

Metode za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica

Hanžek, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:824878>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-09**



Repository / Repozitorij:

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



Antonija Hanžek

**Metode za izolaciju cirkulirajućih tumorskih
stanica**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju *Klinička biokemija organa i organskih sustava I* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Józsefa Petrika u akademskoj godini 2018./2019. Rad je izrađen u okviru Sveučilišne financijske potpore pod nazivomu „Izolacija eksosoma i vanstanične DNA iz medija kultiviranih tumorskih stanica“.

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Józsefu Petriku na stručnom vodstvu i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.

Najveće hvala mojim prijateljima i obitelji, a posebno baki i djedu, na pruženoj podršci tijekom cijelog studiranja.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Tekuća biopsija | 1 |
| 1.2. Usporedba tekuće i tkivne biopsije | 3 |
| 1.3. Cirkulirajuće tumorske stanice | 4 |
| 1.4. Dijagnostički značaj cirkulirajućih tumorskih stanica | 6 |
| 1.5. Tehnologije i metode analize cirkulirajućih tumorskih stanica | 9 |
| 1.5.1. Metode izolacije cirkulirajućih tumorskih stanica | 9 |
| 1.5.2. Strategije detekcije i karakterizacije cirkulirajućih tumorskih stanica | 14 |
| 1.6. ScreenCell® tehnologija za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica | 16 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 18 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 19 |
| 3.1. Korištenje kemikalije i pribor | 19 |
| 3.2. MDA-MB-231 stanična linija karcinoma dojke | 20 |
| 3.3. Uzorci pune krvi | 21 |
| 3.4. Priprema uzoraka pune krvi sa tumorskim stanicama MDA-MB-231 | 22 |
| 3.5. ScreenCell® sustav za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica | 24 |
| 3.6. Pregled ostalih metoda za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica | 26 |
| 4. REZULTATI | 27 |
| 4.1. Priprema uzoraka pune krvi sa MDA-MB-231 tumorskim stanicama | 27 |
| 4.2. ScreenCell® sustav za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica | 29 |
| 5. RASPRAVA | 32 |
| 5.1. CellSearch ®tehnologija | 33 |
| 5.2. MagSweeper sustav | 34 |
| 5.3. Mikrofluidni uređaji | 35 |
| 5.4. ScreenCell ®tehnologija | 36 |
| 6. ZAKLJUČCI | 40 |
| 7. LITERATURA | 42 |
| 8. SAŽETAK/SUMMARY | 46 |
| 9. PRILOZI | 48 |
| Popis kratica | 48 |
| 10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. Tekuća biopsija

Tekuća biopsija (engl. *liquid biopsy*) je minimalno invazivna tehnika uzorkovanja i analize biomarkera. To je jednostavna alternativa biopsiji tkiva koja omogućuje otkrivanje niza informacija o bolesti ili tumoru uz pomoć analize tekućeg biološkog materijala (krvi, urina, ascitesa i dr.). Mnogi solidni tumori i metastaze otpuštaju biomarkere u sistemsku cirkulaciju (molekule, fragmente, makromolekule i stanice). Tekuća biopsija u onkologiji može uključiti analizu cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC), cirkulirajuće tumorske DNA (ctDNA), egzozoma i microRNA (Palmirotta i sur., 2018).

Cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *circulating tumor cells, CTC*) su intaktne tumorske stanice koje se odvajaju od primarnog tumora ili metastaza i nalaze se u perifernoj cirkulaciji. Otkrivene su 1869. godine u krvi bolesnice sa karcinomom dojke (Ashworth TR, 1869). Analiza CTC-a iz krvi može poslužiti za rano otkrivanje invazivnog karcinoma, ima prognostički značaj u praćenju maligne bolesti ili prilikom praćenja odgovora na kemoterapiju. Tekuća biopsija pruža mogućnost analize primarnog tumora, što uključuje analizu proteina i DNA/RNA tj. molekularno profiliranje nakon izolacije CTC. (Qin i sur., 2016).

Slobodna cirkulirajuća DNA (eng. *cell free DNA, cfDNA*) otpušta se u cirkulaciju iz oštećenih stanica različitim mehanizmima, prvenstveno apoptozom i nekrozom. Kod onkoloških bolesnika, frakcija cfDNA porijeklom iz tumora naziva se **cirkulirajuća tumorska DNA** (engl. *circulating tumor DNA, ctDNA*), a čine ju DNA fragmenti veličine 120-200 pb. Primarni izazov analize ctDNA je niska koncentracija ctDNA u odnosu na ukupnu DNA u serumu. Koncentracija ctDNA može varirati od 0,01% do 90 % u odnosu na ukupnu cfDNA što je posljedica stadija tumora i odgovora na terapiju (Qin i sur., 2016). ctDNA nosi genske i epigenske promjene porijeklom iz primarnog tumora te omogućuje molekularnu analizu mutacija na temelju izolirane ctDNA iz plazme. Klinički se koristi kao biomarker za stratifikaciju bolesnika i odabir terapije te praćenje učinka ili rezistencije na terapiju kod karcinoma pluća i kolorektalnog karcinoma (Neumann i sur., 2018; Schmiegel i sur., 2017). ctDNA može se koristiti za otkrivanje rezistencije na terapiju u stvarnom vremenu u praćenju bolesnika sa karcinomom dojke, jajnika i pluća (Murtaza i sur., 2013). U

odnosu na CTC, izolacija ctDNA je jednostavnija. Međutim, klinička rutinska praksa sporo prihvaća ovaj pristup budući da još uvijek postoje izazovi analize povezani sa niskom koncentracijom i nestabilnosti ctDNA.

Općenito, većina studija je usmjerena na tumore u uznapredovalnoj fazi sa visokim koncentracijama ctDNA. Također, zahtjevno je razlikovati ctDNA od normalne cfDNA, a visoke koncentracije cfDNA koje su prisutne u upali mogu razrijediti ctDNA i ometati detekciju. Za potvrdu ctDNA kao kliničkog biomarkera potrebna su multicentrična klinička ispitivanja koja uključuju velike kohorte bolesnika i vrlo osjetljive metode (Qin i sur., 2016).

Egzosomi su subcelularne membranom obavijene vezikule promjera 30-150 nm, građene od proteina, mRNA, miRNA i DNA. Identificirane su u visokim koncentracijama u krvi, ascitesu i likvoru, čak i kod tumora koji nemaju mjerljivu razinu CTC-a u cirkulaciji. Tumori središnjeg živčanog sustava ne seceniraju CTC u cirkulaciju zbog prisutnosti krvno-moždane barijere, ali mogu otpuštati visoku koncentraciju egzosoma. Egzosomi su stabilni, stoga se mogu analizirati iz pohranjenih i zamrznutih uzoraka. Zbog velike količine proteina i nukleinskih kiselina daju informaciju o primarnom tumoru i mikrookolišu. Istraživanja su identificirala nove egzosomalne miRNA markere kod raka pluća, prostate i želuca te prikazala značaj egzosomalne DNA za tumorsku molekularnu analizu (Shao i sur., 2016). **miRNA** su nekodirajuće RNA molekule s funkcijom regulacije genske ekspresije. Iako su distribuirane posvuda u genomu, većina ih se nalazi na fragilnim područjima koja su deletirana u različitim karcinomima, stoga alternacije miRNA mogu odražavati progresiju i nastanak tumora. Najčešći miRNA biomarkeri su u karcinomu kolona, pluća, dojke i kože. Međutim, trenutni uvid u literaturne podatke ne sugerira obećavajuće rezultate za korištenje miRNA kao dijagnostički alat tekuće biopsije u kliničkoj praksi, primarno zbog nedostatka adekvatne tehnologije (Arneth, 2018).

1.2. Usporedba tekuće i tkivne biopsije

Biopsija je postupak uzimanja uzorka tumorskog tkiva koje se fiksira u formalinu i uklapa u parafinske blokove. Tako dobiveni uzorci (engl. *formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE*) se analiziraju s ciljem postavljanja dijagnoze i u svrhu patohistološke analize tumorskog tkiva. Tkivna biopsija je zlatni standard patohistološke informacije za postavljanje dijagnoze te je nužna za diferencijaciju normalne od malignih lezija. Tkivna biopsija daje uvid u histološke karakteristike tumorskog tkiva. Međutim, ovisi o stadiju karcinoma, lokalizaciji i vremenu uzorkovanja (Ameth, 2018).

Prednosti tekuće biopsije u odnosu na tkivnu biopsiju leži u činjenici kako su krv, urin i ekstravaskularne tjelesne tekućine lakše dostupne. Biopsije tumorskog tkiva su invazivne, bolne, vremenski zahtjevne i nose određen rizik od komplikacija. Nisu izvedive u stanjima pogoršanja bolesti ili kada nije poznata lokalizacija primarnog sijela. Tekuća biopsija je uvijek primjenjiva upravo zbog jednostavnosti uzorkovanja periferne krvi te omogućuje manje invazivnu detekciju, karakterizaciju i praćenje tumora (Poulet i sur., 2019).

Izazov u razvoju analitičke metode je molekularna heterogenost između subtipova maligne bolesti. Identifikacija specifičnih mutacija u ciljanim genima bitna je u kliničkoj odluci prilikom odabira terapije. Heterogenost somatskih mutacija tumora predstavlja izazov za liječenje jer postoji mogućnost da se jednom biopsijom tkiva ne otkrije relevantna lezija za primjenu odgovarajuće terapije. Tekuća biopsija daje bolji uvid u genom čitavog primarnog tumora i metastaza (Qin i sur., 2016). Vremenska i prostorna ograničenja tkivne biopsije su evidentna kod pojave stečene rezistencije na terapiju i longitudinalnog praćenja bolesti i odgovora na terapiju. Poznato je da se nestabilan genom tumora dinamički mijenja u vremenu kao odgovor na terapiju što rezultira supresijom ili pojačanim rastom određenih staničnih klonova. Tekuća biopsija omogućuje analizu tumora u stvarnom vremenu (Palmirotta, 2018). Upravo zato je primjenjiva za serijsko praćenje bolesnika u bilo kojem trenutku te omogućuje manje invazivan uvid u tumorsku heterogenost (Poulet i sur., 2019).

Implementacija ovakve tehnologije dovodi do napretka u ishodima bolesti i olakšava pristup za detekciju mutacija u karcinomu pluća, kolona i dojke. Već je prisutna u kliničkoj praksi u praćenju bolesnika sa karcinomom pluća, kolona, dojke, cerviksa i mokraćnog mjehura. Iako test još mora

ostvarariti puni potencijal, brzo postaje standardni onkološki alat za prognostičku i prediktivnu informaciju (Molina i sur., 2017).

1.3. Cirkulirajuće tumorske stanice

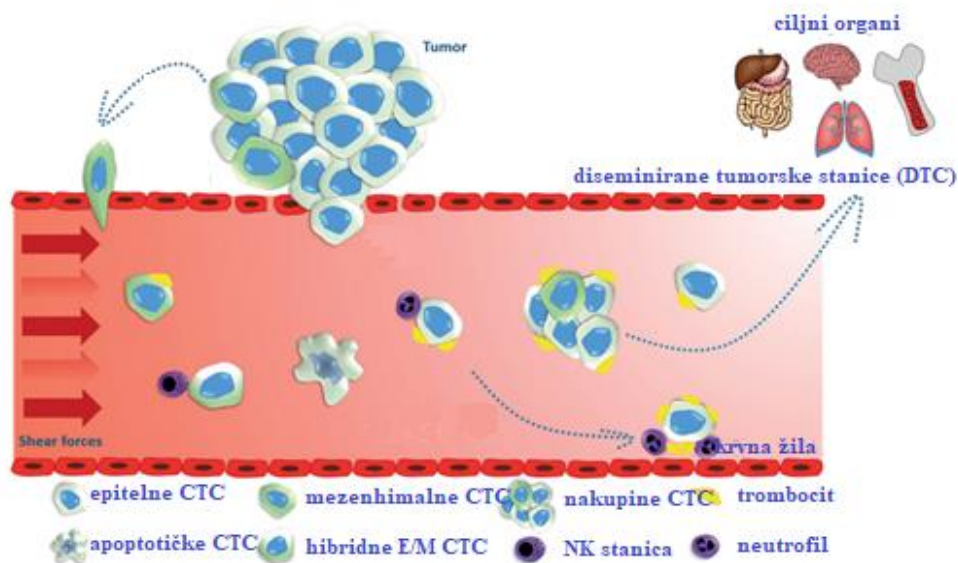
Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) su intaktne stanice u perifernoj krvi porijeklom iz solidnih tumora ili metastaza. To su vrlo rijetke stanice s frekvencijom pojave 1 tumorske stanice na 5×10^6 leukocita i 5×10^9 eritrocita po mililitru krvi u bolesnika sa uznapredovalim karcinomom (de Wit i sur., 2014). Danas su razvijene brojne tehnologije izolacije koje razlikuju CTC od normalnih stanica krvi. CTC su rigidnije stanice od leukocita sa gustoćom $> 1,077 \text{ g/mL}$, većeg promjera od krvnih stanica sa rasponom 8-11 μm i relativno veće, primjerice oko 30 μm u karcinomu dojke (Zhe i sur.,2011).

Degradacijom tumorske mase u prvim fazama metastatske kaskade tumorske stanice se otpuštaju i limfo-hematogenom diseminacijom migriraju u distalne dijelove tijela. Prilikom cirkulacije i kolonizacije dolazi do različitih interakcija sa drugim stanicama koje mogu dovesti do promjena CTC fenotipova (Lozar i sur., 2019). Većina CTC-a umire, dok 0,01 % ima potencijal formiranja metastaza i sekundarnih žarišta bolesti. Mogu biti prisutne kao pojedinačne stanice ili nakupine stanica. Smatra se da je smještanje CTC-a u distalnim organima primarni uzrok nastanka metastaza. Jednom kada se lokaliziraju u organima (koštana srž, jetra, pluća ili mozak), nazivaju se diseminiranim tumorskim stanicama (DTC) (Zhe i sur., 2011). DTC i mikrometastaze mogu biti u dormantnoj fazi godinama nakon resekcije primarnog tumora prije nego što dođe do proliferacije pod utjecajem mikrookoliša i formiranja metastaza. DTC porijeklom iz metastaza mogu zatim recirkulirati putem krvi te kolonizirati druge organe i stvarati sekundarne metastaze. Istraživanja sugeriraju da se DTC mogu preobraziti u CTC te se ponovo vratiti u primarni tumor što rezultira stvaranjem agresivnih varijanta metastaza. Budući da je metastaziranje vodeći uzrok smrtnosti od karcinoma, upravo ovi procesi utječu na progresiju bolesti i preživljenje u čemu leži potencijal CTC-a kao prognostičkog biomarkera (Alix-Panabières i Pantel, 2013).

CTC su većinom potječu iz solidnih tumora epitelnog porijekla (dojka, prostata, kolon i pluća). CTC su stanice s jezgrom, sa ekspresijom adhezijske molekule epitelnih stanica (EpCAM) i/ili citokeratinima (CK) u citoplazmi, a bez ekspresije zajedničkog leukocitnog antigena CD45. Danas se zna da postoji značajna heterogenost vrsta i površinskih biljega što predstavlja izazov u izolaciji

svih klinički relevantnih subpopulacija. Važan je razvoj novih tehnologija koje omogućuju izolaciju različitih fenotipova CTC-a (Ferreira i sur.,2016).

Poteškoća analize CTC-a je stanična plastičnost, odnosno epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT). Proces epitelno-mezenhimalne tranzicije je izmjena epitelnog u mezenhimalni fenotip. EMT je složeni proces stanične dediferencijacije i povećane mobilnosti stanica uslijed reorganizacije kontaktnih veza i gubitka adhezijskih molekula. Iako se ovaj mehanizam primarno događa kod organogeneze i zacjeljivanja rana, povezuje se sa diseminacijom tumora i korelira sa agresivnošću uslijed povećane migracije tumorskih stanica. Suprotan proces je također moguć, MET (mezenhimalno-epitelna tranzicija) za koji se predlaže da ima ulogu u prelasku dormantnih DTC-a u organima u metastaze. Imajući ovo na umu, potencijalno značajna agresivna populacija tumorskih stanica prisutnih u cirkulaciji propuštena je standardnim metodama i kriterijima detekcije CTC-a temeljenim na epitelnim biljezima (Alix-Panabières i Pantel, 2013).



Slika 1. Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) nastaju degradacijom primarnog tumora i ulaskom tumorskih stanica u cirkulaciju. Postoji više fenotipova CTC-a: epitelne, mezenhimalne, hibridne (epitelno-mezenhimalne) i apoptotičke CTC. Mogu biti prisutne kao pojedinačne stanice ili nakupine. Ekstravazacijom prelaze iz krvi u distalne organe (koštana srž, jetra, pluća, mozak) gdje se lokaliziraju kao diseminirane tumorske stanice (DTC) koje imaju potencijal formiranja metastaza (Preuzeto i prevedeno iz Lozar i sur., 2019).

1.4. Dijagnostički značaj cirkulirajućih tumorskih stanica

Maligna bolest je globalni javnozdravstveni problem današnjice. Prema podacima Državnog registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, stope incidencije i mortaliteta za rak u Hrvatskoj, u stalnom su porastu. S ukupnom incidencijom raka od 567/100 000 te stopom mortaliteta 335/100 000 karcinom je od drugi od najčešćih uzroka smrtnosti, odmah iza kardiovaskularnih bolesti (<https://www.hzjz.hr>).

S ciljem smanjenja smrtnosti i poboljšanja ishoda bolesti važan je razvoj novih metoda koje omogućuju ranu dijagnostiku i praćenje bolesnika u svim fazama bolesti. Ciljevi istraživanja CTC-a kao multifunkcionalnog biomarkera uključuju: (1) identifikaciju terapijskih meta, (2) stratifikaciju onkoloških bolesnika i praćenje terapije u stvarnom vremenu (prediktivni značaj), (3) procjenu rizika za metastatski relaps ili progresiju bolesti (prognostički značaj) te (4) otkrivanje mehanizama rezistencije na terapiju (Alix-Panabieres i Pantel, 2013).

Molekularna karakterizacija CTC-a pruža neinvazivan pristup genotipskim i fenotipskim karakteristikama tumora. Odluke o terapiji empirijski su definirane histologijom tumora nakon biopsije koja je ponekad izvedena nakon početne terapijske odluke. Karakterizacija tumora iz CTC-a pomoću jednostavnog testa iz krvi mogla bi omogućiti učinkovitije liječenje i smanjiti incidenciju nepotrebne toksičnosti i nuspojava kod bolesnika na pogrešnoj kemoterapiji i imunoterapiji (Krebs i sur., 2010). Detekcija mutacija na temelju analize CTC pruža informaciju koja značajno ubrzava pronalazak terapijske mete. Kraći *turnaround* (engl. *turnaround time*, TAT) rezultata molekularne analize na temelju CTC-a u odnosu na tkivnu biopsiju dovodi do brže terapijske intervencije i boljeg ishoda bolesti. Budući da mutacijski profil tumora utječe na odabir terapije, istraživanja su napravljena na kolorektalnom karcinomu, (Kong i sur., 2017), karcinomu pluća (Marchetti i sur., 2014), karcinomu dojke i melanomu (Wechsler i sur., 2017).

Prediktivni značaj analize CTC-a uključuje detekciju CTC-a u ranoj fazi maligne bolesti kod resektabilnih solidnih tumora. Cilj je praćenje djelotvornosti terapije te odabir bolesnika koji imaju najveću korist od adjuvantnog liječenja. Nadalje, praćenje broja CTC-a nakon završetka terapije i praćenja bolesnika može otkriti recidiv ranije nego radiološki parametri, stoga su istraživanja analize CTC izrazito korisna kao pomoć pri prognozi bolesti ukoliko se uključe u postojeće algoritme i klasifikacije stadija bolesti (Krebs i sur., 2010).

Prognostički značaj analize CTC-a je potvrđen na različitim vrstama tumora. Ovo područje istraživanja je najaktivnije, zahvaljujući razvoju *CellSearch*® tehnologije koja omogućuje vrijednu informaciju za donošenje kliničke odluke u bilo kojem trenutku praćenja bolesnika. Broj CTC je nezavisni prediktor ukupnog preživljenja (engl. *overall survival*, OS) i razdoblja bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*, PFS) kod bolesnika s metastatskim karcinomom dojke, prostate i kolorektalnog karcinoma (www.cellsearch.com).

U karcinomu dojke, povišen broj CTC stanica sa graničnom vrijednosti od 5 CTC u usporedbi sa bolesnicama sa < 5 CTC je nezavisni prediktor za lošiji ishod bolesti, točnije razdoblje bez progresije bolesti (PFS) i ukupnog preživljavanja (OS). Kod praćenja bolesnica, broj CTC u bilo kojoj kasnijoj vremenskoj točki reproducibilno predviđa klinički ishod bolesnica sa lošijim PFS i OS kada je broj CTC povišen ≥ 5 (Cristofanili i sur., 2005).

U ranom raku dojke, provedena su istraživanja na bolesnicama na neoadjuvantnoj i adjuvantnoj terapiji. Dokazano je da je povišeni broj CTC neovisan i kvantitativan prognostički faktor s negativnim učinkom na ukupno preživljenje (OS), razdoblje bez bolesti (engl. *Disease-free survival*, DFS) i razdoblje bez relapsa bolesti (engl. *Relapse-free survival*, RFS). Također, CTC-pozitivnost korelira sa većom masom tumora, nodalnim statusom i višim histološkim stadijem tumora nego što su CTC-negativne bolesnice (Bidard i sur., 2018; Janni WJ, 2016).

Analiza podataka iz 17 različitih centara utvrdila je značaj kvantifikacije CTC-a u prognozi bolesnica sa metastatskim karcinomom dojke. Demonstrirana je prednost broja CTC-a nad standardnim tumorskim markerima (CEA, CA15.3) koji se koriste za praćenje karcinoma dojke. Za razliku od tumorskih markera, dodatak i praćenje promjena broja CTC tijekom kemoterapije u optimizirane kliničko-patološke modele značajno poboljšava prognozu bolesnica sa metastatskim karcinomom dojke (Bidard i sur., 2014).

Kod metastatskog karcinoma prostate, bolesnici sa CTC ≥ 5 imaju značajno lošiji ishod bolesti. Osim što je CTC pouzdan prediktivni biljeg za OS, pokazalo se da je bolji u odnosu na sniženje koncentracije tumorskog biljega PSA (prostata specifični antigen) koji se trenutno rutinski koristi za praćenje bolesnika (de Bono i sur., 2008).

Kod kolorektalnog karcinoma, dinamika promjene broja CTC-a od početne do slijedeće točke analize omogućuje bolju diskriminaciju bolesnika prema ishodu bolesti nego što je kod karcinoma

dojke i prostate. Bolesnici sa povišenim brojem CTC ≥ 3 imaju znatno lošiji OS u odnosu na bolesnike sa niskim CTC $< 3/7,5$ mL krvi (Cohen i sur., 2009).

Analiza CTC-a iz periferne krvi značajna je kod karcinoma pluća budući da je tkivna biopsija anatomski otežana. Istraživanja na bolesnicima sa karcinomom pluća su u skladu s korelacijom između visokog broja CTC-a i loše prognoze u ranoj i naprednoj fazi bolesti. Smanjenje broja CTC-a nakon liječenja može predstavljati važan pokazatelj osjetljivosti na terapiju u bolesnika s metastatskim karcinomom pluća (Gallo i sur., 2017).

Prognostički značaj povišenog broja CTC-a pomoću *CellSearch*[®] tehnologije pokazan je i na karcinomu mjehura, gušterače, tumorima glave i vrata, karcinomu jajnika i hepatocelularnom karcinomu (Andree i sur., 2015).

Otkrivanje rezistencije na terapiju još je jedna primjena CTC-a u dijagnostičke svrhe. Provode se istraživanja kliničke primjene analize CTC-a kao kriterija kliničke odluke za promjenu terapije. U tijeku je CirCe01 istraživanje u Francuskoj na karcinomu dojke temeljeno na detekciji rane promjene broja CTC-a prilikom praćenja kemoterapije. Bolesnice sa CTC $\geq 5/7,5$ mL krvi biti će prebačene na iduću liniju kemoterapije s ciljem boljeg ishoda bolesti. Cilj je objektivno opravdati rani prekid neučinkovitih terapija i koristiti CTC kao alat otkrivanja kemorezistencije (Bidard i sur., 2013)

Međutim, potrebna su daljnja istraživanja CTC-a, no ovaj dinamički kvantitativni i kvalitativni test zasigurno će poboljšati kvalitetu i očekivano trajanje života oboljelih od maligne bolesti.

1.5. Tehnologije i metode analize cirkulirajućih tumorskih stanica

U novije vrijeme su dostupni sustavi koji omogućuju kvalitetno izdvajanje cirkulirajućih tumorskih stanica. Postoje različite strategije analize CTC-a ovisno o cilju istraživanja i kliničke primjene, a uključuju tri ključna postupka analize: izolaciju, detekciju i karakterizaciju.

1.5.1. Metode izolacije cirkulirajućih tumorskih stanica

Metode izolacije CTC-a temelje se na razlikama između CTC-a i normalno prisutnih stanica krvi. To su fizikalna svojstva (veličina, gustoća, električni naboj, deformabilnost) i specifična biološka obilježja (ekspresija površinskih proteina i vijabilnost) (Alix-Panabières i Pantel, 2013).

Najčešće korišteno načelo izolacije temelji se na imunoafinitetu. Ove metode uključuju detekciju specifičnih biljega (antigena) na staničnoj površini. Temelje se na imunokemijskim reakcijama antitijela usmjerenih na tumorske biljege, najčešće EpCAM molekulu (pozitivna selekcija) ili na leukocitni antigen CD45 (negativna selekcija) (Ferreira i sur., 2016).

CellSearch® sustav (Janssen Diagnostics, Veridex) je prva klinički validirana i odobrena tehnologija tekuće biopsije za analizu CTC-a iz periferne krvi. Ova komercijalno dostupna tehnologija koristi se u svrhu izolacije, identifikacije i kvantifikacije cirkulirajućih tumorskih stanica iz uzorka krvi. Omogućuje jednostavnu, preciznu i reproducibilnu analizu CTC-a koja uključuje prikupljanje, pripremu i analizu uzorka pomoću imunomagnetske analize i fluorescentne slikovne tehnologije (www.cellsearch.com).

Metoda je 2004. godine odobrena od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) za praćenje bolesnika sa metastatskim karcinomom dojke, 2007. za praćenje bolesnika sa kolorektalnim karcinomom, a 2008. za praćenje metastatskog karcinoma prostate. Od tada se koristi za većinu znanstvenih i kliničkih istraživanja CTC-a na različitim tipovima tumora i predstavlja referentnu metodu analize CTC-a.

CellSearch® sustav sastoji se od poluautomatiziranog uređaja i odgovarajućih komponenata. To su epruvete za prikupljanje uzoraka, komercijalno dostupan pakets a reagensima potrebnim za analizu, kontrolni uzorci (tumorske stanice u visokoj i niskoj koncentraciji), sustav za automatiziranu i standardiziranu pripremu uzoraka, nosač kazeta za magnetsku separaciju stanica te fluorescentni analizator povezan sa odgovarajućim softverom i sučeljem za obradu stanica.



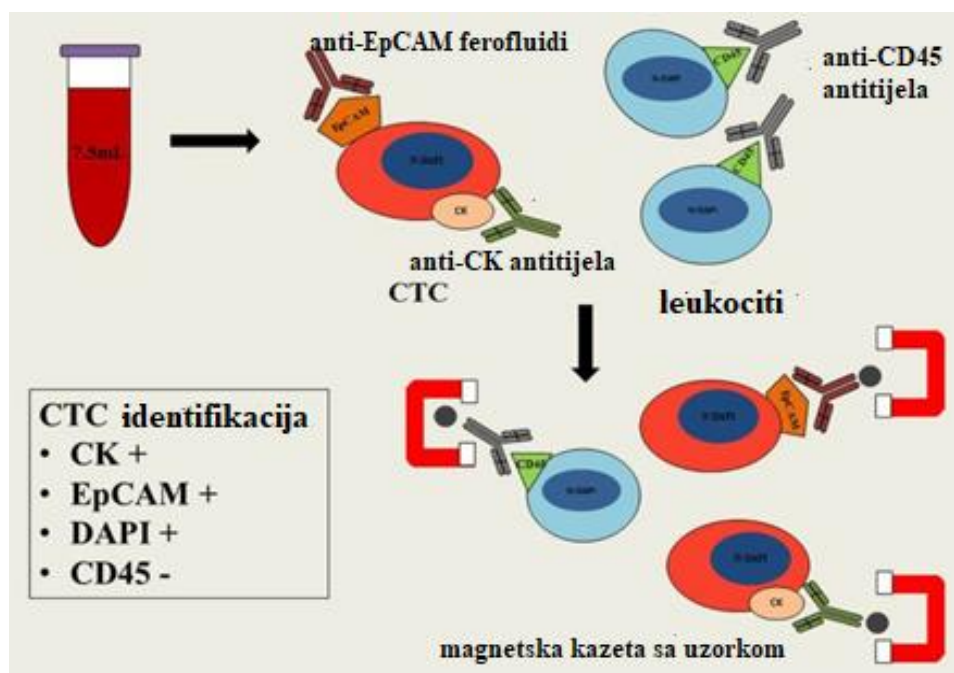
Slika 2. *CellSearch@* uređaj za imunomagnetsku analizu cirkulirajućih tumorskih stanica.(preuzeto sa: www.cellsearch.com)

Prvi korak je prikupljanje uzoraka. Uzorak za analizu CTC-a je puna krv u volumenu 7,5 mL. Budući da su CTC osjetljive stanice podložne degradaciji, krv se prikuplja u specijalizirane *CellSave* epruvete (Janssen Diagnostics) koje omogućuju stabilizaciju stanica na sobnoj temperaturi. Uzorci se obrađuju 96 sati nakon prikupljanja u klasične *CellSave* epruvete. U slučaju analize vijabilnih stanica ili istraživanja RNA ekspresije u CTC, preporučuje se uzorkovanje krvi na EDTA i obrada unutar 24 sata (de Wit i sur., 2014).

Načelo metode je imunomagnetska analiza. Tehnologija koristi ferrofluidne nanočestice funkcionalizirane EpCAM antitijelima koja omogućuju magnetsku separaciju EpCAM pozitivnih stanica od ostalih komponenti krvi nakon centrifugiranja. Slijedi imunofluorescentno obilježavanje CTC-a pomoću antitijela na citokeratine (CK 8, 18 i 19) koji su specifični za tumorske epitelne stanice. Nadalje, vrši se identifikacija kontaminirajućih leukocita korištenjem antitijela na CD45 zajednički leukocitni antigen. Konačno slijedi bojanje jezgre stanica pomoću boje DAPI (4',2'-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid).

Uzorci se pripremaju za analizu pomoću kazete za magnetsku separaciju. Magnetsko polje omogućuje razdvajanje stanica tako da svaka pojedinačna stanica prolazi kroz detektor koji

bilježi signal na temelju fluorescencije. Sustav selektira i registrira EpCAM+/CK+/CD45-/DAPI+ stanice kao potencijalne CTC kandidate te ih pomoću softvera prezentira krajnjem korisniku sustava za interpretaciju rezultata. Rezultat se bilježi kao broj CTC/7,5 mL pune krvi (Swennenhuis i sur., 2016; www.cellsearch.com).

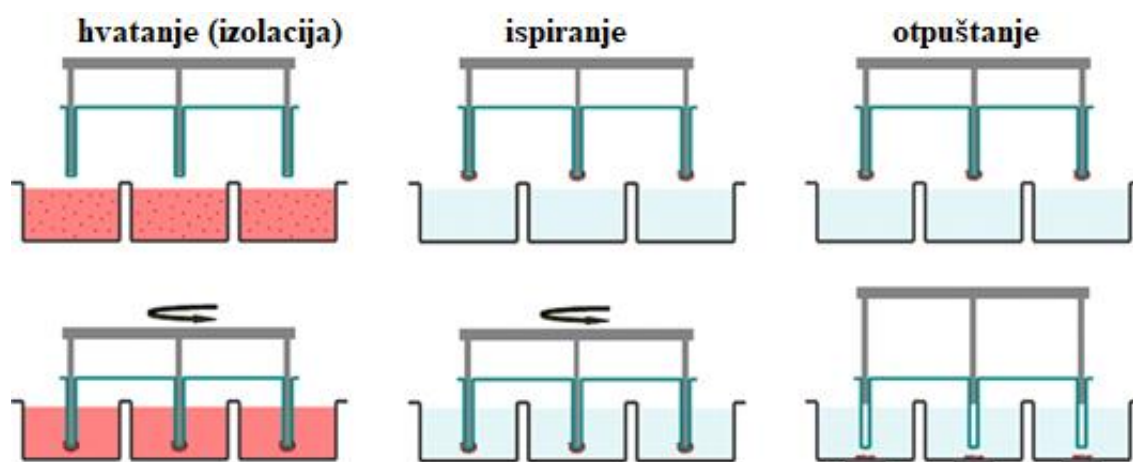


Slika 3. Shematski prikaz izolacije cirkulirajućih tumorskih stanica pomoću *CellSearch®* tehnologije. Sustav izolira i identificira CTC koje imaju jezgru (DAPI+), eksprimiraju epitelne biljege, tj. citokeratine (CK+) i epitelnu adhezijsku molekulu EpCAM (EpCAM+) te ne eksprimiraju leukocitni antigen CD45 (CD45-) (Preuzeto i prevedeno iz Truini i sur., 2014).

Slična platforma detekcije CTC-a je *AdnaTest* (AdnaGen AG) kod koje se izolacija i obogaćivanje ostvaruje pomoću magnetskih čestica obloženih antitijelima. *AdnaTest* koristi više antitijela koja su specifična za pojedini tip tumora (karcinom dojke, prostate, jajnika i kolona) (Ferreira i sur., 2016).

MagSweeper, imunomagnetska tehnologija za izolaciju i obogaćivanje može izolirati CTC visoke čistoće. Funkcionalni dio uređaja je robotski kontrolirana magnetska ruka koja izolira CTC iz

uzorka. Postupak izolacije sastoji se od tri koraka: hvatanje željenih stanica, ispiranje i otpuštanje neželjenih stanica. Uzorak se pomiješa sa magnetskim česticama obloženim tumorskim antitijelima. Razrijeđeni uzorci krvi, koji su prethodno označeni magnetskim česticama, ubacuju se u jažice. Magnetska šipka (ruka) prolazi kružnim pokretima iznad jažica sa uzorkom te izdvaja magnetski obilježene CTC. Nakon prolaska kroz čitavo područje, slijedi pranje kako bi se uklonile slabo vezane neželjene stanice. Neželjene neoznačene kontaminirajuće stanice se otpuštaju. Proces se ponavlja dok se ne dobiju CTC visoke čistoće (Preuzeto sa Talasz i sur., 2009).



Slika 4. Shematski prikaz imunomagnetske izolacije CTC-a pomoću *MagSweeper* tehnologije. Postupak izolacije sastoji se od tri koraka: „hvatanje“ magnetski obilježenih stanica, ispiranje stanica te otpuštanje kontaminirajućih stanica (Preuzeto i prevedeno sa Talasz i sur., 2009).

Obećavajuće područje analize CTC-a su **mikročipovi i mikrofluidni uređaji**, kao što su *CTC-Chip*, *GEDI* i *OncoCEE*. Mikrofluidi, tzv. „laboratorij na čipu“ multidisciplinarno su područje koje proučava ponašanje fluida na mikroskali. Mikrofluidni uređaji su mali, potpuni analitički sustavi koji imaju integrirane sve potrebne komponente za analizu uzorka, u ovom slučaju izolaciju CTC-a.

Prvi mikrofluidni uređaj *CTC-Chip* dizajniran u svrhu izolacije CTC-a razvijen je 2007. godine. Sastoji se se od mikropostroja koji je kemijski funkcionaliziran anti-EpCAM antitijelima.

Geometrijski raspored površine uređaja i kontrola protoka tekućine optimizirana je za učinkovito hvatanje CTC-a na površinu uređaja. Pomoću ove tehnologije, uspješno su izolirane CTC iz periferne krvi bolesnika sa metastatskom bolesti (pluća, dojke, prostate, kolona i gušterače) (Ferreira i sur., 2016).

Imunokemijska mikrofluidna tehnologija *GEDI* testirana je na bolesnicima sa rezistentnim karcinomom prostate. Sustav kombinira pozitivnu selekciju pomoću mikročipa s antitijelima na specifični membranski antigen prostate i hidrodinamičku kromatografiju koja izolira stanice na temelju veličine. Studija je provedena s ciljem molekularne karakterizacije CTC-a u svrhu praćenja i otkrivanja nove mete antitumorske terapije (Kirby i sur., 2012).

Uz nisku koncentraciju CTC-a u krvi, kritični korak za analizu CTC-a je mali ili nedovoljan volumen krvi onkoloških bolesnika, stoga su razvijeni uređaji za direktnu ***in vivo izolaciju CTC-a***, kao što je *GILUPI* nanodetektor. Tijekom 30-minutne primjene uređaja u venu podlaktice, velik volumen krvi prolazi kroz uređaj. Unutar uređaja, do 1,5L krvi prolazi kroz “*screening*” područje obloženo antitijelima na EpCAM te se velik broj CTC-a uspješno veže. Površina nanodetektora može biti obložena i specifičnim tumorskim antitijelima, a CTC se skidaju za imunocitokemijsku ili molekularnu analizu. Studija sa kliničkim uzorcima bolesnika sa karcinomom dojke i pluća pokazala je kako *GILUPI* aparatura uspješno izolira CTC. Uređaj je biokompatibilan i bez nuspojava nakon primjene (Saucedo-Zeni i sur., 2012).

Izolacija i obogaćivanje CTC-a temeljeno na biofizikalnim karakteristikama dobiva na popularnosti zbog izolacije neovisne o antitijelima. Takve metode koje se koriste za analizu stanica su optička mikroskopija i protočna citometrija, a temelje se na razlici morfoloških karakteristika i veličine CTC-a u odnosu na leukocite.

Centrifugiranje je jedna od prvih metoda izolacije CTC-a. *OncoQuick*[®] metoda kombinira centrifugiranje u gradijentu gustoće s filtracijom uz pomoć mikroporozne membrane za separaciju stanica. Iako jednostavna i jeftina metoda, koristi se kao početni korak analize CTC-a u kombinaciji s drugim metodama zbog kontaminacije leukocitima.

Mikrofiltracija je metoda sepracije na temelju razlika u veličini između manjih leukocita i većih CTC-a. Komercijalno dostupni uređaji su ISET[®] i ScreenCell[®]. U ovim metodama, razrijeđena

krv propušta se kroz mikroporozni filter nasumično raspoređenih pora koji propušta leukocita, a zadržava (izolira) CTC (Ferreira i sur., 2016).

1.5.2. Strategije detekcije i karakterizacije cirkulirajućih tumorskih stanica

Strategije detekcije i karakterizacije CTC-a slijede izolaciju CTC-a zbog potpune eliminacije leukocita i potvrde na staničnoj razini da se zaista radi o CTC. Generalno, postoje dva osnovna pristupa detekciji i karakterizaciji CTC-a: (1) metode temeljene na proteinima i (2) metode temelje na nukleinskim kiselinama.

Imunofluorescencija i protočna citometrija su metode detekcije i karakterizacije CTC-a temeljene na proteinima.

Najčešća metoda za detekciju CTC-a na temelju proteina je **imunofluorescencija**. Koristi fluorescentno obilježena antitijela, a uključuje fluorescentnu mikroskopiju ili specifične vrste bojanja stanica ovisno o fenotipu tumorske stanice. Prednosti imunofluorescencije su vizualna potvrda proteinske ekspresije i lokalizacije, mogućnost istovremene analize više proteina i kvantifikacija proteinske ekspresije. Nedostaci su niska osjetljivost te slaba komercijalna dostupnost specifičnih antitijela za ovu primjenu. U **protočnoj citometriji** fluorescentno obilježene CTC prolaze kroz snop laserske svjetlosti. Informacija o individualnoj stanici dobiva se na temelju rasapa svjetlosti i fluorescencije koji opisuju oblik stanice, veličinu, granuliranost i ekspresiju biljega što omogućuje klasifikaciju stanica. Prednosti protočne citometrije su multimarkerska analiza na razini pojedinačne stanice, mogućnost sortiranja CTC-a u subpopulacije i dostupnost metode u rutinskoj hematološkoj i onkologiji. S druge strane, nedostaci su niska osjetljivost za rijetke populacije CTC-a te nemogućnost razlikovanja CTC-a i leukocita (Lowes i Allan, 2018).

Metode temeljene na nukleinskim kiselinama su standardne metode molekularne biologije: RT-PCR, Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) te sekvenciranje. Cilj ovih metoda je detekcija specifičnih tumorskih transkripata za potvrdu prisutnosti CTC-a u pozadini ostalih krvnih stanica.

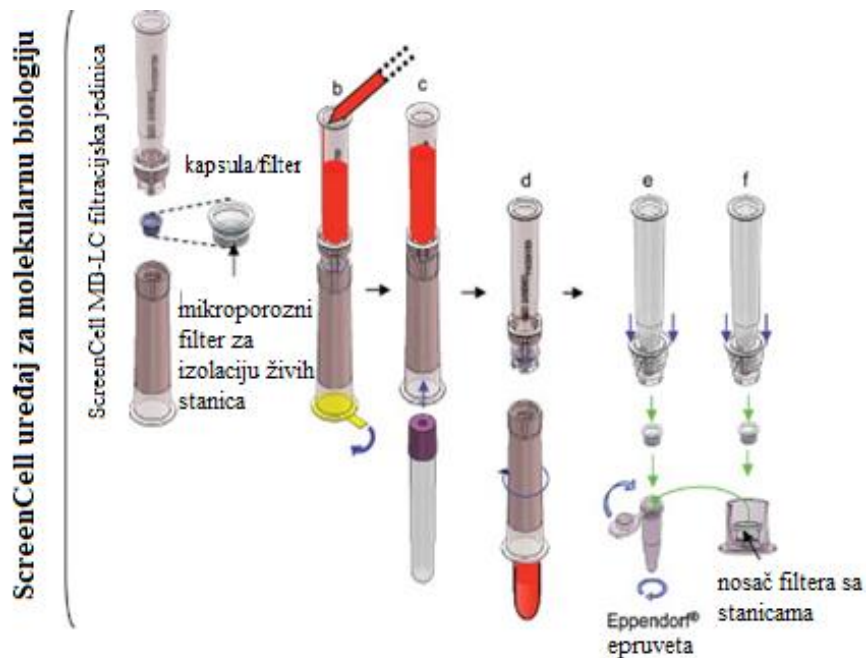
RT-PCR koristi se za detekciju ciljanih transkripata i karakterizaciju CTC (primjerice određivanje HER2, ER, PR statusa kod karcinoma dojke). Prednost ovih metoda je mogućnost analize više gena istovremeno iz malog volumena uzorka što je nužno u istraživanjima CTC-a. **Fluorescentna in situ**

hibridizacija (engl. *Fluorescence in situ hybridization*, FISH) može se koristiti za detekciju i karakterizaciju CTC-a s ciljem otkrivanja promjena u individualnim genima ili kromosomima (Lowes i Allan, 2018). **Sekvenciranje** se smatra idealnim odabirom za karakterizaciju CTC-a jer može koristiti genomsku DNA i cDNA, stoga je moćan alat za analizu specifičnih genomskih aberacija. Prednost sekvenciranja genoma CTC-a je sposobnost otkrivanja promjene na razini jednog nukleotida, a takve mutacije rezultiraju različitim fenotipovima bolesti i predviđaju odgovor na terapiju. Metode sekvenciranja su automatizirane i kvalitativne, stoga se lakše interpretiraju. Nedostatak tehnologije je nemogućnost analize na razini pojedinačne stanice, kao i vizualne potvrde izvora amplificiranog transkripta. Smatra se da je potreban minimum od 50 CTC-a za pouzdane rezultate što je značajno više nego u kliničkim uzorcima (Lowes i Allan, 2018).

1.6. *ScreenCell*® tehnologija za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica

ScreenCell® tehnologija je jednostavna neinvazivna metoda izolacije rijetkih ili atipičnih cirkulirajućih stanica iz pune krvi ili drugih tjelesnih tekućina. Omogućuje jednostavnu izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica u reproducibilnim i standardiziranim uvjetima. Pogodna je za analizu fenotipskih i genotipskih obilježja te funkcionalnu karakterizaciju CTC-a.

Princip izolacije je **mikrofiltracija**, odnosno selekcija stanica na temelju veličine. U uređaju se nalazi okrugli filter hidrofilne površine s cilindričnim porama definirane veličine za izolaciju živih ili fiksiranih stanica. Kako krv prolazi kroz mikroporoznu membranu, tako se se CTC zadržavaju na filteru. Iako značajno manje koncentracije, CTC su veće i rigidnije od krvnih stanica, stoga se uspješno zadržavaju na filteru, dok leukociti, trombociti i eritrociti slobodno prolaze. *ScreenCell*® tehnologija razvijena je kao jeftina i kompaktna, s ciljem izolacije CTC-a bez potrebe za velikom i skupom aparaturom. Uređaj je kompatibilan sa svim relevantnim staničnim i molekularnim metodama analize koje su potrebne za identifikaciju i karakterizacije CTC-a.



Slika 5. *ScreenCell*® MB aparatura za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica.

(Preuzeto i prevedeno iz komercijalno dostupnog paketa *ScreenCell MB KIT*, ref.MB 3LC).

Na tržištu postoje različite konfiguracije *ScreenCell*® aparature ovisno o ciljevima i zahtjevima analize CTC-a. Uređaji dijele temeljno načelo izolacije uz dodatak specijaliziranih karakteristika koje zahtjeva pojedina vrsta analize. „*Molecular biology*“ *ScreenCell MB*® koristi se za genomsku karakterizaciju živih stanica s ciljem sekvenciranja genoma u svrhu identifikacije specifičnih mutacija. „*Cell Culture*“ *ScreenCell CC*® sustav je za izolaciju živih CTC-a te se koristi prilikom funkcionalne karakterizacije stanica s ciljem istraživanja procesa metastaziranja ili detekcije CTC-a sa potencijalom formiranja metasaza. „*Cytology*“ *ScreenCell Cyto*® sustav koristi fiksirane stanice s ciljem kvantifikacije i morfološke karakterizacije stanica (www.screencell.com).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Zloćudni tumori su drugi najčešći uzrok smrti u Hrvatskoj i u većini razvijenih zemalja, odmah iza kardiovaskularnih bolesti. Za liječenje onkoloških bolesnika, od iznimne je važnosti rano otkrivanje prisutnosti karcinoma, odabir najprikladnije terapije, praćenje terapijskog odgovora, rano otkrivanje rezistencije na terapiju i povratka bolesti. Stoga, uvođenje novih vrlo osjetljivih i specifičnih dijagnostičkih postupaka je od velike značajnosti.

Cilj ovog rada je prikazati metode i tehnologije za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica. Cirkulirajuće tumorske stanice u krvi su stanice podrijetlom iz primarnog epitelnog tumora, eksprimiraju epitelne biljege i veće su stanice od stanica leukocitne loze. Cirkulirajuće tumorske stanice, uz druge biomarkere kao što su tragovi RNA ili DNA porijeklom iz stanica karcinoma u krvi, mogu se upotrijebiti od utvrđivanja prisutnosti bolesti do odabira ciljane terapije. Intenzivan razvoj različitih tehnologija tijekom istraživanja molekularnih meta za ciljanu terapiju u velikoj mjeri se oslanja na mogućnostima tzv. tekuće biopsije, minimalne invazivne tehnike za detekciju molekularnih biomarkera. Ta jednostavna i neinvazivna alternativa biopsije tkiva omogućava otkrivanje niza informacija o bolesti ili tumoru pomoću analize krvi bolesnika.

U ovom diplomskom radu razmatrati će se prednosti i nedostaci pojedinih metoda za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica, kao što su: *Cellsearch*[®] tehnologija, *MagSweeper* sustav i mikrofluidni uređaji te će se prikazati rezultati izolacije tumorskih stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 iz krvi dobiveni pomoću *ScreenCell*[®] sustava.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Korištenje kemikalije i pribor

- **Odmrzavanje, presađivanje i uzgoj stanica karcinoma dojke MDA-MB-231:**

- 1) Dulbecco modificirani Eagle-ov medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco modified Eagle medium*, DMEM) (Sigma-Aldrich)
- 2) fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine serum*, FBS) (Gibco)
- 3) Otopina antibiotika i antimikotika (engl. *Antibiotic Antimycotic Solution*) (Sigma-Aldrich)
- 4) L- glutamat (Sigma-Aldrich)
- 5) otopina fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O; sterilno filtrirano
- 6) 0,05 % tripsin - EDTA (Gibco)
- 7) Trypan plavilo boja (Sigma-Aldrich)
- 8) May-Grünwald Giemsa boja (Sigma-Aldrich)
- 9) 37 °C/5 % CO₂ inkubator

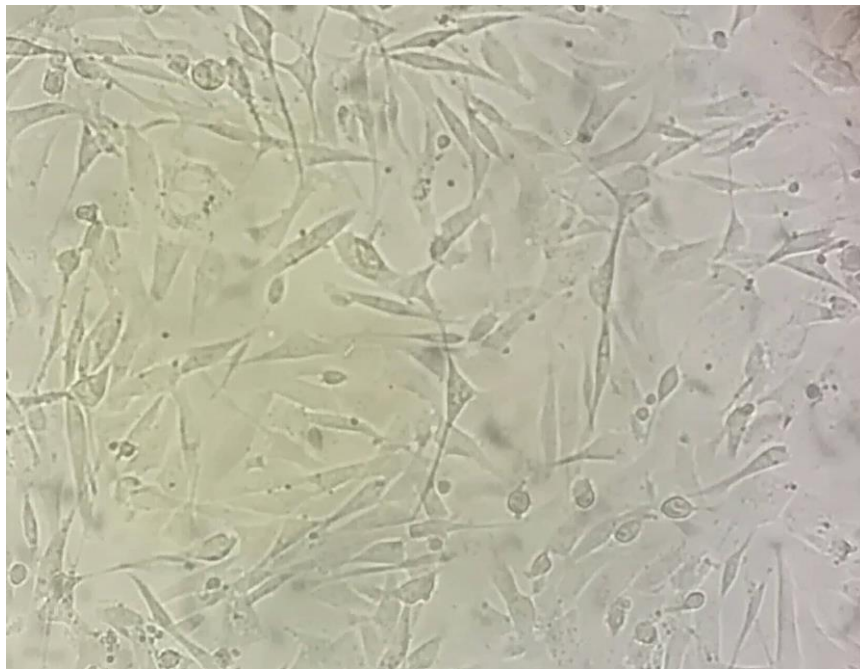
- **Izolacija cirkulirajućih tumorskih stanica pomoću *ScreenCell® MB* sustava:**

- 1) *ScreenCell® MB* kit (cat #MB 3LC)
- 2) *ScreenCell® LC* pufer (ScreenCell, Francuska)
- 3) Uzorci pune krvi (EDTA antikoagulans)
- 4) Fetalni goveđi serum (FBS) (cat # 30-2020, ATCC)
- 5) Pločica za uzgoj stanica sa 24 jažice (cat #353047)
- 6) 70 % etanol
- 7) Sterilne pipete i pinceta
- 8) Sterilni kabinet za uzgoj stanica

3.2. MDA-MB-231 stanična linija karcinoma dojke

MDA-MB-231 stanična je linija humanog karcinoma dojke. Obilježja stanica su invazivnost, agresivnost i slaba diferencijacija. To su trostruko-negativne stanice raka dojke bez ekspresije estrogenskog i progesteronskog receptora i HER2. To su međusobno adherentne stanice epitelnog porijekla koje rastu u jednom sloju pričvršćene za podlogu. Uzgajaju se u DMEM tekućem mediju s dodatkom 10 % FBS-a na temperaturi od 37 °C. (www.phe-culturecollections.org.uk).

MDA-MB-231 učestalo se koriste kao *in vitro* model za istraživanje hormon neovisnog raka dojke. U svrhu ovog ispitivanja, dodane su u punu krv u različitim koncentracijama te predstavljaju simulaciju cirkulirajućih tumorskih stanica. Uzgoj i rast stanica karcinoma dojke prethodi izolaciji “CTC” (MDA-MB-231 stanica) u punoj krvi s ciljem evaluacije *ScreenCell*® MB sustava.



Slika 6. MDA-MB-231 stanična linija humanog karcinoma dojke. Mikrografija predstavlja nativan uzorak slikan inverznim mikroskopom Leitz Wetzler, Germany pri povećanju od 200x.

Postupak kultiviranja: Stanice humanog karcinoma dojke MDA-MB-231 pohranjene su u spremnik s tekućim dušikom na 196 °C. Nakon odmrzavanja, stanice se u sterilnim uvjetima pipetom prenese u epruvetu od 15 mL te se doda 10 mL kompletnog hranjivog medija. Medij sadrži DMEM,

antibiotik, antimikotik, FBS, faktore rasta i glutamat. Stanična suspenzija se centrifugira 5 minuta na 500 g, a zatim se hranjivi medij uklanja vakuum pumpom. Talog se resuspendira u 9 mL hranjivog medija te se stanična suspenzija podjeli na 3 jednaka dijela i prenese u bočice za uzgoj stanica u koje je dodano po 3 mL kompletnog hranjivog medija kako bi ukupan volumen bio 6 mL. MDA-MB-231 stanice promatraju se pod inverznim mikroskopom Leitz Wetzler, Germany te se pohranjuju u inkubator pri 37 °C pri 5 % CO₂. Tijekom rasta stanica potrebna je redovita promjena medija. Morfologija i konfluentnost stanične kulture prati se promatranjem pod inverznim mikroskopom. Nakon postignute odgovarajuće konfluentnosti, stanice se rasađuju. Hranjivi medij se uklanja te se stanice jednokratno ispiru sa 3 mL PBS-a koji se uklanja. Zatim se dodaje se 1 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Inkubira se 3 minute i mehanički protrese. Stanična suspenzija se razrjeđuje dodatkom 11 mL medija kako bi se postigao ukupan volumen od 12 mL i spriječilo štetno djelovanje tripsina (budući da medij sadrži inhibitore tripsina). Stanična suspenzija se resuspendira te se polovica volumena odvoji (presađuje) u novu bočicu za uzgoj stanica. Nadalje, stanice je potrebno prebrojiti pomoću hemocitometra. Izvaja se 100 µL reprezentativnog uzorka stanične suspenzije te se dodaje 100 µL Trypan blue boje. Dio stanične suspenzije prenosi se automatskom pipetom tako da se vrh pipete postavi uz rub pokrovnice i tekućina kapilarnim efektom ulazi ispod stakalca. Iz poznate veličine kvadratića i količine pripremljene suspenzije izračuna se broj stanica u suspenziji.

3.3. Uzorci pune krvi

Sakupljeni su uzorci pune krvi zdravih donora izvađenih u K2-EDTA epruvetu. Uzorci su pribavljeni i dostavljeni iz Hrvatskog Zavoda za transfuzijsku medicinu u skladu s etičkim načelima i prema dobroj laboratorijskoj praksi.

Budući da je maligna bolest hiperkoaguabilno stanje, uzorkovanje krvi na EDTA antikoagulans ključan je korak prije analize cirkulirajućih tumorskih stanica. EDTA krv mora biti homogenizirana neposredno nakon uzorkovanja, pohranjena na 4 °C i korištena unutar 4 sata. Također, EDTA krv nije poželjno pohranjivati na led, budući da na temperaturama nižim od 4 °C dolazi do aktivacije faktora zgrušavanja.

Od ukupno 10 uzoraka na raspolaganju, odabrano je 5 reprezentativnih uzoraka, dok je ostatak odbačen uslijed izražene lipemije. Krv s EDTA epruvetama pohranjuje se na 4 °C na do izolacije CTC-a (prema protokolu proizvođača - *ScreenCell® MB*; ref. *MB 3LC*).

3.4. Priprema uzoraka pune krvi sa tumorskim stanicama MDA-MB-231

Nakon postizanja odgovarajuće konfluentnosti, stanice su tripsinizacijom odvojene od podloge. Obojane su Trypan blue metodom i prebrojane pomoću hemocitometra. Pripremljena je matična otopina MDA-MB-231 iz koje se nizom razrijeđenja uz odgovarajući volumen medija priređuju stanične suspenzije (500 µL) različitih koncentracija (50, 250, 500, 2500 stanica/mL stanične suspenzije). Pripremljene suspenzije stanica karcinoma dojke dodanesu u punu krv. Tako su dobiveni uzorci pune krvi sa poznatom koncentracijom tumorskih stanica MDA-MB-231 koji se koriste za izolaciju „CTC-a“ pomoću *ScreenCell®* sustava.

Tablica 1. Priprema suspenzija MDA-MB-231 stanica karcinoma dojke iz matične otopine i odgovarajućeg volumena medija za uzgoj stanica.

| Koncentracija MDA-MB-231 u staničnoj suspenziji /broj stanica | Volumen matične otopine MDA-MB-231 (µL) | Volumen medija za uzgoj stanica (µL) | Ukupni Volumen otopine stanične suspenzije (µL) |
|---|---|--------------------------------------|---|
| 50 | 10 | 490 | 500 |
| 250 | 50 | 450 | 500 |
| 500 | 100 | 400 | 500 |
| 2500 | 500 | - | 500 |

Nakon pripreme otopina različitih koncentracija stanica, potrebno je prirediti uzorke krvi koji se koriste za izolaciju tumorskih stanica. Slijedi postupak prijenosa priređenih tumorskih stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 u uzorke humane pune krvi zdravih donora kako bi se dobili uzorci sa poznatom koncentracijom „CTC“ te izolacija *ScreenCell® MB* tehnologijom. „CTC“ jer

su MDA-MB-231 umjetno dodane cirkulirajuće tumorske stanice i koriste se u svrhu evaluacije metode.

Prethodno pripremljene otopine MDA-MB-231 stanica definiranih koncentracija i volumena 500 μ L dodaju se u punu krv kako bi ukupan volumen uzorka bio 5 mL. Uzorci pune krvi homogenizirani su na standardiziran način mehaničkim preokretanjem 10 puta te pomiješani sa odgovarajućom staničnom suspenzijom stanica. Dobiveni uzorci pune krvi sa „CTC“ (MDA-MB-231) su ponovo homogenizirani miješanjem.

Tablica 2. Priprema uzoraka pune krvi za izolaciju „CTC“ *ScreenCell*® sustavom. Uzorci poznate koncentracije „CTC“ dobiveni su postupkom prijenosa staničnih suspenzija MDA-MB-231 karcinoma dojke u punu krv zdravih donora.

| Uzorak | Broj stanica/mL pune krvi | Volumen pune krvi (mL) | Volumen MDA-MB-231 stanične suspenzije (mL) | Ukupan volumen uzorka (mL) |
|--------|---------------------------|------------------------|---|----------------------------|
| 1. | 0 - kontrola | 4,5 | 0,5 (0 stanica) | 5 |
| 2. | 10 | 4,5 | 0,5 (50 stanica) | 5 |
| 3. | 50 | 4,5 | 0,5 (250 stanica) | 5 |
| 4. | 100 | 4,5 | 0,5 (500 stanica) | 5 |
| 5. | 500 | 4,5 | 0,5 (2500 stanica) | 5 |

Prije analize i postupka izolacije tumorskih stanica *ScreenCell*® sustavom, napravljen je krvni razmaz MDA-MB-231 stanica bojanjem po Pappenheimu. Ovaj postupak je standardna metoda bojanja u hematologiji. Na native preparate se u kadici za bojanje nanese May-Grunwald boja, a nakon 5 minuta, Giemsa boja koja stoji otprilike 15 minuta. Slijedi ispiranje destiliranom vodom i sušenje preparata na zraku. Bojenje omogućuje razlikovanje bazofilnih od acidofilnih elemenata stanica. Morfologija stanica promatrana je inverznim mikroskopom kako bi se utvrdila kvaliteta uzoraka pune krvi, odnosno integritet i očuvanost krvnih stanica te dodanih MDA-MB-231 stanica karcinoma dojke.

3.5. ScreenCell® sustav za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica

ScreenCell® uređaj je neinvazivan, jednostavan, brz i učinkovit jednokratni sustav za izolaciju rijetkih tumorskih stanica iz pune krvi mikrofiltracijom, odnosno izolacijom na temelju veličine. Aparatura je vrlo malena i kompaktna, svega 19 cm što ju čini jednostavnom za rukovanje.

Sastoji se od filtracijskog spremnika s gornje strane i plastičnog držača s donje strane. Između je specifični mikroporozni membranski filter koji je učvršćen pomoću pomične kapsule te vakuum epruveta. Okrugli ravni filter građen je od polikarbonatnog materijala debljine 18 µm sa glatkom hidrofilnom površinom. Veličina pora je kalibrirana ($7.5 \pm 0,36$ µm ili $6.5 \pm 0,33$ µm ovisno jesu li stanice žive ili fiksirane) te su nasumično distribuirane po filteru (1×10^5 pora/cm²). Krv prolazi kroz mikroporoznu membranu te dolazi do filtracije na temelju veličine. Iako značajno manje koncentracije, CTC su veće i rigidnije od krvnih stanica te se zadržavaju na filteru, dok leukociti, eritrociti i trombociti slobodno prolaze u epruvetu.

U ovom eksperimentu koristi se *ScreenCell*® MB za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica iz pune krvi čije je područje interesa molekularna analiza. Korisnost *ScreenCell*® MB sustava analizirana je na seriji od 5 uzoraka od kojih je jedan kontrola, odnosno uzorak pune krvi bez cirkulirajućih tumorskih stanica. Ostali uzorci su pune krvi obogaćene MDA-MB-231 stanicama karcinoma dojke u definiranom koncentracijskom gradijentu. S ciljem evaluacije sustava i njegovih karakteristika, pokriveno je područje od 10-500 tumorskih stanica/mL pune krvi.

U skladu s našim protokolima i preporukama proizvođača, 5 mL EDTA krvi sa MDA-MB-231 stanicama koje predstavljaju cirkulirajuće tumorske stanice preneseno je u sterilnu bočicu od 15 mL. Dodano je 1 mL *ScreenCell*® LC pufera za razrijeđivanje. *ScreenCell*® LC pufer ujedno je agens za blago liziranje eritrocita. Razrijeđena krv se promiješa i inkubira na 2 minute na sobnoj temperaturi. Zatim se dodaje 1,6 mL kompletnog medija za uzgoj stanica te se ponovo homogenizira. Slijedi proces izolacije CTC-a *ScreenCell*® MB tehnologijom. U filtracijski spremnik s gornje strane pipetom se prenese razrijeđena krv. Ukloni se zaštitna membrana te se umetne vakuum epruveta. Pritiskom prema gore, igla *ScreenCell*® sustava probuši čep te počinje protok krvi. Kako krv prolazi, tumorske stanice MDA-MB-231 zadržavaju se na filteru, dok krv sa preostalim stanicama prelazi u epruvetu ispod filtera. Nakon filtracije, pomični plastični nosač ispod kapsule s filterom se ukloni. Postupak izolacije je obično završen unutar 3 minute. Ukoliko

je potrebno više od 5 minuta po protokolu, postoji sumnja na prisutnost mikro-agregata koji onemogućavaju filtraciju do kraja te daljnju analizu CTC-a. Kapsula sa mikroporoznim filterom na kojem su očuvane izolirane CTC može se izbaciti direktno u sterilnu Eppendorf epruvetu bez RNAza od 1,5 mL za DNA i RNA ekstrakciju i molekularnu analizu. S obzirom na mali broj CTC-a, u daljnjem postupku je često nužan dodatni korak povećanja broja stanica uzgojem u staničnoj liniji. U tom slučaju, nosač s mikrofilterom sa stanicama prenese se 1 cm iznad jažice pločica za kulturu stanica prethodno inkubiranu minimalno 1 sat na 37 °C pri 5 % CO₂. Filter sa stanicama ispusti se u jažicu i uklopi sterilnom pincetom. Ostatak jednokratnog *ScreenCell*® uređaja se odbaci, a u jažicu se dodaje 200 µL medija za uzgoj stanica. Intaktne stanice uzgajaju se standardnim procedurama uzgoja stanica u staničnim linijama.

3.6. Pregled ostalih metoda za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica

U ovom teorijskom dijelu diplomskog rada korištena je znanstvena i stručna literatura na temu metoda i tehnologija za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC) koje se danas najčešće primjenjuju u sklopu tekuće biopsije. Uz velik broj preglednih i originalnih radova objavljenih u znanstvenim časopisima, korištene su različite znanstvene internet stranice i stručne knjige. Pretraživanje i pregled znanstvenih članaka u različitim bibliografskim bazama podataka provedeno je prema ključnim riječima: *liquid biopsy, circulating tumor cells, CTC methods, CTC technologies, CTC isolation CellSearch, ScreenCell, itd.*

Od značajnijih znanstvenih radova kao izvora informacija izdvajaju se:

- Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clinical Chemistry* 59:1, 2013, 110-118
- Andree KC, van Dalum G, Terstappen LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol*, ožujak 2016, 10(3):395-407
- Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N et al. A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells. *Anticancer Research*, 2011, 427-442
- Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology*, 2016, 374-394
- J. Zhang, K.Chen, Z.H.Fan. Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis. *Adv Clin Chem*, 2016, 75, 1-31

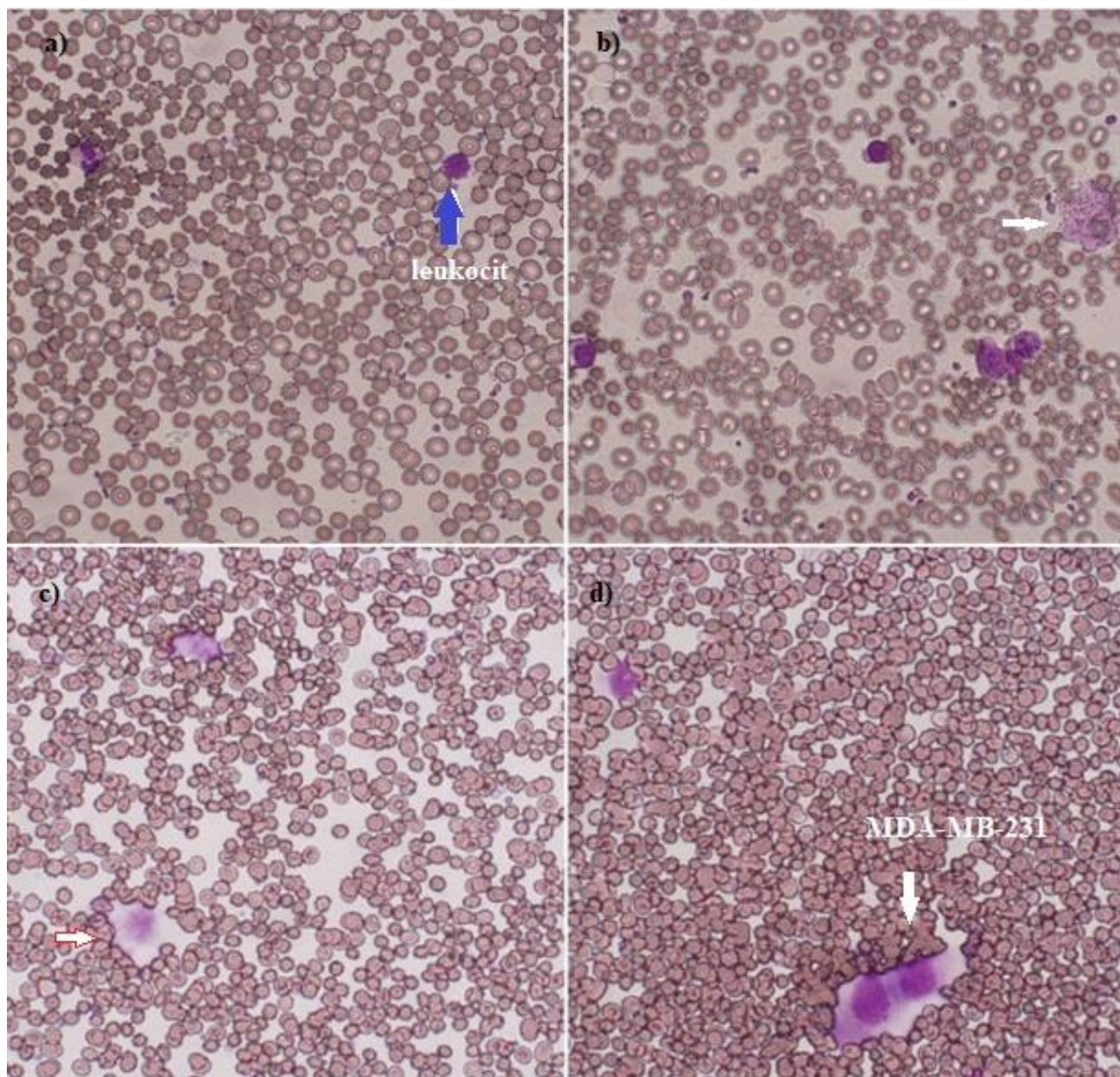
4. REZULTATI

4.1. Priprema uzoraka pune krvi sa MDA-MB-231 tumorskim stanicama

Učinkovitost nove metode za izolaciju CTC-a evaluira se tzv. „*spiking*“ postupkom. Takvo ispitivanje uključuje dodatak određenoj broja tumorskih stanica iz odabrane kulture tumorskih stanica (npr. stanične linije dobivene porijeklom iz karcinoma dojke) u uzorak krvi zdravog donora. Na taj način unaprijed je poznata koncentracija tumorskih stanica u krvi.

Koristili smo punu krv zdravih donora i uzgojene MDA-MB-231 stanice karcinoma dojke koje su dodane u punu krv u definiranim koncentracijama: 0 (kontrola), 10, 50, 100 i 500 stanica/mL pune krvi. Prije izolacije *ScreenCell*® sustavom, napravljeni su krvni razmazi MDA-MB-231 bojanjem po Pappenheimu. S ciljem procjene kvalitete priređenih uzorka pune krvi sa MDA-MB-231 tumorskim stanicama, preparati su promatrani svjetlosnom mikroskopijom.

Napravljene je mikrografije uzoraka pune krvi sa MDA-MB-231 tumorskim stanicama, što u ovom radu predstavlja uzorak sa „CTC“ (Slika 7).



Slika 7. Mikrografije uzoraka pune krvi zdravih donora sa različitim koncentracijama MDA-MB-231 stanica karcinoma dojke nakon bojanja metodom po Pappenheimu. Na mikrografiji (a) nalazi se uzorak 0 (kontrola) bez tumorskih stanica, na mikrografiji (b) uzorak 1 sa 10 stanica/mL krvi, na mikrografiji (c) uzorak sa 50 stanica/mL te na mikrografiji (d) uzorak 5 sa 500 stanica/mL krvi. Na temelju odabranih mikrografija, može se uočiti jasna razlika u veličini i morfologiji tumorskih stanica MDA-MB-231 (bijele strelice) i leukocita (plava strelica) krvi. Tumorske stanice MDA-MB-231 su veće stanice nepravilnog oblika, sa vidljivom jezgrom.

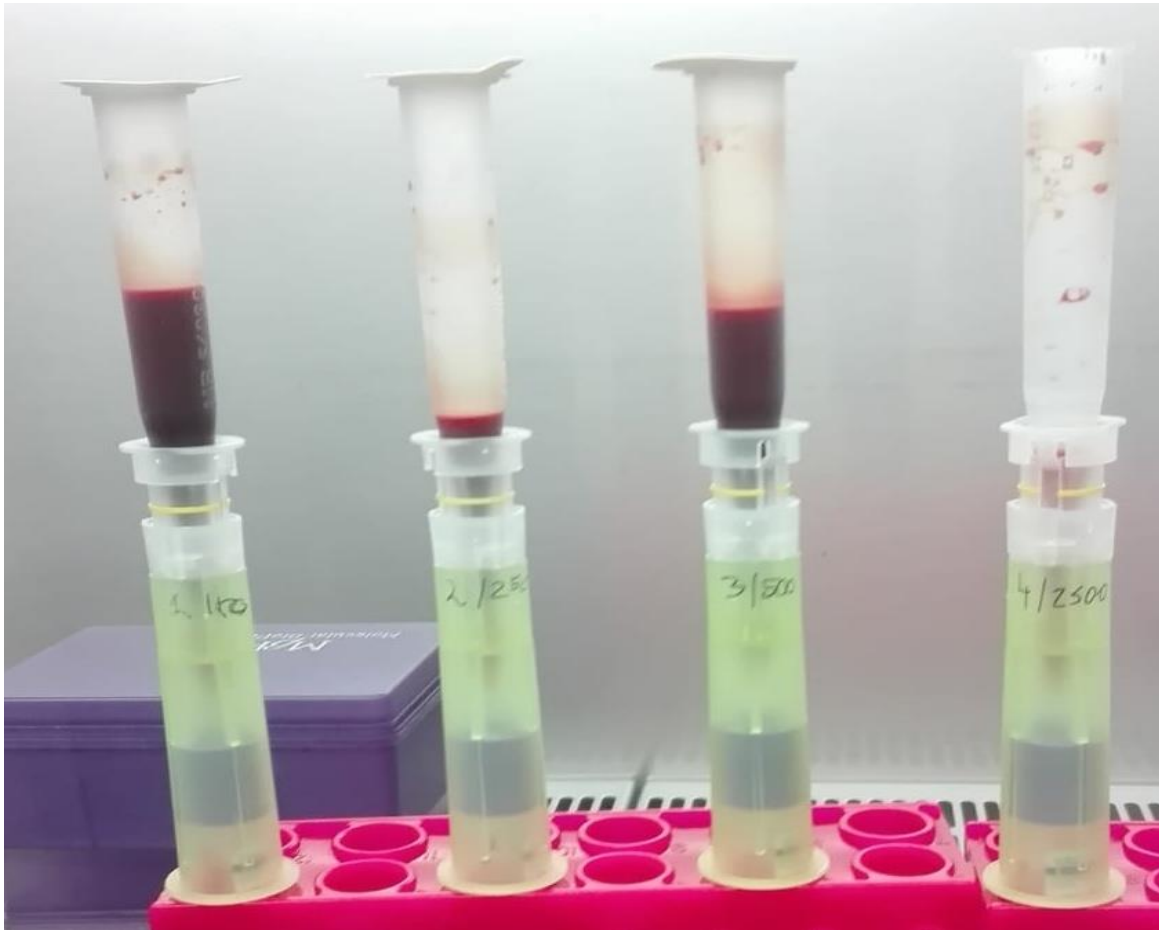
4.2. ScreenCell® sustav za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica

ScreenCell® sustav za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica evaluiran je na temelju pet uzoraka uzoraka pune krvi sa MDA-MB-231 tumorskim stanicama u koncentracijama 0 (kontrola), 10, 50, 100 i 500 stanica/mL pune krvi.

Tijekom izolacije tumorskih stanica *ScreenCell*® sustavom, kod četiri uzoraka su se pojavile poteškoće vezane uz samu filtraciju krvi. Samo kod jednog uzorka je filtracija bila potpuna, bez zaostajanja krvi iznad filtera.

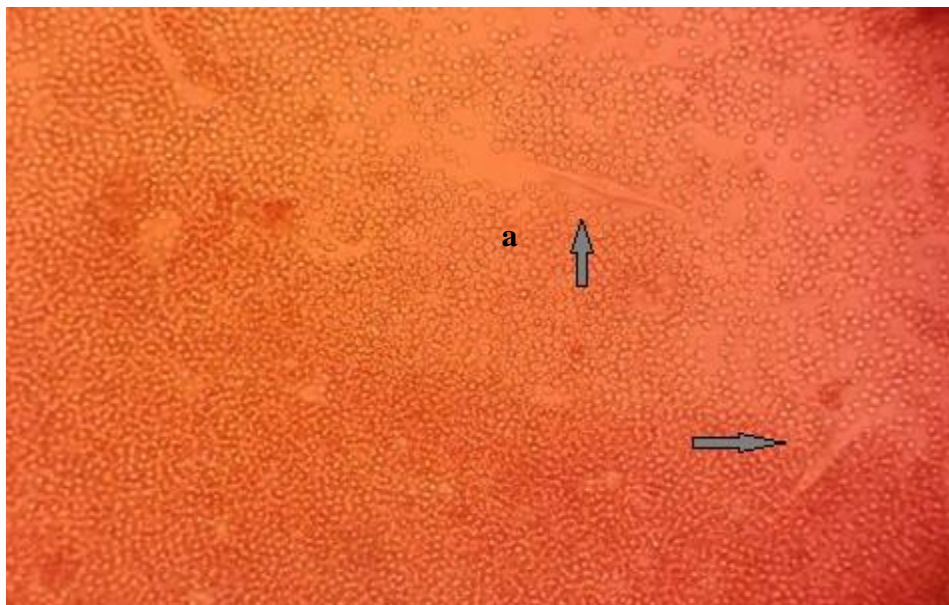
Kod uzoraka krvi sa 10, 50 i 100 stanica/mL krvi te kod kontrolnog uzorka bez tumorskih stanica došlo je do začepjenja sustava i zbog toga do neuspješne izolacije MDA-MB-231 tumorskih stanica iz krvi (Slika 8).

Uspješno izolirane MDA-MB-231 tumorske stanice u koncentraciji 500 stanica/mL pune krvi nalaze se na filteru *ScreenCell*® sustava. Stanice su promatrane su inverznim mikroskopom kako bi se procijenila uspješnost izolacije te su prikazani rezultati prije i nakon izolacije *ScreenCell*® sustavom (Slika 9).



Slika 8. ScreenCell® sustav za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC). Postupak izolacije „CTC“ (MDA-MB-231) iz pune krvi iz uzorka 1 s koncentracijom 10 stanica/mL krvi, iz uzorka 2 sa koncentracijom 50 stanica/mL krvi, iz uzorka 3 sa koncentracijom 100 stanica/mL krvi te iz uzorka 4 sa koncentracijom 500 stanica/mL krvi.

a)



b)



Slika 9. Uzorak pune krvi sa „CTC“ (MDA-MB-231) prije (a) i nakon (b) izolacije *ScreenCell*® sustavom. Na slici (a) crne strelice pokazuju MDA-MB-231 stanice koje se razlikuju veličinom i morfologijom od ostalih stanica krvi. Na slici (b) plava strelica pokazuje izoliranu MDA-MB-231 stanicu iz krvi pomoću *ScreenCell*® sustava. Nativni uzorci slikani inverznim mikroskopom Leitz Wetzler, Germany pri povećanju od 200x.

5. RASPRAVA

Maligna bolest drugi je vodeći uzrok smrtnosti. Za liječenje onkoloških bolesnika važno je rano otkrivanje prisutnosti karcinoma, odabir adekvatne terapije, praćenje terapijskog odgovora, otkrivanje rezistencije na terapiju i povratka bolesti. Stoga, razvoj novih dijagnostičkih metoda od velike je značajnosti. Tekuća biopsija kao postupak omogućuje neinvazivan pristup informacijama o tumoru u vrlo kratkom vremenu, a cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) kao biomarker imaju velik potencijal za poboljšanje skrbi o onkološkom bolesniku.

Istraživanja tehnologija izolacije CTC-a i daljnja klinička ispitivanja su ključna za implementaciju analize CTC-a u kliničku praksu u onkologiji u budućnosti. Kako bi se CTC koristile kao biomarker tekuće biopsije, metoda idealno mora otkriti što je više moguće CTC-a u što više moguće bolesnika. Niska koncentracija CTC-a u krvi, zajedno sa velikom raznolikošću subpopulacija CTC-a čini razvoj nove metode vrlo zahtjevnim. CTC u krvi prisutna je zajedno s velikim brojem ostalih krvnih stanica. Točnije, pojavljuju se u frekvenciji od 1 do 10 CTC po mL pune krvi kod bolesnika sa metastatskom bolesti. Takvi rijetki događaji zahtjevaju osjetljivu i specifičnu metodu sa mehanizmom razlikovanja CTC-a od ostalih krvnih stanica. Upravo na toj razlici temelje se sve trenutno dostupne metode. To mogu biti razlike na temelju fizikalno-kemijskih (veličina, oblik, gustoća) ili bioloških osobina (ekspresija staničnih biljega) stanica.

Kao i svaka tehnologija s komercijalnim potencijalom, platforme za analizu CTC-a moraju biti pouzdane, brze, jednostavne, relativno jeftine i prigodne za produkciju velikog broja uzoraka. Dodatno, moraju imati sposobnost detekcije rijetkih stanica iz klinički značajnog volumena krvi, najčešće 7,5 mL. Ovi zahtjevi formirali su standardne uvjete za evaluaciju metoda CTC-a koje uključuju: efikasnost izolacije i detekcije CTC-a, čistoću uzorka i mogućnost obogaćivanja. (Powell i sur., 2012). Međutim, predanalitika, priroda analize CTC-a i potvrda analitičke i kliničke korisnosti testova tekuće biopsije ukazuju na potrebu za standardizacijom ovog područja. U Europi i Americi su pokrenute inicijative s ciljem standardizacije predanalitičkih zahtjeva i usporedbe različitih metoda tekuće biopsije kod istog bolesnika (Rossi i Ignatiadis, 2019).

Zadnje desetljeće dolazi do pojave novih tehnologija za izolaciju CTC-a s različitim strategijama analize CTC-a ovisno o cilju znanstvenog istraživanja i kliničke primjene. Međutim, trenutno

jedina odobrena metoda za praćenje bolesnika sa metastatskim karcinomom dojke, prostate i kolona je *CellSearch*® tehnologija.

5.1. *CellSearch*® tehnologija

CellSearch® tehnologija najčešće je korištena metoda za analizu CTC-a. Pomoću nje napravljen je najveći broj studija na različitim vrstama tumora, a odobren je za kliničko praćenje bolesnika sa metastatskim karcinomom dojke, prostate i kolona. Trenutno predstavlja referentnu metodu analize CTC-a te se rezultati dobiveni svakom novom metodom uspoređuju sa rezultatima dobivenim pomoću *CellSearch*® tehnologije.

CellSearch® tehnologija temelji se na imunomagnetskoj analizi za separaciju stanica. U metodi se koristi pozitivna selekcija, odnosno detekcija tumorskih stanica pomoću specifičnih antitijela na tumorske površinske biljege (antigene). Koriste se antitijela na adhezijsku molekulu EpCAM i na citokeratine (CK) koji su specifični za epitelne stanice. Prema tome, ova metoda primjenjiva je isključivo na tumore epitelnog porijekla koji ekspimiraju epitelne biljege.

Danas je poznato da postoji raznolikost populacija CTC-a. Kod 35 % pacijenata, čak i sa uznapredovalnom metastatskom bolesti CTC nisu detektibilne. Ovo zapažanje objašnjava se fenomenom epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT). Prilikom epitelno-mezenhimalne tranzicije, epitelne stanice mijenjaju svoj fenotip u mezenhimalni i gube ekspresiju epitelnih biljega (EpCAM, CK). Ovi biljezi su meta većine metoda za izolaciju CTC-a temeljenih na imunoafinitetu, uključujući i *CellSearch*® tehnologiju. Nedavne studije koje proučavaju molekularne karakteristike CTC-a otkrivaju kako CTC mogu biti prisutne u više fenotipova i subpopulacija: epitelne, mezenhimalne i hibridne (epitelno-mezenhimalne). Pojava EMT povezuje se sa agresivnim subtipovima maligne bolesti, rezistencijom na terapiju i lošiji ishodom bolesti. Prema tome, metode izolacije CTC-a na temelju detekcije epitelnih biljega propuštaju agresivnu i invazivnu populaciju CTC-a. Na temelju dosadašnjih saznanja, uočava se potreba za novim metodama izolacije CTC-a koje nadilaze ovo ograničenje metoda koje se temelje na EpCAM molekuli (Lowes i Allan, 2018).

Iako je česta kritika *CellSearch*[®] tehnologiji nemogućnost detekcije stanica bez ekspresije epitelnih biljega, ova metoda je i dalje *zlatni standard* analize CTC-s budući da je ovo područje znanstvenog interesa relativno novo.

Kao nedostatak *CellSearch*[®] tehnologije ističe se cijena. Radi se o velikom, skupom uređaju koji trenutno nije pogodan za rutinski laboratorijski rad. Osim toga, zahtjeva iskusnog educiranog korisnika, stoga se sve više pažnje pridaje manjim, jeftinijim platformama za izolaciju CTC-a koje su jednostavne za rukovanje, kao što je *ScreenCell*[®] sustav.

5.2. MagSweeper sustav

MagSweeper je imunomagnetska tehnologija za izolaciju i obogaćivanje CTC-a visoke čistoće.

Prednosti ove metode izolacije CTC-a je korištenje pune krvi bez predanalitičke obrade, velika čistoća izoliranih CTC-a i izolacija CTC-a koje su žive i intaktne.

Imunomagnetsko odvajanje stanica omogućuje pročišćivanje CTC-a od kontaminirajućih leukocita. Konačna čistoća izoliranih CTC-a od interesa ovisi o specifičnosti korištenih protutijela koje se koriste za odabir željenih tumorskih stanica. Kontaminacija može biti posljedica adsorpcije stanica na uređaj zarobljenih između magnetskih čestica kod korištenja velike količine magnetskih čestica koje su potrebne za obilježavanje u slučaju velikih volumena uzorka (Talasaz i sur., 2009). Kako se kod tekuće biopsije najčešće koristi volumen pune krvi 5-10 mL, dobivene CTC su 100 % čistoće. Postupak pročišćivanja može se kontrolirati do postizanja željene čistoće.

Puna krv sadrži više od 10^9 eritrocita po mL krvi koji mogu interferirati sa postupkom izolacije CTC-a. S druge strane, predanalitička obrada krvi, kao što je centrifugiranje ili liza eritrocita dovode do smanjenja učinkovitosti izolacije CTC-a uz gubitak stanica. Za razliku od većine tehnologija, *MagSweeper* koristi punu krv bez centrifugiranja i lize eritrocita.

Dobivene CTC su žive stanice visoke čistoće sa očuvanim nukleinskim kiselinama, stoga su pogodne za daljnju molekularnu analizu koja je često ograničena uslijed kontaminacije leukocitima. *MagSweeper* je metoda validirana na kliničkim uzorcima, a korištena je za genomsko profiliranje u studijama nakolorektalnom karcinomu, karcinomu dojke i prostate (Ferreira i sur., 2016).

5.3. Mikrofluidni uređaji

Mikrofluidni uređaji su sustavi koji mogu obrađivati i manipulirati izrazito male volumene (10^{-9} do 10^{-18} L) tekućine uz pomoć kanala mikrometarskih dimenzija. Nedavno su mikrofluidni uređaji imobilizirani različitim ligandima (antitijela, aptameri nukleinskih kiselina) koja omogućuju izolaciju tumorskih stanica iz složenih tjelesnih tekućina.

Ovi kompaktni i prenosivi sustavi sa fleksibilnošću primjene prepoznati su kao moćna tehnologija koja će imati veliku ulogu u biomedicinskim analizama. Upravo iz tog razloga dolazi do razvoja nove metodologije analize CTC-a temeljene na mikrofluidima. Danas je ovo područje razvijeno i predstavlja novu platformu za izolaciju i karakterizaciju CTC-a iz periferne krvi. U tu svrhu mogu se koristiti uređaji za izolaciju CTC-a kao što su *CTC-Chip*, *GEDI* i *OncoCEE*®.

Ranije spomenuti *CTC-Chip* koristi mikrofluidni sustav s imobiliziranim anti-EpCAM antitijelima. Mikrofluidni uređaji omogućuju preciznu kontrolu protoka (brzine i smjera) tekućine, što je važno u izolaciji stanica koja ovise o kontaktu između staničnog antigena i antitijela. Nedostatak ove tehnologije je nemogućnost obrade velikih volumena krvi u slučaju potrebe, dok je prednost mogućnost direktne analize pune krvi bez predobrade uzorka. Nakon *CTC-Chip-a*, razvijena je imunokemijska mikrofluidna tehnologija *GEDI* s poboljšanom geometrijom sustava kanala za izolaciju CTC-a u svrhu veće učinkovitosti. *GEDI* mikročip kombinira uporabu antitijela na specifični tumorski antigen i hidrodinamičku kromatografiju koja izolira stanice na temelju veličine. *OncoCEE* je mikrofluidni uređaj koji je napravio odmak od klasičnog pristupa izolacije temeljene na anti-EpCAM antitijelima. Ova tehnologija koristi veći broj antitijela za izolaciju i obogaćivanje CTC-a. Koristi antitijela na specifične tumorske antigene (HER2, EGFR), ali i na mezenhimalne biljege. Uzorci obrađeni sa više protutijela istovremeno omogućuju izolaciju CTC-a veće učinkovitosti, uključujući i izolaciju EpCAM negativnih stanica. Ovo predstavlja prednost u odnosu na ostale metode budući da su subpopulacije CTC-a koje ne ekspimiraju EpCAM molekulu i mezenhimalne biljege propušteni referentnom *CellSearch*® tehnologijom (Ferreira i sur., 2016).

Mikrofluidni uređaji imaju brojne prednosti nad konvencionalnih sustavima za „hvatanje“ cirkulirajućih tumorskih stanica. Zbog svoje veličine, troše malu količinu reagensa i energije, stvaraju malu količinu otpada, a omogućuju visoku učinkovitost, specifičnost i osjetljivost izolacije CTC-a (Zhang i sur., 2016).

5.4. ScreenCell® tehnologija

Izolacija CTC-a na temelju veličine omogućuje jednostavnu i jeftinu izolaciju bez uporabe antitijela. Jedna od komercijalno dostupnih platforma je *ScreenCell*® uređaj koji omogućuje izolaciju CTC-a iz pune krvi mikrofiltracijom pomoću specijaliziranog filtera sa definiranom veličinom pora. CTC su veće stanice od leukocita, stoga se zadržavaju na filteru, dok leukociti slobodno prolaze. *ScreenCell*® je jednostavna, brza i efikasna metoda za izolaciju CTC-a iz pune krvi i kompatibilna je sa svim metodama daljnje analize CTC-a.

Osnovni problem s kojim se susreće razvoj svake nove metode i tehnologije za analizu CTC-a je da ispitanik ne zna postoji li prisutnost CTC-a u krvi onkološkog bolesnika te ukoliko postoji, u kojoj mjeri. Iz tog razloga, prilikom početke faze evaluacije metode CTC-a, ne koriste se klinički uzorci, već se evaluacija obavlja korištenjem tumorskih stanica iz staničnih linija (npr. MDA-MB-231 stanična linija karcinoma dojke). Takvo ispitivanje, tzv. *spiking* postupak, uključuje dodatak stanica iz staničnih linija u zdravu krv donora u definiranim koncentracijama. Na taj način unaprijed je poznata koncentracija CTC-a u krvi. Učinkovitost metode se ispituje određivanjem broja stanica prije i nakon ispitivanog postupka (izolacije ili detekcije). Preporučuje se ispitivanje metode na standardiziran način uporabom stanica iz različitih staničnih linija na istom postupku s ciljem optimizacije metode (Andree i sur., 2015).

Učinkovitost izolacije i osjetljivost *ScreenCell*® sutava pokazana je na studiji sa fiksiranim H2030 stanicama karcinoma pluća koje su dodane u EDTA krv zdravih donora. Mikropipetiranjem 2 i 5 stanica u 1 mL pune krvi dobiveni su uzorci za izolaciju CTC-a. U uzorcima koji su sadržavali 5 stanica/mL krvi očuvano je 91 % stanica, dok je u uzorcima sa 2 stanice/mL krvi postignuto 74 % očuvanosti stanica. Gubitak stanica pripisan je postupku mikropipetiranja, a ne procesu filtracije. Nadalje, ispitana je vijabilnost i morfologija H2030 stanica nakon izolacije *ScreenCell*® tehnologijom čime je pokazano kako su stanice intaktne. Na temelju ovih rezultata pokazalo se kako je *ScreenCell*® tehnologija osjetljiva, učinkovita i reproducibilna, a očuvane stanice su pogodne za daljnju analizu (Desitter i sur., 2011).

U našem eksperimentu, korištene su stanice MDA-MB-231 porijeklom iz karcinoma dojke koje predstavljaju cirkulirajuće tumorske stanice. Nakon uzgoja stanica, nizom razrijeđenja

pripremljene su stanične suspenzije. Stanične suspenzije MDA-MB-231 dodane su u punu krv zdravih donora. Na taj način dobili smo uzorke koji se koriste za izolaciju „CTC“ *ScreenCell*® sustavom. Naši uzorci pune krvi sadržavali su „CTC“ (MDA-MB-231) u različitim koncentracijama, a kontrolni uzorak je uzorak pune krvi bez tumorskih stanica.

Kako bi se definirale značajke testa, mora biti unaprijed poznat broj CTC, dok je stvarni broj CTC u uzorcima bolesnika uvijek nepoznat i vrlo nizak. Činjenica je kako stanice u staničnoj kulturi nisu jednake kao CTC u bolesnika (Powell i sur., 2012). Rezultati dobiveni korištenjem stanica iz staničnih kultura nadilaze klinička očekivanja jer su stanice u kulturi homogene veličinom, morfologijom i ekspresijom staničnih biljega, ali se i znatno razlikuju od leukocita u odnosu na CTC u bolesnika (Ferreira i sur., 2016).

Prije analize i postupka izolacije tumorskih stanica *ScreenCell*® sustavom, napravljen je krvni razmaz MDA-MB-231 bojanjem po Pappenheimu. s ciljem procjene kvalitete uzoraka pune krvi, odnosno očuvanost stanica. Na temelju promatranja razmaza mikroskopom, jasno se može uočiti razlika u morfologiji između MDA-MB-231 tumorskih stanica i stanica krvi. MDA-MB-231 su veće stanice, nepravilna oblika, dok su leukociti i eritrociti znatno manji. Upravo ove razlike i jesu temelj za izolaciju *ScreenCell*® sustavom. Na temelju promatranja svjetlosnom mikroskopijom može se uočiti da su stanice očuvane te se zaključuje da su pripremljeni uzorci spremni za izolaciju „CTC“ *ScreenCell*® sustavom (Slika 7).

Izolacija cirkulirajućih tumorskih stanica provodila se pomoću *ScreenCell*® sustava. Konačni volumen razrijeđenog uzorka je 7,6 mL što je približno volumenu krvi od 7,5 mL koji se koristi u referentnoj *CellSearch*® metodi. Tako razrijeđena krv prenosi se na kolonu sustava te slijedi izolacija. Načelo izolacije je mikrofiltracija. Kako krv prolazi kroz filter, tumorske stanice MDA-MB-231 zadržavaju se na filteru, dok krv sa preostalim stanicama prelazi u epruvetu.

Postupak izolacije obično je završen unutar 3 minute. Ukoliko je potrebno više od 5 minuta za izolaciju iz jednog uzorka, postoji sumnja na prisutnost mikro-agregata koji onemogućuju filtraciju. U našem slučaju, filtracija se provodila otprilike sat vremena i naposljetku nije bila uspješna. Od ukupno pet uzoraka iz kojeg je pokušana izolacija „CTC-a“ (MDA-MB-231) *ScreenCell*® sustavom, tumorske stanice su uspješno izolirane iz samo jednog uzorka. To je uzorak broj 5 najveće koncentracije sa 500 CTC-a po mL pune krvi. U ostalim uzorcima, sa koncentracijom 10, 50, 250, pa i 0 (kontrola) došlo je do začepljenja sustava, odnosno do

zaostajanja krvi iznad filtera (Slika 8). Uspješno su izolirane CTC iz uzorka u koncentraciji 500 stanica po mL pune krvi. Izolirane stanice MDA-MB-231 nalaze se na mikrofilteru, dok se puna krv i ostatak uređaja odbacuje. Na temelju promatranja mikroskopijom, prije izolacije *ScreenCell*[®] sustavom “CTC” (MDA-MB-231) karakteristične morfologije i veličine nalaze se okružene velikim brojem stanica krvi. Može se uočiti tumorska stanica u pozadini velikog broja eritrocita i leukocita. Nakon izolacije, može se uočiti uspješno izolirana tumorska stanica. Stanice krvi uspješno su uklonjene, iako se može uočiti još nekoliko zaostalih eritrocita (Slika 9).

S obzirom na mali broj CTC-a uzorku, a još manji u kliničkim uzorcima onkoloških bolesnika, često je nužan dodatni korak povećanja broja stanica uzgojem u staničnoj liniji. Kao i kod *Magsweeper* metode, izolirane stanice su intaktne i žive, prema tome pogodne za sve oblike molekularne analize. Kod onkoloških bolesnika, bitna je detekcija mutacija u terapijskim metama i otkrivanje rezistencije na terapiju, stoga bi se ovaj sustav mogao koristiti u tu svrhu. Prednost *ScreenCell*[®] metode u odnosu na *Magsweeper* je neovisnost o EpCAM antitijelima.

Potrebna su dodatna ispitivanja na većem broju uzoraka različitih koncentracija na različitim staničnim linijama, a nakon toga i na kliničkim uzorcima onkoloških pacijenata.

Na temelju primjene *ScreenCell*[®] tehnologije za izolaciju CTC-a na malom broju uzoraka (5), preliminarni rezultati pilot istraživanja upućuju na prednosti i nedostatke ove metode.

Izolacija CTC-a na temelju veličine *ScreenCell*[®] tehnologijom omogućuje brzu, jednostavnu izolaciju neovisnu o uporabi antitijela. Na temelju uvida u literaturne podatke, različita istraživanja izolirala su veći broj CTC-a (veća učinkovitost izolacije) pomoću *ScreenCell*[®] sustava nego što je to bilo referentnom *CellSearch*[®] tehnologijom. Pretpostavlja se kako *ScreenCell*[®] može izolirati stanice koje ne eksprimiraju epitelne biljege, odnosno EpCAM molekulu, kao i one koje su ušle u epitelnu-mezenhimalnu-tranziciju. Također, *ScreenCell*[®] sustav može izolirati stanice iz manjeg volumena (3-7) mL krvi nego što je to *CellSearch*[®] u vrlo kratkom vremenu od svega par minuta.

Iako jednostavna metoda pogodna za svakodnevni rutinski rad, *ScreenCell*[®] metoda pokazuje i ograničenja i nedostatke. Postoji rizik od gubitka vrlo malih CTC-a koje imaju promjer manji od promjera pora mikrofiltera uređaja. Nasuprot tome, te male stanice mogu biti detektirane pomoću *CellSearch*[®] sustava.

Veliki nedostatak *ScreenCell*® tehnologije i metoda temeljenih na veličini je potreba za predanalitičkom obradom krvi. Uzorci često zahtjevaju uklanjanje i lizu eritrocita ili razrijeđivanje. U ovim metodama postoji velik rizik začepljenja sustava, što se dogodilo u našem slučaju. Prva pretpostavka bila je priprema prekoncentriranih uzoraka, međutim ova hipoteza je odbačena budući da je uspješna izolacija bila u najkoncentriranijem uzorku. Također, kapacitet sustava koji se ne smije premašiti ispitan od strane proizvođača je 20 000 stanica po mL krvi. Budući da je do začepljenja sustava došlo i u slučaju kontrolnog uzorka koji ne sadrži tumorske stanice, pretpostavka je da je uzrok neuspješne izolacije neadekvatna kvaliteta uzoraka pune krvi. Prema preporukama proizvođača, izolacija *ScreenCell*® sustavom preporuča se učiniti unutar 4 sata od uzorkovanja krvi. U našem slučaju, to nije bilo moguće, stoga se pretpostavlja da je došlo do zgrušavanja krvi koje je uzrokovalo začepljenje *ScreenCell*® sustava. Pretpostavlja se da je začepljenje posljedica utjecaja matriksa uzorka, a ne samih tumorskih stanica u uzorku.

Prvi korak koji je bitan za pouzdanu analizu je pravilno uzorkovanje. Prilikom vađenja krvi, prvi mililitar krvi mora biti eliminiran (korištenjem male vakuum epruvete) budući da može sadržavati epitelne stanice kože zaostale nakon postupka uzorkovanja iglom koje mogu biti pogrešno protumačene kao epitelne tumorske stanice. Budući da je maligna bolest hiperkoagulabilno stanje, preporučuje se izolaciju napraviti što je prije moguće od uzorkovanja krvi. Za *ScreenCell*® sustav, preporuke su 4 sata od uzorkovanja krvi, dok su za *CellSearch*® sustav 24-96 sati u slučaju korištenja specijaliziranih *CellSave* epruveta. Poteškoće filtracije mogu biti posljedica matriksa uzorka (prisutnost mikro-agregata, ugruška, proteina akutne faze) u kliničkim uzorcima onkoloških bolesnika. Također, neke stanice bijele loze mogu biti zadržane na nosaču za izolaciju sa CTC što je varijabilno od uzorka do uzorka. Važno je napomenuti da je broj zaostalih leukocita niži što se postupak provodi ranije u odnosu na uzorkovanje krvi.

Prema tome, predanalitika je ključna za analizu CTC-a.

6. ZAKLJUČCI

- Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) su biomarker za identifikaciju terapijskih meta, praćenje terapije u stvarnom vremenu (prediktivni značaj) te procjenu rizika za metastatski relaps ili progresiju bolesti (prognostički značaj).
- *CellSearch*® imunomagnetska tehnologija je referentna metoda i zlatni standard izolacije i detekcije CTC. FDA je odobrila ovu metodu za praćenje onkoloških bolesnika sa metastatskim karcinomom dojke (2004.), kolona (2007.) i prostate (2008.).
- *CellSearch*® tehnologija primjenjiva je za tumore epitelnog porijekla. Osnovno obilježje metode je imunokemijska detekcija korištenjem antitijela na površinski epitelni biljeg, adhezijsku molekulu EpCAM. CTC koje ne ekspimiraju epitelne biljege ili ulaze u epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) neće biti izolirane ovom metodom.
- *Magsweeper* imunomagnetska metoda omogućuje dobivanje živih CTC visoke čistoće bez potrebe za predanalitičkom obradom uzorka, što je velika prednost u odnosu na ostale metode.
- Mikrofluidni uređaji osiguravaju izolaciju CTC-a iz vrlo malenih volumena uzoraka uz visoku učinkovitost, specifičnosti osjetljivost te malu potrošnju reagensa u odnosu na ostale metode.
- *ScreenCell*® tehnologija je jednostavna, kompaktna, brza i relativno jeftina metoda za izolaciju CTC-a iz uzoraka pune krvi.
- *ScreenCell*® izolacija ovisi o veličini stanica, a ne o ekspresiji površinskih biljega, stoga je primjenjiva za sve vrste tumora.

- U metodama temeljenim na principu mikrofiltracije, odnosno veličini stanica postoji rizik od začepjenja sustava uslijed prisutnosti mikroagregata i/ili ugrušaka koji onemogućuju izolaciju i daljnju analizu.
- Za uspješnu izolaciju CTC-a iz pune krvi pomoću *ScreenCell®* sustava vrlo važan je predanalitički kriterij. Prema preporukama proizvođača krv se mora koristiti unutar 4 sata od uzorkovanja.
- Za rutinsku kliničku primjenu CTC-a u budućnosti, nužna je standardizacija predanalitičke i analitičke faze pojedinih metoda i tehnologija za izolaciju CTC-a.

7. LITERATURA

1. Alix-Panabières C, Vendrell JP, Pellé O et al. Detection and Characterization of Putative Metastatic Precursor Cells in Cancer Patients. *Clinical Chemistry* 53, 2007, 537- 539.
2. Alix-Panabières C., Pantel K. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clinical Chemistry* 59, 1, 2013, 110-118.
3. Ameth B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *Arnth BMC Cancer*, 2018, 18, 527.
4. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australasian Medical Journal*, 1869, 146–147.
5. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.*, 2014, 15,4, 406-414.
6. Bidard FC, Proudhon C, Pierga JY. Circulating tumor cells in breast cancer. *Molecular Oncology*, 2016, 418-430.
7. Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB, Alix-Panabières C et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev.*, 2013, 32, 1-2, 179–188.
8. Bidard FC, Michiels S, Riethdorf S, Mueller V, Esserman LJ et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.*, 2018, 110, 6, 560-567.
9. *CellSearch®*, 2019, <http://www.cellsearch.com>, pristupljeno 20.6.2019.
10. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.*, 2009, 20, 7, 1223-1229.
11. Cristofanili M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2004, 351, 8, 781-91.

12. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.*, 2008, 14, 19, 6302-6309.
13. de Wit S, van Dalum G, Terstappen LW. Detection of circulating tumor cells. *Scientifica (Cairo)*, 2014, 819362.
14. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N et al. A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells. *Anticancer Research* 31, 2011, 427-442.
15. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology*, 2016, 374-394.
16. Freidin MB, Tay A, Freydina DV et al. An assessment to diagnostic performance of a filter-based-antibody-independent peripheral blood circulating tumour cell capture paired with cytomorphologic criteria for the diagnosis of cancer. *LungCancer* 85, 2014, 182–185.
17. Gallo M, De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Esposito C. Clinical utility of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.*, 2017, 6, 4, 486-498.
18. J.F. Swennenhuis, G. van Dalum, L.L. Zeune & L.W.M.M. Terstappen. Improving the CellSearch® system. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2016, 16, 12, 1291-1305.
19. Janni W, Rack B, Terstappen LW, Pierga JY, Taran FA et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res.*, 2016, 22, 10, 2583-2593.
20. Kirby BJ, Jodari M, Loftus MS, Gakhar G, Pratt ED, et al. Functional Characterization of Circulating Tumor Cells with a Prostate-Cancer-Specific Microfluidic Device. 2012, *PLoS ONE* 7(4): e35976.
21. Kong SL, Liu X, Suhaimi NM, Koh KJH, Hu M et al. Molecular characterization of circulating colorectal tumor cells defines genetic signatures for individualized cancer care. *Oncotarget*, 2017, 8, 40, 68026-68037.
22. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall Fha, Dive C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol*, 2010, 2, 6, 351-365.

23. Lowes LE i Allan AL. Circulating Tumor Cells and Implications of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Advances in Clinical Chemistry*, 2018, 18, 121-181.
24. Lozar T, Gersak K, Cemazar M, Grasic Kuhar C, Jasenko T. The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiol Oncol*, 2019, 53, 2, 131-147.
25. Marchetti A, Del Grammastro M, Felicioni L, Malatesta S, Filice G et al. Assessment of EGFR Mutations in Circulating Tumor Cell Preparations from NSCLC Patients by Next Generation Sequencing: Toward a Real-Time Liquid Biopsy for Treatment. *PLoS One.*, 2014, 9(8): e103883.
26. Molina-Vila MA, Mayo-de-las-Casas C, Giménez-Capitán A et al. Liquid biopsy in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Medicine*, 2016, 3, 69.
27. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 2013, 497, 7447, 108-12.
28. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Comput Struct Biotechnol J*, 2018, 16, 190–195.
29. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol*, 2018, 10, 1–24.
30. Parkinson DR, Dracopoli N, Gumbs Petty B et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *Journal of Translational Medicine*, 2012, 10, 138.
31. Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol*, 2019, 1-7.
32. Powell A, Talasaz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, et al. Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e33788.
33. Qin Z, A.Ljubimov V, Zhou C et al. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*, 2016, 35, 36.
34. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol.*, 2012, 41, 4, 1241-50.

35. Schmiegel W , Rodney J. Scott R ,Dooley S. Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *Mol Oncol*, 2017, 11, 2, 208–219.
36. *ScreenCell*®, 2019., [http:// www.screencell.com](http://www.screencell.com), pristupljeno 14.3.2019.
37. Shao H, Chung J, Issadore D. Diagnostic technologies for circulating tumour cells and exosomes. *Bioscience Reports*, 2016, e00292.
38. Talasz AH, Powell AA, Huber DE et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 10, 3970-3975.
39. Trapp E, Janni W, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U et al. Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis. *J Natl Cancer Inst.*, 2019, 111, 4, 380-387.
40. Truini A, Alama A, Dal Bello MG, Coco S, Vanni I et al. Clinical applications of circulating tumor cells in lung cancer patients by CellSearch system. *Frontiers in Oncology*, 2014, 4, 242.
41. Wechsler J, Benali-Furet N, Ye F et al. Analysis of BRAF mutations in circulating tumor cells selected by size from patients with melanoma and comparison to the primary tumor. *Journal of Clinical Oncology* 2017, e21014.
42. Yap TA, Lorente D, OmLin A, Olmos D, de Bono JS. Circulating Tumor Cells: A Multifunctional Biomarker. *Clin Cancer Res*, 2014, 20, 10, 2553-2568.
43. Zhe X, CherML, and BonfilRD et al. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am J Cancer Res.*, 2011,1, 6, 740–751.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Područje primejene cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC) raste s pojavom novih tehnologija koje nude različite pristupe izolacije i karakterizacije CTC-a iz krvi i kliničkom potvrdom CTC kao tumorskog biomarkera.

CTC su stanice porijeklom iz primarnog tumora prisutne u perifernoj cirkulaciji te se koriste kao multifunkcionalan biomarker za odabir terapije, praćenje maligne bolesti i otkrivanje rezistencije na terapiju. CTC su vrlo rijetke stanice, stoga je potrebna osjetljiva metoda koja mora razlikovati CTC od ostalih stanica krvi.

Cilj ovog diplomskog rada je prikazati metode za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica, naglasiti prednosti i nedostatke pojedinih tehnologija te prikazati rezultate izolacije MDA-MB-231 tumorskih stanica karcinoma dojke dobivenih pomoću *ScreenCell*[®] sustava.

Referentna metoda izolacije i detekcije CTC-a je *CellSearch*[®] sustav, imunomagnetska tehnologija koja se koristi za praćenje metastatskog karcinoma dojke, kolona i prostate. Temelji se na detekciji epitelnih biljega, stoga je primjenjiva za tumore epitelnog porijekla. Danas se razvijaju nove tehnologije koje ne zahtjevaju predanalitičku obradu uzoraka krvi, kao što su *Magsweeper* ili mikrofluidni uređaji, a omogućuju izolaciju CTC-a visoke specifičnosti i osjetljivosti. Interes raste za metode izolacije koje su neovisne o ekspresiji epitelnih biljega na CTC te uporabi antitijela, već se temelje na fizikalnim obilježjima stanica. Takva metoda je *ScreenCell*[®] tehnologija koja omogućuje izolaciju CTC-a iz pune krvi na temelju mikrofiltracije. To je jednostavan uređaj koji omogućuje brzu i učinkovitu izolaciju, ali postoji rizik od začepljenja sustava.

Pilot istraživanje s ciljem evaluacije *ScreenCell*[®] sustava je pokušaj izolacije tumorskih stanica MDA-MB-231 u različitim koncentracijama iz pune krvi. Na temelju zapažanja i rezultata, možemo zaključiti da je kvaliteta uzorka i vrijeme od uzorkovanja do analize CTC-a ključan predanalitički kriterij za uspješnu izolaciju CTC-a iz pune krvi pomoću *ScreenCell*[®] sustava.

Poboljšanje postojećih tehnologija i novi inovativni pristupi potvrđuju klinički značaj CTC-a te ubrzavaju uvođenje tekuće biopsije i analize CTC-a u kliničku praksu.

The field of circulating tumor cells (CTCs) is expanding with the development of new technologies, all offering different approaches for isolation and characterization of CTCs from blood. CTCs are tumor-derived cells present in the peripheral circulation. They are used as multifunctional biomarker for selection of therapy, monitoring and follow up of patients and detection of resistance to therapy. CTCs are very rare cells, so detection requires a sensitive method able to differentiate CTCs from hematopoietic cells.

The aim of this master thesis is to provide an overview of current methods for CTC isolation, discuss the advantages and challenges of each technology and present the results of isolation of MDA-MB-231 breast cancer cells from whole blood by using *ScreenCell*® device.

CellSearch® system, immunomagnetic technology is the reference method for the CTC isolation and detection. It is the only CTC technology approved by the FDA for monitoring patients with metastatic breast, prostate and colorectal cancer. This method uses specific epithelial biomarkers expressed on the cell surface to capture cells and is therefore suitable for tumors of epithelial origin. New technologies, such as *Magsweeper* or *microfluidic* devices, do not require pre-analytical processing of blood samples, but they offer CTC isolation of high specificity and sensitivity. Strategies for CTC isolation based on biophysical properties have gained increasing popularity because they are “label free”. One example is *ScreenCell*®, a simple and innovative non-invasive technology for isolating CTCs from whole blood based on the microfiltration. It is a simple and inexpensive device that provides fast and efficient isolation, but as size-based technology, have risk of device clogging.

A pilot study was conducted to evaluate the *ScreenCell*® system. The goal is to isolate the MDA-MB-231 breast cancer cells in different concentrations from whole blood. Based on the observations and results, the conclusion is that the key preanalytical requirements for the successful CTC isolation from whole blood using *ScreenCell*® system are the good quality of the blood sample and the time from sampling to CTC analysis.

Improvements in existing technologies and a new innovative approaches are confirming the clinical utility of CTCs and accelerating the implementation of liquid biopsy and CTC analysis in clinical practice in oncology.

9. PRILOZI

Popis kratica

CA 15.3 (engl. *cancer antigen 15.3*) – tumorski biljeg

CD45 (engl. *lymphocyte common antigen*) – razlikovni biljeg leukocita

CEA (engl. *carcinoembryonic antigen*) – karcinoembrionalni antigen, tumorski biljeg

cfDNA (engl. *cell free DNA*) – cirkulirajuća slobodna deoksiribonukleinska kiselina

CK (engl. *cytokeratin*) - citokeratin

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

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

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

DAPI (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) - 4',2'-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid, boja

DFS (engl. *disease-free survival*) – razdoblje bez bolesti

DMEM (engl. *Dulbecco modified Eagle medium*) - kompletni medij za uzgoj stanica

DTC (engl. *dissociated tumor cells*) – diseminirane tumorske stanice

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) - etilendiamintetraoctena kiselina

EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) – receptor za epidermalni faktor rasta

EMT (engl. *epithelial–mesenchymal transition*) - epitelno-mezenhimalna tranzicija

EpCAM (engl. *epithelial cell adhesion molecule*) – epitelna adhezijska molekula

ER (engl. *estrogen receptor*) – receptor za estrogen

FBS (engl. *fetal bovine serum*) – fetalni goveđi serum

FDA (engl. *Food and Drug Administration*) – Agencija za hranu i lijekove

FFPE (engl. *formalin-fixed paraffin-embedded*) - tkivni uzorci uklopljeni u parafin

FISH (engl. *Fluorescence In situ Hybridisation*)- Florescentna In Situ Hibridizacija

HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) – receptor za humani faktor rasta 2

MET (engl. *mesenchymal–epithelial transition*) – mezenhimalno-epitelna tranzicija

miRNA (engl. *microRNA*) – mikro ribonukleinska kiselina

mRNA (engl. *messenger RNA*) – glasnička ribonukleinska kiselina

OS (engl. *overall survival*) – ukupno preživljenje

PBS (engl. *phosphate buffered saline*) - otopina fosfatnog pufera

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

PFS (engl. *progression-free survival*) - razdoblje bez progresije bolesti

PR (engl. *progesterone receptor*) – receptor za progesteron

PSA (engl. *prostate specific antigen*) – prostata specifični antigen, tumorski biljeg

RFS (engl. *relapse-free survival*) – razdoblje bez relapsa bolesti

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

RT-PCR (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) - reverzna transkripcija-lančana reakcija polimerazom

10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

METODE ZA IZOLACIJU CIRKULIRAJUĆIH TUMORSKIH STANICA

Antonija Hanžek

SAŽETAK

Područje primjene cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC) raste s pojavom novih tehnologija koje nude različite pristupe izolacije i karakterizacije CTC-a iz krvi i kliničkom potvrdom CTC kao tumorskog markera. CTC su stanice porijeklom iz primarnog tumora prisutne u perifernoj cirkulaciji te se koriste kao multifunkcionalan biomarker za odabir terapije, praćenje maligne bolesti i otkrivanje rezistencije na terapiju. CTC su vrlo rijetke stanice, stoga je potrebna osjetljiva metoda koja mora razlikovati CTC od ostalih stanica krvi. Cilj ovog diplomskog rada je prikazati metode za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica, naglasiti prednosti i nedostatke pojedinih tehnologija te prikazati rezultate izolacije MDA-MB-231 tumorskih stanica karcinoma dojke dobivenih pomoću *ScreenCell*® sustava. Referentna metoda izolacije i detekcije CTC-a je *CellSearch*® sustav, imunomagnetska tehnologija koja se koristi za praćenje metastatskog karcinoma dojke, kolona i prostate. Temelji se na detekciji epitelnih biljega, stoga je primjenjiva za tumore epitelnog porijekla. Danas se razvijaju nove tehnologije koje ne zahtijevaju predanalitičku obradu uzoraka krvi, kao što su *Magsweeper* ili mikrofluidni uređaji, a omogućuju izolaciju CTC-a visoke specifičnosti i osjetljivosti. Interes raste za metode izolacije koje su neovisne o ekspresiji epitelnih biljega na CTC te uporabi antitijela, već se temelje na fizikalnim obilježjima stanica. Takva metoda je *ScreenCell*® tehnologija koja omogućuje izolaciju CTC-a iz pune krvi na temelju mikrofiltracije. To je jednostavan uređaj koji omogućuje brzu i učinkovitu izolaciju, ali postoji rizik od začepljenja sustava. Pilot istraživanje s ciljem evaluacije *ScreenCell*® sustava je pokušaj izolacije tumorskih stanica MDA-MB-231 u različitim koncentracijama iz pune krvi. Na temelju zapažanja i rezultata, možemo zaključiti da je kvaliteta uzorka i vrijeme od uzorkovanja do analize CTC-a ključan predanalitički kriterij za uspješnu izolaciju CTC-a iz pune krvi pomoću *ScreenCell*® sustava. Pобољšanje postojećih tehnologija i novi inovativni pristupi potvrđuju klinički značaj CTC-a te ubrzavaju uvođenje tekuće biopsije i analize CTC-a u kliničku praksu.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 9 grafičkih prikaza, 2 tablica i 43 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Cirkulirajuće tumorske stanice, CTC, izolacija CTC, metode analize CTC, tekuća biopsija

Mentor: **Dr. sc. József Petrik**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. József Petrik**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Karmela Barišić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical biochemistry and haematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

METHODS FOR ISOLATION OF CIRCULATING TUMOR CELLS

Antonija Hanžek

SUMMARY

The field of circulating tumor cells (CTCs) is expanding with the development of new technologies, all offering different approaches for isolation and characterization of CTCs from blood. CTCs are tumor-derived cells present in the peripheral circulation. They are used as multifunctional biomarker for selection of therapy, monitoring and follow up of patients and detection of resistance to therapy. CTCs are very rare cells, so detection requires a sensitive method able to differentiate CTCs from hematopoietic cells. The aim of this master thesis is to provide an overview of current methods for CTC isolation, discuss the advantages and challenges of each technology and present the results of isolation of MDA-MB-231 breast cancer cells from whole blood by using *ScreenCell*® device. *CellSearch*® system, immunomagnetic technology is the reference method for the CTC isolation and detection. It is the only CTC technology approved by the FDA for monitoring patients with metastatic breast, prostate and colorectal cancer. This method uses specific epithelial biomarkers expressed on the cell surface to capture cells and is therefore suitable for tumors of epithelial origin. New technologies, such as *Magsweeper* or microfluidic devices, do not require pre-analytical processing of blood samples, but they offer CTC isolation of high specificity and sensitivity. Strategies for CTC isolation based on biophysical properties have gained increasing popularity because they are “label free”. One example is *ScreenCell*®, a simple and innovative non-invasive technology for isolating CTCs from whole blood based on the microfiltration. It is a simple and inexpensive device that provides fast and efficient isolation, but as size-based technology, have risk of device clogging. A pilot study was conducted to evaluate the *ScreenCell*® system. The goal is to isolate the MDA-MB-231 breast cancer cells in different concentrations from whole blood. Based on the observations and results, the conclusion is that the key preanalytical requirements for the successful CTC isolation from whole blood using *ScreenCell*® system are the good quality of the blood sample and the time from sampling to CTC analysis. Improvements in existing technologies and a new innovative approaches are confirming the clinical utility of CTCs and accelerating the implementation of liquid biopsy and CTC analysis in clinical practice in oncology.

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

Thesis includes: 49 pages, 9 figures, 2 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Circulating tumor cells, CTCs, CTC isolation, methods of CTC analysis, liquid biopsy

Mentor: **József Petrik, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **József Petrik, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Karmela Barišić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2019.