Optimiranje izolacije slobodne cirkulirajuće DNA u bolesnica oboljelih od raka dojke

Morožin, Teo

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:163244

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Teo Morožin

Optimiranje izolacije slobodne cirkulirajuće DNA u bolesnica oboljelih od raka dojke

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Suvremene biokemijske tehnike Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti na neizmjernoj pomoći i uloženom trudu, a posebice na strpljivosti i nesebičnosti pri prenošenju znanja.
Također se zahvaljujem i ostalim nastavnicima koji su me svojim sugestijama i savjetima usmjeravali tijekom studija posebno izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky i prof. dr. sc. Jerki Dumić.
Posebnu zahvalu dugujem obitelji i prijateljima na neprestanoj podršci za vrijeme studija.
Na kraju, ali ne i manje bitno, zahvaljujem se Bogu na svoj snazi koju mi je udijelio te se nadam da će mi i nadalje biti oslonac i snaga pri izazovima koji slijede.

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 Rak dojke 1
1.1.1 Molekularna klasifikacija raka dojke 2
1.1.2 Dijagnostika i probir raka dojke 3
1.1.3 Terapija raka dojke 5
1.2 Slobodna cirkulirajuća DNA 5
1.2.1 Slobodna cirkulirajuća DNA i rak 7
1.2.2 Slobodna cirkulirajuća DNA kao biomarker 8
2 OBRAZLOŽENJE TEME 11
3 MATERIJALI I METODE 12
3.1 MATERIJAL 12
3.1.1 Standardne kemikalije 12
3.1.2 Boje 13
3.1.3 Standardi 13
3.1.4 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagensa – kompleti 13
3.1.5 Otopine i puferi 13
3.1.6 Gelovi za elektroforezu 15
3.1.7 Biološki uzorci 15
3.1.7.1 Sakupljanje uzoraka seruma/plazme 15
3.2 METODE 18
3.2.1 Izolacija DNA 18
3.2.1.1 Izolacija humane genomske DNA iz krvnih kartica metodom Chelex® 18
3.2.1.2 Izolacija DNA pomoću QIAamp® DNA Blood Mini Kit 19
3.2.1.3 Specifična izolacija slobodne cirkulirajuće DNA pomoću Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit 20
3.2.2 Gel elektroforeza 20
3.2.2.1 Agarozna gel elektroforeza 21
3.2.2.2 Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA 22
4 REZULTATI I RASPRAVA 23
4.1 Izolacije genomske i slobodne cirkulirajuće DNA 23
4.2 Specifična izolacija slobodne cirkulirajuće DNA 28
4.3 Koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA kod pacijenata oboljelih od raka dojke 31

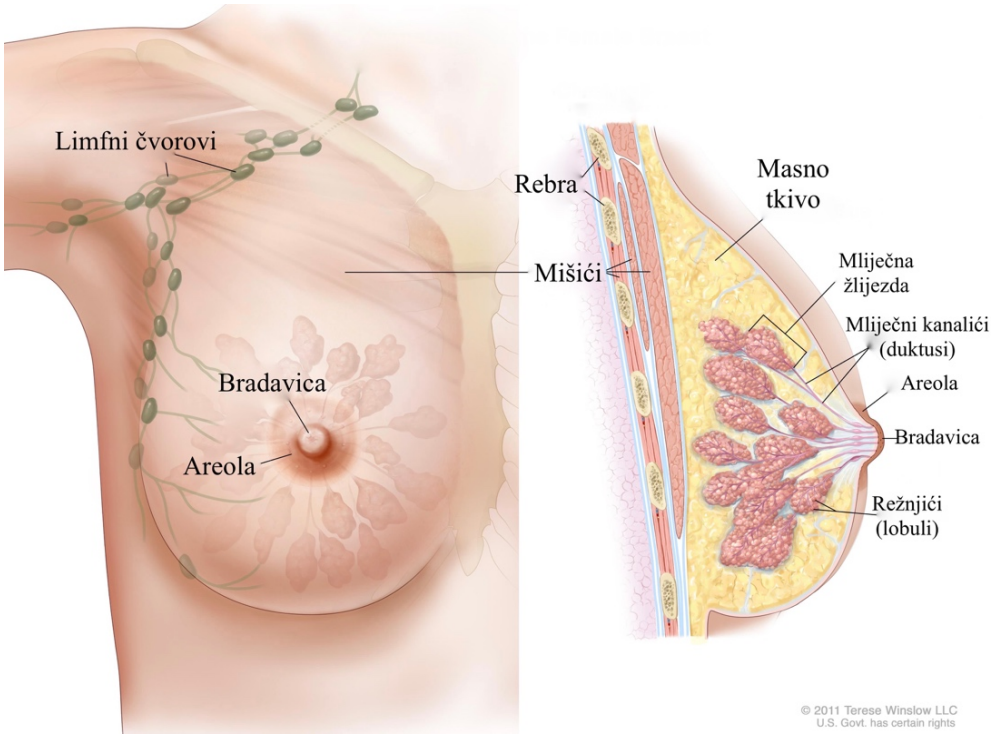
5 ZAKLJUČCI 34
6 LITERATURA 35
7 SAŽETAK/SUMMARY 37
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1 UVOD

1.1 Rak dojke

Rak dojke najčešći je maligni tumor te prvi po mortalitetu od raka u žena u Hrvatskoj (Šekerija i sur., 2014). Tumori dojke mogu biti benigni i maligni (Damjanov i sur., 2014). Većina malignih tumora dojke su epitelni tumori koji se razvijaju od stanica koje oblažu kanaliće ili lobule; rjeđe su to neepitelni tumori potporne strome (angiosarkom, primarni stromalni sarkomi, filodes tumor). Rak se dijeli na karcinom in situ i invazivni rak (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

Karcinom in situ je bujanje stanica raka unutar kanalića ili lobula, a bez prodora u okolno tkivo strome. Obično se duktalni karcinom in situ (DCIS) otkriva tek mamografijom i ograničen je na jedno područje te može postati invazivan. Lobularni karcinom in situ (LCIS) je neopipljiva promjena koja se obično otkriva biopsijom, a rijetko je vidljiva mamografijom. LCIS nije zloćudan, ali njegova prisutnost ukazuje na povećanu opasnost od kasnijeg invazivnog karcinom u bilo kojoj dojci; od bolesnica s LCIS-om, njih 1 do 2% godišnje dobije rak (www.msd-prirucnici.placebo.hr).



Slika 1 *Anatomija ženske dojke; Izvor: www.cancer.gov*

Invazivni karcinom je ponajprije adenokarcinom. Oko 80% je infiltrirajućeg duktalnog tipa; većina ostalih su infiltrirajući lobularni. Rijetki oblici uključuju medularne, mucinozna i tubularne karcinome (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

Pagetova bolest bradavice (koje se ne smije zamijeniti s metaboličkom bolesti kostiju koja se također zove Pagetova bolest) je oblik duktalnog karcinom in situ koji se širi na kožu bradavice i areolu, a očituje se u vidu upalne promjene. Karakteristične zloćudne stanice zvane Pagetove stanice se nalaze u epidermisu. Rak može biti in situ ili invazivan (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

Rak dojke invadira lokalno i širi se u početku kroz regionalne limfne čvorove, krv ili oboje. Metastatski rak dojke može zahvatiti skoro sve organe u tijelu, a najčešće zahvaća pluća, jetra, kosti, mozak i kožu. Većina metastaza u koži događa se na području operirane dojke; metastaze u koži glave su također česte. Metastatski rak dojke se često pojavljuje godinama ili desetljećima nakon početne dijagnoze i liječenja (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

1.1.1 Molekularna klasifikacija raka dojke

Prema današnjoj molekularnoj klasifikaciji, baziranoj na genskoj ekspresiji pojedinih područja unutar genoma, smatra se da postoji pet različitih molekularnih podtipova raka dojke te je dokazana njegova značajna heterogenost. Ti podtipovi su luminalni tip A, luminalni tip B, bazalni tip, karcinom pozitivan na receptor za ljudski epidermalni faktor rasta 2 (HER2, engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) i normalni tip. Luminalni tip A ima najbolju prognozu, dok bazalni tip i HER2 pozitivan imaju najgoru prognozu, a luminalni tip B ima prognozu koja je između ove dvije. Luminalni tip A je karakteriziran visokom ekspresijom estrogenskih receptora (ER) i/ili progesteronskih receptora (PR) bez ekspresije HER2 i s niskom ekspresijom drugih proliferacijskih markera. Luminalni tip B je ER i/ili PR pozitivan, ali također i HER2 pozitivan s visokom ekspresijom proliferacijskih markera. HER2 pozitivan podtip je negativan na ekspresiju ER i PR. Bazalni podtip je uglavnom negativan na ER, PR i HER2, ali je pozitivan na CK5/6 i/ili receptore za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*). Međutim, ne predstavljaju svi bazalni tipovi tumora trostruko negativni (ER, PR, HER2) fenotip, ali također vrijedi i obrnuto, da ne odgovaraju svi trostruko negativni tipovi genskoj ekspresiji koju imaju bazalni tipovi tumora. Normalni tip

tumora obuhvaća neklasificirane tumore koji su negativni na sve markere (Orphanos i Kountourakis, 2012).

Tablica 1. *Klasifikacija tumora dojke bazirana na ekspresiji hormonskih i receptora na površini stanice*

Luminalni tip A	**Luminalni tip B**	**HER2 (+)**	**Bazalni tip/BRCA+**	**Normalni tip**
ER (+) PR (+) HER2 (-)	ER(+) PR (+) HER2 (+)	ER (-) PR (-) HER2 (+)	ER (-) PR (-) HER2 (-) CK5/6 (+) EGFR (HER1) (+)	Negativan na sve markere

Glavni rizični čimbenici koji se povezuju s karcinomom dojke jesu genski i hormonski. Genska je sklonost prepoznata unutar nekih obitelji, te se takvi karcinomi nazivaju hereditarnim karcinomima dojke. U tu se skupinu svrstava oko 10% žena u kojih je dijagnosticiran karcinom dojke. U četvrtine žena te skupine nastanak raka povezuje se s mutacijom dvaju supresorskih gena, *BRCA1* i *BRCA2* (engl. *breast cancer gene*). U hereditarnim se karcinomima jedan mutirani *BRCA*-alel nasljeđuje, dok se drugi inaktivira somatskom mutacijom. Mutacije navedenih gena malokad se nalaze u skupini bolesnica u kojih genska sklonost nije utvrđena (sporadični karcinomi dojke). Sporadični se karcinomi dojke obično nalaze u žena u postmenopauzi, a njihov se nastanak povezuje s određenim hormonskim utjecajima kao što su dug reproduktivni period (rana pojava menarhe i kasna menopauza), kasnija dob rađanja prvog djeteta, kratko dojenje i uzimanje egzogenih estrogena (Damjanov i sur., 2014).

1.1.2 Dijagnostika i probir raka dojke

Za razlikovanje dobroćudnih promjena od raka potrebe su pretrage. Budući da rano otkrivanje i liječenje raka dojke poboljšava prognozu, ovo razlikovanje mora prije završetka obrade pružiti zaključke (www.msd-prirucnici.placebo.hr). Metode kojima se koriste u dijagnostici rak dojke jesu: citološka dijagnostika, patohistološka dijagnostika, radiološka dijagnostika, magnetska rezonancija dojki, biopsija sentinelnog limfnog čvora (Brnić i sur.,

2012). Probir raka dojke obuhvaća mamografiju, klinički pregled dojke i mjesečni samopregled (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

Kod neinvazivnog raka dojke palpabilna masa, promjene na koži ili iscjedak relativno su rijetki znakovi, a na bolest se najčešće posumnja kad se na mamografiji identificiranju suspektni mikrokalcifikati. Nakon identifikacije mikrokalcifikata izvršava se kompletan klinički pregled i ultrazvuk dojki i lokoregionalnih limfnih čvorova te se indicira neka od metoda uzimanja uzorka za morfološku analizu kako bi se postavila preliminarna malignost. Najmanje invazivna, najekonomičnije i relativno dostupna metoda je tankoiglena aspiracijska citološka punkcija (engl. *fine needle aspiration*, FNA) koja može potvrditi, ali ne i pouzdano isključiti malignost promjene. FNA je najbolje učiniti pod ultrazvučnom kontrolom ako se područje s mikrokalcifikatima može pouzdano identificirati ultrazvukom visoke rezolucije. U suprotnom dolazi u obzir FNA vođena mamografskom stereotaksijom. Ako inicijalna morfološka analiza nije pokazala malignost, potrebno je učiniti core-biopsiju ili ekscizijsku biopsiju, radi uzimanja materijala za histološku dijagnostiku. Prije lokalne ekscizije nepalpabilne sumnjive lezije područja s mikrokalcifikatima potrebno je označiti markirnom žicom, metilenskim modrilom ili metalnim kopčama (Brnić i sur., 2012).

Nakon dijagnosticiranja raka dojke dio pozitivnog bioptičkog uzorka bi trebalo analizirati na ER i PR te HER2. Leukocite bi trebalo testirati na *BRCA1* i *BRCA2* gene kada obiteljska anamneza sadrži brojne slučajeve raka dojke ranog nastupa, kad se rak jajnika pojavi u bolesnica s obiteljskom anamnezom raka dojke ili jajnika, kad se rak dojke ili jajnika pojave u iste bolesnice, kad bolesnice imaju nasljeđe Aškenazi Židova ili kad obiteljska anamneza uključuje pojedinačni slučaj raka dojke u muškarca (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

U traganju za metastatskom bolešću radi se rendgen prsnog koša, kompletna krvna slika i testovi funkcije jetra. Općenito se ne preporučuje mjerenje karcinoembrionskog (CEA) antigena, karcinomskog antigena (CA) 15-3, CA 27-29 ili njihove kombinacije u serumu jer rezultati nemaju učinka na liječenje niti na ishod. Pretraga kostiju bi se trebala učiniti ako bolesnice imaju tumore veće od 2 cm, mišićno-koštanu bol, limfadenopatiju ili povišenje alkalne fosfataze ili kalcija u serumu. CT abdomena se radi ako bolesnica ima abdominalne testove jetrene funkcije, hepatomegaliju ili lokalno uznapredovali rak sa ili bez zahvaćanja aksilarnih limfnih čvorova (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

1.1.3 Terapija raka dojke

Centralna komponenta u terapiji raka dojke je ukupno poznavanje opsega bolesti i njenih bioloških obilježja. Ovi čimbenici doprinose definiranju faze bolesti, pomažu u procjeni rizika ponovnog povratka bolesti te daju informaciju o potencijalnom odgovoru na terapiju (npr. ER, PR, HER2). Za definiranje ovih parametara ključna je patohistološka obrada tumorskog tkiva (Gradishar i sur., 2017).

Terapija raka dojke obuhvaća lokaliziranu kiruršku obradu, radioterapiju ili oboje te sistemsku terapiju koja može uključivati kemoterapiju, endokrinu terapiju, biološku terapiju ili njihove kombinacije. Potreba za pojedinim modalitetom terapije te odabir iste se bazira na prognostičkim i prediktivnim faktorima. Ti faktori uključuju histologiju tumora, kliničke i patološke karakteristike primarnog tumora, status aksilarnog limfnog čvora, prisutnost hormonskih receptora u tumoru (ER/PR), HER2 status tumora, multigensko testiranje, prisutnost ili odsutnost detektabilne metastatske bolesti, pacijentove komorbiditete, godine te menopauzalni status (Gradishar i sur., 2017).

1.2 Slobodna cirkulirajuća DNA

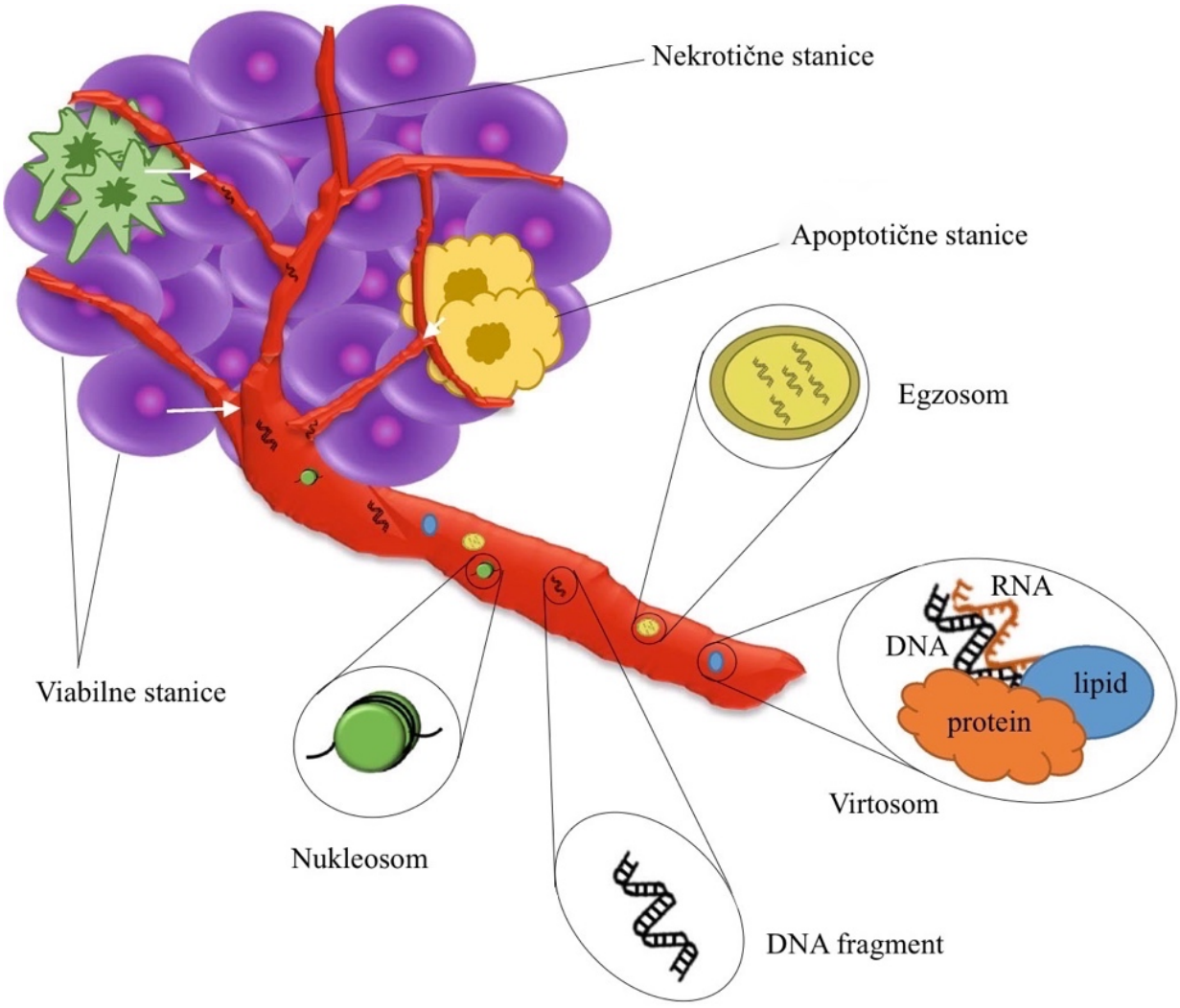
Slobodna cirkulirajuća DNA (ccfDNA, engl. *circulating cell-free DNA*) obuhvaća fragmente nukleinskih kiselina koji cirkuliraju plazmom, serumom ili nekom drugom tjelesnom tekućinom izvan stanice te su prvi pute otkriveni u radu Mandel i Metais 1948. (Mandel i Metais, 1948). ccfDNA čine fragmenti dvolančane DNA s manje od 200 baznih parova (bp) (Ranuncolo, 2017). U cirkulaciji se može pojaviti u nekoliko oblika; kao nevezani fragmenti DNA, nukleosomi, egzosomi (DNA fragmenti unutar vezikula) te kao virtosomi (slika 2.) (Aarthy i sur., 2015).

Nevezani fragmenti DNA nisu povezani ni s jednom drugom molekulom ili površinom. Nakon otpuštanja u cirkulaciju, razgrađuje ih DNaza u krvi. U stanju raka koncentracije DNaze su puno niže te su detektirani i inhibitori DNaze pa su stoga razine ccfDNA i povišene (Aarthy i sur., 2015).

Nukleosomi su kompleksi DNA omotani oko oktamera histonskih proteina te stabilizirani histonom H1 (Cooper i Hausman, 2014).

Egzosomi su male vezikule koje producira više različitih tipova stanica. Mogu sadržavati nukleinske kiseline ili proteine. Egzosomi oslobođeni od tumorskih stanica sadrže u sebi fragmente mutiranih nukleinskih kiselina koji mogu doprinijeti rastu i širenju primarnog tumora i metastaza (Aarthy i sur., 2015).

Virtosomi su kompleksi novosintetizirane DNA, RNA, proteina i lipida te ih oslobađaju isključivo žive stanice (Aarthy i sur., 2015).



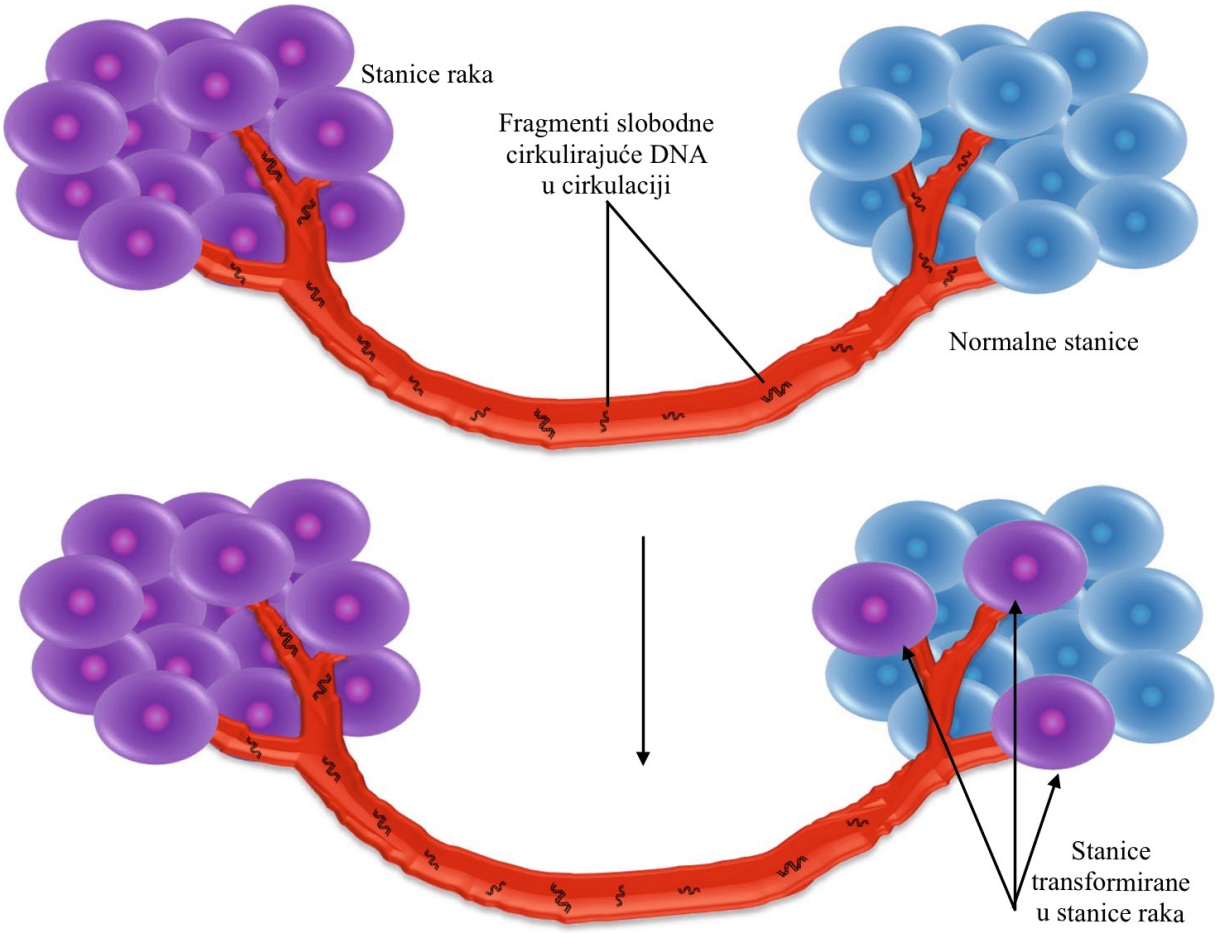
Slika 2 *Slobodna cirkulirajuća DNA. DNA može biti otpuštena u cirkulaciju i tijekom procesa stanične smrti, npr. apoptozom (žute stanice) ili nekrozom (zelene stanice) ili može biti otpuštena od živih stanica (ljubičaste stanice). Slobodna cirkulirajuća DNA može biti prisutna u obliku nevezane DNA, nukleosoma, egzosoma ili virtosoma. Izvor: Aarthy i sur., 2015.*

Slobodna cirkulirajuća DNA je prisutna kod zdravih osoba u različitim, uglavnom niskim koncentracijama (Canzoniero i Park, 2016). Koncentracija ccfDNA u zdravih dobrovoljaca iznosi 2 – 5 ng/mL te uglavnom potječe iz tkiva s visokim "*obrtajem stanice*" kao što su koštana srž, intestinalni epitelili fetus tijekom trudnoće (Ranuncolo, 2017). Veća količina može biti izolirana kod pojedinaca koji boluju od kroničnih upalnih bolesti kao što su sistemski eritematozni lupus, artritis i hepatitis (Canzoniero i Park, 2016). Još veća razina ccfDNA prisutna je kod pacijenata oboljelih od raka te se kreće u rasponu od 10 do 1000 ng/mL (Ranuncolo, 2017).

1.2.1 Slobodna cirkulirajuća DNA i rak

Iako točno porijeklo slobodne cirkulirajuće DNA nije u potpunosti poznato, nekoliko studija je dokazalo kako ona može biti otpuštena iz apoptotičnih, nekrotičnih ili viabilnih stanica (slika 2.) (Aarthy i sur., 2015). Frakcija slobodne cirkulirajuće DNA koja potječe od tumora se naziva tumorska cirkulirajuća DNA (ctDNA, engl. *circulating tumour DNA*) ili ako je specifično izolirana iz plazme, plazmatska tumorska DNA (ptDNA, engl. *plasma tumour DNA*) (Canzoniero i Park, 2016). ctDNA ima biokemijska i biofizikalna svojstva koja se razlikuju od slobodne cirkulirajuće DNA koja potječe od ne-tumorskih stanica. Primjerice, dvolančani fragmenti su manje stabilnosti te sadrže drugačiji GC-sastav (Ranuncolo, 2017). Važno je razlikovati ctDNA od cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC, engl. *circulating tumour cells*) koje su cjelovite stanice dospjele u cirkulaciju od primarnog tumora te cirkuliraju krvlju. Prvotno se mislilo kako ctDNA potječu od CTC, međutim danas se zna da ctDNA može biti detektirana u pacijenata oboljelih od raka kod kojih nisu detektabilne CTC (Canzoniero i Park, 2016).

ctDNA također sadrži i dominantne onkogene koji mogu transformirati osjetljive stanice u udaljenim organima te na taj način doprinijeti metastaziranju tumora (slika 3.). Ovaj proces se naziva genometastaziranje (engl. *genometastasis*). Dakle, ctDNA potencijalno ima ulogu u metastaziranju tumora preko prijenosa onkogena iz inicijalnih tumorskih stanica (Aarthy i sur., 2015).



Slika 3 *Genometastaziranje. Smatra se da cirkulirajuća DNA ima ulogu u procesu metastaziranja. Studije pokazuju da tumorska cirkulirajuća DNA može transformirati osjetljive stanice u udaljenim organima. Izvor: Aarthy i sur., 2015.*

1.2.2 Slobodna cirkulirajuća DNA kao biomarker

Slobodna cirkulirajuća DNA ima potencijalnu primjenu kao dijagnostički, prediktivni i prognostički biomarker kod pacijenata oboljelih od raka (Aarthy i sur., 2015). Slobodna cirkulirajuća DNA može biti detektirana i u plazmi i u serumu. Uzorci seruma imaju 20 puta veće koncentracije slobodne cirkulirajuće DNA nego uzorci plazme. Jedan od razloga za to je što se dosta slobodne cirkulirajuće DNA generira tijekom procesa zgrušavanja u epruveti za sakupljanje uzorka pa je stoga i veći udio DNA iz bijelih krvnih stanica što dovodi do kompliciranije detekcije specifično tumorske cirkulirajuće DNA (Canzoniero i Park, 2016).

Razina slobodne cirkulirajuće DNA mjerena različitim tehnikama, poput radioimuno eseja ili lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*), u različitim tipovima raka bila je značajno veća nego kod zdravih dobrovoljaca. Također, post-terapijske koncentracije cirkulirajućih nukleosoma su korelirale s odgovorom na terapiju (Aarthy i sur., 2015).

Tumorska cirkulirajuća DNA sadrži mutacije koje se nalaze i u tumorskim stanicama. Dakle razina slobodne cirkulirajuće DNA zajedno s genetskim promjenama koje sadrži mogu se iskoristiti u primjeni kao biomarkeri (Aarthy i sur., 2015).

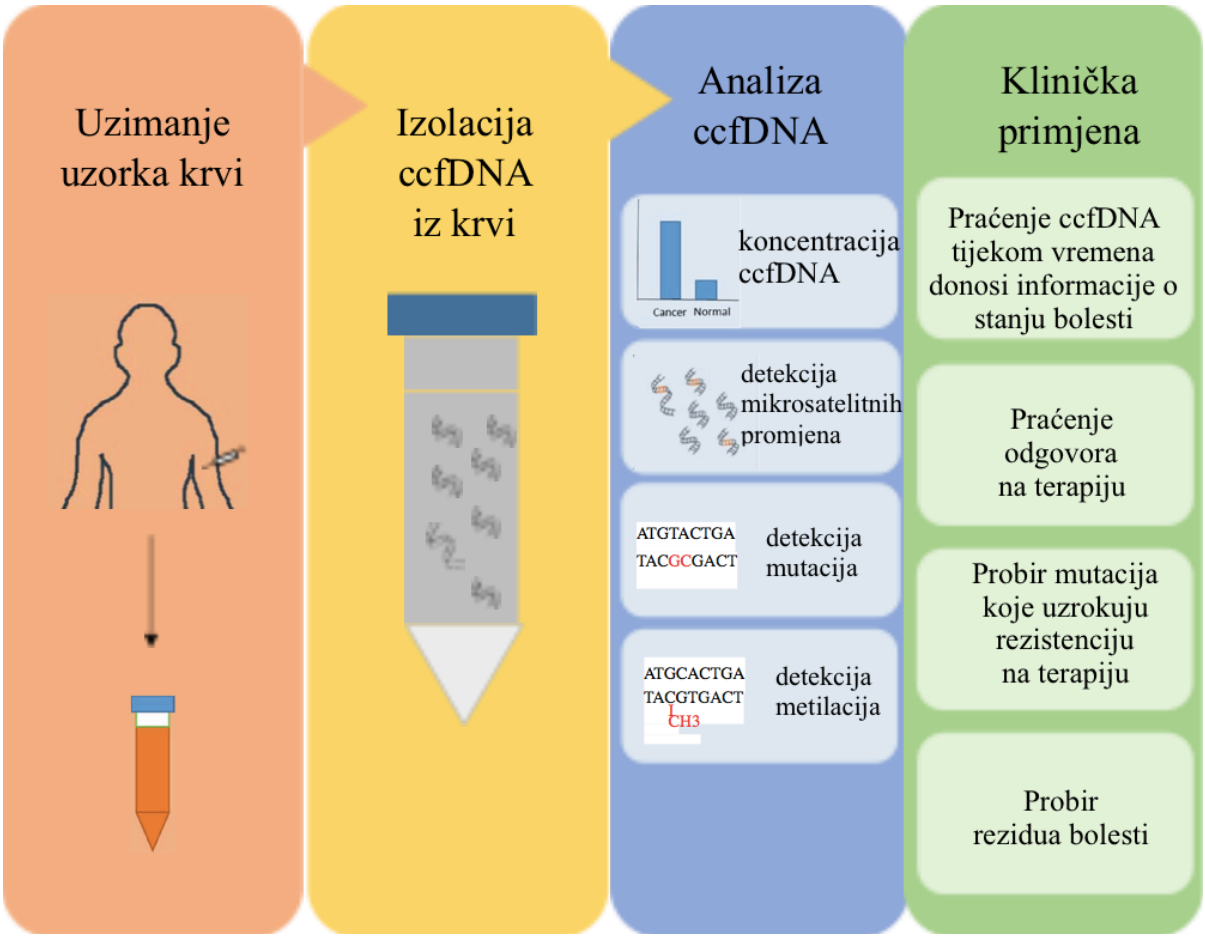
Iako ctDNA ima velik potencijal za kliničku primjenu kao neinvazivna metoda pri ranom otkrivanju tumora, postoje i pojedini limitirajući faktori koji trebaju biti uzeti u obzir (Salvi i sur., 2016). Prije svega, iako se ctDNA može razlikovati od ukupne slobodne cirkulirajuće DNA analizom somatskih mutacija, jako niska prisutnost ctDNA (često manje od 0,1%) zahtjeva osjetljivije i reproducibilnije metode. Nadalje, karakteristike slobodne cirkulirajuće DNA mogu biti različite među pacijentima te su stoga potrebne posebne kvalitativne analize i specifične optimizacijske procedure za svakog pacijenta (Salvi i sur., 2016).

Također jedan od problema je i to što svojstva ctDNA kao markera ovise o populaciji, uvjetima pohrane uzoraka, načinu izvođenja testiranja i rezultatima analize. Zbog ovih razloga, usporedba među biomarkerima koji se baziraju na slobodnoj cirkulirajućoj DNA je neprikladna, osim unutar pojedine studije. Stoga je translacija u kliničku upotrebu i dalje kompliciranа (Salvi i sur., 2016).

Sljedeći korak u evaluaciji slobodne cirkulirajuće DNA kao biomarkera je izdržljivost; potrebno je provesti velike studije s osjetljivijim i reproducibilnijim metodama. Također, različiti laboratoriji moraju potvrditi promjene u slobodnoj cirkulirajućoj DNA kao pouzdane rane dijagnostičke markere prije translacije u kliničku praksu (Salvi i sur., 2016).

Budućnost se čini prilično obećavajućom za primjenu slobodne cirkulirajuće DNA u području onkologije (Canzoniero i Park, 2016). Europska agencija za lijekove je unutar sažetka opisa svojstava za gefitinib, inhibitor za receptore epidermalnog faktora rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*), navela da se pri procjeni statusa tumora, odnosno mutacije EGFR-a prije početka liječenja bolesnika s lokalno uznapredovalim ili metastatskim rakom pluća-ne malih stanica (NSCLC, engl. *non-small cell lung cancer*) može upotrijebiti tumorska

cirkulirajuća DNA dobivena iz uzorka krvi. Također je navedeno da se mogu koristiti samo robusni, pouzdani i osjetljivi testovi koji su dokazano korisni za određivanje statusa mutacija EGFR-a u tumorima ili ctDNA, kako bi se izbjegli lažno negativni ili lažno pozitivni rezultati (www.ema.europa.eu, 2017).



Slika 4 *Klinička primjena ccfDNA. ccfDNA je lako dostupna iz periferne krvi. U tijeku su istraživanja njene uporabe kao potencijalnog biomarkera preko mjerenja koncentracija, detekcije genetskih promjena kao što su mutacija, metilacije i mikrosatelitne promjene Periodično praćenje ovih parametara bi dalo podatke o napretku bolesti i odgovoru na terapiju. Također bi se moglo koristiti za probir mutacija odgovornih za rezistenciju na terapiju, stoga i pri donošenju odluka o pojedinoj terapiji. Minimalne rezidue bolesti je moguće detektirati evaluacijom slobodne cirkulirajuće DNA. Izvor: Aarthy i sur., 2015.*

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Rak dojke najčešći je maligni tumor te prvi po mortalitetu od raka u žena u Hrvatskoj. Uspješnost liječenja raka dojke, kao i svakog drugog malignog oboljenja, uvelike ovisi o fazi u kojoj je otkriven. Stoga rana dijagnoza ove bolesti pridonosi većoj kvaliteti života pojedinaca, ali i donosi mogućnost izlječenja. Napredak na području rane dijagnostike raka dojke, koji je primjenjiv u kliničkoj praksi, predstavlja velik javnozdravstveni interes na globalnoj razini.

Slobodna cirkulirajuća DNA predstavlja fragmente nukleinskih kiselina koji cirkuliraju plazmom, serumom ili nekom drugom tjelesnom tekućinom izvan stanice. Prema do sada provedenim znanstvenim istraživanjima, slobodna cirkulirajuća DNA ima velik potencijal za kliničku primjenu kao novi biomarker pri različitim patofiziološkima stanjima, među kojima su i maligna bolest poput raka dojke. Međutim i dalje postoje određeni limitirajući čimbenici koji koče njenu primjenu u kliničkoj praksi.

Cilj ovog rada bio je pridonijeti optimiranju izolacije slobodne cirkulirajuće DNA u raku dojke kod žena kako bi se upotreba iste približila kliničkoj praksi.

Kao materijal za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA korišteni su uzorci plazme odnosno serumi žena kojima je dijagnosticiran rak dojke. Nakon postupka izolacije, koji su provedeni na kolonama različitih proizvođača, provedena je agarozna gel elektroforeza kako bi bila dokazana prisutnost slobodne cirkulirajuće DNA. Uz to pojedinim uzorcima su određene i koncentracije slobodne cirkulirajuće DNA kao jedan od potencijalno značajnih kliničkih parametara.

Od rezultata provedenog istraživanja očekivalo se da se pokaže određena sličnost pri koncentracijama slobodne cirkulirajuće DNA u žena oboljelih od raka dojke koja bi bila u raskoraku od njene koncentracije u zdravih dobrovoljaca.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJAL

Kemikalije i materijali korišteni u ovom radu nabavljeni su od:

- Biotium (Fremont, CA, SAD)
- GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK)
- Invitorgen (Carlsbad, VA, SAD)
- Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Norgen (Thorold, ON, Kanada)
- Qiagen (Valencia, CA, SAD)
- Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- Sigma (St. Louis, MO, SAD)
- Termo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD)

3.1.1 Standardne kemikalije

- Agaroza, Sigma
- $CaCl_2$, Sigma
- EDTA, Roth
- etanol (96%), Kemika
- glicerol, Kemika
- H_3BO_3, Roth
- HCl (36%), Kemika
- metanol, Kemika
- Na_2CO_3, Sigma

- NaOH, Sigma
- Proteinaza K (PK), Sigma, Norgen
- Tris (tris[hidroksimetil]aminometan) – Trizma baze®, (Sigma)
- Triton X-100, Sigma

3.1.2 Boje

- GelRed™, Biotium

3.1.3 Standardi

- Komercijalno probavljene smjese fragmenata DNA poznatih veličina (standard 100 pb i standard 1kb), Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagensa – kompleti

- QIAamp® DNA mini Kit, Qiagen
- Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit, Product # 55100, Norgen
- Whatman™ FTA™cards, GE Healthcare Life Sciences
- Analytical Grade Chelex® 100 Resin, Bio-Rad

3.1.5 Otopine i puferi

- Otopina EDTA
  - EDTA 0,5 M
  - NaOH (do pH 8,0)
  - u destiliranoj vodi

- 5xTBE-pufer (pH 8,3)
  - Tris HCl, 45 mM
  - H_3BO_3, 45 mM
  - EDTA, 1 mM
  - u destiliranoj vodi
- TE-pufer za proteinazu K
  - Tris, 50 mM
  - EDTA, 1 mM
  - Triton X-100, 0,5%
- 6x pufer za nanošenje uzoraka DNA, pH 6,8
  - glicerol, 30%
  - bromfenol plavo, 0,25%
  - ksilen cijanol, 0,25%
  - u destiliranoj vodi
- Otopina proteinaze K
  - proteinaza K, 10 mg/ml
  - Tris HCl pH 7,5, 10 mM
  - $CaCl_2$,20 mM
  - glicerol, 50%
  - u destiliranoj vodi
- Otopina Chelex
  - Chelex, 5%
  - Tris HCl pH 7,5, 10 mM

- u destiliranoj vodi

- TE-pufer, pH 8,3
  - Tris-HCl, 10 mM
  - EDTA, pH 8.0, 1 mM
  - u sterilnoj vodi

3.1.6 Gelovi za elektroforezu

Za elektroforezu uzoraka izolirane DNA pripravljeni su gelovi 0,8 – 1,5% agaroze u TBE puferu.

3.1.7 Biološki uzorci

"Tumorski uzorci" seruma i plazme pacijentica oboljelih od raka dojke dobiveni su na Klinici za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Ilica 197, 10 000 Zagreb, dok su "kontrolni uzorci" seruma zdravih dobrovoljaca dobiveni na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, 10 000 Zagreb. Svi uzorci dobiveni su dobrovoljno od strane svakog davatelja uzorka uz potpisan informirani pristanak koji je bio u skladu s Helsinškom deklaracijom.

3.1.7.1 Sakupljanje uzoraka seruma/plazme

Venska krv vađena je u epruvete s podtlakom (Vacutainer, Becton Dickinson) kojima je dodan antikoagulans EDTA. Krvna plazma odvojena je od krvnih stanica centrifugiranjem pri 1400 g tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Plazma je prenesena u novu sterilnu epruvetu pazeći da se prilikom pipetiranja ne poremeti sloj leukocita. Nakon toga, plazma je ponovno centrifugirana pri 4500 g tijekom 10 minuta, da bi uklonili eventualno zaostale stanice ili stanični sadržaj. Supernatant je prenesen u novu sterilnu epruvete te pohranjen pri -20°C do analize.

Krv izvađena venepunkcijom bez dodatka antikoagulansa (Vacutainer, Becton Dickinson) zgrušava se stajanjem na zraku posredstvom sustava za koagulaciju. Centrifugiranjem (10 minuta, 2500 g) se ugrušak odvaja od supernatanta koji nazivamo krvnim serumom. Serum je, dakle, dio krvi bez čimbenika zgrušavanja, fibrinogena i krvnih stanica; možemo ga smatrati puferiranom otopinom koja sadrži ione, organske tvari (urea, kreatinin, bilirubin), biološke makromolekule (proteini, lipoproteini, DNA).
Popis uzoraka zajedno s opisom uzorka te datumom izolacije se nalazi u tablici 2.

Prije i nakon izolacije DNA, svi uzorci su bili skladišteni pri -20ºC.

Tablica 2 *Popis uzoraka seruma i plazme korištenih u istraživanju; uzorci 11-20 izolirani su duplikatu s dvije različite serije proteinaze K te imaju oznake a i b*

OZNAKA UZORKA U ISTRAŽIVANJU	**OPIS I OZNAKA UZORKA U KLINICI**	**DATUM IZOLACIJE**
1	Kontrolni	26.01.2016.
2	Kontrolni	26.01.2016.
3	Tumorski (P0015)	03.02.2016.
4	Tumorski (S0015)	03.02.2016.
11a	Kontrolni (žena, 37, B+)	24.03.2016.
11b	Kontrolni (žena, 37, B+)	24.03.2016.
12a	Kontrolni (žena,19, A+)	24.03.2016.
12b	Kontrolni (žena,19, A+)	24.03.2016.
13a	Kontrolni (žena, 31, A+)	24.03.2016.
13b	Kontrolni (žena, 31, A+)	24.03.2016.
14a	Tumorski (P0038)	24.03.2016.
14b	Tumorski (P0038)	24.03.2016.
15a	Tumorski (P0041)	24.03.2016.
15b	Tumorski (P0041)	24.03.2016.

16a	Tumorski (S0054)	24.03.2016.
16b	Tumorski (S0054)	24.03.2016.
17a	Tumorski (S0015)	24.03.2016.
17b	Tumorski (S0015)	24.03.2016.
18a	Tumorski (S0041)	24.03.2016.
18b	Tumorski (S0041)	24.03.2016.
19a	Tumorski (S0038)	24.03.2016.
19b	Tumorski (S0038)	24.03.2016.
31-1	Tumorski (P0015*)	22.03.2017.
31-2	Tumorski (S0015*)	22.03.2017.
32-1	Tumorski (P0019)	22.03.2017.
32-2	Tumorski (S0019)	22.03.2017.
33-1	Tumorski (P0020)	22.03.2017.
33-2	Tumorski (S0020)	22.03.2017.
34-1	Tumorski (P0031)	22.03.2017.
34-2	Tumorski (S0031)	22.03.2017.
35-1	Tumorski (P0032)	22.03.2017.
35-2	Tumorski (S0032)	22.03.2017.
36-1	Tumorski (P0034)	22.03.2017.
36-2	Tumorski (S0034)	22.03.2017.
37-1	Tumorski (P0047)	22.03.2017.
37-2	Tumorski (S0047)	22.03.2017.
38-1	Tumorski (P0050)	22.03.2017.

38-2	Tumorski (S0050)	22.03.2017.
39-1	Tumorski (P0058)	22.03.2017.
39-2	Tumorski (S0058)	22.03.2017.
40-1	Tumorski (P0062)	22.03.2017.
40-2	Tumorski (S0062)	22.03.2017.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNA

Izolacija nukleinskih kiselina, tj. DNA, u načelu se sastoji od tri osnovna koraka: (1) "otvaranje", liza stanica kako bi DNA bila dostupna za daljnje procesiranje, (2) odvajanje DNA od drugih staničnih komponenti i (3) pročišćavanje DNA (Nicholl, 2008).

Konvencionalne metode koje se koriste pri izolaciji DNA su fenol-kloroform ekstrakcija, alkoholna precipitacija ili isoljavanje (Perakis i sur., 2017).

Govoreći o slobodnoj cirkulirajućoj DNA, konvencionalne metode nisu prikladne za praktičnu primjenu i izolaciju DNA iz veće količine uzoraka s obzirom na to da oduzimaju mnogo vremena, da su složene te su rezultati teško usporedivi. Stoga se u tim slučajevima najčešće primjenjuju komercijalno dostupni kitovi čiji je osnovni princip selektivno vezivanje DNA za na siliciju bazirane membrane u prisutnosti kaotropičnih soli (Perakis i sur., 2017)□. U ovom radu su za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA korištena dva komercijalno dostupna kita: QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen i Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulatin DNA Purification Mini Kit, Norgen.

Za izolaciju humane genomske DNA iz uzorka krvi koji je korišten kao kontrolni uzorak rabljene su Whatman™ FTA™ kartice, GE Healthcare te pripadajući protokol.

3.2.1.1 Izolacija humane genomske DNA iz krvnih kartica metodom Chelex®

U cilju izolacije humane genomske DNA, komadić filter papirića sa sakupljenim uzorkom pune krvi (dimenzija 2x2 mm, Blood Stain Cards) prenesen je u 1,5 ml Eppendorf

epruvetu te je dodano 1 ml sterilne destilirane vode nakon čega je sadržaj inkubiran pri sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta, uz povremeno miješanje na mješaču Vortex. Nakon centrifugiranja 3 minute pri 15 700 *g*, 950 µl supernatanta je odbačeno te je u epruvetu dodano 150 µl *otopine Chelex* i 50 µl *otopine proteinaze K* (do konačne koncentracije 2 mg/ml). Tako priređena otopina za izolaciju inkubirana je tijekom 3 sata pri 56° C, promiješana na mješaču Vortex tijekom 10 sekundi te inkubirana 8 minuta pri 95° C. Nakon centrifugiranja 3 minute pri 15 700 *g* sakupljen je supernatant koji sadrži DNA i pohranjen je na + 4° C do uporabe.

3.2.1.2 Izolacija DNA pomoću QIAamp® DNA Blood Mini Kit

Za izolaciju genomske DNA i slobodne cirkulirajuće DNA korišten je protokol *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* te pripadajuće kolone za izolaciju i otopine osigurane od strane proizvođača.

U 200 µL uzorka plazme/seruma dodano je 20 µL proteinaze K i 200 µL pufera AL (osiguran od strane proizvođača) te je smjesa promiješana 15 sekundi na mješaču Vortex, a zatim inkubirana 10 minuta pri 56ºC. Smjesa je zatim kratko centrifugirana kako bi se uklonile kapljice s unutarnje stjenke. Ovoj smjesi je dodano 200 µL 96% etanola te je ponovno promiješana 15 sekundi na mješaču Vortex, a zatim kratko centrifugirana, ponovno, kako bi se uklonile kapi s unutarnje stjenke. Pripravljena smjesa je dodana u kolonu za izolaciju te centrifugirana na 6 000 g 1 minutu, a smjesa koja je prošla kroz kolonu je odbačena. Potom je dodano 500 µL pufera AW1 (osiguran od strane proizvođača) te centrifugirano na 6 000 g 1 minutu. Smjesa koja je prošla kroz kolonu, ponovo je odbačena. Kolona za izolaciju je prebačena u čistu tubu za sakupljanje, a zatim je u kolonu dodano 500 µL pufera AW2 (osiguran od strane proizvođača). Smjesa je centrifugirana na 20 000 g, 3 minute. Sadržaj koji je prošao kroz kolonu ponovno je odbačen. Kolona za izolaciju zatim je stavljena u 1,5 mL tubu te je dodano 200 µL pufera AE (osiguran od strane proizvođača), smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 1 minutu te centrifugirana na 6 000 g 1 minutu. U 1,5 mL tubi za sakupljanje nalazi se izolirana DNA iz uzorka plazme/seruma.

3.2.1.3 Specifična izolacija slobodne cirkulirajuće DNA pomoću Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit

Izolacija slobodne cirkulirajuća DNA provedena je pomoću *Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Product # 55100)* firme Norgen.

500 µL uzorka plazme/seruma je stavljeno u 2 mL tubu te je dodano 12 mL proteinaze K te promiješano na Vortex mješaču 10 sekundi. Zatim su uzorci inkubirani 10 minuta pri temperaturi od 55ºC. Nakon inkubacije pri 55ºC,dodano je 1000 µL pufera za vezanje B (osiguran od strane proizvođača) te je smjesa dobro promiješana na Vortex mješaču 10 sekundi. Smjesa od 800 µL je prebačena u kolonicu za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA zajedno s pridruženom tubom za sakupljanje. Potom je provedeno centrifugiranje u trajanju od 2 minute na 3 300 g. Sadržaj koju je prošao kroz kolonicu za izolaciju je odbačen. Ovaj postupak je ponovljen kako bi se sva smjesa uzorka i pufera B iskoristila za izolaciju. Nakon toga u kolonicu za izolaciju je dodano 600 µL otopine za ispiranje A (osigurana od strane proizvođača) te je provedeno centrifugiranje od 1 minute na 3 300 g. Sadržaj koji je prošao kroz kolonicu je odbačen te je ovaj korak ispiranja ponovljen. Prazna kolona je potom centrifugirana 2 minute na 13 000 g. Nakon toga kolona za izolaciju je prebačena u čistu 1,7 mL tubu za ispiranje, dodano 50 µL pufera B za ispiranje te je smjesa inkubirana sobnoj temperaturi 2 minute. Nadalje su provedena dva centrifugiranja, prvo u trajanju od 1 minute na 400 g, te drugo u trajanju od 2 minute na 5 800 g. U tubi za sakupljanje uzoraka se sada nalazi izolirana slobodna cirkulirajuća DNA iz uzorka plazme odnosno seruma.

3.2.2 Gel elektroforeza

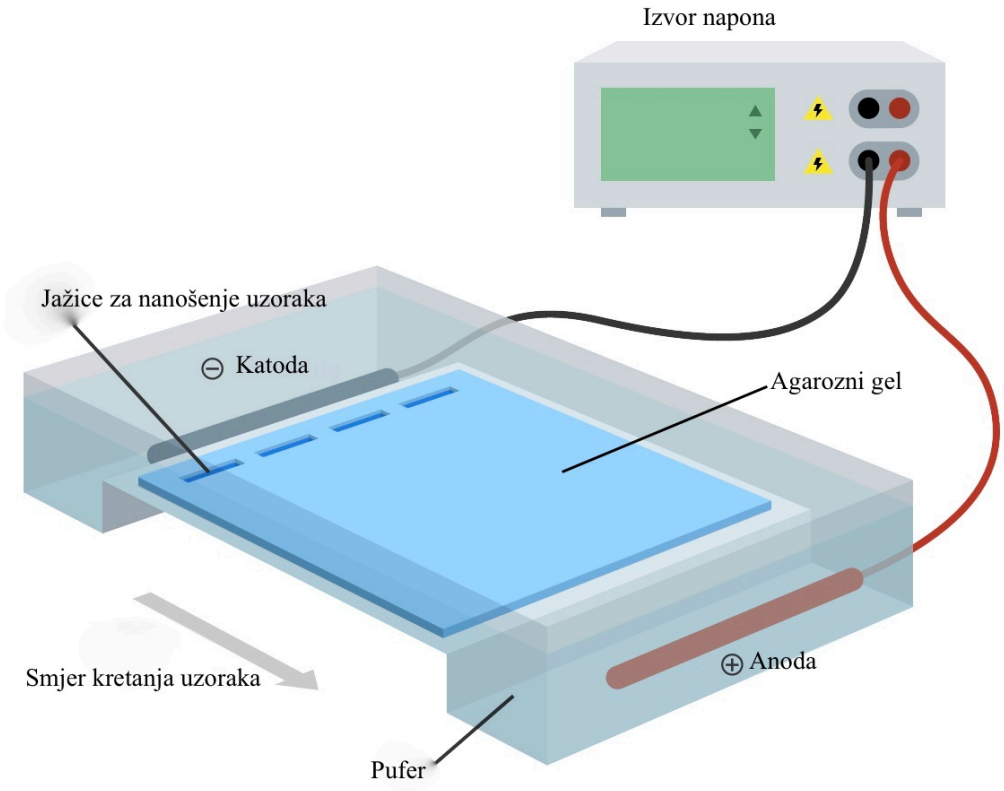
Gel elektroforeza predstavlja glavnu metodu kojom se vizualiziraju fragmenti nukleinskih kiselina. Metoda se temelji na činjenici da su nukleinske kiseline polianionske pri neutralnom pH, dakle nose višestruki negativni naboj zbog prisutnosti fosfodiesterskih veza. Zbog toga će molekule nukleinskih kiselina u električnom polju putovati prema pozitivnoj nabijenoj elektrodi (anodi). S obzirom na to da su negativni naboji ravnomjerno raspoređeni po DNA, omjer naboj/masa je konstantan, stoga pokretljivost fragmenata ovisi o njihovoj duljini. U ovoj metodi se koristi matriks u obliku gela koji odvaja nukleinske kiseline prema njihovoj veličini (Nicholl, 2008).

O tipu matriksa koji se koristi pri elektroforezi i o njegovoj poroznosti ovisi koji će stupanj razdvajanja fragmenata biti postignut. Dva osnovna tipa gela koji se najčešće koriste su: agarozni i poliakrilamidni (Nicholl, 2008).

3.2.2.1 Agarozna gel elektroforeza

U ovom radu za vizualizaciju DNA fragmenta korištena je agarozna gel elektroforeza.

Agaroza je polisaharid izoliran iz morskih algi, otapa se u vodi pri povišenoj temperaturi, a prilikom hlađenja dolazi do formiranja gela (Nicholl, 2008). Aparatura za agaroznu gel elektroforezu prikazana je na slici 5.



Slika 5 *Aparatura za agaroznu gel elektroforezu Izvor: www.yourgenome.org*

Za agaroznu gel elektroforezu pripravljeni su 0,8 – 1,5% agarozni gelovi u TBE puferu. U jažicu za nanošenje uzorka je nanesena smjesa od 10 µL uzorka te 2 µL boje GelRed^{TM}. Zatim je provedena elektroforeza u trajanju od 30 minuta pri 80 V. Potom je provedena vizualizacija DNA u gelovima na Gel Imager-a (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences).

3.2.2.2 Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA

Koncentraciju nukleinskih kiselina u uzorku, tj. DNA je moguće odrediti spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Apsorbancija A_{260} koja iznosi 1,0 ekvivalentna je koncentraciji 50 µg/mL dvolančane DNA ili 40 µg/mL jednolančane DNA ili RNA. U svrhu određivanja čistoće uzorka, određuje se i apsorbancija na 280 nm. Omjer A_{260}/A_{280} koristi se za utvrđivanje stupnja kontaminiranosti uzorka zaostalim fenolom iz ekstrakcije ili proteinima. Za "čisti" uzorak DNA, A_{260}/A_{280} omjer bi trebao iznositi oko 2,0 (Nicholl, 2008).Prema protokolu uređaja koji je korišten za određivanje koncentracije DNA u uzorcima, NanoDrop 8000, Thermo Fisher Scientific, također se mjeri apsorbancija pri 230 nm te određuje omjer A_{260}/A_{230}. Ovaj omjer predstavlja sekundarno mjerenje čistoće uzorka nukleinskih kiselina. Za čiste nukleinske kiseline omjer A_{260}/A_{230} je veći od omjera A_{260}/A_{280}, te iznosi između 1,8 i 2,2. U slučaju da je omjer značajno manji, to može ukazati na prisutnost onečišćenja.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Izolacije genomske i slobodne cirkulirajuće DNA

Iz seruma i plazme bolesnica oboljelih od raka dojke kao i kontrolnih uzoraka zdravih žena, pokušala se izolirati slobodna cirkulirajuća DNA sa zadovoljavajućim prinosom DNA. Uzorci su izolirani metodom Chelex (kontrolni uzorak, koji je služio kao kontrola izolata genomske DNA zdrave osobe), izolacijom na komercijalnim Qiagen kolonama te komercijalnim Norgen kolonama specifičnim za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA.

Na slikama 6, 7, 8. i 9. prikazani su rezultati izolacije genomske i slobodne cirkulirajuće DNA iz uzoraka plazme i seruma pomoću QIAamp® DNA mini Kit kolona uz pripadajući protokol. Zatim je provedena agarozna gel elektroforeza uzoraka uz boju GelRed™ te su fragmenti DNA vizualizirani na imageru (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences).

Na slici 6. prikazani su rezultati agarozne gel elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu (Qiagen metoda). Kod kontrolnih zdravih izolata (oznake 2, 3 i 8) nisu vidljive nikakve vrpce što je i očekivani rezultat. Kod uzoraka pod jažicama 4 i 6, vide se dvije intenzivnije vrpce pri vrhu gela koje predstavljaju genomsku DNA, dok se ispod njih vide i nešto svjetlije vrpce koje predstavljaju slobodnu cirkulirajuću DNA. Kod uzorka 5, iako je tumorski nisu vidljive nikakve vrpce.

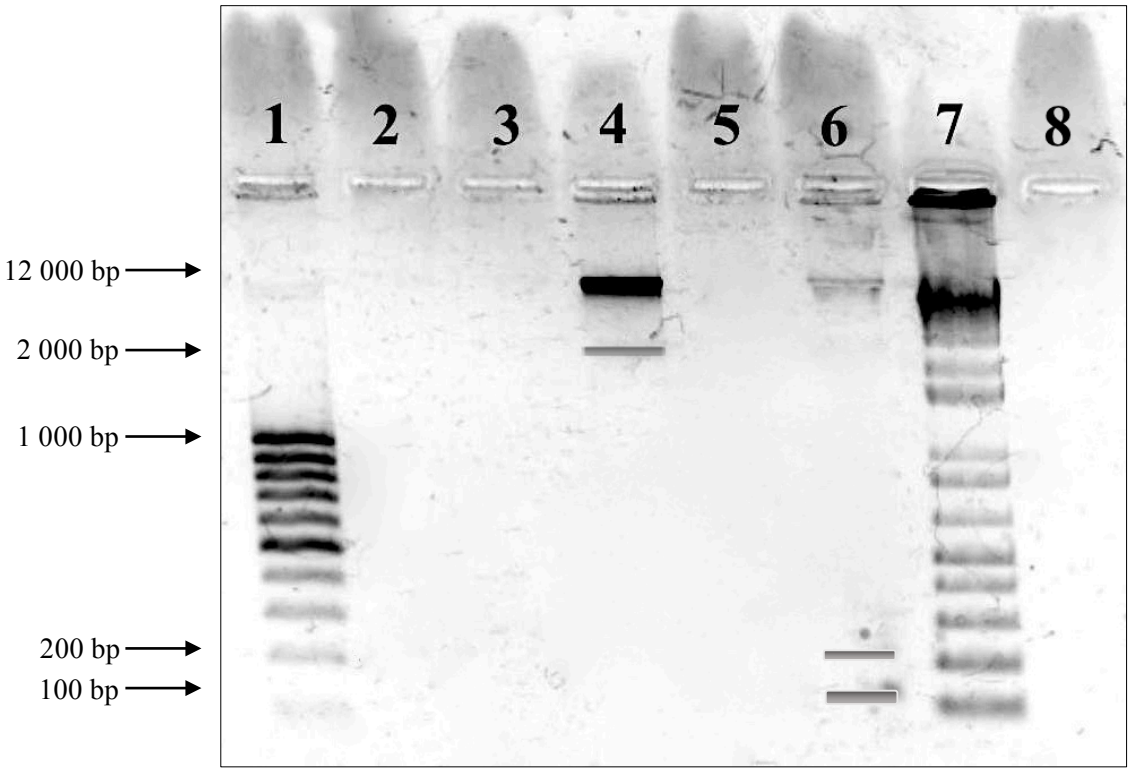
Na slici 7. prikazani su rezultati agarozne gel elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu. Na ovom gelu uzorci seruma zdravih dobrovoljaca (jažica 2) također pokazuju nikakve vrpce. Tumorski uzorci plazme (jažice 3, 5 i 7) ponovno pokazuju dvije vrpce, intenzivniju koja predstavlja genomsku DNA, te se nalazi iznad najvećeg fragmenta standarda, i manje intenzivnu koja se nalazi nešto niže te predstavlja slobodnu cirkulirajuća DNA. Tumorski uzorci seruma, ne pokazuju nikakve vrpce.

Na slici 8. prikazani su rezultati agarozne elektroforeze u 0,8% agaroznom gelu što se ispostavilo da je preniski postotak agaroze za elektroforezu u trajanju od 30 minuta pri 80 V što se vidi po tome da je uzorak standarda došao do donjeg ruba gela. Pri ovoj analizi ponovno kod kontrolnih uzoraka (jažica 2) nema nikakvih vrpci, dok se kod tumorskih plazmatskih uzoraka (jažice 3, 5 i 7) ponovno vidi intenzivna vrpca koja predstavlja genomsku DNA te se nalazi

iznad razine najvećeg fragmenta standarda. Na ovim uzorcima se ne vidi druga vrpca koja bi predstavljala slobodnu cirkulirajuću DNA. Tumorski uzorci seruma ni na ovoj agaroznoj gel elektroforezi ne pokazuju nikakve vrpce DNA.

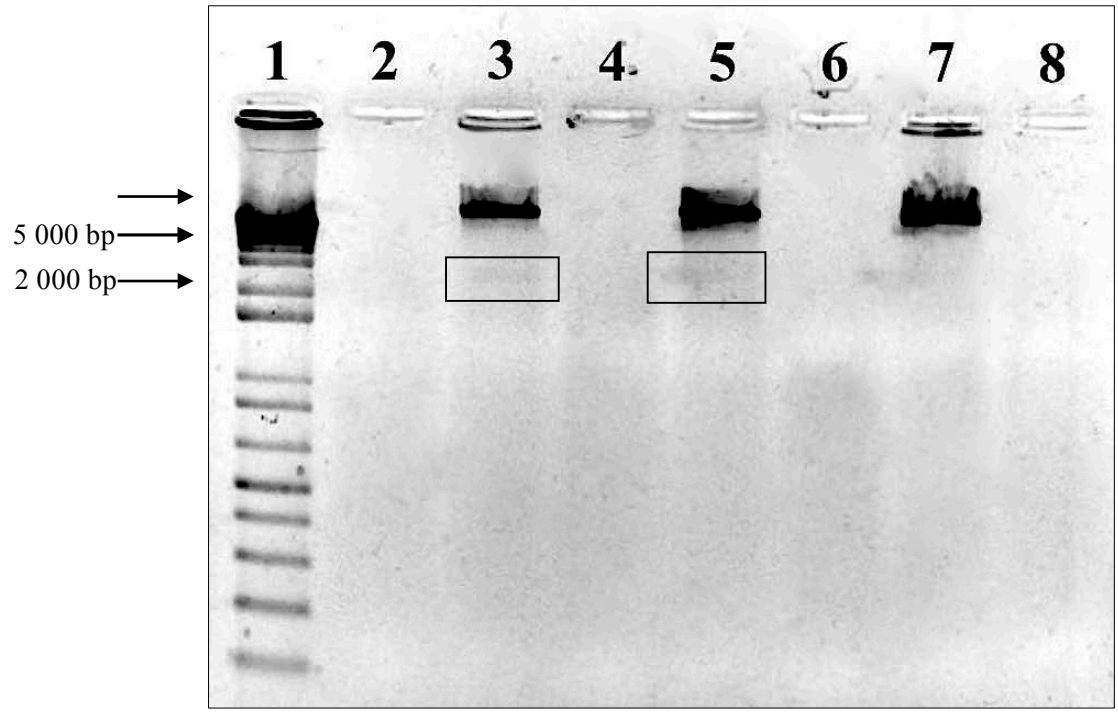
Na slici 9. su prikazani rezultati agarozne gel elektroforeze u 1,0% agaroznom gelu. Na ovom gelu se pri dnu gela vide "mrlje" kod svih uzoraka što može biti posljedica opetovanih zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka u predanalitičkom postupku ili je na gelu sad uočljiva DNA koja nije bila detektirana prijašnjim pokusima. Kako bi se potvrdilo o čemu je točno riječ bilo bi potrebno provesti dodatne pokuse kojima bi se specifičnijim metodama potvrdilo o čemu se radi, npr. sekvenciranjem. Nadalje tumorski plazmatski uzorci ponovo pokazuju jednu intenzivniju vrpcu koja predstavlja genomsku DNA (jažice 3, 5 i 7), dok kontrolni zdravi uzorci i tumorski uzorci seruma (jažice 2, 4, 6 i 8) ne pokazuju nikakve vrpce osim već spomenutih "mrlji" pri dnu gela.

U istraživanju koje su proveli Xue i sur. također je korišten QIAamp protokol te je pokazano kako su QIAamp® DNA mini Kit kolone prikladne za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA (Xue i ostali, 2009). Iako je izolacija slobodne cirkulirajuće DNA moguća pomoću ovih kolona tijekom ovog istraživanja pokazano je kako genomska DNA koja se također nalazi u uzorcima seruma i plazme, može ometati preciznu izolaciju i kvantifikaciju.



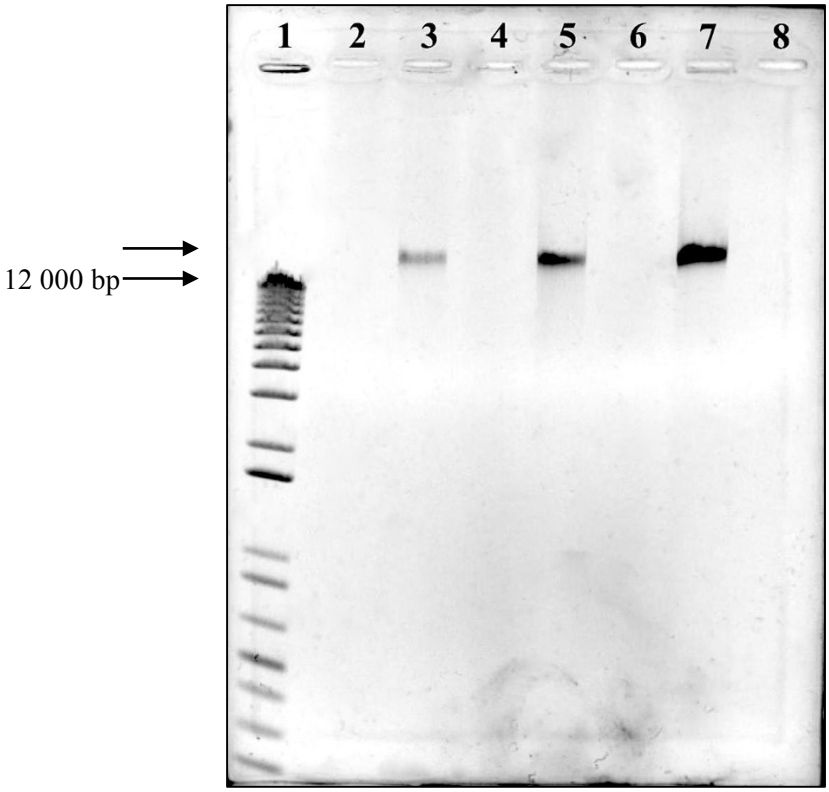
Slika 6 *Agarozna elektroforeza izolata genomske i slobodne cirkulirajuće DNA prema protokolu QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; uzorci: 1 – standard 100 bp, 2 – kontrolni uzorak 12a, 3 – kontrolni uzorak 12b, 4 – tumorski 3 (P0015), 5 – tumorski 17a (S0015), 6 – tumorski 18a (S0041), 7 – standard 1kbp, 8 – genomska DNA (Teo Morožin) [25.03.2016. agarozna elektroforeza, 1,5% agaroza u TBE puferu]; Uzorci označeni u kodu sa S, označuju izolate iz seruma, a P iz plazme.*

Na slici 6. vidljivi su različiti obrasci koji se pojavljuju kod različitih bolesnica, tipa izolati 4 i 6, iako oba tumorskog podrijetla, imaju različite obrasce, dok kod uzorka broj 5 nisu vidljivi fragmenti što odgovara kliničkoj slici bolesnice na terapiji. U ovom radu nisu navedeni svi klinički podaci o pojedinim uzorcima, s obzirom na kompleksnost bolesti i različite terapije, potreban je veći broj uzoraka za specifičnije zaključke.



Slika 7 *Agarozna elektroforeza izolata genomske i slobodne cirkulirajuće DNA prema protokolu QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; uzorci: 1 – standard 1 kbp, 2 – kontrolni uzorak 13a, 3 – tumorski 14a (P0038), 4 – tumorski 19a (S0038), 5 – tumorski 3 (P0015), 6 – tumorski 17a (S0015), 7 – tumorski 15a (P0041), 8 – tumorski 18a (S0041) [12.04.2016. agarozna elektroforeza, 1,5% agaroza u TBE puferu]; Uzorci označeni u kodu sa S, označuju izolate iz seruma, a P iz plazme.*

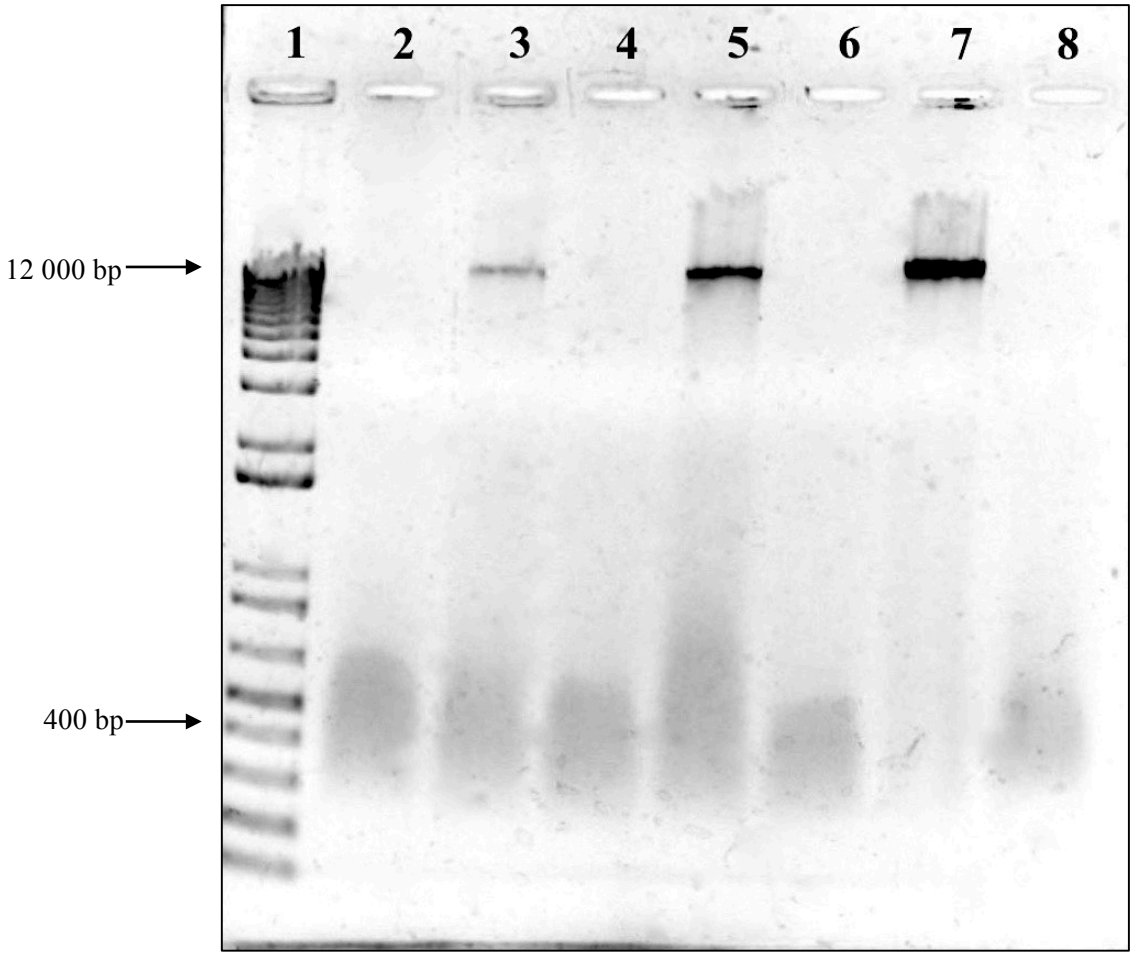
U izolatima na slici 7., vidljiva je velika količina genomske DNA a i vjerojatno iz podataka o absorbanciji možemo zaključiti da je prisutno dosta onečišćenja koja bi nam mogla posljedično smetati u eventualnim daljnjim analizama.



Slika 8 *Agarozna elektroforeza izolata genomske i slobodne cirkulirajuće DNA prema protokolu QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; uzorci: 1 – standard 1 kbp, 2 – kontrolni uzorak 13a, 3 – tumorski 14a (P0038), 4 – tumorski 19a (S0038), 5 – tumorski 3 (P0015), 6 – tumorski 17a (S0015), 7 – tumorski 15a (P0041), 8 – tumorski 18a (S0041) [13.04.2016. agarozna elektroforeza, 0,8% agaroza u TBE puferu]; Uzorci označeni u kodu sa S, označuju izolate iz seruma, a P iz plazme.*

Na slici broj 8, najvjerojatnije se radi o izolatu genomske DNA ili specifičnom fragmentu.

Zapravo različitost dobivenih obrazaca različitih izolata upućuje na dodatnu analizu ovih izolata, ne samo kvantifikacijom, nego zahtijeva detaljniju gensku analizu.



***Slika* 9.** *Agarozna elektroforeza izolata genomske i slobodne cirkulirajuće DNA prema protokolu QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; uzorci: 1 – standard 1 kbp, 2 – kontrolni uzorak 13a, 3 – tumorski 14a (P0038), 4 – tumorski 19a (S0038), 5 – tumorski 3 (P0015), 6 – tumorski 17a (S0015), 7 – tumorski 15a (P0041), 8 – tumorski 18a (S0041) [15.04.2016. agarozna elektroforeza, 1,0% agaroza u TBE puferu]; Uzorci označeni u kodu sa S, označuju izolate iz seruma, a P iz plazme.*

4.2 Specifična izolacija slobodne cirkulirajuće DNA

Za specifičnu izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA korištene su kolone Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit uz pripadajući protokol.

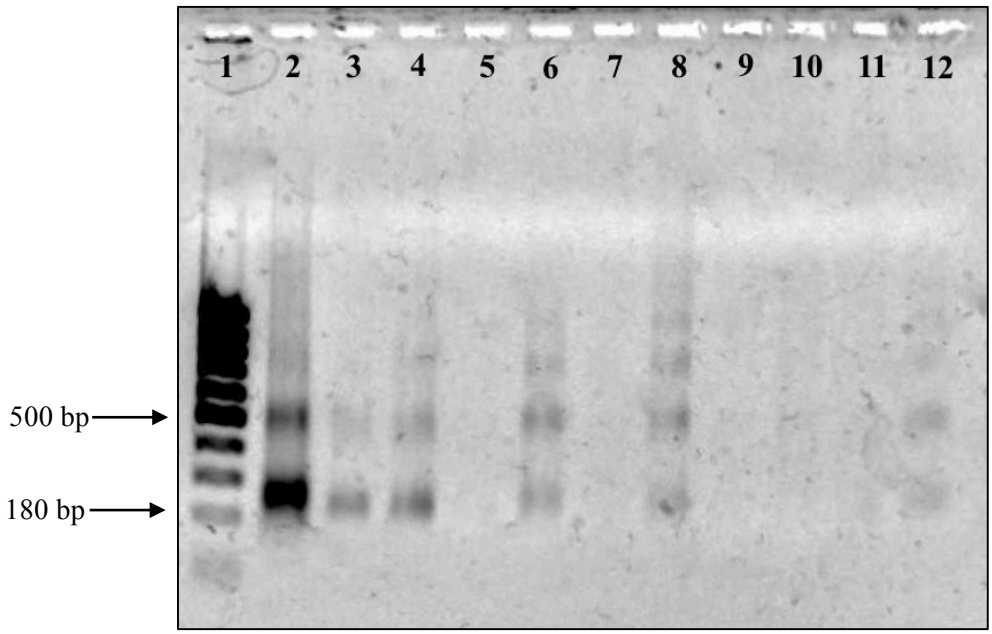
Zatim je provedena agarozna gel elektroforeza uzoraka uz boju GelRed™ u 1,5% agaroznom gelu u trajanju od 30 minuta pri 80 V te su fragmenti DNA vizualizirani na imageru (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences).

Na slikama 10. i 11. prikazani su rezultati agarozne gel elektroforeze uzoraka iz iste serije izolacije.

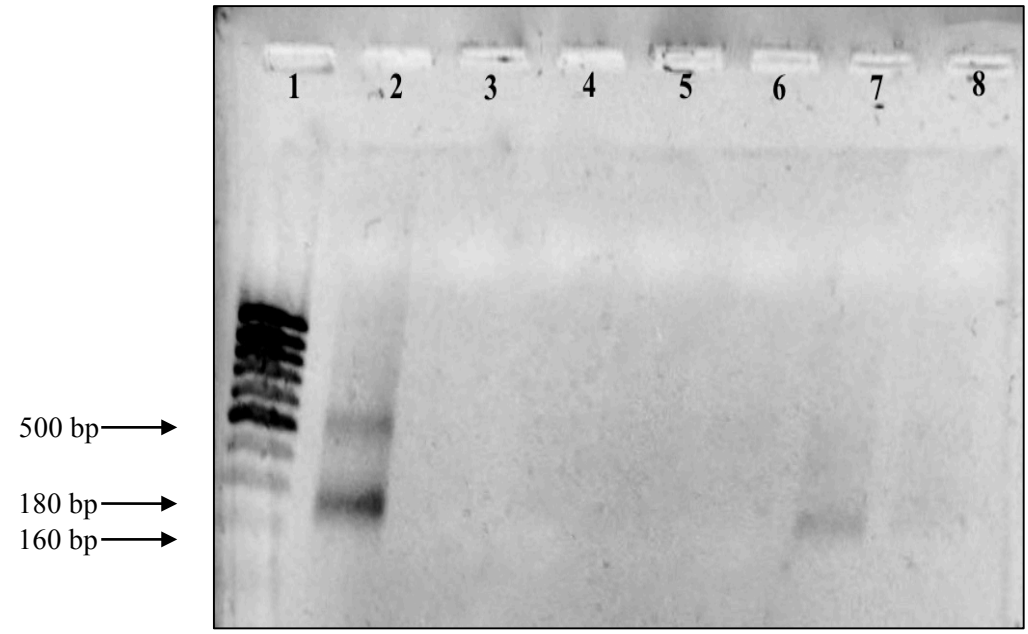
Pri ovoj izolaciji kod pojedinih uzoraka plazme i seruma su vidljive vrpce koje predstavljaju slobodnu cirkulirajuću DNA (približno 180 bp), dok kod nekih uzoraka vrpca nije prisutna iako je nakon spektrofotometrijskog određivanja koncentracije DNA ustanovljena da je u uzorku prisutna određena količina DNA što se može vidjeti u tablici 3.

Nadalje kod uzoraka prikupljenih od zdravih dobrovoljaca vidljive su vrpce puno jačeg intenziteta. Uzroci tome mogu biti različiti. Naime jedan od uzroka bi mogla biti starost kontrolnog uzorka (više od godinu dana) te opetovanja odmrzavanja i zamrzavanja uzoraka. Drugi uzrok pojave ovih vrpca leži u tome da je slobodna cirkulirajuća DNA povišena i kod nekih fizioloških stanja.

Trenutno postoji dostupna samo jedna studija u kojoj su za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA korištene Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit kolone. Tu se radi o istraživanju koje su proveli Mauger i sur., a cilj joj je bio usporediti različite protokole i tipove kolona za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA. Prema njima, navedene kolone imaju kapacitet izolirati dovoljnu količinu slobodne cirkulirajuće DNA iz plazme iako se radi o malim koncentracijama u kojima je ona prisutna u izvornom uzorku (Mauger i sur., 2015).



Slika 10 *Agarozna elektroforeza izolata slobodne cirkulirajuća DNA prema protokolu Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Product # 55100); uzorci: 1 – standard 100bp, 2 – kontrolni, zdravi uzorak 13a, 3 – tumorski P0031, 4 – tumorski S0031, 5 – tumorski P0032, 6 – tumorski S0032, 7 – tumorski P0034, 8 – tumorski S0034, 9 – tumorski P0047, 10 – tumorski S0047, 11 – tumorski P0050, 12 – pozitivna kontrola, tumorski S0038 [22.03.2017. agarozna elektroforeza, 1,5% agaroza u TBE puferu]; Uzorci označeni u kodu sa S, označuju izolate iz seruma, a P iz plazme.*



Slika 11 *Agarozna elektroforeza izolata slobodne cirkulirajuća DNA prema protokoluNorgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Product # 55100); uzorci: 1 – standard 100 bp, 2 – kontrolni, zdravi uzorak 12a, 3 – tumorski P0015*, 4 – tumorski S0015*, 5 – tumorski P0019, 6 – tumorski S0019, 7 – tumorski P0020, 8 – tumorski S0020 [22.03.2017.]; Uzorci označeni u kodu sa S, označuju izolate iz seruma, a P iz plazme.*

4.3 Koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA kod pacijenata oboljelih od raka dojke

Prema rezultatima koji su dobiveni spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije DNA u 10 izolata plazme i pripadajućih 10 izolata seruma pacijentica oboljelih od raka dojke, srednja vrijednost za plazmu je iznosila 12,84 ng/mL, dok je za serum bila 11,55 ng/mL. Za usporedbu su uzeta dva kontrolna uzorka zdravih dobrovoljaca te su kod njih izmjerene koncentracije slobodne cirkulirajuće DNA od 14,07 i 19,27 ng/mL što je više od srednjih vrijednosti kod pacijentica oboljelih od raka dojke. Ovakav rezultat bi se mogao protumačiti "dotrajalošću" uzoraka ili se može raditi o situaciji u kojoj je slobodna cirkulirajuća DNA zbilja povišena kao posljedica specifičnog fiziološkog stanja.

Mjerenje koncentracije slobodne cirkulirajuće DNA u oboljelih od raka dojke provedeno je u različitim studijama te su rezultati bili različiti. Tako su Silva i sur. dobili srednju vrijednost DNA u uzorcima plazme od 135 ng/mL, dok je u njihovom istraživanju srednja

vrijednost koncentracije DNA kod zdravih dobrovoljaca bila 15 ng/mL (Silva i sur., 2002). Međutim, valja naglasiti da u njihovom istraživanju nisu bili korišteni kitovi za specifičnu izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA tako da se unutar ovih vrijednosti vjerojatno nalaze i potencijalna onečišćenja s genomskom DNA.

Studija koju su proveli Gal sur. pokazala je da je medijan koncentracija DNA u serumu mjerenih real-time PCR-om iznosio 221 ng/mL za pacijente te 63 ng/mL za zdrave dobrovoljce (Gal i sur., 2004). I ova studija također prikazuje rezultate ukupne DNA u serumu.

Tablica 3*: Koncentracija slobodne cirkulirajuće DNA u uzorcima određena spktrofotometrijski nakon izolacije pomoću kolona Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit uz pripadajući protokol; na uzorcima označenima s Δ nije provedena agarozna gel elektroforeza.*

OZNAKA UZORKA U ISTAŽIVANJU	**OZNAKA UZORKA U KLINICI**	**KONCENTRACIJA (ng/µL)**
31-1	P0015*	13,24
32-1	P0019	10,57
33-1	P0020	10,23
34-1	P0031	14,45
35-1	P0032	7,16
37-1	P0047	9,59
38-1	P0050	7,95
36-1Δ	P0034	8,09
39-1Δ	P0058	16,95
40-1Δ	P0062	9,38
Srednja vrijednost		**10,76**
31-2	S0015*	16,32
32-2	S0019	13,27
33-1	S0020	11,89
34-2	S0031	14,70
35-2	S0032	10,51
37-2	S0038	9,73

38-2	S0047	9,80
36-2Δ	S0034	13,54
39-2Δ	S0058	10,88
40-2Δ	S0062	15,57
Srednja vrijednost		**12,62**
12a	Z19	14,07
13a	Z31	19,27

Tijekom provođenja ovog istraživanja potvrđene su činjenice iz preglednog rada Perakis i sur. gdje se navodi kako je postupak analize slobodne cirkulirajuće DNA puno složeniji nego rad s "standardnom" genomskom DNA. Naime, mnogo faktora može potencijalno utjecati na koncentraciju i fragmentaciju slobodne cirkulirajuće DNA u predanalitičkim postupcima. Trenutne preporuke za analizu slobodne cirkulirajuće DNA uključuju: (1) korištenje plazme kao uzorka umjesto seruma kako bi se izbjegla kontaminacija s genomskom DNA, (2) procesiranje uzorka unutar 3 sata otkad je uzet uzorak u epruveti sa EDTA, (3) centrifugiranje pri velikim brzinama kako bi se odstranile potencijalno zaostale stanice u plazmi, (4) ponovljeno centrifugiranje pri visokim brzinama, (5) izbjegavanje opetovanog odmrzavanja i zamrzavanja plazme ili uzoraka koji sadrže izoliranu slobodnu cirkulirajuću DNA, (6) pohranjivanje plazme pri -80ºC (Perakis i ostali, 2017).

5 ZAKLJUČCI

- Za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA puno su prikladniji kitovi koji omogućuju njenu specifičnu izolaciju kako bi se eliminirala prisutnost genomske DNA koja ometa točnu kvalitativnu i kvantitativnu analizu slobodne cirkulirajuće DNA
- Od sviju provedenih izolacija najbolja je Norgen metoda za izolaciju; daje najbolji prinos i kvalitetu DNA, te najspecifičnije fragmente
- S uzorcima plazme ili seruma koji će biti korišteni za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA treba se predanalitički specifično postupati. Preporuka je provesti izolaciju unutar nekoliko sati od uzorkovanja, a ukoliko to nije moguće uzorke pohraniti na -20 °C do postupka izolacije
- Uzorci se ne smiju opetovano odmrzavati i zamrzavati te bi se izolacije trebala obaviti u što kraćem roku nakon sakupljanja uzoraka.
- Kontrolni uzorci zdravih dobrovoljaca trebaju biti reprezentativni s obzirom na to da je razina slobodne cirkulirajuće DNA povišena i pri određenim fiziološkim stanjima. Stoga i pri potencijalnom korištenju slobodne cirkulirajuće DNA kao biomarkera za rak dojke, potrebno je provesti kvalitetnu diferencijalnu dijagnostiku.

6 LITERATURA

Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Mol Diagnosis Ther,* 2015, 19, 339-350.

Breast Cancer Screening (PDQ®)–Patient Version, 2017, https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-screening-pdq#section/all, pristupljeno 15.06.2017.

Brnić Z, Brkljačić B, Drinković I, Jakić-Razumović J, Kardum-Skelin I, Krajina Z i sur. Kliničke smjernice za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnika s neinvazivnim rakom dojke. *Liječnički Vjesn,* 2012*,* 9-10, 259-265.

Canzoniero JVL, Park BH. Use of cell free DNA in breast oncology. *Biochim BiophysActa - Rev Cancer*, 2016, 1865, 266-274.

Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2014, str. 645.

European medicines agency, 2017, http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001016/human_med_000857.jsp&mid=WC0b01ac058001d124, pristupljeno 18.06.2017.

Gal S, Fidler C, Lo Y, Taylor M, Han C, Moore J i sur. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br J Cancer*, 2004, 90, 1211-1215.

Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach. Sunderland, ASM Pess, 2014, str. 167.

Gradishar WJ, Anderson BO, Fred VC, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ i sur. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Brest Cancer. *National Comprehensive Cancer Network*, 2017.

Mandel P, Metais P. Les acides nuclei ques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil,* 1948, 142, 241-243.

Mauger F, Dulary C, Daviaud C, Deleuze JF, Tost J. Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma. *Anal Bioanal Chem,* 2015, 407, 6873-6878.

MSD priručnik dijagnostike i terapije, 2014, http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/bolesti-dojke/rak-dojke, pristupljeno 15. 06. 2017.

Nicholl DST. An Introduction to Genetic Engineering. New York, Cambridge University Press, 2008, str. 34.

Orphanos G, Kountourakis P. Targeting the HER2 Receptor in Metastatic Breast Cancer. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2012, 5, 127-137.

Perakis S, Auer M, Belic J, Heitzer E. Advances in Circulating Tumor DNA Analysis, *Adv Clin Chem*. 2017, 80, 73-153.

Ranuncolo SM. Liquid Biopsy in Liquid Tumors. *J Cancer Ther,* 2017, 8, 302-320.

Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, Conteduca V, Tedaldi G, Calistri D, Casadio V. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther,* 2016, 9, 6549-6559.

Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Incidencija raka u Hrvatskoj. *Registar za rak Republike Hrvatske 2014*, 2014, 1, 1–44.

Silva JM, Silva J, Sanchez A, Garcia JM, Dominguez G, Provencio M i sur. Tumor DNA in Plasma at Diagnosis of Breast Cancer Patients Is a Valuable Predictor of Disease-free Survival. *Clin Cancer Res*, 2002, 8, 3761-3766.

Whatis gel electrophoresis?, 2017, http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis, pristupljeno 01. 07. 2017.

Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta*, 2009, 404, 100-104

7 SAŽETAK/SUMMARY

Rak dojke najčešći je maligni tumor te prvi po mortalitetu od raka u žena u Hrvatskoj. Po svojoj molekularnoj osnovi, postoji 5 podtipova raka dojke: luminalni tip A, luminalni tip B, bazalni tip, HER2 pozitivan i normalni tip. Ovi tipovi se međusobno razlikuju prema prisutnosti i zastupljenosti pojedinih vrsta receptora, a njihovo određivanje je bitno za definiranje terapije te procjenu ishoda liječenja. Trenutne metode koje se koriste pri dijagnostici raka dojke su: citološka dijagnostika, patohistološka dijagnostika, radiološka dijagnostika, magnetska rezonancija dojki, biopsija sentinelnog limfnog čvora.

Slobodna cirkulirajuća DNA obuhvaća fragmente nukleinskih kiselina koji cirkuliraju plazmom, serumom ili nekom drugom tjelesnom tekućinom izvan stanice te se uglavnom radi o fragmentima dvolančane DNA veličine do 200 baznih parova. Različita istraživanja su pokazala kako je razina slobodne cirkulirajuće DNA povišena u različitim malignim stanjima pa tako i u raku dojke. Međutim i dalje postoje prepreke za njenu upotrebu kao novog biomarkera u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Cilj ovog istraživanja bio je pridonijeti optimiranju metode izolacije slobodne cirkulirajuće DNA u raku dojke. U tu svrhu su korištene različite metode tj. kolone za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA. Istraživanje je pokazalo kako je za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA potrebna upotreba specifičnih kolona kako bi izolacija bila provedena bez tragova genomske DNA koji ometaju detekciju i kvantifikaciju. Također potrebno je oprezno rukovanje s uzorcima, bez opetovanih odmrzavanja i zamrzavanja, s obzirom na to da je slobodna cirkulirajuća DNA manje stabilna od genomske DNA. Nadalje pri usporedbi s kontrolnim uzorcima zdravih dobrovoljaca potreban je njihov pažljiv odabir te dobra diferencijalna dijagnostika jer razina slobodna cirkulirajuća DNA može biti povišena i pri određenim fiziološkim stanjima.

Breast cancer is the most common malignancy in women and the first most common cause of cancer death among the female population in Croatia. On molecular basis, there are 5 subtypes of breast cancer: luminal A, luminal B, basal, HER positive and normal type. Those types have different expression level of certain receptors what is important for the choice of therapy and its outcome. Current methods used in breast cancer diagnosis are: cytological diagnostic, histopathological diagnostic, radiological diagnostic, magnet resonance of breasts, the biopsy of sentinel lymph node.

Circulating cell free DNA are nucleic acids fragments that circulate in plasma, serum and other bodily fluids outside of cells. Those fragments are composed of double stranded DNA and their size is up to 200 base pairs. Various researches have demonstrated that the level of circulating cell free DNA is elevated in malignancy therefore in breast cancer as well. However, there are still obstacles for its everyday use in clinical practice as a new biomarker.

The aim of this research was to contribute to the optimization of isolation of circulating cell free DNA in breast cancer. Different methods and kits for isolations were used. The results showed that for isolation of circulating cell free DNA the specific kits for isolation should be used to eliminate the traces of genomic DNA which may interrupt detection and quantification of cell free DNA. Moreover, the handling with the samples should be very careful, without several freezing and defrosting steps because cell free DNA has the lower level of stability than genomic DNA. Last but not least, considering that level of circulating cell free DNA can be elevated in several physiological conditions, the choice of healthy volunteers should be done very carefully and the differential diagnostic should be done as well.

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

Optimiranje izolacije slobodne cirkulirajuće DNA u bolesnica oboljelih od raka dojke

Teo Morožin

SAŽETAK

Rak dojke najčešći je maligni tumor te prvi po mortalitetu od raka u žena u Hrvatskoj. Po svojoj molekularnoj osnovi, postoji 5 podtipova raka dojke: luminalni tip A, luminalni tip B, bazalni tip, HER2 pozitivan i normalni tip. Ovi tipovi se međusobno razlikuju prema prisutnosti i zastupljenosti pojedinih vrsta receptora, a njihovo određivanje je bitno za definiranje terapije te procjenu ishoda liječenja. Trenutne metode koje se koriste pri dijagnostici raka dojke su: citološka dijagnostika, patohistološka dijagnostika, radiološka dijagnostika, magnetska rezonancija dojki, biopsija sentinelnog limfnog čvora.

Slobodna cirkulirajuća DNA obuhvaća fragmente nukleinskih kiselina koji cirkuliraju plazmom, serumom ili nekom drugom tjelesnom tekućinom izvan stanice te se uglavnom radi o fragmentima dvolančane DNA veličine do 200 baznih parova. Različita istraživanja su pokazala kako je razina slobodne cirkulirajuće DNA povišena u različitim malignim stanjima pa tako i u raku dojke. Međutim i dalje postoje prepreke za njenu upotrebu kao novog biomarkera u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Cilj ovog istraživanja bio je pridonijeti optimiranju metode izolacije slobodne cirkulirajuće DNA u raku dojke. U tu svrhu su korištene različite metode tj. kolone za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA. Istraživanje je pokazalo kako je za izolaciju slobodne cirkulirajuće DNA potrebna upotreba specifičnih kolona kako bi izolacija bila provedena bez tragova genomske DNA koji ometaju detekciju i kvantifikaciju. Također potrebno je oprezno rukovanje s uzorcima, bez opetovanih odmarzavanja i zamrzavanja, s obzirom na to da je slobodna cirkulirajuća DNA manje stabilna od genomske DNA. Nadalje pri usporedbi s kontrolnim uzorcima zdravih dobrovoljaca potreban je njihov pažljiv odabir te dobra diferencijalna dijagnostika jer razina slobodna cirkulirajuća DNA može biti povišena i pri određenim fiziološkim stanjima.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 11 grafičkih prikaza, 3 tablice i 21 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: rak dojke, slobodna cirkulirajuća DNA, biomarker, optimiranje

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Olga Gornik, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

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

Optimization of isolation of circulating cell-free DNA in breast cancer

Teo Morožin

SUMMARY

Breast cancer is the most common malignancy in women and the first most common cause of cancer death among the female population in Croatia. On molecular basis, there are 5 subtypes of breast cancer: luminal A, luminal B, basal, HER positive and normal type. Those types have different expression level of certain receptors what is important for the choice of therapy and its outcome. Current methods used in breast cancer diagnosis are: cytological diagnostic, histopathological diagnostic, radiological diagnostic, magnet resonance of breasts, the biopsy of sentinel lymph node.

Circulating cell free DNA are nucleic acids fragments that circulate in plasma, serum and other bodily fluids outside of cells. Those fragments are composed of double stranded DNA and their size is up to 200 base pairs. Various researches have demonstrated that the level of circulating cell free DNA is elevated in malignancy therefore in breast cancer as well. However, there are still obstacles for its everyday use in clinical practice as a new biomarker.

The aim of this research was to contribute to the optimization of isolation of circulating cell free DNA in breast cancer. Different methods and kits for isolations were used. The results showed that for isolation of circulating cell free DNA the specific kits for isolation should be used to eliminate the traces of genomic DNA which may interrupt detection and quantification of cell free DNA. Moreover, the handling with the samples should be very careful, without several freezing and defrosting steps because cell free DNA has the lower level of stability than genomic DNA. Last but not least, considering that level of circulating cell free DNA can be elevated in several physiological conditions, the choice of healthy volunteers should be done very carefully and the differential diagnostic should be done as well.

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

Thesis includes: 38 pages, 11 figures, 3 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: breast cancer, circulating cell-free DNA, biomarker, optimization

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

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

The thesis was accepted: July 2017.