

# Usporedba metoda izdvajanja slobodne cirkulirajuće DNA iz uzoraka tekuće biopsije pacijenata s kolorektalnim adenomom

---

**Matusina, Marko**

**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:163:747237>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Marko Matusina**

**Usporedba metoda izdvajanja slobodne  
cirkulirajuće DNA iz uzoraka tekuće biopsije  
pacijenata s kolorektalnim adenomom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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

Rad je financiran sredstvima projekta Hrvatske zaklade za znanost „Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnog karcinoma primjenom tekuće biopsije“ (IP-2019-04-4624, voditeljica prof. dr. sc. Karmela Barišić) i podržan sredstvima projekta FarmInova (KK.01.1.1.02.0021) financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj.



*Najprije bih htio od srca zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Andrei Čeri na prilici za sudjelovanjem u projektu, predanom i pedantnom vodstvu, mnogim zabavnim trenucima i beskrajnom strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na svemu, puno ste me toga naučili, što se nadam da ću nositi sa sobom zauvijek. Hvala mojim roditeljima na iznimnom ulaganju truda u moje obrazovanje i podršci na svakom koraku života. Najveću zahvalu zaslužuju moji dragi prijatelji Ivana, Lucija, Marija, Ilija i Josip. Hvala vam što ste uvijek bili uz mene, na svim lijepim trenucima i na pozornom slušanju mojih gluposti, bez vas ništa od ovoga ne bi imalo smisla.*

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	1
1.1.	SLOBODNA CIRKULIRAJUĆA DNA.....	1
1.2.	METODE IZDVAJANJA ccfDNA .....	2
1.3.	KOLOREKTALNI ADENOM I KOLOREKTALNI KARCINOM.....	3
1.4.	DIJAGNOSTIKA, KLASIFIKACIJA I LIJEČENJE CRC-a.....	5
1.5.	KONCEPT I PRIMJENA TEKUĆE BIOPSIJE .....	8
<b>2.</b>	<b>OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	10
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE</b> .....	11
3.1.	UZORKOVANJE I POSTUPANJE S UZORKOM PRIJE IZDVAJANJA.....	11
3.2.	METODE IZDVAJANJA ccfDNA .....	12
3.2.1.	Izdvajanje ccfDNA pomoću kompleta NucleoSpin cfDNA XS Kit (metoda MN) .....	12
3.2.2.	Izdvajanje ccfDNA pomoću kompleta QIAamp ccfDNA/RNA Kit (metoda SQ) .....	13
3.2.3.	Izdvajanje ccfDNA pomoću kompleta QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (metoda VQ) .....	15
3.3.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZDVOJENE ccfDNA .....	17
3.4.	PROCJENA KVALITETE IZDVOJENE ccfDNA .....	18
3.5.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	21
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	22
4.1.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZDVOJENE ccfDNA .....	22
4.2.	USPOREDBA KONCENTRACIJA IZDVOJENE ccfDNA.....	22
4.3.	PROCJENA KVALITETE IZDVOJENE ccfDNA .....	24
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	26
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	30
<b>7.</b>	<b>POPIS KRATICA</b> .....	30
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	32
<b>9.</b>	<b>SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	36
9.1.	SAŽETAK.....	36
9.2.	SUMMARY .....	37

# 1. UVOD

## 1.1. SLOBODNA CIRKULIRAJUĆA DNA

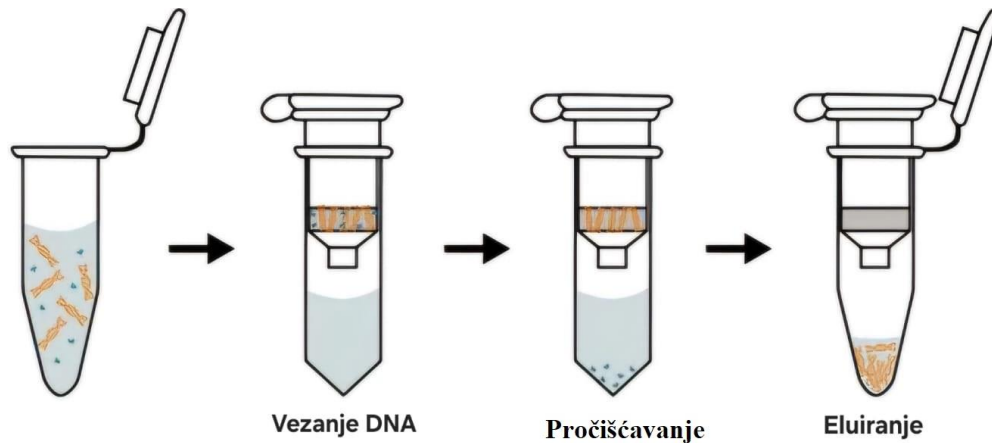
Slobodna cirkulirajuća DNA (engl. *circulating cell-free DNA*, ccfDNA) je dvolančana, fragmentirana DNA koja se nalazi izvan stanica u tjelesnim tekućinama poput seruma, plazme, urina, sline, pleuralnoga izljeva, cerebrospinalne tekućine i dr. Otkrivena je u krvi onkoloških pacijenata još 1948. godine, no to je otkriće dugi niz godina ostalo nezapaženo u velikom dijelu znanstvene zajednice. 1975. godine otkrivena je i u serumu zdravih ispitanika, dok je u kasnijim godinama u mnogim znanstvenim istraživanjima koncentracija ccfDNA povezana s tumorskim bolestima. Veliku prekretnicu u istraživanju ccfDNA donijelo je otkriće fetalne DNA u majčinoj krvi 1997. godine, što je otvorilo put prenatalnoj dijagnostici genskih poremećaja. U 21. stoljeću pojavom novih metoda molekularne analize obnavlja se interes za istraživanjem i primjenom ccfDNA u raznim patološkim stanjima (Szilágyi i sur., 2020).

Smatra se da se ccfDNA u tjelesne tekućine zdravih osoba otpušta kao rezultat apoptoze hematopoetskih stanica, što je potkrijepljeno činjenicom da je ccfDNA visoko fragmentirana, u odsječcima od otprilike 160 – 180 baznih parova (bp), što odgovara duljini DNA uključenoj u strukturu jednoga nukleosoma. U patološkim stanjima, kao što su tumorske bolesti, ccfDNA otpušta se i kao rezultat nekroze i aktivne sekrecije. Povećane koncentracije pronađene su i u brojnim drugim patološkim stanjima poput kardiovaskularnih bolesti, nakon transplantacije organa, sepse, šećerne bolesti i u upalama, ali i u nekim fiziološkim stanjima kao što je stanje nakon intenzivne tjelovježbe. Koncentracije u tjelesnim tekućinama izrazito su niske, a važna karakteristika ccfDNA je i kratko poluvrijeme života (od nekoliko min do 2 h), što omogućuje primjenu ccfDNA kao biljega bolesti u stvarnom vremenu. Razlog kratkoga poluvremena života je prisutnost enzima deoksiribonukleaza (DNaza) u tjelesnim tekućinama, kao i brzo uklanjanje u jetri, bubrežima i slezeni (Kustanovich i sur., 2019). Iako je postojanje ccfDNA poznato dulje vrijeme, biološka uloga nije u potpunosti razjašnjena. Ipak, poznato je da je ccfDNA važna komponenta takozvanih neutrofilnih izvanstaničnih zamki (engl. *neutrophil extracellular traps*), gdje pomaže u vezanju i sprječavanju širenja patogenih mikroorganizama, kao i u aktivaciji kaskade zgrušavanja. Osim toga, istraživanja upućuju na ulogu ccfDNA u procesima starenja i širenja tumora (Volik i sur., 2016).

Glavna primjena analize ccfDNA danas je zasigurno neinvazivno prenatalno testiranje, odnosno rana detekcija kromosomskih aneuploidija fetusa, što predstavlja važnu alternativu dosadašnjim invazivnim i riskantnim metodama poput amniocenteze i biopsije korionskih resica. Osim toga, kvantifikacija i molekularna analiza ccfDNA ima obećavajuću primjenu u dijagnozi, praćenju i određivanju terapije tumorskih bolesti. Metode analize ccfDNA uključuju metode temeljene na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), kojima se mogu ciljano detektirati specifične mutacije i metode temeljene na sekvenciranju sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS), kojima je moguće detektirati sve genske promjene (Szilágyi i sur., 2020).

## 1.2. METODE IZDVAJANJA ccfDNA

Izdvajanje ccfDNA ključan je korak svake molekularne analize jer o učinkovitosti izdvajanja, odnosno količini i čistoći izdvojene ccfDNA ovisi uspješnost bilo koje daljnje analize. Tradicionalne metode izdvajanja DNA, poput ekstrakcije fenolom i kloroformom, temelje se na lizi stanica, uklanjanju ostalih komponenti uzorka i pročišćavanju DNA u tekućoj fazi. U današnje vrijeme ove metode uvelike su zamijenjene metodama na čvrstoj fazi zbog veće učinkovitosti, posebno prilikom izdvajanja niskih količina ccfDNA, gdje je izbor metode izdvajanja ključan korak u cjelokupnom procesu analize. Najčešće se koriste komercijalno dostupni kompleti uz propisani postupak proizvođača, a najveći broj metoda temelji se na izdvajanju ccfDNA selektivnom adsorpcijom na kolone od silikatnih čestica ili na magnetske čestice u uvjetima povećane koncentracije soli (Ye i Lei, 2021). Izdvajanje na kolonama temelji se na vezanju ccfDNA iz uzorka na silikatne čestice u sastavu kolone, ispiranju ostalih ometajućih tvari i konačnom ispiranju ccfDNA s kolone (Slika 1.), a svaki dio opisanoga procesa potpomognut je centrifugiranjem kolone (takozvane spin-kolone) ili primjenom vakuuma (takozvane vakuum-kolone) kako bi se prolazak uzorka ili pufera kroz kolonu ubrzao (Lee i sur., 2018). Izbor metode izdvajanja ovisi o početnom volumenu uzorka, potrebnom prinosu i čistoći izdvojene ccfDNA i metodi koja se koristi za kasniju analizu (Terp i sur., 2024).



Slika 1. Osnovni princip izdvajanja cfDNA na koloni (preuzeto i prilagođeno prema Lee i sur., (2018) uz dopuštenje izdavača).

Osim metode izdvajanja, važno je uzeti u obzir i utjecaj ostalih predanalitičkih čimbenika. Iako predanalitički postupci u ovom području još uvijek nisu standardizirani, Meddeb i sur. (2019) izdali su smjernice za predanalitičke uvjete analize cfDNA. Preporučuje se kao uzorak koristiti plazmu radi smanjivanja mogućnosti kontaminacije genomskom DNA koja je moguća u serumu kao rezultat lize leukocita prilikom zgrušavanja krvi. Uzorkovanje krvi provodi se pomoću spremnika s antikoagulantom EDTA ili pomoću specijaliziranih spremnika koji omogućuju dulju pohranu uzorka prije izdvajanja. Također, preporuča se odvojiti plazmu centrifugiranjem u dva koraka, gdje prvi korak pri manjoj brzini služi za oprezno odvajanje stanica, a drugi korak pri većoj brzini služi za dodatno odvajanje staničnih ostataka i vezikula, nakon čega je uzorke plazme do izdvajanja cfDNA poželjno pohraniti na -20 ili -80 °C. Nakon samog izdvajanja, koncentracija cfDNA provjerava se fluorimetrijskim metodama ili metodama PCR-a u stvarnom vremenu, a kvaliteta cfDNA provjerava se analizom fragmenata.

Standardizacija i validacija predanalitičke faze, u kojoj se događa najveći dio laboratorijskih pogrešaka, ključan je preduvjet uvođenja analize cfDNA u kliničku praksu.

### 1.3. KOLOREKTALNI ADENOM I KOLOREKTALNI KARCINOM

Kolorektalni karcinom (CRC), odnosno rak debelog i završnog crijeva, danas je izraziti globalni zdravstveni izazov. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, predstavlja treći najučestaliji karcinom u svijetu, od kojega godišnje obolijeva gotovo dva milijuna ljudi, uz gotovo milijun smrti godišnje. S druge strane, u Republici Hrvatskoj CRC je

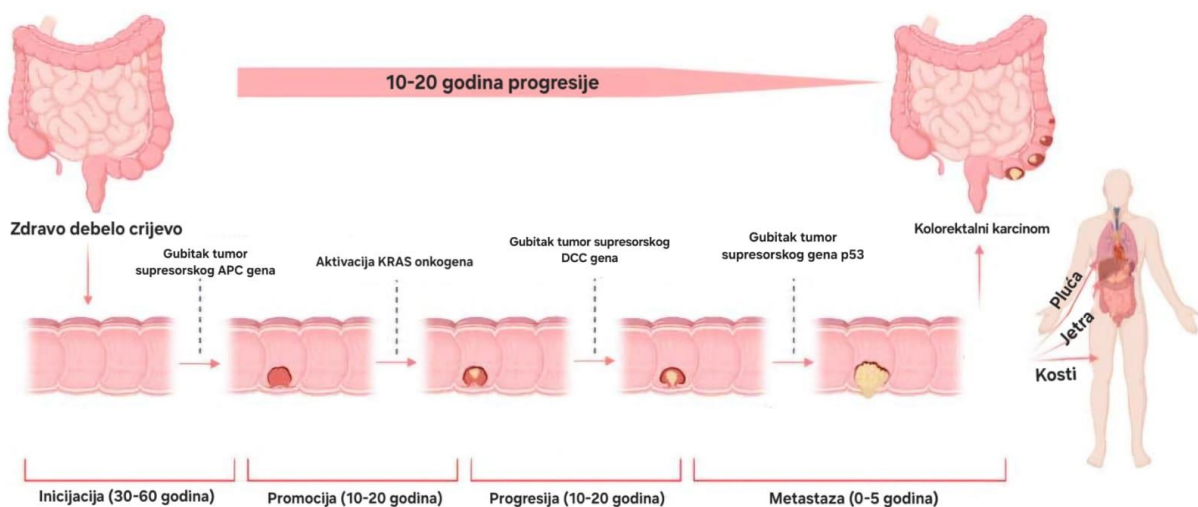
na prvom mjestu po učestalosti, pri čemu se u jednoj godini otkrije prosječno 3600 novih slučajeva, uz 2100 slučajeva sa smrtnih ishodom. CRC je u Hrvatskoj i svijetu na drugom mjestu po smrtnosti od tumorskih bolesti, što dodatno naglašava zdravstveni problem koji predstavlja, ali i upozorava na potrebu za poboljšanim modalitetima prevencije, rane dijagnostike, praćenja i liječenja ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)).

CRC nastaje malignom transformacijom benignih polipa, odnosno adenoma. Kolorektalni adenomi su benigni epitelni tumori debeloga crijeva, koji se definiraju kao predkancerozne lezije, a karakterizirani su određenim stupnjem stanične displazije, što ih razlikuje od zdravog tkiva. Općenito, tumori se razvijaju u četiri faze. Prva je faza inicijacija, u kojoj stanice stječu genske promjene koje dovode do poremećene regulacije staničnog ciklusa. Slijedi promocija, karakterizirana proliferacijom stanica koje u ovoj fazi još uvijek nisu neoplastične. Treća je faza progresija, u kojoj zbog nakupljanja dodatnih genskih varijacija dolazi do fenotipskih promjena koje omogućavaju izrazitu proliferaciju stanica, uz stjecanje invazivnog potencijala. Konačna je faza metastaziranje, odnosno širenje tumorskih stanica limfnim ili krvožilnim sustavom do udaljenih mjesta u organizmu (Ho i sur., 2024).

Opisani mehanizam karcinogeneze primjenjiv je i za razvoj kolorektalnoga adenoma, iz kojeg se razvija CRC u procesu koji se naziva adenomsko-karcinomski slijed (Brkić i Grgić, 2006). Ovaj proces obilježen je nakupljanjem somatskih mutacija u epitelnim stanicama debeloga crijeva, koje im omogućuju sve veću sposobnost proliferacije i malignu transformaciju (Slika 2.). Prelazak iz benigne u malignu bolest kompleksan je, multifaktorijalan i dugotrajan proces u koji je uključeno više različitih molekularnih mehanizama. U najvećem broju slučajeva sporadičnoga CRC-a, glavni je mehanizam kromosomska nestabilnost. Kromosomska nestabilnost uzrokovana je greškama u odvajanju kromosoma tijekom stanične diobe, što dovodi do kromosomskih aberacija koje mijenjaju broj kopija ključnih onkogenih i tumor-supresorskih gena, a povezane su i s mutacijama ključnih gena za razvoj CRC-a kao što su *APC*, *KRAS*, *PIK3CA* i *TP53*. Mutacija u *APC* smatra se najranijim inicijacijskim događajem kolorektalne karcinogeneze, a dovodi do translokacije beta-katenina u jezgru i pojačane aktivacije signalnog puta Wnt (engl. *Wingless-related integration site*), koji je odgovoran za staničnu proliferaciju. Osim mutacije u *APC*, od velikog je značaja i aktivacijska mutacija gena *KRAS*, čiji je genski produkt važan sudionik brojnih signalnih puteva staničnog rasta i proliferacije, a često je praćena mutacijom u *PIK3CA*, koja se javlja kasno u adenomsko-karcinomskom slijedu i povezana je sa staničnim



preživljenjem, odnosno inhibicijom mehanizama apoptoze. U kasnom stadiju karcinogeneze javlja se i mutacija *TP53*, dovodeći do gubitka funkcije proteina p53, jednog od glavnih regulatora staničnog ciklusa (Nguyen i sur., 2020). Osim kromosomske nestabilnosti, istaknut je i mehanizam mikrosatelitne nestabilnosti, koji je uzrokovan mutacijama gena koji kodiraju proteine uključene u popravljanje grešaka u replikaciji DNA *mismatch* mehanizmom popravka, poput *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* te *PMS1* i *PMS2* (Siskova i sur., 2020). Iako su genske promjene u CRC-u brojne, važnu ulogu imaju i epigenetske promjene, a najčešće metilacija promotorskih regija tumor-supresorskih gena kojima se na taj način smanjuje ekspresija (Verbanac i sur., 2021).



Slika 2. Razvoj CRC-a (preuzeto i prilagođeno prema Hossain i sur., (2022) uz dopuštenje izdavača).

#### 1.4. DIJAGNOSTIKA, KLASIFIKACIJA I LIJEČENJE CRC-a

Zlatni standard dijagnoze i praćenja kolorektalnoga adenoma i CRC-a je kolonoskopija, kojom je moguće pregledati cijelo debelo crijevo, lokalizirati promijenjene strukture, uzeti uzorak tkivne biopsije za patohistološku analizu kojom se postavlja dijagnoza, ali i izvršiti resekciju polipa. Prisutnost metastaza utvrđuje se slikovnim tehnikama. Što se tiče laboratorijskih pretraga, ne postoji validirani tumorski biljeg za postavljanje dijagnoze, već smjernice preporučuju određivanje karcinoembrionalnoga antigena (CEA) isključivo za određivanje prognoze i praćenje terapije, a posebno nakon kirurškoga zahvata (Lakemeyer i sur., 2021). Na temelju navedenih dijagnostičkih postupaka, CRC se može klasificirati TNM sustavom (Tablica 1.), koji u obzir uzima svojstva primarnog tumora (T), zahvaćenost nodusa

regionalnih limfnih čvorova (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M). Bolest se na temelju TNM klasifikacije svrstava u četiri stadija, koji određuju i oblike liječenja. Stadiji bolesti i oblici liječenja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 1. TNM klasifikacija CRC-a.

<b>Stadij</b>	<b>Opis</b>
<b>T (tumor)</b>	
Tis	Tumor in situ
T1	Tumor prodire u submukozu
T2	Tumor prodire u mišićni sloj stijenke debelog crijeva
T3	Tumor prodire kroz mišićni sloj u perikolorektalno područje
T4	Tumor prodire u druge organe ili probija visceralni peritoneum
<b>N (nodus)</b>	
Nx	Ne može se procijeniti
N0	Nema metastaza u limfnim čvorovima
N1	Metastaze u 1-3 limfna čvora
N2	Metastaze u 4 ili više limfnih čvorova
<b>M (metastasis)</b>	
Mx	Ne može se procijeniti
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Prisutne udaljene metastaze

Tablica 2. Stadiji i liječenje CRC-a.

Stadij	TNM	Liječenje
0	Tis/N0/M0 (polip)	Kolonoskopija, operativno
I	T1,2/N0/M0	Operativno
II	T3,4/N0/M0	Operativno, adjuvantna kemoterapija u slučaju rizika za relaps
IIIA	T1,2/N1/M0	Operativno, adjuvantna kemoterapija
IIIB	T3,4/N1/M0	
IIIC	Bilo koji T/N2/M0	
IV	Bilo koji T i N/M1	Kemoterapija i biološka terapija, rijetko operativno

Unatoč postojećim metodama dijagnostike, CRC je u samo 40 % slučajeva otkriven u ranim fazama kada je moguće potpuno izlječenje, a uz to je moguća rekurencija bolesti nakon operativnih i drugih terapijskih postupaka. Od iznimne je važnosti činjenica da petogodišnje preživljenje pacijenata sa stadijem I CRC-a iznosi više od 90 %, dok je u uznapredovaloj bolesti manje od 15 % (Vymetalkova i sur., 2018). Na kolonoskopiju se pacijenti često upućuju već u kasnijim stadijima, a osim toga kolonoskopija ima brojne nedostatke poput neugodnosti za pacijenta, rizika od komplikacija, zahtjeva za prilagođavanjem prehrane prije postupka, potrebom za visokostručnim operaterom i dr. Stoga je naglašena potreba za novim tehnikama dijagnostike i praćenja CRC-a, kao i za metodama probira i prevencije. Prevencija tumorskih bolesti može se podijeliti na primarnu i sekundarnu. Primarna se prevencija odnosi na sprječavanje pojave bolesti u zdravoj populaciji eliminacijom rizičnih čimbenika. Rizični čimbenici za razvoj CRC-a uključuju prehranu, način života, kronične upalne bolesti crijeva, pozitivnu obiteljsku anamnezu i dr. Stoga se kao primarna prevencija preporuča zdrava prehrana, fizička aktivnost, održavanje normalne tjelesne mase te prestanak pušenja i konzumacije alkohola. S druge strane, sekundarna prevencija odnosi se na rano otkrivanje postojeće bolesti i sprječavanje daljnje progresije. Metode sekundarne prevencije uključuju kolonoskopiju i testove probira (Hossain i sur., 2022). Testovi probira od instrumentalne su važnosti s obzirom na činjenicu da se CRC razvija tijekom dugogodišnjeg razdoblja pa je dijagnostički prozor zapravo vrlo širok. U Republici Hrvatskoj od 2008. godine provodi se Nacionalni program ranog otkrivanja raka debeloga crijeva, čiji je cilj smanjenje smrtnosti za

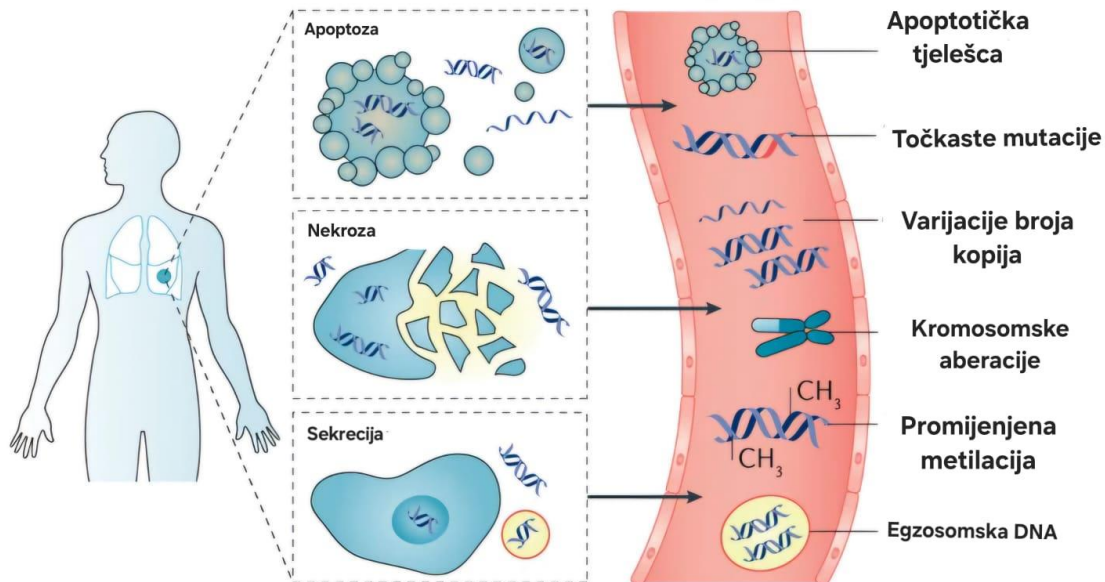
15 % u razdoblju od 10 – 13 godina nakon početka provedbe programa, a u program su uključene osobe prosječnog rizika, bez znakova bolesti i u dobi od 50 – 74 godine. Probir se tradicionalno temelji na Gvajakovom testu, gdje se u uzorku stolice detektira okultno krvarenje temeljem pseudoperoksidativnoga djelovanja prisutnoga hemoglobina u pozitivnom uzroku, što dovodi do promjene boje reagencije. Ispitanici samostalno nanose uzorak stolice na priloženu karticu tijekom tri uzastopna dana ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)). U novije vrijeme ovaj test uvelike se zamjenjuje jednostavnijim imunokromatografskim testom, koji pokazuje bolje dijagnostičke karakteristike, uz značajno manju zahtjevnost preanalitičke faze za pacijenta, odnosno, nije potrebna manipulacija uzorkom niti prilagodba prehrane (Daly i sur., 2017). Ipak, ovi testovi pokazuju značajno nižu osjetljivost u stadiju adenoma i prvom stadiju CRC-a, što ukazuje na potrebu za novim i naprednim metodama rane detekcije (Niedermaier i sur., 2020). U tu svrhu danas se intenzivno istražuju metode tekuće biopsije.

## **1.5. KONCEPT I PRIMJENA TEKUĆE BIOPSIJE**

Tekuća biopsija novi je pristup u onkologiji za detekciju, praćenje i molekularnu karakterizaciju tumorskih bolesti, a odnosi se na analizu specifičnih biljega tumorskoga porijekla u tjelesnim tekućinama, kao što su cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA), cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) i egzosomi, male izvanstanične vezikule promjera 35 – 150 µm koje sadrže lipide, proteine i nukleinske kiseline (Kurma i sur., 2024). Prednosti tekuće biopsije u odnosu na tkivnu biopsiju uključuju: minimalnu invazivnost, brzinu, mogućnost procjene heterogenosti tumora, dobivanje uvida u potpuni molekularni profil bolesti, mogućnost otkrivanja prisutnih metastaza te povoljan odnos koristi i troška. Osim toga, tekuća biopsija znatno pojednostavljuje longitudinalno praćenje bolesti i pruža informaciju o potpunom tumoru u stvarnom vremenu (Vymetalkova i sur., 2018).

Od svih dostupnih biljega tekuće biopsije, ctDNA smatra se najviše obećavajućom. ctDNA je frakcija ccfDNA koja se otpušta iz primarnoga tumora, udaljenih metastaza, egzosoma i CTC-a. Odgovara 0,1 – 89 % ukupne ccfDNA (Kustanovich i sur., 2019). Analiza ctDNA odnosi se na određivanje koncentracije i molekularnu analizu. Dokazano je da je koncentracija ccfDNA značajno povišena kod pacijenata s tumorskim bolestima (prosječno 180 ng/mL) nego kod zdravih ispitanika (prosječno 13 ng/mL), a pacijenti s CRC-om imaju 25 – 50 puta povećane koncentracije nego zdrave osobe, te da koncentracije rastu usporedno s veličinom i stadijem tumora (Vymetalkova i sur., 2018). Osim toga, ctDNA sadržava sve

genske i epigenetske promjene tumorskih stanica (Slika 3.) poput točkastih mutacija, varijacija broja kopija, kromosomskih aberacija i promijenjene metilacije, koje se zatim mogu analizirati molekularnim metodama (Verbanac i sur., 2021).



Slika 3. Porijeklo i molekularne promjene ctDNA (preuzeto i prilagođeno prema Wan i sur., (2017) uz dopuštenje izdavača).

ctDNA može služiti kao dijagnostički biljeg za rano otkrivanje bolesti i praćenje minimalne ostatne bolesti, prediktivni biljeg za procjenu heterogenosti i dinamike razvoja tumora, identifikaciju meta za ciljanu terapiju i procjenu odgovora na terapiju, ali i prognostički biljeg za procjenu rizika pojave recidiva bolesti (Heizer i sur., 2015). Tako je Američka uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*) odobrila nekoliko metoda tekuće biopsije u području CRC-a, kao što su test Epi proColon, koji metodom PCR-a u stvarnom vremenu detektira metilaciju *SEPTIN9* u plazmi i test Cologuard, kojim se u uzroku stolice ispituju mutacije u *KRAS*, metilacija u *BMP3* i *NRG4*, kao i koncentracija hemoglobina. Uz testove temeljene na analizi DNA, odobren je i sustav CellSearch, kojim je u uzorku pune krvi omogućeno brojanje CTC-a, čiji broj korelira s prognozom i odgovorom na terapiju. Ipak, uvođenje metoda tekuće biopsije u rutinsku kliničku praksu prepuno je izazova, kao što su odobrenja regulatornih agencija, standardizacija predanalitičkih, analitičkih i poslijeanalitičkih postupaka te validacija metoda i tumačenje kliničkog značaja (Ho i sur., 2024).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

CRC je treća najučestalija vrsta karcinoma u svijetu od koje umire gotovo milijun ljudi godišnje, dok je u Hrvatskoj na prvom mjestu po učestalosti. Ovakvi epidemiološki podaci rezultat su mnogih ograničenja moderne medicine, poput nedovoljnog razumijevanja molekularne genetike CRC-a, nemogućnosti rane dijagnostike i rezistencije na terapiju. Zlatni standard postavljanja dijagnoze i praćenja je kolonoskopija, kojom se uzima uzorak tkivne biopsije, no velik broj pacijenata i dalje se otkrije u uznapredovalim fazama kada su stope preživljenja niske. Stoga se u znanstvenoj zajednici ulažu veliki napor u pronalazak i validaciju novih biljega i pristupa, kao što je tekuća biopsija, nova minimalno invazivna metoda koja omogućuje izdvajanje, detekciju, kvantifikaciju i molekularnu analizu analita porijeklom iz tumorskih stanica, među kojima se ističe ctDNA. ctDNA sadrži sve molekularne promjene tumora i metastaza pa ima velik potencijal u ranoj detekciji kao dijagnostički, prognostički i prediktivni biljeg. Prepreka uvođenja analize ctDNA u rutinsku kliničku upotrebu svakako su nedovoljno optimirane metode, kao i nepostojanje standardizacije i validacije metoda tekuće biopsije, a dodatni je izazov sve veći broj različitih komercijalno dostupnih kompleta za izdvajanje i analizu ctDNA, odnosno ccfDNA. Usporedba komercijalnih kompleta ključan je korak pri odabiru prikladne metode izdvajanja ccfDNA.

Cilj ovoga rada jest usporediti tri metode za izdvajanje ccfDNA u uzorcima tekuće biopsije pacijenata s kolorektalnim adenomom kako bi se na temelju koncentracije i kvalitete izdvojene ccfDNA mogla odabrati optimalna metoda za daljnje postupke. Očekuje se da će se svim trima metodama izdvojiti ccfDNA usporedive količine i kvalitete.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. UZORKOVANJE I POSTUPANJE S UZORKOM PRIJE IZDVAJANJA

Za izradu ovog rada odabrani su pacijenti (n=11) s potvrđenom dijagnozom kolorektalnoga adenoma zaprimljeni na redovite preglede u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice. Ispitanici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u projektu „Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnoga karcinoma primjenom tekuće biopsije“ (HRZZ IP-2019-04-4624, voditeljica prof. dr. sc. Karmela Barišić), za koji je dobiveno odobrenje Povjerenstva za etičnost eksperimentalnoga rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta (ur. broj: 251-62-03-19-29) i Etičkoga povjerenstva Kliničkoga bolničkoga centra Sestre milosrdnice (ur. broj: EP-19243/17-6).

Ispitanicima je krv uzorkovana u volumenu od 10 mL u dva spremnika CellSave (Menarini Silicon Biosystems, Italija) koji sadrže antikoagulant Na<sub>2</sub>EDTA i konzervans koji čuva integritet stanica tijekom najviše 96 sati. Uzorci su do transporta u laboratorij čuvani na +4 °C, a transport je učinjen uz pohranu uzoraka na +4 °C. Laboratorij u kojem je ccfDNA izolirana prije rada je steriliziran UV zračenjem, a prilikom rada korišteni su sterilni spremnici bez DNAza i sterilni nastavci za pipete s filterima. Odvajanje plazme učinjeno je unutar 6 sati od uzorkovanja u dva koraka diferencijalnoga centrifugiranja. U prvom koraku, uzorak je centrifugiran u prethodno rashlađenoj (+4 °C) centrifugi LISA (AFI, Francuska) s njihajućim rotorom (engl. *swinging bucket*) pri brzini od 1900 × g tijekom 10 min. Ako je nakon prvog centrifugiranja u uzorku bila prisutna vidljiva hemoliza, uzorak je odbijen i isključen iz daljnjih postupaka radi sigurne kontaminacije genomskom DNA zbog lize leukocita. Nakon centrifugiranja, plazma je u što većoj količini prenesena u sterilne spremnike volumena 15 mL (Corning Inc., SAD). Drugo centrifugiranje provedeno je pomoću iste rashladne centrifuge na 16000 × g tijekom 10 min, ovoga puta s rotorom koji omogućuje centrifugiranje pod stalnim kutem (engl. *fixed angle*). Alikvoti plazme su označeni i pohranjeni na -20 °C do daljnjeg izdvajanja ccfDNA, što je za sve ispitanike učinjeno unutar najviše 6 mjeseci od izdvajanja plazme. Prije izdvajanja, uzorci su odmrznuti inkubacijom na +37 °C.

## 3.2. METODE IZDVAJANJA ccfDNA

### 3.2.1. Izdvajanje ccfDNA pomoću kompleta NucleoSpin cfDNA XS Kit (metoda MN)

Kao prva metoda izdvajanja ccfDNA korišten je komercijalni komplet NucleoSpin cfDNA XS Kit (Machery Nagel, Njemačka), kojim je ccfDNA izdvojena iz alikvota plazme volumena 700  $\mu$ L prema uputama proizvođača. Komplet sadrži:

- pufer BB za lizu i vezanje (30 – 40 % gvanidin tiocijanat)
- pufer WB za ispiranje (55 – 75 % etanol)
- pufer EB za eluiranje (5 mM Tris/HCl, pH 8,5)
- proteinaza K, liofilizirana
- pufer PB za otapanje proteinaze K
- kolone NucleoSpin cfDNA XS
- sterilne sabirne epruvete volumena 2 mL

Uz komplet potrebni su sljedeći dodatni materijali i oprema:

- sterilne epruvete s poklopcem volumena 1,5 i 2 mL
- automatske pipete i nastavci s filterom različitih volumena
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka) za epruvete volumena 2 mL
- termoblok zagrijan na 37 °C (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)

Najprije je u epruvetu od 2 mL dodano 700  $\mu$ L plazme i 20  $\mu$ L otopljene proteinaze K, nakon čega je smjesa inkubirana na termobloku pri temperaturi od +37 °C tijekom 10 min. U svrhu prilagodbe uvjeta za vezanje ccfDNA na kolonu, dodano je 1050  $\mu$ L pufera BB, te je uzorak promiješan preokretanjem epruvete 3 puta, miješanjem na vrtložnoj miješalici tijekom 3 s i zatim kratko centrifugiran. Vezanje ccfDNA na kolonu NucleoSpin cfDNA XS postavljenu u sabirnu epruvetu ostvareno je pipetiranjem smjese direktno na kolonu i centrifugiranjem kolone tijekom 30 s pri 2000  $\times$  g i zatim tijekom 5 s pri 11000  $\times$  g. Slijede dva koraka ispiranja onečišćenja s kolone, prvi dodatkom 500  $\mu$ L pufera WB i centrifugiranjem tijekom 30 s pri 11000  $\times$  g, a drugi dodatkom 250  $\mu$ L pufera WB i centrifugiranjem tijekom 3 min pri 11000  $\times$  g, uz bacanje sadržaja u sabirnoj epruveti



prikupljenog nakon centrifugiranja. Konačno, ccfDNA je eluirana s kolone, postavljene u označenu sterilnu epruvetu s poklopcem volumena 1,5 mL, dodatkom 22  $\mu$ L pufera EB i centrifugiranjem tijekom 30 s pri  $11000 \times g$ . Volumen izdvojenog uzorka ccfDNA iznosio je 20  $\mu$ L, a pohranjen je na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnjih analiza.

### **3.2.2. Izdvajanje ccfDNA pomoću kompleta QIAamp ccfDNA/RNA Kit (metoda SQ)**

Kao druga metoda izdvajanja ccfDNA korišten je komercijalni komplet QIAamp ccfDNA/RNA Kit (Qiagen, Njemačka), kojim je ccfDNA izdvojena iz alikvota plazme volumena 2,0 - 3,5 mL prema uputama proizvođača. Komplet sadrži:

- kolone RNeasy Midi Spin
- sterilne epruvete volumena 15 mL
- pufer RPL
- pufer RPP
- kolone RNeasy MinElute Spin
- sterilne epruvete s poklopcem volumena 1,5 mL
- sterilne sabirne epruvete volumena 2 mL
- pufer RWT
- pufer RPE
- sterilnu vodu bez ribonukleaza (RNaza)

Uz komplet potrebni su sljedeći dodatni materijali i oprema:

- apsolutni etanol
- izopropanol
- led
- automatske pipete i nastavci s filterom različitih volumena
- sterilne epruvete volumena 2 mL
- centrifuga LISA (AFI, Francuska) s njihajućim rotorom i rotorom sa stalnim kutem
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka) za epruvete volumena 2 mL
- vrtložna miješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)

Najprije je u epruvetu od 15 mL dodano 1 – 4 mL plazme i po 300  $\mu$ L pufera RPL za svaki mL plazme. Epruveta je miješana na vrtložnoj miješalici tijekom 5 s i inkubirana tijekom 3 min na sobnoj temperaturi, čime se postignuta denaturacija proteina i liza vezikula. Potom je dodano po 100  $\mu$ L pufera RPP za svaki mL plazme. Epruveta je miješana na vrtložnoj miješalici tijekom 20 s i inkubirana tijekom 3 min na ledu, što je dovelo do stvaranja taloga proteina, nakon čega je smjesa centrifugirana tijekom 3 min pri  $12000 \times g$  u prethodno rashlađenoj (+4 °C) centrifugi s rotorom sa stalnim kutem. Supernatant (oko 1 mL po mL plazme) je prenesen u novu epruvetu prethodno ohlađenu na ledu te je ponovo centrifugiran tijekom 3 min pri  $12000 \times g$  u prethodno rashlađenoj (+4 °C) centrifugi s rotorom sa stalnim kutem. Konačni supernatant (oko 1 mL po mL plazme) je prenesen u novu epruvetu i dodan je jednak volumen ledeno hladnog izopropanola. Potom je smjesa prebačena pipetom na kolonu RNeasy Midi postavljenu u epruvetu od 15 mL i centrifugirana pomoću centrifuge s njihajućim rotorom tijekom 1 min pri  $5351 \times g$  (maksimalna brzina za korištenu centrifugu) uz bacanje sadržaja u sabirnoj epruveti nakon centrifugiranja. Zatim je na kolonu dodano 4 mL pufera RWT, kolona je centrifugirana tijekom 1 min pri  $5351 \times g$  uz bacanje sadržaja u sabirnoj epruveti nakon centrifugiranja. Zatim je na kolonu dodano 2,5 mL pufera RPE i kolona je centrifugirana tijekom 5 min pri  $5351 \times g$ . Nakon centrifugiranja sabirna epruveta sa sadržajem je bačena, a kolona je postavljena u novu sabirnu epruvetu volumena 15 mL. Nakon toga dodano je 200  $\mu$ L vode bez RNaza na sredinu kolone, kolona je inkubirana tijekom 1 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana tijekom 1 min pri  $5351 \times g$  kako bi se ccfDNA eluirala.

Daljnji koraci uključuju centrifugiranje na centrifugi MiniSpin. U prethodni eluat je dodano 200  $\mu$ L pufera RPL, zatim 800  $\mu$ L etanola te je uzorak promiješan na vrtložnoj miješalici. Potom je 700  $\mu$ L smjese preneseno na kolonu RNeasy MinElute postavljenu u sabirnu epruvetu volumena 2 mL, kolona je centrifugirana tijekom 30 s pri 10800 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm), a nakon toga je postupak ponovljen s ostatkom smjese, uz bacanje sadržaja u sabirnoj epruveti nakon centrifugiranja. Nadalje, na kolonu je dodano 500  $\mu$ L pufera RPE, kolona je centrifugirana tijekom 30 s pri 10800 rpm te ponovno tijekom 30 s pri 13400 rpm (maksimalna brzina za korištenu centrifugu). Kolona je prebačena u novu označenu epruvetu s poklopcem volumena 1,5 mL, na kolonu je dodano 22  $\mu$ L vode bez RNaza, kolona je inkubirana tijekom 1 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana tijekom 1 min pri 13400 rpm. Volumen izdvojenog uzorka ccfDNA iznosio je 20  $\mu$ L, a pohranjen je na -20 °C do daljnjih analiza.

### 3.2.3. Izdvajanje ccfDNA pomoću kompleta QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (metoda VQ)

Kao treća metoda izdvajanja ccfDNA korišten je komercijalni komplet QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Njemačka) uz pomoć vakuumske sustava QIAvac (Qiagen, Njemačka), kojim je ccfDNA izdvojena iz alikvota plazme volumena 2,0 – 3,5 mL prema uputama proizvođača. Komplet sadrži:

- pufer ACL za lizu
- pufer ACB za vezanje na kolonu
- pufer ACW1 za ispiranje
- pufer ACW2 za ispiranje
- pufer AVE za eluiranje
- proteinaza K
- nastavke za kolonu Tube Extenders volumena 20 mL
- spojnice za vakuum VacConnectors
- kolone QIAamp Mini
- sterilne sabirne epruvete volumena 2 mL
- sterilne epruvete s poklopcem volumena 1,5 mL
- RNA nosač (engl. *carrier RNA*), liofiliziran, prije korištena otopljen u 1550 µL pufera AVE

Uz komplet potrebni su sljedeći dodatni materijali i oprema:

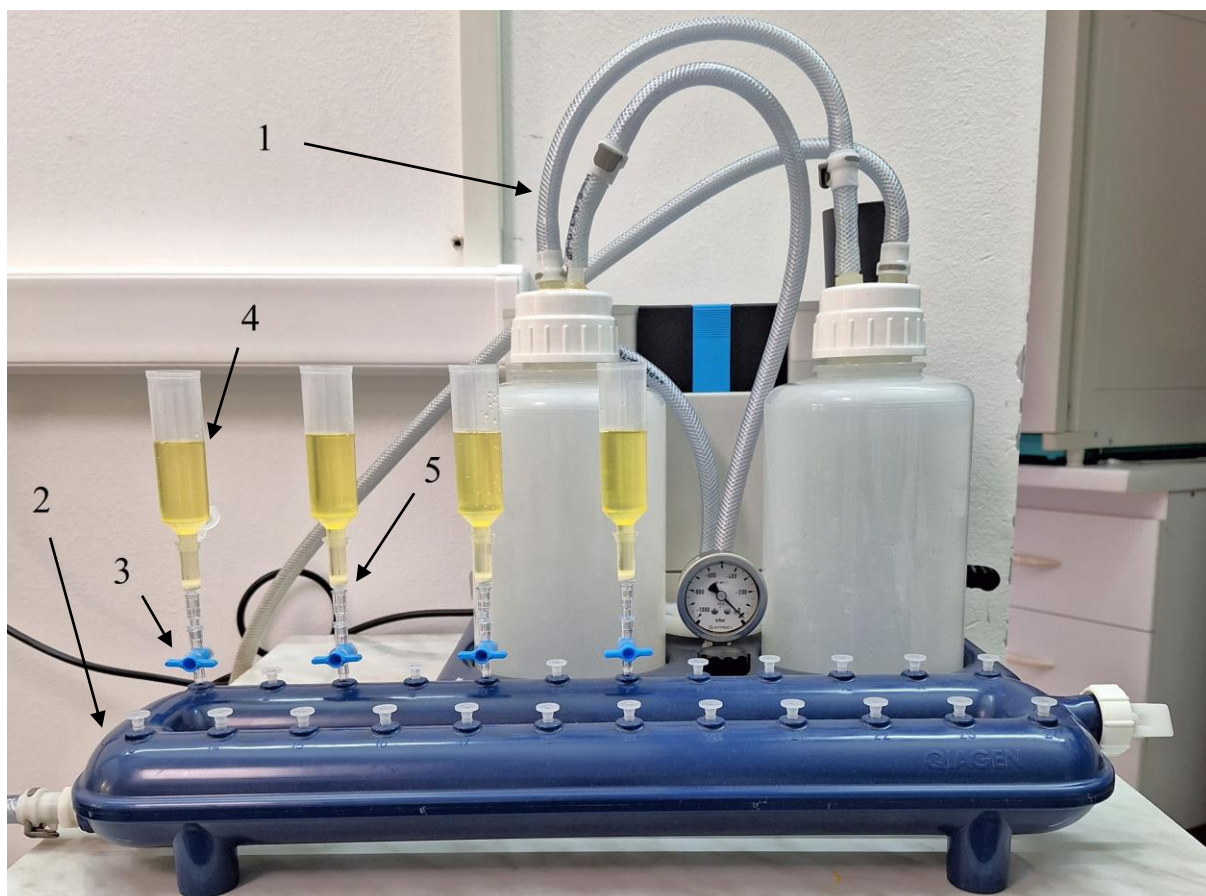
- automatske pipete i nastavci s filterom različitih volumena
- fosfatni pufer (PBS)
- termoblok zagrijan na 60 °C za epruvete volumena 50 mL (Eppendorf, Njemačka)
- termoblok zagrijan na 56 °C za epruvete volumena 2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne epruvete volumena 50 mL
- apsolutni etanol
- izopropanol
- led

- vakuumski sustav QIAvac, koji se sastoji od vakumske pumpe i vakuumskoga priključka
- centrifuga EBA 12R (Hettich, Njemačka)
- vrtložna miješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)

Prije samog postupka izdvajanja, za svaki uzorak pripremljena je smjesa od 5,63  $\mu$ L RNA nosača i pufera ACL (1,76 mL za 2 mL plazme / 2,64 mL za 3 mL plazme / 3,52 mL za 4 mL plazme). Uloga RNA nosača je pospješivanje vezanja nukleinskih kiselina na kolonu. Nakon uklanjanja krioprecipitata iz pohranjenog alikvota plazme centrifugiranjem pri +4 °C tijekom 5 min i brzini 3000  $\times$  g, uzet je što veći volumen supernatanta u epruvetu od 50 mL i po potrebi korigiran do punog mL dodatkom pufera PBS. Korigirani volumeni plazme za sve uzorke iznosili su 2, 3 ili 4 mL, o čemu je ovisio daljnji volumen korištenih materijala. Dodano je 200/300/400  $\mu$ L proteinaze K, potom 1,6/2,4/3,2 mL smjese RNA nosača i pufera ACL, nakon čega je smjesa miješana na vrtložnoj miješalici tijekom 30 s i inkubirana tijekom 30 min na termobloku zagrijanom na +60 °C. Zatim je dodano 3,6/5,4/7,2 mL pufera ACB, uzorak je promiješan na vrtložnoj miješalici tijekom 30 s i inkubiran tijekom 5 min na ledu.

Za vrijeme inkubacije postavljena je kolona QIAamp Mini na spojnik za vakuum VacConnector na vakuumskom priključku QIAvac, a na otvorene kolone su postavljeni nastavci za kolonu Tube Extenders (Slika 4.). Nakon inkubacije, lizat je prebačen na pripremljen sustav s kolonom, vakuumska pumpa je upaljena te su prilagođeni uvjeti tlaka od 800 – 900 mbar. Zatim je otvoren ventil sustava kako bi pomoću vakuuma sav sadržaj prošao kroz kolonu nakon čega je ventil zatvoren. Potom su, uz isto postupanje s vakuumskom pumpom, dodani redom: 600  $\mu$ L pufera ACW1, 750  $\mu$ L pufera ACW2 i 750  $\mu$ L apsolutnog etanola.

Kolona je potom prebačena u sterilnu sabirnu epruvetu volumena 2 mL, centrifugirana tijekom 3 min pri 20000  $\times$  g, inkubirana tijekom 10 min na termobloku zagrijanom na +56 °C radi sušenja kolone i na kraju postavljena u sterilnu epruvetu s poklopcem od 1,5 mL. Na kolonu je dodano 55  $\mu$ L pufera AVE na sredinu kolone i kolona je inkubirana tijekom 3 min na sobnoj temperaturi. Konačno, kolona je centrifugirana tijekom 2 min pri 20000  $\times$  g, čime je ccfDNA eluirana s kolone. Volumen izdvojenog uzorka ccfDNA iznosio je 50  $\mu$ L, a pohranjen je na -20 °C do daljnjih analiza.



Slika 4. Sustav QIAvac s postavljenom kolonom QIAamp Mini preko spojnika za vakuum VacConnector i na kojoj se nalazi nastavak za kolonu Tube Extenders u kojoj se nalazi lizat. 1 – vakuumska pumpa, 2 – spojnik za vakuum, 3 – ventil, 4 – nastavak za kolonu, 5 – kolona.

### 3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZDVOJENE ccfDNA

Koncentracije ccfDNA izdvojene svim metodama određene su fluorimetrijskom metodom. Metoda se temelji na mjerenju signala fluorescentne boje koja s visokom selektivnošću veže dvolančanu DNA. Korišten je komplet reagensija Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, SAD) prema uputama proizvođača, a koji sadrži:

- otopinu fluorescentne boje (komponenta A)
- pufer (komponenta B)
- standard #1 (komponenta C)
- standard #2 (komponenta D)

Potrebni su sljedeći dodatni materijali i oprema:

- mikrovolumni spektrofotometar s fluorimetrijskim modulom DS-11 Fx (DeNovix, SAD)
- automatske pipete i sterilni nastavci s filterom različitih volumena
- sterilne epruvete Qubit Assay volumena 0,5 mL
- vrtložna miješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka) s nastavcima za epruvete volumena 2 mL

Najprije je pripremljena radna otopina razrjeđivanjem otopine fluorescentne boje s puferom u omjeru 1:200, pri čemu količine pojedinih komponenti ovise o broju uzoraka. U označene sterilne epruvete Qubit Assay volumena 0,5 mL dodano je 190  $\mu\text{L}$  radne otopine i 10  $\mu\text{L}$  Qubit dsDNA HS standarda, odnosno, 199  $\mu\text{L}$  radne otopine i 1  $\mu\text{L}$  uzorka. Pripremljene smjese su potom promiješane na vrtložnoj miješalici tijekom 5 s, spuštene na dno epruvete kratkim centrifugiranjem i inkubirane tijekom 2 min na sobnoj temperaturi. Prije analize uzoraka, na mikrovolumni spektrofotometar s fluorimetrijskim modulom postavljeni su standardi kako bi se izradila kalibracijska krivulja. Uzorci su zatim serijski analizirani na uređaju nakon odabira volumena dodanoga originalnoga uzorka (1  $\mu\text{L}$ ) i željene mjerne jedinice ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Rezultati dobiveni fluorimetrijskim mjerenjem koncentracije ccfDNA u izolatima unesene su u tablicu u programu Excel (Microsoft Corporation, SAD), gdje je koncentracija ccfDNA u plazmi ( $\text{ng}/\text{mL}$ ) izračunata prema formuli:

$$\text{Koncentracija ccfDNA u plazmi } \left( \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{koncentracija u izolatu dobivena flurometrijskim mjerenjem } \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right) \times \text{volumen izolata } (\mu\text{L})}{\text{početni volumen plazme korišten za izdvajanje } (\text{mL})}$$

### 3.4. PROCJENA KVALITETE IZDVOJENE ccfDNA

Procjena kvalitete izdvojene ccfDNA učinjena je automatiziranom mikrovolumnom gel-elektroforezom u kapilari na čipu visoke osjetljivosti, uz pridržavanje uputa proizvođača. Princip ove metode je razdvajanje fragmenata DNA, koji su u uzorku prisutni u niskoj koncentraciji, na temelju razlika u pokretljivosti u električnom polju zbog razlika u duljini fragmenata (bp). Primjena elektroforeze u kapilari u čipu omogućuje korištenje izrazito malih

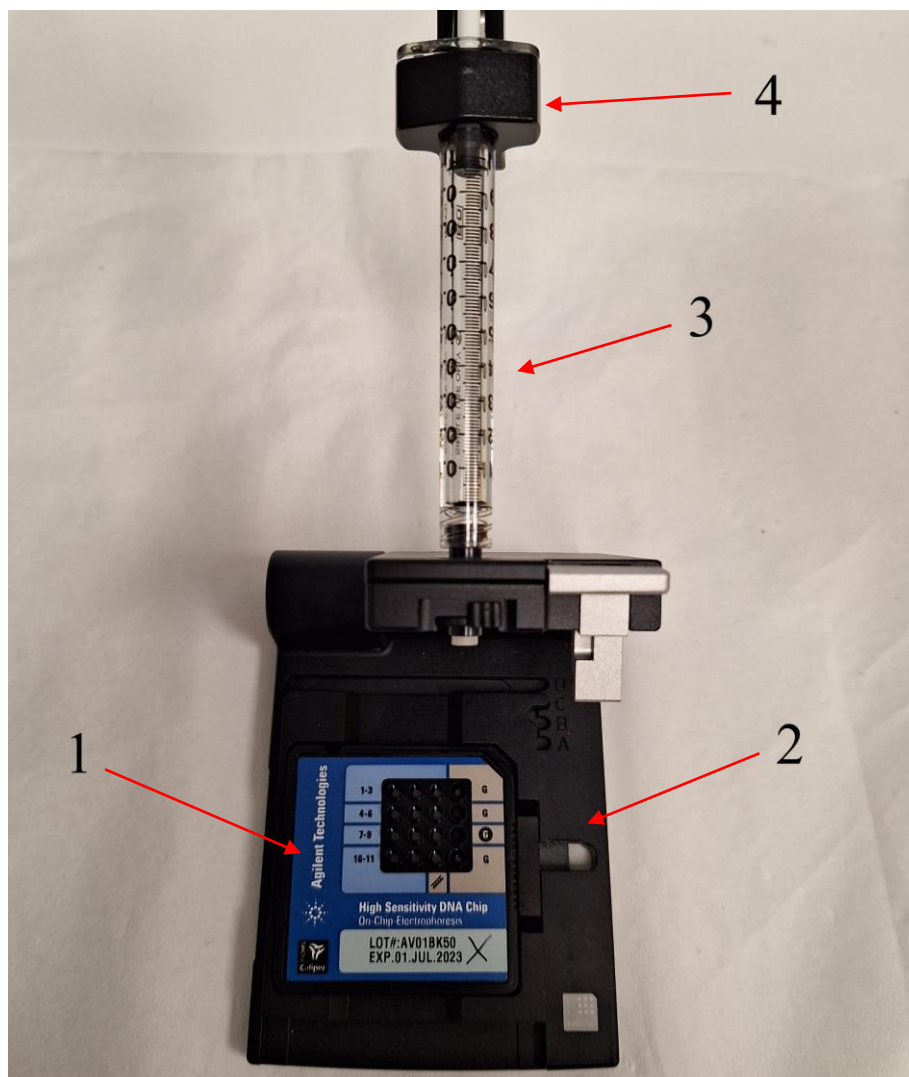
volumena uzorka, kao i brzo i učinkovito odvajanje fragmenata uz veliku osjetljivost. U kompletu High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, SAD) su sadržani:

- standard duljina, služi za utvrđivanje duljine fragmenata
- donji i gornji marker, služi za poravnanje signala standarda i uzoraka
- koncentrat fluorescentne boje
- gel za elektroforezu
- filteri za pročišćavanje pripremljene smjese gela i fluorescentne boje
- čipovi za provođenje elektroforeze
- čistač elektroda

Potrebni su sljedeći dodatni materijali i oprema:

- uređaj za automatiziranu mikrovolumnu gel-elektroforezu u kapilari na čipu Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, SAD) s računalom i pripadajućim računalnim programom
- aparatura za nanošenje uzorka na čip koja se sastoji od nosača čipa, šprice i držača klipa šprice
- automatske pipete i nastavci s filterom različitih volumena
- sterilne epruvete volumena 2 mL
- sterilna voda bez DNaza i RNaza
- vrtložna miješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka) s nastavcima za epruvete volumena 2 mL

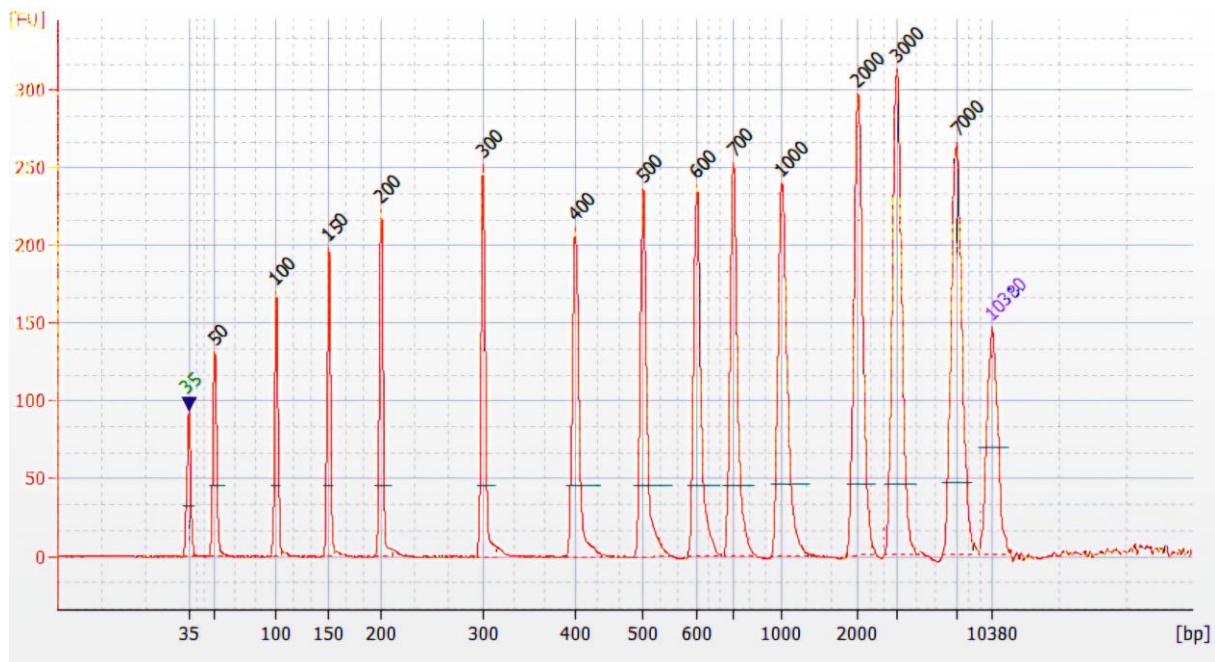
Prije analize, uređaj za automatiziranu mikrovolumnu gel-elektroforezu u kapilari na čipu ispran je pipetiranjem 350  $\mu$ L sterilne vode bez RNaza i DNaza u bilo koju jažicu čistača elektroda i postavljanjem čistača elektroda na uređaj za automatiziranu mikrovolumnu gel-elektroforezu tijekom 5 min. Sve reagencije prije analize inkubirane su tijekom 30 min na sobnoj temperaturi. Prvo je pripremljena mješavina gela i fluorescentne boje dodavanjem 15  $\mu$ L fluorescentne boje u spremnik s gelom, miješanjem na vrtložnoj miješalici i kratkim centrifugiranjem. Smjesa je zatim prenesena u filter postavljen u novu sterilnu epruvetu s poklopcem volumena 2 mL i centrifugirana tijekom 15 min pri 2240  $\times$  g.



Slika 5. Aparatura za nanošenje uzoraka na čip. 1 – čip, 2 – nosač čipa, 3 – šprica, 4 – držač klipa šprice.

Novi čip postavljen je u aparaturu za nanošenje uzoraka (Slika 5.), gdje se redom u predviđene jažice dodaju mješavina gela i boje, marker, standard duljina i uzorci. Važno je marker pipetirati u sve jažice koje će sadržavati standard duljina i uzorke. U jednoj seriji moguća je analiza najviše 11 uzoraka. Čip je nakon pripreme promiješan na vrtložnoj miješalici tijekom 1 min i unutar 5 min postavljen na uređaj za automatiziranu mikrovolumnu gel-elektroforezu u kapilari na čipu. Po završetku analize, rezultati su prikazani na računalu u pripadajućem računalnom programu u grafičkom obliku, kao ovisnost zabilježene fluorescencije, koja upućuju na relativnu koncentraciju ccfDNA u uzorku, o duljini fragmenata dvolančane DNA (Slika 6.).





Slika 6. Primjer rezultata automatizirane mikrovolumne gel-elektroforeze u kapilari na čipu na uređaju Bioanalyzer 2100 za standard veličina. Rezultati su omeđeni gornjim (35 bp) i donjim markerom (10380 bp). bp – bazni par, FU – relativna fluorescencija.

### 3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza podataka načinjena je u statističkom programu MedCalc, verzija 23.0.6. (MedCalc Software Ltd., Belgija), u kojem je određena deskriptivna statistika za svaku od metoda izdvajanja, testirana normalnost razdiobe i provedena usporedba rezultata koncentracija ccfDNA dobivena različitim metodama. Normalnost razdiobe testirana je Shapiro-Wilkovim testom, a ovisno o dobivenom rezultatu, dobivene količine ccfDNA su prikazane kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija ili kao medijan (raspon). Za ispitivanje statistički značajne razlika u količini ccfDNA izdvojene različitim metodama korišten je test ANOVA ponovljenih mjerenja ili Friedmanov test, ovisno o dobivenom rezultatu testiranja normalnosti razdiobe. Postavljena je i testirana nulta hipoteza, kojom se tvrdi da ne postoji statistički značajna razlika između niti jedne od kombinacija triju metoda. P-vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZDVOJENE ccfDNA

Nakon izdvajanja, koncentracije ccfDNA u svim izolatima određene su fluorimetrijskim mjerenjem, a rezultati su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Koncentracije ccfDNA za pojedinačne izolate i svaku metodu izdvajanja dobivene fluorimetrijskim mjerenjem.

Broj uzorka	MN		SQ		VQ	
	Volumen izolata = 20 $\mu$ L		Volumen izolata = 20 $\mu$ L		Volumen izolata = 50 $\mu$ L	
	Početni volumen plazme (mL)	Izmjerena koncentracija ccfDNA (ng/ $\mu$ L)	Početni volumen plazme (mL)	Izmjerena koncentracija ccfDNA (ng/ $\mu$ L)	Početni volumen plazme (mL)	Izmjerena koncentracija ccfDNA (ng/ $\mu$ L)
1	0,70	0,102	2,20	0,194	2,20	0,566
2	0,70	0,015	2,00	0,820	2,00	0,577
3	0,70	0,004	2,15	0,162	2,15	0,449
4	0,70	0,035	2,00	0,343	2,00	0,372
5	0,70	0,251	2,70	2,100	2,70	4,250
6	0,70	0,014	3,40	0,344	3,40	0,832
7	0,70	0,008	3,00	0,074	3,00	0,448
8	0,70	0,021	2,20	0,133	2,40	0,607
9	0,70	0,000	3,50	0,315	3,50	0,681
10	0,70	0,031	3,20	0,203	3,20	0,645
11	0,70	0,031	2,90	0,457	2,90	1,380

### 4.2. USPOREDBA KONCENTRACIJA IZDVOJENE ccfDNA

S obzirom da se metode i uzorci razlikuju u početnim volumenima plazme i konačnim volumenima izolata, rezultati mjerenja najprije su preračunati u količine izdvojene ccfDNA po mL plazme kako bi se mogli usporediti. Prilikom utvrđivanja normalnosti razdiobe Shapiro-Wilkovim testom, utvrđeno je da rezultati nisu razdijeljeni po normalnoj razdiobi (P

< 0,001), stoga su izraženi kao medijan (raspon). U Tablici 4. prikazane su količine izdvojene ccfDNA po mL plazme te medijan i raspon za svaku metodu.

Tablica 4. Izračun koncentracije ccfDNA u plazmi ispitanika.

Broj uzorka	Koncentracija ccfDNA u plazmi (ng/mL)		
	MN	SQ	VQ
1	2,914	1,764	12,864
2	0,429	8,200	14,425
3	0,114	1,507	10,442
4	1,000	3,430	9,300
5	7,171	15,556	78,704
6	0,400	2,024	12,235
7	0,229	0,493	7,467
8	0,600	1,209	12,646
9	0,000	1,800	9,729
10	0,886	1,269	10,078
11	0,886	3,152	23,793
<b>Medijan (raspon)</b>	<b>0,600 (0,000 - 7,171)</b>	<b>1,800 (0,493 – 15,556)</b>	<b>12,235 (7,467 – 78,704)</b>

Za usporedbu koncentracija ccfDNA odabran je Friedmanov test, koji se koristi za uspoređivanje triju ili više zavisnih skupina, a čije vrijednosti nisu razdijeljene po normalnoj razdiobi. Provedbom statističkog testa odbačena je nulta hipoteza i prihvaćena alternativna hipoteza, odnosno određeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentracijama ccfDNA dobivenim različitim metodama izdvajanja ( $P < 0,001$ ). Zaključeno je da su najveće koncentracije ccfDNA u plazmi dobivene korištenjem metode s vakuum-kolonom QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (VQ), zatim korištenjem metode sa spin-kolonom QIAamp ccfDNA/RNA Kit (SQ), a najniže koncentracije dobivene su metodom sa spin-kolonom NucleoSpin cfDNA XS Kit (MN).

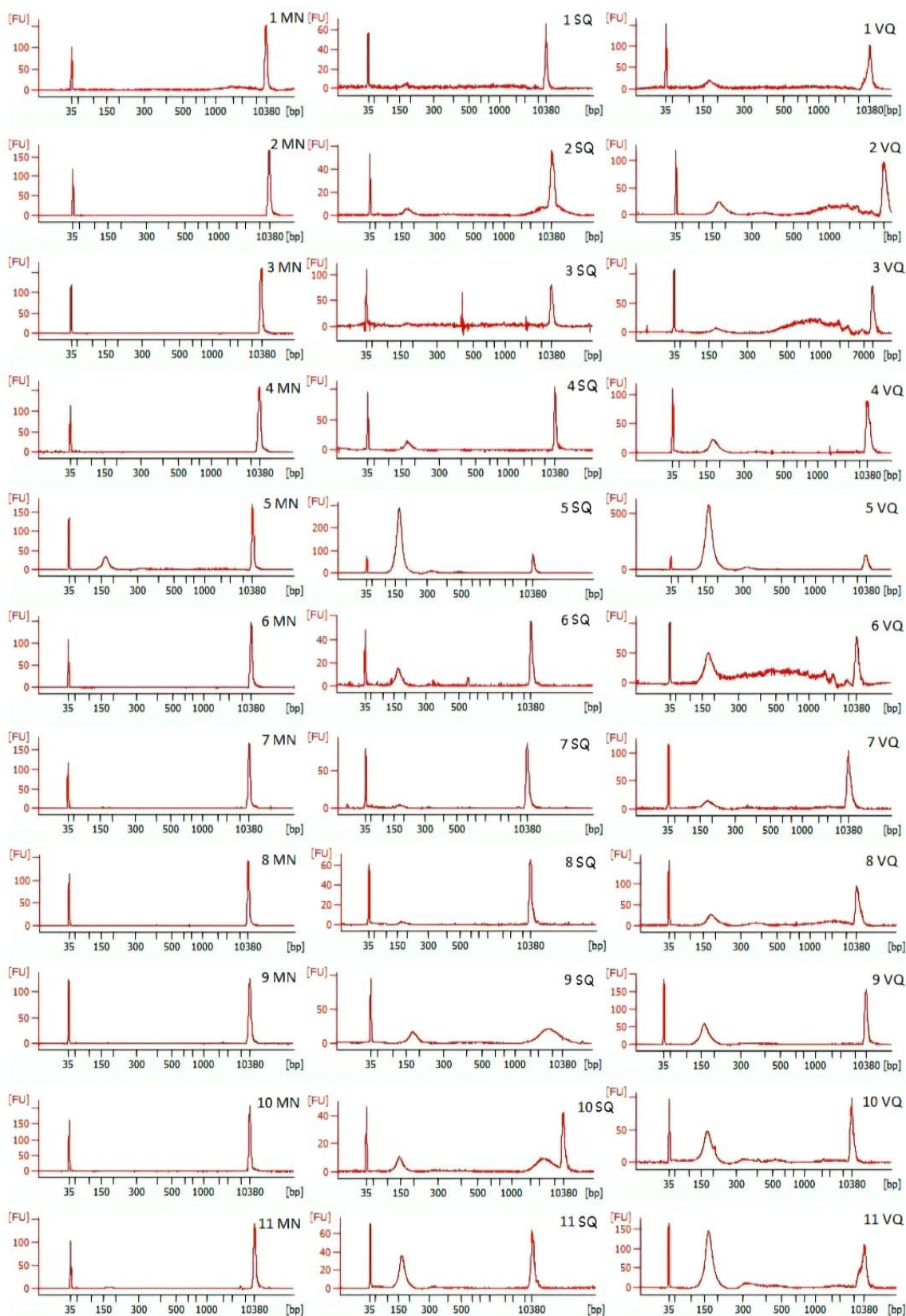
### 4.3. PROCJENA KVALITETE IZDVOJENE ccfDNA

Procjena kvalitete izdvojene ccfDNA odnosi se na detekciju fragmenata čija duljina odgovara očekivanoj duljini ccfDNA u uzorku i procjenu kontaminacije genomskom DNA, a što je određeno metodom automatizirane mikrovolumne gel-elektroforeze u kapilari na čipu. Fragmenti koji odgovaraju ccfDNA pronađeni su u svih 11 uzoraka izdvojenih metodom VQ (vakuum-kolona QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit), 9 uzoraka izdvojenih metodom SQ (spin-kolona QIAamp ccfDNA/RNA Kit) i 2 uzorka izdvojenih metodom MN (spin-kolona NucleoSpin cfDNA XS Kit).

Na elektroferogramima prikazanima na Slici 7. mogu se uočiti fragmenti ccfDNA koji odgovaraju mononukleosomima duljine 146 – 190 bp, s prosječnom duljinom oko 171 bp. Osim toga, na elektroferogramima četiri uzorka metode VQ i dva uzorka metode SQ prikazuju se i fragmenti koji odgovaraju dinukleosomima duljine 316 –374 bp, s prosječnom duljinom oko 331 bp, otprilike dvostruko većoj od duljine mononukleosoma. Signali koji odgovaraju kontaminaciji visokomolekularnom DNA nalaze se na znatno većim duljinama fragmenata. Duljine detektiranih fragmenata prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. Duljine fragmenata ccfDNA za pojedinačne izolate i svaku metodu izdvajanja.

Uzorak	Duljine fragmenata DNA		
	MN	SQ	VQ
1	nema	nema	174
2	nema	179	172
3	nema	nema	178
4	nema	172	173
5	165	167 i 317	164 i 322
6	nema	168	170
7	nema	175	183
8	nema	170	181 i 374
9	nema	190	162
10	nema	146	174 i 329
11	163	166 i 329	163 i 316



Slika 7. Elektroferogrami svih uzoraka izdvojenih metodom MN (NucleoSpin cfDNA XS Kit), SQ (QIAamp ccfDNA/RNA Kit i VQ (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit). bp – bazni par, FU – relativna fluorescencija.

## 5. RASPRAVA

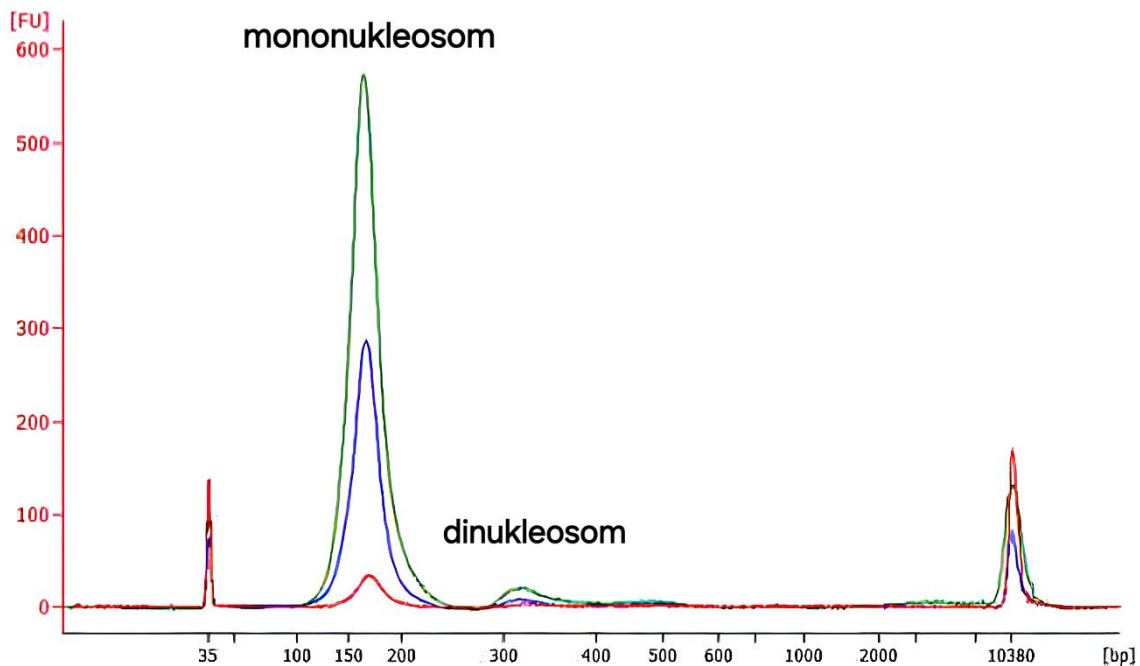
CRC izrazito je kompleksna i heterogena bolest, s brojnim izazovima dijagnostike i liječenja, zbog čega se intenzivno traga za novim biljezima bolesti, dok se metode tekuće biopsije sve više nameću kao jednostavni i učinkoviti alati u području kliničke onkologije. Analiza ccfDNA obećavajući je biljeg u dijagnostici, praćenju i prognozi CRC-a, budući da je dokazano da je u odnosu na zdrave osobe koncentracija ccfDNA u pacijenata s tumorskim bolestima viša, fragmenti su kraći, a molekularnom analizom mogu se utvrditi specifične genske i epigenske promjene (Stejskal i sur., 2023). S obzirom na veliki potencijal ccfDNA, izrazito je važno optimirati predanalitičke, analitičke i poslijeanalitičke postupke, što će pridonijeti uvođenju tekuće biopsije u kliničku praksu, zbog čega je cilj ovoga rada bio usporediti tri komercijalno dostupna kompleta za izdvajanje ccfDNA radi odabira optimalne metode izdvajanja za dobivanje kvalitetnog izolata koji se može koristiti za daljnje analize.

Na tržištu je dostupan veliki broj kompleta za izdvajanje ccfDNA, a razlikuju se po principu i učinkovitosti izdvajanja, čistoći izdvojene ccfDNA, selektivnošću za fragmente manjih duljina, reproducibilnosti, mogućnosti automatizacije i cijeni, što se sve uzima u obzir prilikom odabira zbog čega je teško pronaći i odabrati prikladnu metodu (Peng i sur., 2024). U ovom radu uspoređivani su komercijalno dostupni kompleti NucleoSpin cfDNA XS Kit (Machery Nagel, Njemačka), QIAamp ccfDNA/RNA Kit (Qiagen, Njemačka) i QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Njemačka). Najveće koncentracije ccfDNA dobivene su u izolatima izdvojenim metodom QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, dok su najmanje koncentracije ccfDNA dobivene u izolatima izdvojenim metodom NucleoSpin cfDNA XS Kit, za koju u jednom uzorku fluorimetrijskim mjerenjem koncentracije uopće nije detektirana prisutnost ccfDNA. Polatoglou i sur. (2022) u svojoj su usporedbi koristili ove dvije metode, pri čemu je donesen isti zaključak. Pregledom relevantne literature može se zaključiti da QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit dosljedno ima najveće prinose ccfDNA u odnosu na druge metode (Wang i sur., 2020; Devonshire i sur., 2018; Sorber i sur., 2017), što se može pripisati uvođenju vakuum-kolone u postupak izdvajanja, što omogućuje korištenje većih volumena plazme (Lee i sur., 2018), a prinosi su potencijalno povećani i zbog dodatka RNA nosača (Warton i sur., 2018). Ungerer i sur. (2020) meta-analizom 20 prethodno objavljenih studija zaključili su da QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit ima izvrsnu učinkovitost izdvajanja ccfDNA. Općenito, kompleti proizvođača Qiagen danas su najčešće korišteni zbog visoke stabilnosti kompleta i učinkovitosti izdvajanja (Peng i sur., 2024), a iz tih razloga ih se



u znanstvenoj zajednici danas čak smatra i zlatnim standardom (Warton i sur., 2018; Diefenbach i sur., 2018).

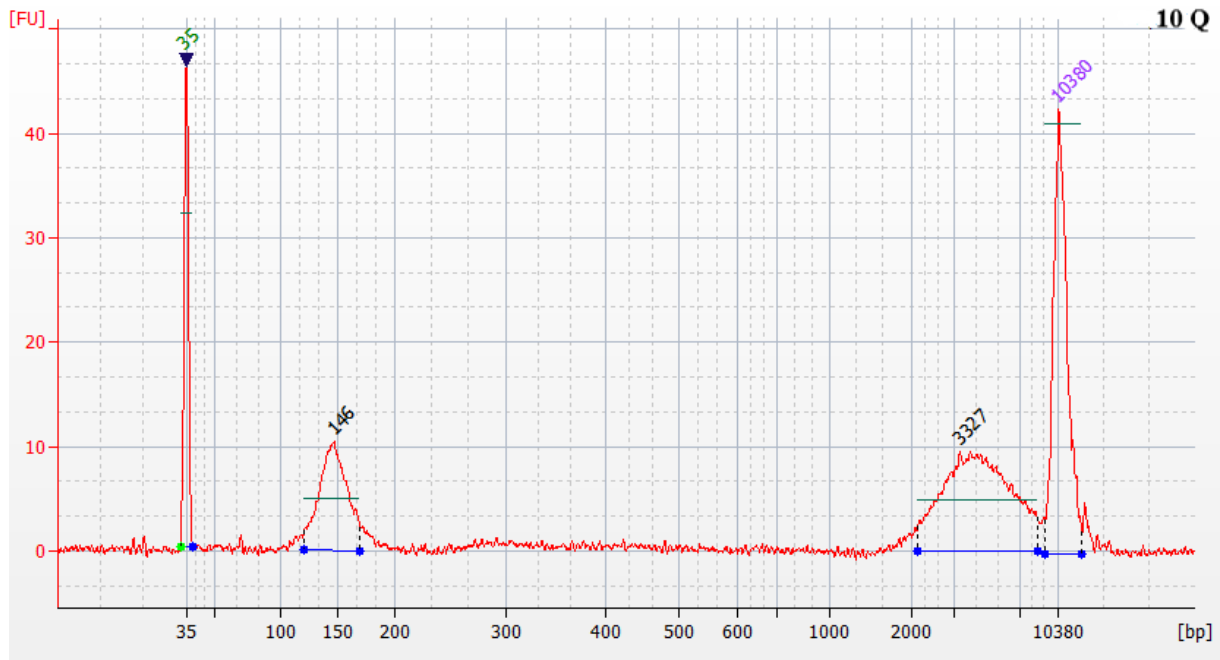
Osim na temelju koncentracija, metode su u ovom radu uspoređivane i prema kvaliteti izdvojene ccfDNA elektroforetskom analizom fragmenata. Na Slici 8. prikazan je rezultat analize fragmenata za uzorak broj 5, kojem je u svim ispitivanim metodama izmjerena najviša koncentracija ccfDNA. Osim donjeg (35 bp) i gornjeg markera (10380 bp), na elektroferogramu se uočava vršak koji odgovara mononukleosomu (~165 bp) i drugi vršak koji odgovara dinukleosomu (~320 bp). Ponovno, metoda QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit pokazala se optimalnom jer su u svim uzorcima detektirani najviši vršci koji odgovaraju ccfDNA, a u četiri uzorka dodatno je detektiran vršak dinukleosoma.



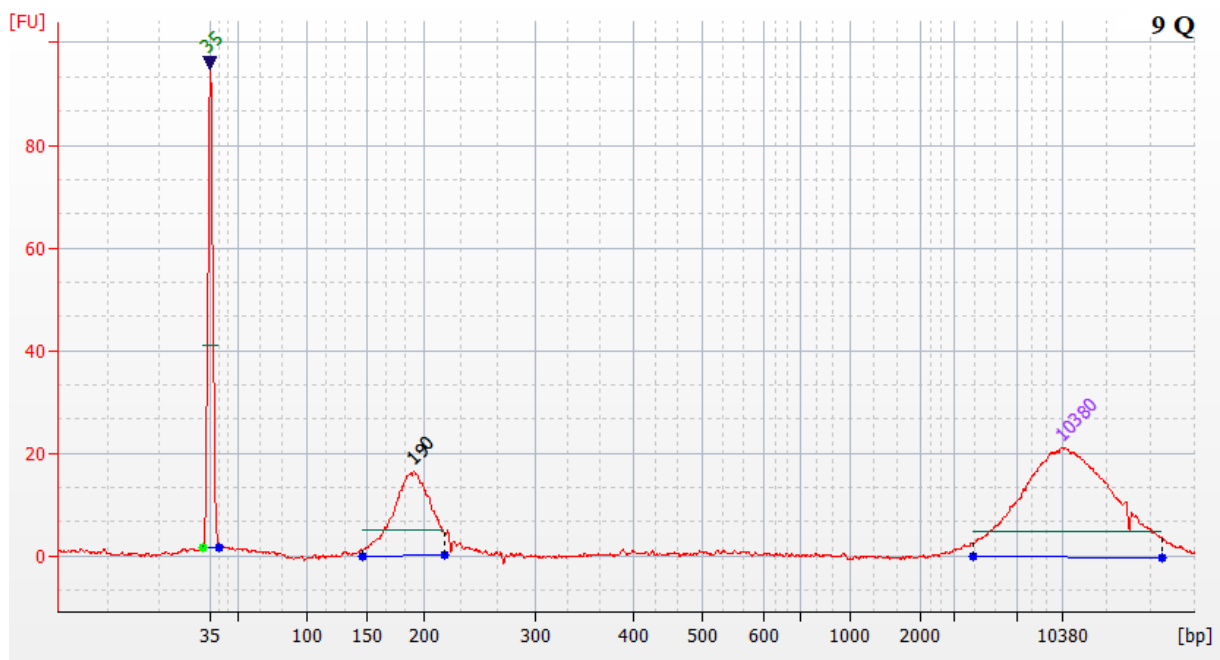
Slika 8. Prikaz rezultata analize fragmenata uzorka broj 5 za sve tri korištene metode. Crvenom bojom prikazan je elektroferogram koji odgovara metodi NucleoSpin cfDNA XS Kit, plavom bojom metodi QIAamp ccfDNA/RNA Kit, a zelenom bojom metodi QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit. bp – bazni par, FU – relativna fluorescencija.

Analizom fragmenata može se utvrditi i zagađenje visokomolekularnom DNA uzrokovano lizom leukocita. Sumnja na zagađenje postavljena je za dva izolata izdvojena metodom QIAamp ccfDNA/RNA Kit. Primjer izolata broj 10 prikazan je na Slici 9., gdje je vidljivo da je kontaminacija visokomolekularnom DNA karakterizirana prisutnošću dodatnog vrška koji odgovara DNA velike molekularne mase, u ovom slučaju više od 3000 bp. Osim

toga, analizom fragmenata izolata broj 9 iste metode, uočen je razvučen i nizak vršak gornjeg markera (prikazano na Slici 10.), što prema navodima proizvođača može biti posljedica kontaminacije solima, etanolom ili restrikcijskim enzimima koji nisu uspješno uklonjeni prilikom izdvajanja ccfDNA.



Slika 9. Prikaz elektroferograma izolata 10 izdvojenog metodom QIAamp ccfDNA/RNA Kit. Zagađenje visokomolekularnom DNA prikazuje se kao široki vršak na prosječnoj duljini od 3327 bp. bp – bazni par, FU – relativna fluorescencija.



Slika 10. Prikaz elektroferograma izolata 9 izdvojenog metodom QIAamp ccfDNA/RNA Kit sa sumnjivim izgledom gornjeg markera. bp – bazni par, FU – relativna fluorescencija.



Uzimajući u obzir dobivene rezultate i podatke iz literature, razvidno je kako je QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit najuspješnija od uspoređivanih metoda, s obzirom da su ovom metodom izdvojene najveće količine ccfDNA te su analizom fragmenata u svim uzorcima utvrđeni vršci koji odgovaraju ccfDNA, bez zagađenja s DNA visoke molekularne mase. Stoga je opravdano odabrati ovu metodu izdvajanja za daljnju obradu uzoraka tekuće biopsije pacijenata s kolorektalnim adenomom. Rezultati ovoga rada pridonose standardizaciji i optimizaciji predanalitičkih protokola tekuće biopsije prije mogućnosti rutinske upotrebe.

## 6. ZAKLJUČAK

Usporedbom triju metoda izdvajanja ccfDNA s ciljem pronalaska metode s najvećim prinosom i kvalitetom ccfDNA zaključeno je sljedeće:

- medijan dobivenih koncentracija za metodu NucleoSpin cfDNA XS Kit iznosi 0,600 ng/mL s rasponom 0,000 – 7,171 ng/mL, za metodu QIAamp ccfDNA/RNA Kit 1,800 ng/mL s rasponom 0,493 – 15,556 ng/mL, a za metodu QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 12,235 ng/mL s rasponom 7,467 – 78,704 ng/mL,
- usporedbom rezultata koncentracija ccfDNA izdvojene trima metodama pokazano je da postoji statistički značajna razlika ( $P < 0,001$ ) između dobivenih koncentracija, te je zaključeno da su najveće koncentracije dobivene metodom QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, zatim metodom QIAamp ccfDNA/RNA Kit, a najniže koncentracije dobivene su metodom NucleoSpin cfDNA XS Kit,
- uporabom automatizirane mikrovolumne gel-elektroforeze u kapilari na čipu pronađeni su fragmenti DNA koji odgovaraju izdvojenoj ccfDNA u svih 11 izolata izdvojenih metodom QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, 9 izolata izdvojenih metodom QIAamp ccfDNA/RNA Kit i samo 2 izolata izdvojena metodom NucleoSpin cfDNA XS Kit,
- pronađeni fragmenti odgovaraju mononukleosomima i duljine su 146 – 190 bp, a dodatno su pronađeni fragmenti koji odgovaraju dinukleosomima duljine 316 – 374 bp u 4 izolata izdvojena metodom QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit i 2 izolata izdvojena metodom QIAamp ccfDNA/RNA Kit,
- iz dobivenih rezultata zaključuje se da je u usporedbi s drugim ispitivanim metodama, QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit najprikladnija metoda izdvajanja ccfDNA za daljnju primjenu, s obzirom na najveće koncentracije izdvojene ccfDNA, prisutnost fragmenata ccfDNA u svim uzorcima i odsutnost zagađenja s DNA velike molekularne mase.

## 7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

bp – bazni par

ccfDNA – slobodna cirkulirajuća DNA (engl. *circulating cell-free DNA*)

CEA – karcinoembrionalni antigen (engl. *carcinoembryonic antigen*)

CRC – kolorektalni karcinom

CTC – cirkulirajuća tumorska stanica (engl. *circulating tumor cell*)

ctDNA – cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *circulating tumor DNA*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

DNaza – deoksiribonukleaza

FU – relativna fluorescencija (engl. *fluorescence units*)

MN – komplet NucleoSpin cfDNA XS Kit

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*)

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate-buffered saline*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RNaza – ribonukleaza

rpm – broj okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*)

SQ – komplet QIAamp ccfDNA/RNA Kit

VQ – komplet QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit

Wnt – engl. *Wingless-related integration site*

## 8. LITERATURA

Brkić T, Grgić M. Kolorektalni karcinom. *Colorectal Carcinoma Medicus*, 2006, 15, 89–97.

Daly JM, Xu Y, Levy BT. Which Fecal Immunochemical Test Should I Choose?. *J Prim Care Community Health*, 2017, 8, 264–277.

Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, Huggett JF. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406, 6499–6512.

Diefenbach RJ, Lee JH, Kefford RF, Rizos H. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. *Cancer Genet*, 2018, 228–229, 21–27.

Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj, 2022., <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj/>, pristupljeno 15. 9. 2024.

Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin Chem*, 2015, 61, 112–123.

Ho H-Y, Chung K-S (Kasey), Kan C-M, Wong S-C (Cesar). Liquid Biopsy in the Clinical Management of Cancers. *Int J Mol Sci*, 2024, 25, 8594.

Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, Lim YC, Kibria KMK, Mohiuddin AKM, Ming LC, Goh KW, Hadi MA. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*, 2022, 14, 1732.

Kurma K, Eslami-S Z, Alix-Panabières C, Cayrefourcq L. Liquid biopsy: paving a new avenue for cancer research. *Cell Adh Migr*, 2024, 18, 1–26.

Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free

DNA. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20, 1057–1067.

Lakemeyer L, Sander S, Wittau M, Henne-Bruns D, Kornmann M, Lemke J. Diagnostic and Prognostic Value of CEA and CA19-9 in Colorectal Cancer. *Diseases*, 2021, 9, 21.

Lee H, Na W, Park C, Park KH, Shin S. Centrifugation-free extraction of circulating nucleic acids using immiscible liquid under vacuum pressure. *Sci Rep*, 2018, 8, 5467.

Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin Chem*, 2019, 65, 623–633.

Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2020, 158, 291–302.

Niedermaier T, Balavarca Y, Brenner H. Stage-Specific Sensitivity of Fecal Immunochemical Tests for Detecting Colorectal Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*, 2020, 115, 56–69.

Peng H, Pan M, Zhou Z, Chen C, Xing X, Cheng S, Zhang S, Zheng H, Qian K. The impact of preanalytical variables on the analysis of cell-free DNA from blood and urine samples. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12

Polatoglou E, Mayer Z, Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Isolation and Quantification of Plasma Cell-Free DNA Using Different Manual and Automated Methods. *Diagnostics*, 2022, 12, 2550.

Program probira raka debelog crijeva, 2021., <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/program-probira-raka-debelog-crijeva/>, pristupljeno 17. 9. 2024.

Siskova A, Cervena K, Kral J, Hucl T, Vodicka P, Vymetalkova V. Colorectal Adenomas—Genetics and Searching for New Molecular Screening Biomarkers. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 3260.

- Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, Pauwels P. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits. *J Mol Diagnostics*, 2017, 19, 162–168.
- Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J, Hajdúch M, van 't Veer LJ, Magbanua MJM. Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. *Mol Cancer*, 2023, 22, 15.
- Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keserű J, Penyige A, Szemes T, Nagy B. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 6827.
- Terp SK, Pedersen IS, Stoico MP. Extraction of Cell-Free DNA. *J Mol Diagnostics*, 2024, 26, 310–319.
- Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2020, 57, 484–507.
- Verbanac D, Čeri A, Hlapčić I, Shakibaei M, Brockmueller A, Krušlin B, Ljubičić N, Baršić N, Detel D, Batičić L, Rumora L, Somborac-Bačura A, Štefanović M, Čelap I, Demirović A, Petlevski R, Petrik J, Grdić Rajković M, Hulina-Tomašković A, Rako I, Saso L, Barišić K. Profiling Colorectal Cancer in the Landscape Personalized Testing—Advantages of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci*, 2021, 22, 4327.
- 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, 898–908.
- Vymetalkova V, Cervena K, Bartu L, Vodicka P. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, 2018, 19, 3356.
- Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17, 223–238.
- Wang M, Huang X, Li X, Guo Q, Xu W, Zhao M, Wang X, Wang L, Lou J. Performance

comparison of commercial kits for isolating and detecting circulating tumor DNA. *Scand J Clin Lab Invest*, 2021, 81, 276–281.

Warton K, Graham L-J, Yuwono N, Samimi G. Comparison of 4 commercial kits for the extraction of circulating DNA from plasma. *Cancer Genet*, 2018, 228–229, 143–150.

Ye X, Lei B. The current status and trends of DNA extraction. *BioEssays*, 2023, 4

## 9. SAŽETAK/SUMMARY

### 9.1. SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od vodećih uzroka smrtnosti povezanih s malignim bolestima u svijetu, pri čemu rana dijagnostika predstavlja temeljni preduvjet za uspješno liječenje. Slobodna cirkulirajuća DNA (ccfDNA) je dvolančana, fragmentirana DNA prisutna izvan stanica, koja se može detektirati i analizirati iz uzoraka tekuće biopsije. Kod pacijenata s malignim oboljenjima, dio ccfDNA čini cirkulirajuća tumorska DNA, čija koncentracija i specifične molekularne promjene odražavaju dinamiku bolesti, omogućujući primjenu analize ccfDNA kao dijagnostičkoga, prognostičkoga i prediktivnoga biljega. S obzirom na nisku koncentraciju i izraženu fragmentiranost ccfDNA u biološkim uzorcima, ključno je uspostaviti optimalnu metodu izdvajanja te provesti temeljitu standardizaciju i validaciju svih postupaka tekuće biopsije. Cilj ovoga rada je usporediti tri komercijalno dostupne metode za izdvajanje ccfDNA: NucleoSpin cfDNA XS Kit (Machery Nagel, Njemačka), QIAamp ccfDNA/RNA Kit (Qiagen, Njemačka) i QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). Ispitivane metode izdvajanja temelje se na selektivnoj adsorpciji ccfDNA na kolone od silikatnih čestica. Koncentracija izdvojene ccfDNA u svakom izolatu određena je fluorimetrijskim mjerenjem, dok su kvaliteta i integritet ocijenjeni detekcijom fragmenata pomoću automatizirane mikrovolumne gel-elektroforeze u kapilari na čipu. Metodom QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit dobivene su najveće koncentracije ccfDNA i jedina je od ispitivanih metoda kojom je u svim uzorcima detektiran elektroforetski vršak koji odgovara ccfDNA, čime se ističe kao optimalna za daljnju primjenu.



## 9.2. SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide, and early diagnosis is a crucial prerequisite for successful treatment. Circulating cell-free DNA (ccfDNA) is double-stranded, fragmented DNA found outside cells, detectable and analysable from liquid biopsy samples. In patients with malignant diseases, a portion of ccfDNA corresponds to circulating tumor DNA, whose concentration and specific molecular changes reflect disease dynamics, allowing ccfDNA to serve as a diagnostic, prognostic, and predictive biomarker. Given the low concentration and significant fragmentation of ccfDNA in biological samples, establishing an optimal isolation method is essential, alongside thorough standardization and validation of all liquid biopsy procedures. This study compares three commercially available methods for isolating ccfDNA: NucleoSpin cfDNA XS Kit (Machery Nagel, Germany), QIAamp ccfDNA/RNA Kit (Qiagen, Germany), and QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). The extraction methods examined here rely on the selective adsorption of ccfDNA to silica-based columns. The concentration of isolated ccfDNA was determined by fluorimetric measurement, while quality and integrity were assessed by detecting fragments using automated microvolume gel-electrophoresis on a chip. The QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit yielded the highest ccfDNA concentrations and was the only method among those tested to detect an electrophoretic peak corresponding to ccfDNA in all samples, highlighting it as optimal for further application.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## USPOREDBA METODA IZDVAJANJA SLOBODNE CIRKULIRAJUĆE DNA IZ UZORAKA TEKUĆE BIOPSIJE PACIJENATA S KOLOREKTALNIM ADENOMOM

Marko Matusina

### SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od vodećih uzroka smrtnosti povezanih s malignim bolestima u svijetu, pri čemu rana dijagnostika predstavlja temeljni preduvjet za uspješno liječenje. Slobodna cirkulirajuća DNA (ccfDNA) je dvolančana, fragmentirana DNA prisutna izvan stanica, koja se može detektirati i analizirati iz uzoraka tekuće biopsije. Kod pacijenata s malignim oboljenjima, dio ccfDNA čini cirkulirajuća tumorska DNA, čija koncentracija i specifične molekularne promjene odražavaju dinamiku bolesti, omogućujući primjenu analize ccfDNA kao dijagnostičkoga, prognostičkoga i prediktivnoga biljega. S obzirom na nisku koncentraciju i izraženu fragmentiranost ccfDNA u biološkim uzorcima, ključno je uspostaviti optimalnu metodu izdvajanja te provesti temeljitu standardizaciju i validaciju svih postupaka tekuće biopsije. Cilj ovoga rada je usporediti tri komercijalno dostupne metode za izdvajanje ccfDNA: NucleoSpin cfDNA XS Kit (Machery Nagel, Njemačka), QIAamp ccfDNA/RNA Kit (Qiagen, Njemačka) i QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). Ispitivane metode izdvajanja temelje se na selektivnoj adsorpciji ccfDNA na kolone od silikatnih čestica. Koncentracija izdvojene ccfDNA u svakom izolatu određena je fluorimetrijskim mjerenjem, dok su kvaliteta i integritet ocijenjeni detekcijom fragmenata pomoću automatizirane mikrovolumne gel-elektroforeze u kapilari na čipu. Metodom QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit dobivene su najveće koncentracije ccfDNA i jedina je od ispitivanih metoda kojom je u svim uzorcima detektiran elektroforetski vršak koji odgovara ccfDNA, čime se ističe kao optimalna za daljnju primjenu.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 10 grafičkih prikaza, 5 tablica i 31 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, kolorektalni adenom, tekuća biopsija, slobodna cirkulirajuća DNA, izdvajanje DNA, usporedba metoda

Mentor: **Dr. sc. Andrea Čeri**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Andrea Čeri**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

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

Rad prihvaćen: studeni 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### COMPARISON OF METHODS FOR ISOLATING CIRCULATING CELL-FREE DNA FROM LIQUID BIOPSY SAMPLES OF PATIENTS WITH COLORECTAL ADENOMA

Marko Matusina

#### SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide, and early diagnosis is a crucial prerequisite for successful treatment. Circulating cell-free DNA (ccfDNA) is double-stranded, fragmented DNA found outside cells, detectable and analysable from liquid biopsy samples. In patients with malignant diseases, a portion of ccfDNA corresponds to circulating tumor DNA, whose concentration and specific molecular changes reflect disease dynamics, allowing ccfDNA to serve as a diagnostic, prognostic, and predictive biomarker. Given the low concentration and significant fragmentation of ccfDNA in biological samples, establishing an optimal isolation method is essential, alongside thorough standardization and validation of all liquid biopsy procedures. This study compares three commercially available methods for isolating ccfDNA: NucleoSpin cfDNA XS Kit (Machery Nagel, Germany), QIAamp ccfDNA/RNA Kit (Qiagen, Germany), and QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). The extraction methods examined here rely on the selective adsorption of ccfDNA to silica-based columns. The concentration of isolated ccfDNA was determined by fluorimetric measurement, while quality and integrity were assessed by detecting fragments using automated microvolume gel-electrophoresis on a chip. The QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit yielded the highest ccfDNA concentrations and was the only method among those tested to detect an electrophoretic peak corresponding to ccfDNA in all samples, highlighting it as optimal for further application.

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

Thesis includes: 37 pages, 10 figures, 5 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Colorectal cancer, colorectal adenoma, liquid biopsy, circulating cell-free DNA, DNA extraction, method comparison

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

Reviewers: **Andrea Čeri, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2024.