology of OA. Minimally invasive liquid biopsies such as synovial fluid and blood sampling of genomic material may be more sensitive over radiography in the detection, diagnosis and monitoring of OA in the future.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

SLOBODNA CIRKULIRAJUĆA DNA U OSTEOARTRITISU

Klara Čosić

SAŽETAK

Osteoarthritis (OA), kronična i degenerativna bolest zglobova, najčešći je oblik artritisa. Često se zanemaruje ozbiljnost ove raširene i kronične bolesti. Razvoj lijeka za modificiranje OA otežan je nedostatkom topivih biomarkera za rano otkrivanje OA. Cilj istraživanja OA biomarkera je identificirati rani OA prije pojave radiografskih znakova i razvoja boli. Slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA) mogla bi poslužiti kao neinvazivni biomarker OA. Uspoređene su dvije različite metode izolacije cfDNA i cilj je bio potvrditi koju je od njih bolje koristiti u budućoj genomskoj analizi s obzirom na bolji prinos ili čistoću. Istraživanje izvanstaničnog genomskog materijala također može otkriti više o temeljnoj patofiziologiji OA, stoga postoji potreba za definiranjem biomarkera za otkrivanje i praćenje napredovanja OA bolesti. Minimalno invazivne metode tekuće biopsije kao što su uzorkovanje sinovijalne tekućine i krvi za uzimanje genomskog materijala mogu biti osjetljivije od radiografije u otkrivanju, dijagnozi i praćenju OA u budućnosti.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 5 grafičkih prikaza, 2 tablice i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: slobodna cirkulirajuća DNA, cfDNA, osteoarthritis, izolacija DNA

Mentor: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Najda Rudman, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CIRCULATING FREE DNA IN OSTEOARTHRITIS

Klara Ćosić

SUMMARY

Osteoarthritis (OA), a chronic, debilitating and degenerative disease of the joints, is the most common form of arthritis. The seriousness of this prevalent and chronic disease is often overlooked. Disease modifying OA drug development is hindered by the lack of soluble biomarkers to detect OA early. The objective of OA biomarker research is to identify early OA prior to the appearance of radiographic signs and the development of pain. So, the aim of work was extracellular genomic material that could serve as biomarkers of OA, cell-free DNA (cfDNA). Two different cfDNA isolation methods were compared and the aim was to confirm which one is better to use in future genomic analysis considering better yield or purity. There is an unmet need for soluble biomarkers for detecting and then monitoring OA disease progression. Extracellular genomic material research may also reveal more about the underlying pathophysiology of OA. Minimally invasive liquid biopsies such as synovial fluid and blood sampling of genomic material may be more sensitive over radiography in the detection, diagnosis and monitoring of OA in the future.

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

Thesis includes: 38 pages, 5 figures, 2 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: circulating free DNA, cfDNA, osteoarthritis, DNA isolation

Mentor: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Najda Rudman, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2024