

# Metode otkrivanja i kvantifikacije cirkulirajućih tumorskih stanica

---

Popić, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:867239>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

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



**Paula Popić**

**Metode otkrivanja i kvantifikacije cirkulirajućih  
tumorskih stanica**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 1, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Józsefa Petrika.

*Veliko hvala mentoru prof. dr. sc. Józsefu Petriku na pruženom znanju i stručnom vodstvu prilikom pisanja diplomskog rada.*

*I posebno hvala mojoj obitelji.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. MATERIJALI I METODE.....	4
3. OBRAZLOŽENJE TEME.....	5
4. RASPRAVA I REZULTATI.....	6
4.1. Tekuća biopsija.....	6
4.2. Cirkulirajuće tumorske stanice.....	12
4.3. Biologija i vrste cirkulirajućih tumorskih stanica.....	16
4.4. Metode detekcije i kvantifikacije cirkulirajućih tumorskih stanica.....	21
4.4.1. Imunofluorescentne metode detekcije i kvantifikacije cirkulirajućih tumorskih stanica.....	29
4.5. Klinička značajnost cirkulirajućih tumorskih stanica.....	32
4.5.1. Klinička važnost cirkulirajućih tumorskih stanica u dijagnostici kolorektalnog karcinoma.....	34
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	38
7. LITERATURA.....	40
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	48
8.1. Sažetak.....	48
8.2. Summary.....	49

# 1. UVOD

Zloćudne bolesti su nakon kardiovaskularnih bolesti vodeći uzrok smrtnosti diljem svijeta, uključujući i Republiku Hrvatsku. S obzirom na to da je smrtnost od karcinoma povezana s kasno postavljenom dijagnozom ili neadekvatnim odgovorom na terapiju, rano otkrivanje važno je za poboljšanje ishoda bolesnika i smanjenje smrtnosti (Lawrence i sur., 2023). Probir kod zdravih i visokorizičnih populacija nudi priliku za rano otkrivanje raka i povećanu mogućnost izlječenja. Dok kirurška resekcija i adjuvantna terapija mogu izliječiti dobro ograničene primarne tumore, metastatska bolest je uglavnom neizlječiva zbog kompleksnih bioloških karakteristika metastaza i različitog odgovora na terapiju. Cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *circulating tumor cells*, CTC) su stanice koje se odvajaju od primarnog tumora i ulaze u krvotok. Sposobnost CTC-a da nasele udaljena tkiva i organe navelo je na vjerovanje da su CTC primarni uzrok metastaza tumora (Lozar i sur., 2019). Metastatski proces se sastoji od niza vrlo kompleksnih koraka: lokalna invazija stanica primarnog tumora u okolno tkivo; intravazacija ovih stanica u cirkulaciju i preživljavanje tijekom hematogenog širenja; zaustavljanje i ekstravazacija CTC-a kroz stijenke krvnih žila; stvaranje mikrometastatskih kolonija u parenhimu; naknadna proliferacija mikroskopskih kolonija u klinički detektabilne metastatske lezije (Lambert i sur., 2017). Sve više dokaza pokazuje da su metastaze rani događaj kod bolesnika s agresivnim karcinomom, a mogu se pojaviti i prije nego se primarni tumor klinički otkrije (Lawrence i sur., 2023).

CTC su rijetke stanice koje se nalaze u krvotoku u vrlo malim koncentracijama, što uvelike otežava njihovu detekciju. CTC uglavnom potječu od solidnih tumora epitelnog podrijetla (Petrik i sur., 2022). U krvotoku se mogu širiti kao samostalne stanice ili kao nakupine sastavljene većinom od 2 – 50 stanica tzv. klasteri (engl. *clusters*). Razvijene su brojne tehnologije za izolaciju, detekciju i karakterizaciju CTC-a, koje se temelje na njihovim fizičkim svojstvima i biološkim značajkama. Metode temeljene na fizičkim svojstvima uključuju filtraciju, mikrofluidne tehnike i centrifugiranje, dok se biološke metode oslanjaju na imunomagnetske i molekularne tehnike za prepoznavanje specifičnih biljega na površini stanica (Pantel i Alix-Panabières, 2012). Unatoč napretku u tehnologiji, još uvijek postoje značajni izazovi, uključujući heterogenost CTC-a i nedovoljnu osjetljivost metoda za detekciju različitih subpopulacija ovih stanica.

Tekuća biopsija uvedena je kao novi dijagnostički koncept koji se temelji na neinvazivnoj analizi cirkulirajućih tumorskih stanica ili elemenata izvedenih iz tumora, posebno cirkulirajuće tumorske DNA (engl. *circulating tumor DNA*, ctDNA). Tekuća biopsija postala je važan alat u onkologiji jer omogućuje praćenje genskih promjena tijekom metastatskog procesa, rano otkrivanje tumora, kao i rano otkrivanje relapsa, određivanje stadija bolesti, praćenje razvoja tumora i terapijskog odgovora (Alix-Panabières i Pantel, 2021). Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je odobrila nekoliko testova tekuće biopsije za otkrivanje i praćenje bolesti (5 testova za analizu cirkulirajuće tumorske DNA i jedan test za analizu CTC-a) koje koriste različite tehnologije. FDA kontinuirano procjenjuje nove tehnologije i testove u području tekuće biopsije.

Karcinomi su vrlo heterogena tkiva sastavljena od histološki različitih stanica. Na rubnim dijelovima i unutar tumora se nalaze i epitelne nemaligne stanice, a izvanstanični matriks se mijenja pod utjecajem tumora te nastaje tzv. tumorski mikrookoliš (Ređović i sur., 2015). Složena međudjelovanja između stanica i mikrookoliša rezultiraju da tumorske stanice dobivaju prednost u rastu i proliferaciji (Ređović i sur., 2015). Svaki metastatski tumor može rasti u drugom organu i imati jedinstveno mikrookruženje što može utjecati na odgovor na liječenje. Cirkulirajuće tumorske stanice odražavaju različite biološke aspekte primarnog tumora, uključujući mutacije, promjene u signalnim putevima i razine ekspresije određenih proteina (Habli i sur, 2020). U proteklih petnaest godina postignut je značajan napredak u razjašnjavanju različitih aspekata metastatskog procesa, posebno za karcinome, koji čine približno 80 % slučajeva raka (Lambert i sur., 2017). Chemi i sur. (2019) su u svom istraživanju genomski profilirali pojedinačne CTC bolesnika s karcinomom pluća. Uzorke su prikupljali iz plućne vene tijekom operacije bolesnika, a CTC su detektirali CellSearch® tehnologijom. Otkrili su da se mutacije CTC-a više preklapaju (91 %) s metastazama otkrivenim 10 mjeseci nakon operacije primarnog tumora, u usporedbi s preklapanjem mutacija s primarnim tumorom koje iznosi 79 %. Iako su rezultati obećavajući, potrebno je dodatno razumijevanje genskih i epigenetskih promjena u metastatskim tumorima za razvoj učinkovitih terapija.

Glavni ciljevi istraživanja CTC-a kao višenamjenskih biomarkera uključuju: (1) otkrivanje procesa metastaziranja u ranoj fazi, (2) prilagodbu terapijskih ciljeva i praćenje terapije u stvarnom vremenu (prediktivni značaj), (3) stratifikaciju onkoloških bolesnika, (4) procjenu rizika od metastatskog recidiva ili napredovanja bolesti (prognostički značaj) i (5) razumijevanje biologije tumora i mehanizama rezistencije na terapiju (Petrik i sur., 2022). Čvrsti dokazi za CTC kao prognostičkog biljega dokumentirani su u mnogim istraživanjima

karcinoma dojke, prostate, pluća, kolorektalnog karcinoma i dr. (Alix-Panabières i Pantel, 2021). Daljnji razvoj i optimizacija metoda za detekciju CTC-a te integracija tekuće biopsije u rutinsku kliničku praksu ključni su za poboljšanje praćenja i liječenja bolesnika s metastatskim karcinomom.

## 2. MATERIJALI I METODE

Za izradu ovog preglednog diplomskog rada korištene su znanstvene publikacije iz časopisa zastupljene u bazama podataka biomedicinskog područja: PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), ResearchGate (<https://www.researchgate.net/>) te relevantne internetske stranice.

Baze znanstvenih radova i podataka pretraživane su u razdoblju od 15.4.2024. do 31.8.2024.

Pretraživanje publikacija provedeno je pomoću sljedećih ključnih riječi: „*CTC*“, „*CTC clusters*“, „*liquid biopsy*“, „*CTC isolation techniques*“, „*CTC detection methods*“, „*cancer*“, „*colorectal cancer*“, „*mechanism of cancer metastasis*“, „*clinical utility of CTC*“.



### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Cirkulirajuće tumorske stanice su stanice koje se odvajaju od tumora i ulaze u krvotok. Smatra se da hematogeni način širenja tumorskih stanica prevladava u nastanku udaljenih metastaza u tijelu. Unatoč velikom napretku u liječenju karcinoma, nastanak metastaza ostaje vodeći uzrok smrtnosti u onkoloških bolesnika čemu doprinosi kasno otkrivanje metastaza te rezistencija na terapiju. Tekuća biopsija predstavlja obećavajući, neinvazivni pristup koji bolesnicima omogućava personaliziranu medicinu. Tekuća biopsija omogućava analizu cirkulirajućih tumorskih stanica i drugih biomarkera u krvi, čime olakšava dijagnozu, praćenje bolesti, odabir terapije i procjenu njezine učinkovitosti.

Otkrivanjem prisutnosti CTC-a u krvi i njihovom analizom, liječnici dobivaju vrijedne informacije o molekularnim karakteristikama tumora, u realnom vremenu, što je ključno za optimizaciju liječenja. Štoviše, količina CTC-a u krvi često se povezuje s prognozom bolesti, pri čemu veći broj CTC-a obično ukazuje na lošiji ishod i agresivniji tijek bolesti. Tehnološki napredak omogućava bolju analizu ovih rijetkih stanica, bez potrebe za invazivnim postupcima. Tradicionalne metode za detekciju CTC-a imaju ograničenja, što naglašava potrebu za poboljšanim pristupima izolacije i detekcije.

Opseg istraživanja koje obuhvaća cirkulirajuće tumorske stanice i tehnologije za njihovo otkrivanje, izolaciju i karakterizaciju, eksponencijalno raste već niz godina. U bazi podataka PubMed, u srpnju 2024. godine, moglo se pronaći približno 31 000 članaka pod ključnim riječima „cirkulirajuće tumorske stanice“.

Ovaj pregledni rad pruža uvid u trenutne spoznaje o biologiji cirkulirajućih tumorskih stanica i njihovoj ulozi u procesu metastaziranja. Usredotočuje se na tehničke aspekte i napredak metoda za detekciju i kvantifikaciju cirkulirajućih tumorskih stanica u bolesnika s karcinomom s osvrtom na potencijalne primjene ovakvog pristupa u kliničkoj praksi.

## 4. RASPRAVA I REZULTATI

### 4.1. Tekuća biopsija

Tekuća biopsija je neinvazivan postupak uzorkovanja lako dostupne tjelesne tekućine iz koje se specifičnim metodama izoliraju i analiziraju potencijalni tumorski biljezi. Pojam „tekuća biopsija“ općenito se pripisuje dr. Catherine Alix-Panabières, francuskoj profesorici onkologije te dr. Klausu Pantelu, njemačkom onkologu i istraživaču. Dr. Alix-Panabières, dr. Pantel te njihovi kolege sa Sveučilišnog medicinskog centra Hamburg-Eppendorf u Njemačkoj, bili su među pionirima u razvoju i promicanju koncepta tekuće biopsije. Pojam je počeo dobivati na značaju početkom 2000-ih kada su istraživanja cirkulirajućih tumorskih stanica i cirkulirajuće slobodne DNA (engl. *cell-free*, cfDNA) u krvi počela pokazivati potencijal za neinvazivnu dijagnostiku malignih oboljenja.

Tekuća biopsija uključuje dijagnostički ponovljive test, koji su se posljednjih godina pojavili za profiliranje genoma karcinoma u stvarnom vremenu i prilagođavanje onkoloških odluka uz minimalnu invazivnost (Caputo i sur., 2023). Najčešći uzorak tekuće biopsije je periferna krv, budući da pruža najveći niz bioloških analita poput cirkulirajućih tumorskih stanica, cirkulirajuće tumorske DNA, egzosoma (vezikularne strukture koje sadrže proteine i molekule RNA), tumorske glasničke (engl. *messenger*) RNA (mRNA), tumorske mikroRNA (miRNA) i drugih molekula podrijetlom iz tumorskih stanica. Navedeni elementi sadrže genska, RNA i proteinska obilježja tumorskih stanica, što ih čini potentnim biopokazateljima koji pružaju uvid u molekulska događanja u tumorskim stanicama (Barišić, 2019).

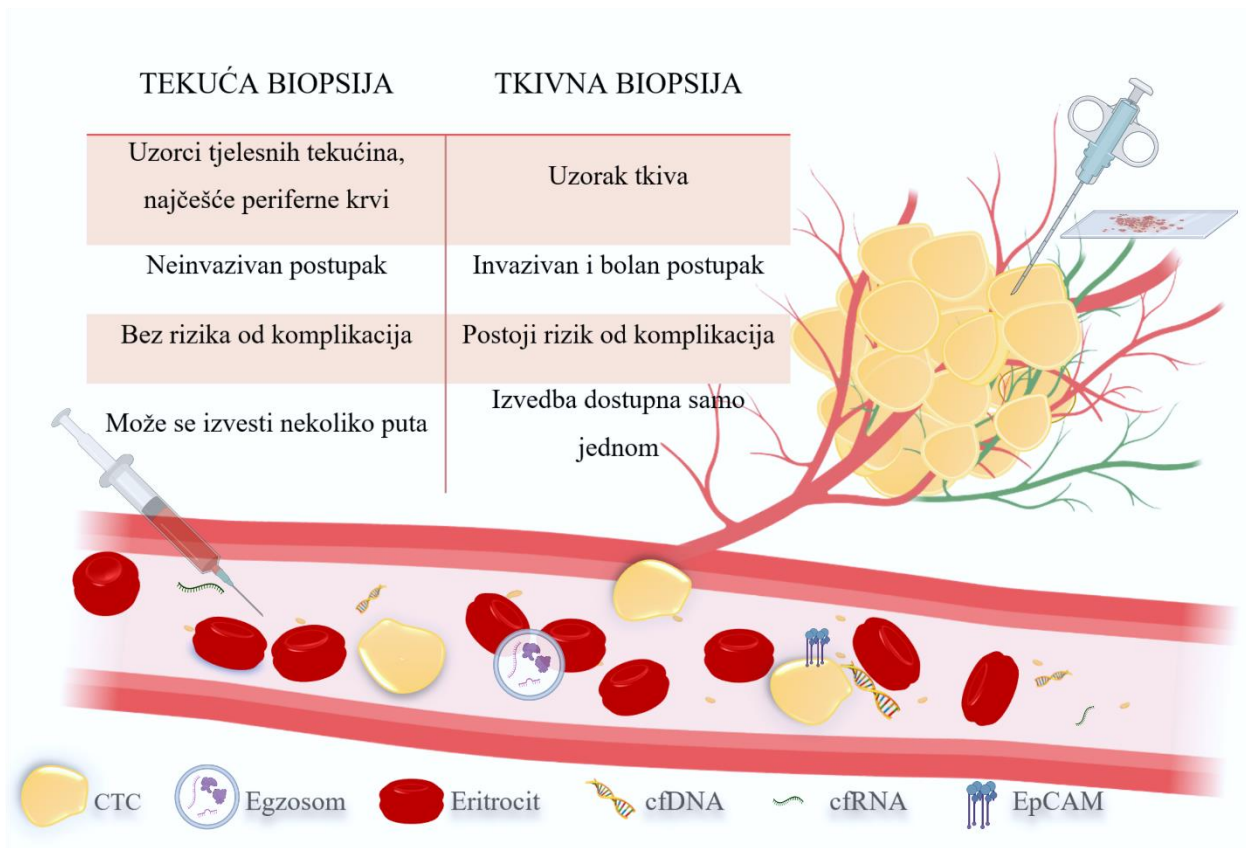
Biopsija tkiva vodeća je metoda u dijagnostici mnogih zdravstvenih stanja pa tako i solidnih tumora. Slikovne tehnike poput kompjuterizirane tomografije (CT), pozitron emisijske tomografije (PET) ili magnetske rezonance (MRI) korisne su u otkrivanju novotvorina i lezija, međutim svaka ima svoja ograničenja u razlikovanju benignog od malignog tkiva. Analiza tkiva neizostavna je u dijagnostici solidnih tumora te je u većini slučajeva potrebna za određivanje specifičnog tipa tumora (Connal i sur., 2023). Biopsija tkiva može se izvesti na nekoliko načina, ovisno o lokalizaciji, vrsti i veličini tumora. Najčešće metode su ekscizijski ili incizijski kirurški zahvat, biopsija iglom ili endoskopska biopsija. Ekscizijska biopsija je kompletno uklanjanje

lezije ili čitavog organa zahvaćenog tumorom, često zajedno s dijelom zdravog tkiva kako bi se osigurala potpuna resekcija. U pojedinim situacijama je potrebno izvršiti hitnu biopsiju i postaviti dijagnozu za vrijeme kirurškog zahvata za daljnje usmjeravanje operacije. Incizijska biopsija se odnosi na djelomično uklanjanje zahvaćenog tkiva. Biopsiju tijekom endoskopije izvodi liječnik koristeći posebnu tanku, fleksibilnu napravu s kamerom (endoskop) za pregled i uzimanje uzorka tkiva unutarnjih organa poput želuca, crijeva, pluća ili mjehura. Biopsija iglom je metoda za područja koja liječnik može napipati kroz kožu, kao što su kvržice u dojci, štitnjača ili povećani limfni čvorovi. Vršni se posebnom iglom kroz kožu za prikupljanje stanica sa sumnjivog područja. Biopsije širokom iglom (engl. *core needle biopsy*) se izvode pod vodstvom slikovnih tehnika, s većom iglom s reznim vrhom za dobivanje tkiva kojemu je očuvana tkivna arhitektura za razliku od aspiracije tankom iglom (engl. *fine needle aspiration*) pri čemu se dobiva aspirirani uzorak tkiva/stanica ili tkivnih tekućina i analiziraju se stanice (Fučkar Čupić, 2016).

Takvi postupci su invazivni, neugodni i bolni za pacijenta te često zahtijevaju anesteziju. Osim toga, postoji i određeni rizik od komplikacija poput upale, krvarenja i širenja tumorskih stanica (Periša i sur., 2017). Neka istraživanja su pokazala da kirurške intervencije mogu povećati broj CTC-a perioperativno (Krog i Henry, 2018). Povezanost širenja različitih tipova tumora uzrokovanog biopsijom ostaje sporna unatoč brojnim istraživanjima (Bai i sur., 2017). Iako vrlo rijetki, ipak postoje potvrđeni slučajevi ovakvih komplikacija (Shi i sur., 2021). Ponekad nije moguće postavljanje dijagnoze na temelju raspoloživog tkiva, što bi značilo ponavljanje cjelokupnog postupka. To se može dogoditi ako u uzorku nema dovoljno stanica ili ako se stanice ne vide dobro (Connal i sur., 2023). Također, ako je dobiveni uzorak premali, može dovesti do pogrešne dijagnoze. Opetovane biopsije zahjeva i sve veći broj raspoloživih biljega koji usmjeravaju liječenje (Tomasik i sur., 2023). Ponekad biopsija tkiva nije uopće izvediva kada nije poznata lokalizacija tumora ili u progresivnom stadiju bolesti zbog pogoršanja općeg stanja bolesnika (Tomasik i sur., 2023). Tekuća biopsija uvijek je primjenjiva zbog jednostavnosti uzorkovanja periferne krvi. Razlika tekuće i tkivne biopsije je shematski prikazana na Slici 1. Upravo glavna prednost tekuće biopsije je dostupnost uzoraka za analizu. Krv i urin se rutinski uzorkuju u biomedicinskim laboratorijima, a složenije ekstravaskularne tjelesne tekućine također imaju standardizirane metode uzorkovanja.

Postupci za konačnu dijagnostiku tkivnih uzoraka uključuju makroskopski pregled, patohistološki pregled koji se temelji na svjetlosnoj mikroskopiji, imunohistokemijske metode te molekularne i citogenetske analize (Fučkar Čupić, 2016). Histološka analiza uzorka tkiva

daje uvid u molekularno zbivanje unutar jednoga dijela tkiva u određenom vremenu (Mićan, 2023). Jedna od glavnih problematika vezanih za biopsiju tkiva je nemogućnost hvatanja heterogenosti tumora i njegove klonske evolucije (Connal i sur., 2023). Može postojati čak šest različitih klonskih staničnih linija unutar samo jednog tumora (Bailey i Martin, 2019). Heterogenost somatskih mutacija tumora predstavlja izazov za liječenje i primjenu odgovarajuće terapije. Tumorske stanice dobivene tekućom biopsijom pokazuju gensku i fenotipsku raznolikost, odražavajući heterogenost unutar primarnog tumora u stvarnom vremenu (Asante i sur., 2023).



Slika 1. Shematski prikaz usporedbe tekuće i tkivne biopsije. Minimalno invazivno uzorkovanje krvi predstavlja izvor heterogenih biljega. CTC – cirkulirajuće tumorske stanice; cfDNA – *cell free DNA*; cfRNA – *cell free RNA*; EpCAM – površinski biljeg (kreirano uz BioRender.com).

Tekuća biopsija može nadopuniti tradicionalnu tkivnu biopsiju, smanjujući rizik i nelagodu za pacijente, te pružajući dinamičniji pogled na molekularne promjene u tumorima. Razvijen je veliki broj tehnologija s ciljem povećanja njihove osjetljivosti i specifičnosti uz prihvatljive troškove. cfDNA se ispušta u cirkulaciju iz oštećenih stanica različitim mehanizmima, a prvenstveno apoptozom i nekrozom. cfDNA koja potječe iz tumora naziva se ctDNA, a sastoji se od fragmenata DNA veličine između 120 i 200 parova baza. Klinički se koristi kao biomarker za stratifikaciju bolesnika, izbor terapije i praćenje učinkovitosti terapije, posebice u bolesnika s karcinomom pluća i debelog crijeva (Petrik i sur., 2022). Cirkulirajuća tumorska DNA i cirkulirajuća tumorska RNA (engl. *circulating tumor RNA*, ctRNA) mogu se izolirati te analizirati korištenjem metoda kao što su lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), digitalni PCR, BEAMing (engl. *beads, emulsion, amplification, magnetics*; vrlo osjetljiva digitalna PCR metoda koja kombinira emulzijski PCR i protočnu citometriju za identifikaciju i kvantifikaciju specifičnih somatskih mutacija prisutnih u DNA), sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS), *microarray*, WGBS (engl. *whole genome bisulfite sequencing*; zlatni standard za proučavanje metilacije cijelog genoma) i druge (Nikanjam i sur., 2022). Postoje mnogi različito izvedeni komercijalni NGS testovi za procjenu somatskih mutacija ciljajući istovremeno različite gene, TAm-Seq, Safe-SeqS, CAPP-Seq i dr. Trenutno je od strane FDA odobreno 6 dijagnostičkih testova temeljenih na tekućoj biopsiji koji služe kao prateći dijagnostički alati za kliničku upotrebu, omogućujući određivanje različitih terapija dostupnih za karcinome dojke, jajnika, prostate, kolorektalnog karcinoma i karcinoma pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC).

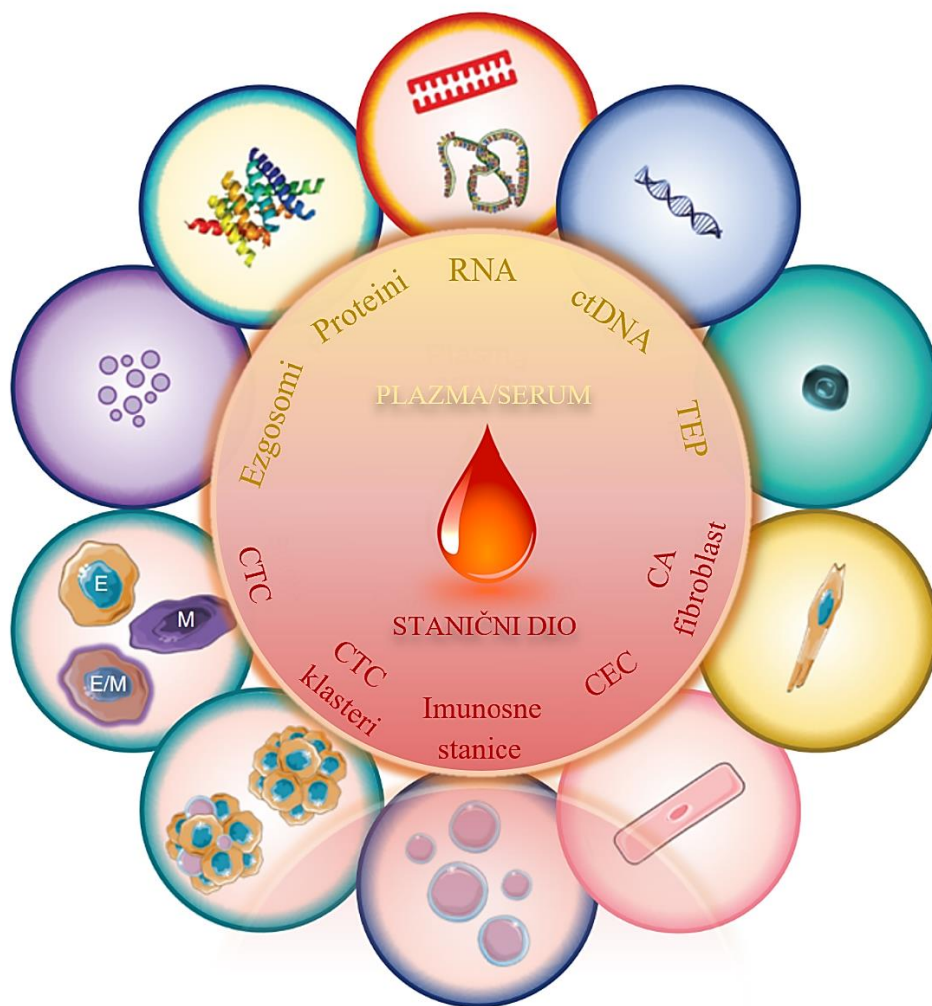
Egzosomi su vezikule obavijene membranom, bogate sadržajem proteina, mikroRNA i DNA, koje mogu pružiti informacije o primarnom tumoru i mikrookruženju (Petrik i sur., 2022). U velikim koncentracijama se mogu pronaći u krvi, ascitesu i cerebrospinalnoj tekućini te i u tumorima koji nemaju mjerljive razine CTC-a u cirkulaciji (Hanžek, 2019). Egzosomi su stabilni i stoga se mogu analizirati pomoću pohranjenih ili zamrznutih uzoraka. Zbog svoje prirode i uloge, egzosomi se potencijalno mogu koristiti za prijenos lijekova do ciljnih tumorskih stanica (Caputo i sur., 2023).

Neki od novijih tumorskih biljega koji se istražuju u sklopu tekuće biopsije su trombociti koji u interakciji s tumorskim stanicama mijenjaju RNA profil (engl. *tumor-educated platelets*, TEP), cirkulirajuće endotelne stanice (engl. *circulating endothelial cells*, CEC) kao pokazatelji oštećene vaskulature ili angiogeneze te s rakom povezani fibroblasti (engl. *cancer-associated*

*fibroblasts*, CA fibroblasti). Leukociti i profiliranje receptora T-stanica također mogu biti potencijalni biomarkeri za bolesnike liječene biološkom terapijom (Caputo i sur., 2023). Dobro istraživani cirkulirajući biljezi u tekućoj biopsiji su prikazani na Slici 2.

Dopuna biopsiji tkiva s tekućom biopsijom pokazala je uštedu troškova sustava i povećanje broja bolesnika kojima su davane odgovarajuće ciljane terapije (Tomasik i sur., 2023). Otkrivanje specifičnih molekularnih promjena u tumorima omogućuje personalizirani pristup liječenju, što može poboljšati ishode bolesnika. Naposljetku, tekuća biopsija može značajno skratiti vrijeme obrade pri postavljanju primarne dijagnoze i pri otkrivanju progresije bolesti (Tomasik i sur., 2023). Međutim, nalaze tekuće biopsije treba kombinirati i evaluirati s patološkim nalazima tkiva prije konačne validacije kako bi se osigurala točnost i pouzdanost dijagnoze (Verbanac i sur., 2021).

U Republici Hrvatskoj je smrtnost onkoloških bolesnika veća nego u većini ostalih europskih država što ukazuje na potrebu poboljšanja personaliziranog liječenja. Dana 19. ožujka 2024. godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb otvoren je Zavod za personaliziranu medicinu u sklopu kojeg će djelovati Nacionalni laboratorij za gensko profiliranje tumora. U Nacionalnom laboratoriju za gensko profiliranje tumora provodit će se sveobuhvatno genomsko profiliranje tumora koje se temelji na NGS tehnologiji. Uz analizu tumorskog tkiva provodit će se i tekuća biopsija odnosno analiza ctDNA. Na taj način će bolesnicima biti omogućena ciljana terapija. KBC Zagreb tako postaje treći medicinski centar u Europi s ovakvim laboratorijem (<https://www.kbc-zagreb.hr/>).



Slika 2. Cirkulirajući biomarkeri u tekućoj biopsiji za preciznu medicinu. Kap krvi simbolizira uzorak krvi iz kojeg se nakon centrifugiranja odvaja plazma/serum od staničnog dijela. U uzorku krvi mogu se detektirati, izolirati i karakterizirati različiti komplementarni cirkulirajući biomarkeri. U plazmi ili serumu (gore) mogu se otkriti egzozomi, proteini, cirkulirajuća RNA bez stanica (nekodirajuća i glasnička RNA), cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) i tumorom educirani trombociti (TEP). U staničnom dijelu (dolje) mogu se detektirati CTC (pojedinačni CTC i klasteri CTC) te netumorske imunosne stanice, cirkulirajuće endotelne stanice (CEC) ili s rakom povezani fibroblasti (CA fibroblasti). E: epitelni; M: mezenhimalni. Preuzeto i prilagođeno prema Alix-Panabières i Pantel (2021) uz dopuštenje izdavača.

## 4.2. Cirkulirajuće tumorske stanice

Tijekom rasta i razvoja tumora, neke stanice tumora se odvajaju i ulaze u krvotok ili limfni sustav. Thomas R. Ashworth je prvi dokumentirao ove stanice i nazvao ih cirkulirajućim tumorskim stanicama nakon što ih je otkrio u mikroskopskom preparatu razmaza krvi kod bolesnice koja je bolovala od karcinoma dojke. Smatrao ih je mogućim tumorskim stanicama zbog njihovih morfoloških značajki koje su bile zajedničke sa čvrstim tumorskim tkivom pronađenim drugdje u tijelu bolesnice. Time je potencijalno objasnio prisutnost višestrukih tumorskih metastaza na različitim anatomskim mjestima bolesnice (Ashworth, 1869).

Ekperimentalna istraživanja pokazuju da se tumorske stanice mogu širiti tijekom ranih faza evolucije tumora (Harper i sur., 2016; Hosseini i sur., 2016). Pojedinačne cirkulirajuće tumorske stanice mogu se otkriti čak i u bolesnika s premalignim bolestima, poput intraduktalne papilarne mucinozne novotvorine gušterače (nekarcirozni tip tumora) i dukalnog karcinoma dojke *in situ* (neinzvazivni stadij karcinoma dojke), što sugerira da dio stanica stječe maligne sposobnosti u vrlo ranim stadijima bolesti. Da bi mogle metastazirati, tumorske stanice moraju prodrijeti kroz bazalnu membranu i okolni izvanstanični matriks koji pruža fizičku barijeru. U krvne žile mogu dospjeti pasivno zbog oštećenja tumorske vaskulature ili aktivnom intravazacijom (Micalizzi i sur., 2017). Povećana propusnost krvnih žila doprinosi stvaranju CTC-a, kao i povećana angiogeneza (Lin i sur., 2021). Poremećena regulacija proangiogenih signala poput faktor rasta fibroblasta te vaskularnog endotelnog faktora rasta promoviraju stvaranje aberantnih žila čime se olakšava intravazacija tumorskih stanica (De Renzi i sur., 2022).

Iz tumora se svakodnevno oslobađaju brojne stanice u krvotok, no CTC imaju kratak vijek trajanja u cirkulaciji. CTC su rijetke stanice, s učestalošću od jedne tumorske stanice na  $5 \times 10^6$  leukocita i  $5 \times 10^9$  eritrocita po mililitru krvi u bolesnika s uznapredovalim karcinomom (Petrik i sur., 2022). Velika većina tih stanica je uništena imunosnim odgovorom, mehanizmima fizičkog stresa (poput hemodinamskih sila i sila smicanja), apoptozom, anoikisom (oblikom stanične smrti sličnim apoptozi, koji se javlja kada stanice izgube vezanost s izvanstaničnim matriksom i susjednim stanicama) ili uslijed nedostatka faktora rasta i citokina (Lozar i sur., 2019). Samo mali postotak cirkulirajućih tumorskih stanica sposoban je metastazirati, što ukazuje na to da su te rijetke stanice stekle izrazito agresivne osobine. Međutim, unutarstanični



mehanizmi CTC-a i izvanstanični uvjeti koji im omogućuju preživljavanje još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Neki od poznatih mehanizama su epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), interakcija s drugim stanicama, širenje u nakupinama te aktivacija anti-apoptotskih puteva. CTC često stupaju u interakciju s trombocitima preko površinskih receptora. Agregacija trombocita oko tumorskih stanica štiti ih od sila smicanja i prirodnih stanica ubojica (NK stanice) i potpomaže prianjanje tumorskih stanica na stijenku krvnih kapilara (Liao i sur., 2020). Citotoksični T limfociti i NK stanice ključne su imunostane stanice odgovorne za uništavanje tumorskih stanica. Te stanice otpuštaju granzim B iz svojih granula i na taj način aktiviraju apoptozu u cirkulirajućim tumorskim stanicama. CTC mogu eksprimiranjem određenih proteina (survivin, Bcl-2, Mcl-1) aktivirati signalne putove koji ih štite od apoptoze. Protein survivin je glavni inhibitor apoptoze koji inhibira aktivaciju apoptotskih proteaza, kaspaze-8 i kaspaze-6 (Wang i sur., 2018). Istraživanja bolesnika s kolorektalnim karcinomom, karcinomom dojke, karcinomom jednjaka i karcinomom pluća nemalih stanica su pokazala da su bolesnici kojima su izolirani survivin (+) CTC, u većem broju doživjeli recidiv bolesti (Ning i sur., 2015; Cao i sur., 2009; Yie i sur., 2006). CTC u krvotoku mogu putovati u obliku klastera sastavljenih od 2 do 50 stanica (Petrik i sur., 2022). Grupiranje CTC-a u klasterne je adaptivni mehanizam koji povećava njihovo preživljavanje i metastatski potencijal (Schuster i sur., 2021). U klasterima su stanice često međusobno povezane adhezijskim molekulama, što im omogućuje izbjegavanje apoptoze (Aceto, 2020). Razlikuju se tzv. homotipski klasteri sastavljeni od samo tumorskih stanica i heterotipski klasteri sastavljeni od tumorskih i krvnih stanica (Schuster i sur., 2021). Duda i suradnici (2010) koristili su mišji model karcinoma pluća i pokazali da CTC imaju prednost u preživljavanju ako formiraju heterotipske klasterne s fibroblastima. Iako su CTC klasteri u krvotoku još rjeđi od samostalnih CTC-a, u takvom obliku imaju do 100 puta veći metastatski potencijal (Schuster i sur., 2021).

Izlazak CTC-a iz krvne žile, tzv. ekstravazacija, jest idući korak u metastatskom procesu. Uspješnost ekstravazacije ovisi o vrsti CTC-a te njihovom obliku ili konfiguraciji klastera (homotipski naspram heterotipski). Aktivna ekstravazacija CTC-a oponaša dijapedezu leukocita, uključujući citoskeletne i signalne promjene odnosno ekspresiju liganada i receptora koji omogućuju izravnu interakciju s endotelom (Kurma i Alix-Panabières, 2023). Trombociti olakšavaju ekstravazaciju uzrokujući retrakciju endotela, a neutrofilni stvaraju proupalno lokalno okruženje putem izlučivanja različitih citokina što rezultira povećanom vaskularnom propusnošću (Ring i sur., 2023).

Važan proces koji omogućuje početne korake metastaske kaskade jest epitelno-mezenhimalna tranzicija, tijekom koje tumorske stanice gube epitelne značajke te poprimaju mezenhimalni fenotip i time dobivaju višestruke maligne osobine (Lambert i sur., 2017). EMT je složen razvojni proces koji se fiziološki događa tijekom embriogeneze i kod odraslih prilikom zacjeljivanja tkiva odnosno u patološkim stanjima poput fibroze organa i progresije tumora (Jie i sur., 2017). Ovaj mehanizam povezan je s diseminacijom tumora i korelira s agresivnošću tumora zbog povećane sposobnosti migriranja tumorskih stanica (Petrik i sur., 2022). Epitelne stanice su apikalno-bazalno polarizirane stanice, međusobno vezane tijesnim spojevima, adherentnim spojevima i dezmosomima. Suprotno tome, mezenhimalne stanice su vretenastog izgleda i međusobno slabo vezane što im daje sposobnost migracije (Ribatti i sur., 2020). Fischer i sur. (2015) utvrdili su na jedinstvenom sustavu za praćenje loze EMT-a (engl. *EMT lineage tracing system*) upotrebom fluorescentnog biljega, da EMT nije nužan proces za metastaziranje tumora, međutim pokazali su da su visoko proliferativne ne-EMT stanice bile osjetljive na kemoterapiju, a da su rekurentne metastaze koje su uočene nakon tretmana proizašle iz EMT stanica. Dokazano je da EMT transkripcijski faktori kao što su Slug i Snail, izravno doprinose otpornosti na lijekove na bazi platine u bolesnicima s karcinomom jajnika (Asante i sur., 2023).

Većina CTC-a se u konačnici podvrgava EMT-u tijekom progresije tumora. Osim u progresiji tumora i kemorezistenciji, aktivacija EMT-a ima i uloge u stimulaciji tumorske angiogeneze, stvaranju cirkulirajućih matičnih stanica raka (engl. *circulating cancer stem cells, CSCs*), uspostavljanju imunosupresivnog tumorskog mikrookruženja i integriranju nekoliko važnih signalnih molekula koje su ključne za rast tumora (Ribatti i sur., 2020). Moguć je i suprotan proces, mezenhimalno-epitelna tranzicija (MET), zbog čega se prvotni termin transformacija zamijenio s tranzicija kako bi se naglasila reverzibilnost procesa (Omazić, 2019).

Stanice karcinoma koje su već prošle kroz stijenku krvnih žila i lokalizirale se u sekundarnom organu poput koštane srži, jetre, pluća ili mozga, nazivaju se diseminiranim tumorskim stanicama (engl. *disseminated tumor cells, DTC*). Hüseman i sur., (2007) utvrdili su na mišjim modelima kao i na ljudskim uzorcima karcinoma dojke da se diseminacija tumorskih stanica može dogoditi u preinvazivnim stadijima progresije tumora te da broj i genotip diseminiranih tumorskih stanica nisu povezani s veličinom tumora. Pod utjecajem mikrookruženja organa, DTC mogu ostati u stanju mirovanja različito dugo, čak desetljećima (Risson i sur., 2020; Gomis i Gawrzak, 2017). Većina, posebno u koštanoj srži, ne proliferira ni godinama nakon dijagnoze primarnog tumora (Pantel i Speicher, 2016). Klinički nedetektabilna minimalna

ostatna bolest (engl. *minimal residual disease*, MRD), definirana diseminiranim tumorskim stanicama koje su ostale nakon operacije primarnog tumora, nudi vremenski okvir za sprječavanje metastaza. U te svrhe se trenutno koristi adjuvantna terapija, s ciljem eliminacije preostalih tumorskih stanica u fazi MRD-a i smanjenja rizika od budućih metastaza. Međutim, još uvijek nije jasno kako tumorske stanice mogu godinama preživjeti u stanju mirovanja na ektopičnim mjestima te kako se regulira mirovanje tumora i metastatski rast (Hosseini i sur., 2016). Pretpostavlja se da mezenhimalno-epitelna tranzicija ima važnu ulogu u transformaciji uspavanih DTC-a u organima u metastaze (Petrik i sur., 2022; Tsai i Yang, 2013).

### 4.3. Biologija i vrste cirkulirajućih tumorskih stanica

CTC mogu potjecati od različitih vrsta karcinoma, a razlikuju se međusobno i od normalnih krvnih stanica po veličini, nepravilnom obliku i specifičnoj proteinskoj ekspresiji. Njihova veličina značajno varira ovisno o tkivu iz kojeg potječu. CTC karcinoma malih stanica pluća mogu dosegnuti promjer od samo 10  $\mu\text{m}$ , CTC karcinoma dojke mogu imati promjer do 70  $\mu\text{m}$ , a stanice karcinoma prostate mogu biti promjera većeg od 100  $\mu\text{m}$  (Thiele i sur., 2017). Okolne stanice su općenito manjeg promjera, trombociti (2-4  $\mu\text{m}$ ), eritrociti (6-8  $\mu\text{m}$ ), granulociti (prosječno 15  $\mu\text{m}$ ), limfociti (7-18  $\mu\text{m}$ ) i monociti (12-20  $\mu\text{m}$ ). Razlika u veličini služi kao princip određenih metoda za izolaciju i obogaćivanje CTC-a.

Ekspresija proteina u CTC je vrlo raznolika. Može se razlikovati od stanica primarnog tumora te ukazivati na različite podskupine CTC-a unutar iste populacije, što otežava njihovu izolaciju i detekciju (Alix-Panabières i Pantel, 2014). Najčešći pristup za izolaciju i detekciju CTC-a je korištenje imunokemijskih metoda, pri čemu se antitijela koriste za selektivno vezanje antigena na protein površine stanice odnosno površinski biljeg (Habli i sur., 2020). Epitelni biljezi su izraženi na površini normalnih epitelnih stanica i karcinoma, ali ih nema na mezenhimalnim stanicama poput leukocita (Alix-Panabières i Pantel, 2014). Najčešće korišteni epitelni biljezi su transmembranski glikoprotein EpCAM (engl. *epithelial cell adhesion molecule*), citokeratin (engl. *cytokeratin*, CK) i E-kadherin (Lin i sur., 2021). CD45, poznat po imenu zajednički leukocitni antigen (engl. *leukocyte common antigen*, LCA) je transmembranska protein-tirozin fosfataza koja je eksprimirana gotovo na svim stanicama mijeloidne i limfoide loze osim na zrelih eritrocitima i megakariocitima, stoga u metodama obogaćivanja CTC-a služi za depleciju leukocita odnosno negativnu selekciju (Alix-Panabières i Pantel, 2013). Postoje i mnogobrojni specifični biljezi za pojedine vrste karcinoma poput HER2 za karcinom dojke, PSMA za karcinom prostate, PI3K za kolorektalni karcinom i drugi prikazani u Tablici 1 (Lin i sur., 2021). Za točnu fenotipiziju izoliranih stanica većina metoda koristi kombinaciju različitih biljega (Alix-Panabières i Pantel, 2013).

Cirkulirajuće tumorske stanice pokazuju visok stupanj plastičnosti, što im omogućuje postojanje u različitim fenotipskim oblicima (Alix-Panabières i Pantel, 2014). Stanice karcinoma koje su prošle kroz epitelno-mezenhimalnu tranziciju pokazuju smanjenu ekspresiju epitelnih biljega i povećanu ekspresiju mezenhimalnih biljega. Zbog toga, korištenje isključivo

epitelnih biljega za dokazivanje CTC-a može dovesti do neotkrivanja populacije potencijalno agresivnih tumorskih stanica (Petrik i sur., 2022). Kod bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica je otkriveno da je količina EpCAM-negativnih CTC-a bila znatno veća od EpCAM-pozitivnih CTC-a (Wang i sur., 2015). N-kadherin (membranski protein iz obitelji kadherina), vimentin (strukturni citoskeletni protein) i Twist (transkripcijski faktor) su izraženi u mezenhimalnim stanicama te se ti proteini koriste kao biljezi u metodama za detekciju mezenhimalnih CTC-a. Upotreba fluorescentno-magnetskih nanočestica koje se sastoje od sučelja dvostrukog antitijela, koje cilja na EpCAM i N-kadherin, pridonijela je visokoučinkovitoj izolaciji i brznoj identifikaciji CTC-a karcinoma dojke (Wang i sur., 2019). Ponekad proces epitelno-mezenhimalne tranzicije nije potpun pa se tumorske stanice nalaze u višestrukim prijelaznim stanjima te izražavaju miješane epitelne i mezenhimalne značajke. Takve hibridne stanice mogu se kretati kolektivno kao klasteri i mogu biti agresivnije od stanica s potpunim EMT fenotipom (Roche, 2018; Lambert i sur., 2017). Budući da trenutno postoji samo ograničen broj dostupnih biljega, teško je definirati cjelokupnu populaciju CTC-a (Connal i sur., 2023). Idealni CTC biljeg bi trebao biti izražen na svim CTC, u svim fazama procesa invazije i cirkulacije, a da pritom nije prisutan na okolnim krvnim stanicama.

Tablica 1. Molekularni biljezi za detekciju CTC-a (preuzeto i prilagođeno prema Lin i sur., 2021).

Tip karcinoma	Epitelni biljezi	Mezenhimalni biljezi	Specifični biljezi
<b>Karcinom dojke</b>	EpCAM CK 5/7/8/18/19 E-kadherin	Vimentin	HER2
		Twist	ER
		Fibronektin	AR
		N-kadherin	MRP
		SERPINE1/PAI1	
<b>Karcinom prostate</b>	EpCAM CK 8/18/19	Vimentin	PSMA
		Twist	PSA
			EGFR
			ARV7
			PIM1
<b>Karcinom bubrega</b>	EpCAM	-	AR
			CD147
<b>Karcinom mjehura</b>	EpCAM CK 8/18/19	-	-
<b>Kolorektalni karcinom</b>	EpCAM CK 8/18/19	Vimentin	
		Twist	PI3K
		SNAI1	CEA
		AKT2	PRL3
		LOXL3	
	Plastin3		

<b>Karcinom pluća nemalih stanica</b>	EpCAM	Vimentin	Folatni receptor
	CK 7/8/18/18	Twist	(FR)
		N-Cadherin	Aktivnost telomeraze
<b>Karcinom pluća malih stanica</b>	EpCAM	Vimentin	DLL3
	CK 8/18/19		
<b>Rak gušterače</b>	EpCAM	Vimentin	
	CK 8/18/19	Twist	-
		KLF8	
<b>Hepatocelularni karcinom</b>	EpCAM	Vimentin	GPC3
	CK8/18/19	Twist	ASGPR
<b>Karcinom želuca</b>	EpCAM	Vimentin	XAF1
	CK 19/20	N-kadherin	MT1-MMP
			Survivin
			HER2
<b>Karcinom jednjaka</b>	EpCAM	-	-
	CK 8/18/19		
<b>Karcinom grlića maternice</b>	EpCAM	-	-
	CK8/18/19		
<b>Melanom</b>	-	-	MART-1
			MHW-MAA
			CD146
			MAGE A3
			GaINAc-T
			MAGE A1-6
			hTERT

Deformabilnost je sposobnost promjene oblika CTC-a pod djelovanjem sila naprezanja. Razlika u deformabilnosti proizlazi iz mnogih čimbenika poput signalizacije izvanstaničnog matriksa, kemoterapije ili mutacija u DNA koje mogu uzrokovati promjene u ekspresiji proteina (Thiele i sur., 2017). Deformabilnost se može izmjeriti pomoću mikrofluidnog optičkog sustava. Mješavina CTC-a različitih staničnih linija može se razvrstati prema tome potječu li od benignih, nepomičnih odnosno nemetastatskih ili visoko agresivnih metastatskih stanica na temelju različite optičke deformabilnosti (Thiele i sur., 2017). Visoko agresivne metastatske stanice pokazuju povećanu deformabilnost (Thiele i sur., 2017). Park i sur. (2016) su izolirali CTC iz krvi bolesnika s karcinomom prostate koristeći sofisticirani mikrofluidni uređaj. Princip metode je oscilatorni protok uzorka kroz suženja uređaja kako bi se stvorili različiti putovi protoka za različite tipove stanica, čime se iskorištava njihova različita deformabilnost. U bolesnika s metastatskim karcinomom prostate, CTC se mogu obogatiti s 25 puta većim prinosom u odnosu na obogaćivanje korištenjem CellSearch® tehnologije.

Promjene u obliku, veličini jezgre i ekspresiji proteina u CTC utječu na omjer između različitih suspendiranih čestica i citosola. Taj omjer je različit u CTC u usporedbi s leukocitima i benignim epitelnim stanicama. Razlika u omjeru cirkulirajućim tumorskim stanicama daje dielektrične karakteristike koje mogu biti korisne za njihovo razlikovanje od ostalih stanica u krvi (Thiele i sur., 2017).



## 4.4. Metode detekcije i kvantifikacije cirkulirajućih tumorskih stanica

Razvoj metoda za detekciju i kvantifikaciju cirkulirajućih tumorskih stanica označava veliki napredak u onkološkim istraživanjima i kliničkoj praksi. Tijekom posljednjeg desetljeća razvijene su brojne tehnologije za detekciju CTC-a, svaka koristeći specifična svojstva CTC-a za njihovu preciznu selekciju i hvatanje (Habli, 2020). Razlike između CTC-a i normalnih krvnih stanica u ekspresiji proteina, morfologiji i veličini doprinijele su nastanku i komercijalizaciji ovih tehnologija. Svi pristupi teže preciznoj kvantifikaciji CTC-a kako bi se donijeli klinički relevantni zaključci, s ciljem unapređenja liječenja i kontrole malignih bolesti (Habli, 2020). Kvantifikacija je ključna za procjenu progresije i praćenje učinkovitosti terapije (Lin i sur., 2021).

Većina postojećih tehnologija sastoje se od procesa u dva koraka, izolacije stanica i naknadne detekcije (Ju i sur., 2022). Izolacija i detekcija CTC-a iz periferne krvi je vrlo izazovna s obzirom na to da su prisutne u vrlo malim koncentracijama u krvi, s očekivanim brojem od 1 do 10 stanica u 1 mililitru krvi (Caputo i sur., 2023; Hu i sur., 2021; Alix-Panabières i Pantel, 2012). Bolesnicima se obično uzima od 7,5 do 10,0 ml krvi u registrirane IVD (engl. *in vitro diagnostics*) *CellSave* (Menarini Silicon Biosystems) epruvete specijalizirane za očuvanje stanica i njihove stabilnosti tijekom transporta i analize. Ove epruvete su posebno dizajnirane za prikupljanje uzoraka krvi iz kojih se žele izolirati CTC u kliničke svrhe. Sadrže antikoagulans  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  te specifičan stabilizator koji sprječava razgradnju stanica i omogućava stabilnost uzorka do 96 sati na sobnoj temperaturi (<https://www.siliconbiosystems.com/en-us/>). U slučaju analize živih stanica ili istraživanja ekspresije RNA u CTC, preporučuje se uzorkovanje krvi pomoću EDTA i obrada unutar 24 sata (Petrik i sur., 2022).

Primarni cilj izolacije CTC-a je odvajanje od ostalih krvnih stanica, čime se dobiva uzorak koji sadrži CTC s minimalnom kontaminacijom eritrocitima, leukocitima i trombocitima. Ovaj korak je ključan za omogućavanje precizne detekcije CTC-a. Stoga većina metoda podrazumijeva postupak obogaćivanja (engl. *enrichment*) prilikom ili nakon izolacije CTC-a iz krvi s ciljem dodatnog povećanja koncentracije CTC-a unutar uzorka (Edd i sur., 2022). Mnogi znanstvenici poistovjećuju pojam obogaćivanja s pojmom izolacije. Za obogaćivanje CTC-a dostupne su različite metode temeljene na različitim svojstvima CTC-a koja ih razlikuju od

okolnih normalnih krvnih stanica, uključujući fizička svojstva veličinu, gustoću, električni naboj, sposobnost deformacije te biološka svojstva npr. ekspresija proteina na površini stanice ili njihova vijabilnost (Pantel i Alix-Panabières, 2012). Metode imunoseparacija (engl. *immunoaffinity based separation*) selektivno ciljaju biljege prisutne na CTC što se naziva pozitivnom selekcijom i/ili biljege prisutne na leukocitima za njihovu depleciju što se naziva negativnom selekcijom. Imunoseparacija omogućuje visoku specifičnost, ali može propustiti CTC koji ne izražavaju ciljani biljeg dok fizičke metode mogu obuhvatiti širi spektar CTC-a, ali često s manjom specifičnošću (Bailey i Martin, 2019).

Metode na temelju fizičkih karakteristika dobivaju na popularnosti zbog jednostavnosti i cijene u usporedbi s metodama koje su ovisne o antitijelima (Petrik i sur., 2022; Edd i sur., 2022). Dvije su glavne tehnike obogaćivanja CTC-a, centrifugiranje s gradijentom gustoće ili imunomagnetsko obogaćivanje tumorskih stanica antigenima stanične površine (Andergassen i sur., 2016).

Ficoll® odnosno Ficoll-Paque, je mješavina visokomolekulskih polimera saharoze (Ficoll) za stvaranje gradijenta gustoće i kontrastnog sredstva natrijevog diatrizoata (Hypaque). Uzorak krvi se dodaje u Ficoll-Paque medij te centrifugira nakon čega se komponente krvi odvajaju prema njihovoj gustoći. Eritrociti i granulociti se talože na dnu, dok se mononuklearne stanice zadržavaju u sloju na međupovršini između medija i plazme. Međutim, zbog citotoksičnosti Ficolla, stvaranje staničnih nakupina može dovesti do gubitka tumorskih stanica koje migriraju na dno medija. Percoll je alternativni medij za stvaranje gradijenta gustoće, koji se sastoji od koloidne suspenzije čestica silicijevog dioksida i koji pokazuje smanjenu citotoksičnost i širi raspon gradijenta gustoće u odnosu na Ficoll (Li i sur., 2020).

OncoQuick® postupak kombinira centrifugiranje gradijenta gustoće s mikroporoznom membranskom filtracijom za odvajanje stanica. Krv se nanosi na vrh gradijenta, a centrifugiranje rezultira hvatanjem CTC-a na filteru. Iako je jednostavna i jeftina metoda, koristi se kao početni korak CTC analize, često u kombinaciji s drugim sustavima, zbog kontaminacije leukocitima (Petrik i sur., 2022). Prosječna uspješnost iskorištenja tumorskih stanica za OncoQuick i Ficoll-Paque je slična, između 70% i 90% (Li i sur., 2020).

Sustav RosetteSep™ (STEMCELL Technologies) sastoji se od tetramernih kompleksa protutijela koja ciljaju neželjene stanice u uzorku krvi, omogućujući njihovo uklanjanje (negativna selekcija) i pročišćavanje CTC-a. Protutijela prepoznaju nekoliko antigena na eritrocitima i leukocitima, uključujući CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66b i

glikoforin A. Nakon centrifugiranja pomoću medija s gradijentom gustoće (RosetteSep-Ficoll), pročišćene tumorske stanice nalaze se između plazme i medija (De Renzi i sur., 2022).

Izolacija cirkulirajućih tumorskih stanica prema veličini, ISET (engl. *isolation by size of tumor cells*) je metoda filtracije krvi kroz cilindrične pore od 8  $\mu\text{m}$  u kojoj je moguće paralelno filtriranje 12 uzoraka. Uzorak se filtrira primjenom vakuuma što rezultira nježnom aspiracijom uzorka. Velika prednost ove metode je što se stanice ne modificiraju tijekom obogaćivanja, pa se naknadno mogu koristiti za FISH ili PCR testove karakterizacije. Farace i sur. (2011) su proveli istraživanje u kojem su usporedili učinkovitost izolacije ISET metode sa sustavom CellSearch®. Sustav CellSearch® je pokazao bolje rezultate izolacije CTC-a kod bolesnika s karcinomom dojke dok se ISET pokazao učinkovitijim kod bolesnika s karcinomom prostate i pluća. Sveukupno, 30% bolesnika (18 od 60) bilo je negativno prema CellSearch-u, dok je samo 5% bolesnika (3 od 60) bilo negativno primjenom ISET sustava. Varijabilnost u podudarnosti pokazuje ograničenja metoda obogaćivanja temeljenih na EpCAM-u. Razvijen je i pridruženi poluautomatizirani sustav detekcije CTC-a koji omogućuje jednostavno prebrojavanje nakon filtracije (Rushton i sur., 2021; Habli i sur., 2020; Andergassen i sur., 2016). Parsortix™ tehnologija je mikrofluidna separacija CTC-a koja se temelji na njihovoj veličini i deformabilnosti (Miller i sur., 2018).

ScreenCell® je tehnologija koja izolira CTC prema njihovoj veličini u usporedbi s krvnim stanicama pomoću porozne membrane. Ova izolacija omogućuje naknadnu analizu CTC-a korištenjem raznih metoda. Proces izolacije odvija se uz pomoć posebnih modula između kojih se nalazi membrana kroz koju se filtriraju stanice. 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 CTC zadržavaju na filteru dok leukociti, eritrociti i trombociti slobodno prolaze. ScreenCell® tehnologija razvijena je kao jeftina i kompaktna tehnologija, s ciljem izolacije CTC-a bez potrebe za velikom i skupom aparaturom. ScreenCell® je brza, jednostavna, neovisna o antigenima, ekonomična i učinkovita tehnologija (Hanžek, 2019).

Dielektroforetska (engl. *dielectrophoresis*, DEP) metoda obogaćivanja koristi sile električnog polja za razdvajanje CTC-a na temelju razlika u dielektričnim svojstvima stanica, neovisno o EpCAM ekspresiji i vrlo je specifična, ali skupa metoda. Krv se prvo obrađuje pomoću Ficoll-a za izolaciju mononuklearnih stanica, a zatim se koristi uređaj ApoStream. Tehnologija ApoStream (ApoCell) kombinira DEP s pomoćnim protokom polja za izolaciju CTC-a.

Citometar za lasersko skeniranje iCys koristi se za detekciju CTC-a nakon obogaćivanja. DEP ima dobro iskorištenje uz visoku čistoću i visoku vijabilnost dobivenih stanica (Bailey i Martin, 2019). DEPArray™ (Menarini Silicon Biosystems) je metoda s pokretnim dielektroforetskim kavezom za hvatanje stanica u kombinaciji sa Sangerovim sekvenciranjem (Habli 2020).

MagSweeper (Illumina Inc) je tehnologija imunomagnetskog obogaćivanja koja koristi robotsku magnetsku šipku kojom upravlja automatizirani sustav. Omogućuje izolaciju CTC-a visoke čistoće i, za razliku od drugih tehnologija, može se obraditi puna krv bez prethodnog centrifugiranja ili lize eritrocita (Ferreira i sur., 2016). U ovom postupku, magnetske kuglice obložene specifičnim protutijelima ciljaju biljeg EpCAM. Nakon što se protutijela vežu na CTC, robotska šipka generira magnetsko polje koje privlači i izolira te stanice iz uzorka krvi (<https://techfinder.stanford.edu/>). Ova metoda omogućuje učinkovito i selektivno obogaćivanje CTC-a. MagSweeper je korišten za gensko profiliranje CTC-a u više istraživanja, uključujući profiliranje transkripcije karcinoma dojke, otkrivanje *PIK3CA* mutacija u CTC metastatskog karcinoma dojke i sekvenciranje cijelog egzoma karcinoma prostate (Ferreira i sur., 2016).

CTC-chip tehnologija koristi mikrofluidnu platformu za izuzetno osjetljivu izolaciju CTC-a iz perifernih uzoraka krvi. CTC-chip se sastoji od mikrofluidnog sustava čipa s vrlo malim kanalima i komorama. Površina čipa je obložena anti-EpCAM protutijelima. Takva struktura omogućava preciznu kontrolu protoka krvi kroz čip. Mana ovakvog sustava je nemogućnost hvatanja CTC klastera. Nakon što su CTC izolirani, moguće ih je vizualizirati i analizirati pomoću različitih detekcijskih tehnika, uključujući imunofluorescenciju. Uz visoku osjetljivost, važna prednost CTC-chipa je mogućnost izolacije stanica uz zadržavanje njihove vijabilnosti, koja iznosi oko 98% u usporedbi sa sustavom CellSearch® (Sequist i sur., 2009).

Nakon obogaćivanja, frakcija CTC-a obično još uvijek sadrži znatan broj leukocita, pa je CTC potrebno detektirati metodom koja može razlikovati tumorske stanice od normalnih krvnih stanica na razini jedne stanice (Pantel i Alix-Panabières, 2012). Generalno, postoje dva osnovna pristupa detekciji CTC-a, metode temeljene na proteinima odnosno direktna CTC detekcija ili neizravna CTC detekcija molekularnim pristupima, poput metoda temeljenih na PCR-u (Hendricks i sur. 2020). Daljnja karakterizacija može uključivati dodatne genomske analize poput fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) ili analize jedne stanice (engl. *single-cell sequencing*) (Alix-Panabières i Pantel, 2014).

Lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) koristi se za detekciju ciljanih transkripata i

karakterizaciju CTC-a. To je metoda koja omogućuje detekciju malog broja stanica. Prednost ovih metoda je mogućnost analize više gena istovremeno iz malog volumena uzorka što je nužno u istraživanjima CTC-a (Hanžek, 2019).

AdnaTest® (AdnaGen AG) je test pozitivne selekcije koji hvata stanice pomoću imunomagnetskih kuglica obloženih protutijelima na površinske biljege. Uhvaćene stanice detektiraju se pomoću PCR-a koji analizira specifične transkripte na temelju vrste tumora: receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGFR), karcinoembrionalni antigen (CEA) i EpCAM za kolorektalni karcinom te MUC-1, receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2) i GA733-2 za karcinom dojke, s osjetljivošću otkrivanja sličnom onoj CellSearch-a (Habli i sur., 2020).

EPISPOT (engl. *epithelial immunospot*) test detektira proteine specifične za tumorske stanice tako da se detektiraju samo vijabilne stanice. Detekcijom proteina CK 19 putem EPISPOT testa može se otkriti aktivna podskupina stanica karcinoma dojke s metastatskim svojstvima. Ova tehnika mimoilazi izravan kontakt s ciljnim stanicama i procjenjuje prisutnost CTC-a na temelju proteina koji su izlučeni ili otpušteni iz stanica tijekom kratkotrajne kulture u trajanju od 24 do 48 sati (De Renzi i sur., 2022).

Farace i sur. (2011) su u svom radu koristili postupak detekcije cirkulirajućih tumorskih stanica imunocitokemijskim bojenjem, nakon izolacije stanica pomoću ISET sustava. Nakon izolacije, stanice se obilježavaju pomoću primarnih protutijela koja prepoznaju biljege specifične za određene karcinome (npr. citokeratin 7 za karcinome dojke i pluća, anti-p504S za adenokarcinom prostate). Nadalje se vrši inkubacija sekundarnim protutijelima obilježenim peroksidazom. Peroksidaza katalizira reakciju s diaminobenzidinom (DAB) koji se koristi kao kromogen što omogućuje vizualizaciju pomoću svjetlosne mikroskopije (Farace i sur., 2011).

Razvoj novih tehnologija dovest će do integriranih sustava za kombinirano obogaćivanje, detekciju i karakterizaciju CTC-a poput sustava za *in vivo* hvatanje CTC-a koje bi mogle prevladati ograničenje malog broja CTC-a (Alix-Panabières i Pantel, 2021). Kombinacija metoda koja koristi površinske biljege s drugim metodama može poboljšati osjetljivost detekcije CTC-a i održati integritet i biološke karakteristike CTC-a za dodatna istraživanja. U Tablici 2 je prikazan sažeti pregled komercijalno dostupnih metoda za izolaciju i/ili detekciju CTC-a.

Tablica 2. Sažeti pregled komercijalno dostupnih metoda za izolaciju i/ili detekciju CTC-a koje se baziraju na biljezima (preuzeto i prilagođena prema Habli i sur., (2020).

Uređaj	Tehnologija	Vrsta tumora	Napomene
<b>Magnetne nanočestice</b>			
<b>CELLSEARCH® (Menarini Silicon Biosystem)</b>	EpCAM-om premazane ferofluidne nanočestice za selekciju EpCAM+ stanica. Uhvaćene stanice se zatim potvrđuju imufluorescentnim bojenjem CK 8, 18, 19.	Metastatski karcinom dojke, prostate i metastatski kolorektalni karcinom	Odobreno od strane FDA; Upotreba protutijela; Niska čistoća uhvaćenih CTC-a; Osjetljivost: 27 %, 32 %, 70 %; Specifičnost: 89 %, 99,7 %, 93 %; Najviše klinički potvrđena tehnologija
<b>AdnaTest (Adnagen)</b>	Magnetne kuglice premazane kombinacijom protutijela (EpCAM, MUC-1, itd.). Uhvaćeni CTC se analiziraju pomoću multipleks RT-PCR genskih panela.	Karcinom dojke, prostate, jajnika i kolona	Analizira uzorke krvi i koštane srži; Velika osjetljivost; Kontaminacija leukocitima; Granica detekcije: > 2 CTC/7,5 mL

<b>MACS sustav (Miltenyi Biotec)</b>	Imunomagnetsko obogaćivanje CTC-a pomoću protutijela usmjerenih na površinske biljege stanica ili pomoću unutarstaničnog anti-pan CK protutijela.	Karcinom pluća malih stanica (NSCLC) i karcinom dojke (HER2+)	Prepoznaje EpCAM negativne CTC, ali ne i CK negativne; Može se kombinirati s deplecijom leukocita pomoću anti-CD45 protutijela
<b>MagSweeper (Illumina)</b>	Imunomagnetska izolacija CTC-a pomoću protutijela na EpCAM iz neobrađenih uzoraka krvi.	Karcinom dojke, prostate i kolorektalni karcinom	Visoka čistoća uhvaćenih CTC (gotovo 100 %); Visoka propusnost (9 mL/h)
<i>In vivo</i>			
<b>GILUPI CellCollector™</b>	EpCAM-om obložena žica postavljena intravenski kod bolesnika za prikupljanje CTC-a.	Karcinom dojke	Detekcija CTC-a <i>in vivo</i> ; Procesira velike volumene krvi; Invazivno; Dugotrajno
<b>Mikrofluidni</b>			
<b>Modularni sinusoidalni mikrosustavi (BioFluidica)</b>	Čip se sastoji od 320 sinusoidalnih mikrokanala obloženih protutijelima, nakon čega slijedi fenotipska identifikacija.	Karcinom gušterače	Električni senzor za kvantifikaciju; Visoka čistoća (> 86 %) s izvrsnom iskorištenjem; Procesira 7,5 mL/h

<b>GEDI</b>	Protutijela usmjerena na HER2 i PSMA.	Karcinom dojke i prostate	Visoka specifičnost hvatanja iz neobrađene krvi; detektira do 27 CTC/mL; Osjetljivost: 94 %
<b>OncoCEE (obogaćivanje i ekstrakcija stanica) (Biocept)</b>	Mikrofluidni čip s funkcionaliziranim površinama obloženim mješavinom protutijela protiv mezenhimalnih biljega.	Karcinom dojke	Visoka učinkovitost hvatanja CTC-a; Moguća naliza CK+ i CK– CTC-a; Osjetljivost: 95 %; Specifičnost: 92 %
<b>LiquidBiopsy® (Cynvenio)</b>	Mikrofluidni čip s funkcionaliziranim površinama za pozitivnu selekciju CTC-a uz izravnu automatsku DNA analizu.	Karcinom dojke i pluća	Procesira 5 mL/h; Osjetljivost 80 %; Preciznost 75 %; Visoka čistoća detektiranih stanica; Struja omotača smanjuje nespecifično vezivanje
<b>Čip s grafenskim oksidom (GO)</b>	Nanoslojevi grafenskih oksida funkcionalizirani s protutijelima protiv površinskih biljega CTC-a s visokom osjetljivošću.	Karcinom dojke, gušterače i pluća	Velika učinkovitost hvatanja; Procesira 1–3 mL/h ; Relativno mali broj znastvenih dokaza



#### 4.4.1. Imunofluorescentne metode detekcije i kvantifikacije cirkulirajućih tumorskih stanica

Imunofluorescentne metode baziraju se na interakciji antigena i antitijela konjugiranog s fluorescentnom bojom koja emitira svjetlost kada je pobuđena zračenjem odgovarajuće valne duljine. Dijele se na direktne i indirektne imunofluorescentne metode. U direktnim imunofluorescentnim metodama koristi se jedno obilježeno protutijelo koje cilja antigen od interesa. Indirektna metoda koristi primarno nekonjugirano protutijelo i sekundarno protutijelo konjugirano fluoroforom. Vidljiva reakcija nastupa nakon vezanja sekundarnog protutijela na primarno nekonjugirano protutijelo. U postupku se najčešće koriste protutijela na citokeratine (CK), protutijela na CD45 i DAPI (4',2'-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid) boja za bojenje jezgre kako bi se identificirale intaktne stanice. Nakon što su CTC detektirani imunofluorescentnom metodom, moderni sustavi mogu automatski kvantificirati broj stanica na temelju intenziteta i lokacije fluorescentnog signala.

CellSearch® tehnologija je prva i zasada jedini klinički validirana tehnologija za izolaciju, detekciju i kvantifikaciju CTC-a od strane Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država. FDA je 2004. odobrila CTC test za kliničku primjenu odnosno za prognostičke svrhe u bolesnika s metastatskim karcinomom dojke, a naknadno je odobrenje prošireno za upotrebu u bolesnika s metastatskim karcinomom prostate (2007.) i kolorektalnim karcinomom (2008.). Sustav CellSearch® sastoji se od poluautomatiziranog uređaja i pripadajućih komponenti. Uzorak za CTC analizu je puna krv u volumenu od 7,5 mL. Princip tehnologije je imunomagnetska analiza. U metodi se koriste ferofluidne nanočestice funkcionalizirane s EpCAM protutijelima koja omogućuju magnetsko odvajanje EpCAM-pozitivnih stanica od ostalih komponenti krvi nakon centrifugiranja. Imunofluorescentno označavanje se provodi pomoću protutijela protiv citokeratina (CK 8, 18 i 19) koji su specifični za tumorske epitelne stanice i protutijela protiv CD45, uobičajenog leukocitnog antigena. Na kraju se stanične jezgre boje s bojom DAPI. Magnetsko polje omogućuje razdvajanje stanica tako da svaka stanica pojedinačno prolazi kroz detektor fluorescentnog signala. Sustav odabire EpCAM+/CK+/CD45-/DAPI+ stanice kao potencijalne CTC kandidate. Kandidati se prezentiraju putem softverske platforme koja zahtijeva iskusnog korisnika za interpretaciju rezultata. Rezultati se bilježe kao broj CTC-a na 7,5 mL pune krvi. Stanice od interesa izolirane

su žive i mogu se održavati u kulturi, što omogućuje *in vitro* karakterizaciju CTC subpopulacija (Petrik i sur., 2022).

Nakon obogaćivanja, CTC se mogu se detektirati i karakterizirati na temelju protočne citometrije. Razvrstavanje stanica potpomognuto fluorescencijom (engl. *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) je specijalizirana vrsta protočne citometrije. FACS omogućuje razvrstavanje heterogene mješavine bioloških stanica u dva ili više spremnika, na temelju specifičnog raspršenja svjetlosti i fluorescentnih karakteristika svake stanice. Protutijela specifična za određeni površinski biljeg CTC-a se konjugiraju s fluorescentnom molekulom i zatim dodaju u mješavnu stanica. Protok osigurava prolazak jedne po jedne stanice ispred laserske zrake. Mogu se mjeriti fizička svojstva uključujući veličinu stanice (raspršenost prema naprijed) i unutarnja složenost stanice (bočna raspršenost). FACS omogućuje brzo, objektivno i kvantitativno snimanje fluorescentnih signala iz pojedinačnih stanica kao i fizičko odvajanje stanica od posebnog interesa. Ograničenje FACS-a je količina stanica koje se mogu analizirati budući da se svaka stanica mora zasebno sortirati. Vijabilnost određenih vrsta stanica može se smanjiti zbog uvjeta protoka (Miller i sur., 2018).

Hendricks i sur. (2020) u svom radu su opisali NYONE® (SYNENTEC), novi poluautomatizirani mikroskopski pristup za citološku detekciju i kvantifikaciju CTC-a u bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Ova tehnologija ima potencijal lako ponovljive, robusne i poluautomatizirane kvantifikacije CTC-a, a glavna prednost je jednostavan postupak primjene. Mononuklearne stanice periferne krvi obogaćene su centrifugiranjem s gradijentom gustoće uz Ficoll® ili BD Vacutainer® CPT™ (epruveta za pripremu stanica s natrijevim heparinom namijenjena za prikupljanje pune krvi i odvajanje mononuklearnih stanica). Nakon uzorkovanja krvi, uzorci se obrađuju i fiksiraju kako bi se spriječio značajan gubitak CTC-a, nakon čega se uzorci mogu pohraniti do četiri dana. Za imunofluorescentno bojenje upotrijebljena su protutijela anti-pan-CK, anti-HER2, anti-EGFR i anti-EpCAM konjugirana s crvenom bojom Alexa647, specifična za detekciju CTC-a epitelnih tumora, posebno kolorektalnog karcinoma. Za bojenje jezgre koristi se DAPI boja, a za identifikaciju leukocita korištena su anti-CD45 protutijela konjugirana s zelenom bojom Alexa488. Sustav za snimanje stanica, NYONE®, potom automatski analizira slike i identificira moguće CTC. Ove stanice su zatim prikazane istraživaču u slikovnim datotekama, omogućujući ručnu procjenu rezultata. Ručna procjena je i dalje potrebna kako bi se dodatno potvrdila točnost kvantifikacije, uz mogućnost pregleda morfologije stanica, što može pružiti vrijedne informacije za dodatnu analizu (Hendricks i sur., 2021; Hendricks i sur., 2020).

TelomeScan je napredna metoda za detekciju cirkulirajućih tumorski stanica koja koristi adenovirusni vektor specifičan za tumorske stanice. Ovaj vektor prenosi gen za zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP) koji se aktivira samo u stanicama gdje je aktiviran promotor za hTERT (reverzna transkriptaza telomeraze), katalitičku podjedinicu enzima telomeraze. Telomeraza je specifična za tumorske stanice, što omogućuje selektivnu replikaciju virusa u tim stanicama. Kada virus uđe u tumorsku stanicu, GFP se izražava i stanica počinje emitirati zeleni fluorescentni signal, što omogućava jednostavnu vizualizaciju pod fluorescentnim mikroskopom. Ovaj sustav omogućuje visoko specifičnu detekciju i praćenje vijabilnih CTC-a. Jedna od ključnih prednosti TelomeScan metode je njena potencijalna efikasnost u detekciji CTC-a koje su prošle kroz epitelno-mezenhimalnu tranziciju. Ovaj sustav omogućava detekciju CTC-a neovisno o ekspresiji EpCAM-a, jer se temelji na adenovirusu koji selektivno inficira tumorske stanice (Ju i sur., 2022; Togo i sur., 2017).

## 4.5. Klinička značajnost cirkulirajućih tumorskih stanica

Zloćudne bolesti predstavljaju javnozdravstveni problem diljem svijeta te su drugi vodeći uzrok smrti u svijetu nakon kardiovaskularnih bolesti. Prema procjenama Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) u 2022. godini u svijetu je registrirano 20,0 milijuna novih slučajeva raka i 9,7 milijuna umrlih od raka. Predviđa se više od 35 milijuna novih slučajeva raka u 2050., što je povećanje od 75% u odnosu na 2022. godinu (<https://www.who.int/>). U Hrvatskoj je prema posljednim podacima Registra za rak, broj potvrđenih novih slučajeva raka u 2021. godini iznosio 24,834 (<https://www.hzjz.hr/>). Unatoč povećanju incidencije, rana detekcija i napredak u liječenju su posljednjih godina smanjili stopu smrtnosti od zloćudnih bolesti. Uspješnost izlječenja najviše uspoređuju metastaze koje su još uvijek nedovoljno objašnjene te je njihovo otkrivanje često prekasno. Smatra se da su metastaze odgovorne za 80 do 90 % smrti od raka (Hu i sur., 2021). Potrebno je spoznavanje mehanizama metastaziranja za poboljšanje dijagnostičkih mogućnosti i razvitak novih terapijskih opcija. Tekuća biopsija i analiza cirkulirajućih tumorskih stanica prepoznate su od strane globalne onkološke istraživačke zajednice kao područje s velikim potencijalom. Glavni ciljevi detekcije, kvantifikacije i karakterizacije CTC-a su rana dijagnoza, prognoza bolesti, praćenje terapije, otkrivanje terapijske rezistencije te pronalazak novih terapijskih meta. Jedan od glavnih razloga neuspjele terapije u bolesnika s metastazama je kemorezistencija. Genomsko profiliranje CTC-a daje klinički vrijedne informacije o mutacijskom statusu karcinoma i njegovoj evoluciji. Na primjer, stečena mutacija u genu *EGFR* najčešći je uzrok rezistencije na prvu i drugu generaciju inhibitora *EGFR*-a za bolesnike uznapredovalog karcinoma pluća nemalih stanica (Tan i sur., 2018). Nekoliko lijekova treće generacije razvijeno je za liječenje takvog oblika NSCLC-a (Tan i sur., 2018). U bolesnica s karcinomom dojke ovisnim o estrogenu, analiza CTC-a otkrila je značajnu heterogenost koja se može pratiti tijekom vremena, uključujući pojavu mutacija u genu za estrogenski receptor *ESR1* (Mastoraki i sur., 2018). Za uspješnost hormonalne terapije kod tih bolesnica, važan je i metilacijski status. Pokazano je da je metilacija gena *ESR1* snažno povezana s odgovorom na primijenjenu terapiju odnosno utišavanje gena *ESR1* je povezano s rezistencijom na terapiju (Mastoraki i sur., 2018). Prognostički značaj CTC-a je opsežno istraživano. Općenito se smatra da je povećani broj CTC-a povezan s većom vjerojatnošću od metastaziranja i agresivnosti karcinoma što su potvrdila

brojna istraživanja, pogotovo za CellSearch® tehnologiju (Lin i sur., 2021). Broj mjerljivih CTC-a u krvi bolesnika je negativno povezan s preživljavanjem u ranom i kasnom stadiju bolesti (Alix-Panabières i Pantel, 2021). Broj CTC-a je nezavisni prediktor ukupnog preživljenja (engl. *overall survival*, OS) i razdoblja bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*, PFS). Tako je za metastatski karcinom dojke određena granična vrijednost 5 CTC/7,5 mL periferne krvi što bi značilo da je broj CTC-a veći ili jednak 5 pronađen u 7,5 mililitara periferne krvi bolesnika, nezavisni prediktor za lošiji ishod bolesti, točnije razdoblje bez progresije bolesti i ukupnog preživljavanja (Cristofanilli i sur., 2005). De Bono i sur. (2008) su napravili istraživanje u kojem je utvrđeno da bolesnici s metastatskim karcinomom prostate kojima je detektiran broj CTC-a veći ili jednak 5 na 7,5 mililitara krvi imaju značajno lošiji ishod bolesti. Također su pokazali da je za predviđanje OS-a u bolesnika nakon provedenog liječenja, broj CTC-a u bolji pokazatelj u odnosu na smanjenje koncentracije tumorskog biljega PSA (prostata specifični antigen). S obzirom da CTC mogu potjecati od primarnog tumora i od metastatskih lezija, smatra se da su kod resektabilnih tumora, CTC podrijetlom iz metastatskih lezija i u tom slučaju imaju veliki prediktivni značaj (Micalizzi i sur., 2017). Prognostički značaj povišenog broja CTC-a pomoću CellSearch® tehnologije pokazan je i na karcinomu pluća, mjehura, gušterače, jajnika, tumorima glave i vrata i hepatocelularnom karcinomu (Lin i sur., 2021). Dodatna istraživanja, validacije te standardizacija procesa su potrebni za potpunu uporabu metoda za analizu CTC-a u kliničkoj praksi. S obzirom na navedene prednosti, potpuna implementacija tekuće biopsije u kliničku praksu se sve više smatra opravdanom.

#### 4.5.1. Klinička važnost cirkulirajućih tumorskih stanica u dijagnostici kolorektalnog karcinoma

U svijetu je kolorektalni karcinom (KRK) jedan od najčešće dijagnosticiranih karcinoma te je vodeći uzrok smrti od raka, iza raka dojke i pluća. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo objavljenim 11. ožujka 2022., KRK je druga najučestalija zloćudna bolest u Hrvatskoj u oba spola. 2007. godine usvojen je Nacionalni program ranog otkrivanja karcinoma debelog crijeva. Svake dvije godine pisanim putem se pozivaju sve žene i muškarci u dobi od 50. do navršene 74. godine da naprave test na nevidljivu krv u stolici (<https://www.hzjz.hr/>). Rutinski probir KRK-a savjetuje se osobama s prosječnim rizikom jer je to česta zloćudna bolest, koju je moguće spriječiti te izliječiti ukoliko se otkrije na vrijeme. Probir se sastoji od testiranja uzorka stolice na okultno krvarenje (tragovi krvi u stolici koji se ne mogu vidjeti golim okom). Osobe s pozitivnim nalazom upućuju se na probirnu kolonoskopiju. KRK je češći u osoba starije životne dobi, međutim skoro petina oboljelih je mlađa od 60 godina (Petrik i sur., 2022). Trend mortaliteta je stabilan u posljednjih 10 godina, no pojavnost kolorektalnog karcinoma je u porastu, oko 1% godišnje u posljednjih 20 godina. Smrtnost od KRK-a često je posljedica metastaza koje su zahvatile druge organe i njihovu funkciju. CTC pružaju dodatne prognostičke informacije uz radiološke i endoskopske slikovne tehnike i uobičajeno korištene serumske tumorske biljege poput CEA i CA19-9 (Verbanac i sur., 2021). Broj CTC-a prije i tijekom liječenja neovisni je prediktor PFS-a i OS-a u bolesnika s metastatskim kolorektalnim karcinomom. Uloga broja CTC-a u prognozi KRK-a istraživana je u prospektivnoj studiji na 149 bolesnika s KRK-om koji su bili podvrgnuti kirurškoj intervenciji. Zabilježeno je da količina CTC-a značajno korelira sa stadijem (Raza i sur., 2022). Velik broj CTC-a korelirao je s visokom stopom recidiva tumora i lošijom prognozom (Raza i sur., 2022). Bolesnici s brojem CTC-a većim ili jednakim od 3/7,5 mL imaju znatno lošiji OS (Raza i sur., 2022; Cohen i sur., 2008). Prisustvo CTC-a nakon operacije može ukazivati na postojanje mikrometastaza koje nisu uklonjene tijekom zahvata, što povećava rizik od recidiva. Na taj način, analiza CTC-a može pomoći u odlučivanju o potrebi za dodatnom (adjuvantnom) terapijom, čak i kod bolesnika kojima su svi vidljivi tumori uklonjeni. Genomska analiza CTC-a može otkriti specifične mutacije koje su važne za odabir ciljanih terapija, poput mutacija u genima *KRAS*, *NRAS*, i *BRAF* (Verbanac i sur., 2021). Pored toga, fenotipska analiza CTC-a može otkriti

prisutnost specifičnih proteinskih biljega koji mogu ukazivati na agresivnost tumora ili potencijalnu rezistenciju na terapiju (Lawrence i sur., 2023).

## 5. ZAKLJUČCI

Tekuća biopsija omogućava minimalno invazivno praćenje karcinoma u bolesnika analizom bioloških uzoraka poput periferne krvi, iz koje se analiziraju cirkulirajuće tumorske stanice, DNA, RNA i egzosomi. Takvim pristupom je olakšan uvid u molekulska događanja u tumorima te praćenje bolesnika i prilagodba onkoloških odluka.

CTC su važan biomarker jer mogu pružiti informacije o minimalnoj rezidualnoj bolesti, o metastatskom potencijalu tumora te za odabir ciljane terapije. Uz to omogućuju praćenje odgovora na terapiju u stvarnom vremenu te prognozu bolesti.

Biopsija tkiva neizostavna je metoda u dijagnostici solidnih tumora i određivanju specifičnog tipa tumora. Dobivanje uzorka tkiva za analizu zahtjeva postupke koji su invazivni, neugodni i bolni za pacijenta s određenim rizikom od komplikacija.

Uzorak tkiva dobiven biopsijom često ne odražava u dovoljnoj mjeri heterogenost tumora i njegovu klonsku evoluciju. Tumorske stanice dobivene tekućom biopsijom pokazuju gensku i fenotipsku raznolikost, odražavajući heterogenost unutar primarnog tumora u stvarnom vremenu. Nalaze tekuće biopsije treba kombinirati i evaluirati s nalazima histološke analize tkiva prije konačne validacije kako bi se osigurala točnost i pouzdanost dijagnoze.

Cilj tehnologija za analizu CTC-a je izolirati CTC iz krvi sa što većim prinosom i potom detektirati CTC metodom koja može razlikovati tumorske stanice od normalnih krvnih stanica na razini jedne stanice.

CellSearch® je tehnologija s najviše kliničkih dokaza za izolaciju, detekciju i kvantifikaciju CTC-a. FDA je 2004. odobrila CTC test za prognostičke svrhe u bolesnika s metastatskim karcinomom dojke, a naknadno je odobrenje prošireno za upotrebu u bolesnika s metastatskim karcinomom prostate (2007.) i kolorektalnim karcinomom (2008.).

Glavni nedostatak CellSearch® tehnologije jest ovisnost o ekspresiji površinskog proteina EpCAM-a na CTC. CellSearch® tehnologija nije u mogućnosti uhvatiti CTC koje su poprimile mezenhimalna obilježja nakon EMT-a.



Metode koje se baziraju na fizičkim karakteristikama stanica, poput veličine i deformabilnosti stanica, stječu sve veću popularnost zbog jednostavnosti primjene, neovisnosti o biljezima, prihvatljive cijene, šire primjene te u konačnici pokazuju veliku iskoristivost u usporedbi sa CellSearch® tehnologijom.

ScreenCell® je tehnologija koja izolira CTC prema njihovoj veličini u usporedbi s krvnim stanicama pomoću porozne membrane. ScreenCell® je brza, jednostavna, neovisna o antigenima, ekonomična i učinkovita tehnologija.

TelomeScan je napredna metoda za detekciju cirkulirajućih tumorskih stanica koja koristi adenovirusni vektor za gen za zeleni fluorescentni protein (GFP) koji se aktivira samo u tumorskim stanicama. Ovaj sustav omogućuje visoko specifičnu detekciju i praćenje vijabilnih CTC-a.

Detekcija vijabilnih CTC-a je velika prednost u metodama zbog toga što samo vijabilne stanice imaju sposobnost metastaziranja. TelomeScan, EPISPOT, CTC-chip, CellSearch® i ApoStream su neke od metoda koje najvećim dijelom hvataju vijabilne stanice.

Za proširenje kliničke primjene CTC-a potrebna je dodatna validacija metoda te standardizacija ukupnog laboratorijskog procesa.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

CA fibroblasti – s rakom povezani fibroblasti (engl. *cancer-associated fibroblasts*)

CEC – cirkulirajuće endotelne stanice (engl. *circulating endothelial cells*)

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

CK – citokeratin (engl. *cytokeratin*)

CTC – cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *circulating tumor cells*)

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

DAPI – 4',2'-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid

DEP – dielektroforeza (engl. *dielectrophoresis*)

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

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

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*)

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

EpCAM – (engl. *epithelial cell adhesion molecule*)

EPISPOT – (engl. *epithelial immunospot*)

FACS – razvrstavanje stanica potpomognuto fluorescencijom (engl. *fluorescence-activated cell sorting*)

FDA – Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *U.S Food and Drug Administration*)

GFP – zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*)

HER2 – receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2

ISET – izolacija cirkulirajućih tumorskih stanica prema veličini (engl. *isolation by size of tumor cells*)

MET – mezenhimalno-epitelna tranzicija

MRD – minimalna ostatna bolest (engl. *minimal residual disease*)

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

NSCLC – karcinom pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*)

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

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

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

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

TEP – tumorom educirani trombociti (engl. *tumor-educated platelets*)

## 7. LITERATURA

Aceto N. Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomed J*, 2020, 43(1), 18-23.

Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9), 623-631.

Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*, 2013, 59(1), 110-118.

Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov*, 2021, 11(4), 858–873.

Andergassen U, Zebisch M, Kölbl AC, König A, Heublein S, Schröder L, Hutter S, Friese K, Jeschke U. Real-Time qPCR-Based Detection of Circulating Tumor Cells from Blood Samples of Adjuvant Breast Cancer Patients: A Preliminary Study. *Breast Care*, 2016, 11(3), 194-198.

Asante DB, Mohan GR, Acheampong E, Ziman M, Calapre L, Meniawy TM, Gray ES, Beasley AB. Genetic analysis of heterogeneous subsets of circulating tumour cells from high grade serous ovarian carcinoma patients. *Sci Rep*, 2023, 13(1), 2552.

Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australas Med J*, 1869, 14, 146–147.

Bai RY, Staedtke V, Xia X, Riggins GJ. Prevention of tumor seeding during needle biopsy by chemotherapeutic-releasing gelatin sticks. *Oncotarget*, 2017, 8(16), 25955-25962.

Bailey PC, Martin SS. Insights on CTC Biology and Clinical Impact Emerging from Advances in Capture Technology. *Cells*, 2019, 8(6), 553.

Barišić K. Tekuća biopsija – novi pristup u dijagnozi, predviđanju i praćenju terapijskog odgovora te procjeni ishoda malignih bolesti. Knjiga sažetaka, Novo doba farmacije - spremni na izazove, 6. Hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2019, 50.

Cao M, Yie SM, Wu SM, Chen S, Lou B, He X, Ye SR, Xie K, Rao L, Gao E, Ye NY. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(7), 751-758.

Caputo V, Ciardiello F, Corte CMD, Martini G, Troiani T, Napolitano S. Diagnostic value of liquid biopsy in the era of precision medicine: 10 years of clinical evidence in cancer. *Explor Target Antitumor Ther*, 2023, 4(1), 102-138.

Chemi F, Rothwell DG, McGranahan N, Gulati S, Abbosh C, Pearce SP, Zhou C, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Birkbak N, Pierce J, Kim CS, Ferdous S, Burt DJ, Slane-Tan D, Gomes F, Moore D, Shah R, Al Bakir M, Hiley C, Veeriah S, Summers Y, Crosbie P, Ward S, Mesquita B, Dynowski M, Biswas D, Tugwood J, Blackhall F, Miller C, Hackshaw A, Brady G, Swanton C, Dive C. TRACERx Consortium. Pulmonary venous circulating tumor cell dissemination before tumor resection and disease relapse. *Nat Med*, 2019, 25(10), 1534-1539.

Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2008, 26(19), 3213-3221.

Connal S, Cameron JM, Sala A, Brennan PM, Palmer DS, Palmer JD, Perlow H, Baker MJ. Liquid biopsies: the future of cancer early detection. *J Transl Med*, 2023, 21(1), 118.

Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005, 23(7), 1420-1430.

De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(19), 6302-6309.

De Renzi G, De Marco G, De Meo M, Del Rosso E, Gazzaniga P, Nicolazzo C. In vitro cultures of circulating tumor cells: a potential tool to unravel drug sensitivity. *Cancer Drug Resist*, 2022, 5(1), 245-260.

Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, Snuderl M, Steller EJ, Fukumura D, Jain RK. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(50), 21677-21682.

Edd JF, Mishra A, Smith KC, Kapur R, Maheswaran S, Haber DA, Toner M. Isolation of circulating tumor cells. *iScience*, 2022, 25(8), 104696.

Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, Laplanche A, Chauchereau A, Lacroix L, Planchard D, Le Moulec S, André F, Fizazi K, Soria JC, Vielh P. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer*, 2011, 105(6), 847-853.

Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*, 2016, 10(3), 374-94.

Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V, Gao D. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 2015, 527(7579), 472-476.

Fučkar Čupić D. Kirurška patologija. *Medicina Fluminensis*, 2016, 52(3), 337-344.

Gomis RR, Gawrzak S. Tumor cell dormancy. *Mol Oncol*, 2017, 11(1), 62-78.

Habli Z, AlChamaa W, Saab R, Kadara H, Khraiche ML. Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. *Cancers*, 2020, 12(7), 1930.

Hanžek A. Metode za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:824878>.

Harper KL, Sosa MS, Entenberg D, Hosseini H, Cheung JF, Nobre R, Avivar-Valderas A, Nagi C, Girmius N, Davis RJ, Farias EF, Condeelis J, Klein CA, Aguirre-Ghiso JA. Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2<sup>+</sup> mammary cancer. *Nature*, 2016, 540(7634), 588-592.

Hendricks A, Brandt B, Geisen R, Dall K, Röder C, Schafmayer C, Becker T, Hinz S, Sebens S. Isolation and Enumeration of CTC in Colorectal Cancer Patients: Introduction of a Novel Cell Imaging Approach and Comparison to Cellular and Molecular Detection Techniques. *Cancers*, 2020, 12(9), 2643.

Hendricks A, Dall K, Brandt B, Geisen R, Röder C, Schafmayer C, Becker T, Hinz S, Sebens S. Longitudinal Analysis of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer Patients by a Cytological and Molecular Approach: Feasibility and Clinical Application. *Front Oncol*, 2021, 11, 646885.

Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, Nanduri LK, Werno C, Ehrl C, Maneck M, Patwary N, Haunschild G, Gužvić M, Reimelt C, Grauvogl M, Eichner N, Weber F, Hartkopf AD, Taran FA, Brucker SY, Fehm T, Rack B, Buchholz S, Spang R, Meister G, Aguirre-Ghiso JA, Klein CA. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*, 2016, 540(7634), 552-558.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2024., <https://www.hzjz.hr/>, pristupljeno 1. 9. 2024.

Hu X, Zang X, Lv Y. Detection of circulating tumor cells: Advances and critical concerns. *Oncol Lett*, 2021, 21(5), 422.

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13(1), 58-68.

Jie XX, Zhang XY, Xu CJ. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget*, 2017, 8(46), 81558-81571.

Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, Chen Y, Zhou J, Ji F, Wang L. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res*, 2022, 10(1), 58.

Klinički bolnički centar Zagreb, 2024., <https://www.kbc-zagreb.hr/>, pristupljeno 24. 8. 2024.

Krog BL, Henry MD. Biomechanics of the Circulating Tumor Cell Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1092, 209-233.

Kurma K, Alix-Panabières C. Mechanobiology and survival strategies of circulating tumor cells: a process towards the invasive and metastatic phenotype. *Front. Cell Dev. Biol*, 2023, 11, 118849911.

Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 2017, 168(4), 670-691.

Lawrence R, Watters M, Davies CR, Pantel K, Lu YJ. Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(7), 487–500.

Li X, Li Y, Shao W, Li Z, Zhao R, Ye Z. Strategies for enrichment of circulating tumor cells. *Transl Cancer Res*, 2020, 9(3), 2012-2025.

Liao K, Zhang X, Liu J, Teng F, He Y, Cheng J, Yang Q, Zhang W, Xie Y, Guo D, Cao G, Xu Y, Huang B, Wang X. The role of platelets in the regulation of tumor growth and metastasis: the mechanisms and targeted therapy. *MedComm*, 2020, 4(5), e350.

Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, Zhu F, Zhou D, Zheng S, Chen Y, Zhou J. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Sig Transduct Target Ther*, 2021, 6(1), 404.

Lozar T, Gersak K, Cemazar M, Kuhar CG, Jesenko T. The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiol Oncol*, 2019, 53(2), 131-147.

Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Politaki E, Voutsina A, Psyrris A, Georgoulas V, Lianidou E. ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy-Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(6), 1500-1510.

Menarini Silicon Biosystem, 2024., <https://www.siliconbiosystems.com/en-us/>, pristupljeno 26. 8. 2024.

Micalizzi DS, Maheswaran S, Haber DA. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Dev*, 2017, 31(18), 1827-1840.

Mićan K. Ekspresija gena c-MYC u pacijenata s kolorektalnim karcinomom. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2023. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:489137>.

Miller MC, Robinson PS, Wagner C, O'Shannessy DJ. The Parsortix™ Cell Separation System- A versatile liquid biopsy platform. *Cytometry A*, 2018, 93(12), 1234-1239.

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

Ning Y, Hanna DL, Zhang W, Mendez A, Yang D, El-Khoueiry R, Matsusaka S, Sunakawa Y, Stremitzer S, Parekh A, Okazaki S, Berger MD, Barzi A, Lenz HJ. Cytokeratin-20 and Survivin-Expressing Circulating Tumor Cells Predict Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients by a Combined Immunomagnetic qRT-PCR Approach. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(10), 2401-2408.



Omazić I. Epitelno mezenhimalna tranzicija u stromi adenokarcinoma in situ i invazivnog adenokarcinoma vrata maternice. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2019. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:143153>.

Pantel K, Alix-Panabières C. Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis*, 2012, 4(5), 446-447.

Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*, 2016, 35(10), 1216-1224.

Park ES, Jin C, Guo Q, Ang RR, Duffy SP, Matthews K, Azad A, Abdi H, Todenhöfer T, Bazov J, Chi KN, Black PC, Ma H. Continuous Flow Deformability-Based Separation of Circulating Tumor Cells Using Microfluidic Ratchets. *Small*, 2016, 12(14), 1909-1919.

Periša J, Bulić P, Špacir Prskalo Z, Gaće M, i Mayer LJ. Possibilities of liquid biopsy in clinical practice. *Libri Oncologici*, 2017, 45(1), 23-30.

Petrik J, Verbanac D, Fabijanec M, Hulina-Tomašković A, Čeri A, Somborac-Bačura A, Petlevski R, Grdić Rajković M, Rumora L, Krušlin B, Štefanović M, Ljubičić N, Baršić N, Hanžek A, Bočkor L, Čelap I, Demirović A, Barišić K. Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer: Detection Systems and Clinical Utility. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21), 13582.

Raza A, Khan AQ, Inchakalody VP, Mestiri S, Yoosuf ZSKM, Bedhiafi T, El-Ella DMA, Taib N, Hydrose S, Akbar S, Fernandes Q, Al-Zaidan L, Krishnankutty R, Merhi M, Uddin S, Dermime S. Dynamic liquid biopsy components as predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1), 99.

Redžović, A, Pavlović, S, Dobrila Dintinjana, R. Cirkulirajuće tumorske stanice – pogled u budućnost. *Medicina Fluminensis*, 2015, 51(3), 396-400.

Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol*, 2020, 13(6), 100773.

Ring A, Nguyen-Sträuli BD, Wicki A, Aceto N. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(2), 95-111.

Risson E, Nobre AR, Maguer-Satta V, Aguirre-Ghiso JA. The current paradigm and challenges ahead for the dormancy of disseminated tumor cells. *Nat Cancer*, 2020, 1(7), 672-680.

Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers*, 2018, 10(2), 52.

Rushton AJ, Nteliopoulos G, Shaw JA, Coombes RC. A Review of Circulating Tumour Cell Enrichment Technologies. *Cancers*, 2021, 13(5), 970.

Schuster E, Taftaf R, Reduzzi C, Albert MK, Romero-Calvo I, Liu H. Better together: circulating tumor cell clustering in metastatic cancer. *Trends Cancer*, 2021, 7(11), 1020-1032.

Sequist LV, Nagrath S, Toner M, Haber DA, Lynch TJ. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(3), 281-283.

Shi LH, Zhou L, Lei YJ, Xia L, Xie L. Needle tract seeding of papillary thyroid carcinoma after fine-needle capillary biopsy: A case report. *World J Clin Cases*, 2021, 9(15), 3662-3667.

Stanford, Explore Technologies, <https://techfinder.stanford.edu/>, pristupljeno 2. 7. 2024.

Tan CS, Kumarakulasinghe NB, Huang YQ, Ang YLE, Choo JR, Goh BC, Soo RA. Third generation EGFR TKIs: current data and future directions. *Mol Cancer*, 2018, 17(1), 29.

Thiele JA, Bethel K, Králíčková M, Kuhn P. Circulating Tumor Cells: Fluid Surrogates of Solid Tumors. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12, 419-447.

Togo S, Katagiri N, Namba Y, Tulafu M, Nagahama K, Kadoya K, Takamochi K, Oh S, Suzuki K, Sakurai F, Mizuguchi H, Urata Y, Takahashi K. Sensitive detection of viable circulating tumor cells using a novel conditionally telomerase-selective replicating adenovirus in non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*, 2017, 8(21), 34884-34895.

Tomasik B, Skrzypski M, Bieńkowski M, Dziadziuszko R, Jassem J. Current and future applications of liquid biopsy in non-small-cell lung cancer-a narrative review. *Transl Lung Cancer Res*, 2023, 12(3), 594-614.

Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev*, 2013, 27(20), 2192-2206.

Verbanac D, Čeri A, Hlapčić I, Shakibaei M, Brockmueller A, Krušlin B, Ljubičić N, Baršić N, Detel D, Batičić L, Rumora L, Somborac-Baćura A, Štefanović M, Čelap I, Demirović A, Petlevski R, Petrik J, Grdić Rajković M, Hulina-Tomašković A, Rako I, Saso L, Barišić K. Profiling Colorectal Cancer in the Landscape Personalized Testing-Advantages of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9), 4327.

Wang J, Lu W, Tang C, Liu Y, Sun J, Mu X, Zhang L, Dai B, Li X, Zhuo H, Jiang X. Label-Free Isolation and mRNA Detection of Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Lung Cancer for Disease Diagnosis and Monitoring Therapeutic Efficacy. *Anal Chem*, 2015, 87(23), 11893-11900.

Wang WC, Zhang XF, Peng J, Li XF, Wang AL, Bie YQ, Shi LH, Lin MB, Zhang XF. Survival Mechanisms and Influence Factors of Circulating Tumor Cells. *Biomed Res Int*, 2018, 2018, 6304701.

Wang Z, Sun N, Liu H, Chen C, Ding P, Yue X, Zou H, Xing C, Pei R. High-Efficiency Isolation and Rapid Identification of Heterogeneous Circulating Tumor Cells (CTCs) Using Dual-Antibody-Modified Fluorescent-Magnetic Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(43), 39586-39593.

World Health Organization (Svjetska zdravstvena organizacija), 2024., <https://www.who.int/>, pristupljeno 1. 9. 2024.

Yie SM, Luo B, Ye NY, Xie K, Ye SR. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23(5-6), 279-289.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Opseg istraživanja koje obuhvaća cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) i tehnologije za njihovo otkrivanje, izolaciju i karakterizaciju, eksponencijalno raste već niz godina. CTC su stanice koje se odvajaju od primarnog tumora i ulaze u krvotok te imaju sposobnost stvaranja metastaza na udaljenim mjestima u tijelu bolesnika. Glavni ciljevi istraživanja CTC-a uključuju: (1) otkrivanje procesa metastaziranja u ranoj fazi; (2) prediktivni značaj; (3) stratifikaciju onkoloških bolesnika; (4) prognostički značaj; (5) razumijevanje biologije tumora i mehanizama rezistencije na terapiju. Cilj ovog diplomskog rada je pružiti uvid u trenutne spoznaje o biologiji CTC-a te opisati istraživane metode za detekciju i kvantifikaciju CTC-a u bolesnika s karcinomom, s osvrtom na potencijalne primjene ovakvog pristupa u kliničkoj praksi. CellSearch® tehnologija je zlatni standard za detekciju i kvantifikaciju CTC-a u bolesnika s karcinomom dojke, prostate i kolorektalnim karcinomom. Ova tehnologija je za sada jedina klinički validirana od strane Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država. Princip CellSearch® tehnologije su magnetske kuglice obložene antitijelima koja prepoznaju površinski biljeg EpCAM. Ograničenje ove tehnologije je nedovoljna osjetljivost za detekciju tumorskih stanica koje ne izražavaju biljeg EpCAM. Zbog toga su razvijene nove tehnologije koje koriste različite pristupe, kao što su mikrofluidni uređaji, čipovi za hvatanje CTC-a, uređaji za *in vivo* hvatanje CTC-a, protočna citometrija i dr. Metode koje se baziraju na fizičkim karakteristikama stanica, poput veličine i deformabilnosti stanica, stječu sve veću popularnost jer omogućuju širu primjenu i pokazuju veliku iskoristivost u usporedbi sa CellSearch® tehnologijom. Dodatna istraživanja, validacija te standardizacija procesa su potrebni za potpunu implementaciju metoda za analizu CTC-a u kliničkoj praksi.

## 8.2. Summary

The field of research involving circulating tumor cells (CTCs) and technologies for their detection, isolation, and characterization has been growing exponentially for years. CTCs are cells that detach from the primary tumor, enter the bloodstream, and have the ability to form metastases at distant sites in the patient's body. The main objectives of CTC research include: (1) early detection of metastasis; (2) predictive significance; (3) stratification of oncology patients; (4) prognostic significance; (5) understanding tumor biology and mechanisms of therapy resistance. The aim of this master thesis is to provide insight into current knowledge about CTC biology and to describe researched methods for the detection and quantification of CTCs in cancer patients, with a focus on the potential applications of this approach in clinical practice. The CellSearch® technology is the gold standard for the detection and quantification of CTCs in patients with breast, prostate, and colorectal cancer. This technology is currently the only one approved by the U.S. Food and Drug Administration. The principle of CellSearch® technology is based on magnetic beads coated with antibodies that recognize the EpCAM surface marker. However, a limitation of this technology is its low sensitivity in detecting tumor cells that lack EpCAM expression. As a result, new technologies have been developed that utilize various approaches, such as microfluidic devices, CTC-capture chips, in vivo CTC-capture devices, flow cytometry, and more. Methods based on the physical characteristics of cells, such as size and deformability, are gaining popularity as they allow broader application and demonstrate greater efficiency compared to CellSearch® technology. Further research, validation, and process of standardization are required for the full implementation of methods for CTC analysis in clinical practice.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## METODE OTKRIVANJA I KVANTIFIKACIJE CIRKULIRAJUĆIH TUMORSKIH STANICA

Paula Popić

### SAŽETAK

Opseg istraživanja koje obuhvaća cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) i tehnologije za njihovo otkrivanje, izolaciju i karakterizaciju, eksponencijalno raste već niz godina. CTC su stanice koje se odvajaju od primarnog tumora i ulaze u krvotok te imaju sposobnost stvaranja metastaza na udaljenim mjestima u tijelu bolesnika. Glavni ciljevi istraživanja CTC-a uključuju: (1) otkrivanje procesa metastaziranja u ranoj fazi; (2) prediktivni značaj; (3) stratifikaciju onkoloških bolesnika; (4) prognostički značaj; (5) razumijevanje biologije tumora i mehanizama rezistencije na terapiju. Cilj ovog diplomskog rada je pružiti uvid u trenutne spoznaje o biologiji CTC-a te opisati istraživane metode za detekciju i kvantifikaciju CTC-a u bolesnika s karcinomom, s osvrtom na potencijalne primjene ovakvog pristupa u kliničkoj praksi. CellSearch® tehnologija je zlatni standard za detekciju i kvantifikaciju CTC-a u bolesnika s karcinomom dojke, prostate i kolorektalnim karcinomom. Ova tehnologija je za sada jedina klinički validirana od strane Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država. Princip CellSearch® tehnologije su magnetske kuglice obložene antitijelima koja prepoznaju površinski biljeg EpCAM. Ograničenje ove tehnologije je nedovoljna osjetljivost za detekciju tumorskih stanica koje ne izražavaju biljeg EpCAM. Zbog toga su razvijene nove tehnologije koje koriste različite pristupe, kao što su mikrofluidni uređaji, čipovi za hvatanje CTC-a, uređaji za *in vivo* hvatanje CTC-a, protočna citometrija i dr. Metode koje se baziraju na fizičkim karakteristikama stanica, poput veličine i deformabilnosti stanica, stječu sve veću popularnost jer omogućuju širu primjenu i pokazuju veliku iskoristivost u usporedbi sa CellSearch® tehnologijom. Dodatna istraživanja, validacija te standardizacija procesa su potrebni za potpunu implementaciju metoda za analizu CTC-a u kliničkoj praksi.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 2 grafička prikaza, 2 tablice i 80 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Cirkulirajuće tumorske stanice, CTC, obogaćivanje CTC-a, metode detekcije CTC-a, klinička značajnost CTC-a, tekuća biopsija, karcinom

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. Andrea Hulina Tomašković**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Anita Hafner**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujna 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### METHODS FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF CIRCULATING TUMOR CELLS

**Paula Popić**

#### SUMMARY

The field of research involving circulating tumor cells (CTCs) and technologies for their isolation, detection and characterization has been growing exponentially for years. CTCs are cells that detach from the primary tumor, enter the bloodstream, and have the ability to form metastases at distant sites in the patient's body. The main objectives of CTC research include: (1) early detection of metastasis; (2) predictive significance; (3) stratification of oncology patients; (4) prognostic significance; (5) understanding tumor biology and mechanisms of therapy resistance. The aim of this master thesis is to provide insight into current knowledge about CTC biology and to describe researched methods for the detection and quantification of CTCs in cancer patients, with a focus on the potential applications of this approach in clinical practice. The CellSearch® technology is the gold standard for the detection and quantification of CTCs in patients with breast, prostate, and colorectal cancer. This technology is currently the only one approved by the U.S. Food and Drug Administration. The principle of CellSearch® technology is based on magnetic beads coated with antibodies that recognize the EpCAM surface marker. However, a limitation of this technology is its low sensitivity in detecting tumor cells that lack EpCAM expression. As a result, new technologies have been developed that utilize various approaches, such as microfluidic devices, CTC-capture chips, in vivo CTC-capture devices, flow cytometry, and more. Methods based on the physical characteristics of cells, such as size and deformability, are gaining popularity as they allow broader application and demonstrate greater efficiency compared to CellSearch® technology. Further research, validation, and process of standardization are required for the full implementation of methods for CTC analysis in clinical practice.

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

Thesis includes: 49 pages, 2 figures, 2 tables and 80 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Circulating tumor cells, CTC, CTC enrichment, CTC detection methods, clinical significance of CTC, liquid biopsy, carcinoma

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

**Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Anita Hafner, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2024.