

# Utvrđivanje prisustva TGF- $\beta$ 1 metodama tekuće i tkivne biopsije kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom

---

Bašić, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:957422>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



**Tamara Bašić**

**Utvrdjivanje prisustva TGF- $\beta$ 1 metodama tekuće  
i tkivne biopsije kod pacijenata s kolorektalnim  
karcinomom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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

*Prije svega zahvaljujem se mentorici, doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura, na pruženoj prilici, prenesenom znanju i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Od srca hvala mojoj obitelji, dečku i prijateljima na vjeri u mene i motivaciji tijekom cijelog školovanja. Uz vašu ljubav i podršku sve je lakše i ljepše!*

Rad je financiran sredstvima projekta IP-2019-04-4624 Hrvatske zaklade za znanost.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. KOLOREKTALNI KARCINOM .....	1
1.2. ETIOLOGIJA .....	2
1.3. PREVENCIJA I RANA DIJAGNOSTIKA .....	4
1.4. TEKUĆA BIOPSIJA .....	5
1.5. EGZOSOMI .....	7
1.6. TRANSFORMIRAJUĆI ČIMBENIK RASTA $\beta$ .....	9
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	11
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	12
3.1. ISPITANICI .....	12
3.2. PRIPREMA UZORAKA PLAZME .....	12
3.3. IZOLACIJA EGZOSOMA .....	13
3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA .....	14
3.5. WESTERN BLOT ANALIZA .....	15
3.6. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA TKIVA .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	19
4.1. KONCENTRACIJA PROTEINA .....	19
4.2. ODREĐIVANJE TGF- $\beta$ 1 WESTERN BLOT ANALIZOM .....	21
4.3. KVANTIFIKACIJA TGF- $\beta$ 1 .....	23
4.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA TKIVA DOBIVENOG BIOPSIJOM .....	24
4.5. RASPRAVA .....	25
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	27
<b>6. POPIS KRATICA</b> .....	28
<b>7. LITERATURA</b> .....	29
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	32
8.1. SAŽETAK .....	32
8.2. SUMMARY .....	33

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1. KOLOREKTALNI KARCINOM

Kolorektalni karcinom (CRC, engl. *colorectal cancer*) zloćudna je bolest debelog crijeva koja zahvaća obodno crijevo (kolon) i ravno crijevo (rektum). Stijenka debelog crijeva građena je od tri sloja: sluznice kroz čije se nabore odvija apsorpcija hranjivih tvari, mišićnog sloja te vezivnog sloja prekrivenog seroznom ovojnicom. Zbog konstantne izloženosti vanjskim čimbenicima i specifične uloge u apsorpciji hranjivih tvari, debelo crijevo ima očuvanu visoku razinu stanične regeneracije, što mu ujedno povećava i mogućnost razvoja raznih patologija. Kolorektalni karcinom najčešće započinje malignom preobrazbom epitelnih stanica u sluznici odakle se širi u druge dijelove crijevne stijenke te u okolna tkiva i organe (Arvelo i sur., 2015).

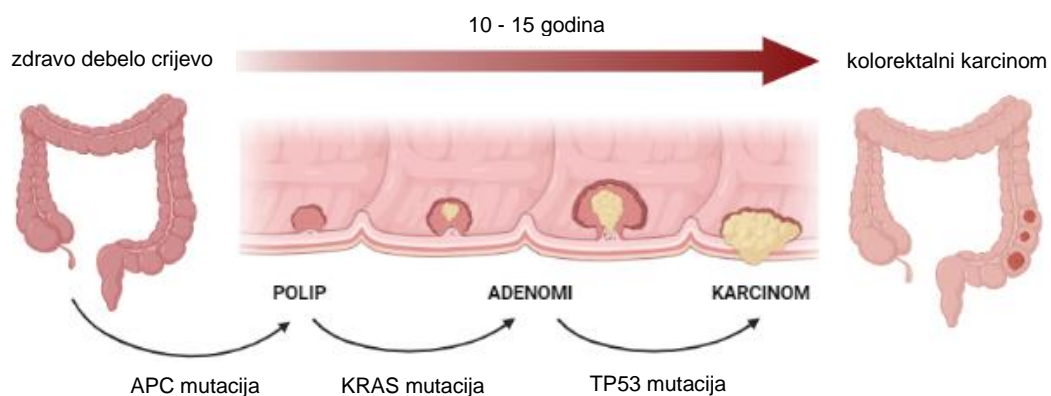
Prevalencija kolorektalnog karcinoma posljednjih je godina u stalnom rastu te predstavlja ozbiljan zdravstveni problem na svjetskoj razini. 10 % svih dijagnosticiranih slučajeva karcinoma u svijetu otpada na kolorektalni karcinom (Ciardiello i sur., 2022). Smatra se da je godišnje dijagnosticiran kod gotovo 2 milijuna ljudi, što ga po incidenciji stavlja na treće mjesto u svijetu, odmah iza raka dojke i raka pluća (Sung i sur., 2021). Češće je dijagnosticiran kod muškaraca nego kod žena, a posebno je zabrinjavajuća činjenica sve veće incidencije u mlađoj populaciji (Xi i Xu, 2021).

U Republici Hrvatskoj kolorektalni je karcinom najčešći novodijagnosticirani rak te je, kao i u svijetu, drugi najčešći uzrok smrti od raka, nakon raka pluća. Godišnje prosječno oboli preko 3600 osoba, od čega je 60 % muškaraca. Češći je kod osoba starije životne dobi, međutim skoro petina oboljelih mlađa je od 60 godina. Trend mortaliteta stabilan je posljednjih 10 godina, no pojavnost kolorektalnog karcinoma je u porastu, oko 1 % godišnje u posljednjih 20 godina. Uspoređujući se s drugim europskim zemljama, Republika Hrvatska nalazi se na 9. mjestu po pojavnosti, a na visokom 2. mjestu po smrtnosti. Ovi podaci ukazuju na to da postoji puno prostora za nužan napredak na svim razinama prevencije i rane dijagnostike kolorektalnog karcinoma ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)).

## 1.2. ETIOLOGIJA

Kolorektalni karcinom heterogena je bolest čiju je klasifikaciju neophodno odrediti kako bi postavljanje dijagnoze te određivanje terapije i prognoze bolesti bilo što učinkovitije (Li i sur., 2021). Molekularnu pozadinu same bolesti čine mutacije u onkogenima, tumor supresorskim genima i genima uključenim u mehanizam popravka DNA. Ovisno o tipu nastalih mutacija, kolorektalne karcinome dijelimo na sporadične i one s nasljednom komponentom (Mármol i sur., 2017).

Karcinome čiji su uzrok točkaste mutacije koje se pojavljuju spontano tijekom staničnog ciklusa nazivamo sporadičnima i oni čine 70 % svih kolorektalnih karcinoma (Mármol i sur., 2017). Međutim, kod velikog broja sporadičnih karcinoma prepoznat je određen slijed mutacija koji daje specifičnu kliničku sliku. Prva promjena javlja se u tumorskom supresorskom *APC* genu (engl. *adenomatous polyposis coli gene*) koji mutacijom gubi svoju funkciju i to izaziva formiranje polipa unutar sluznice debelog crijeva. Polipom se smatra svaka makroskopski vidljiva novotvorina. Postepeno slijedi aktivacija *KRAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*) onkogeni nakon čega stvoreni polipi rastu u adenome. Konačno, mutacijom u tumorskom supresorskom *TP53* (engl. *tumor protein 53*) genu, čija je mutacija prisutna u preko 50 % svih karcinoma (Marei i sur., 2021), adenomi spontano prelaze u karcinom (Hossain i sur., 2022). Upravo takav slijed očekuje se u otprilike 15 % slučajeva, deset do petnaest godina nakon početnog stvaranja polipa (Mármol i sur., 2017).



Slika 1. Razvoj kolorektalnog karcinoma (napravljeno pomoću BioRender.com prema Hossain i sur., 2022)

S druge strane, oko 25 % pacijenata s kolorektalnim karcinomom ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za ovu bolest, što jasno upućuje na njenu nasljednu komponentu. Ovakvi nasljedni karcinomi debelog crijeva mogu se na osnovu stvaranja polipa u početnom stadiju bolesti podijeliti u dva glavna tipa: sindrom obiteljske adenomatozne polipoze (FAP, engl. *familial adenomatous polyposis*) i nasljedni nepolipozni rak debelog crijeva (HNPCC, engl. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*). FAP je rijetka autosomno dominantna bolest povezana s delecijom 5q21 kromosoma (*APC* gena), a obilježena je pojavom mnogobrojnih malignih polipa uzduž debelog crijeva. HNPCC je također autosomno dominantna bolest, javlja se češće od FAP-a, no nije karakterizirana pojavom polipa, već su osnova bolesti nasljedne mutacije u genima uključenim u mehanizam popravka DNA. Najčešće se radi o skupu mutacija koje se nazivaju Lynchov sindrom. Karcinom u tom slučaju nastaje iz adenoma, bez razvijanja polipoze (Brkić i Grgić, 2006).

Za razvoj kolorektalnog karcinoma odgovorna je složena interakcija između prethodno opisanih nasljednih promjena i vanjskih čimbenika (Brkić i Grgić, 2006). Zajedno se nazivaju rizičnim čimbenicima, a uključuju sve okolnosti koje pogoduju eventualnom nastanku bolesti. Manjak fizičke aktivnosti, pretilost (pogotovo kod muškaraca), prehrana bogata crvenim i prerađenim mesom, pušenje te prekomjeran unos alkohola zdravstveni su problemi današnjice za koje je dokazano da uvelike povećavaju i rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)). Na sve njih može se utjecati promjenom životnih navika čime se smanjuje rizik i od brojnih drugih zdravstvenih problema. Čimbenici na koje se ne može utjecati, a također povećavaju rizik su pozitivna obiteljska anamneza, starija životna dob te postojanje neke od upalnih bolesti crijeva. Kod ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti zbog dugotrajne upale crijevne stijenke dolazi do displazije njenih stanica koje s vremenom mogu postati maligne (Shah i sur., 2022).

### 1.3. PREVENCIJA I RANA DIJAGNOSTIKA

Kolorektalni je karcinom u početnim stadijima bez simptoma. Kad se oni pojave, a obično uključuju abdominalnu bol uz rektalno krvarenje i posljedičnu anemiju, bolest je već u znatno uznapredovanom stadiju. Rana je detekcija stoga ključna za poboljšanje prognoze bolesti, prevenciju metastaza te smanjenje smrtnosti. Upravo su s tim ciljem prije više od deset godina predloženi i usvojeni populacijski programi probira u brojnim razvijenim zemljama, čime je omogućeno otkrivanje kolorektalnog karcinoma u ranijoj, asimptomatskoj fazi bolesti (Xi i Xu, 2021).

Postoji nekoliko različitih testova probira, od kojih svaki ima svoje prednosti i ograničenja. Najvažnija karakteristika testa probira njegova je osjetljivost, što je postotak oboljelih osoba koje dobiju pozitivan rezultat testa. Također je važna i visoka specifičnost, što je postotak osoba bez bolesti s negativnim rezultatom. Osjetljivost i specifičnost zajedno definiraju točnost testa. Ona je ključna pri uvrštavanju pojedinog testa u program probira jer lažno pozitivni rezultati uzrokuju nepotrebno praćenje pacijenata, dok lažno negativni rezultati mogu dovesti do propuštenog otkrivanja bolesti (Simon, 2016).

Kolonoskopija je trenutni referentni test u probiru na kolorektalni karcinom. To je endoskopska metoda koja omogućuje vizualizaciju sluznice debelog crijeva te se smatra zlatnim standardom u dijagnostici zbog njene specifičnosti koja je veća od 95 %. Preporučuje se svakih 10 godina kod osoba s umjerenim rizikom u dobi od 50 godina ili starijih. Jedna od najvećih prednosti kolonoskopije jest mogućnost uklanjanja polipa koji potencijalno mogu postati maligni, čime se sprječava pojava same bolesti. Međutim, postoje i brojna ograničenja kolonoskopije poput invazivnosti i pripreme za postupak koji je pacijentima često neugodan. Također, postoji rizik od krvarenja, kao i perforacije crijeva tijekom kolonoskopije. Ova ograničenja pridonose niskoj suradljivosti pacijenata, zbog čega se kao prvi test probira u mnogim zemljama provodi testiranje na okultno fekalno krvarenje (Simon, 2016). Test okultnog krvarenja odnosi se na dokazivanje oku nevidljivog krvarenja iz probavnog trakta, a temelji se na peroksidativnoj aktivnosti hemoglobina u stolici. Ovi testovi jednostavni su i prikladni za uporabu na velikom broju ispitanika zbog čega su dobro prihvaćeni u populaciji, no zbog niže specifičnosti prisutan je velik broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Navedeno se može poboljšati naknadnim testiranjem pozitivnih osoba imunokemijskim testovima specifičnim za ljudski hemoglobin (Brkić i Grgić, 2006).



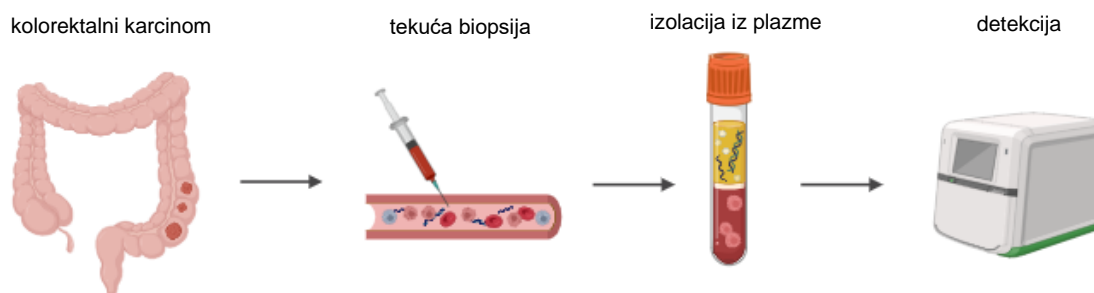
U Republici Hrvatskoj od 2008. godine provodi se Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva. Svake dvije godine pozivaju se sve žene i muškarci u dobi od 50. do navršene 74. godine da naprave kartični test na okultno fekalno krvarenje u stolici. Osobe s pozitivnim nalazom upućuju se zatim na probirnu kolonoskopiju, a one s negativnim nalazom testiranje ponavljaju u sljedećem ciklusu. Dobni raspon i način provedbe programa u skladu je s preporukama Europske komisije. Udio testiranih osoba je oko 25 %, s većim odazivom u starijoj dobnoj skupini. Međutim, takav odaziv još uvijek nije dostatan da se počnu ostvarivati dugoročni ciljevi Nacionalnog programa, zbog čega je potrebno bolje informirati javnost uz edukaciju i sveobuhvatnu kampanju kojom će se promicati ovakav preventivni program ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)).

#### **1.4. TEKUĆA BIOPSIJA**

Trenutni terapijski pristupi za liječenje kolorektalnog karcinoma najčešće uključuju kirurško liječenje, kemoterapiju ili imunoterapiju. Međutim, zbog lošeg odgovora mnogih pacijenata na trenutne strategije liječenja, a obzirom da stopa preživljenja uvelike ovisi o ranoj dijagnozi, potrebni su pouzdani biljezi koji bi mogli predvidjeti terapijski odgovor što je ranije moguće. Tkivna biopsija, nakon koje slijedi imunohistokemijska analiza, smatra se zlatnim standardom u svrhu klasifikacije tumora. Unatoč njenim brojnim prednostima, glavni nedostatak jest invazivnost same metode. Također, dobiveni uzorak tkiva ponekad je premalen da predstavlja tumor u cijelosti, što može dovesti do krive interpretacije rezultata (Zhou i sur., 2022).

Zbog navedenih ograničenja razvila se potreba za razvojem minimalno invazivne metode kojom bi se omogućio probir visokorizične populacije i otkrivanje asimptomatskih pacijenata u ranoj fazi bolesti, kad je stopa izlječivosti viša (Zhou i sur., 2022). Trenutno su karcinoembrionalni antigen (CEA) i karbohidratni antigen 19-9 (CA 19-9) jedini biljezi koji se koriste u kliničkoj praksi, no nisu pogodni za profiliranje i praćenje bolesti zbog niske specifičnosti za kolorektalni karcinom (Verbanac i sur., 2021).

Zadnjih godina razvijena je stoga metoda tekuće biopsije koja predstavlja inovaciju u području onkološke dijagnostike. Neinvazivna je i ponovljiva metoda kojom se iz uzoraka tjelesnih tekućina (najčešće krvi, mokraće i sline) izoliraju elementi porijeklom iz tumorskog tkiva, a čijom je analizom omogućeno kontinuirano praćenje tijeka bolesti. Glavni elementi tumorskog tkiva prisutni u tjelesnim tekućinama su cirkulirajuće tumorske stanice, cirkulirajuća tumorska DNA te egzosomi. Iako tekuća biopsija zahtjeva specifične metode izolacije i analize pojedinih elemenata, može se primijeniti za određivanje prognoze bolesti, praćenje njene progresije, kao i za procjenu odgovora na terapiju (Periša i sur., 2017).



Slika 2. Princip tekuće biopsije (napravljeno pomoću BioRender.com prema Delcuratolo i sur., 2023)

Prednosti u odnosu na tkivnu biopsiju su brojne. Tekuća biopsija minimalno je invazivna te brža i jeftinija metoda što osigurava bolju suradljivost pacijenata prilikom uzorkovanja. Također, ovom metodom postoji mogućnost analize elemenata porijeklom iz eventualnih metastaza, a ne samo iz primarnog tumora. Time se može procijeniti molekularna heterogenost tumora, što nije moguće prilikom tkivne biopsije kada se analizira samo mali dio uzetog tkiva. Isto tako, postupak tekuće biopsije može se provoditi serijski kako bi se promatrala dinamika bolesti, promjene nastale uslijed terapije te eventualno otkrivanje minimalne ostatne bolesti. Međutim, unatoč navedenim prednostima postoje i ograničenja zbog kojih tekuća biopsija još uvijek nije u potpunosti zaživjela u kliničkoj praksi. Koncentracija elemenata porijeklom iz tumora u tjelesnim je tekućinama često vrlo mala, što uzrokuje poteškoće u izolaciji te interpretaciji dobivenih rezultata. Također, potrebno je provesti standardizaciju među različitim laboratorijima čime bi se omogućila uspješna interpretacija dobivenih rezultata (Nikanjam i sur., 2022).

Rezultate tekuće biopsije potrebno je stoga kombinirati i interpretirati usporedno s patološkim nalazima tkivne biopsije prije konačne validacije metode i uvođenja u kliničku praksu. Potrebno je razmotriti i način na koji bi patolog trebao biti uključen u tumačenje rezultata tekuće biopsije u kontekstu optimalne procjene pacijentove dijagnoze (Verbanac i sur., 2021).

## 1.5. EGZOSOMI

Egzosomi, zajedno s mikrovezikulama i apoptotskim tjelešcima, pripadaju skupini izvanstaničnih vezikula. Smatraju se nanovezikulama zbog svog promjera koji je između 30 i 120 nm. Sastavljeni su od fosfolipidnog dvosloja koji potječe iz multivezikularnog tijela nastalog tijekom endocitoze, a obzirom da cirkuliraju unutar tjelesnih tekućina moguće ih je izolirati metodom tekuće biopsije (Verbanac i sur., 2021). Gotovo sve stanice sisavaca otpuštaju egzosome i pod utjecajem su njihovog signaliziranja. U njih se, osim tumorskih stanica, ubrajaju i adipociti, mikroglia te imunosne stanice u brojnim fiziološkim i patološkim stanjima. Egzosomi izvedeni iz tumorskih stanica također mogu regulirati metabolizam endotelne stanice kako bi pospješili angiogenezu, posebno u hipoksičnim stanjima (Zhang i sur., 2019). Postoje dokazi o potencijalnoj ulozi egzosoma u raznim biološkim događajima, kao što je međustanična komunikacija, stanična signalizacija, regeneracija tkiva, imunoregulacija te razvoj raka i metastaza, zbog jedinstvene sposobnosti da prenose različit stanični sadržaj, uključujući DNA, RNA i proteine (Verbanac i sur., 2021).

Tumorske stanice općenito proizvode više egzosoma od normalnih stanica (Zhang i sur., 2019), a egzosomi nastali iz tumorskog tkiva sadrže unutarstanične proteine porijeklom iz tumora. Neki od njih, kao što je TGF- $\beta$ , mogu se koristiti za rano otkrivanje CRC-a. Nedavna analiza proteina egzosoma izoliranih iz krvi pacijenata s CRC-om i iz krvi zdravih dobrovoljaca pokazala je da su razine proteina uključenih u remodeliranje izvanstaničnog matriksa, međustaničnu komunikaciju i staničnu signalizaciju povećane kod pacijenata s CRC-om. Navedena činjenica pruža mogućnost da se na minimalno invazivan način, analizom egzosoma izoliranih iz tjelesnih tekućina, donose zaključci o tumorskom tkivu (Verbanac i sur., 2021).

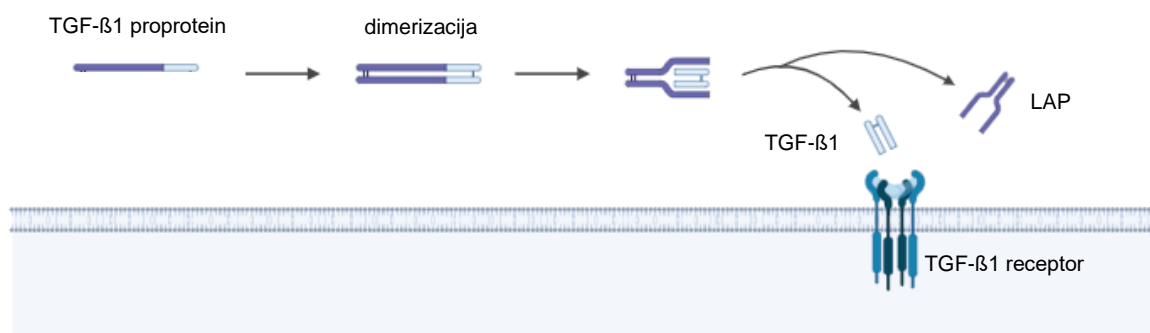
U usporedbi s drugim izvanstaničnim vezikulama, egzosomi najviše obećavaju kao biljezi jer nose genetičku informaciju o stanicama iz kojih potječu, stabilni su u cirkulaciji te ih ima dovoljno za uspješno provođenje izolacije (Zhou i sur., 2022). Razvijeno je nekoliko metoda izolacije egzosoma iz tjelesnih tekućina, a koriste se ovisno o namjeni izolacije i analizama koje slijede nakon iste. Zlatnim standardom smatra se ultracentrifugiranje, to je najčešće korištena metoda, a uključuje diferencijalno centrifugiranje te centrifugiranje u gradijentu gustoće. Tijekom diferencijalnog centrifugiranja brzina se postepeno povećava svakim uzastopnim korakom centrifugiranja čime se redom odvajaju stanice i druge vezikule, dok se na kraju primjenom najveće brzine talože egzosomi. Tijekom centrifugiranja u gradijentu gustoće čestice se razdvajaju u slojeve ovisno o njihovoj gustoći, dok su u mediju gustoće koja se povećava odozgo prema dolje. Navedenom metodom dobivaju se egzosomi iznimne čistoće. Izolacija egzosoma moguća je i metodama koje se temelje na različitoj veličini čestica, obzirom na fiksni promjer egzosoma. Ultrafiltracija je najčešće korištena takva metoda, a temelji se na korištenju membranskih filtera s porama određene veličine u kojima zaostaju čestice koje se razdvajaju. Metoda je jednostavna, no postoji nedostatak niskog prinosa. Trenutno je stoga često u primjeni kombinacija ultrafiltracije i ultracentrifugiranja, pri čemu se ultrafiltracija koristi za uklanjanje stanica i velikih vezikula, dok se pročišćavanje egzosoma postiže ultracentrifugiranjem. U upotrebi su još i metode precipitacije na kojima se temelji većina dostupnih komercijalnih setova za izolaciju egzosoma. U metodi se koristi hidrofilni polimer, najčešće polietilen glikol, koji se kompetitivno veže na molekule vode oko membrane egzosoma, čime se smanjuje njihova topljivost te posljedično dolazi do precipitacije.

Nakon uspješno provedene izolacije, pristupa se daljnjoj karakterizaciji egzosoma i njihovog sadržaja, što uključuje analizu proteina i nukleinskih kiselina (Yu i sur., 2022). Veličina i morfologija egzosoma obično se analizira elektronskom mikroskopijom, proteini imunokemijskim metodama poput Western blota i ELISA-e, a nukleinske kiseline kvantitativnim PCR-om ili sekvenciranjem sljedeće generacije (He i sur., 2022).

## 1.6. TRANSFORMIRAJUĆI ČIMBENIK RASTA $\beta$

Nazivom transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) smatra se skupina citokina s različitim ulogama u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji, zacjeljivanju rana, imunoregulaciji te u brojnim patološkim stanjima poput fibroze, raznih mišićnih bolesti te raka. Poznata su 33 polipeptida koja se smatraju dijelom TGF- $\beta$  skupine proteina, a najpoznatiji među njima su 3 izoforme TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3. Najistraženija izoforma jest TGF- $\beta$ 1 koja se sastoji od dva monomera od 12,5 kDa povezana disulfidnom vezom u aktivan dimer od 25 kDa. Vrlo sličnu strukturu imaju i druge izoforme, a konzerviranost je očuvana u cijeloj TGF- $\beta$  skupini obzirom da se svi sintetiziraju istim principom (Morikawa i sur., 2016).

Prilikom sinteze TGF- $\beta$ , transkripcijom nastaje prekursorski TGF- $\beta$ 1 proprotein koji se sastoji od tri segmenta: signalnog peptida na amino kraju, prosegmenta nazvanog LAP (engl. *latency associated peptide*) te TGF- $\beta$ 1 monomera od 12,5 kDa na karboksi kraju proteina. Prilikom translokacije s ribosoma u endoplazmatski retikulum signalni peptid se uklanja, a LAP ostaje nekovalentno vezan na TGF- $\beta$ 1 monomer čime ga održava latentnim. Navedena struktura ima 44 kDa (www.uniprot.org). Stvaranjem triju disulfidnih veza dolazi do dimerizacije TGF- $\beta$ 1 proproteina te se ovakav kompleks otpušta u cirkulaciju. Tek nakon što u cirkulaciji dođe do disocijacije LAP prosegmenta, TGF- $\beta$ 1 postaje aktivan protein od 25 kDa koji može djelovati na svoje receptore (Tzavlaki i Moustakas, 2020). Signalizacija pomoću TGF- $\beta$ 1 temelji se na prijenosu signala preko membranskih receptora do grupe SMAD proteina koji šalju signal u jezgru čime reguliraju rast i razvoj stanice (Li i sur., 2022).



Slika 3. Prikaz sinteze i signalizacije TGF- $\beta$ 1 (napravljeno pomoću BioRender.com prema Tzavlaki i Moustakas, 2020)

Iako se u početku mislilo da stimulira staničnu proliferaciju, brzo je postalo jasno da učinak TGF- $\beta$ 1 može biti inhibirajući ili stimulirajući, ovisno o situaciji u kojoj se stanica na koju djeluje nalazi (Morikawa i sur., 2016). TGF- $\beta$ 1 signalizacija u fiziološkim uvjetima primarno inhibira staničnu proliferaciju te stimulira staničnu diferencijaciju u ranim stadijima razvoja tumora (Chaudhury i Howe, 2009). Međutim, mutacije u TGF- $\beta$ 1 receptorima te SMAD proteinima izazivaju promjenu u signalnim putevima koje uzrokuju progresiju tumora i razvoj metastaza u kasnijim stadijima. Sukladno tome, tumorske stanice u usporedbi sa zdravima pokazuju povećanu ekspresiju i sekreciju TGF- $\beta$  proteina, posebice TGF- $\beta$ 1. Uz to, ekspresija TGF- $\beta$ 1 korelira s progresijom tumora i lošijom prognozom bolesti, obzirom da stimulira epitelno mezenhimalnu tranziciju, angiogenezu i tumorigenezu. Također, ekspresija TGF- $\beta$ 1 u udaljenim metastazama CRC-a značajno je povećana u usporedbi s ekspresijom u primarnom tumorskom tkivu (Li i sur., 2022).

TGF- $\beta$ 1 dugo se nije smatrao dobrom terapijskom metom zbog svoje dvostruke uloge u ranim stadijima tumora te razvoju metastaza u kasnijim stadijima. Međutim, posljednjih godina razvija se sve veći broj novih terapijskih opcija koje ciljaju upravo na preusmjerenje TGF- $\beta$ 1 signalizacije prilikom razvoja metastaza (Li i sur., 2022).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kolorektalni karcinom predstavlja ozbiljan zdravstveni problem kako u svijetu, tako i u Republici Hrvatskoj. Glavni nedostatak trenutne dijagnostike jest da se unatoč razvijenom programu probira, bolest otkriva u uznapređovalom stadiju kad je prognoza znatno lošija. Metode koje se trenutno najviše koriste pri postavljanju dijagnoze i klasifikaciji bolesti su kolonoskopija te tkivna biopsija. Obje su invazivne zbog čega postoji opravdana težnja za razvojem novih metoda koje će omogućiti bolju i raniju dijagnostiku.

Tekuća biopsija upravo je takva metoda obzirom da je njome moguće na minimalno invazivan način iz periferne krvi pacijenata izolirati elemente porijeklom iz tumorskog tkiva. Egzosomi, kao jedni od tih elemenata, prenose brojne molekule koje imaju potencijal da se koriste pri praćenju bolesti. TGF- $\beta$ 1 jest protein kojeg je moguće odrediti u egzosomima, a dokazano je da uzrokuje staničnu proliferaciju i diferencijaciju tumorskog tkiva. Mutacije u njegovoj signalizaciji utječu na progresiju tumora te razvoj metastaza, zbog čega je jedna od molekula koja se pomno istražuje kao mogući biljeg u dijagnostici kolorektalnog karcinoma.

S obzirom da analize tekućom biopsijom još uvijek nisu dio rutinske dijagnostike, potrebna su brojna istraživanja kojima će se prvenstveno utvrditi pouzdanost rezultata dobivenih ovom metodom. Jedno od takvih istraživanja jest i projekt "Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnog karcinoma primjenom tekuće biopsije" kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (IP-2019-04-4624, voditeljica: prof. dr. sc. Karmela Barišić), a u sklopu kojeg je napravljen i ovaj diplomski rad. Cilj rada utvrditi je prisutnost proteina TGF- $\beta$ 1 u egzosomima pacijenata s kolorektalnim karcinomom dobivenima metodom tekuće biopsije te je usporediti s rezultatima imunohistokemijske analize tumorskog tkiva dobivenog biopsijom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. ISPITANICI

U ovom radu korišteni su uzorci ispitanika s dijagnozom CRC-a koji su ispunjavanjem informiranog pristanka dobrovoljno prihvatili sudjelovanje u projektu "Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnog karcinoma primjenom tekuće biopsije" kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (IP-2019-04-4624, voditeljica: prof. dr. sc. Karmela Barišić). Ispitanike su regrutirali liječnici Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu. Neposredno prije operacije, ispitanicima je uzeta krv za analizu tekućom biopsijom, a tijekom tkivne biopsije uzorak tumorskog tkiva za imunohistokemijsku analizu.

Tekućom biopsijom ukupno je analizirano 29 uzoraka krvi CRC pacijenata, od kojih je 15 ženskog, a 14 muškog spola. Dob ispitanika u rasponu je od 42 do 86 godina, s medijanom od 68 godina. Imunohistokemijska analiza napravljena je na ukupno 17 uzoraka CRC pacijenata. Jedan nasumično odabran uzorak pacijenta s preCRC-om korišten je kao interna (pozitivna) kontrola.

#### 3.2. PRIPREMA UZORAKA PLAZME

Svakom je ispitaniku izvađeno 10 mL pune krvi u epruvetu *CellSave Preservative Tubes* (Menarini Silicon Biosystems Inc, SAD) koja sadrži dinatrijevu sol etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) kao antikoagulans uz odgovarajući prezervativ za očuvanje stanica. Nakon vađenja krvi potrebno je što prije, unutar jednog sata, odvojiti plazmu od stanica centrifugiranjem kako ne bi došlo do oslobađanja staničnog sadržaja *in vitro*. Hemolizirani uzorci nisu prikladni za analizu te se isti odbacuju ukoliko se postojanje hemolize primijeti nakon centrifugiranja.

Centrifugiranje se provodi na 1900 g tijekom 10 minuta na 4 °C u centrifugi koja sadrži rotor s njišućim vjedrima (engl. *swinging-bucket rotor*). Nadsloj plazme (obično 4 – 5 mL) zatim se prenosi u novu sterilnu epruvetu od 15 mL s koničnim dnom, pri čemu se mora biti oprezan da se uz plazmu ne prenese i međusloj (engl. *buffy coat*) koji sadrži leukocite i



trombocite kao mogući izvor kontaminacija. Dobiveni uzorak plazme se zatim ponovo centrifugira na 3000 g tijekom 15 minuta na 4 °C, čime se uklanja preostali stanični materijal, fragmenti trombocita i apoptotska tjelešca. Pročišćeni nadsloj plazme prenosi se u novu epruvetu od 2 mL koja ne sadrži ribonukleaze. Svaka epruveta se označuje dodijeljenim identifikacijskim brojem ispitanika i pohranjuje na 4 °C (ako će se egzosomi izolirati isti dan) ili na temperaturu nižu od – 20 °C (ako je uzorke potrebno spremirati na duži period).

Ako se izolacija egzosoma provodi nakon smrzavanja uzoraka plazme, iste je uzorke potrebno otopiti na ledu ili na 4 °C te vorteksirati. Nakon otapanja provodi se centrifugiranje na 3000 g tijekom 5 do 10 minuta na 4 °C čime se uklanjaju preostale stanice, debris, trombociti i fibrin. Dobiveni nadsloj plazme prenosi se u nove epruvete od 2 mL koje ne sadrže ribonukleaze.

### 3.3. IZOLACIJA EGZOSOMA

Za postupak izolacije egzosoma koristi se komercijalan komplet *miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen)* koji omogućuje brzu izolaciju i pročišćavanje egzosoma i drugih izvanstaničnih vezikula iz seruma ili plazme. Komplet se sastoji od sljedećih reagensa: 10 mL *Precipitation Buffer A*, 10 mL *Resuspension Buffer*, 200 U *Thrombin* (liofiliziran) te 500 µL *Thrombin Buffer*. Svi reagensi čuvaju se zaštićeni od svjetla na 4 °C. Liofilizirani *Thrombin* potrebno je otopiti u 400 µL *Thrombin Buffera*, ostaviti 1 minutu na sobnoj temperaturi, a zatim lagano promiješati te po potrebi alikvotirati i čuvati na – 20 °C. Poželjno je izbjegavati naknadno smrzavanje i odmrzavanje reagensa. *Thrombin* (500 U/mL) je nakon resuspenzije stabilan najmanje 6 mjeseci na 4 °C. Dodatni materijali i oprema potrebi za postupak izolacije su: automatske pipete s nastavcima bez ribonukleaza (engl. *RNAse free*), epruvete s koničnim dnom od 15 mL, epruvete bez ribonukleaza (engl. *RNAse free*) od 2 mL, mikrocentrifuga za epruvete od 2 mL, vorteks, hladnjak i led.

U postupak izolacije kreće se s alikvotom od 600 µL plazme kojeg je potrebno promiješati sa 6 µL *Thrombina*, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirati na 10 000 g tijekom 10 minuta na 20 °C. Nakon centrifugiranja, 0,5 mL nadsloja prenosi se u novu epruvetu od 2 mL. Uzorak je zatim potrebno promiješati s *Precipitation*

*Bufferom A* u omjeru 5 : 2 pa se 200  $\mu\text{L}$  *Precipitation Buffera A* dodaje u epruvetu s 0,5 mL nadsloja, vorteksira oko 5 sekundi te inkubira tijekom 60 minuta (ili preko noći) na 4 °C.

Nakon inkubacije uzorak je potrebno centrifugirati na 500 g tijekom 5 minuta na 20 °C kako bi se egzosomi istaložili na dno epruvete. Nadsloj se uklanja i baca, a dobiveni talog opet se kratko centrifugira kako bi se uklonio preostali nadsloj. Talogu egzosoma zatim se dodaje 270  $\mu\text{L}$  *Resuspension Buffera* te se uzorci miješaju na termalnom mikseru pri 1400 rpm tijekom 15 minuta na 20 °C kako bi se egzosomi u uzorku resuspendirali. Konačan volumen izoliranih egzosoma jest oko 300  $\mu\text{L}$ . Uzorke egzosoma dobivene iz više početnih alikvota plazme potrebno je sjediniti te alikvotirati po 100  $\mu\text{L}$  za daljnje analize proteina. Alikvoti egzosoma pohranjuju se na 4 °C do 2 dana ili na – 65 °C tijekom dužeg vremenskog perioda.

### **3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA**

Prije određivanja i analize pojedinih proteina u egzosomima, potrebno je odrediti njihovu ukupnu koncentraciju. Proteini se u egzosomima nalaze unutar membranske ovojnice te ih je za određivanje njihove koncentracije potrebno osloboditi u otopinu. U tu svrhu uzima se po alikvot svakog uzorka te se egzosomi liziraju dodatkom RIPA (engl. *radioimmunoprecipitation assay*) pufera (*RIPA Lysis and Extraction Buffer*, Thermo Scientific, SAD) koji sadrži inhibitore proteaza (*Roche cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Merck, SAD).

Pohranjeni alikvot egzosoma od 100  $\mu\text{L}$  potrebno je otopiti na ledu te promiješati. U 40  $\mu\text{L}$  svakog uzorka dodaje se 40  $\mu\text{L}$  RIPA pufera te se sonicira tijekom 10 sekundi u ultrazvučnoj vodenoj kupelji. Nakon sonikacije uzorci se najmanje 15 minuta drže na ledu, a zatim se uzima alikvot od 1  $\mu\text{L}$  iz kojeg se određuje ukupna koncentracija proteina kolorimetrijskom metodom s bicinkoniničnom kiselinom (BCA, engl. *bicinchoninic acid*). Metoda se temelji na reakciji proteina i  $\text{Cu}^{2+}$  iona u alkalnim uvjetima pri čemu nastaje njihov kompleks, dok se  $\text{Cu}^{2+}$  ioni reduciraju do  $\text{Cu}^{+}$  iona. Navedena reakcija naziva se biuret reakcijom te je dokaz prisustva peptidne veze u uzorku. Reducirani  $\text{Cu}^{+}$  ioni zatim reagiraju s BCA dajući ljubičasto obojen kompleks koji se otapa u vodi i čiji je apsorpcijski maksimum na 570 nm. Apsorbancija koja ovisi o intenzitetu nastalog obojenja proporcionalna je

koncentraciji reduciranih  $\text{Cu}^+$  iona, a samim time i koncentraciji proteina u uzorku. Metoda se smatra linearnom u rasponu koncentracija 0,020 – 2,0 mg/mL.

Izmjerenj apsorbanaciji pridružuje se odgovarajuća koncentracija proteina dobivena iz jednadžbe baždarnog pravca. Baždarni pravac dobiva se mjerenjem apsorbanacija standardnih otopina goveđeg serumskog albumina (BSA, engl. *bovine serum albumine*). Matični standard proteina koncentracije 1,0 mg/mL pripremljen je otapanjem 0,0100 g BSA (Capricorn Scientific, Njemačka) u 10 mL fiziološke otopine (0,9 % NaCl), a iz njega je zatim razrjeđivanjem s fiziološkom otopinom pripremljen niz standardnih koncentracija (ST) od 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL i 1,0 mg/mL. Mjerenje apsorbanacije provodi se na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica. Za baždarni pravac otpipetira se 25  $\mu\text{L}$  svake koncentracije standarda te se na mikrotitarsku pločicu nanose u triplikatu, redosljedom padajućih koncentracija. Za slijepu probu (SP) koristi se 25  $\mu\text{L}$  destilirane vode koja se isto nanosi u triplikatu. Uzorci egzosoma prije mjerenja apsorbanacije razrjeđuju se  $100\times$  s destiliranom vodom pa se 25  $\mu\text{L}$  svakog uzorka nanosi na mikrotitarsku pločicu, također u triplikatu.

Radni reagens koji se dodaje u svaki uzorak potrebno je pripremiti neposredno prije mjerenja, a dobiva se miješanjem 10 mL otopine BCA, koja sadrži BCA, natrijev karbonat, natrijev tartarat i natrijev bikarbonat u 0,1 M NaOH (pH 11,25) (Sigma-Aldrich, SAD), i 200  $\mu\text{L}$  4 %-tne otopine bakrovog (II) sulfata pentahidrata (Sigma-Aldrich, SAD), tj. u omjeru 50:1. Omjer volumena radnog reagensa i uzorka mora biti 4:1 pa se stoga u svaku jažicu dodaje 100  $\mu\text{L}$  pripremljenog radnog reagensa. Mikrotitarska se pločica zatim stavlja na tresilicu na brzinu od 300 rpm te inkubira 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije pomoću čitača mikrotitarskih pločica *Victor3* (PerkinElmer, SAD) mjeri se apsorbanacija na 570 nm.

### **3.5. WESTERN BLOT ANALIZA**

Western blot analiza omogućuje odvajanje, identificiranje i kvantificiranje specifičnih proteina u uzorcima tkiva ili tjelesnih tekućina. Metoda je dugotrajna, no vrlo precizna i specifična jer se dokazivanje proteina od interesa temelji na specifičnoj reakciji između antitijela i antigena. Cijeli proces analize sastoji se od razdvajanja proteina denaturirajućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecile sulphate*

*polyacrylamide gel electrophoresis*), njihovog prijenosa na nitroceluloznu membranu te konačne detekcije ciljnog proteina pomoću posredne imunokemijske metode.

Uzorke egzosoma potrebno je pripremiti za elektroforezu na način da se osiguraju reducirajući uvjeti za denaturaciju proteina. U tu svrhu napravi se  $6\times$  *Sample Buffer* (2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g 12 % SDS; 3 mL 30 % glicerol; 20 mg 0,2 % bromfenol plavilo; 1,2 mL 12 %  $\beta$ -merkaptotanol u destiliranoj vodi do ukupnog volumena od 10 mL). SDS u puferu veže se na sve proteine iz uzorka u jednakom omjeru čime im daje negativan naboj kako bi svi elektroforezom putovali prema pozitivnoj elektrodi i razdvojili se samo na temelju molekulske mase. U puferu se nalazi i  $\beta$ -merkaptotanol koji reducira sve proteine kidajući im disulfidne veze, a bromfenol plavilo omogućuje vizualizaciju tijekom elektroforeze. U uzorke egzosoma koji su prethodno lizirani RIPA puferom dodaje se 16  $\mu$ L pripremljenog pufera za nanošenje uzoraka, svi uzorci kuhaju se 3 minute na 95 °C, a zatim se hlade na ledu i po potrebi pohranjuju na – 20 °C do početka elektroforeze.

U jažice 12 %-tnog poliakrilamidnog gela za elektroforezu prvo se nanosi standard proteina *mPAGE Color Protein Standard* (Merck Millipore, SAD), a zatim redom volumeni uzoraka egzosoma koji sadrže 40  $\mu$ g proteina. Elektroforeza se provodi u vertikalnom položaju u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 0,25 M glicin; 0,1 % otopina SDS-a) tijekom 90 minuta uz napon od 100 V. Proteini se razdvajaju samo na temelju molekulske mase, pri čemu proteini manje mase putuju brže. Nakon elektroforeze razdvojeni proteini prenose se na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2  $\mu$ m (GE Healthcare, SAD) u uređaju za elektroprijenos proteina *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad, SAD). Prijenos se odvija pomoću elektroda postavljenih okomito na membranu, tijekom 90 minuta uz jakost struje od 250 mA. Vezanje proteina na membranu omogućeno je visokim afinitetom membrane prema proteinima.

Nakon prijenosa proteina na membranu potrebno je blokirati sva slobodna vezna mjesta na membrani kako bi se onemogućilo nespecifično vezanje antitijela na proteine ili samu membranu. Membrana se stoga inkubira 1 sat uz protresivanje na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje koji je 5 %-tna otopina BSA u puferu TBS+T (engl. *Tris Buffered Saline with Tween*) (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20 u ultračistoj vodi). Bitno je da je membrana cijelom površinom prekrivena odgovarajućim puferom u svakom

pojedinom koraku protokola. Višak blokirajućeg reagensa uklanja se ispiranjem uz protresivanje, 3 puta po 5 minuta u puferu TBS+T.

Slijedi inkubacija s primarnim (veznim) antitijelom koje će specifično prepoznati antigen na ciljnom proteinu. Korištena su monoklonska mišja antitijela koja se vežu na protein TGF- $\beta$ 1 (*TGF- $\beta$ 1 mAb (TB21)*, #MA5-16949, Invitrogen, SAD). Koncentracija antitijela jest 1 mg/mL, a pohranjuju se na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Otopina antitijela razrijeđuje se u omjeru 1:1000 jer previsoka koncentracija može dati nespecifične rezultate. Volumen od 8  $\mu\text{L}$  otopine antitijela stoga je dodan u 8 mL 5 %-tne otopine obranog mlijeka u prahu u puferu TBS+T. Inkubacija s primarnim antitijelom radi se preko noći na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sljedeći dan membrana se ispiri 3 puta po 5 minuta uz protresivanje u puferu TBS+T kako bi se uklonio višak nevezanog primarnog antitijela. Nakon ispiranja membrana se inkubira sa sekundarnim (detekcijskim) antitijelom koje prepoznaje epitop na primarnom antitijelu. Sekundarno antitijelo obilježeno je peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*), enzimom koji u prisustvu kemiluminiscentnog supstrata luminola emitira svjetlo koje omogućuje vizualizaciju ciljnog proteina. Korištena su poliklonska anti-mišja antitijela (*Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody*, #7076S, Cell Signaling Technology, SAD) iz seruma konja koja se pohranjuju na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a prije inkubacije potrebno ih je razrijediti u omjeru 1:3000. Volumen od 3  $\mu\text{L}$  otopine antitijela dodaje se u 9 mL 5 %-tne otopine obranog mlijeka u prahu u puferu TBS+T pa se inkubira uz protresivanje tijekom 1 sata na  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Slijedi ispiranje 3 puta po 5 minuta uz protresivanje u puferu TBS+T.

Membrana se zatim 1 minutu inkubira u mraku s reagensom za kemiluminiscenciju. Reagens se priprema miješanjem 5 mg luminola (Sigma-Aldrich, SAD), 1 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 i 14 mL ultračiste vode. Neposredno prije mjerenja u reagens se dodaje 5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  i 150  $\mu\text{L}$  pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich, SAD) u 10 mL DMSO, a čuva se na sobnoj temperaturi u mraku. Svjetlo koje tijekom kemiluminiscencije emitira enzim HRP vizualiziramo kao tamne vrpce na membrani pomoću uređaja za fotografiranje membrana *Amersham A1600 Imager* (GE Healthcare Life Sciences, SAD). Molekulske mase proteina TGF- $\beta$ 1 koje se očekuju iznose oko 12 kDa, oko 25 kDa i oko 44 kDa, a određuju se pomoću standarda proteina koji daje deset obojenih proteinskih vrpca u rasponu od 10 do 203 kDa. Kao pozitivna kontrola korišten je uzorak egzosoma jednog preCRC pacijenta u kojem je prethodnim analizama dokazano prisustvo TGF- $\beta$ 1.

Kvantifikacija dobivenih vrpca napravljena je u programu *ImageQuant TL, Version 8.1* (GE Healthcare Life Sciences, SAD), a iskazuje se relativno u odnosu na jednu specifičnu vrpcu iz pozitivne kontrole koja je bila prisutna na svim membranama.

### **3.6. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA TKIVA**

Imunohistokemijska analiza (IHC) proces je selektivne identifikacije antigena u stanicama dijela tkiva koji se temelji na principu specifičnog vezanja antitijela na antigene u biološkim tkivima. U Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju "Ljudevit Jurak" Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu, ispitanicima je napravljena rutinska patohistološka analiza uzorka tkiva dobivenog resekcijom adenoma ili CRC-a pomoću koje je postavljena konačna patohistološka dijagnoza. Uzorci su analizirani svjetlosnim mikroskopom, a priprema je podrazumijevala standardnu obradu. Uzorci tkiva fiksirani su u 10 % puferiranom formalinu, uklopljeni u parafin, izrezani na 4  $\mu\text{m}$  i obojeni hematoksilinom i eozinom. Dodatno je na reprezentativnom parafinskom bloku učinjena imunohistokemijska analiza na TGF- $\beta$ 1. Imunohistokemijska analiza provedena je na ukupno 17 uzoraka tumorskog tkiva pacijenata s CRC-om.

Postupak deparafinizacije tkiva, demaskiranja antigena i imunohistokemijskog bojenja proveden je na automatiziranom uređaju za imunohistokemijsko bojenje *DAKO Techmate Horizon 30*<sup>®</sup>. Za detekciju proteina TGF- $\beta$ 1 korišteno je mišje monoklonsko antitijelo (*TGF- $\beta$ 1 mAb (TB21)*, #MA5-16949, Invitrogen, SAD) razrijeđeno u omjeru 1:400. Kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo karcinoma dojke, prema preporuci proizvođača. Zamjena primarnih antitijela s izotipskim imunoglobulinom korištena je kao negativna kontrola.

Procjena izraženosti TGF- $\beta$ 1 određena je semikvantitativno, pregledom preparata na malom povećanju svjetlosnog mikroskopa (40 $\times$ ) kako bi se odredilo područje s najjačom izraženošću bojanja. U području najveće izraženosti bojanja reakcija je mjerena na ukupno 1000 stanica na velikom povećanju svjetlosnog mikroskopa (400 $\times$ ). Reakcija je smatrana pozitivnom ukoliko je citoplazmatsko ili membransko bojenje bilo prisutno u  $\geq 10$  % stanica, a negativna ukoliko je bilo prisutno u  $< 10$  % stanica.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

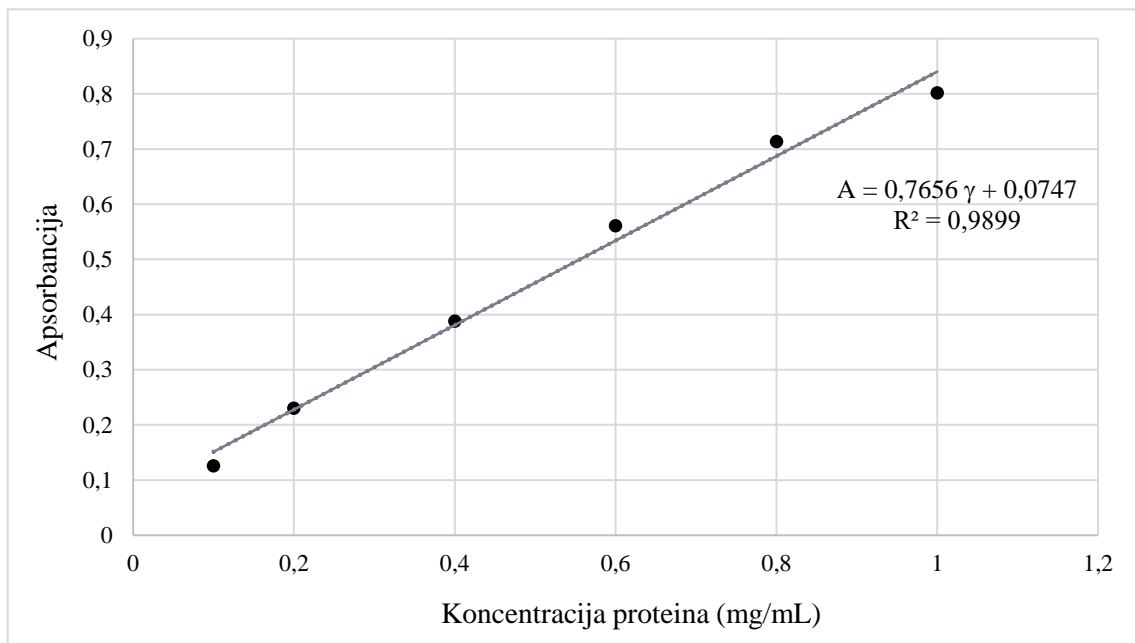
### 4.1. KONCENTRACIJA PROTEINA

Koncentracija proteina u egzosomima određena je kolorimetrijskom metodom s BCA. Pripremljenim uzorcima mjeri se apsorbancija (A) na 570 nm iz koje se pomoću baždarnog pravca određuje masena koncentracija ( $\gamma$ ) proteina. Sva mjerenja rađena su u triplikatu te je za svaki uzorak izračunata srednja vrijednost mjerenja. Kako bi se uklonile interferencije iz matriksa, određena je srednja vrijednost apsorbancije slijepe probe koja je zatim oduzeta od izmjerenih vrijednosti ostalih apsorbancija.

Tablica 1. Primjer srednjih vrijednosti apsorbancija standardnih otopina BSA

$\gamma$ (mg/mL)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
A	0,126	0,231	0,388	0,561	0,714	0,802

Iz srednje vrijednosti apsorbancija standardnih otopina BSA napravljen je baždarni pravac kroz 6 baždarnih točaka. Linearnost dobivenog baždarnog pravca mora biti zadovoljavajuća te se pomoću dobivene jednadžbe pravca iz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancija određuju masene koncentracije proteina u uzorcima.



Slika 4. Primjer baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina

Uvrštavanjem srednjih vrijednosti apsorbancija uzoraka u jednadžbu pravca dobiva se masena koncentracija proteina u svakom pojedinom uzorku egzosoma označenom identifikacijskom oznakom ispitanika. Uzorci su prije mjerenja apsorbancije 100× razrijeđeni kako bi se dobivene vrijednosti masenih koncentracija mogle očitati iz baždarnog pravca čiji je raspon koncentracija 0,1 – 1 mg/mL. Dobivene vrijednosti stoga je potrebno korigirati kako bi se dobile prvobitne masene koncentracije proteina u uzorcima. Iz masene koncentracije proteina zatim se računa volumen proteina koji odgovara masi od 40 µg proteina u uzorku. Time se dobiva optimalna količina proteina koja se nanosi na gel za elektroforezu u prvom koraku Western blot analize. Dodatno se radi korekcija volumena koji se nanosi na gel zbog razrjeđenja uzoraka s puferom za denaturaciju ( $6 \times$  *Sample Buffer*).

Tablica 2. Prikaz koncentracija proteina uz izračun volumena uzoraka za SDS-PAGE

	A	$\gamma$ (mg/mL)	$\gamma$ prije razrijedenja (mg/mL)	$V_{40 \mu\text{g proteina}}$ (µL)	$V_{\text{stavljen na gel}}$ (µL)
<b>E7</b>	0,302	0,297	29,7	1,35	1,62
<b>E11</b>	0,183	0,141	14,1	2,84	3,41
<b>E12</b>	0,276	0,263	26,3	1,52	1,82
<b>E13</b>	0,230	0,203	20,3	1,97	2,37
<b>E14</b>	0,337	0,343	34,3	1,17	1,40
<b>E15</b>	0,206	0,172	17,2	2,33	2,79
<b>E19</b>	0,213	0,181	18,1	2,22	2,66
<b>E20</b>	0,203	0,168	16,8	2,38	2,86
<b>E21</b>	0,199	0,163	16,3	2,46	2,95
<b>E22</b>	0,320	0,321	32,1	1,25	1,49
<b>E23</b>	0,180	0,137	13,7	2,92	3,50
<b>E24</b>	0,153	0,102	10,2	3,92	4,71
<b>E25</b>	0,198	0,161	16,1	2,48	2,98
<b>E26</b>	0,249	0,228	22,8	1,76	2,11
<b>E27</b>	0,258	0,239	23,9	1,67	2,01
<b>E28</b>	0,228	0,200	20,0	2,00	2,40
<b>E29</b>	0,213	0,180	18,0	2,23	2,67
<b>E30</b>	0,307	0,304	30,4	1,32	1,58
<b>E32</b>	0,192	0,153	15,3	2,61	3,13
<b>E33</b>	0,263	0,247	24,7	1,62	1,95
<b>E35</b>	0,221	0,191	19,1	2,10	2,52
<b>E36</b>	0,257	0,238	23,8	1,68	2,02
<b>E37</b>	0,210	0,177	17,7	2,26	2,71
<b>E38</b>	0,230	0,202	20,2	1,98	2,37
<b>E39</b>	0,270	0,255	25,5	1,57	1,88
<b>E40</b>	0,287	0,277	27,7	1,45	1,73
<b>E41</b>	0,213	0,181	18,1	2,21	2,65
<b>E42</b>	0,285	0,274	27,4	1,46	1,75
<b>E43</b>	0,285	0,275	27,5	1,46	1,75

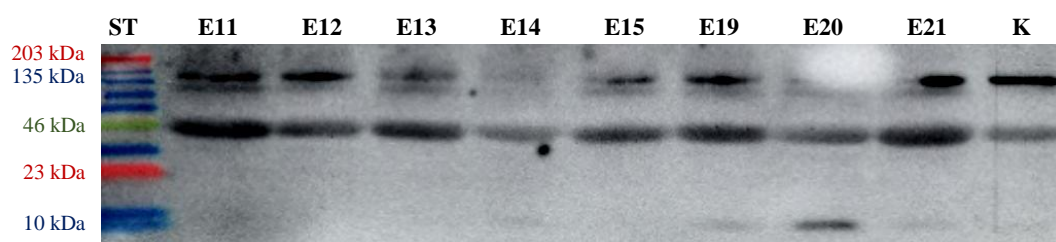


## 4.2. ODREĐIVANJE TGF- $\beta$ 1 WESTERN BLOT ANALIZOM

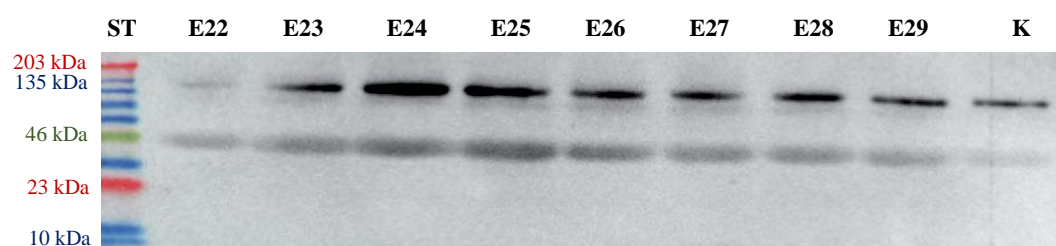
Western blot analiza provedena je na ukupno 29 uzoraka pacijenata s CRC-om označenim identifikacijskim oznakama (E7, E11 – E15, E19 – E30, E32, E33, E35 – 43). U svakoj od četiri serije uzoraka u prvu jažicu poliakrilamidnog gela nanesen je standard proteina (ST), a u zadnju pozitivna kontrola (K).

Kao pozitivna kontrola korišten je uzorak egzosoma jednog preCRC pacijenta u kojem je prethodnim analizama dokazano prisustvo TGF- $\beta$ 1. Usporedbom sa standardom proteina određene su približne molekulske mase proteina u dobivenim vrpčama.

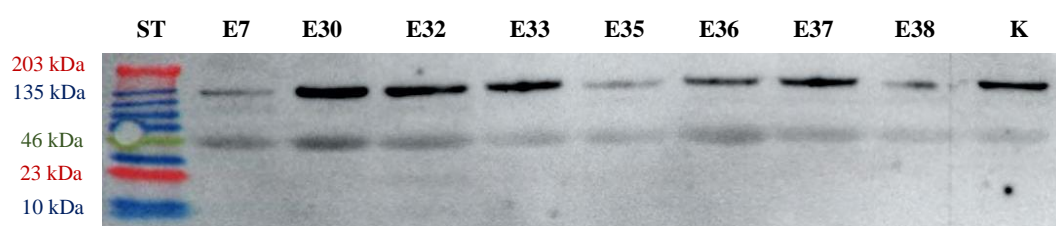
U svim uzorcima egzosoma dobivene su vrpce za TGF- $\beta$ 1 na otprilike 44 kDa. Navedeno odgovara molekulskoj masi TGF- $\beta$ 1 proproteina koji se sastoji od LAP prosegmenta i TGF- $\beta$ 1 monomera. U pojedinim uzorcima (E14, E19, E20, E21, E27, E32, E41) vide se i vrlo slabe vrpce na oko 12 kDa, što odgovara molekulskoj masi monomera TGF- $\beta$ 1, tj. pojedinog polipeptidnog lanca koji je dio strukture TGF- $\beta$ 1. U jednom uzorku (E32) moguće je da se vidi i vrlo slaba vrpca na oko 25 kDa, što odgovara dimeru, aktivnom obliku TGF- $\beta$ 1. U svim uzorcima prisutan je i intenzivan nespecifičan signal na oko 135 kDa. Vrpca od 44 kDa koja označuje pozitivnu kontrolu prisutna je na membranama u svim serijama, što potvrđuje uspješnost provedbe Western blot analize.



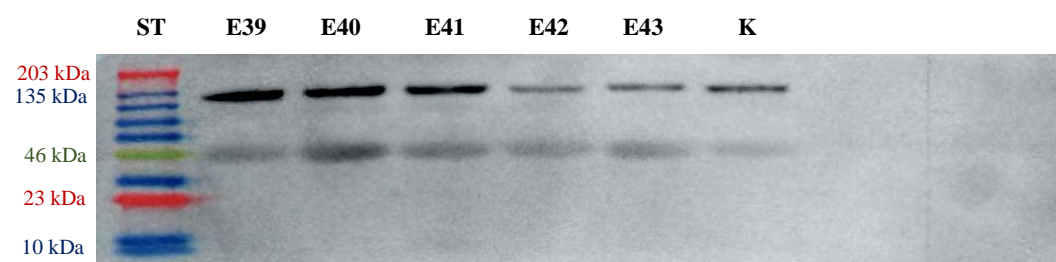
Slika 5. Western blot membrana prve serije uzoraka



Slika 6. Western blot membrana druge serije uzoraka



Slika 7. Western blot membrana treće serije uzoraka



Slika 8. Western blot membrana četvrte serije uzoraka

### 4.3. KVANTIFIKACIJA TGF- $\beta$ 1

Nakon fotografiranja te vizualizacije vrpce Western blot membrana, pomoću računalnog programa napravljena je i njihova kvantifikacija. Obzirom da intenzitet vrpce na svakoj fotografiji Western blot membrane ovisi o brojnim čimbenicima, pa tako i o ekspoziciji membrane prilikom fotografiranja, za referentnu vrpcu odabran je isti uzorak koji je prisutan u svim serijama, a to je pozitivna kontrola. Vrpca od 44 kDa pozitivne kontrole stoga je proglašena apsolutnim brojem 1 u svim serijama, a sve ostale vrpce izražene su relativno u odnosu na nju.

Tablica 3. Prikaz relativne kvantifikacije vrpce TGF- $\beta$ 1 u prvoj seriji uzoraka

<b>kDa</b>	<b>E11</b>	<b>E12</b>	<b>E13</b>	<b>E14</b>	<b>E15</b>	<b>E19</b>	<b>E20</b>	<b>E21</b>	<b>K</b>
<b>135</b>	1,46	1,08	1,43	0,43	1,10	1,19	1,12	0,99	1,01
<b>44</b>	1,33	1,12	1,19	0,86	1,18	1,18	1,03	1,31	<b>1</b>
<b>12</b>				0,55		0,58	0,82	0,52	0,29

Tablica 4. Prikaz relativne kvantifikacije vrpce TGF- $\beta$ 1 u drugoj seriji uzoraka

<b>kDa</b>	<b>E22</b>	<b>E23</b>	<b>E24</b>	<b>E25</b>	<b>E26</b>	<b>E27</b>	<b>E28</b>	<b>E29</b>	<b>K</b>
<b>135</b>	0,65	1,60	2,33	1,97	1,74	1,67	1,50	1,21	0,93
<b>44</b>	1,12	1,39	1,59	1,63	1,36	1,44	1,30	1,26	<b>1</b>
<b>12</b>			0,58			0,31			

Tablica 5. Prikaz relativne kvantifikacije vrpce TGF- $\beta$ 1 u trećoj seriji uzoraka

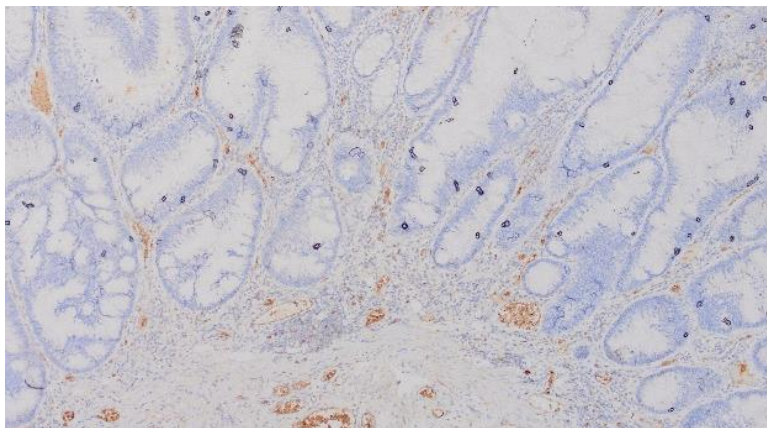
<b>kDa</b>	<b>E7</b>	<b>E30</b>	<b>E32</b>	<b>E33</b>	<b>E35</b>	<b>E36</b>	<b>E37</b>	<b>E38</b>	<b>K</b>
<b>135</b>	0,91	1,65	1,47	1,38	0,86	1,03	1,21	0,88	1,28
<b>44</b>	1,25	1,37	1,35	1,16	1,10	1,43	1,23	1,08	<b>1</b>
<b>25</b>			0,60						
<b>12</b>			0,69						

Tablica 6. Prikaz relativne kvantifikacije vrpce TGF- $\beta$ 1 u četvrtoj seriji uzoraka

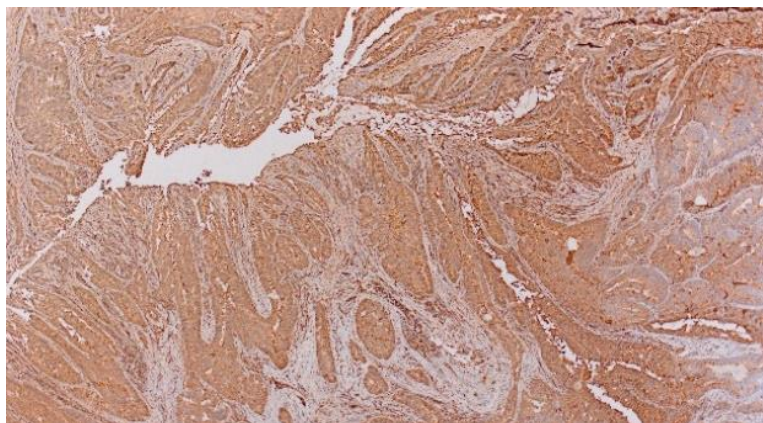
<b>kDa</b>	<b>E39</b>	<b>E40</b>	<b>E41</b>	<b>E42</b>	<b>E43</b>	<b>K</b>
<b>135</b>	1,35	1,19	1,04	0,70	0,73	0,79
<b>44</b>	1,25	1,47	1,14	1,09	1,18	<b>1</b>
<b>12</b>			0,56			

#### 4.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA TKIVA DOBIVENOG BIOPSIJOM

Imunohistokemijska analiza provedena je na ukupno 17 uzoraka tkiva pacijenata s CRC-om. TGF- $\beta$ 1 određivan je u "hot spotu" na 1000 stanica. U svim uzorcima dobivena je pozitivna (100 %) reakcija na TGF- $\beta$ 1 (citoplazmatska i membranska). Pozitivna (100 %) reakcija dobivena je i na tkivnom uzorku preCRC pacijenta koji je korišten kao interna kontrola (K) prilikom Western blot analize.



Slika 9. Negativna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$ 1 u adenomu, povećanje 100 $\times$



Slika 10. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$ 1 u CRC-u, povećanje 40 $\times$

## 4.5. RASPRAVA

Rezultatima dobivenima Western blot analizom dokazana je prisutnost TGF- $\beta$ 1 u svih 29 uzoraka egzosoma pacijenata s CRC-om dobivenih tekućom biopsijom. Navedeno je u skladu s opažanjem da je ekspresija TGF- $\beta$ 1 veća u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo (Morikawa i sur., 2016). Istom su metodom Shang i sur. (2020) izolirali egzosome iz komercijalne kulture CRC stanica te Western blot analizom pokazali povećane razine TGF- $\beta$ 1 u egzosomima i stanicama CRC-a u odnosu na kontrolnu skupinu.

Kvantifikacijom vrpce dobivenih nakon Western blota utvrđeno je da su vrpce TGF- $\beta$ 1 od 44 kDa u gotovo svim uzorcima (osim E14) većeg intenziteta od pozitivne kontrole. S obzirom da je kao pozitivna kontrola korišten uzorak egzosoma pacijenta s preCRC-om, navedeni rezultat ide u prilog činjenici da je ekspresija TGF- $\beta$ 1 veća što je tkivo u više uznapredovalom stadiju bolesti (Li i sur., 2022). Međutim, to bi bilo potrebno i statistički dokazati na većem broju uzoraka egzosoma pacijenata s preCRC-om. Nespecifična vrpca dobivena Western blot analizom na oko 135 kDa, a koja je prisutna u svim uzorcima, može biti posljedica nespecifičnog vezanja ili neodgovarajuće pripreme uzoraka (npr. previsoke koncentracije antitijela ili nedovoljnog blokiranja), što bi se trebalo utvrditi daljnjim analizama u svrhu optimizacije ove metode.

Imunohistokemijskom analizom 17 uzoraka tkiva pacijenata s CRC-om dobivenih tkivnom biopsijom u svima je dobivena pozitivna (100 %) reakcija na TGF- $\beta$ 1. Od svih analiziranih uzoraka, na ukupno 7 uzoraka napravljene su istovremeno i Western blot metoda te imunohistokemijska analiza tkiva čime je potvrđena istovjetnost rezultata dobivenih tekućom i tkivnom biopsijom. S obzirom da se imunohistokemijskom analizom tkiva dobivaju samo kvalitativni podaci o prisustvu TGF- $\beta$ 1 (reakcija je isključivo pozitivna ili negativna), kao glavna prednost tekuće biopsije, uz njenu neinvazivnost, nameće se i mogućnost kvantifikacije. Potrebna su stoga daljnja istraživanja koja bi se temeljila na kvantifikaciji TGF- $\beta$ 1 kao jednom od ključnih podataka na temelju kojeg bi se mogla postavljati prognoza bolesti, pratiti njena progresija ili procjenjivati odgovor na terapiju. Jedno od istraživanja koje može poslužiti kao izvrstan primjer za navedeno proveli su Qiao i sur. (2022). Njihov fokus bila je izolacija specifične mRNA porijeklom iz egzosoma, za čiju je ekspresiju na kraju utvrđeno da je u izvrsnoj korelaciji s uznapredovalim stadijem CRC-a.

Glavno ograničenje ovog rada jest to da tekućom biopsijom nisu analizirani uzorci pacijenata s adenomom kao početnim stadijem razvoja CRC-a, dok su rezultati imunohistokemijske analize na TGF- $\beta$ 1 dobiveni tijekom ovog projekta kod dijela preCRC pacijenata pokazali negativan, a kod dijela preCRC pacijenata pozitivan rezultat (ti rezultati nisu prikazani o ovom diplomskom radu). U daljnjim istraživanjima bilo bi poželjno i u takvim uzorcima odrediti prisustvo i kvantificirati TGF- $\beta$ 1 tekućom biopsijom, usporediti rezultate s CRC pacijentima te vidjeti na koji se način dobiveni rezultati mogu koristiti u samoj dijagnostici CRC-a, s obzirom da je jedan od ključnih problema sadašnje dijagnostike rijetko otkrivanje bolesti u početnim stadijima.

## 5. ZAKLJUČCI

Metodom tekuće biopsije izolirani su egzosomi iz uzoraka plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom. Svi uzorci pripremljeni su s istim puferom za liziranje (RIPA pufer s inhibitorima proteaza) i istim puferom za nanošenje uzoraka ( $6\times$  *Sample Buffer* s  $\beta$ -merkaptoetanolom) te je u svima određena koncentracija proteina BCA metodom kako bi se osigurali optimalni uvjeti za Western blot analizu.

Prilikom Western blot analize u svim uzorcima egzosoma dokazana je prisutnost TGF- $\beta$ 1. Dobivene su vrpce za TGF- $\beta$ 1 na otprilike 44 kDa, što odgovara TGF- $\beta$ 1 proproteinu, u pojedinim uzorcima vide se i vrlo slabe vrpce na oko 12 kDa, što odgovara TGF- $\beta$ 1 monomeru, a u jednom se uzorku uočava i vrlo slaba vrpca na oko 25 kDa, što odgovara TGF- $\beta$ 1 dimeru. U svim uzorcima prisutan je i nespecifičan signal na oko 135 kDa.

Imunohistokemijskom analizom tumorskog tkiva dobivenog biopsijom u svim je uzorcima također dokazana prisutnost TGF- $\beta$ 1. Time je potvrđeno da se tekućom biopsijom kao neinvazivnom metodom mogu dobiti rezultati istovjetni onima dobivenim tkivnom biopsijom. Uz to, tekućom biopsijom moguće je i kvantificirati TGF- $\beta$ 1, što je poželjno obzirom na činjenicu da je ekspresija TGF- $\beta$ 1 veća što je bolest u kasnijem stadiju.

Sve navedeno otvara vrata tekućoj biopsiji da se u budućnosti uvede u kliničku praksu kao neinvazivna metoda kojom će se omogućiti kvalitetan probir, postavljanje dijagnoze te praćenje bolesti kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom.

## 6. POPIS KRATICA

A	apsorbancija
APC	engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>
BCA	bicinkoninična kiselina (engl. <i>bicinchoninic acid</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumine</i> )
CRC	kolorektalni karcinom (engl. <i>colorectal cancer</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
E	uzorak egzosoma
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FAP	sindrom obiteljske adenomatozne polipoze (engl. <i>familial adenomatous polyposis</i> )
$\gamma$	masena koncentracija
HNPCC	nasljedni nepolipozni rak debelog crijeva (engl. <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> )
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
IHC	imunohistokemijska analiza
K	kontrolni uzorak
KRAS	engl. <i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
LAP	engl. <i>latency associated peptide</i>
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	ribonukleinska kiselina
SDS-PAGE	denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. <i>sodium dodecile sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SP	slijepa proba
ST	standard
TBS+T	engl. <i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TGF- $\beta$	transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (engl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TP53	engl. <i>tumor protein 53</i>



## 7. LITERATURA

Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*, 2015, 9, 520.

Brkić T, Grgić M. Kolorektalni karcinom. *Medicus*, 2006, 15(1\_Gastroenterologija), 89-97.

Chaudhury A, Howe PH. The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigné enigma. *IUBMB Life*, 2009, 61(10):929-939.

Ciardello F, Ciardiello D, Martini G, Napolitano S, Tabernero J, Cervantes A. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin*. 2022, 72(4):372-401.

Colorectal Cancer Risk Factors, 2023, [www.cancer.org](http://www.cancer.org), pristupljeno 20. kolovoza 2023.

Delcuratolo MD, Modrego-Sánchez A, Bungaro M, Antón-Pascual B, Teran, S, Dipace V, Novello S, Garcia-Carbonero R, Passiglia F, Graválos-Castro C. Liquid Biopsy in Advanced Colorectal Cancer: Clinical Applications of Different Analytes. *J Mol Pathol*. 2023, 4, 128-155.

Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj, 2022, [www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr), pristupljeno 27. svibnja 2023.

He J, Xi N, Han Z, Luo W, Shen J, Wang S, Li J, Guo Z, Cheng H. The Role of Liquid Biopsy Analytes in Diagnosis, Treatment and Prognosis of Colorectal Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13:875442.

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*, 2022, 14(7):1732.

Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalpour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev*, 2021, 35(11-12):787-820.

Li X, Wu Y, Tian T. TGF- $\beta$  Signaling in Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): From Underlying Mechanism to Potential Applications in Clinical Development. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22):14436.

Marei, HE, Althani, A, Afifi, N, Hasan A, Cacei T, Pozzoli G, Morrione A, Giordano A, Cenciarelli C. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int*, 2021, 21, 703.

Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1):197.

Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(5):a021873.

Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2022, 15(1):131.

Periša J, Bulić P, Špacir Prskalo Z, Gaće M, Mayer LJ. Mogućnost tekuće biopsije u kliničkoj praksi. *Libri Oncologici*, 2017, 45(1):23.

Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*, 2022, 162(3):715-730.

Shang A, Gu C, Wang W, Wang X, Sun J, Zeng B, Chen C, Chang W, Ping Y, Ji P, Wu J, Quan W, Yao Y, Zhou Y, Sun Z, Li D. Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer via the miR-142-3p/miR-506-3p- TGF- $\beta$ 1 axis. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):117.

Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*, 2016, 11:967-976.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71, 209-249.

Transforming growth factor  $\beta$ -1 proprotein, 2023, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), pristupljeno 26. kolovoza 2023.

Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules*, 2020, 10(3):487.

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.

Qiao D, Gu C, Wang W, Yan W, Jiang C, Hu J, Shang A, Guo J. Tumor-Originated Exosomal hsa-miR-3937 as a Minimally Invasive Early Biomarker for Liquid Biopsy of Colorectal Cancer. *J Oncol*, 2022, 6990955.

Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, 2021, 14(10):101174.

Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, Fang X, Zhang X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer*, 2022, 21, 56.

Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(2):455-468.

Zhou H, Zhu L, Song J, Wang G, Li P, Li W, Luo P, Sun X, Wu J, Liu Y, Zhu S, Zhang Y. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):86.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. SAŽETAK

Kolorektalni karcinom bolest je čija je prevalencija posljednjih godina u stalnom rastu. U početnom je stadiju bez simptoma, zbog čega je rana dijagnostika ključna za poboljšanje prognoze bolesti te smanjenje smrtnosti. Zbog invazivnosti i ograničenja kolonoskopije te tkivne biopsije kao postojećih dijagnostičkih metoda, kao inovacija u području onkologije razvijena je tekuća biopsija. To je neinvazivna i ponovljiva metoda kojom je iz periferne krvi pacijenata moguće izolirati egzosome porijeklom iz tumorskog tkiva. Egzosomi prenose molekule s potencijalom da se koriste u praćenju bolesti, a jedna od njih je protein TGF- $\beta$ 1. Mutacije u njegovoj signalizaciji utječu na staničnu proliferaciju, progresiju tumora te razvoj metastaza.

Cilj ovog rada bio je utvrditi prisutnost TGF- $\beta$ 1 u egzosomima pacijenata s kolorektalnim karcinomom dobivenima metodom tekuće biopsije te je usporediti s rezultatima imunohistokemijske analize tumorskog tkiva dobivenog biopsijom.

Metodom tekuće biopsije izolirani su egzosomi iz uzoraka plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom. U uzorcima je određena koncentracija proteina spektrofotometrijskom metodom s bicinkoniničnom kiselinom te je provedena Western blot analiza. Prisutnost TGF- $\beta$ 1 dokazana je u svim uzorcima, a napravljena je i relativna kvantifikacija rezultata. Imunohistokemijskom analizom tumorskog tkiva dobivenog biopsijom u svim je uzorcima također dokazana prisutnost TGF- $\beta$ 1.

Iz dobivenih se rezultata može zaključiti da su rezultati dobiveni tekućom biopsijom istovjetni onima dobivenima tkivnom biopsijom. Navedeno, uz potrebna daljnja istraživanja, otvara vrata tekućoj biopsiji da se uvede u kliničku praksu kao neinvazivna metoda koja omogućuje kvalitetan probir, postavljanje dijagnoze te praćenje bolesti kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom.

## 8.2. SUMMARY

Colorectal cancer is a disease whose prevalence has been steadily increasing in recent years. It is asymptomatic in early stages, which is why early detection is essential for improving prognosis and reducing mortality. Due to the invasiveness and limitations of colonoscopy and tissue biopsy as existing diagnostic methods, liquid biopsy was developed as an innovation in the field of oncology. It is a non-invasive and reproducible method by which it is possible to isolate exosomes from the patient's peripheral blood. Exosomes carry molecules originating from tumor tissue with potential to be used in disease monitoring, one of them being TGF- $\beta$ 1. Mutations in TGF- $\beta$ 1 signaling path affect cell proliferation, tumor progression and development of metastases.

The aim of this thesis was to determine the presence of TGF- $\beta$ 1 in exosomes from patients with colorectal cancer obtained by liquid biopsy and to compare it with the results of immunohistochemical analysis of tumor tissue obtained by biopsy.

Using liquid biopsy, exosomes were isolated from plasma samples of patients with colorectal cancer. The protein concentration in all samples was determined by spectrophotometric method with bicinchoninic acid and Western blot analysis was performed. The presence of TGF- $\beta$ 1 was proven in all samples, with relative quantification of the obtained results. Immunohistochemical analysis of tumor tissue obtained by biopsy also demonstrated the presence of TGF- $\beta$ 1 in all samples.

In conclusion, results obtained by liquid biopsy are identical to those obtained by tissue biopsy. The above, along with the necessary further research, allows liquid biopsy to be introduced into clinical practice as a non-invasive method that enables high-quality screening, diagnosis and disease monitoring in patients with colorectal cancer.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## UTVRĐIVANJE PRISUSTVA TGF- $\beta$ 1 METODAMA TEKUĆE I TKIVNE BIOPSIJE KOD PACIJENATA S KOLOREKTALNIM KARCINOMOM

Tamara Bašić

### SAŽETAK

Kolorektalni karcinom bolest je čija je prevalencija posljednjih godina u stalnom rastu. U početnom je stadiju bez simptoma, zbog čega je rana dijagnostika ključna za poboljšanje prognoze bolesti te smanjenje smrtnosti. Zbog invazivnosti i ograničenja kolonoskopije te tkivne biopsije kao postojećih dijagnostičkih metoda, kao inovacija u području onkologije razvijena je tekuća biopsija. To je neinvazivna i ponovljiva metoda kojom je iz periferne krvi pacijenata moguće izolirati egzosome porijeklom iz tumorskog tkiva. Egzosomi prenose molekule s potencijalom da se koriste u praćenju bolesti, a jedna od njih je protein TGF- $\beta$ 1. Mutacije u njegovoj signalizaciji utječu na staničnu proliferaciju, progresiju tumora te razvoj metastaza. Cilj ovog rada bio je utvrditi prisutnost TGF- $\beta$ 1 u egzosomima pacijenata s kolorektalnim karcinomom dobivenima metodom tekuće biopsije te je usporediti s rezultatima imunohistokemijske analize tumorskog tkiva dobivenog biopsijom. Metodom tekuće biopsije izolirani su egzosomi iz uzoraka plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom. U uzorcima je određena koncentracija proteina spektrofotometrijskom metodom s bicinkonitičnom kiselinom te je provedena Western blot analiza. Prisutnost TGF- $\beta$ 1 dokazana je u svim uzorcima, a napravljena je i relativna kvantifikacija rezultata. Imunohistokemijskom analizom tumorskog tkiva dobivenog biopsijom u svim je uzorcima također dokazana prisutnost TGF- $\beta$ 1. Iz dobivenih se rezultata može zaključiti da su rezultati dobiveni tekućom biopsijom istovjetni onima dobivenima tkivnom biopsijom. Navedeno, uz potrebna daljnja istraživanja, otvara vrata tekućoj biopsiji da se uvede u kliničku praksu kao neinvazivna metoda koja omogućuje kvalitetan probir, postavljanje dijagnoze te praćenje bolesti kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom.

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

Rad sadrži: 33 stranice, 10 grafičkih prikaza, 6 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, tekuća biopsija, egzosomi, TGF- $\beta$ 1

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Olga Gornik Kljaić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2023.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### DETERMINATION OF TGF- $\beta$ 1 PRESENCE BY LIQUID AND TISSUE BIOPSY METHODS IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

**Tamara Bašić**

#### SUMMARY

Colorectal cancer is a disease whose prevalence has been steadily increasing in recent years. It is asymptomatic in early stages, which is why early detection is essential for improving prognosis and reducing mortality. Due to the invasiveness and limitations of colonoscopy and tissue biopsy as existing diagnostic methods, liquid biopsy was developed as an innovation in the field of oncology. It is a non-invasive and reproducible method by which it is possible to isolate exosomes from the patient's peripheral blood. Exosomes carry molecules originating from tumor tissue with potential to be used in disease monitoring, one of them being TGF- $\beta$ 1. Mutations in TGF- $\beta$ 1 signaling path affect cell proliferation, tumor progression and development of metastases. The aim of this thesis was to determine the presence of TGF- $\beta$ 1 in exosomes from patients with colorectal cancer obtained by liquid biopsy and to compare it with the results of immunohistochemical analysis of tumor tissue obtained by biopsy. Using liquid biopsy, exosomes were isolated from plasma samples of patients with colorectal cancer. The protein concentration in all samples was determined by spectrophotometric method with bicinchoninic acid and Western blot analysis was performed. The presence of TGF- $\beta$ 1 was proven in all samples, with relative quantification of the obtained results. Immunohistochemical analysis of tumor tissue obtained by biopsy also demonstrated the presence of TGF- $\beta$ 1 in all samples. In conclusion, results obtained by liquid biopsy are identical to those obtained by tissue biopsy. The above, along with the necessary further research, allows liquid biopsy to be introduced into clinical practice as a non-invasive method that enables high-quality screening, diagnosis and disease monitoring in patients with colorectal cancer.

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

Thesis includes: 33 pages, 10 figures, 6 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: colorectal cancer, liquid biopsy, exosomes, TGF- $\beta$ 1

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Olga Gornik Kljaić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2023.